Katherine Garcia Ravelli

**Estudo do mecanismo da ereção peniana causada pela toxina
TX2-6 produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

**São Paulo
2011**

Katherine Garcia Ravelli

**Estudo do mecanismo da ereção peniana causada pela toxina
TX2-6 produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Lanfranco Ranieri Paolo
Troncone

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ravelli, Katherine.

Estudo do mecanismo de ereção peniana causada pela toxina TX2-6 produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer* / Katherine Ravelli. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Lanfranco Ranieri Paolo Troncone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Farmacologia de venenos de aranhas.

Versão do título para o inglês: Study of penile erection mechanism caused by Tx2-6 toxin produced by *Phoneutria nigriventer* spider.

Descritores: 1. Óxido nítrico 2. Ereção peniana 3. Toxina TX2-6 I. Troncone, Lanfranco Ranieri Paolo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB003/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Katherine Ravelli.

Título da Dissertação: Estudo do mecanismo de ereção peniana causada pela toxina TX2-6 produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer*.

Orientador(a): Lanfranco Ranieri Paolo Troncone.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais,
pela vida, por todo amor, cuidado e por
todo sacrifício para a realização de mais este sonho.

Aos meus irmãos,
pela cumplicidade e companheirismo que
aumentam nosso amor a cada dia .

Ao meu amor,
por tornar cada dia mais alegre e belo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, por me receber em seu laboratório, pela paciência, boa vontade e por todos os ensinamentos que me serão úteis para a vida toda.

Aos meus amigos, Leandro, Gustavo, Wilson, Simone, Karyn e Adriana que tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Ao Alexsander Seixas de Souza, pela paciência durante os dois anos de trabalho no microscópio confocal.

A Marina Sorrentino, que me ajudou com imensa boa vontade na confecção da imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti Britto, por ceder seu laboratório para a confecção da imuno-histoquímica.

A Prof. Dr^a Catarina F. P. Teixeira, por ceder material para a realização do Teste de Griess e dosagem de Proteínas.

A Prof. Dr^a Rosana Camarini, por ceder seu laboratório para a realização da cirurgia estereotáxica.

Aos companheiros de laboratório Milene, Cíntia, Andréia, Marlos, Marcio e Elbio, que estiveram empenhados em me ajudar todas as vezes que necessitei.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de Óxido nítrico catalisada pela NO-sintase.....	22
Figura 2: Mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do pênis em estado flácido.....	25
Figura 3: Mecanismos moleculares envolvidos na ereção peniana.....	26
Figura 4: Corte coronal de cérebro de camundongo mostrando o local de implantação da cânula guia inserida através de cirurgia estereotáxica. É possível observar o núcleo paraventricular do hipotálamo corado em azul, indicando que as coordenadas estereotáxicas utilizadas estão corretas.....	43
Figura 5: Imagem de fluorescência de cortes longitudinais de pênis incubados por 1 hora em geladeira com fluoróforo sensível a NO (DAF-FM) concentração 10µM (esquerda) e sem fluoróforo (direita) observados em microscópio confocal. X 400.....	45
Figura 6: Imagem tridimensional de fluorescência e a respectiva colorização representativa da intensidade de fluorescência de corte longitudinal de pênis capturada no tempo 0, logo após a adição do Ringer KBR (esquerda) e 60 minutos após a adição (direita). Os quatro pontos marcados foram os escolhidos para que a fluorescência fosse medida. X 200.....	46
Figura 7: Imagem tridimensional de fluorescência e a respectiva colorização representativa da intensidade de fluorescência de corte longitudinal de pênis capturada no tempo 0, logo após a adição da toxina Tx2-6 (esquerda) e 60 minutos após a adição de toxina (direita). Os quatro pontos marcados foram os escolhidos para que a fluorescência fosse medida. X 200.....	47
Figura 8: Comparação da liberação de óxido nítrico por tecido cavernoso de camundongos através da fluorescência obtida através de tratamento com fluoróforo sensível a NO, DAF-FM diacetato, durante o período de 60 minutos após a adição das drogas. A cada 15 minutos foi realizada uma medição na intensidade de fluorescência. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. Não foi detectada diferença estatística significativa entre os tratamentos.....	47
Figura 9: Coloração de tecido cavernoso de camundongos com azul de toluidina. As setas indicam células com grânulos citoplasmáticos medindo entre 10 µm e 15 µm, e que se co-	

localizam com as células que apresentam marcação fluorescente com o uso do DAF-FM. X400.....	48
Figura 10: Curva-padrão obtida através de concentrações conhecidas de nitrito (0 μ M, 5 μ M, 15 μ M, 30 μ M e 60 μ M) em relação às densidades ópticas das amostras em comprimento de onda de 550 nm.....	49
Figura 11: Concentração de nitrito, expressa em μ Moles/mg de proteína, obtida através do método de Griess nas amostras incubadas com diferentes concentrações de L-NAME, NPS, toxina TX2-6 e controle sem nenhuma droga. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. (*) diferença significativa em relação ao controle; $p < 0,05$	50
Figura 12: Ação de diferentes doses da toxina TX2-6 injetada intraperitonealmente em camundongos Swiss e a porcentagem de ocorrência de ereção, hipersalivação e morte nesses animais.....	51
Figura 13: Ereção completa causada pela injeção da toxina TX2-6 (0,6 μ g/Kg) em camundongos.....	52
Figura 14: Coloração com Tricrômico de Masson evidenciando colágeno (em azul) em cortes de pênis denervados (esquerda) e sham-operados (direita). X 100.....	55
Figura 15: Imuno-histoquímica para neurofilamentos em pênis de camundongos sham-operados. x100 (esquerda). À direita uma ampliação da região do nervo (x400). As setas indicam a região dos nervos.....	57
Figura 16: Imuno Imuno-histoquímica para neurofilamentos em pênis de camundongos denervados. x100 (esquerda). À direita uma ampliação da região do nervo (x400). As setas indicam a região dos nervos.....	57
Figura 17: Imuno-histoquímica para sinaptofisina em pênis de camundongos sham-operados. X400. As setas indicam regiões no corpo cavernoso que apresentaram maior reatividade para o anticorpo utilizado.....	58
Figura 18: Imuno-histoquímica para sinaptofisina em pênis de camundongos denervados. X400. As setas indicam regiões no corpo cavernoso que apresentaram maior reatividade para o anticorpo utilizado.....	58
Figura 19: Imuno-histoquímica para nNOS em pênis de camundongos sham-operados (esquerda) e denervados (direita). X100.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Concentração da toxina Tx2-6 injetada no núcleo paraventricular do hipotálamo de camundongos Swiss distribuídos em diferentes grupos.....	34
Tabela 2 - Anticorpos primários específicos utilizados para a realização da técnica de imuno-histoquímica e seus respectivos anticorpos secundários.....	41
Tabela 3 - Resposta comportamental individual de camundongos injetados com diferentes doses da toxina TX2-6 diretamente no núcleo paraventricular do hipotálamo através de cânulas guia implantadas permanentemente.....	44
Tabela 4 - Média da fluorescência obtida através do fluoróforo sensível a NO, DAF-FM diacetato, em tecido cavernoso de camundongo no tempo 0 (imediatamente após a adição das drogas) e 60 minutos após a adição das drogas e cálculo de $\Delta F/F$	46
Tabela 5 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 15 dias após a cirurgia.....	53
Tabela 6 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 1 mês após a cirurgia.....	53
Tabela 7 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 2 meses após a cirurgia.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DAG	Diacilglicerol
ECS	Choques eletroconvulsivos
eNOS	Óxido Nítrico –sintase endotelial
FCLM	Fosfatase da cadeia leve de miosina
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclico
IP3	Trifosfato de inositol
L-NAME	N (G)-nitro-L- arginine methyl Ester
NADPH	Nicotinamida-adeninadinucleotídeo-fostato-hidrogênio
nNOS	Óxido Nítrico –sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico -sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
NPV	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PDE5	Fosfodiesterase-5
PFA	Paraformaldeído
PKG	Quinase dependente de guanosina monofosfato cíclico
PTZ	Pentilenotetrazol
QCLM	Quinases de cadeia leve da miosina
sGC	Guanilato ciclase solúvel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Ação da toxina TX2-6, produzida pela aranha Phoneutria nigriventer.....	17
1.2 A Função Erétil e Sua Disfunção	19
1.3 Anatomia do pênis	20
1.4 Óxido Nítrico como mediador da ereção peniana	21
1.5 Hemodinâmica do pênis durante os estados de flacidez e de ereção peniana.....	23
1.6 Mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do pênis em estado flácido	24
1.7 Mecanismos moleculares no estado de ereção peniana.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Drogas e reagentes	30
3.2 Soluções.....	31
3.3 Animais.....	32
3.4 Obtenção da toxina TX2-6.....	32
3.5 Injeção intracerebral da toxina TX2-6	32
3.6 Detecção de Óxido nítrico através de microscopia de fluorescência	34
3.7 Coloração com azul de Toluidina	35
3.8 Dosagem de nitritos através do método de Griess	36
3.9 Determinação da dose mínima efetiva da toxina TX2-6.....	37
3.10 Cirurgia para excisão do nervo cavernoso.....	37
3.11 Ação da toxina nos animais denervados e Sham-operados.....	38
3.12 Coloração de tecido peniano com Tricrômico de Masson	39
3.13 Imuno-histoquímica.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Injeção intracerebral da toxina TX2-6	42
4.2 Microscopia de fluorescência	44
4.3 Coloração com azul de Toluidina	48
4.4 Dosagem de nitritos através do método de Griess	49
4.5 Determinação da dose mínima efetiva da toxina TX2-6.....	50
4.6 Cirurgia de excisão do nervo cavernoso.....	51

4. 7 Ação da toxina nos animais denervados e Sham-operados	51
4. 8 Coloração dos pênis dos animais denervados e sham-operados com Tricrômico de Masson dois meses após a cirurgia.....	54
4. 9 Imuno-histoquímica	56
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

Ravelli KG. Estudo do mecanismo de ereção peniana causada pela toxina TX@-6 produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer* [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A ereção peniana é resultado de complexa interação neurovascular causada por impulsos parassimpáticos que causam dilatação arterial e relaxamento da musculatura lisa do pênis, permitindo que o sangue flua sob alta pressão para o tecido erétil, que se dilata de modo acentuado. O gás óxido nítrico (NO), sabidamente atua no relaxamento dos corpos cavernosos. O veneno produzido pela aranha *Phoneutria nigriventer*, entre outros sintomas, causa relaxamento do tecido dos corpos cavernosos em animais experimentais, efeito que provavelmente contribui para o priapismo observado em envenenamento por esta espécie envolvendo humanos. O pré-tratamento de camundongos com inibidores da NO-sintase antes de se injetar intraperitonealmente a toxina Tx2-5, uma toxina semelhante a Tx2-6, inibe o priapismo, assim como todos os outros sintomas, demonstrando o envolvimento do NO no processo de intoxicação. Investigações revelaram que a toxina causa intensa ativação do gene de transcrição c-fos em determinados núcleos cerebrais, entre eles, o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV). Este estudo tem como objetivo ampliar os conhecimentos relacionados ao mecanismo da ereção peniana causada pela toxina Tx2-6. Inicialmente a toxina foi injetada intracerebralmente no NPV e os resultados obtidos não mostraram o envolvimento direto do mesmo com o priapismo, pois não houve ereção em nenhum animal injetado com a toxina. Depois, cortes de pênis de camundongos foram incubados na presença do fluoróforo sensível ao NO e foram observados em microscópio confocal de fluorescência. Foram capturadas imagens 3D e medida a intensidade média de fluorescência nas estruturas marcadas. Os resultados mostraram que no controle houve um aumento máximo de 14% na fluorescência no período observado. Com a adição do L-NAME houve um aumento de 8% na fluorescência. O nitroprussiato de sódio, que é um doador de NO, causou um aumento de 13%, na maior concentração utilizada e a toxina, um aumento de 7%.

Procuramos então avaliar se há aumento na produção de NO quando o tecido é submetido à TX2-6 medindo a produção de nitritos derivados da oxidação de NO pelo método de Griess. Observamos que a toxina não aumenta a produção de nitritos. Foram feitos também experimentos com camundongos que sofreram ablação cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos. Estes, quando injetados intraperitonealmente com a toxina Tx2-6 aos 30 e 60 dias após a denervação, tiveram ereção peniana, assim como os animais sham-operados. Porém, a ereção do grupo denervado não apresentou exposição total do pênis, como ocorre nos sham-operados possivelmente devido à fibrose causada pela denervação confirmada por avaliação histológica dos pênis empregando a coloração com Tricrômico de Masson que evidenciou maior quantidade de colágeno. Estes resultados nos levam a crer que a ereção causada pela toxina Tx2-6 pode não ser mediada pela produção de NO e não depende da inervação peniana.

Palavras-chave: *Phoneutria nigriventer*. Toxina TX2-6. Ereção peniana. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Ravelli KG. **Study of penile erection mechanism caused by Tx2-6 toxin produced by *Phoneutria nigriventer* spider.** [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Penile erection is a result of complex neurovascular interaction caused by parasympathetic impulses which cause arterial dilation and penis smooth muscle relaxation letting the blood flow in high pressure to the erectile tissue that dilates sharply. The nitric oxide gas (NO) wisely acts on corpus cavernosum relaxation. The venom produced by *Phoneutria nigriventer* spider causes, among others, the relaxation of the corpus cavernosum tissue in experimental animals, effect which probably contributes to the priapism observed in human poisoning by this species. Mice pretreatment with NO-synthase inhibitors before intraperitoneally injecting the Tx2-5 toxin, which is similar to the Tx2-6, inhibits the priapism as well as all the other symptoms, showing NO performance in the intoxication process. Investigation reveals that the toxin causes intense c-fos gene transcription activation in some brain nuclei such as paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN). This study aims to widen some knowledge concerning penile erection mechanism caused by Tx2-6 toxin. Initially, the toxin was intracerebrally injected in the PVN and the results didn't show its direct relation with the priapism because there was no erection in any animal that had been injected with the toxin. Afterwards, mice penis samples were incubated in the presence of fluorophore which is sensitive to NO and they were observed with a confocal fluorescence microscope. 3D images were captured and the average fluorescence intensity of the marked structures was measured. The results showed that in the control there was a maximum increase of 14% in fluorescence in the observed period. By adding up L-NAME there was an increase of 8% of fluorescence. The NO donor sodium nitroprusside caused an increase of 13%, whereas the toxin showed an increase of 7%. Therefore, we decided to analyze if there is any increase of NO production when the tissue is submitted to TX2-6 by measuring the production of nitrites derived from NO oxidation through the Griess method. It was observed that the toxin does not increase the concentration of nitrite, however the NPS caused a dose-dependent increase in the production. Experiments were carried out on mice which suffered bilateral surgical ablation of the cavernosum

nerves. By the time animals were intraperitoneally injected with the Tx2-6 toxin 30 and 60 days after the denervation, there was penile erection, as well as with the sham-operated animals. However, the erection of the denervation group didn't present total penis exposition as it happens with the sham-operated group possibly due to the fibrosis caused by the denervation confirmed by histological evaluation of the penes colored by Masson's Trichromic method which showed more collagen. These results reveal that erection caused by Tx2-6 toxin might not be mediated by NO production and it does not depend on penile nerves.

Key words: *Phoneutria nigriventer*. TX2-6 toxin. Penile erection. Nitric oxide.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ação da toxina TX2-6, produzida pela aranha *Phoneutria nigriventer*

A aranha *Phoneutria nigriventer*, conhecida como “armadeira” por sua agressividade, tem hábitos solitários e distribuição geográfica extensa por toda a América do Sul. No Brasil, principalmente nas regiões centrais e no sudeste, esta espécie é responsável por um grande número de acidentes envolvendo humanos, incluindo morte infantil, (1). Os sintomas da picada incluem intensa dor local, câimbras, tremores, convulsões tônicas, perturbações visuais (2-4), disfunções cardíacas (taquicardia e arritmia) (5), distúrbios no sistema nervoso central, espasmos musculares, bloqueio neuromuscular, piloereção, aumento da permeabilidade vascular (causando a formação de edemas), coceira, priapismo e, eventualmente, morte (5). O veneno causa relaxamento do tecido dos corpos cavernosos de coelhos *in vitro*, efeito que deve contribuir para o priapismo observado em envenenamento por esta espécie em acidentes envolvendo humanos e em animais experimentais (6).

O veneno da armadeira é uma mistura de toxinas, contendo peptídeos, aminoácidos, histamina e serotonina, entre várias outras moléculas menos conhecidas (7). É composto principalmente por três tipos de polipeptídeos neurotóxicos (Tx1, Tx2 e Tx3), e uma fração não tóxica (M), que tem atividade em músculo liso. A fração Tx2, após injeção intracerebral em camundongos, causa sintomas excitatórios, tais como salivação, lacrimação, convulsões e paralisia espástica das extremidades anteriores e posteriores (1). Esses efeitos ocorrem devido ao fato da toxina ativar e retardar a inativação dos canais de Na⁺, ação que pode ocasionar a despolarização das fibras musculares e terminais nervosos na junção neuromuscular, assim como a ativação do sistema nervoso autônomo (8).

A análise da fração TX-2 revelou a presença de pelo menos oito componentes principais. Dentre eles as neurotoxinas Tx2-1, Tx2-5 e Tx2-6. Todas causam lacrimejamento, salivação, sudorese, agitação, paralisia espástica das extremidades anterior e posterior e morte, dependendo da dose. As toxinas Tx2-5 e Tx2-6 apresentam uma grande semelhança com respeito a sequência de aminoácidos, da

ordem de 85% (9). A toxina TX2-5 tem 47 aminoácidos enquanto a TX2-6 possui 48. Ambas possuem 10 cisteínas que formam 5 pontes dissulfeto (10). Os sintomas causados pelas duas são os mesmos (11).

Camundongos machos injetados com a toxina Tx2-5 apresentam uma intoxicação com dois sintomas iniciais: hipersalivação e ereção peniana, seguidos por morte com sinais de severa deficiência respiratória (11,12). O priapismo é claramente espécie-dependente, sendo observado claramente em camundongos, cães e seres humanos, enquanto que ratos, coelhos e cobaias não desenvolvem este sintoma (3). O pré-tratamento de camundongos com inibidores da NO-sintase inibiu o priapismo causado pela injeção intraperitoneal da toxina Tx2-5, semelhante a Tx2-6, assim como todos os outros sintomas, incluindo salivação, deficiência respiratória e morte, demonstrando um possível envolvimento do NO no processo de intoxicação (12).

A ativação da transcrição do gene c-fos tem sido usada como marcador da ativação de células nervosas e mapeamento da atividade de centros cerebrais. Convulsões provocadas por choques eletroconvulsivos (ECS) ou por pentilenotetrazol (PTZ) têm demonstrado ativação de c-fos em cérebros. Um estudo comparativo relatou que estruturas cerebrais de ratos como o córtex olfatório, giro dentado, amígdala basolateral, posteromedial núcleo hipotalâmico ventromedial e dorsomedial, entre muitas outras áreas, seletivamente expressam o fator c-fos após o episódio ECS. Administração de PTZ resultou num padrão similar de ativação com exceção do núcleo hipotalâmico ventromedial e dorsomedial (13). Embora se possa imaginar que a toxina Tx2-6 possa causar convulsões, nenhuma dessas áreas foi particularmente afetada por esta toxina em estudo realizado em nosso laboratório. Áreas como o núcleo central da amígdala, paraventricular do hipotálamo e núcleos do leito da estria terminal foram fortemente afetados por Tx2-6 (manuscrito em preparação).

O mapeamento prévio de áreas cerebrais envolvidas no controle de ereção peniana ou inervação dos órgãos genitais masculinos identificou o envolvimento de

diversas estruturas cerebrais. Isto foi descrito injetando-se em pênis de ratos, pseudo-vírus que são transportados retrógradamente para centros nervosos que, depois, foram localizados nos núcleos paragigantocelular, paraventricular do hipotálamo e alguns núcleos da rafe entre outras estruturas (14). Estas estruturas cerebrais foram também implicadas na função de ereção peniana em estudos envolvendo lesões ou estimulação elétrica (15). Muitas evidências sugerem o envolvimento do núcleo paraventricular do hipotálamo na função erétil, portanto a extensão e especificidade do seu papel na ereção peniana induzida por Tx2-6 requer mais investigações.

1.2 A função erétil e sua disfunção

A disfunção erétil é definida como a incapacidade persistente para obter ou manter uma ereção peniana com rigidez suficiente para o intercursos sexual. O grau de disfunção erétil pode variar de uma redução parcial da rigidez peniana até a falha erétil total. A impotência é um distúrbio dependente da idade, com uma incidência de 1,9% aos 40 anos de idade e 25% aos 65 (16).

Durante muito tempo acreditou-se que a disfunção erétil estava relacionada exclusivamente a problemas psicológicos, no entanto, nas últimas décadas, ficou claro que a maioria dos pacientes com insuficiência erétil possui algum tipo de desordem orgânica. A disfunção erétil pode ter origem neurológica, arteriogênica, veno-oclusiva ou cavernosa e, portanto, pode estar associada a fatores de risco vascular como aterosclerose, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e tabagismo (17).

Um grande número de ensaios clínicos mostraram que inibidores da enzima fosfodiesterase-5 (PDE5), responsável pela degradação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) no corpo cavernoso, podem melhorar a ereção em homens com disfunção erétil, independentemente da causa (psicogênica, orgânica ou mista). Esse tipo de medicamento vem sendo muito utilizado terapia oral não invasiva nas últimas décadas. Porém, a PDE5 não é uma enzima restrita ao pênis e pode ser

encontrada em outros tecidos, o que torna possível a ocorrência de efeitos secundários, tais como congestão nasal, dispepsia, dor de cabeça, rubor facial e diarreia. Possíveis efeitos cardiovasculares têm dominado as discussões sobre a segurança desse medicamento. Uma contra-indicação absoluta para esse medicamento é a utilização concomitante com o uso de nitratos (utilizados no tratamento da hipertensão). Várias mortes associadas a esse medicamento têm sido atribuídas a esse fator (18). Embora o tratamento com inibidores da PDE5 seja eficaz na maioria dos casos de disfunção erétil, pacientes submetidos a prostatectomia, com lesão bilateral dos nervos cavernosos, não respondem bem ao tratamento (19).

1. 3 Anatomia do pênis

O pênis é composto por dois corpos cavernosos emparelhados e um corpo esponjoso. Ambos são cercados por uma espessa bainha fibrosa, a túnica albugínea. O corpo esponjoso, que envolve a uretra, forma a glândula do pênis distalmente. O cavernoso possui múltiplos espaços lacunares interligados revestidos por endotélio vascular. A parede trabecular desses espaços é composta por uma camada de músculo liso e por uma trama fibroelástica composta por fibroblastos, colágeno e elastina (16).

O fluxo sanguíneo arterial chega nos corpos cavernosos através das artérias cavernosas, ramos terminais da pudenda interna. As artérias helicinas, ramificações da artéria cavernosa, se abrem diretamente para os espaços lacunares (16). A drenagem venosa ocorre através das vênulas subtunicais, localizadas entre a periferia do tecido erétil e túnica albugínea. As veias subtunicais se unem para formar as veias emissárias, que são maiores e perfuram a túnica albugínea.

O pênis recebe inervação autônoma e somática (20). A partir dos neurônios da medula espinhal e gânglios periféricos, os nervos simpáticos (cuja estimulação provoca vasoconstrição arterial) e parassimpáticos (cuja estimulação provoca

vasodilatação arterial) se fundem para formar os nervos cavernosos, que invadem os corpos cavernosos e corpo esponjoso e controlam os eventos neurovasculares que ocorrem durante a ereção e a detumescência do pênis. Os nervos cavernosos são ramos do plexo pélvico que inervam o pênis, enquanto outros ramos inervam o reto, a bexiga, a próstata e os esfíncteres. Esses nervos são facilmente danificados durante a excisão radical do reto, bexiga e próstata. A clara compreensão do seu curso é essencial para a prevenção da disfunção erétil iatrogênica (21).

A ereção peniana é resultado de complexa interação nervosa central e periférica que induz mudanças musculares e vasculares nos tecidos eréteis do aparato genital masculino (22). Além disso, os andrógenos também exercem papéis de destaque no desenvolvimento e manutenção de diversos circuitos neuronais envolvidos na função sexual tanto central quanto periférica (23).

O corpo cavernoso possui uma importante população de nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos, contendo enzimas geradoras de transmissores/moduladores, tais como, peptídeo intestinal vasoativo, neuropeptídeo Y e óxido nítrico (NO) (24).

1.4 Óxido Nítrico como mediador da ereção peniana

Em 1980, estudos relataram que apesar de uma potente ação vasodilatadora in vivo, a acetilcolina nem sempre produzia relaxamento das preparações isoladas de vasos sanguíneos in vitro. Foi demonstrado que o relaxamento provocado pela acetilcolina em preparações isoladas de aorta torácica de coelho e outros vasos sanguíneos exige a presença de células endoteliais e que, no endotélio, a acetilcolina estimula a liberação de um fator que causa relaxamento do músculo liso vascular (25). Este fator foi identificado como óxido nítrico (26). Posteriormente, estudos envolvendo estimulação elétrica evidenciaram o papel do NO no relaxamento do músculo liso cavernoso de pênis humano (27). Defeitos nessa via poderiam provocar algumas formas de impotência (28). Importantes evidências

sugerem que o NO é o mediador mais importante, responsável pelo relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos durante a resposta erétil (29).

A formação do NO a partir da L-arginina ocorre através da ação da enzima NO-sintase (NOS) (30) e o pênis contém esta enzima predominantemente na isoforma neuronal (nNOS) (31), produzida pela inervação não-adrenérgica não-colinérgica. Ocorre também a presença da isoforma endotelial (eNOS), produzida nas células de músculo liso cavernoso e no endotélio (32). A ereção peniana é mediada pelo NO produzido por estas duas isoformas (33, 34). A nNOS atua iniciando a resposta erétil, que é mantida e, em seguida, aumentando a atividade da eNOS, no sentido de manter a ereção máxima (35,33).

A nNOS e a eNOS, são isoformas constitutivas da NO sintase e funcionam acopladas à calmodulina, que na presença de cálcio forma um elemento regulatório da atividade enzimática da NO, o complexo cálcio-calmodulina. Na presença desse complexo a NOS é ativada, mas quando a concentração intracelular de cálcio cai o complexo é desfeito e a atividade enzimática da NOS é desativada (36).

A síntese de NO ocorre em duas etapas (Figura 1). Na primeira, a L-arginina é transformada em N-hidroxi-L-arginina e água na presença de nicotinamida-adeninadinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio. Na segunda etapa, é necessário mais NADPH e oxigênio para transformar N-hidroxi-L-arginina em L-citrulina e NO (36).

Figura 1: Síntese de Óxido nítrico catalisada pela NO-sintase.

1.5 Hemodinâmica do pênis durante os estados de flacidez e de ereção peniana

No pênis humano, o sangue é levado para o tecido erétil através das artérias cavernosas que se ramificam em arteríolas dentro dos corpos cavernosos (22). Atividade elétrica da musculatura lisa dos corpos cavernosos de sujeitos normais registrada durante o estado de detumescência do pênis indica que as células do músculo liso cavernoso se mantém contraídas durante esse período. Há saída livre de sangue através das vênulas subtúnicas e das veias emissárias (37). A norepinefrina, por interação com receptores α -adrenérgicos, mantém a contração das fibras de músculo liso arteriolar e impede significativamente o fluxo sanguíneo para os seios cavernosos (38). O influxo sanguíneo através da artéria cavernosa é mínimo, e possui apenas propósito nutricional (37).

Durante a excitação sexual, a atividade simpática é diminuída e impulsos parassimpáticos que vão da porção sacra da medula espinhal até o pênis causam a liberação de neurotransmissores vasodilatadores (principalmente NO) que levam ao relaxamento do músculo liso sinusoidal e arteriolar, o que permite que o sangue arterial flua sob alta pressão para o tecido erétil, que é composto por grandes vasos venosos cavernosos e se dilata de modo acentuado (22). Nessa fase o influxo de sangue chega a ser de 25 a 60 vezes maior que na fase flácida e a pressão intracavernosa aumenta rapidamente (37). À medida que o seio cavernoso é preenchido ele se expande contra a túnica albugínea, ocluindo as veias subtúnicas e limitando o fluxo de sangue para fora através das veias emissárias. O fluxo através das veias emissárias é também parcialmente ocluído pelo aumento da pressão intracavernosa, produzindo rigidez no pênis (39).

Durante o retorno do pênis ao estado flácido, devido à diminuição da atividade parassimpática e aumento da simpática, os músculos lisos arteriolares e sinusoidais se contraem novamente, o influxo de sangue diminui, fazendo com que a pressão intracavernosa caia, removendo assim o bloqueio venoso e permitindo a drenagem do sangue dos seios cavernosos (39).

1.6 Mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do pênis em estado flácido

A contração e o relaxamento de músculos lisos são regulados pelo cálcio citosólico livre. A noradrenalina das terminações nervosas, endotelinas e prostaglandinas do endotélio ativam receptores nas células de músculo liso para aumentar os níveis de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), resultando na liberação dos estoques intracelulares de cálcio, tais como do retículo sarcoplasmático e mitocôndrias e / ou abertura de canais de cálcio na membrana das células musculares lisas levando a um influxo de cálcio. Em altas concentrações, o cálcio se liga a calmodulina e altera sua conformação, expondo sítios de interação com quinases de cadeia leve da miosina (QCLM), ativando-as. As QCLM catalisam a fosforilação da miosina, desencadeando a interação entre os filamentos de actina e miosina. Em adição, essa fosforilação ativa a miosina - ATPase, a qual hidrolisa ATP para fornecer energia para a contração muscular (Figura 2) (21).

Um mecanismo via ativação de receptores excitatórios acoplados à proteína G, também pode causar contração, aumentando a sensibilidade ao cálcio, sem qualquer alteração do cálcio citosólico. Este mecanismo envolve a RhoA, uma pequena proteína G monomérica que ativa a Rho-quinase. A Rho-quinase ativada fosforila e, assim, inibe a miosina-fosfatase, prevenindo a desfosforilação dos miofilamentos e, assim, mantendo o tônus contrátil. Um inibidor seletivo da Rho-quinase é capaz de provocar relaxamento do corpo cavernoso humano *in vitro* e induzir a ereção peniana em animais experimentais (21).

Figura 2: Mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do pênis em estado flácido.
Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2007(24).

1.7 Mecanismos moleculares no estado de ereção peniana

Durante a ereção, a redução no nível de cálcio intracelular induz à dissociação do complexo cálcio-calmodulina-QCLM. A miosina é desfosforilada pela fosfatase da cadeia leve de miosina (FCLM) e se separa do filamento de actina, relaxando o músculo liso dos vasos, o que faz com que os mesmos se dilatem, e permitam que o sangue arterial flua sob alta pressão para o tecido erétil (21).

O NO entra na célula muscular lisa e ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) (Figura3) (40), o que desencadeia um aumento da produção de GMPc, que sinaliza para a modificação de canais iônicos, fosfodiesterases e proteínas quinases (18).

O aumento no GMPc ativa proteínas quinase dependentes de GMPc (PKGs), levando a uma redução no nível intracelular de cálcio (30), por diminuir a atividade dos canais de cálcio, ou ainda por abrir canais de K^+ dependentes de cálcio, o que hiperpolariza as células de músculo liso, levando ao relaxamento. Além disso, a

PKG pode fosforilar proteínas que afetem canais de cálcio ou alterem o estado de fosforilação das cadeias leves de miosina, promovendo o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso (24). A vasodilatação e o relaxamento do músculo liso permitem que o corpo cavernoso se encha de sangue (32).

Durante o retorno do pênis ao estado flácido, o GMPc é convertido em 5' GMP pela fosfodiesterase-5 (PDE5) (24). Há no mercado diversos medicamentos para a disfunção erétil e todos eles atuam inibindo a PDE5 (41), essa inibição causa acúmulo de GMPc no corpo cavernoso, promovendo a ereção (42).

Figura 3: Mecanismos moleculares envolvidos na ereção peniana.
Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2007 (24).

2 OBJETIVOS

Objetivos

Este estudo tem como objetivo ampliar os conhecimentos relacionados ao mecanismo da ereção peniana causada pela toxina Tx2-6 das seguintes maneiras:

- Avaliar a relação entre o núcleo paraventricular do hipotálamo e a ocorrência de ereção peniana causada pela toxina TX2-6 através de injeção intracerebral da toxina.
- Avaliar se a toxina TX2-6 é capaz de causar liberação de óxido nítrico em tecido peniano.
- Investigar os efeitos da toxina TX2-6 em animais com o cavernoso denervado.
- Investigar os padrões de inervação do tecido cavernoso por imunohistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

Azul de toluidina (Merk)

Bicarbonato de sódio (Sigma)

Calcimicina (Sigma)

Cloreto de Cálcio (Sigma)

Cloreto de potássio (Sigma)

Cloreto de sódio (Sigma)

Complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC-Elite)

DAF-FM diacetate (- Molecular Probes)

Glicose (Sigma)

Historesina® (Sigma)

Kit para determinação de nitrito Reagente de Griess (Molecular Probes)

L-Arginina (Tocris)

L-nitro arginina metil-éster (Tocris)

Nitroprussiato de sódio (Sigma)

Potássio fosfato monobásico (Mallinckrodt Chemicals)

Toxina TX2-6 (Instituto Butantan)

3.2 Soluções

As soluções foram preparadas com água deionizada.

- Tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KBR): NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4.8 mM, CaCl₂ 1.3 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glicose 10 mM.
- Solução de sulfanilamida: 1g de sulfanilamida, 5 mL de H₃PO₄ e água q. s. p 100 mL.
- Solução de N- (1-NAPHTHYL) ETHYLENODIAMINE: 0,1g de N- (1-NAPHTHYL) ETHYLENODIAMINE água q. s. p 100 mL.
- Solução de Griess: Solução de sulfanilamida e Solução de N- (1-NAPHTHYL) ETHYLENODIAMINE (v/v: 1:1).
- Fixador de Bouin: 75 mL de Solução saturada de Ácido Pícrico, 25 mL de Formaldeído puro e 5 mL de Ácido Acético Glacial.
- Parafina: 425 g de parafina, 50 g de cera de abelha e 25 g de estearina.
- Hematoxilina férrica de weigert : Solução A – 1g de hematoxilina e 100 mL de álcool 95%. Solução B – 4 mL de Solução aquosa de Cloreto Férrico a 29%, 95 mL de água e 1 mL de Ácido Clorídrico Concentrado. (Soluções A e B em partes iguais).
- Solução de Escarlata de Biebrich: 90 mL de Solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1%, 10 mL de Solução aquosa de Fucsina Ácida 1% e 1 mL de Ácido Acético Glacial.
- Solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica: 2,5 g de Ácido Fosfotúngstico, 2,5 g de Ácido Fosfomolibdico 100 mL de água.

- Solução de azul de anilina: 2,5 g de Azul de Anilina, 2 mL de Ácido Acético Glacial e 100 mL de água.
- Solução de água-ácido: 1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada.

3.3 Animais

Todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram avaliados e considerados em concordância com as normas vigentes pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAIB No. 453/08. Os animais utilizados em todos os experimentos foram camundongos Swiss machos com peso entre 25g e 28g. Os camundongos foram mantidos em biotério com luz, temperatura e ventilação adequadas durante todos os procedimentos experimentais, com água e ração padrão à vontade.

3.4 Obtenção da toxina TX2-6

O veneno da *Phoneutria nigriventer* foi obtido no Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan através de estimulação elétrica. A toxina foi separada por cromatografia em coluna Sephadex G50. O pico ativo foi purificado por cromatografia líquida de alta pressão. A identidade do peptídeo TX2-6 foi confirmada por espectrometria de massa.

3.5 Injeção intracerebral da toxina TX2-6

Foram utilizados um total de 24 camundongos machos. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). Após a anestesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotático

e tiveram a pele desinfetada, rebatida e excisada e o perióstio do crânio foi removido. Foram feitos três pequenos orifícios nos ossos do crânio utilizando uma broca odontológica em baixa rotação. O primeiro orifício na direção do núcleo paraventricular do hipotálamo (coordenadas tendo como ponto 0 o bregma: +0,25mm latero-lateral, -0,94 mm antero-posterior e -3,6 mm de profundidade), os outros dois em pontos próximos. Foi implantada uma cânula no núcleo paraventricular do hipotálamo e nos outros dois orifícios foram encaixados pequenos parafusos firmemente para servirem como âncoras para a cânula. O sistema foi coberto com acrílico dental auto-polimerizável envolvendo a cânula e os parafusos, de forma que apenas o orifício superior ficasse exposto. Após o procedimento os animais se recuperaram da anestesia.

Aproximadamente uma semana depois da cirurgia os animais foram injetados intracerebralmente, através da cânula guia, com 3 µl das doses da toxina Tx2-6 expostas na Tabela 1, tomando-se o cuidado de observar, em seguida, a ocorrência e a intensidade da ereção peniana. Um grupo de 4 camundongos foi utilizado como controle, injetando-se o mesmo volume (3 µl) de salina estéril. Os animais assim tratados foram observados quanto aos sinais de toxicidade, tais como ereção peniana, salivação e piloereção.

Após os experimentos foi injetado pela cânula-guia 2 µL de corante azul de metileno, os animais foram sacrificados em seguida, por decapitação, e seus cérebros foram removidos e cortados com o auxílio de um criostato para verificar se a cânula estava realmente no núcleo desejado.

Tabela 1- Concentração da toxina Tx2-6 injetada no núcleo paraventricular do hipotálamo de camundongos Swiss distribuídos em diferentes grupos

Grupo	Número de animais	Concentração injetada
Grupo 1	2	1 µg/µl
Grupo 2	2	0,66 µg/µl
Grupo 3	4	0,5 µg/µl
Grupo 4	3	0,02 µg/µl
Grupo 5	6	0,002 µg/µl
Grupo 6	3	0,0002 µg/µl
Grupo 7	4	3 µl de salina

3.6 Detecção de Óxido nítrico através de microscopia de fluorescência

A liberação de NO foi realizada utilizando o marcador 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, DAF-FM diacetato, um composto não-fluorescente permeável pela membrana celular, mas que, quando penetra na célula é desacetilado, impedindo seu extravasamento. Quando reage com o NO, dentro da célula, forma um benzotriazol fluorescente (43).

Foram empregados 18 camundongos Swiss. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, através de cirurgia, os pênis foram retirados e colocados rapidamente em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) gaseado com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), pH 7.3. Com o auxílio de um criostato, foram feitos cortes longitudinais de pênis com 45 µm de espessura a -22 °C.

Inicialmente os cortes foram incubados em geladeira na presença do fluoróforo sensível a NO, DAF-FM 10 µM, por 1 hora. Após a incubação e lavagem com KRB, os mesmos foram imersos em KRB acrescido de arginina 1 mM. Foi utilizado um microscópio confocal de fluorescência equipado com sistema digital de

captura de imagem para a observação das imagens. Foi capturada uma imagem 3D a cada 15 minutos durante 1 hora e meia, sendo que durante os 30 primeiros minutos não foi adicionada nenhuma droga, esse tempo foi utilizado para que a fluorescência pudesse se estabilizar. Após esse período foram adicionados a toxina TX2-6, 10 nM, ou as drogas utilizadas como controles, tais como: N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 100 μ M e Nitroprussiato de sódio (NPS) 100 μ M e 300 μ M ou Tampão Krebs-Ringer-bicarbonato. Alguns cortes foram incubados sem o fluoróforo, para garantir que o tecido não possuía auto-fluorescência.

Em seguida, a intensidade média de fluorescência nas estruturas marcadas foi medida empregando o programa ImageJ. Os dados foram normalizados e inseridos em um gráfico (os experimentos foram realizados em triplicata e, em seguida, a média dos resultados obtidos foi calculada para cada grupo). Foi realizada análise de variância seguida pelo teste Bonferroni.

3.7 Coloração com azul de Toluidina

Pênis de quatro camundongos foram retirados, fixados em paraformaldeído 4% em PBS. Após a fixação, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100%) e infiltrado em uma mistura de solução infiltradora (50 ml de resina básica [glicolmetacrilato] e 0,5 ml de ativador [peróxido de benzoíla] e álcool 95% na proporção 1:1 durante 2 horas e deixado polimerizar em uma mistura de resina (15 ml de solução infiltradora e 1 ml de endurecedor, derivado do ácido barbitúrico- DMSO) à temperatura ambiente, durante 5 horas.

Após esse período, as amostras foram embebidas em resina pura em moldes e permaneceram em estufa a 60 °C por 72 horas para permitir a polimerização da resina. Foram obtidos cortes longitudinais de 2 μ M de espessura. Os cortes foram corados com azul de Toluidina.

3.8 Dosagem de nitritos através do método de Griess

A avaliação da síntese de NO foi realizada através da quantificação de nitritos (NO_2^-), metabólitos estáveis do NO, de acordo com a reação de Griess (44). A reação colorimétrica se baseia na reação desses metabólitos do óxido nítrico com ácido sulfanílico, formando o íon diazônio, que se acopla ao N-(1-Naftil)-etilenodiamina, formando um composto azo que pode ser espectrofotometricamente quantificado.

Para efetuar a dosagem indireta de óxido nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito das amostras foi necessária a construção de uma curva padrão. Para isso, foi utilizada uma solução de Nitrato de sódio (NaNO_2) em diferentes concentrações (0 μM , 5 μM , 15 μM , 30 μM e 60 μM).

Cortes de pênis de 4 camundongos cortados conforme citado anteriormente foram distribuídos em tubos tipo Eppendorf. Em cada tubo, foi adicionada a toxina TX2-6 (100 nM, 10 nM e 1 nM) ou uma das drogas utilizadas como controles: L-NAME (100 μM , 300 μM e 500 μM), NPS (100 μM , 300 μM e 500 μM .) e calcimicina 1mM. O mesmo procedimento foi aplicado em tubos contendo apenas as drogas, sem tecido. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 45 minutos. O volume de incubação foi de 200 μL . As amostras foram homogeneizadas por ultra-som e duas alíquotas de 10 μl foram retiradas para dosagem de proteína.

O restante do material foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos. Foi pipetado 50 microlitros de cada amostra em uma microplaca de 96 poços. A curva de nitritos também foi distribuída na placa (50 microlitros de cada ponto da curva, em triplicata). Em seguida, foram adicionados 50 microlitros do Reagente de Griess em cada poço, formando um volume final de 100 microlitros. A microplaca foi levada para a leitura em espectrofotômetro para determinar a densidade óptica das amostras no comprimento de onda de 548 nm. As concentrações de nitritos e das amostras foram determinadas através da curva-padrão. A concentração de óxido nítrico foi corrigida

pela quantidade de proteínas das amostras, determinada baseada no método de Bradford (Bradford, 1976).

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos à análise de variância seguida pelo teste Bonferroni.

3.9 Determinação da dose mínima efetiva da toxina TX2-6

Foram utilizados 40 camundongos divididos em 4 grupos. Cada grupo recebeu uma dose da toxina TX2-6 injetada intraperitonealmente. Foram utilizadas as seguintes doses: 0,3 $\mu\text{g/kg}$, 0,6 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$ e 3 $\mu\text{g/kg}$.

Os animais foram observados quanto à frequência de ocorrência de ereção peniana (pênis ereto e totalmente exposto) e morte.

3.10 Cirurgia para excisão do nervo cavernoso

Foram utilizados 9 camundongos. Os animais foram divididos em dois grupos, um com 4 animais e outro com 5. O primeiro grupo sofreu excisão cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos (grupo denervado) e o segundo sofreu apenas exposição cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos, sem lesão dos mesmos (grupo sham-operado).

As cirurgias foram realizadas sob anestesia volátil com isoflurano a 2-3% em oxigênio medicinal. Foi feita uma incisão mediana infra-abdominal para a exposição do nervo cavernoso para a excisão bilateral do nervo. A musculatura foi suturada com fio Vicryl 4-0 absorvível pelo organismo e a pele foi presa com grampos mecânicos de aço 7 mm. Uma semana após a cirurgia os grampos foram retirados e

cada animal foi colocado em uma caixa separada com uma fêmea e foram assim mantidos por um mês. Para observar a capacidade de ereção dos mesmos, as fêmeas foram avaliadas para constatar se estavam prenhes.

3.11 Ação da toxina nos animais denervados e Sham-operados

Foram utilizados 38 camundongos divididos em três grupos (um grupo contendo 10 animais, um com 12 e outro com 14 animais). Em cada grupo metade dos animais sofreu excisão bilateral do nervo cavernoso e outra metade sofreu apenas exposição do nervo. Os animais foram injetados intraperitonealmente com a toxina TX2-6 (0,6µg/kg) de acordo com o tempo pós-cirúrgico:

- Grupo 1: injeção 15 dias após a cirurgia
- Grupo 2: injeção 1 mês após a cirurgia
- Grupo 3: injeção 2 meses após a cirurgia

Além disso, mais quatro animais denervados e quatro sham-operados de cada grupo foram injetados com solução salina, para garantir que a ereção observada nos demais não é causada pela manipulação do animal. Após a injeção os animais foram avaliados quanto aos sintomas, principalmente o de priapismo que foi classificado em 4 categorias:

- +: base do pênis arroxeadada
- ++: pênis arroxeadado e pouco exposto
- +++: pênis ereto e quase totalmente exposto
- ++++: pênis muito ereto (ereção completa) e completamente exposto

Os animais denervados que tiveram ereção com a toxina foram dissecados para observação de uma possível reconstituição dos nervos. Os resultados foram submetidos a comparação de proporção quanto a ocorrência de ereção nos grupos sham e denervados.

3.12 Coloração de tecido peniano com Tricrômico de Masson

Os pênis de 7 camundongos denervados e 7 sham – operados foram retirados após dois meses da cirurgia e fixados em formol 10% e, em seguida, foram desidratados em álcool etílico da seguinte maneira: 2 horas em álcool 70%, 2 horas em álcool 95% e 2 horas em álcool 100% (ao completar 1 hora o álcool era trocado). Em seguida as peças foram diafanizadas em xilol por uma hora e meia (trocas de 30 minutos). O material ficou incubado em parafina por 12 horas (dentro da estufa a 60 °C) e, em seguida, foi emblocado, permanecendo em moldura até a consolidação. Foram montadas lâminas com cortes de 6 µm obtidos através de um micrótomo. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em 2 banhos de xilol (10 minutos cada), e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico por 30 minutos (álcool etílico absoluto, álcool etílico 95%, e álcool etílico 70%, 10 minutos cada banho) e água corrente por 5 minutos. O protocolo para coloração de Tricrômico de Masson foi o seguinte:

- a) Incubação em Solução de Bouin por 12 horas a temperatura ambiente.
- b) Incubação em água corrente por 5 minutos.
- c) Incubação em água destilada por 10 segundos.
- d) Incubação em solução de Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos.
- e) Lavagem em água corrente por 10 minutos.
- f) Lavagem em água destilada por 10 segundos.
- g) Incubação na solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos.
- h) Lavagem em água destilada por 10 segundos.
- i) Incubação na solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 12 minutos.
- j) Lavagem em água destilada por 10 segundos.
- k) Incubação em solução de Azul de Anilina por 8 minutos.
- l) Lavagem em água destilada por 10 segundos.
- m) Incubação em solução de ácido acético glacial 1% por 5 minutos.
- n) Lavagem em água destilada por 10 segundos.

As lâminas foram desidratadas e diafanizadas conforme citado anteriormente e montadas com Entelan (resina).

3.13 Imuno-histoquímica

Sete animais denervados e sete sham-operados foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina tamponada seguida de solução fixadora constituída de 4% de paraformaldeído (PFA) dissolvido em tampão fosfato salina 0,1M (PB pH 7,4). Após a perfusão, os pênis foram coletados e mantidos em 4% de PFA durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução de PB contendo 30% de sacarose, para crioproteção, por um período de 48 horas. Em seguida, os pênis foram cortados em criostato. Os cortes histológicos longitudinais, com 22 µm de espessura, foram mantidos em lâminas e submetidos às seguintes etapas:

- a) Três lavagens de 10 minutos cada, em PB;
- b) Incubação “overnight” à temperatura ambiente, em solução incubadora contendo PB-T (0,3% de Triton X-100), 5% de soro normal de cabra e anticorpo monoclonal primário específico diluído a 1:1000. Os anticorpos primários utilizados e os respectivos anticorpos secundários estão especificados na tabela 2.
- c) Três lavagens de 10 minutos cada com PB;
- d) Incubação durante duas horas à temperatura ambiente, com anticorpo secundário biotilado, diluído a 1:200 em PB contendo 0,3% de Triton X-100;
- e) Três lavagens de 10 minutos em PB;
- f) Incubação com um complexo avidina-biotina-peroxidase preparado com 10 µL da solução A e 10 µL da solução B por mL de PB contendo 0,3% de Triton X-100 e NaCl (0,3M – 0,5M) durante 1 hora e meia à temperatura ambiente;
- g) Três lavagens com PB durante 10 minutos cada.

A marcação com peroxidase foi realizada utilizando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em PB durante 3 minutos, e em seguida foi adicionada uma solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em água destilada. Após o desenvolvimento da cor, foram feitas três lavagens com PB de 10 minutos cada. As lâminas foram deixadas por aproximadamente 24 horas em uma placa de aquecimento a 37 °C. Em seguida, foram deixadas por 5 minutos em água destilada e mergulhadas em uma solução de 0,05% de tetróxido de ósmio por

aproximadamente 15 segundos para intensificação da marcação. Logo após, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens de 10 minutos cada em PB e submetidas a uma bateria de desidratação, que consiste em uma série crescente de álcoois e por um solvente clareador com duração de 5 minutos para cada estágio. As lâminas foram então cobertas com lamínulas usando Permount como meio de montagem e analisadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de análise de imagens.

Tabela 2 - Anticorpos primários específicos utilizados para a realização da técnica de imunohistoquímica e seus respectivos anticorpos secundários

Anticorpo Primário	Anticorpo secundário
rabbit - anti-sinaptofisina	<u>α-rabbit goat biotin</u>
mouse - anti-neurofilamento (PAN)	3 <u>α- mouse goat biotin</u>
mouse - anti- nNOS	3 <u>α- mouse goat biotin</u>

4 RESULTADOS

4.1 Injeção intracerebral da toxina TX2-6

Os animais do grupo que recebeu injeção de salina estéril não apresentaram sintomas visíveis. Os sintomas obtidos nos animais injetados com diferentes doses de toxina TX2-6 encontram-se expostos na Tabela 3.

As cânulas foram implantadas no local correto. A figura 4 mostra o núcleo paraventricular do hipotálamo corado em azul.

Figura 4: Corte coronal de cérebro de camundongo mostrando o local de implantação da cânula guia inserida através de cirurgia estereotáxica. É possível observar o núcleo paraventricular do hipotálamo corado em azul, indicando que as coordenadas estereotáxicas utilizadas estão corretas.

Tabela 3 – Resposta comportamental individual de camundongos injetados com diferentes doses da toxina TX2-6 diretamente no núcleo paraventricular do hipotálamo através de cânulas guia.

Dose (µg)	Animal	Rotação Ipsi- lateral	Rotação Contra- lateral	Salivação	Convulsão	Ereção	Morte
3	1						X
	2						X
1,5	1	X		X	X		X
	2	X			X		X
	3						
	4						
	5		X		X		X
	6		X		X		X
0,06	1		X	X	X		X
	2						
	3		X		X		X
0,006	1		X		X		X
	2		X		X		X
	3						
	4		X	X	X		X
	5		X		X		
	6	X			X		
0,0006	1						
	2						
	3						

4.2 Microscopia de fluorescência

Os cortes incubados sem fluoróforo não mostraram marcação, conforme apresentado na figura 5, diferente dos que foram incubados com DAF-FM diacetato

10 μ M, por 1 hora, o que mostra que a fluorescência observada é realmente causada pelo fluoróforo, não sendo auto-fluorescência do tecido.

Figura 5: Imagem de fluorescência de cortes longitudinais de pênis incubados por 1 hora em geladeira com fluoróforo sensível a NO (DAF-FM) concentração 10 μ M (esquerda) e sem fluoróforo (direita) observados em microscópio confocal. X 400

Os resultados obtidos através da microscopia de fluorescência utilizando as drogas de interesse estão expostos na tabela 4. Os tecidos submetidos à toxina tiveram um aumento médio de 7%. Enquanto o controle, que não foi exposto a nenhuma droga, teve um aumento de 14%. O L- NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico), após 30 minutos de sua adição, diminuiu levemente a fluorescência, mas no decorrer dos 60 minutos houve um aumento de 8%. O NPS (doador de óxido nítrico), nas duas concentrações testadas (100 μ M e 300 μ M) apresentou um aumento próximo ao obtido nos controles, 13%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos.

Resultados

Tabela 4 - Média da fluorescência obtida através do fluoróforo sensível a NO, DAF-FM diacetato, em tecido cavernoso de camundongo no tempo 0 (imediatamente após a adição das drogas) e 60 minutos após a adição das drogas e cálculo de $\Delta F/F$.

	O min	60 min	$\frac{\Delta F}{F}$
Controle	100	114,3847	0,143847
Toxina 10nM	100	107,1859	0,071859
L-NAME 100 μM	100	108,0968	0,080968
NPS 100 μM	100	113,8344	0,138344
NPS 300 μM	100	113,3546	0,133546

Nas figura 6 e 7, podemos observar comparativamente a evolução da fluorescência nos tecidos submetidos ao Ringer KBR (controle) e à toxina TX2-6 no tempo 0 (imediatamente após a adição) e em imagem capturada 60 minutos após a adição da droga (ou do Ringer).

Na figura 8, podemos observar comparativamente a evolução da fluorescência nos tecidos submetidos à toxina e às drogas utilizadas como controles no tempo 0 (imediatamente após a adição das drogas) e em imagens capturadas em intervalos de 15 minutos, durante 60 minutos após a adição das drogas.

Figura 6: Imagem tridimensional de fluorescência e a respectiva colorização representativa da intensidade de fluorescência de corte longitudinal de pênis capturada no tempo 0, logo após a adição do Ringer KBR (esquerda) e 60 minutos após a adição (direita). Os quatro pontos marcados foram os escolhidos para que a fluorescência fosse medida. X 200

Figura 7: Imagem tridimensional de fluorescência e a respectiva colorização representativa da intensidade de fluorescência de corte longitudinal de pênis capturada no tempo 0, logo após a adição da toxina Tx2-6 (esquerda) e 60 minutos após a adição de toxina (direita). Os quatro pontos marcados foram os escolhidos para que a fluorescência fosse medida. X 200

Figura 8: Comparação da liberação de óxido nítrico por tecido cavernoso de camundongos através da fluorescência obtida através de tratamento com fluoróforo sensível a NO, DAF-FM diacetato, durante o período de 60 minutos após a adição das drogas. A cada 15 minutos foi realizada uma medição na intensidade de fluorescência. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. Não foi detectada diferença estatística significativa entre os tratamentos.

4.3 Coloração com azul de Toluidina

A coloração com azul de toluidina foi realizada com o intuito de identificar as células do tecido cavernoso de camundongos que ficaram marcadas com fluorescência durante o uso do fluoróforo sensível a NO, DAF-FM diacetato.

Foram observadas células arredondadas, medindo entre 7 e 12 μm , com coloração arroxeada e apresentando inúmeros grânulos citoplasmáticos. Estas células possuem a mesma localização, formato e tamanho que as células marcadas com fluorescência no experimento anterior (Figura 9).

Figura 9: Coloração de tecido cavernoso de camundongos com azul de toluidina. As setas indicam células com grânulos citoplasmáticos medindo entre 10 μm e 15 μm , e que se co-localizam com as células que apresentam marcação fluorescente com o uso do DAF-FM. X400.

4.4 Dosagem de nitritos através do método de Griess

A curva-padrão, obtida através de diferentes concentrações de NaNO_2 (0 μM , 5 μM , 15 μM , 30 μM e 60 μM) que foi utilizada para calcular as concentrações de nitritos das amostras, encontra-se exposta na figura 10.

Figura 10: Curva-padrão obtida através de concentrações conhecidas de nitrito (0 μM , 5 μM , 15 μM , 30 μM e 60 μM) em relação às densidades ópticas das amostras em comprimento de onda de 550 nm.

No controle positivo, com NPS, os resultados mostraram resposta dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de NPS utilizada, maior a concentração de nitrito detectada na amostra. O controle negativo, com L-NAME obteve uma diminuição na concentração de nitritos com relação ao controle, o KRB e a toxina TX2-6. A figura 11 mostra as concentrações de nitrito contidas em cada ensaio.

Figura 11: Concentração de nitrito, expressa em $\mu\text{Moles/mg}$ de proteína, obtida através do método de Griess nas amostras incubadas com diferentes concentrações de L-NAME, NPS, toxina TX2-6 e controle sem nenhuma droga. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. (*) diferença significativa em relação ao controle; $p < 0,05$.

4. 5 Determinação da dose mínima efetiva da toxina TX2-6

Todas as doses de toxina TX2-6 utilizadas foram capazes de causar ereção, cerca de 40 minutos após a injeção. Porém as doses de $1 \mu\text{g/Kg}$ e $3 \mu\text{g/Kg}$, muitas vezes, levam os animais a morte antes de atingirem este sintoma. A dose de $0,3 \mu\text{g/Kg}$ não chega a matar os animais, mas a ocorrência de ereção é de 63%, enquanto com a dose de $0,6 \mu\text{g/Kg}$ a ocorrência de ereção chega a 85% e os animais levam cerca de duas horas para chegar ao óbito. A figura 12 demonstra a porcentagem de ocorrência desses sintomas em cada dose da toxina utilizada.

Figura 12: Ação de diferentes doses da toxina TX2-6 injetada intraperitonealmente em camundongos Swiss e a porcentagem de ocorrência de ereção, hipersalivação e morte nesses animais.

4. 6 Cirurgia de excisão do nervo cavernoso

Nenhuma das fêmeas que ficaram nas mesmas caixas com camundongos denervados engravidaram. No grupo Sham-operado quatro de cinco camundongos engravidaram as fêmeas.

4. 7 Ação da toxina nos animais denervados e Sham-operados

A ereção causada pela toxina TX2-6 em cada grupo está descrita em detalhes abaixo. A figura 13 mostra a ereção completa causada pela toxina.

Figura 13: Ereção completa causada pela injeção da toxina TX2-6 (0,6 µg/Kg) em camundongos.

Injeção da toxina TX2-6 15 dias após a cirurgia

Nenhum animal injetado com salina teve ereção. A classificação da ereção obtida nos animais denervados e sham-operados com a injeção intraperitoneal da toxina TX2-6 15 dias após a cirurgia está exposta na tabela 5. Alguns animais também apresentaram atenuadamente outros sintomas clássicos da intoxicação com a toxina TX2-6, como salivação e piloereção. Os animais denervados que tiveram ereção foram dissecados e não foi observada a reconstituição dos nervos.

Tabela 5 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 15 dias após a cirurgia

	Denervados	Sham-operados
Animal 1	Sem ereção	Sem ereção
Animal 2	++++	++++
Animal 3	++++	+++
Animal 4	++	Sem ereção
Animal 5	++++	Sem ereção

Injeção da toxina TX2-6 1 mês após a cirurgia

Nenhum animal injetado com salina teve ereção. A classificação da ereção obtida nos animais denervados e sham-operados com a injeção intraperitoneal da toxina TX2-6 1 mês após a cirurgia está exposta na tabela 6. Alguns animais também apresentaram atenuadamente outros sintomas clássicos da intoxicação com a toxina TX2-6, como salivação e pilo-ereção. Os animais denervados que tiveram ereção foram dissecados e não foi observada a reconstituição dos nervos.

Tabela 6 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 1 mês após a cirurgia.

	Denervados	Sham-operados
Animal 1	+++	+++
Animal 2	+++	+++
Animal 3	+++	++++
Animal 4	Sem ereção	Sem ereção
Animal 5	Sem ereção	Sem ereção
Animal 6	Sem ereção	_____
Animal 7	Sem ereção	_____

Injeção da toxina TX2-6 2 meses após a cirurgia

Nenhum animal injetado com salina teve ereção. A classificação da ereção obtida nos animais denervados e sham-operados com a injeção intraperitoneal da toxina TX2-6 2 meses após a cirurgia está exposta na tabela 7. Alguns animais também apresentaram atenuadamente outros sintomas clássicos da intoxicação

com a toxina TX2-6, como salivação e pilo-ereção, Os animais denervados que tiveram ereção foram dissecados e não foi observada a reconstituição dos nervos.

Tabela 7 - Classificação da ereção obtida em animais denervados (esquerda) e sham-operados (direita) com a injeção da toxina TX2-6 2 meses após a cirurgia.

	Denervados	Sham-operados
Animal 1	+++	++++
Animal 2	+++	++++
Animal 3	+++	++++
Animal 4	+++	++++
Animal 5	+++	++++
Animal 6	+++	+++
Animal 7	+++	Sem ereção

4.8 Coloração dos pênis dos animais denervados e sham-operados com Tricrômico de Masson dois meses após a cirurgia

Pela análise microscópica de lâminas de cortes de pênis corados pelo método Tricrômico de Masson, foi possível observar que no grupo denervado houve maior deposição de colágeno (corado em azul) do que no grupo sham operado, conforme apresentado na figura 14.

Figura 14: Coloração com Tricrômico de Masson evidenciando colágeno (em azul) em cortes de pênis denervados (esquerda) e sham-operados (direita). X 100

4. 9 Imuno-histoquímica

Os animais do grupo sham-operado (Figura 15) apresentaram marcação para neurofilamentos mais intensa que os animais denervados (Figura 16) na região onde se localizam os nervos.

Figura 15: Imuno-histoquímica para neurofilamentos em pênis de camundongos sham-operados. x100 (esquerda). À direita uma ampliação da região do nervo (x400). As setas indicam a região dos nervos.

Figura 16: Imuno Imuno-histoquímica para neurofilamentos em pênis de camundongos denervados. x100 (esquerda). À direita uma ampliação da região do nervo (x400). As setas indicam a região dos nervos.

Os animais do grupo sham-operado também apresentaram maior reatividade para a proteína sinaptofisina (Figura 17). Embora os denervados também tenham apresentado alguma marcação, esta foi rara (Figura 18).

Figura 17: Imuno-histoquímica para sinaptofisina em pênis de camundongos sham-operados. X400. As setas indicam regiões no corpo cavernoso que apresentaram maior reatividade para o anticorpo utilizado.

Figura 18: Imuno-histoquímica para sinaptofisina em pênis de camundongos denervados. X400. As setas indicam regiões no corpo cavernoso que apresentaram maior reatividade para o anticorpo utilizado.

Não foi possível observar imuno-reatividade diferencial para a nNOS em nenhum dos dois grupos (Figura 19).

Figura 19: Imuno-histoquímica para nNOS em pênis de camundongos sham-operados (esquerda) e denervados (direita). X100.

5 DISCUSSÃO

Observações da ativação do fator de transcrição fos no núcleo paraventricular do hipotálamo, conforme citado na introdução, poderiam demonstrar o papel dessa estrutura na ereção peniana induzida pela toxina Tx2-6. Porém, os resultados obtidos não comprovam o envolvimento direto deste núcleo com o priapismo observado, já que não houve ereção em nenhum animal injetado intracerebralmente com a toxina. Outros autores (9) descreveram os efeitos da administração intracerebro-ventricular da toxina e nunca observaram/reportaram priapismo, reforçando nossa observação.

A ativação do fator de transcrição fos em áreas cerebrais, como descrito em nosso estudo preliminar, não necessariamente se relaciona de forma causal com a ereção peniana observada. Embora muitas evidências sugiram o envolvimento do núcleo paraventricular do hipotálamo na função erétil, segundo Ferguson e colaboradores (45), o mesmo está clara e consistentemente envolvido no estresse. O quadro de intoxicação causado pela Tx2-6 é severo e leva à morte, de tal forma que se constitui em poderoso estresse. De maneira geral o quadro comportamental sugere que a ativação de fos observada poder refletir efeitos relacionados à convulsão e estresse da intoxicação por Tx2-6.

A análise da liberação de óxido nítrico por tecido cavernoso através de fluorescência não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os diversos tratamentos aplicados. Os resultados colocaram em dúvida a metodologia utilizada quanto ao modo de preparo do tecido e quanto a sensibilidade do método para esse tipo de medição. Nunes e colaboradores (2008) (7) observaram a liberação de NO causada pela toxina TX2-6 em tecido cavernoso de ratos através de microscopia de fluorescência com o mesmo fluoróforo utilizado neste trabalho. Estes autores não utilizaram o mesmo corte de tecido para comparar a fluorescência antes e depois da toxina, o que torna muito difícil comparar os controles com os tratados, uma vez que cada corte de tecido tem uma fluorescência inicial diferente do outro, mesmo quando incubados durante o mesmo tempo, com a mesma droga e na mesma concentração. Em nossos experimentos recorremos ao método de Griess para dosagem indireta de óxido nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito, um processo mais

confiável de quantificação, e observamos que a Tx2-6 não causou aumento dos nitritos totais sugerindo que a toxina não ativa a NOS diretamente. O Nitroprussiato de sódio é um doador de NO com mecanismo de liberação pouco conhecido. Esse mecanismo é tão rápido que é usado em hospitais para proporcionar uma rápida redução da pressão arterial em crise hipertensiva (46). O L-NAME é um análogo da L-arginina e inibe a produção de NO através de substituição do seu substrato (47). Estas duas drogas foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente, no teste de Griess. Os resultados obtidos com elas estão dentro do esperado, uma vez que o NPS causou aumento na dosagem de nitritos e o L-NAME causou diminuição. A diminuição obtida com o L-NAME, mesmo que na maior concentração utilizada tenha bloqueado totalmente a produção de nitritos, não chegou a ser significativa estatisticamente com relação ao controle, provavelmente porque a produção de nitritos no controle já é baixa. As isoformas constitutivas da NOS (eNOS e nNOS) são dependentes de cálcio para o seu funcionamento (36), portanto esperava-se que ao adicionar a calcimicina, um ionóforo de cálcio, no tecido, a produção de NO iria aumentar, o que não ocorreu. A toxina TX2-6 não causou aumento na concentração de nitritos em nenhuma dose utilizada, o que demonstra que ela não deve agir diretamente no tecido cavernoso causando a liberação de óxido nítrico.

A coloração com azul de toluidina, utilizada para identificação de mastócitos devido ao fato de evidenciar os grânulos citoplasmáticos identificou as células marcadas com fluorescência nos tecidos submetidos ao DAF-FM diacetato como esse tipo celular devido ao seu formato, tamanho, distribuição e presença de grânulos citoplasmáticos.

Nos experimentos de denervação, considerando que as fêmeas que ficaram em caixas com animais denervados não emprenharam, concluiu-se que a técnica utilizada na cirurgia de denervação foi bem sucedida. Foi escolhida a dose de 0,6 µg/Kg para se trabalhar, pois essa dose tem uma frequência alta de ereção (cerca de 85%) e mesmo que a maioria dos animais cheguem a morrer com essa dose, a morte leva cerca de 2 horas para ocorrer, o que nos dá tempo suficiente para avaliar

a ocorrência e a intensidade da ereção obtida. Essa dose de toxina é relativamente baixa e, algumas vezes não causa os sinais clássicos de intoxicação quando injetada em animais saudáveis. Isso explica porque alguns animais tanto sham-operados como denervados não apresentaram ereção, assim como outros sintomas clássicos da intoxicação. Também foi possível observar que nos dois grupos (sham-operados e denervados) nos animais que foram injetados com a toxina 15 dias e 1 mês após a cirurgia a ocorrência de ereção foi menor. Isso pode ser atribuído ao tempo pós-cirúrgico, que pode não ter sido suficiente para recuperação total dos animais. A análise de comparação de proporção não detectou diferença estatística na ocorrência de ereção entre os dois grupos (sham-operados e denervados) em nenhum dos tempos pós-cirúrgicos utilizados.

Alguns animais denervados do grupo que recebeu injeção intraperitoneal da toxina TX2-6 após 15 dias de cirurgia obtiveram uma ereção completa com exposição total. Já nos grupos injetados após 1 e 2 meses da operação foi possível observar apenas ereção, mas sem exposição total do pênis. Em todos os grupos houve a presença de animais sham com ereção completa e exposição total.

A denervação peniana leva a uma degeneração progressiva e fibrose do músculo liso cavernoso. Uma possível explicação para isso é que os nervos cavernosos podem estar envolvidos na produção de algum fator trófico para as células do pênis (48). Outro mecanismo possível seria uma mudança no fluxo sanguíneo do pênis como consequência da denervação. Um evento isquêmico pode levar a morte celular com subsequente perda de tecido peniano, em um processo de fibrose (48). O fato dos animais denervados terem conseguido ter ereção, mas sem exposição total, nos levou a crer que a toxina é capaz de causar ereção em animais denervados e que o pênis só tem dificuldade para se expor devido à fibrose decorrente da denervação. Recorremos então à coloração com Tricrômico de Masson para avaliar a ocorrência de fibrose. Esta coloração mostra os núcleos em preto, fibras musculares lisas, citoplasma, queratina e fibras intracelulares em vermelho e colágeno em azul. Os resultados comprovaram a presença da fibrose nos animais denervados, pois todos os animais denervados apresentaram mais

fibras colágenas do que os sham-operados. Alternativamente, seria possível que a denervação tenha deixado ainda terminações ativas onde a toxina pudesse agir. Embora isto tenha sido observado na imunohistoquímica para sinaptofisina, acreditamos que o número muito baixo de terminações remanescentes não teria papel funcional.

Os resultados obtidos com anticorpo anti-sinaptofisina, uma proteína presente nas vesículas pré-sinápticas (49), mostraram uma imuno-reatividade muito maior nos animais sham-operados do que nos denervados. O anticorpo anti-neurofilamentos, normalmente usado para estudo da morfologia e conexões entre neurônios (50) também mostrou maior reatividade nos animais sham-operados. Porém os animais denervados que ficaram em caixas juntos com as fêmeas não foram capazes de procriar, portanto, mesmo que eles tenham algumas terminações nervosas ativas, parece que as mesmas, sem o auxílio da toxina, não são capazes de causar ereção. Homens que sofrem prostectomia, com lesão bilateral dos nervos cavernosos eventualmente também poderiam manter algumas terminações nervosas ativas, uma vez que eles sofrem dano no mesmo nervo lesado na nossa cirurgia de denervação.

A imuno-histoquímica para nNOS aparentemente não mostrou reatividade em nenhum dos dois grupos. Burnett e colaboradores (51) demonstraram, em pênis de rato, diferença na marcação com anticorpo anti-NOS em animais denervados e animais controles. Portanto a imuno-histoquímica para nNOS deverá ser refeita e ainda deverá ser feita imuno-histoquímica para eNOS.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que:

- O núcleo paraventricular do hipotálamo não está envolvido na ereção causada pela toxina TX2-6, como se acreditava anteriormente, uma vez que nenhum animal que teve a toxina TX2-6 injetada neste núcleo teve ereção.
- A toxina TX2-6 não induz a liberação de óxido nítrico em tecido cavernoso de camundongos.
- A toxina TX2-6 é capaz de causar ereção peniana em animais cujos cavernosos foram denervados.
- A denervação peniana causa fibrose do penis o que acarreta impedimento para a distensão completa do tecido cavernoso, permitindo a observação de ereção apenas parcial após a injeção da toxina TX2-6.
- Não se observou imunoreatividade para nNOS no penis normal, resultado a ser confirmado.
- A denervação peniana causou perda da imunoreatividade à sinaptofisina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- (1) 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.
- (2) Brazil V, Vellard J. Contribuição ao estudo das aranhas. *Memorias do Instituto Butantan*. 1925;1:1-70.
- (3) Schenberg S, Lima FA. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Memorias do Instituto Butantan*. 1966;33(2):627-38.
- (4) Lucas S. Spiders in Brazil. *Toxicon*. 1988;26(9):759-72.
- (5) Antunes E, Marangoni RA, Borges NC, Hyslop S, Fontana MD, de-Nucci G. Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*. 1993;26(1):81-91.
- (6) Lopes-Martins RA, Antunes E, Oliva ML, Sampaio CA, Burton J, de Nucci G. Pharmacological characterization of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *British Journal of Pharmacology*. 1994;113(1):81-6.
- (7) Nunes KP, Costa-Goncalves A, Lanza LF, Cortes SF, Cordeiro MN, Richardson M et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*. 2008;51(7):1197-1206.
- (8) 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.
- (9) Cordeiro MdN, Diniz CR, Valentim AdC, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. The purification and amino acid sequences of four Tx2

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Referências

- neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Letters*. 1992;310(2):153-6.
- (10) Richardson M, Pimenta AM, Bemquerer MP, Santoro MM, Beirao PS, Lima ME 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(3-4):173-87.
- (11) Troncone LRP, Lebrun I, Hipolide DC, Raymond RR, Nobrega JN. Regional brain c-Fos activation associated with penile erection and other symptoms by the spider toxin TX2-6. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1998;358(1 Suppl 1):R38.
- (12) Yonamine CM, Troncone LRP, Camillo MAP. 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.
- (13) Shehab S, Coffey P, Dean P, Redgrave P. Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylentetrazole and maximal electroshock. *Exp Neurol*. 1992;118(3):261-74.
- (14) Marson L, Platt KB, McKenna KE. Central nervous system innervation of the penis as revealed by the transneuronal transport of pseudorabies virus. *Neuroscience*. 1993;55(1):263-80.
- (15) Holstege G, Tan J. Supraspinal control of motoneurons innervating the striated muscles of the pelvic floor including urethral and anal sphincters in the cat. *Brain*. 1987;110(Pt 5):1323-44.
- (16) Krane RJ, Goldstein I, Saenz dT, I. Impotence. *N Engl J Med*. 1989;321(24):1648-59.
- (17) Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl*. 2003; 24(6 Suppl):S17-S37.

Referências

- (18) 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.
- (19) Feng MI, Huang S, Kaptein J, Kaswick J, Aboseif S. Effect of sildenafil citrate on post-radical prostatectomy erectile dysfunction. *J Urol*. 2000;164(6):1935-8.
- (20) CALABRISI P. The nerve supply of the erectile cavernous tissue of the genitalia in the human embryo and fetus. *Anat Rec*. 1956;125(4):713-23.
- (21) Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005;32(4):379-95.
- (22) Argiolas A, Melis MR. Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog Neurobiol*. 2005;76(1):1-21.
- (23) Magee TR, Ferrini MG, Davila HH, Zeller CB, Vernet D, Sun J et al. Protein inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) and the N-methyl-D-aspartate receptor are expressed in the rat and mouse penile nerves and colocalize with penile neuronal NOS. *Biol Reprod*. 2003;68(2):478-88.
- (24) Gonçalves ACC, Reis AB, Reis FM. Fisiopatologia da disfunção erétil: aspectos moleculares e suas implicações clínicas. *Hipertensão*. 2007;10(1):4-10.
- (25) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- (26) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9265-9.
- (27) Pickard RS, Powell PH, Zar MA. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1991;104(3):755-9.

Referências

- (28) Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med.* 1992;326(2):90-4.
- (29) Hallen K, Gustafsson LE, Wiklund NP. Nerve-induced release of nitric oxide from the rabbit corpus cavernosum is modulated by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Neuroscience.* 2005;133(1):169-74.
- (30) Bivalacqua TJ, Liu T, Musicki B, Champion HC, Burnett AL. Endothelial nitric oxide synthase keeps erection regulatory function balance in the penis. *Eur Urol.* 2007;51(6):1732-40.
- (31) Brandelli A, Miranda PV, Tezon JG. Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins. *Journal of Andrology.* 1996;17(5):522-9.
- (32) Archer SL. Potassium channels and erectile dysfunction. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(1):61-71.
- (33) Hurt KJ, Sezen SF, Champion HC, Crone JK, Palese MA, Huang PL et al. Alternatively spliced neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(9):3440-3.
- (34) Musicki B, Burnett AL. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(2):154-165.
- (35) Musicki B, Ross AE, Champion HC, Burnett AL, Bivalacqua TJ. Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis. *J Androl.* 2009;30(4):352-62.
- (36) Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:235-76.
- (37) Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 1995;75(1):191-236.

- (38) Traish AM, Kim NN, Goldstein I, Moreland RB. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J Androl.* 1999;20(6):671-82.
- (39) Mills TM, Reilly CM, Lewis RW. Androgens and penile erection: a review. *J Androl.* 1996;17(6):633-8.
- (40) Pepicelli O, Raiteri M, Fedele E. The NOS/sGC pathway in the rat central nervous system: a microdialysis overview. *Neurochem Int.* 2004;45(6):787-97.
- (41) Renaud RC, Xuereb H. Erectile-dysfunction therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):663-4.
- (42) Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD. Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol Pharmacol.* 1999;56(1):124-30.
- (43) Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y et al. Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal Biochem.* 2000;287(2):203-9.
- (44) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8.
- (45) Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(6):717-27.
- (46) Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007;151(3):305-21.
- (47) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990;101(3):746-52.

Referências

- (48) Klein LT, Miller MI, Buttyan R, Raffo AJ, Burchard M, Devris G et al. Apoptosis in the rat penis after penile denervation. J Urol. 1997;158(2):626-30.
- (49) Schmidt HH, Walter U. NO at work. Cell. 1994;78(6):919-25.
- (50) Schmidt ML, Murray J, Lee VM, Hill WD, Wertkin A, Trojanowski JQ. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. Am J Pathol. 1991;139(1):53-65.
- (51) Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. Science. 1992;257(5068):401-3.