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

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 wit 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 methodwhich 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 America 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 polipeptídios 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 sequencia 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 cobaios 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, amigdala 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 amigdala, 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 inabilidade persistente para obter ou manter uma ereção peniana com rigidez suficiente para o intercurso 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 diarréia. 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 hipertenção). 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 prostectomia, com lesão bilateral dos nervos cavernosos, não respodem 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 glande 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 toráxica 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).

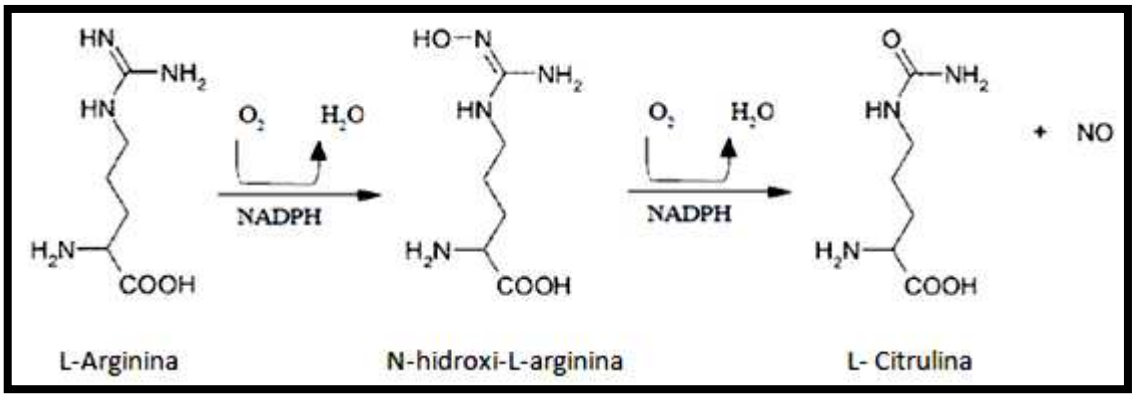

Figura 1: Síntese de Óxido nítrico catalisada pela NO-sintase.

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 subtunicais 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 subtunicais 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).

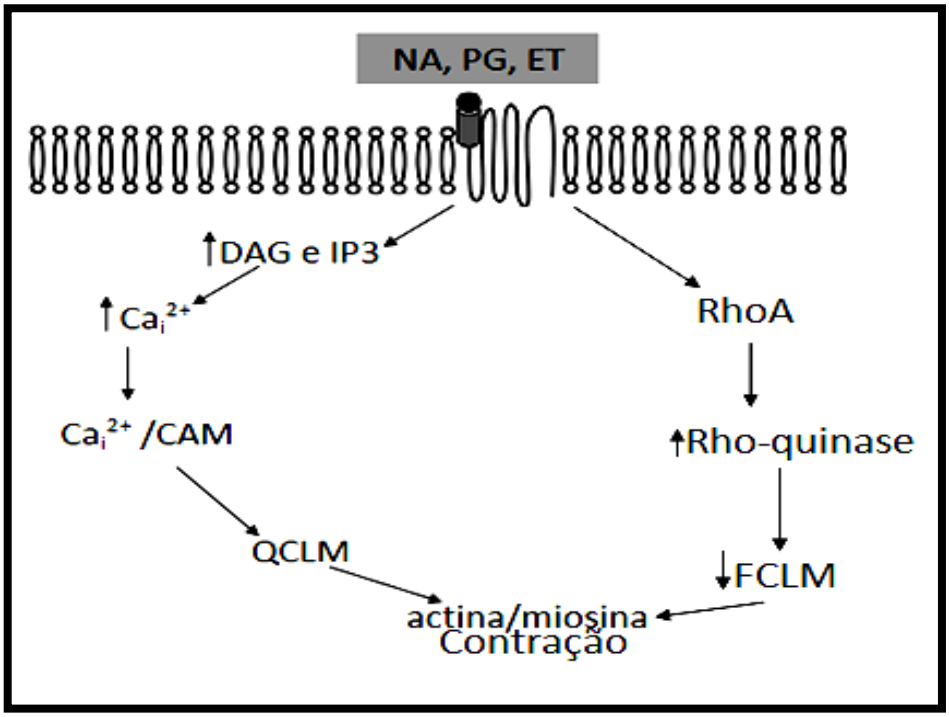

Figura 2: Mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do pênis em estado flácido. Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2007(24).

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 acumulo de GMPc no corpo cavernoso, promovendo a ereção (42).

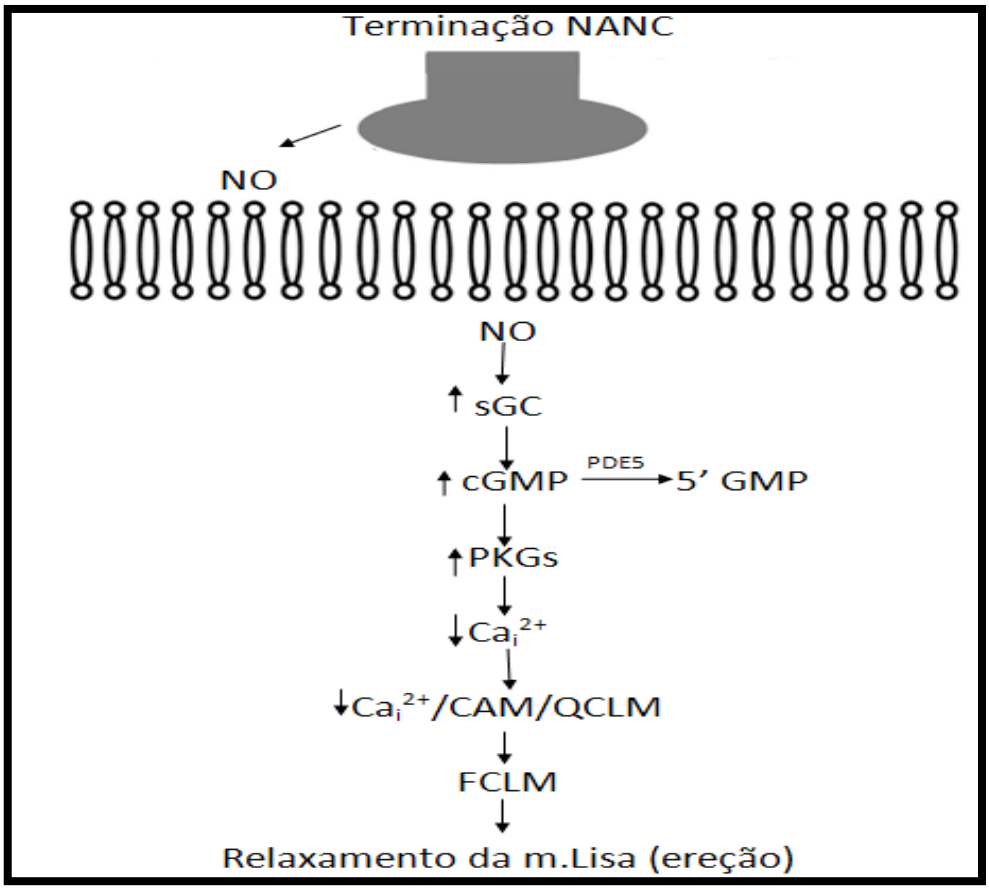

Figura 3: Mecanismos moleculares envolvidos na ereção peniana.
Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2007 (24).

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 distenção 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) Bucaretchi 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 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). FEBS Letters. 1992;310(2):153-6.

*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].

(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-Schmiedebergs 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 pentylenetetrazole 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.

(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.

(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.

(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.