FABIOLA ELIZABETH VILLANOVA

Regulação da expressão gênica pela toxina da aranha

Phoneutria nigriventer* no corpo cavernoso *in vivo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Urologia

Orientadora: Dra. Katia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Villanova, Fabiola Elizabeth

Regulação da expressão gênica pela toxina da aranha *Phoneutria nigriventer* no corpo cavernoso *in vivo* / Fabiola Elizabeth Villanova. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração:Urologia.

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Toxinas biológicas 2.Venenos de aranha 3.Regulação da expressão gênica 4.Ereção peniana 5.Microarranjos de DNA

USP/FM/SBD-213/09

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais pelo amor incondicional,
pelo incentivo e os sacrifícios que sempre fizeram por nós...*

*Ao meu marido Élcio Leal por todos os
momentos compartilhados...*

*À Priscila Andrade, que sempre
fez tanto por mim...*

AGRADECIMENTOS

Ao grupo da disfunção erétil, meu co-orientador Dr Enrico Andrade, mentor da pesquisa inicial que iniciou este trabalho, pelo auxílio nas minhas dúvidas e a colaboração na parte experimental. Aos Dres Joaquim Claro e Mário Paranhos pela confiança depositada em mim ao ter me permitido ingressar no seu grupo na Urologia.

À Priscila Andrade “culpada” de meu mestrado e doutorado, por ter me ensinado tantas coisas nestes dez anos que nos conhecemos. Eu tenho muito orgulho de ser sua amiga!

Ao prezado Prof. Dr. Miguel Srougi pela oportunidade de desenvolver este trabalho na Urologia.

À Dra Katia Leite pela oportunidade de realizar a parte experimental da tese no seu laboratório e pelo auxílio na realização das imuno-histoquímicas.

À meu revisor anônimo da FAPESP, que com suas críticas contribuiu enormemente com a elaboração e progresso desta tese.

À meu cunhado Ednei Leal, futuro professor de línguas, pela correção do português e a sua esposa Simone Tristão, maravilhosa pessoa e fotógrafa pelas dicas no tratamento das imagens de imuno-histoquímica. Agradeço também ao pequeno André, que apesar de não ter corrigido nada, encheu de alegria a vida de todos desde que chegou...

Às queridas amigas Marta Privato e Regina Affonso pela correção minuciosa da qualificação, pelo auxílio nas minhas dúvidas e acima de tudo, pela amizade. Agradeço muito também a Márcia Kubrusly, Tadeo Stefano e Patrícia Nunes, exemplos de profissionais, sempre de bem

com a vida e prontos para ajudar; seus trabalhos me ajudaram muito para começar minha tese.

À Luciana Gilbert e Michele Junqueira, companheiras de muitos anos, sempre presentes e prontas para me auxiliar e trazer correndo os *kits* utilizados neste trabalho...A vida dá tantas voltas que agente sempre acaba se encontrando...

Às minhas irmãs de sangüe, Sandra, Silvia, Ingrid e Marina e a minhas irmãs do coração Nelly Santos, Priscila Andrade, Audrey Otsuka, Hellen Fuzii e Esther da Silveyra, não sei o que faria sem vocês...

Ao meu marido Élcio Leal, não importa o que aconteça, sempre do meu lado. Não teria chegado até aqui sem tua ajuda...

À nova geração que chegou, Irina e Isabela Bonafede, Luana da Sylveira, André “Chiquinho” Leal, João Pedro Reis, Daniel Nunes e Giulia Gilbert. Enorme compromisso tentar fazer um mundo melhor para vocês, pequeninhos...

À minha mãezinha, que me ensinou não apenas a andar e sim a voar.

Ao Dr Lanfranco Troncone pelo colaboração com nosso projeto fornecendo a toxina e o auxílio nas aplicações.

À Ricardo Borra da Universidade Ibirapuera, Márcio Almeida do Incor, e Adriana Sanhudo pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório LIM55, Sabrina Reis, Camila Piantino, Luciana Timoszczuk, Alberto Tomiyama, Mabel e Irán Amorim, pela agradável convivência no dia a dia.

Ao pessoal do setor de Patologia do Hospital Sirio Libanés, Josiane, Issac, Felipe e Robson pelo auxílio inestimável nas reações de imuno-histoquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo indispensável suporte financeiro e acima de tudo pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto.

Aos os funcionários da Faculdade de Medicina, em especial a Iones, Elisa, Veneranda, e Bety, que seria de nós sem vocês!

APÓIO FINANCEIRO

FAPESP: Fundação do Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo

Projetos nº 06/57922-3 e 06/57923-0

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ARANHAS – ASPECTOS GERAIS	2
1.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DE <i>PHONEUTRIA NIGRIVENTER</i>	4
1.3	TRANSMISSÃO DO IMPULSO ELÉTRICO NAS CÉLULAS	6
1.4	CARACTERÍSTICAS DOS PEPTÍDEOS Tx2-5 E Tx2-6	7
1.5	O TECIDO ERÉTIL E O MECANISMO DE EREÇÃO	9
1.5.1	Disfunção erétil e tratamento farmacológico	12
1.6	MICROARRANJOS E CHIPS DE DNA	13
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	ANIMAIS DE LABORATÓRIO	19
3.2	EXTRAÇÃO DO VENENO TOTAL E PURIFICAÇÃO DE Tx2-6	20
3.3	DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA EFETIVA DE Tx2-6	21
3.3.1	Tratamento com a dose mínima efetiva de Tx2-6	22
3.4	INCLUSÃO DO TECIDO PARA ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	22
3.5	EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO <i>GENECHIPS</i> (AFFYMETRIX)	23
3.5.1	Características do GeneChip	23
3.5.2	Extração de RNA, análises quantitativa e qualitativa	25

3.5.2.1	Isolamento do RNA poli-A	26
3.5.2.2	Síntese do DNAc e RNAc a partir do RNA poli-A	27
3.5.2.3	Purificação e fragmentação do RNAc	28
3.5.3	Hibridização, coloração e quantificação da fluorescência do <i>GeneChip</i>	29
3.6	ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	31
3.6.1	Categorização dos genes diferencialmente expressos baseados no GO	31
3.6.1.1	Características do programa DAVID	33
3.6.1.2	Análise estatística implementada no algoritmo do programa DAVID	34
3.6.1.3	Redes da função dos genes diferencialmente expressos no BINGO	36
3.7	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS <i>GENECHIPS</i>	37
3.7.1	Reação em cadeia da polimerase quantitativa: PCRq	37
3.7.1.1	Fundamento do PCRq	37
3.7.1.2	Extração de RNA	39
3.7.1.3	Síntese do DNAc	39
3.7.1.4	Desenho dos oligonucleotídeos para PCRq	39
3.7.1.5	Incubação das reações de PCRq	41
3.7.1.6	Quantificação relativa das reações das PCRq	42
3.7.1.7	Análise estatística das reações de PCRq	43
3.7.2	Análise histomorfológica e reações de imuno-histoquímica	43
3.7.2.1	Inclusão do tecido erétil e coloração com HE	43
3.7.2.2	Reações de imuno-histoquímica	44
3.7.2.3	Análise e quantificação da marcação imuno-histoquímica	46
4	RESULTADOS	49
4.1	ENSAIO ATIVIDADE BIOLÓGICA DE Tx2-6	50
4.1.1	Dose mínima de Tx2-6 capaz de induzir ereção pela via intracavernosa	50

4.2	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DO PÊNIS DE CAMUNDONGO	52
4.3	ANÁLISE QUALITATIVA DO RNA _m UTILIZADO NOS <i>GENECHIPS</i>	52
4.4	ANÁLISE GLOBAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	54
4.4.1	Identificação de genes diferencialmente expressos	54
4.4.1.1	Detalhamento da função biológica dos genes superexpressos com o DAVID	54
4.4.1.2	Genes superexpressos que se ligam aos cátions e metais iônicos analisados com o programa BINGO	56
4.4.1.2.1	Atividade de ligação	57
4.4.1.2.2	Atividade catalítica	58
4.4.1.2.3	Atividade de transporte através da membrana plasmática	59
4.4.1.3	Genes superexpressos relacionados a receptores e ligação a receptores	60
4.4.1.3.1	Atividade de receptores	61
4.4.1.3.2	Atividade de ligação a receptores	62
4.4.1.3.3	Atividade de quinases	63
4.4.2	Detalhamento da função biológica dos genes subexpressos	63
4.5	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR PCR _q E IMUNO-HISTOQUÍMICA	66
4.5.1	PCR _q dos genes diferencialmente expressos	66
4.5.1.1	Análise estatística dos resultados da PCR _q	66
4.5.2	Avaliação da expressão protéica por imuno-histoquímica	70
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	83
7	ANEXOS	85
8	REFERÊNCIAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abcc – gene do membro 1 da subfamília C da ATP binding cassette

Ach – Acetilcolina

AMP: monofosfato de adenosina

AMPc (cAMP)– monofosfato de adenosina cíclico

ATP: trifosfato de adenosina

BLAST – *Basic Local Alignment and Search Tool*

BSA – Albumina Sérica Bovina

Bind –ligação, do inglês *binding*

Ca^{2+} – íon cálcio

Cd^{2+} – íon cádmio

Cu^{+} – íons cobre

DAB - Diaminobenzidina

DAG – Gráfico Acíclico Direto

DE – disfunção erétil

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DNAC – Ácido desoxiribonucleico complementar

DNAss – DNA fita simples

DMSO - Dimetil sulfóxido

DTT - ditioneitol

ednrb – gene do receptor de endotelina tipo B

Ednrb – (proteína) receptor de endotelina tipo B

eNOS (NOS3) – óxido nítrico sintase endotelial

fn1 – gene da fibronectina 1

Fn1 – (proteína) fibronectina 1

Fe^{2+} – íon ferroso

Fe^{3+} - íon férrico

GF – fator de crescimento, do inglês *Growth Factor*

GMP: monofosfato de guanosina

GMPC (cGMP) – monofosfato de guanosina cíclico

GO – Ontologia Gênica

G-prot - proteína G

GTP: trifosfato de guanosina

h – hora

HE – Hematoxilina-Eosina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

IFN - interferon

junb – gene que codifica para o oncogene Jun-B

K⁺ – íon potássio

Kv (VGKC) – Canais de potásio regulados por voltagem, do inglês *Voltage Gated Potassium Channel*

LDL – lipo-proteína de baixa densidade

Mg²⁺ – íon magnésio

MM – pareamento imperfeito (do inglês *mismatch*)

Min –Minuto

mL –Mililitro

Mn²⁺ – íon manganês

Na⁺ –íon sódio

Nav (VGSC) – canais de sódio regulados por voltagem; do inglês *Voltage gated sodium channel*

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

nNOS (NOS1) – óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido Nítrico

Oligo(dT) – Oligo Desoxitimidilato

OR – óxidoredutase

PCRq – Reação de Cadeia da Polimerase Quantitativa

PDE – fosfodiesterase

pdgfra – gene do receptor tipo α do fator de crescimento de plaquetas

Pdgfra – (proteína) receptor tipo α do fator de crescimento de plaquetas

PM – pareamento perfeito (do inglês *Perfect Match*)

Rec – receptor

RT- Transcrição Reversa

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAc – Ácido ribonucleico complementar

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

RNA_{poli-A} - Ácido ribonucleico com cauda de poli-Adenosina

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

sod1 – gene da superóxido dismutase 1

Sod1 – (proteína) superóxido dismutase 1

Seg –Segundo

sparc – gene da glicoproteína de secreção, ácida e rica em cisteína

Sparc – (proteína) glicoproteína de secreção, ácida e rica em cisteína

SSC – Tampão Salina-Sódio Citrato

sstr2 – gene do receptor tipo 2 de somatostatina

Sstr2 – (proteína) receptor tipo 2 de somatostatina

ST – serina treonina

STK – serina treonina quinase

TK – tirosina quinase

TM – transmembrana

UV – Ultra Violeta

VEGFR - receptor do fator de crescimento vascular endotelial

VG – regulados por voltagem, do inglês *Voltage Gated*

VGCC – Canais de cálcio regulados por voltagem, do inglês *Voltage Gated Calcium Channel*

VGKC (Kv) – Canais de potássio regulados por voltagem, do inglês *Voltage Gated Potassium Channel*

VGSC (Nav) – Canais de sódio regulados por voltagem, do inglês *Voltage Gated sodium Channel*

Zn²⁺ – íon zinco

7TM – domínio sete transmembrana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Phoneutria nigriventer em posição de ataque/defesa	3
Figura 2 -	Sequência de aminoácidos dos peptídeos Tx2-5 e Tx2-6	8
Figura 3 -	Mecanismos moleculares envolvidos na contração do músculo liso no estado de flacidez do pênis	11
Figura 4 -	Mecanismos moleculares envolvidos no relaxamento do músculo liso no estado de ereção peniana	12
Figura 5 -	Representação esquemática de um micorarranjo ou <i>Genechip</i> comercializado pela Affymetrix	24
Figura 6 -	Representação esquemática da cobertura de um gene pelas sondas PM e MM e sua disposição no arranjo	25
Figura 7 -	Experimento de avaliação do perfil de expressão gênica de camundongos pela técnica de microarranjos em chip de DNA	27
Figura 8 -	Níveis funcionais de categorização dos genes pelos algoritmos implementados nos programas de ontologia gênica	32
Figura 9 -	(A) Camundongo sem ereção após aplicação de solução salina por via intracavernosa. (B) Estado de ereção peniana em apos injeção intracavernosa de Tx2-6	51
Figura 10 -	Fotomicrografias de cortes histológicos mostrando imagens digitalizadas de parte do corpo cavernoso (corte longitudinal) de camundongos dos grupos controle e inoculado com Tx2-6	51
Figura 11 -	Eletroferogramas dos pools de RNAs dos grupos (A) Controle; (B) Tratado com Tx2-6 pela via ICV	53
Figura 12 -	Função molecular (nível 2) dos 719 genes superexpressos no tecido erétil de camundongos inoculados com Tx2-6 analisados pelo programa DAVID	56
Figura 13-	Atividade de ligação dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo programa BINGO	57

Figura 14 -	Atividade catalítica/transdução de sinais dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo programa BINGO	58
Figura 15 -	Atividade de transportadores através da membrana plasmática dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo BINGO	59
Figura 16 -	Atividade de receptores dos genes superexpressos anotados nas categorias de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO	61
Figura 17 -	Atividade de ligantes a receptores dos genes superexpresso anotados na categoria de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO	62
Figura 18 -	Atividade de quinases dos genes anotados na categoria de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO	63
Figura 19 -	Função molecular dos genes subexpressos (nível 2) no tecido erétil de camundongos inoculados com Tx2-6 analisados pelo programa DAVID	64
Figura 20 -	Expressão gênica relativa obtida na PCRq dos genes <i>ednbr</i> , <i>fn1</i> , <i>pdgfr-α</i> , <i>sparc</i> e <i>sstr2</i> representada nos gráficos <i>box-plot</i>	69
Figura 21 -	Expressão gênica relativa obtida na PCRq dos genes <i>sod1</i> e <i>eNOS</i> representada nos gráficos <i>box-plot</i>	69
Figura 22 -	Fotomicrografias da localização das proteínas: A) <i>Pdgfr-α</i> ; B) <i>Sstr2</i> ; C) <i>Fn1</i> , através de reações de imuno-histoquímica no corpo cavernoso de camundongo	71
Figura 23 -	Análise por avaliação imuno-histoquímica das proteínas <i>Fn1</i> , <i>Pdgfrα</i> e <i>Sstr2</i> no corpo cavernoso de camundongo	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCRq	40
Tabela 2 -	Descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica	46
Tabela 3 -	Genes superexpressos na categoria transportadores relacionados com canais iônicos	60
Tabela 4 -	Genes subexpressos relacionados à categoria de canais iônicos	65
Tabela 5 -	Médias dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct	67

RESUMO

Villanova, FE. Regulação da expressão gênica pela toxina da aranha *Phoneutria nigriventer* no corpo cavernoso *in vivo* [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2009.

INTRODUÇÃO: O aracnídeo *Phoneutria nigriventer*, também conhecido por aranha-armadeira, possui um veneno complexo, contendo vários peptídeos que ativam canais iônicos nas células. Dentre estes, só dois neuropeptídeos, Tx2-5 e Tx2-6, destacam-se por relaxar o músculo liso trabecular do corpo cavernoso, induzindo ereção peniana em camundongos e ratos. Este efeito tem sido associado à produção de óxido nítrico pela ativação de óxido nítrico sintases. No entanto, faltam estudos mais amplos para determinar o papel de Tx2-6 na indução da ereção.

OBJETIVOS: Identificar os genes diferencialmente expressos no tecido erétil de camundongos após indução da ereção pela Tx2-6 utilizando microarranjos de oligonucleotídeos. Validação dos resultados obtidos nos microarranjos por PCR quantitativa e imuno-histoquímica. **MATERIAIS**

E MÉTODOS: Camundongos machos e adultos da linhagem *Swiss* foram divididos em dois grupos: controle (n=10), inoculados pela via intracavernosa com 20 µl de solução salina; e tratado (n=10), os quais receberam 0,006µg/animal do peptídeo Tx2-6 diluído em 20 µl de salina pela via intracavernosa. Uma hora após o início da ereção no grupo tratado todos os animais foram sacrificados e retirou-se o pênis. Este último foi dividido em dois fragmentos, uma parte do material foi congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80°C até a extração do RNA para os experimentos de microarranjos e PCR quantitativa; outra parte foi utilizada para avaliação imuno-histoquímica. **RESULTADOS:** No grupo tratado a ereção foi observada 30-45 minutos

após aplicação de Tx2-6 e mantida durante 120 minutos. Os camundongos de grupo controle não apresentaram nenhum indício de ereção. Nos experimentos de microarranjos, onde foram analisados 34.000 genes representando o genoma total do camundongo, identificou-se 3.803 (12,3%) genes com expressão diferencial de pelo menos $\geq \pm 1,5$ vez entre os grupos (1.823 genes superexpressos e 1.980 genes subexpressos no grupo tratado comparado ao controle). Os genes *ednrb*, *sparc*, *fn1*, *sstr2*, *pdgfr α* foram selecionados para validação dos microarranjos por PCR quantitativa e confirmaram a superexpressão em relação aos controles. As proteínas Fn1, Sstr2 e Pdgfr α resultaram aumentadas no grupo tratado após avaliação imuno-histoquímica.

CONCLUSÕES: A inoculação de Tx2-6 pela via intracavernosa alterou o perfil de expressão gênica no tecido erétil de camundongos. O número de genes superexpressos foi similar ao de genes subexpressos. Serão necessários outros estudos para entender melhor as vias moleculares que Tx2-6 afeta na indução da ereção peniana.

Descritores: 1.Toxinas biológicas 2.Venenos de aranha 3.Regulação da expressão gênica 4.Ereção peniana 5.Microarranjos de DNA

SUMMARY

Villanova, FE. *In vivo* regulation of gene expression in the corpus cavernosum by the *Phoneutria nigriventer* toxin [Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2009.

INTRODUCTION: The *Phoneutria nigriventer* arachnid, also known as armed-spider, has a complex venom, composed by several peptides that affect cellular ionic channels.

Among these, only two neuropeptides, Tx2-5 and Tx2-6 induce penile erection in mice and rats and this effect has been associated with the production of nitric oxide by the activation of nitric oxide synthases. Moreover, there is a scarcity of studies focusing on the role of Tx2-6 in the induction of erection.

OBJECTIVES: To identify the differently expressed genes in the erectile tissue of mice after erection induction by Tx2-6 using oligonucleotide microarrays. To validate microarray results by quantitative PCR and immunohistochemistry.

MATERIALS AND METHODS: *Swiss* adult male mice were divided in two groups: control (n=10) were injected intracavernously with 20 µl of saline solution; and treated (n=10) were injected intracavernously with 0.006µg/mouse of the Tx2-6 peptide diluted in 20 µl of saline solution. After checking the penile erection in the treated group, all mice were sacrificed one hour after the beginning of erection for the removal of the penis. Penile organ was divided into two fragments, one piece was immediately frozen in liquid-nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction to make the microarray and quantitative PCR experiments; the other was reserved for immunohistochemistry analysis. RESULTS: In the treated group, erection was noticed 30-45 minutes after Tx2-6 inoculation and lasted for 120 minutes. Control mice did not present any sign of erection. Considering as differentially expressed genes with a $\geq \pm 1.5$ fold expression difference, of the

34,000 genes on the microarray we identified 3,803 (12.3%) genes differentially expressed between the groups (1,823 genes up-regulated and 1,980 genes down-regulated in the treated group compared to controls). The *ednrb*, *sparc*, *fn1*, *sstr2*, *pdgfra* genes were selected for validation of microarray results by using quantitative PCR and confirmed the up-regulation when compared to controls. After immunohistochemistry analysis the Fn1, Sstr2 and Pdgfra proteins were found increased in the treated group. CONCLUSIONS: The intracavernous inoculation of Tx2-6 modified the gene expression profile of erectile tissue of mice. The number of up-regulated and down-regulated genes was similar. Further studies are needed to understand the molecular pathways that Tx2-6 affect to induce penile erection.

Descriptors: 1.Biological toxins 2.Spider venoms 3. Gene expression regulation 4.Penile erection 5.DNA microarrays

1 - Introdução

2 - Objetivos

3 - Materiais e Métodos

4 - Resultados

5 - Discussão

6 - Conclusões

7 - Anexos

8 - Referências

3.7.1.6 Quantificação relativa das reações das PCRq

Nos experimentos de PCRq deve-se considerar a possibilidade de variação de concentração da amostra inicial de DNAc na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam normalizados. A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a um gene chamado de normalizador de expressão constitutiva, que apresenta pouca variação nas diversas condições. Neste estudo foram utilizados como genes normalizadores *actb* e *gapdh*.

Para a quantificação relativa, foi obtida a média dos *Cycle Threshold* (Cts) de todas as amostras em triplicatas. Os valores de Ct foram normalizados com o Ct de gene normalizador. A normalização e a quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁸⁷ utilizando a fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1 + E)^{-\Delta Ct_{geneAlvo}}}{(1 + E)^{-\Delta Ct_{geneControle}}}.$$

onde E = eficiência da reação; Ct = *threshold cycle* (ciclo da reação em que a fluorescência da amostra excede o sinal basal do fluoróforo ROX); ΔCT do gene alvo = (Ct alvo – Ct normalizador) no grupo tratado; ΔCt do gene controle ou calibrador = (Ct alvo – Ct normalizador) no grupo controle.

Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada para o gene calibrador *actb* ou

gapdh. O valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ indica a diferença (em vezes) na expressão gênica relativa nos grupo tratado em relação ao grupo controle. Esta fórmula para o cálculo da expressão gênica assume que a eficiência (F) de amplificação do gene alvo e do gene de referência é igual a 2, ou seja, de 100%. Genes que mostraram valores acima de 1,5 vez foram considerados como diferencialmente expressos.

3.7.1.7 Análise estatística das reações de PCRq

Os grupos ou categorias, foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney com uma significância estabelecida de $p < 0,05$. Os resultados foram configurados em forma de gráficos de caixa (*box-plot*) utilizando o programa MedCalc 9.3 (Mariakerke, Bélgica), onde as variáveis quantitativas foram resumidas através da média, variação interquartil (Q1-Q3) e valores de mínimo e máximo.

3.7.2 Análise histomorfológica e reações de imuno-histoquímica

3.7.2.1 Inclusão do tecido erétil e coloração com HE

Após sacrifício dos camundongos por deslocamento cervical, o pênis foi amputado na base e colocado em formol tamponado com tampão fosfato pH7 a 10% durante 24 hs. A amostra biológica foi submetida a álcool e xilol em processador de tecidos *Shandon Pathcentre Tissue Processor* (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e finalmente o tecido de quatro animais por grupo foi incluído em paraplast.

Após a inclusão do tecido em blocos de paraplast, estes foram resfriados a -

20°C durante 20 min. para a realização dos cortes utilizando o micrótomo Shandon Finesse 325 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), com espessura padronizada de 3 µM. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e aqueles destinados aos exames imuno-histoquímicos foram colocados em lâminas tratadas com silano (3-aminopropiltrietixisilano, Sigma, Co).

3.7.2.2 Reações de imuno-histoquímica

Considerando que os experimentos com os chips mensuram somente a quantidade RNA mensageiro (transcrição gênica) produzido e isso não necessariamente implica na expressão protéica (síntese protéica) resultado da tradução do RNAm dos genes, em razão utilizamos a marcação de proteínas por reações de imuno-histoquímica desses genes para corroborar o perfil de expressão observado nos chips.

Os fragmentos de tecido erétil nas lâminas silanizadas foram desparafinizados em estufa a 80°C, depois submetidos a banhos de xilol (quatro banhos de xilol por 5 min cada), hidratados em concentrações decrescentes de etanol (99, 95, 80 e 50%) e finalmente em água destilada. Após a hidratação e para realizar a recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas no tampão específico para cada anticorpo e colocadas em panela a vapor a 95°C por 30 min. Após este período as lâminas foram retiradas do vapor e deixadas resfriando a temperatura ambiente, dentro dos seus respectivos tampões, por 15 min e lavadas abundantemente em água corrente. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram mergulhadas em banhos de H₂O₂ (3% ou 10 vol., Nalgum) 2 vezes por 10 min e após, lavadas

abundantemente em água corrente. As lâminas foram mantidas em tampão Tris HCl pH 7,6 para impedir o ressecamento das mesmas até ser submetidas a incubação com o anticorpo.

As lâminas foram retiradas do tampão, o excesso foi secado com papel toalha ao redor do tecido, e deitadas em uma câmara úmida específica para reação de imuno-histoquímica. O anticorpo primário diluído em PBS em concentrações determinadas previamente foi colocado sobre o corte e mantido a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, a solução com o anticorpo primário foi retirada utilizando Tris HCl pH7 a 4°C por duas vezes. O anticorpo secundário biotinilado (Reagente 1B do *Histostain-SP Kit AEC, Broad Spectrum*, Invitrogen, USA) foi aplicado sobre o material por 20 min a 20°C e as lâminas foram protegidas da luz. Após nova lavagem com Tris HCl pH 7,6 os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase a 20°C por 20 min. (Solução HRP, *Horseradish Peroxidase-Streptavidin*, Histostain, Invitrogen, USA). Em seguida, os cortes histológicos foram lavados novamente com Tris HCl pH7,6 e para a revelação o material foi incubado numa solução de PBS pH 7,4 com diaminobenzidina 0,1 % p/v (DAB; 3,3 diaminobenzidine, Sigma, USA) durante 20 min.

Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente, realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 3 min, seguindo-se nova lavagem em água corrente. Os cortes foram tratados com água amoniacal 0,2% (3 passagens rápidas) e desidratados em três banhos de álcool (50, 80, 95 e 100%), seguidos de 4 banhos de xilol (5 min cada) e montados com lamínula e verniz vitral (Acrilex).

Selecionamos para validação as seguintes proteínas: o receptor α do fator de

crescimento plaquetário (Pdgfr α); o receptor de somatostatina 2 (Sstr2) e a proteína fibronectina (Fn1).

Os anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica, titulação, tampão de recuperação antigênica, fabricante, especificidade e clones estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Anticorpo Primário	Diluição	Recuperação antigênica	Fabricante	Especificidade	Clone
Pdgfr- α	1/600	Tampão citrato pH6	Santa Cruz Biotechnology Inc.	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	IgG Policlonal
Sstr2	1/150	Tampão citrato	Santa Cruz Biotechnology Inc.	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , outros mamíferos	IgG Policlonal
Fn1	1/50	Tampão citrato pH6	Merck Biosciences	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	IgG Policlonal

3.7.2.3 Análise e quantificação da marcação imuno-histoquímica

Para quantificar a expressão protéica, utilizamos um microprocessador com os programas para tratamento das imagens Photoshop CS2 (Adobe, CA, USA) e programas específicos para análises de imagem Image J 1.40 (disponível no endereço eletrônico <http://wareseeker.com/download/imaiej-1.40.rar/447466>) e Imagelab 2000 (Diracom, São Paulo, Brasil). A captura de imagens foi realizada por

câmera fotográfica (Nikon), acoplada em microscópio Nikon. Nos cortes histológicos do tecido peniano foram identificadas e selecionadas as regiões do corpo cavernoso e quatro imagens de cada lâmina, em aumento de 400X, foram fotografadas para posterior análise.

Em cada imagem foi quantificada a superfície que apresentava a cor marrom característica da reação positiva para imuno-histoquímica.

A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada de forma a contrastar a marcação marrom-castanha da diaminobenzidine (DAB) da contra coloração de fundo, por limiar de cor.

Para isso, cada arquivo de imagem foi aberto no programa Image J e a ferramenta *Deconvolution* foi utilizada (*vectors* H DAB, Hematoxilina Diaminobenzidina) para separação das cores. Três arquivos foram gerados e só foi salvo o arquivo correspondente à cor 3, com extensão *.bmp. A proporção da cor marrom no campo foi quantificada pelo programa Imagelab. Para isso cada imagem foi aberta, e após aplicação da ferramenta Subtração RGB selecionamos manualmente as regiões marcadas com DAB, que melhor se ajustassem à marcação observada na imagem original. Assim encontramos a porcentagem da imagem que apresentou marcação marrom-castanha característica do DAB. Após a determinação da marcação com DAB no campo, e considerando que o tecido no corpo cavernoso apresenta espaços vasculares amplos, chegando a totalizar até 50 % do campo, a porcentagem da marcação do DAB foi corrigida pela porcentagem de tecido presente em cada campo. Para determinar a porcentagem de tecido por campo, os arquivos de imagem originais, sem manipulação e com extensão *.JPG foram abertos no Imagelab. A ferramenta Subtração RGB foi aplicada e foi selecionado o

último pico, correspondente a superfície do campo com tecido. Esse valor foi anotado em planilha de dados do Excel para posterior correção dos valores obtidos na marcação com DAB. A porcentagem da área marcada com DAB em relação á superfície do campo com tecido presente (∂) foi calculada pela seguinte expressão:

$$\partial = \frac{\partial_{DAB} \times 100}{\partial_{campo}}.$$

Sendo que ∂_{DAB} corresponde a 100 vezes a área do campo visual marcada com DAB, e ∂_{campo} corresponde à área do campo com tecido.

O valor da porcentagem média dos quatro campos analisados para cada amostra foi registrado para as análises estatísticas.

Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para amostras independentes para os valores obtidos para cada marcação imuno-histoquímica nos grupos controle e tratado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados utilizando o programa MedCalc 9.3 (Mariakerke, Bélgica).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio atividade biológica do peptídeo Tx2-6 e determinação da dose letal

Inicialmente verificamos a ação da toxina Tx2-6. Para tanto, fizemos o ensaio de atividade biológica da Tx2-6. Os animais foram observados durante duas horas e apresentaram sinais de neurotoxicidade (hipersalivação, lacrimejamento, sinais de dor, hiperventilação respiratória) e priapismo. O priapismo surgiu 40 minutos após inoculação da toxina e se manteve até o sacrifício do animal, cerca de 80 minutos após a aplicação da toxina em decorrência de hemorragia pulmonar, confirmado por necropsia e exame anatomopatológico.

4.1.1 Dose mínima de Tx2-6 capaz de induzir ereção pela via intracavernosa

Partindo do conhecimento prévio das doses mínimas efetivas de toxina (0,012 µg/animal) que induzem ereção pela via IPE, testamos doses de Tx2-6 (0,024; 0,012; 0,006; 0,003 µg e 0,0012 µg) pela via intracavernosa. Foi verificado que a mínima dose capaz de ocasionar ereção foi de 0,006 µg /animal, sendo que os cinco animais apresentaram ereção num intervalo de 35 a 45 minutos após a aplicação, como pode ser observado na Figura 9. O término da ereção ocorreu 120-140 minutos após a aplicação. Nesta dose mínima não foi verificado nenhum efeito colateral sistêmico nem local.

(A) Controle

(B) Tratado com Tx2-6

Figura 9 - (A) Camundongo sem ereção após aplicação de solução salina por via intracavernosa. (B) Estado de ereção peniana em apos injeção intracavernosa de Tx2-6.

CONTROLE **TRATADO**

Figura 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos mostrando imagens digitalizadas de parte do corpo cavernoso (corte longitudinal) de camundongos dos grupos controle e inoculado com Tx2-6. Nos cortes histológicos dos camundongos tratados observam-se espaços vasculares congestionados e dilatados (setas) por efeito do peptídeo Tx2-6 (400x).

4.2 Análise histomorfológica do pênis de camundongo

Histologicamente, o corpo do pênis do camundongo é formado pela união de dois corpos cavernosos, separados parcialmente por um septo intracural por onde passam vasos sanguíneos e nervos, e um corpo esponjoso localizado ventralmente que envolve a uretra. Os corpos cavernosos estão rodeados por uma espessa camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. No terço distal do pênis dos roedores está presente um osso peniano, ou *baculum*, que se inicia na transição do corpo para a glândula, como uma continuação do corpo cavernoso do pênis^{88,89}. Os corpos cavernosos do pênis do camundongo, assim como dos humanos, são constituídos de tecido erétil que é formado por feixes de fibras musculares lisas, fibras colágenas, fibroblastos e elastina que se dispõem em múltiplas direções formando uma malha esponjosa deixando lacunas revestidas por endotélio vascular chamado de espaços sinusoidais ou sinusóides. O tecido erétil dos camundongos mostrou dilatação e congestão dos espaços vasculares após tratamento com o peptídeo Tx2-6 (Figura 10).

4.3 Análise qualitativa do RNAm utilizado nos *GeneChips*

Realizamos a análise por eletroferogramas (Bioanalyzer). O RNA extraído apresentou pouca contaminação com RNA ribossomal, menos de 2% do total (Figura 11).

(A)

(B)

Figura 11 - Eletroferogramas dos *pools* de RNAs dos grupos (A) Controle; (B) Tratado com Tx2-6 pela via ICV. O eixo Y mostra a quantidade de RNA na amostra. O eixo X mostra o perfil de migração dos diferentes tipos de RNA (de acordo com o peso molecular). O pico observado no eixo X no tempo de 20 s representa o RNAm; e o pico entre 30s e 40s refere-se ao RNA ribossomal que corresponde a uma contaminação <2 %. A figura localizada ao lado de cada gráfico mostra o padrão de migração dos RNAs no gel. Análise realizada pelo programa *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

4.4 Análise global dos genes diferencialmente expressos identificados nos GeneChips

4.4.1 Identificação de genes diferencialmente expressos

A análise do perfil de expressão gênica baseada na abundância do RNA nos grupos tratado e controle revelou um aumento significativo na expressão (superexpressão) de 5,3% (1823) e uma subexpressão de 6,5% (1980) dos genes. O critério de expressão diferencial neste experimento foi de 1,5 vez de *fold change* comparando os camundongos inoculados com o peptídeo Tx2-6 em relação aos controles.

A seguir, analisaremos separadamente, em primeiro lugar os genes superexpressos e na continuação os subexpressos.

4.4.1.1 Detalhamento da função biológica dos genes superexpressos analisados com o programa DAVID

Na primeira análise exploratória utilizamos os recursos do programa DAVID para determinar a função de 1823 genes superexpressos em camundongos inoculados com Tx2-6 quando comparados com o grupo controle. Os resultados dessa classificação inicial estão resumidos no gráfico da figura 13, que mostra a percentagem de genes alvo com função definida e que foram inclusos em alguma categoria de função molecular. Assim, dos 1823 genes superexpressos, somente 719 (39%) deles foram anotados; os remanescentes são genes que não tem função definida.

A Figura 12 mostra as diferentes categorias funcionais dos 719 genes superexpressos analisados pelo programa DAVID no nível 2. A maioria (69%) dos genes superexpressos apresentou função de ligação. Assim, 25% desses genes têm função de ligação a cátions, que são os íons com carga positiva (área lilás na Figura 12). Da mesma forma, 26% dos genes têm função de ligação a íons metálicos (metais com carga positiva ou negativa). Existem genes com função de ligação inespecífica às macromoléculas (açúcares e proteínas). Por exemplo, 2% dos genes se ligam a complexos protéicos e outros 3% ligam-se em açúcares. Por outro lado, 1% dos genes se liga aos fatores de crescimento.

Outro grupo interessante de genes são os que se ligam a receptores (7%) e os que têm atividade de receptores (13%).

Visto que a maior parte dos genes superexpressos em camundongos inoculados com Tx2-6 possuem uma função inespecífica, como ligação a íons metálicos, e esse tipo de função biológica é pouco informativa no que se refere ao potencial de ação do peptídeo Tx2-6. Uma análise mais detalhada das principais categorias funcionais foi realizada utilizando o programa BINGO.

Figura 12 - Função molecular (nível 2) dos 719 genes superexpressos no tecido erétil de camundongos inoculados com Tx2-6 analisados pelo programa DAVID. As áreas do gráfico são proporcionais ao número de genes classificados em cada categoria de função celular. As diferentes cores indicam as distintas categorias.

4.4.1.2 Genes superexpressos que se ligam aos cátions e metais iônicos analisados com o programa BINGO

Em primeiro lugar, analisamos conjuntamente os genes anteriormente incluídos na categoria funcional de ligação a cátions (íons positivos) e na categoria de metais iônicos. Esta análise mostrou que no nível 2, os genes se agrupam em três atividades moleculares principais: i) ligação; ii) catalítica; iii) transporte através da membrana plasmática. A seguir, uma breve descrição das funções e dos genes inclusos em cada uma destas categorias.

4.4.1.2.1 Atividade de ligação

A função de ligação (*binding* na Figura 13) contém a categoria de ligantes a cátions e a metais iônicos. Além disso, obtivemos um refinamento dos resultados obtidos utilizando o programa DAVID, visto que identificamos genes que se ligam ao potássio, ao zinco, ao cobre e ao ferro. Nesta última categoria de genes que se ligam ao ferro, os genes identificados se ligam especificamente a íons férricos (Fe^{3+}).

Figura 13 - Atividade de ligação dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo programa BINGO. Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo incluídos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica. *Bind*: ligação; Ca^{2+} : íons cálcio; Cu^{+} : íons cobre; Fe^{2+} : íons ferrosos; Fe^{3+} : íons férricos; K^{+} : íons potássio; Mn^{2+} : íon manganês; Mg^{2+} : íons magnésio.

Figura 14 - Atividade catalítica/transdução de sinais dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo programa BINGO. Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo inclusos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância de inclusão dos genes alvo em uma determinada categoria funcional está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica. OR: óxidoreductase; rec: receptor; ST: serina treonina; STK: serina treonina kinase; TGFBR: receptor do fator transformante tipo β ; TM: transmembrana

transporter

TM transporter

substrate-specific transporter

passive TM transporter

substrate-specific TM transporter

oxygen transporter

channel

ion TM transporter

gated channel

substrate specific channel

metal ion TM transporter

cation TM transporter

voltage-gated channel

ion channel

transition metal ion TM transporter

inorganic cation TM transporter

VG ion channel

VG cation channel

K⁺ channel

di-, tri-valent inorganic cation TM transporter

Cu⁺ ion TM transporter

VGIC

Figura 15 - Atividade de transportadores através da membrana plasmática dos genes superexpressos anotados nas categorias de ligação aos cátions e aos metais iônicos analisados pelo programa BINGO. Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo inclusos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância de inclusão dos genes alvo em uma determinada categoria funcional está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica. KC: canais de potássio; TM: transmembrana; VG: regulado por voltagem, *voltage gated*.

Tabela 3 - Genes superexpressos na categoria transportadores relacionados com canais iônicos

<i>Gene</i>	<i>Função</i>
<i>Kcna4</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shaker-related subfamily, member 4</i>
<i>Kcna6</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shaker-related, subfamily, member 6</i>
<i>Kcnc4</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shaw-related subfamily, member 4</i>
<i>Kcnd2</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shal-related family, member 2</i>
<i>Kcnab2</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shaker-related subfamily, beta member 2</i>
<i>Kcnab3</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shaker-related subfamily, beta member 3</i>
<i>Kcnk2</i>	Canal de potássio <i>subfamily k, member 2</i>
<i>Kcnb1</i>	Canal de potássio ativado por voltagem, <i>shab-related subfamily, member 1</i>
<i>Kcnj10</i>	Canal de potássio <i>inwardly-rectifying channel, subfamily j, member 10</i>
<i>Scn1b</i>	Canal de sódio ativado por voltagem, <i>voltage-gated, type i, beta</i>
<i>Cacna2d1</i>	Canal de cálcio ativado por voltagem, <i>alpha2/delta subunit 1</i>
<i>Cacna1g</i>	Canal de cálcio ativado por voltagem t type, <i>alpha 1g subunit</i>
<i>Cacng2</i>	Canal de cálcio ativado por voltagem <i>gamma subunit 2</i>
<i>Cybb</i>	Citocromo b-245, <i>beta polypeptide</i>
<i>Ryr1</i>	Canal de cálcio ativado ryanodina da musculatura esquelética

4.4.1.3 Genes superexpressos relacionados a receptores e ligação a receptores

Os 248 genes inicialmente correlacionados com função de ligação a receptores (7%) e atividade de receptores (13%, figura 13) no nível 2, foram analisados conjuntamente utilizando os recursos do programa BINGO. Os resultados desta análise mostram uma rede complexa que compreende três grupos funcionais importantes com atividades de: i) receptores; ii) ligação a receptores e iii) quinases; que serão apresentados separadamente.

4.4.1.3.1 Atividade de receptores

O primeiro grupo contém 85 genes e correlaciona os genes alvo com função de receptores transmembrana (*TM rec* na Figura 16). Essa categoria funcional contém os genes *Lphn3*, que codifica um receptor cálcio-independente, o gene do receptor de somatostatina tipo 2, *sstr2* na categoria de receptores tipo 7 transmembrana acoplados às proteínas G (*G-prot coupled rec* na Figura 16).

Figura 16 - Atividade de receptores dos genes superexpressos anotados nas categorias de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO. Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo incluídos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância de inclusão dos genes alvo em uma determinada categoria funcional está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica. IFN: interferon; G-prot: proteína G; rec: receptor; TM: transmembrana; 7TM: receptor sete transmembrana

4.4.1.3.2 Atividade de ligação a receptores

O segundo grupo funcional é a categoria de proteínas que se ligam a receptores (Figura 17). Nesta categoria incluem-se várias proteínas com atividade de ligação a diversos receptores, como ligantes aos receptores de dopamina, ligantes aos receptores opiáceos, entre outros.

Figura 17 - Atividade de ligantes a receptores dos genes superexpresso anotados na categoria de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO.

Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo incluídos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância de inclusão dos genes alvo em uma determinada categoria funcional está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica. *Bind*: ligação; *IFN*: interferon; *G-prot*: proteína G; *rec*: receptor; *GF*: fator de crescimento; *TM*: transmembrana; *VEGFR*: receptor do fator de crescimento vascular endotelial; *LDL*: lipo-proteína de baixa densidade

4.4.1.3.3 Atividade de quinases

Por fim, o último grupo funcional é a categoria quinases (Figura 18). Estas enzimas participam do controle do ciclo celular e sinalização através da membrana. Em especial, os genes alvo superexpressos estão correlacionados a enzimas quinases transmembrana.

Figura 18 - Atividade de quinases dos genes anotados na categoria de receptores e ligação a receptores analisados pelo programa BINGO. Os círculos representam funções moleculares e o tamanho indica o número de genes alvo incluídos nestas funções. As cores indicam o suporte estatístico baseado na distribuição binomial com correção de taxa de falsa correlação pelo teste de Benjamini & Hochberg e nível de significância de 0,05. A significância de inclusão dos genes alvo em uma determinada categoria funcional está representada por um gradiente de cores indo do amarelo ao laranja. As setas indicam a hierarquia dos diferentes níveis de função molecular na ontologia gênica.

4.4.2 Detalhamento da função biológica dos genes subexpressos

Primeiramente, anotamos os genes subexpressos nos camundongos tratados. Utilizamos os algoritmos implementados no programa DAVID. Do total de 1980 genes subexpressos encontramos 1061 anotados, destes 39% têm função genérica de

ligação a íons, 19% estão envolvidos na transdução de sinais, 21% estão envolvidos no transporte de proteínas, 11% atuam na atividade de fatores de transcrição, 5% ligam-se a lipídeos e 5% regulam a atividade da GTPase (Figura 19).

Figura 19 - Função molecular dos genes subexpressos (nível 2) no tecido erétil de camundongos inoculados com Tx2-6 analisados pelo programa DAVID. As áreas do gráfico são proporcionais ao número de genes classificados em cada categoria de função celular. As diferentes cores indicam as distintas categorias.

Selecionamos os genes da categoria anotada de função molecular de ligação a íons metálicos e esses genes foram novamente anotados. A nova análise indicou 312 genes anotados e destes 86,2% (269/312) são ligantes de cátions. Notadamente quase metade desses genes estão relacionados à ligação com íons de zinco (47,75%), outros 22,75% são genes relacionados à ligação com íons de cálcio, 10,26 com magnésio (10,26%) e 3,5% genes relacionados à ligação com íons de sódio. Também detectamos genes subexpressos relacionados com canais iônicos (9,9% ou 31/312). Nesta última categoria detectamos vários genes de canais de potássio (12/31) e canais de sódio ativados por voltagem (4/31) (Tabela 4). Também detectamos genes subexpressos (4/31) relacionados com canais de cloro ativados

por cálcio e genes relacionados com canais de cálcio voltagem-dependentes (5/31).

Na análise desses genes com auxílio do programa BINGO não identificamos vias específicas associadas aos genes alvo subexpressos.

Tabela 4 - Genes subexpressos relacionados à categoria de canais iônicos

<i>Gene</i>	<i>Função</i>
<i>Scn5α</i>	Canal de sódio ativado por voltagem (<i>type v, alpha</i>)
<i>Scn4α</i>	Canal de sódio ativado por voltagem (<i>type iv, alpha polypeptide</i>)
<i>Scn2α1</i>	Canal de sódio ativado por voltagem (<i>type ii, alpha 1</i>)
<i>Scn3β</i>	Canal de sódio ativado por voltagem (<i>type iii, beta</i>)
<i>Cacnb4</i>	Canal de cálcio voltagem-dependente, (<i>beta 4 subunit</i>)
<i>Cacng7</i>	Canal de cálcio voltagem-dependente (<i>gamma subunit 7</i>)
<i>Cacng5</i>	Canal de cálcio voltagem-dependente (<i>gamma subunit 5</i>)
<i>Cacng2</i>	Canal de cálcio voltagem-dependente (<i>gamma subunit 2</i>)
<i>Cacna2d2</i>	Canal de cálcio voltagem-dependente (<i>alpha 2/delta subunit 2</i>)
<i>Clca3</i>	Canal de cloro ativado por cálcio
<i>Clca6</i>	Canal de cloro ativado por cálcio
<i>Clca2</i>	Canal de cloro ativado por cálcio
<i>Clca1</i>	Canal de cloro ativado por cálcio
<i>P2rx2</i>	Receptor purinérgico receptor p2x, 1 íon ligante-dependente
<i>P2rx3</i>	Receptor purinérgico receptor p2x, 1 íon ligante-dependente
<i>P2rx4</i>	Receptor purinérgico receptor p2x, 1 íon ligante-dependente
<i>P2rx1</i>	Receptor purinérgico receptor p2x, 1 íon ligante-dependente
<i>Hcn3</i>	Canal ativado por hiperpolarização (<i>cyclic nucleotide-gated K⁺ 3</i>)
<i>Kcnj11</i>	Canal de potássio (<i>subfamily j, member 11</i>)
<i>Kcnb2</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>shab-related</i>)
<i>Kcnip1</i>	Canal de potássio (<i>Kv channel-interacting protein 1</i>)
<i>Kcnj6</i>	Canal de potássio (<i>subfamily j, member 6</i>)
<i>Kcna2</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>shaker-related subfamily</i>)
<i>Kcnf1</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>subfamily f, member 1</i>)
<i>Kctd8</i>	Canal de potássio (<i>tetramerisation domain containing 8</i>)
<i>Kctd18</i>	Canal de potássio (<i>tetramerisation domain containing 18</i>)
<i>Kcnh3</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>eag-related</i>)
<i>Kcnj16</i>	Canal de potássio (<i>subfamily j, member 16</i>)
<i>Kcnq2</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>subfamily q, member 2</i>)
<i>Kcnq4</i>	Canal de potássio ativado por voltagem (<i>subfamily q, member 4</i>)

4.5 Validação da expressão diferencial por PCRq e imuno-histoquímica

4.5.1 PCRq dos genes diferencialmente expressos

Para validação dos dados obtidos com os *GeneChips* avaliamos por PCRq a expressão de sete genes, baseádonos em dados da literatura que relacionam os produtos protéicos destes genes ao óxido nítrico (*ednrb*^{90,91} *eNOS*^{34,51} e *sod1*⁹²); à produção de GMPc (*sstr2*⁹³); à manutenção da ereção (*pdgfra*^{94,95} e *fn1*⁵⁵) e ao complexo contráctil no músculo liso (*sparc*⁹⁶).

4.5.1.1 Análise estatística dos resultados da PCRq

Os valores de Ct dos genes *ednrb*, *eNOS*, *fn1*, *pdgfr-α* e *sstr2* foram normalizados utilizando o valor de Ct do gene normalizador *actb*, considerando que quantos mais próximos os valores de Ct do alvo e do normalizador, mais acurado o método de quantificação relativa. No entanto, os genes *sod1* e *sparc* foram normalizados utilizando o gene *gapdh*. Os resultados das amplificações estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct e o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação das diferenças de expressão entre os grupos

Gene	Grupo	VMCt*	ΔCt^{**}	$\Delta\Delta Ct^{***}$	Razão $2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>ednrb</i>	CTRL	28,31	1,79		Calibrador
	ICV	27,09	0,95	-0,84	1,79
<i>eNOS</i>	CTRL	23,09	-3,43		Calibrador
	ICV	22,39	-3,75	-0,33	1,25
<i>fn1</i>	CTRL	30,29	3,86		Calibrador
	ICV	27,01	0,86	-3,00	8,00
<i>pdgfr-α</i>	CTRL	28,52	2,09		Calibrador
	ICV	26,46	0,31	-1,78	3,44
<i>Sstr2</i>	CTRL	24,92	-1,51		Calibrador
	ICV	23,17	-2,97	-1,47	2,78
<i>Actb</i>	CTRL	26,52			
	ICV	26,15	Normalizador		
<i>Sod1</i>	CTRL	18,39	0,47		Calibrador
	ICV	17,66	0,33	0,15	1,10
<i>sparc</i>	CTRL	17,24	-0,68		Calibrador
	ICV	15,83	-1,49	-0,81	1,75
<i>gapdh</i>	CTRL	17,92			
	ICV	17,33	Normalizador		

CTRL: camundongos inoculados com salina; ICV: camundongos inoculados pela via intracavernosa; Ct: *cycle threshold* ciclo da reação em que a fluorescência das amostras excede o sinal basal do fluoróforo ROX

*VMCt: valor médio do Ct

** ΔCt : (Valor Médio do Ct gene Alvo - VM Ct gene normalizador (*actb* ou *gapdh*))

*** $\Delta\Delta Ct$: (ΔCt gene alvo - ΔCt gene do Controle)

A partir dos valores do perfil de expressão relativa, usamos o teste de Mann-Whitney para avaliar o suporte estatístico do perfil diferenciado de expressão entre os grupos de camundongos inoculados com Tx2-6 e os camundongos do grupo controle. Os resultados dessas análises foram resumidos em gráficos *box-plot* nas Figura 20 e 21. Os resultados mostram que a expressão dos genes *ednrb*, *fn1*, *pdgfr*,

sparc e *sstr2* está aumentada em camundongos inoculados com Tx2-6 comparada à expressão dos camundongos do grupo controle ($p \leq 0,05$).

Figura 20 - Expressão gênica relativa obtida na PCRq dos genes *ednrb*, *fn1*, *pdgfr- α* , *sparc* e *sstr2* representada nos gráficos *box-plot*. CTRL=grupo controle; ICV=grupo tratado via intracavernosa. Valores de $*p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes

Na Figura 21 está representada a expressão relativa obtida por PCRq dos genes *sod1* e *eNOS* que não diferem estatisticamente entre os grupos ($p=0,1$ e $p=0,4$ respectivamente).

Figura 21 - Expressão gênica relativa obtida na PCRq dos genes *sod1* e *eNOS* representada nos gráficos *box-plot*. CTRL=grupo controle; ICV=grupo tratado via intracavernosa.

4.5.2 Avaliação da expressão protéica por imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica mostrou que o receptor tipo α do fator de crescimento plaquetário, Pdgfr- α , está localizado no citoplasma de células do músculo liso e fibroblastos do corpo cavernoso (Figura 22A). A análise estatística (vide metodologia), no entanto, indicou que a média (μ) da porcentagem superfície do tecido marcado positivamente por imuno-histoquímica nos animais tratados com Tx2-6 pela via intracavernosa foi de 13,83% (desvio padrão (σ) de $\pm 0,84\%$) e 11,78% ($\sigma \pm 0,78\%$) no grupo controle. Aplicando o teste de Mann-Whitney achamos que expressão de Pdgfr- α difere de forma significativa entre o grupo tratado pela via ICV e o controle ($T=6, p \leq 0,0001$) (Figura 23).

A análise da marcação do corpo cavernoso dos camundongos, com o uso de anticorpos para a proteína Sstr2 demonstrou expressão localizada no citoplasma das células do músculo liso trabecular e fibroblastos trabeculares (Figura 22B). As médias do percentual das áreas marcadas em DAB foram de 11,72% ($\sigma \pm 3,56\%$) nos animais tratados e 7,47% ($\sigma \pm 0,48\%$) nos animais controle. Quando aplicado o teste de Mann-Whitney achamos um valor que demonstrou diferença estatisticamente significativa na expressão de Sstr2 entre os dois grupos ($T=30; p=0,016$) (Figura 23).

A marcação por imuno-histoquímica mostrou que a glicoproteína fibronectina, Fn1 é expressa no citoplasma das células do músculo liso trabecular e fibroblastos trabeculares (Figura 22C). As médias obtidas da porcentagem de marcação nas áreas com tecido nos animais tratados com Tx2-6 pela via intracavernosa foram de 22,8% ($\sigma \pm 0,33\%$), e 21,02% ($\sigma \pm 0,77\%$) no grupo

controle. Esta diferença na marcação foi estatisticamente significativa entre os grupos (T=6 e $p \leq 0,0001$) (Figura 23).

(A) Pdgfra

(B) Sstr2

(C) Fn1

Figura 22 - Fotomicrografias da localização das proteínas: A) Pdgfr- α ; B) Sstr2; C) Fn1, (setas) através de reações de imuno-histoquímica no corpo cavernoso de camundongo. Aumento de 400X.

Figura 23 - Análise por avaliação imuno-histoquímica das proteínas Fn1, Pdgfra e Sstr2 no corpo cavernoso de camundongo. CTROL=grupo controle; ICV=grupo tratado pela via intracavernosa. Valores de $*p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho apresentamos uma análise baseada na tecnologia de chips de DNA, do perfil da expressão gênica do tecido peniano de camundongos inoculados com a toxina Tx2-6, um dos neuropeptídeos que compõem o veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer*. Existem vários estudos que salientam a importância e o potencial farmacológico de toxinas de animais peçonhentos^{3,4,6,68,76,97-99}. Toxinas isoladas de veneno de aracnídeos têm sido usadas há muito tempo no estudo do funcionamento de canais iônicos¹⁰⁰, receptores colinérgicos¹⁰¹ e outros receptores de membrana celular¹⁰²⁻¹⁰⁴. Particularmente, a picada de algumas aranhas e de alguns escorpiões induz priapismo em coelhos, camundongos e humanos.

No caso do veneno da aranha armadeira, Yonamine et al.⁴² demonstraram que a ereção peniana pode ser induzida após inoculação *in vivo* de Tx2-5 pela via intraperitoneal. Devido à alta homologia entre as toxinas Tx2-5 e Tx2-6, conjecturamos que a Tx2-6 também poderia induzir ereção peniana em camundongos. Isto foi confirmado e também foi estabelecida uma nova via de administração do peptídeo, a aplicação intracavernosa ou local *in vivo*^{43,105} (Anexos D e E). Visto que a inoculação de altas concentrações de Tx2-6 pode ser letal, inicialmente determinamos a dose mínima efetiva capaz de ocasionar a ereção quando aplicada pela via intracavernosa⁴³.

O relaxamento muscular e a ereção peniana induzidos pelo peptídeo Tx2-6 possivelmente estão relacionados à liberação de óxido nítrico no endotélio¹⁰⁶,

passamos a investigar a ação da Tx2-6 no padrão de expressão de genes especificamente relacionados com a via do óxido nítrico (NO). Nossos resultados indicaram que somente 10.4% (10/96) dos genes da via do óxido nítrico tiveram expressão diferenciada no tecido erétil de camundongos inoculados com Tx2-6¹⁰⁵ (Anexo E).

Em razão desses resultados passamos a analisar o repertório completo dos genes de camundongos e avaliar o perfil de expressão gênica do tecido peniano após aplicação do peptídeo Tx2-6. Isso permitiu identificar 3.803 genes diferencialmente expressos pela ação da toxina Tx2-6. A utilização de ferramentas de bioinformática foi de fundamental importância na análise do grande número de informações geradas. Partimos do princípio de agrupar os genes de acordo com as suas funções moleculares. Inicialmente, fizemos uma abordagem geral com auxílio do programa DAVID e depois detalhamos as vias de sinalização molecular específicas utilizando o programa BINGO. As análises sempre foram direcionadas em uma tentativa de esclarecer o mecanismo de ereção peniana induzido pelo peptídeo Tx2-6.

Genes diferencialmente expressos relacionados a canais iônicos

As neurotoxinas de diferentes artrópodes se ligam de maneira específica aos canais iônicos, com isso o equilíbrio osmótico e o fluxo de íons através da membrana da célula são afetados. Por exemplo, toxinas isoladas do veneno da aranha *Phoneutria sp* e de escorpiões agem em diferentes canais iônicos (canais de sódio, potássio e cálcio)^{7,15} que, através do controle do fluxo de íons nas células, controlam diversas atividades, entre elas, a contração e o relaxamento da célula muscular^{15,39,107,108}. Os peptídeos Tx2-5 e Tx2-6 retardam a inativação dos canais de

Nav prolongando assim o potencial de ação^{31,32}.

Genes superexpressos. Em nossos experimentos com os chips de DNA contendo o genoma do camundongo, achamos um aumento significativo na expressão de 5,3% (1823) dos genes no tecido peniano nos animais inoculados com Tx2-6 comparado ao grupo de animais controle. Nas análises posteriores, encontramos que 61% desses genes não estavam incluídos em nenhuma categoria funcional devido à inexistência de dados referentes à função molecular dos mesmos. Somente 39% (729/1823) dos genes restantes apresentaram detalhes da função molecular nos bancos de dados. Na categorização, metade dos 729 genes superexpressos apresentou função de ligação a cátions e metais iônicos. O detalhamento da função molecular desses genes indicou 13 genes relacionados com a atividade de canais iônicos que controlam o transporte de cátions de sódio, cálcio e potássio através da membrana plasmática (Tabela 3). Apesar da ação do peptídeo Tx2-6 ser específica aos canais Nav³¹, observamos no perfil de expressão do tecido erétil após aplicação da Tx2-6 a alteração de diversos genes relacionados com outros canais iônicos. Isso sugere que a inibição do fechamento dos canais iônicos Nav pela Tx2-6 ocasionaria um desequilíbrio iônico afetando principalmente os íons Na⁺, K⁺ e Ca⁺. Isso favoreceria o relaxamento das células musculares induzindo a ereção. Muitos trabalhos referem-se à importância dos canais iônicos no mecanismo de ereção peniana^{37,50,109}. Por exemplo, a expressão artificial do gene *hSlo*, que é uma subunidade formadora de canais de potássio em células da musculatura lisa vascular de tecido cavernoso de ratos, restaura a perda de resposta do estímulo nervoso (habilidade de induzir ereção) relacionada ao envelhecimento. Isso se deve ao incremento da hiperpolarização das células musculares induzida pelo aumento da

expressão de hSlo^{50,109}.

Genes subexpressos. Após análise do perfil de expressão gênica posteriormente à aplicação do peptídeo Tx2-6, detectamos a subexpressão de 6,5% (1980) genes no tecido erétil. A categorização dos genes subexpressos indicou que os genes anotados não pertencem a nenhuma função molecular específica contrariamente aos resultados obtidos após análise dos genes superexpressos. Por exemplo, não encontramos genes com função de ligantes de canais iônicos, somente alguns que participam de subunidades de canais de potássio e cálcio (Tabela 4). No entanto, estes genes também têm participação em várias outras vias. Apesar de termos observado aumento de expressão de um gene da subunidade β de canais de sódio (*Scn1b*, na Tabela 3) é importante salientar que o equilíbrio de íons de Na^+ depende exclusivamente das subunidades α . Da mesma maneira, as subunidades β são importantes na formação dos canais de sódio e na cinética de inativação do canal após o impulso elétrico¹¹⁰. Assim, o aumento da subunidade β e principalmente a subexpressão das unidades α pode afetar o controle do fechamento dos canais, com isso ocorreria o influxo de sódio nas células induzindo o relaxamento muscular¹¹¹. Por outro lado, os genes *Kcnj6*, *Kcnj16* e *Kcnq4* relacionados com o controle de transporte de íons de potássio pela membrana e o gene *Cacng2*, relacionado com transporte de íons de cálcio, também apresentaram expressão diminuída (Tabela 4).

Genes diferencialmente expressos não relacionados aos canais iônicos

Ainda na categoria de genes superexpressos com função molecular anotada encontrou-se 20% dos genes (248/1823) incluídos na função de receptores e ligação a receptores. Esta categoria de proteínas desempenha atividade de sinalização

através da membrana plasmática (mensageiros celulares). Um gene alvo superexpresso no tecido cavernoso em camundongos encontrado nesta rede particularmente interessante ao estudo é o gene *Lphn3*. Este gene codifica um receptor cálcio-independente e pertence à família das *secretin-like* (7 transmembrana acopladas a proteínas G) com função de adesão e sinalização celular. O ligante endógeno deste receptor é desconhecido. A α -latrotoxina, subunidade do veneno da aranha viúva negra (*Latrodectus sp*), possui afinidade por esse tipo de receptor e sua ligação ao receptor induz o influxo de cálcio na célula e conseqüente liberação massiva de neurotransmissores de células endócrinas e neuronais¹⁰⁴.

Adicionalmente, outros genes detectados com expressão alterada e que não influenciam diretamente no equilíbrio iônico na célula podem estar envolvidos no processo erétil. Na lista de genes diferencialmente expressos podemos destacar alguns genes que serão discutidos a seguir.

Proteína acídica rica em cisteínas (sparc). O gene *sparc* codifica uma proteína da matriz extracelular, multifuncional, que ao interagir com o complexo actinmiosina, poderia modular o mecanismo de relaxamento e contração do músculo liso^{96,112}. Em nosso estudo identificamos os transcritos do gene *sparc* aumentados, portanto, sugerimos que este gene possa estar diretamente relacionado ao mecanismo de relaxamento da musculatura lisa peniana. Em estudo recente, foi observado o aumento de expressão do gene *sparc* durante a ereção fisiológica em ratos⁸⁰. O mesmo estudo mostrou uma diminuição de expressão de *sparc* em animais diabéticos, condição esta que pode ocasionar disfunção erétil.

Receptor de somatostatina tipo 2 (ssrt2). O *ssrt2* foi identificado como superexpresso nos microarranjos no tecido erétil após aplicação da Tx2-6 e validado

por PCRq e imuno-histoquímica. A somatostatina é um peptídeo endógeno cíclico encontrado em duas formas moleculares uma com 28 e outra com 14 aminoácidos. A somatostatina está distribuída amplamente em diferentes tecidos e é multifuncional. A diversidade funcional desse gene decorre da existência de múltiplos receptores; nomeados de um a cinco (*i.e.*, *ssrt1*, *ssrt2*, *ssrt3*, *ssrt4* e *ssrt5*) sendo que os receptores *ssrt2* estão envolvidos no mecanismo de contração e relaxamento muscular¹¹³. Por exemplo, em retinas isoladas de ratos, a somatostatina induz, através da ativação de *sstr2*, a produção de GMPc⁹³. No corpo cavernoso, um aumento da produção de GMPc ocasiona a ativação de proteína quinase (PKG), a qual reduz a concentração intracelular de íons de cálcio e isso leva ao relaxamento do músculo liso trabecular e ereção peniana⁴⁷. Assim, a amplificação do efeito da somatostatina via *ssrt2* no tecido erétil poderia estar incrementando a síntese de GMPc (Figura 4).

Receptor de plaquetas tipo α (*pdgfr- α*). Nos chips de DNA achamos aumentada a expressão do gene que codifica a cadeia α do receptor de plaquetas, *pdgfr- α* , nos camundongos tratados com o peptídeo. Este aumento foi validado por PCRq e imuno-histoquímica. O receptor Pdgfr pertence à família de receptores tirosina quinase transmembrana, e consiste de uma cadeia tipo α ou β . Quando ativado, dimeriza para formar as três diferentes isoformas. Após a dimerização ocorre a transativação entre as duas cadeias, e inicia-se a cascata de sinalização⁹⁴. O Pdgfr pode ser ativado pelo seu ligante, a citocina Pdgf ou pelo cisalhamento do sangue (*shear stress*). O acúmulo de sangue nos sinusóides gera uma força hemodinâmica, chamada de estresse pelo cisalhamento do sangue e que age nas células endoteliais as quais revestem o sinusóide do corpo cavernoso⁴⁵. A pressão do sangue sob o

endotélio ativa o receptor de plaquetas mesmo na ausência do ligante, induzindo a síntese e/ou secreção de prostaciclina, óxido nítrico, Pdgf, Fgf e o fator de transcrição c-Fos/c-Jun⁹⁵. O tratamento de artérias mesentéricas de ratos com o homodímero ativo Pdgf-BB (o Pdgf é uma glicoproteína composta por duas cadeias denominadas A e B, e é ativo somente quando se encontra na forma dimérica) ocasionou a vasodilatação destas. A eliminação do endotélio que revestia as artérias ou o pré-tratamento com L-NAME inibiu o relaxamento arterial, indicando que o relaxamento observado depende do endotélio e da ação do óxido nítrico¹⁰⁶. Da mesma forma, esse evento poderia estar acontecendo no corpo cavernoso dos camundongos, onde a ativação do Pdgfr estaria contribuindo com o relaxamento de artérias helicinais e do músculo liso trabecular, favorecendo a ereção. Visto que o Pdgfr pode ser ativado pelo *shear stress*⁵¹, é possível especular que o aumento observado deste receptor no tecido erétil após aplicação da Tx2-6 seria consequência do estresse de cisalhamento.

Fibronectina 1 (*fn1*). Nos chips de DNA identificamos o aumento na expressão do gene que codifica a fibronectina tipo 1, *fn1*, nos camundongos tratados. Este aumento foi validado por PCRq onde houve um aumento de oito vezes em relação aos controles e também ocasionou o aumento no nível protéico após avaliação imuno-histoquímica. A fibronectina é uma glicoproteína de elevado peso molecular, contendo cerca de 5% de carboidratos que pode apresentar-se na forma solúvel, na superfície da membrana ou na matriz extracelular. Um dos principais receptores para a fibronectina é a integrina formada pelas subunidades $\alpha 5$ e $\beta 1$. A expressão destes dois genes também foi encontrada aumentada no tecido erétil após inoculação com a Tx2-6 (respectivamente 1,8 e 1,5 vez de aumento comparado ao controle). Foi

demonstrado que o *shear stress* induz vasodilatação em artérias coronárias e este relaxamento depende da ligação da fibronectina às integrinas¹¹⁴. Por outro lado, também observou-se que o *shear stress* aumenta a expressão gênica e protéica das subunidades das integrinas⁵⁵. Portanto podemos inferir que o aumento na produção de *fn1* e do seu receptor integrina $\alpha 5$ e $\beta 1$ seria consequência do *shear stress*.

Receptor de endotelina tipo B (*endrb*). O gene do receptor de endotelina tipo B, *endrb*, foi encontrado superexpresso no tecido erétil após aplicação da Tx2-6 e o aumento foi validado por PCRq. A proteína deste gene, quando ligada às endotelinas, ativa a proteína eNOS, assim aumentando a produção de óxido nítrico que determina o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso^{45,91}. Em razão disso, a superexpressão de *endrb* pode estar diretamente relacionada com o mecanismo de ereção mediado pelo óxido nítrico (NO)¹¹⁵. No entanto, é importante lembrar que dependendo do receptor ao qual se unem as endotelinas; os efeitos podem ser antagônicos. Assim, ocorre contração do músculo liso quando as endotelinas ligam-se ao receptor tipo A (*Ednra*). Nos experimentos de microarranjos não achamos diferenças de expressão neste receptor.

Óxido nítrico sintase endotelial (*eNOS*). Devido à importância das óxido nítrico sintases no processo de ereção procuramos determinar se houve diferença na expressão gênica da nNOS e a eNOS no tecido erétil após a inoculação da Tx2-6 nos experimentos de microarranjos. O RNAm desses genes não apresentou diferença de expressão, fato também confirmado por PCRq para *eNOS*. Portanto, especulamos que o aumento na produção de óxido nítrico observada *in vitro* em ratos após a aplicação da Tx2-6⁴⁴, não se deveria ao aumento da produção protéica de *eNOS*. No entanto, ainda não é possível descartar um aumento na atividade da proteína eNOS

já presente na célula endotelial. Diversos trabalhos descrevem ativação desta sintase por fosforilação o que ocasionaria maior produção de óxido nítrico^{51,89}. Assim, seria importante avaliar a atividade da proteína eNOS através de Western-Blot utilizando anticorpos que detectam a fosforilação protéica.

Superóxido dismutase (sod1). Com relação aos genes subexpressos no tecido erétil após aplicação da Tx2-6, identificamos a subexpressão do gene da superóxido dismutase 1, *sod1*. Destacamos este gene porque codifica uma proteína com função vital na proteção da célula contra a ação de agentes oxidantes, como o nitrito de peróxido (ONOO-), resultante da interação entre o óxido nítrico e o peróxido^{92,116}. O nitrito de peróxido é uma substância altamente oxidante que causa lesão no DNA, lipídeos e diversas proteínas. Consequentemente, a redução na expressão gênica do *sod1* teria um efeito nocivo para a célula. No entanto, por PCRq não detectamos diferença de expressão no gene *sod1* entre os animais tratados e o grupo controle.

Em suma, avaliamos em detalhes o perfil de expressão gênica de camundongos inoculados com a toxina Tx2-6 que é um componente do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Nossos resultados mostraram que houve alteração na expressão de diversos genes e que alguns destes podem estar relacionados ao mecanismo de relaxamento muscular e conseqüente indução da ereção peniana.

6 CONCLUSÕES

1. A ação da Tx2-6 induz alterações no perfil de expressão gênica no tecido peniano de camundongos. Observamos aumento da expressão gênica em 1.823 genes e redução da expressão gênica em outros 1.980 genes. Entre os genes com perfil de expressão alterado e cuja a função biológica é conhecida, grande maioria tem função associada aos canais iônicos. Notadamente, genes relacionados aos canais de sódio, potássio e cálcio, foram afetados pela toxina. Assim, podemos especular que a ação mais evidente do peptídeo Tx2-6 é a interferência no fluxo de íons na célula. Assim, a transmissão do impulso elétrico e conseqüente perda do tônus celular podem estar diretamente relacionados ao efeito de relaxamento muscular e ereção peniana induzidos pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*.

2. A avaliação do perfil de expressão gênica proporcionou um panorama geral acerca da ação da Tx2-6 em genes relacionados aos canais iônicos. No entanto, experimentos com inibidores e competidores de canais iônicos poderão revelar detalhes mais pontuais do mecanismo de ação da Tx2-6.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **759/06**, intitulado: **"Regulação da expressão gênica pela toxina da Aranha Phoneutria nigriventer no Corpo Cavernoso in vivo"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr(a): Kátia Ramos Moreira Leite**

Pesquisador(a) Executante: **Dr(a): Fabiola Elizabeth Villanova**

CAPPesq, 13 de Setembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
fê

ANEXO B – Carta de colaboração do Instituto Butantan

INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA
AV. VITAL BRASIL, 1500 - CEP 05503-900 - SÃO PAULO - SP
TEL. 3726.7222 – R. 2133/2118

São Paulo 18 de julho de 2006

Prezado Professor,

Declaro para os devidos fins, como pesquisador do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, que nosso laboratório será colaborador do projeto intitulado “Regulação da expressão gênica pela toxina da aranha *Phoneutria nigriventer* no corpo cavernoso *in vivo*” da pesquisadora Kátia Ramos Moreira Leite do Laboratório de Investigação Médica LIM 55, da Divisão de Clínica Urológica do HC-FMUSP.

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, PhD
Laboratório de Farmacologia
Instituto Butantan
Av. Vital Brasil 1500
05503-900 São Paulo, SP, Brasil
Telefone: 11-3726 7222 ext. 2118 FAX: 11-3726 7222 ext. 2133
E-mail: ltronc@usp.br

ANEXO C– Carta de colaboração do LNLS

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Operado pela ABTLUS para o CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia

Nilson Zanchin
Laboratório de Biologia Molecular
Centro de Biologia Molecular Estrutural

Campinas, 13 de setembro de 2006

À Profa. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite
Att: Fabiola Elizabeth Villanova
HC-FMUSP
Av Dr Arnaldo 455 2 andar lab 2141
CEP 01246-903 São Paulo-SP

Prezada Profa. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite,

Escrevo para informar que o sistema de análise de micro-chips de DNA que está instalado no Centro de Biologia Molecular Estrutural do LNLS, cujo fornecedor é a empresa Affymetrix, é constituído por um forno de hibridização, estações de lavagem e de um scanner de *micro-arrays* de DNA. O sistema funcionará como uma instalação multi-usuário estando disponível para realização do projeto "Regulação da Expressão Gênica pela Toxina da Aranha *Phoneutria Nigriventer* no Tecido Erétil *in vivo*" que está sendo proposto pela aluna Fabiola Elizabeth Villanova. Os usuários terão o apoio de um técnico treinado para a realização dos experimentos de marcação do cRNA, hibridização, lavagem e leitura dos dados. Os reagentes básicos poderão ser fornecidos pelo LNLS, entretanto, os sistemas para marcação do cRNA bem como os micro-chips com os arrays de DNA deverão ser fornecidos pelo próprio usuário. No que se refere às análises dos dados, no momento poderemos fornecer apenas apoio para as análises iniciais sendo que análises mais elaboradas também ficarão a cargo do próprio usuário. Neste caso, nenhum pesquisador ou técnico do LNLS entrará como co-autor do trabalho. O sistema já está operacional devendo em breve haver um sistema *online* para registro das propostas apresentadas por pesquisadores externos ao LNLS.

Aproveito para informar que as instalações do LNLS podem ser utilizadas de forma gratuita por todos os pesquisadores que se comprometerem a publicar os dados obtidos nos projetos realizados em qualquer das suas instalações. Os casos em que há interesses comerciais diretos ou para fins de proteção de propriedade intelectual, devem ser encaminhados previamente à direção do LNLS para análise.

Atenciosamente,

Correspondência: Caixa Postal 6192 – CEP 13083-970 – Campinas, São Paulo, Brasil
Campus do LNLS: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 – Bairro Guará
Telefone: +55.(0)19.3512 1113 – FAX: +55.(0)19.3512 1004 – e-mail: zanchin@lnls.br

ANEXO D - Artigo publicado: Penile erection induced *in vivo* by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*.

BJUI

Penile erection induced *in vivo* by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*

Enrico Andrade, Fabiola Villanova, Priscila Borra, Katia Leite, Lanfranco Troncone*, Italo Cortez, Leonardo Messina, Mario Paranhos, Joaquim Claro and Miguel Srougi

Urology, University of São Paulo, and the *Butantan Institute, São Paulo, Brazil

Accepted for publication 29 February 2008

Study Type – Therapy (case control study)
Level of Evidence – 3b

OBJECTIVES

To verify the effect on erectile tissue of mice of two neuropeptides extracted from the poison of a spider, *Phoneutria nigriventer*, (Tx2-5 and -6, termed 'eretina') after direct injection into the corpus cavernosum, to assess the minimum dosage necessary for effect, the time for initiation of action, the local duration of the erection, histological effects and the presence of local and systemic side-effects.

MATERIALS AND METHODS

When applied intraperitoneally, eretina promotes the relaxation of cavernous

smooth muscle, thus causing penile erection. Thirty-five mice were divided in two groups; 10 control mice were injected 20 µL of saline solution, and in the treated group, 25 mice were divided into groups of five and each subgroup received eretina in decreasing doses (0.024, 0.012, 0.006, 0.003 and 0.0015 µg/kg) until the minimum dose that produced an erection was determined. After treatment all mice were monitored to determine the response and any collateral effects.

RESULTS

The minimum dose producing an erection was 0.006 µg/kg, the five mice in this group having evidence of an erection at 35–45 min after injection. The histology of the cavernosum of mice treated with eretina showed dilatation and congestion of the

vascular spaces with more blood than in controls. With the minimum dose there were no local or systemic collateral effects and the erection was lost after 120–140 min.

CONCLUSION

The minimum dose of eretina producing an erection in mice was determined, and the agent was safe for this use as it did not produce any collateral toxic effects. These studies indicate a possible means of determining the mechanism of action of eretina.

KEYWORDS

penile erection, poison, spider, sexual dysfunction, *Phoneutria nigriventer*

INTRODUCTION

Sexual dysfunction is a frequent clinical problem of great relevance, and therefore compromises the quality of life of affected individuals. Of mature men, ≈45% present with erectile dysfunction (ED) and the condition is addressed by several treatment options, including oral, intraurethral and intracorporal agents, or by surgical treatment using penile implants [1].

Although there has been much research and investment in new drugs for ED, there are already some agents known in nature that provoke penile erection, including the poisons of spiders and scorpions, which should be investigated for their principle mode of action

on the penis. One of the characteristics of the poisons from the bite of the Brazilian spider, *Phoneutria nigriventer* is penile erection, mainly apparent in children bitten by this spider [2,3]. From the poison two peptides have been isolated, the Tx2-5 and -6, termed 'eretina', which causes relaxation of cavernous smooth muscle in rabbits and mice when applied i.p., and thus causing penile erection [3–5].

In the present study we assessed the potential beneficial actions of eretina, by injecting the peptide directly in the corpus cavernosum of mice. The objective was to verify the effects of eretina on erectile tissue of mice after direct injection, the minimum dose necessary for its effects, the time for initiation of action and

the local duration of erection, histological effects, and the presence of local and systemic collateral effects.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-five male mice of Swiss ancestry (aged 18–24 weeks, 25–35 g) were selected for the study; the study was approved by the Ethics Committee of the São Paulo University of Medicine. The eretina toxin (Tx2-6) from the poison of *P. nigriventer* was used, isolated in the Laboratory of Pharmacology of the Butantan Institute. The mice were divided in two groups; 25 were injected with eretina into the corpus cavernosum (in saline), and 10 were injected with 20 µL of saline only as controls. The 30 treated mice were divided

into groups of five and each subgroup injected with eretina of decreasing doses until the minimum dose producing an erection was determined.

The minimum i.p. dose of eretina necessary to cause erection was already established in another study [3] and from this dose (0.024 $\mu\text{g/kg}$) we injected groups of five mice with decreasing concentrations of eretina into the corpus cavernosum at 0.024, 0.012, 0.006, 0.003 and 0.0015 $\mu\text{g/kg}$ body weight. All mice maintained and monitored to assess the development and incidence of collateral effects.

After determining the minimum dose the five mice that received this dose and produced an erection were observed to evaluate the time of penile erection, and the local and systemic collateral effects. The mice were anaesthetized with an i.p. injection of 100 μL of a solution of 1.5 mg of ketamine and 0.1 mg of xylazine. In the treated and control groups, mice were kept under anaesthesia, the erectile tissue (with or without erection) was removed and embedded in paraffin for histological analysis, sectioned and stained with haematoxylin and eosin.

RESULTS

It was verified that the minimum dose for producing an erection was 0.006 $\mu\text{g/kg}$, such that the five mice in this group produced an erection at 35–45 min after injection. The control group and the group treated with a 0.003 $\mu\text{g/kg}$ did not produce an erection (Fig. 1).

The histological assessment of the corpus cavernosum in the control group and the group treated with eretina showed that the vascular space of the treated group was more dilated and congested, with more blood than in controls (Fig. 2).

After injection with eretina at the minimum dose there were no apparent local and systemic collateral effects, and the erection was lost at 120–140 min after initiation.

DISCUSSION

Research has shown that there are 11 isoforms of phosphodiesterase (PDE), which have similar effects but which are present at different concentrations in different tissues [6]; in the penis, PDE type 5 (PDE5) is present

FIG. 1. Penile erection in a mouse after injection with eretina into the corpus cavernosum (0.006 $\mu\text{g/kg}$).

FIG. 2. Digitized images of part of the corpus cavernosum (longitudinal section) of mice in the control and eretina-treated groups. In the treated mice there was congestion and dilation of the vascular spaces (arrow). Haematoxylin and eosin, $\times 400$.

in larger amounts [7]. These enzymes hydrolyse the phosphodiester bond present in cAMP and cGMP [8].

The contraction of the smooth muscle fibres depends on two conditions; an increase in intracellular calcium concentration and dephosphorylated myosin. However, when the intracellular concentration of calcium and dephosphorylated myosin diminishes, the smooth muscle relaxes and erection occurs.

These mechanisms are controlled by substances such as cAMP and the cGMP, produced in the cytoplasm, from stimulation of receptors in the cellular wall, which act to promote the exit of calcium and inhibit dephosphorylated myosin, with consequent muscular relaxation [7].

The most common oral agents for ED are inhibitors of PDE action, which promote the relaxation of penile smooth muscle, mediated by nitric oxide (NO), which is synthesized and released in response to sensory stimulation. NO stimulates guanylate cyclase to produce a secondary messenger, cGMP, that it is hydrolysed by PDEs. When such a mechanism is blocked by these selective drugs, there is facilitation of relaxation of the smooth muscle and consequent erection [6]. Currently, drugs with a partly selective action of PDE5 inhibition are in use, including sildenafil, vardenafil and tadalafil, and some have fewer side-effects. Studies are underway to develop more selective drugs that have fewer contraindications [8,9], and several natural agents are known, particularly the poisons of scorpions and spiders.

The changes in erectile tissue that determine how an erection is provoked by toxins of *P. nigriventer* are not completely understood. The poison is composed of three neurotoxins and lethal fractions for mice, called PhTx1, PhTx2 and PhTx3 [10] and a different fraction, PhTx4, that modifies the neuromuscular response in insects [11,12]. From these fractions some pure neurotoxins have been characterized, identified [10,11,13–15] and cloned [16]. The PhTx2 fraction is composed of nine different peptides, which are mostly responsible for the effect of the total poison. Of these, only two neuropeptides, Tx2–5 and –6, are active in the relaxation of smooth muscle in the corpus cavernosum of rabbits and mice, causing erection [3–5]. The initial studies with this toxin were by i.p. injection; the animals have an erection and hyper-salivate, with signals of severe asphyxia, followed by death, depending on the administered dose [3].

In the present study the effect seems to be local in the penis; when the mice were injected with eretina directly into the corpus cavernosum they had no systemic effects but only an erection. The i.p. route distributed eretina throughout the animal and produced an erection but other side-effects.

In recent studies, it was shown that treatment with nitroindazol, an inhibitor of neuronal NO synthase (nNOS), blocks all toxic effects of Tx2–5 [3], suggesting that the induced erection with Tx2–5 involves the nNOS pathway. For such a reaction the interaction of this substance with the NO pathway still needs to be elucidated. Therefore, inhibition

of NO can provoke inhibition of penile erection, independent of whether the toxic action is via NO or other participating mechanisms of erection, e.g. PDE, cGMP and calcium channels.

Knowing the minimum dose of toxin that produces erection, we can now initiate studies with pharmacogenomics, using microarray studies to elucidate which genes are involved in this mechanism of erection.

In conclusion, we determined the minimum dose of eretina that caused no toxic side-effects, maintaining the mice alive and allowing an assessment of the duration of effects on the corpus cavernosum. This study indicates a protocol to determine the mechanism of action of eretina.

CONFLICT OF INTEREST

Source of funding: FAPESP.

REFERENCES

- Lewis JM, Osbourne AL, O'Leary MP. Erectile dysfunction. *J Med Liban* 2004; **52**: 213–6
- Teixeira CE, Oliveira JF, Baracat JS *et al*. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology* 2004; **63**: 184–9
- Yonamine CM, Troncone LR, Camillo MA. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2–5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon* 2004; **44**: 169–72
- Matavel A, Cruz JS, Penaforte CL *et al*. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2–6. *FEBS Lett* 2002; **523**: 219–23
- Richardson M, Pimenta AM, Bemquerer MP *et al*. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; **142**: 173–87
- Boolell M, Allen MJ, Ballard SA *et al*. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1996; **8**: 47–52
- Corbin JD. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2004; **16**: S4–7
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; **257**: 401–3
- Padma-Nathan H, McMurray JG, Pullman WE *et al*. On-demand IC351 (Cialis) enhances erectile function in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2001; **13**: 2–9
- Rezende Junior L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 1991; **29**: 1225–33
- Entwistle ID, Johnstone RA, Medzihradszky D, May TE. Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* 1982; **20**: 1059–67
- Rego E, Bento AC, Lopes-Martins RA *et al*. Isolation and partial characterization of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. *Toxicon* 1996; **34**: 1141–7
- Diniz CR, Cordeiro Mdo N, Junior LR *et al*. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett* 1990; **263**: 251–3
- Cordeiro Mdo N, Diniz CR, Valentim Ado C, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett* 1992; **310**: 153–6
- Romano-Silva MA, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Ribeiro AM. Acetylcholine release from rat brain cortical slices evoked by the fraction P4 of the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* has Ca²⁺ and temperature independent components. *Neurosci Lett* 1996; **219**: 159–62
- Kalaothakis E, Penaforte CL, Leao RM *et al*. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon* 1998; **36**: 1971–80

Correspondence: Enrico Andrade, Urology, USP, Rua Tijuco Preto, 845, apt42 Sao Paulo, 03316-000, Brazil.
e-mail: enricoandrade@uol.com.br

Abbreviations: ED, erectile dysfunction; PDE, phosphodiesterase; (n)NO(S), (neuronal) nitric oxide (synthase).

ANEXO E - Artigo *in press*: Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: Expression of profile genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice.

ARTICLE IN PRESS

TOXCON3576_proof ■ 22 June 2009 ■ 1/9

Toxicon xxx (2009) 1–9

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice

Fabiola E. Villanova^{a,*,1}, Enrico Andrade^{a,1}, Élcio Leal^{b,1}, Priscila M. Andrade^a, Ricardo C. Borra^c, Lanfranco R.P. Troncone^d, Leandro Magalhães^d, Katia R.M. Leite^a, Mario Paranhos^a, Joaquim Claro^a, Miguel Srougi^a

^a Laboratory of Medical Investigation – LIM55, Department of Urology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo - 455, 2 andar, sala 2145, CEP: 01246-903 São Paulo, SP, Brazil

^b Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Ibirapuera University, São Paulo, Brazil

^d Butantan Institute, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2009

Received in revised form 1 June 2009

Accepted 3 June 2009

Available online xxxxx

Keywords:

Phoneutria nigriventer

Tx2-6

Gene expression

Spider toxin

Nitric oxide

Penile erection

ABSTRACT

The peptides Tx2-5 and Tx2-6, isolated from the whole venom of “armed-spider” *Phoneutria nigriventer* venom, are directly linked with the induction of persistent and painful erection in the penis of mammals. The erection induced by Tx2-6 has been associated with the activation of nitric oxide synthases. There is a scarcity of studies focusing on the outcome of Tx2-6 at the molecular level, by this reason we evaluated the gene profile activity of this toxin at the nitric oxide (NO) pathway. After microarray analyses on cavernous tissue of mice inoculated with Tx2-6 we found that only 10.4% (10/96) of these genes were differentially expressed, showing a limited effect of the toxin on the NO pathway. We found the genes *sparc*, *ednrb*, *junc*, *cdkn1a*, *bcl2*, *ccl5*, *abcc1* over-expressed and the genes *sod1*, *s100a10* and *fth1* under-expressed after inoculation of Tx2-6. The differential expressions of *sparc* and *ednrb* genes were further confirmed using real-time PCR. Interestingly, *ednrb* activates the L-arginine/NO/cGMP pathway that is involved in the relaxation of the cavernous body. Therefore the priapism induced by Tx2-6 is a consequence of a highly specific interference of this neurotoxin with the NO pathway.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The armed-spider *Phoneutria nigriventer*, of the Ctenidae family, inhabits South American countries; it hunts by wandering the soil searching for preys and has an aggressive behavior against humans (Brazil, 1925). Typically, signs observed from bites of the *Phoneutria* spider include pain, hyperemia and edema of the affected region.

However, young and elderly individuals bitten by the *Phoneutria* spider can also present intense tachycardia, hypertension, pulmonary edema and priapism (Bucarety et al., 2000, 2008). The whole venom of *P. nigriventer* is composed of distinct polypeptides and biologically active molecules, most of them neurotoxins (Richardson et al., 2006) and interferes with the function of ionic channels (Araujo et al., 1993; Corzo and Escoubas, 2003; Corzo et al., 2005; Dos Santos et al., 2002; Kalapothakis et al., 1998; Martin-Moutot et al., 2006; Richardson et al., 2006; Troncone et al., 2003); it also causes vascular damage in the central nervous system of rats that ultimately disrupts the hematoencephalic barrier (de Paula Le Sueur et al.,

* Corresponding author. Tel./fax: +55 11 3061 7183.

E-mail address: fvillanova@gmail.com (F.E. Villanova).

¹ These authors contributed equally to this work.

2003; Le Sueur et al., 2004). Purified toxins from the PhTx3 fraction of the *Phoneutria* venom block specifically calcium channels, giving rise to glutamate release, calcium uptake and glutamate uptake in synaptosoma (Cordeiro Mdo et al., 1992; Diaz, 2004). On the other hand, the PhTx2 fraction affects the voltage-dependent gating of sodium channels (Matavel et al., 2002, 2009; Richardson et al., 2006). Interestingly, neurotoxins isolated from the PhTx2 fraction induce painful and persistent penile erection (priapism), most notably in pediatric patients (Cordeiro Mdo et al., 1992; Diaz, 2004) although it may also occurs in adults alike (Bucaretschi et al., 2008). Penile erection is a complex neurovascular event controlled by chemical mediators released from the cavernous nerve terminals and the sinusoidal endothelium of erectile tissues. Nerves and endothelial cells directly release nitric oxide (NO) in the penis, where it stimulates guanylyl cyclase to produce cGMP (cyclic guanosine monophosphate) that subsequently lowers intracellular calcium levels. These events trigger the relaxation of arterial and trabecular smooth muscle cells, leading to arterial dilatation and penile erection (Agarwal et al., 2006; Napoli and Ignarro, 2003). On the other hand, phosphodiesterase 5 (PDE5) hydrolyzes cGMP and this abrogates the erection mediated by the NO/cGMP smooth muscle relaxation. Nitric oxide is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), it has three isoforms: inducible (iNOS); neuronal (nNOS) which is expressed in neuronal cells in the cavernous body; and endothelial (eNOS) expressed equally in smooth muscle cells in the cavernous body and endothelium (Burnett, 1997; Musicki and Burnett, 2006).

Among the different peptides already identified in the PhTx2 fraction from the venom of *Phoneutria* only Tx2-5 and Tx2-6, which share 89% of similarity in the amino acid sequence, have been observed to stimulate relaxation of the smooth muscles of the cavernous body of rabbits, rats and mice, thereby inducing the penile erection (Andrade et al., 2008; Nunes et al., 2008; Rego et al., 1996; Yonamine et al., 2004). The priapism induced by these neurotoxins has been directly linked with nitric oxide pathway in rats and mice (Nunes et al., 2008; Yonamine et al., 2004). Interestingly, priapism induced by Tx2-5 can be partially suppressed in mice pretreated with a non-selective nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME, N[omega]-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (Yonamine et al., 2004).

Pretreatment of rats with L-NAME inhibited penile erection after inoculation of Tx2-6, and nitric oxide levels in cells of the cavernous body are increased after the administration of the toxin (Nunes et al., 2008). Since Tx2-6 seems to be highly linked to nitric oxide production, priapism induced by this neurotoxin could involve the activity of several genes of nitric oxide pathway. In order to investigate this hypothesis, we analyzed the mRNA profile expression of genes involved in the nitric oxide pathway in mouse erectile tissue after Tx2-6 treatment. Our findings could give new insights regarding the mechanisms of Tx2-6-induced priapism, and also provide a nitric oxide pathway-guided therapy to be used in the treatment of erectile dysfunction.

2. Material and methods

2.1. Toxin

Whole venom from the “armed-spider” was obtained by electrical stimulation. The toxin was then dried and separated by chromatography on a Sephadex G50 column. The active peak was further purified by high-pressure liquid chromatography. The identity of the Tx2-6 peptide was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Ettan-Amersham Biosciences) and sequenced by Edman degradation (Edman, 1949).

2.2. Animals

Fourteen male Swiss adult mice (*Mus musculus*, Rodentia, Mammalia) between 18 and 24 weeks of age and weighing 30–35 g were provided by the Central Bioterism of the University of São Paulo Medical School (São Paulo, Brazil). The mice were maintained at our animal care facility for 1 week prior to experimental use. The experiments were approved by the local ethical board council no. 759/06 (University of São Paulo, Medical School, Brazil).

The animals were separated into two groups with each group receiving intracavernosal inoculation (icv) with the following reagents:

- (i) Control group ($n = 7$) injected with 20 μ l of saline solution (0.9% NaCl);
- (ii) Treated group ($n = 7$) injected with 1 μ g/kg of the Tx2-6 toxin diluted in 20 μ l of saline solution.

One hour after inoculation of the Tx2-6 penile erection was observed in the treated group. All animals were sacrificed after 1 h after the initiation of erection and the penile organ was removed. Each sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing (usually next day).

2.3. RNA extraction

Total RNA from both the control and test groups was extracted with Trizol[®] (Invitrogen, CA, USA) and purified on RNeasy columns (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purity and concentration of the samples were determined by the absorbance readings at 260 and 280 nm with a spectrophotometer (Nanodrop ND-1000-Thermo Fisher Scientific, MA, USA). In order to evaluate the integrity of the extracted RNA, all samples were analyzed in agarose gel electrophoresis with formaldehyde under denaturing conditions. 18S and 28S bands were observed for each sample. The RNA samples were quantified and pooled into two groups: (1) RNA from all mice injected with Tx2-6 and (2) RNA from all mice injected with saline. In the end each group contained 5 μ g of total RNA.

2.4. Synthesis of labelled probes

The cDNA probes were prepared from the 5 μ g of purified RNA from each pool. Complementary DNA (cDNA) was

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	abcc1	adm	alas2	agtr1a	bcl2	bnip3	cc12	Ccl3
2	cc15	cdkn1a	cfr	col1a1	col2a1	col3a1	csf1	cxcl2
3	cyp19a1	cyp2d26	cyp3a13	ddit3	edn1	ednrb	egr1	epo
4	flt1	fmr1	fn1	fos	flh1	flt1	flt2	gadd45a
5	Gadd45b	gadd45g	gclc	gclm	h2-ea	hbb-bh1	hmox1	hprt1
6	hmrt11i	hmrt112	hspca	hspa4	icam1	igfbp1	il10	il1a
7	il1b	il2	il4	il6	ilk	junb	lanc1	madcam1
8	mmp2	mmp7	mmp9	myb	myc	ncam1	nfbia	nos2
9	ogg1	oprm1	pdgfa	pdgfb	pla2g2d	plat	svep1	prkdc
10	prkg1	hrmt113	ptgs2	s100a10	serpine1	sftpa1	shc1	slc6a6
11	slc7a1	slc7a2	sod1	sod2	sparc	tgfb1	timp1	tnf
12	tnfrsf1a	fas	tfr	txnd1	tyr	vcam	vegfa	zfpn1a1

Fig. 1. Location of the genes involved in the nitric oxide pathway. Position of mouse genes spotted on the surface of nylon membranes of the Mouse Nitric Oxide Signaling Pathway. For additional details see Methods.

synthesized using the RevertAid™ H Minus M-First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, ON, Canada) with 5 µg of the pooled RNA and 500 pmol/ml oligo dT. The reaction was incubated at 70 °C for 5 min and immediately transferred to ice. Then, 4 µL of 5× first strand buffer, 10 mM of each dNTP, 1 µL DNase-free water and 200 U reverse transcriptase were added to the reaction mixture. The reaction was incubated at 42 °C for 60 min. Finally, the enzyme was heated at 70 °C for 15 min to stop the reaction. The synthesized cDNA was then used as a template for linear amplification by DNA polymerase (LPR cocktail, Superarray Bioscience Corporation, MD, USA) with Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) and specific primers according to the manufacturer's instructions (Superarray Bioscience Corporation, MD, USA).

2.5. Microarray membrane

The effect of Tx2-6 on gene expression was analyzed using commercially available cDNA arrays corresponding to the murine NO pathway (GEArray Q series-MM034 Mouse Nitric Oxide Signaling Pathways, Superarray Bioscience Corporation, MD, USA). Each array consisted of a nylon membrane with 450 base pairs (bp) cDNA sequences from 96 genes spotted in quadruplicate (tetraspots). These genes are involved in the mouse NO pathway, and the locations of these genes on the membrane are depicted in Fig. 1.

2.6. Hybridization and microarray analysis

The membranes were pre-hybridized for 6 h at 60 °C and then hybridized overnight at 60 °C with the denatured and biotinylated cDNA probes. The membranes were then

washed twice with 2× SSC, 1% SDS and twice with 0.1× SSC, 0.5% SDS for 15 min at 60 °C. The membranes were blocked for 40 min and incubated with alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (1:8000) for 10 min. The membranes were washed with 1× Buffer F (Superarray, MD, USA) for 20 min and the hybridized biotinylated probes were detected by chemiluminescence using the CDP-Star alkaline phosphatase substrate (Superarray, MD, USA). The membranes were exposed to Kodak BioMax films (KODAK, NY, USA) for periods between 1 and 20 min. Finally, the films were scanned and the images were digitized for further analysis.

2.7. Quantitative PCR

The altered gene expressions of *ednrb*, *sparc* and *sod1* were verified by real-time quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analysis. RNA samples used in qRT-PCR were the same used to perform the microarray experiments. cDNA was synthesized using 1.5 µg of RNA. Reverse transcription was made using oligo dT 12–18 primer and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) as recommended by the manufacturer. Each cDNA mixture was diluted 1:5 in distilled H₂O for subsequent PCR amplification.

The following primers were used: *sparc* (NCBI accession No. NM_009242) sense 5'-ACC ACA CGT TTC TTT GAG AC-3', antisense 5'-CAT CAG AGG GAG AGA GTT CA-3', covering a 159-bp sequence; *ednrb* (NCBI accession No. NM_007904) sense 5'-ATT GGT ATC AAC ATG GCT TC-3', antisense 5'-TTG GCT TTG AAC TTC AGG-3', covering a 170-bp sequence; *sod1* (NCBI accession No. NM_011434.1) sense 5'-CCA GTG

CAG GAC CTC ATT TT-3', antisense 5'-TCC CAG CAT TTC CAG TCT TT-3', covering a 251-bp sequence; and the control reference gene β -actin (NCBI accession No. NM 007393.3) sense 5'-CTG TGG CAT CCA CGA AAC TA-3', antisense 5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA-3', covering a 199-bp region. The efficiency of amplification for all primers was determined by standard dilution curves.

Cycling and fluorescence detection were performed using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). The reaction mixture contained 4 μ l of RealMasterMix SYBR ROX (5' Prime, Berlin, Germany), 1 μ mol/ μ l of forward and reverse primers and 1 μ l of diluted cDNA in a total volume of 10 μ l. The cycling conditions were: 95 °C for 2 min and 40 cycles of [95 °C/15 s; 60 °C/15 s; 68 °C/30 s]. No template controls (NTCs = water added instead of cDNA) were conducted. Each reaction was amplified in triplicates. For normalization of the data, the mRNA expression of β -actin (house-keeping gene) was chosen as a reference gene expression level. The gene expression levels in treated samples relative to the controls were calculated using the comparative C_t method ($\Delta\Delta C_t$ method) with the following formulas: $\Delta C_t = C_t$ (target) – C_t (normalized, β -actin); $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ test – ΔC_t control. Fold increase in the expression of specific mRNA in the treated group compared to normal controls was calculated as $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

2.8. Statistical analysis

Densitometric quantification of microarray images was performed using the quantitative software, ArrayLab (Diracom Bioinformática, São Paulo, Brazil). In order to quantify spot intensities, we used a grid tool from the software and quantified the signal and background intensities for each tetraspot on the microarray, and calculated the sum of the pixel intensities within each spot. This value represented the total amount of cDNA hybridized to the target DNA on the membrane. The four local background samples surrounding the spot were measured, and the average background was subtracted from the average signal of the tetraspots. Values less than zero were discarded (background > spot signal). In order to normalize the signal intensity between the two arrays, a global normalization method was used (Cao et al., 2002; Sasaki et al., 2001). The data filtering criteria were as follows: at least one of the spot intensities to be compared had to be more than twice the background intensity, and the spot intensity ratios had to be higher than 2.0 [$-1 < \log_2(\text{Control})$ for over-expression] or lower than -2.0 [$\log_2(\text{Treated}) > 1$ for sub-expression]. A dispersion plot containing the $\log_2(\text{Control})$ and $\log_2(\text{Treated})$ values was constructed using the Excel program (Excel 2007 – Microsoft) in order to visualize the distribution of the genes affected by Tx2-6 treatment.

The Mann–Whitney test was used to verify the relative quantification of the expression differences for the selected genes (*sparc*, *ednrb* and *sod1*) between the control and the Tx2-6 treated group. Differences were considered significant at P -value of less than 5% ($P \leq 0.05$). The MedCalc 9.3 statistical software (Mariakerke, Belgium) was used to construct the bar graphs.

3. Results

3.1. Erection induced by Tx2-6

After 35–45 min of Tx2-6 injection we observed that penile erection was present in all mice. This effect lasted for 120–140 min after inoculation. On the other hand, mice inoculated only with saline did not present any sign of penile erection.

3.2. Gene expression profile

In order to identify differentially expressed genes, we compared the images of arrays hybridized to biotin-16-UTP DNA probes that were generated from the total RNA of the control and treated groups (Fig. 2). Analyses of the control and treated membranes revealed that 32 of the 96 genes (33.3%) on the array had a detectable hybridization signal while 64 of the 96 genes (66.7%) had either only trace levels of hybridization deemed to be background or no signal at all (Fig. 2). Genes that exhibited a 2-fold or greater change in mRNA expression level in either direction between mice with Tx2-6 inoculation and control mice were considered to be differentially expressed. Following this criterion, we identified 10.4% (10/96) with differential expression. Seven of the genes were over-expressed (black dots in Fig. 3) and three of the genes were under-expressed (grey dots in Fig. 3) by the Tx2-6 treated mice compared to controls.

3.3. Characteristics of genes differentially expressed by Tx2-6

Genes identified to be differentially expressed in the inoculated mice compared to the control mice were involved in cell cycle control, apoptosis, immune system activation, free radical metabolism and signal transduction (Table 1). Among the over-expressed genes, many of them have specific cellular functions including interference with the cell cycle progression (*cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A and *junb*, jun-B oncogene), signal transduction (*ednrb*, endothelin receptor type B), activation of the immune system (*ccl5*, chemokine C–C motif ligand 5), cell adhesion and extracellular matrix remodeling (*sparc*, secreted acidic cysteine-rich glycoprotein gene), and inhibition of apoptosis (*bcl2*, B-cell leukemia). In addition, we also found that the *abcc* (ATP-binding cassette 1) gene was over-expressed in Tx2-6 treated mice, an interesting finding considering that this gene was associated with defense mechanisms against toxic compounds.

Conversely, the under-expressed genes also participated in numerous cellular functions including iron homeostasis (*fth* – ferritin heavy chain 1), dimerization of *anxa2/p36 s100a10* (S100 calcium binding protein A10) and protection against oxidative stress (*sod1* – superoxide dismutase 1).

3.4. PCR quantification

We next performed real-time PCR to validate the distinct expression levels of the *sparc*, *ednrb* and *sod1* genes as observed on the cDNA microarrays. The efficiency of amplification for the various PCR reactions as determined by the standard dilution curves (data not shown) was close

Fig. 2. Membrane microarrays containing the 96 genes. Genes involved in the mouse nitric oxide (NO) pathway were spotted in quadruplicate. Panel (1) depicts the hybridized cDNA probe of pooled RNA obtained from seven mice of the control group inoculated with saline alone. Panel (2) depicts the hybridized cDNA probe of pooled RNA obtained from seven mice (treated group) inoculated with Tx2-6. Columns (A–H) and lines (1–12) indicate the location of distinct genes involved in the NO pathway of mice according to Fig. 1.

to 100%, thereby allowing further analysis using the comparative ΔC_t method. Fig. 4 shows the normalized mRNA expressions of *sparc*, *ednrb* and *sod1* in the Tx2-6 treated group, compared with those in the control group. Values were represented as mean $\pm$ SE of at least five samples for each experimental group in triplicate wells per point. The mRNA expressions of *sparc* ($P \leq 0.001$, 1.75-fold over-expressed) and *ednrb* ($P \leq 0.001$, 1.8-fold over-expressed) were significantly higher in the treated group than those in the control group. However, the mRNA expression level of *sod1* as measured in animals treated with Tx2-6 was not statistically different than the expression of *sod1* in control animals ($P \geq 0.05$).

4. Discussion

During sexual stimulation, the NO synthesized from L-arginine by neuronal NO synthase (nNOS) is released from non-adrenergic non-cholinergic (NANC) nerve endings or from NO synthases of endothelial cells (eNOS) that were stimulated by acetylcholine released from cholinergic nerve endings (Fig. 5). NO activates, in turn, a soluble guanylyl cyclase of the smooth muscle cell that forms cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Subsequently, in response to activation of prostaglandin receptor (EP) by prostaglandins, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is also produced in the smooth muscle cell by adenylyl cyclase. Both, cGMP and cAMP activate their respective protein kinases G (i.e. PKG and PKA, respectively) which then phosphorylate certain proteins and ion channels. As a consequence, the intake of calcium ions is decreased. Myosin light chain phosphatase (MLC-phosp) is activated by this fall in the myoplasmic calcium levels.

Myosin light chain (MLC) is dephosphorylated by activated MLC-phosp, and detaches from the actin filaments causing relaxation of smooth muscle (Fig. 5). This relaxation allows the inflow of blood into the corpus cavernosum of penis

Fig. 3. Logarithmic scatter plots of the normalized fluorescence intensity values from the control and Tx2-6 treated microarrays. The position of each dot on the scatter plot corresponds to the normalized average signal intensity (log scale) of a single gene. Both the X and Y-axes indicate the normalized log-intensity signal of the spots detected on the control and Tx2-6 treated microarray membranes. The middle line indicates values that represent a treated/control ratio of 1.0 (similar levels of expression in both tissues). The upper line represents a treated/control ratio of 2.0 (2-fold greater expression in the Tx2-6 treated erectile tissue compared to control); over-expressed genes after Tx2-6 treatment are indicated as black circles. The lower line represents a treated/control ratio of 0.5 (2-fold lower expression in treated mice compared to control); the under-expressed genes are shown as grey circles.

Table 1
Differentially expressed genes in mouse erectile tissue after inoculation of Tx2-6.

Gene	Location	Fold change ^a	Gene description
<i>Over-expressed genes</i>			
<i>sparc</i>	E11	+4.24	Secreted acidic cysteine-rich glycoprotein; matricellular protein with roles in adhesion, fibrosis, angiogenesis, and ECM remodeling
<i>junb</i>	F7	+3.68	Jun-B oncogene; transcription factor
<i>ednrb</i>	F3	+3.50	Endothelin receptor type B; G protein coupled receptor for endothelins
<i>cdkn1a</i>	B2	+3.18	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; blocks cell cycle progression
<i>bcl2</i>	E1	+2.71	B-cell leukemia/lymphoma 2; anti-apoptotic signaling
<i>ccl5</i>	A2	+2.40	Chemokine (C-C motif) ligand 5; involved in the inflammatory response
<i>abcc1</i>	A1	+2.19	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1; involved in multi-drug resistance; protection against toxic compounds
<i>Under-expressed genes</i>			
<i>fth</i>	E4	−2.67	Ferritin heavy chain 1; involved in iron homeostasis; stores iron in a soluble, non-toxic, readily available form
<i>s100a10</i>	D10	−2.33	S100 calcium binding protein A10; induces the dimerization of anxa2/p36
<i>sod1</i>	C11	−2.22	Superoxide dismutase 1, soluble; protects against oxidative stress

^a Logarithmic base 2 expression of the genes in the treated samples relative to expression in the control samples, positive values indicate a relative increase in expression, and the negative values indicate a relative reduction in gene expression.

thus leading to erection (for review see Dean and Lue, 2005; Jin and Burnett, 2006; Maas et al., 2002).

It has been proposed that Tx2-5 and Tx2-6 induce erection by activation of NO synthases (dashed arrows in Fig. 5) (Nunes et al., 2008; Yonamine et al., 2004). This is based on the observation that half of mice treated prior to Tx2-5 inoculation with an L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, did not present erection. Likewise, 7-nitroindazole, a specific inhibitor of nNOS, completely reverted the effects of Tx2-5 in treated mice (Yonamine et al., 2004). In the same way, pretreatment of rats with L-NAME abolished the effect of erection induced by Tx2-6 (Nunes et al., 2008). Alternatively, Tx2-6 also could spur the potential of erection by increasing the mRNA levels of the *ednrb* and *sparc* genes that could result in increased protein products, as will be discussed below.

We analyzed the gene expression profile of erectile tissue after Tx2-6 treatment using the microarray technology. Our results showed that only 10% of the genes involved in the NO pathway were differentially expressed. Additionally, differential expressions of *sparc* and *ednrb* genes were further supported by real-time PCR results.

Then, we focused our attention on the *sparc* gene because it encodes a multi-functional protein that mediates cell-matrix interactions and cellular functions (Bradshaw et al., 1999; Schiemann et al., 2003). *Sparc* also influences a number of diverse biological processes such as vascular function. It has been shown that in osteoblasts, *sparc* promotes G protein (Gs) coupled to adenylyl cyclase to generate cyclic AMP (cAMP) (Kessler and Delany, 2007) and cAMP induce relaxation of trabecular smooth muscle (Dean and Lue, 2005). *Sparc* also interacts with the actinomyosin complex to potentially modulate the machinery involved in smooth muscle relaxation and contraction (Barker et al., 2005; Shi et al., 2007) (Fig. 5). Interestingly, erectile tissue of diabetic rats, a disease that can induce erectile dysfunction, revealed that after electrical induction of penile erection the *sparc* gene was under-expressed (Sullivan et al., 2005). This finding contrasts with our experiments that detected over-expression of *sparc* gene in penile erection induced by Tx2-6. Thus it is tempting to speculate that *sparc* gene may have an important role in penile erection.

Moreover, over-expression of *ednrb* (endothelin receptor type B) was also confirmed by real-time PCR. This receptor has been found on the endothelium and smooth muscle cells in both humans and animal models (Christ et al., 1995; Parkkisenniemi and Klinge, 1996). As is depicted in Fig. 5, *ednrb* is activated by endothelins (ET), a family of peptides mainly synthesized in the endothelial cell layer with potent vasoconstrictor and vasodilator properties (Filippi et al., 2003; Granchi et al., 2002). Activation of *ednrb* on endothelial cells mediates an increase in endothelial nitric oxide synthase (NOS) activity, and this effect results in the release of NO that in turn mediates relaxation of the smooth muscle responsible for erection (Christ et al., 1995; Parkkisenniemi and Klinge, 1996).

Conversely, *sod1* (superoxide dismutase 1) was an under-expressed gene in the erectile tissue after Tx2-6 injection. This gene encodes the superoxide dismutase enzyme, SOD

Fig. 4. Relative mRNA expression of *sparc*, *ednrb* and *sod1* genes. The intensity was measured by real-time PCR in mice inoculated with Tx2-6 and control animals inoculated with saline. Values on the y-axis represent mRNA levels in arbitrary units, with all results normalized to the expression of the housekeeping gene (β -actin) of the same sample. Values are means $\pm$ SE for five experiments by group and triplicate wells per point. *Sparc* and *ednrb* gene expressions were significantly higher in the treated group compared to those in the control animals. *Sod1* gene was not differentially expressed. A probability level of $*P \leq 0.05$ was considered significant; ctrl: control group; icv: treated group injected intracavernously with Tx2-6 1 μ g/kg.

Fig. 5. Effect of Tx2-5 and Tx2-6 on the penile erection mechanism. The key molecular events associated with nitric oxide (NO) production in the corpus cavernosum are depicted in the diagram; the possible interference of Tx2-5 and Tx2-6 with specific events of the NO pathway to induce priapism is also shown. Recent studies indicate that Tx2-5 and Tx2-6 affect the penile erection mechanism: (1) Tx2-5 has a direct action on voltage-gated sodium channels (Nav) and it may also affect, by unknown mechanisms, nitric oxide synthases – nNOS and eNOS (Yonamine et al., 2004). (2) In addition to the interference with Nav channels, Tx2-6 increases nitric oxide levels, possibly through activation of nNOS and eNOS (Nunes et al., 2008). (3) Since Tx2-6 deregulates mRNA expression of *ednrb*, *sod1* and *sparc* genes, we propose that *ednrb* and *sparc* induce priapism due to the important functions they have in the mechanism of erection. ACh: acetylcholine; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; Ca^{2+} : calcium ions; Cholinergic: cholinergic nerve ending; NANC: non-adrenergic, non-cholinergic nerve ending; NO: nitric oxide; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; *ednrb*: endothelin receptor type B; *sod1*: superoxide dismutase; *sparc*: secreted acidic cysteine-rich glycoprotein; EP: prostaglandin receptor; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; GTP: guanosine triphosphate; Gs: G protein; L-arg: L-arginine; MLC: myosin light chain; MLC-phosph: myosin light chain phosphatase; M3: muscarinic receptor 3 for acetylcholine; Nav: voltage-gated sodium channel; P: phosphate group; PGE2: prostaglandin E2; PKA: protein kinase A; PKG: protein kinase G; O_2^- : superoxide; ONOO $^-$: peroxynitrite; Tx2-5 and Tx2-6: peptides from the *Phonetrutia nigriventer* spider venom.

(Fig. 5), that plays a vital role in protecting the cell against oxidant agents, such as peroxynitrite (ONOO $^-$), a by-product of reaction between nitric oxide and superoxide (O_2^-) (Agarwal et al., 2006). Peroxynitrite is a highly oxidative substance, and can damage DNA, lipids and a diverse range of proteins. Thus, under-expression of the protective factor *sod1* in the erectile tissue after Tx2-6 injection would be predicted to have a detrimental effect on the cells. However, real-time PCR did not indicate that *sod1* was differentially expressed after Tx2-6 treatment. Given the specificity of real-time PCR compared to microarray analysis, we believe that PCR results provided a more accurate data and thus concluded that the mRNA levels of the *sod1* gene remained unchanged in the penile tissue in both groups.

Interestingly, among the 96 genes involved in the NO pathway of mouse that were analyzed in our study, only a small fraction of them were affected by Tx2-6. Although, penile erection as mediated by Tx2-6 may rely primarily on the NO pathway, the activity of Tx2-6 was highly specific to only a few genes in this pathway. Notably, the *ednrb* gene may have pivotal function in the penile erection induced by Tx2-6 (Fig. 5). Thus, more specific

experiments should be performed in order to pinpoint the mechanism by which Tx2-6 induces penile erection and to map the repertoire of genes that may be regulated by this spider toxin.

In summary, neurotoxins Tx2-5 and Tx2-6, isolated from the venom of the armed-spider *P. nigriventer*, induce priapism in mammals (Andrade et al., 2008; Nunes et al., 2008; Yonamine et al., 2004) and the use of inhibitors of nitric oxide synthases curbs this effect (Yonamine et al., 2004). By this reason we focused specifically on genes involved on the nitric oxide pathway in mouse erectile tissue after inoculation of Tx2-6. We detected a small fraction of genes of nitric oxide pathway differentially expressed. In addition, we propose a molecular model to explain the interference of *sparc*, *sod1* and *ednrb* genes with the mechanism of the penile erection (Fig. 5). These genes have not been previously identified in the context of induction of erection by Tx2-6, and therefore represented novel candidates for further studies on the physiology of erection. A detailed understanding of the gene expression profile during penile erection induced by Tx2-6 could also provide therapeutic insights of erectile dysfunction.

Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo, Brazil), grant number 06/57922-3. F.E. Villanova is a PhD student supported by FAPESP (grant number: 06/57923-0). E. Leal is a postdoctoral researcher supported by FAPESP (grants numbers: 04/10372-3, 07/52841-8).

Conflicts of interest

All authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Agarwal, A., Nandipati, K.C., Sharma, R.K., Zippe, C.D., Raina, R., 2006. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J. Androl.* 27 (3), 335–347.
- Andrade, E., Villanova, F., Borra, P., Leite, K., Troncone, L., Cortez, I., Messina, L., Paranhos, M., Claro, J., Srougi, M., 2008. Penile erection induced in vivo by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. *BJU Int.* 102 (7), 835–837.
- Araujo, D.A., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Beirao, P.S., 1993. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 347 (2), 205–208.
- Barker, T.H., Baneyx, G., Cardo-Vila, M., Workman, G.A., Weaver, M., Menon, P.M., Dedhar, S., Rempel, S.A., Arap, W., Pasqualini, R., Vogel, V., Sage, E.H., 2005. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J. Biol. Chem.* 280 (43), 36483–36493.
- Brazil, V.V.J., 1925. Imunização por via intradérmica e por via subcutânea pelo soro antitoxenus. Método de dosagem e primeira aplicação no homem. *Bras. Med.* 60 (5), 555–563.
- Bucarety, F., Deus Reinaldo, C.R., Hyslop, S., Madureira, P.R., De Capitani, E.M., Vieira, R.J., 2000. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42 (1), 17–21.
- Bucarety, F., Mello, S.M., Vieira, R.J., Mamoni, R.L., Blotta, M.H., Antunes, E., Hyslop, S., 2008. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. *Clin. Toxicol. (Phila.)* 46 (9), 885–889.
- Burnett, A.L., 1997. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J. Urol.* 157 (1), 320–324.
- Cao, Z., Wu, H.K., Bruce, A., Wollenberg, K., Panjwani, N., 2002. Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (9), 2897–2904.
- Christ, G.J., Lerner, S.E., Kim, D.C., Melman, A., 1995. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I. Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *J. Urol.* 153 (6), 1998–2003.
- Cordeiro Mdo, N., Diniz, C.R., Valentim Ado, C., von Eickstedt, V.R., Gilroy, J., Richardson, M., 1992. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.* 310 (2), 153–156.
- Corzo, G., Escoubas, P., 2003. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol. Life Sci.* 60 (11), 2409–2426.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M., Nakajima, T., Gilles, N., 2005. A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry* 44 (5), 1542–1549.
- de Paula Le Sueur, L., Kalapothakis, E., da Cruz-Hofling, M.A., 2003. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Acta Neuropathol.* 105 (2), 125–134.
- Dean, R.C., Lue, T.F., 2005. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 32 (4), 379–395.
- Diaz, J.H., 2004. The global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of spider bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71 (2), 239–250.
- Dos Santos, R.G., Van Renterghem, C., Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Mori, Y., De Lima, M.E., Seagar, M., 2002. *Phoneutria nigriventer* omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. *J. Biol. Chem.* 277 (16), 13856–13862.
- Edman, P., 1949. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 22 (3), 475.
- Filippi, S., Marini, M., Vannelli, G.B., Crescioli, C., Granchi, S., Vignozzi, L., Luconi, M., Ferruzzi, P., Morelli, A., Forti, G., Ledda, F., Maggi, M., 2003. Effects of hypoxia on endothelin-1 sensitivity in the corpus cavernosum. *Mol. Hum. Reprod.* 9 (12), 765–774.
- Granchi, S., Vannelli, G.B., Vignozzi, L., Crescioli, C., Ferruzzi, P., Mancina, R., Vinci, M.C., Forti, G., Filippi, S., Luconi, M., Ledda, F., Maggi, M., 2002. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* 8 (12), 1053–1064.
- Jin, L., Burnett, A.L., 2006. RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clin. Sci. (Lond.)* 110 (2), 153–165.
- Kalapothakis, E., Penaforte, C.L., Leao, R.M., Cruz, J.S., Prado, V.F., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A., Gomez, M.V., Beirao, P.S., 1998. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon* 36 (12), 1971–1980.
- Kessler, C.B., Delany, A.M., 2007. Increased Notch 1 expression and attenuated stimulatory G protein coupling to adenylyl cyclase in osteonectin-null osteoblasts. *Endocrinology* 148 (4), 1666–1674.
- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B., da Cruz-Hofling, M.A., 2004. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. *Brain Res.* 1027 (1–2), 38–47.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25 (4), 402–408.
- Maas, R., Schwedhelm, E., Albsmeier, J., Boger, R.H., 2002. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc. Med.* 7 (3), 213–225.
- Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Alcaraz, G., Dos Santos, R.G., Cordeiro, M.N., De Lima, M.E., Seagar, M., Van Renterghem, C., 2006. *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with [micro] conotoxin binding sites. *Mol. Pharmacol.* 69 (6), 1931–1937.
- Matavel, A., Cruz, J.S., Penaforte, C.L., Araujo, D.A., Kalapothakis, E., Prado, V.F., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Beirao, P.S., 2002. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.* 523 (1–3), 219–223.
- Matavel, A., Fleury, C., Oliveira, L.C., Molina, F., de Lima, M.E., Cruz, J.S., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Ramos, C.H., Beirao, P.S., 2009. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry* 48 (14), 3078–3088.
- Musicki, B., Burnett, A.L., 2006. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231 (2), 154–165.
- Napoli, C., Ignarro, L.J., 2003. Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 97–123.
- Nunes, K.P., Costa-Goncalves, A., Lanza, L.F., Cortes, S.F., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Pimenta, A.M., Webb, R.C., Leite, R., De Lima, M.E., 2008. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon* 51 (7), 1197–1206.
- Parkkinen, U.M., Klinge, E., 1996. Functional characterization of endothelin receptors in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol. Toxicol.* 79 (2), 73–79.
- Rego, E., Bento, A.C., Lopes-Martins, R.A., Antunes, E., Novello, J.C., Marangoni, S., Giglio, J.R., Oliveira, B., De Nucci, G., 1996. Isolation and partial characterization of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. *Toxicon* 34 (10), 1141–1147.
- Richardson, M., Pimenta, A.M., Bemquerer, M.P., Santoro, M.M., Beirao, P.S., Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Bloch Jr., C., Vasconcelos, E.A., Campos, F.A., Gomes, P.C., Cordeiro, M.N., 2006. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 142 (3–4), 173–187.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., Tabata, S., 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.* 8 (4), 153–161.
- Shi, Q., Bao, S., Song, L., Wu, Q., Bigner, D.D., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2007. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival

- and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 26 (28), 4084–4094.
- Troncone, L.R.P., Georgiou, J., Hua, S.Y., Elrick, D., Lebrun, I., Magnoli, F., Charlton, M.P., 2003. Promiscuous and reversible blocker of presynaptic calcium channels in frog and crayfish neuromuscular junctions from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *J. Neurophysiol.* 90 (5), 3529–3537.
- Yonamine, C.M., Troncone, L.R., Camillo, M.A., 2004. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon* 44 (2), 169–172.

UNCORRECTED PROOF

REFERÊNCIAS

1. Escoubas P, Diochot S, Corzo G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. 2000;82(9-10):893-907.
2. Binford GJ, Cordes MH, Wells MA. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon*. 2005;45(5):547-60.
3. Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*. 2002;40(3):225-54.
4. Corzo G, Escoubas P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(11):2409-26.
5. Kawai N, Niwa A, Abe T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. *Brain Res*. 1982;247(1):169-71.
6. Khan SA, Zafar Y, Briddon RW, Malik KA, Mukhtar Z. Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res*. 2006;15(3):349-57.
7. Richardson M, Pimenta AM, Bemquerer MP, Santoro MM, Beirao PS, Lima ME, Figueiredo SG, Bloch C, Jr., Vasconcelos EA, Campos FA, Gomes PC, Cordeiro MN. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;142(3-4):173-87.
8. Ferentz AE. Integrating pharmacogenomics into drug development. *Pharmacogenomics*. 2002;3(4):453-67.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. 2. ed. 2001, Brasília, D. F.: Fundação Nacional de Saúde. 120.
10. Bucarechi F, Deus Reinaldo CR, Hyslop S, Madureira PR, De Capitani EM, Vieira RJ. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(1):17-21.
11. Brazil VV, J. Imunização por via intradérmica e por via subcutânea pelo sôro antictenus. Método de dosagem e primeira aplicação no homem. *Brazil Medico*. 1925;60(5):555-63.
12. Lucas S. Spiders in Brazil. *Toxicon*. 1988;26(9):759-72.
13. Chavez-Olortegui C, Bohorquez K, Alvarenga LM, Kalapothakis E, Campolina D, Maria WS, Diniz CR. Sandwich-ELISA detection of venom antigens in envenoming by *Phoneutria nigriventer* spider. *Toxicon*. 2001;39(6):909-11.
14. Entwistle ID, Johnstone RA, Medzihradszky D, May TE. Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon*. 1982;20(6):1059-67.
15. Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol*. 2002;22(5-6):579-88.
16. de Paula Le Sueur L, Kalapothakis E, da Cruz-Hofling MA. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria*

- nigriventer spider venom. *Acta Neuropathol.* 2003;105(2):125-34.
17. Rezende Junior L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon.* 1991;29(10):1225-33.
 18. Cordeiro Mdo N, Diniz CR, Valentim Ado C, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.* 1992;310(2):153-6.
 19. Diniz M, Paine M, Diniz C, Theakston R, Crampton J. Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* 1993;268(21):15340-2.
 20. Romano-Silva MA, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Ribeiro AM. Acetylcholine release from rat brain cortical slices evoked by the fraction P4 of the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* has Ca²⁺ and temperature independent components. *Neurosci Lett.* 1996;219(3):159-62.
 21. Kalapothakis E, Penaforte CL, Leao RM, Cruz JS, Prado VF, Cordeiro MN, Diniz CR, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV, Beirao PS. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon.* 1998;36(12):1971-80.
 22. Diniz CR, Cordeiro Mdo N, Junior LR, Kelly P, Fischer S, Reimann F, Oliveira EB, Richardson M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* 1990;263(2):251-3.
 23. Leao RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirao PS. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology.* 2000;39(10):1756-67.
 24. Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirao PS, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MA. *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem.* 1999;72(4):1472-81.
 25. de Castro Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza AH, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV. Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett.* 2008;439(2):170-2.
 26. Cordeiro Mdo N, de Figueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.* 1993;31(1):35-42.
 27. Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco L, Gomez MV. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int.* 2006;49(5):543-7.
 28. de Lima ME, Stankiewicz M, Hamon A, de Figueiredo SG, Cordeiro MN, Diniz CR, Martin-Eauclaire M, Pelhate M. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁽⁺⁾ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *J Insect Physiol.* 2002;48(1):53-61.
 29. Araujo DA, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirao PS. Effects of a toxic fraction,

- PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1993;347(2):205-8.
30. Kalapothakis E, Penaforte CL, Beirao PS, Romano-Silva MA, Cruz JS, Prado MA, Guimaraes PE, Gomez MV, Prado VF. Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon.* 1998;36(12):1843-50.
 31. Matavel A, Cruz JS, Penaforte CL, Araujo DA, Kalapothakis E, Prado VF, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirao PS. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.* 2002;523(1-3):219-23.
 32. Matavel A, Fleury C, Oliveira LC, Molina F, de Lima ME, Cruz JS, Cordeiro MN, Richardson M, Ramos CH, Beirao PS. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry.* 2009;48(14):3078-88.
 33. Christ GJ, Richards S, Winkler A. Integrative erectile biology: the role of signal transduction and cell-to-cell communication in coordinating corporal smooth muscle tone and penile erection. *Int J Impot Res.* 1997;9(2):69-84.
 34. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Boger RH. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med.* 2002;7(3):213-25.
 35. Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol.* 1998;508 (Pt 3):647-57.
 36. Teixeira CE, Faro R, Moreno RA, Rodrigues Netto N, Jr., Fregonesi A, Antunes E, De Nucci G. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum induced by scorpion venom. *Urology.* 2001;57(4):816-20.
 37. Teixeira CE, de Oliveira JF, Baracat JS, Priviero FB, Okuyama CE, Rodrigues Netto N, Jr., Fregonesi A, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology.* 2004;63(1):184-9.
 38. Teixeira CE, Teixeira SA, Antunes E, De Nucci G. The role of nitric oxide on the relaxations of rabbit corpus cavernosum induced by *Androctonus australis* and *Buthotus judaicus* scorpion venoms. *Toxicon.* 2001;39(5):633-9.
 39. Teixeira CE, Bento AC, Lopes-Martins RA, Teixeira SA, von Eickstedt V, Muscara MN, Arantes EC, Giglio JR, Antunes E, de Nucci G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitergic nerve fibres. *Br J Pharmacol.* 1998;123(3):435-42.
 40. Fletcher JI, Chapman BE, Mackay JP, Howden ME, King GF. The structure of versutoxin (delta-atracotoxin-Hv1) provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. *Structure.* 1997;5(11):1525-35.
 41. Nicholson GM, Walsh R, Little MJ, Tyler MI. Characterisation of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation. *Pflugers Arch.* 1998;436(1):117-26.
 42. Yonamine CM, Troncone LR, Camillo MA. Blockade of neuronal nitric

- oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal Phoneutria nigriventer spider toxin. *Toxicon*. 2004;44(2):169-72.
43. Andrade E, Villanova F, Borra P, Leite K, Troncone L, Cortez I, Messina L, Paranhos M, Claro J, Srougi M. Penile erection induced in vivo by a purified toxin from the Brazilian spider Phoneutria nigriventer. *BJU Int*. 2008;102(7):835-7.
 44. Nunes KP, Costa-Goncalves A, Lanza LF, Cortes SF, Cordeiro MN, Richardson M, Pimenta AM, Webb RC, Leite R, De Lima ME. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*. 2008;51(7):1197-206.
 45. Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev*. 1995;75(1):191-236.
 46. Goldstein AM, Meehan JP, Morrow JW, Buckley PA, Rogers FA. The fibrous skeleton of the corpora cavernosa and its probable function in the mechanism of erection. *Br J Urol*. 1985;57(5):574-8.
 47. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005;32(4):379-95, v.
 48. Jin L, Burnett AL. RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(2):153-65.
 49. Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol*. 1997;157(1):320-4.
 50. Christ GJ, Day N, Santizo C, Sato Y, Zhao W, Sclafani T, Bakal R, Salman M, Davies K, Melman A. Intracorporal injection of hSlo cDNA restores erectile capacity in STZ-diabetic F-344 rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(4):H1544-53.
 51. Musicki B, Burnett AL. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(2):154-65.
 52. Kharitonov SA. NOS:molecular mechanisms, clinical aspects, therapeutic and monitoring approaches. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(2):141-9.
 53. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992;257(5068):401-3.
 54. Burnett AL. Nitric oxide regulation of penile erection: biology and therapeutic implications. *J Androl*. 2002;23(5):S20-6.
 55. Mott RE, Helmke BP. Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(5):C1616-26.
 56. Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol*. 2000;163(2):460-3.
 57. Shabsigh R, Anastasiadis AG. Erectile dysfunction. *Annu Rev Med*. 2003;54:153-68.
 58. Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Bosch R, Fugl-Meyer AR, Laumann EO, Lizza E, Martin-Morales A. Epidemiology/risk factors of sexual dysfunction. *J Sex Med*. 2004;1(1):35-9.
 59. Rendell MS, Rajfer J, Wicker PA, Smith MD. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. *Jama*. 1999;281(5):421-6.

60. Zippe CD, Kedia AW, Kedia K, Nelson DR, Agarwal A. Treatment of erectile dysfunction after radical prostatectomy with sildenafil citrate (Viagra). *Urology*. 1998;52(6):963-6.
61. Zelefsky MJ, McKee AB, Lee H, Leibel SA. Efficacy of oral sildenafil in patients with erectile dysfunction after radiotherapy for carcinoma of the prostate. *Urology*. 1999;53(4):775-8.
62. Kedia S, Zippe CD, Agarwal A, Nelson DR, Lakin MM. Treatment of erectile dysfunction with sildenafil citrate (Viagra) after radiation therapy for prostate cancer. *Urology*. 1999;54(2):308-12.
63. Corbin JD. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2004;16 Suppl 1:S4-7.
64. Seftel AD. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: molecular pharmacology and interactions with other phosphodiesterases. *Curr Pharm Des*. 2005;11(31):4047-58.
65. Francis SH, Corbin JD. Phosphodiesterase-5 inhibition: the molecular biology of erectile function and dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005;32(4):419-29, vi.
66. Padma-Nathan H, McMurray JG, Pullman WE, Whitaker JS, Saoud JB, Ferguson KM, Rosen RC. On-demand IC351 (Cialis) enhances erectile function in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2001;13(1):2-9.
67. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21(1 Suppl):10-4.
68. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science*. 1996;274(5287):536-9.
69. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996;14(13):1675-80.
70. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 1991;251(4995):767-73.
71. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(12):951-60.
72. Guo X, Zhang J, Fu X, Wei Q, Lu Y, Li Y, Yin G, Mao Y, Xie Y, Rui Y, Ying K. Analysis of common gene expression patterns in four human tumor cell lines exposed to camptothecin using cDNA microarray: identification of topoisomerase-mediated DNA damage response pathways. *Front Biosci*. 2006;11:1924-31.
73. Guindalini C, Tufik S. [Use of microarrays in the search of gene expression patterns: application to the study of complex phenotypes]. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29(4):370-4.
74. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-64.
75. Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J. Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques*. 2003;Suppl:45-51.
76. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics

- into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487-91.
77. Poulsen TT, Pedersen N, Perin MS, Hansen CK, Poulsen HS. Specific sensitivity of small cell lung cancer cell lines to the snake venom toxin taipoxin. *Lung Cancer*. 2005;50(3):329-37.
 78. Pachiappan A, Thwin MM, Manikandan J, Gopalakrishnakone P. Glial inflammation and neurodegeneration induced by candoxin, a novel neurotoxin from Bungarus candidus venom: global gene expression analysis using microarray. *Toxicon*. 2005;46(8):883-99.
 79. Cher CD, Armugam A, Lachumanan R, Coghlan MW, Jeyaseelan K. Pulmonary inflammation and edema induced by phospholipase A2: global gene analysis and effects on aquaporins and Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2003;278(33):31352-60.
 80. Sullivan CJ, Teal TH, Luttrell IP, Tran KB, Peters MA, Wessells H. Microarray analysis reveals novel gene expression changes associated with erectile dysfunction in diabetic rats. *Physiol Genomics*. 2005;23(2):192-205.
 81. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-9.
 82. Huang da W, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, Guo Y, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W169-75.
 83. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*. 2003;4(5):P3.
 84. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3448-9.
 85. Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J. Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods*. 2005;2(5):337-44.
 86. Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*. 1999;11(4):305-12.
 87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
 88. Goyal HO, Braden TD, Cooke PS, Szewczykowski MA, Williams CS, Dalvi P, Williams JW. Estrogen receptor alpha mediates estrogen-inducible abnormalities in the developing penis. *Reproduction*. 2007;133(5):1057-67.
 89. Mizusawa H, Hedlund P, Hakansson A, Alm P, Andersson KE. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*. 2001;132(6):1333-41.
 90. Christ GJ, Lerner SE, Kim DC, Melman A. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I. Characteristics of contraction of isolated

- corporal tissue strips. *J Urol*. 1995;153(6):1998-2003.
91. Dai Y, Pollock DM, Lewis RL, Wingard CJ, Stopper VS, Mills TM. Receptor-specific influence of endothelin-1 in the erectile response of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(1):R25-30.
 92. Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Raina R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl*. 2006;27(3):335-47.
 93. Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept*. 2006;133(1-3):41-6.
 94. Hu Y, Bock G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *Faseb J*. 1998;12(12):1135-42.
 95. Jeremy JY, Angelini GD, Khan M, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Thompson CS, Bruckdorfer KR, Naseem KM. Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc Res*. 2000;46(1):50-4.
 96. Barker TH, Baneyx G, Cardo-Vila M, Workman GA, Weaver M, Menon PM, Dedhar S, Rempel SA, Arap W, Pasqualini R, Vogel V, Sage EH. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36483-93.
 97. Escoubas P, Sollod B, King GF. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*. 2006;47(6):650-63.
 98. Freund CL, Wilfond BS. Emerging ethical issues in pharmacogenomics: from research to clinical practice. *Am J Pharmacogenomics*. 2002;2(4):273-81.
 99. Kirkwood SC, Hockett RD, Jr. Pharmacogenomic biomarkers. *Dis Markers*. 2002;18(2):63-71.
 100. Wanke E, Ferroni A, Gattanini P, Meldolesi J. alpha Latrotoxin of the black widow spider venom opens a small, non-closing cation channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;134(1):320-5.
 101. Changeux JP, Kasai M, Lee CY. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970;67(3):1241-7.
 102. Siemens J, Zhou S, Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, King D, Julius D. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*. 2006;444(7116):208-12.
 103. Sudhof TC. alpha-Latrotoxin and its receptors: neurexins and CIRL/latrophilins. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:933-62.
 104. Ushkaryov YA, Rohou A, Sugita S. alpha-Latrotoxin and its receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(184):171-206.
 105. Villanova FE, Andrade E, Leal E, Andrade PM, Borra RC, Troncone LR, Magalhaes L, Leite KR, Paranhos M, Claro J, Srougi M. Erection induced by Tx2-6 toxin of Phoneutria nigriventer spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon*. 2009.
 106. Takase H, Oemar BS, Pech M, Luscher TF. Platelet-derived growth factor-induced vasodilatation in mesenteric resistance arteries by nitric oxide: blunted response in spontaneous hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*.

- 1999;33(2):223-8.
107. Rego E, Bento AC, Lopes-Martins RA, Antunes E, Novello JC, Marangoni S, Giglio JR, Oliveira B, De Nucci G. Isolation and partial characterization of a polypeptide from Phoneutria nigriventer spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. *Toxicon*. 1996;34(10):1141-7.
 108. Marangoni S, Borges NC, Marangoni RA, Antunes E, Vieira CA, Novello JC, Domont GB, Giglio JR, Oliveira B, de Nucci G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from Phoneutria nigriventer (armed spider) venom. *Toxicon*. 1993;31(4):377-84.
 109. Christ GJ, Rehman J, Day N, Salkoff L, Valcic M, Melman A, Geliebter J. Intracorporal injection of hSlo cDNA in rats produces physiologically relevant alterations in penile function. *Am J Physiol*. 1998;275(2 Pt 2):H600-8.
 110. Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SK, Lopatin AN, Isom LL. Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(5):636-47.
 111. Gillespie MN, Niehaus KE, Rodger IW, Diamond L. Sodium-dependent relaxation in arterial smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1981;8(3):209-14.
 112. Shi Q, Bao S, Song L, Wu Q, Bigner DD, Hjelmeland AB, Rich JN. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene*. 2007;26(28):4084-94.
 113. Huang J, Mahavadi S, Sriwai W, Hu W, Murthy KS. Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J*. 2006;396(1):193-200.
 114. Urbich C, Walter DH, Zeiher AM, Dammeler S. Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis. *Circ Res*. 2000;87(8):683-9.
 115. Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev*. 2001;53(3):417-50.
 116. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide-releasing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:97-123.