



ANDRE MOREIRA MARTINS ARRUDA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DO HEMIPENIS DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS (SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE)**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ANDRE MOREIRA MARTINS ARRUDA

***ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DO HEMIPENIS DE
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS (SERPENTES: VIPERIDAE:
CROTALINAE)***

Orientação: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR ANDRE MOREIRA
MARTINS ARRUDA, ORIENTADO PELO
PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ar69e Arruda, Andre Moreira Martins, 1987-
Estudo morfológico e funcional do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) / Andre Moreira Martins Arruda. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gilberto de Nucci.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemipênis. 2. Ereção peniana. 3. Óxido nítrico. 4. GMP cíclico. 5. Nucleotídeo cíclico fosfodiesterase do tipo 5. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Estudo morfológico e funcional do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae)

Palavras-chave em inglês:

Hemipenis

Penile erection

Nitric oxide

Cyclic GMP

Cyclic nucleotide phosphodiesterases, type 5

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Rodrigo Alvaro Brandao Lopes Martins

Stephen Hyslop

Data de defesa: 25-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANDRÉ MOREIRA MARTINS ARRUDA

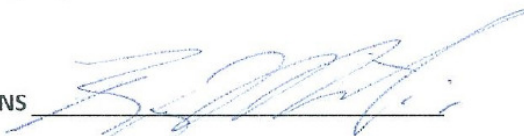
ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI



2. PROF. DR. RODRIGO ALVARO BRANDAO LOPES MARTINS



3. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24 de julho de 2013

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais, Antônio e Liduvina Arruda,
que são minha história e minha razão de ser.*

*Aos meus irmãos Fábio e Fernando Arruda,
pelos bons exemplos que representam para mim.*

Ao meu orientador

Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

Agradeço pelas oportunidades e pela orientação. Agradeço pelas conversas e por todos os conselhos, pessoais e profissionais.

Aos meus amigos,

Fábio Henrique, Lu Chen, Mauro Sucupira, Antônio Celso e Fabíola Iglesias.

Meus agradecimentos por terem me recebido tão bem em Campinas e pelas inúmeras ajudas que precisei.

Agradecimentos

Aos amigos da cascata, Luiz Osório Silveira Leiria, Julio Rojas, Fernando Báu, Samuel Barillas, Fernanda Priviero, Fernanda Dell, Lorenzo Pincinatti, Paulo Gonzales, Rodrigo Capel, Fabiano Calmasini, Marcovan Porto, Mário Ângelo, pelo respeito e ajuda indispensável para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos de laboratório, Antônio Sérgio, Wanderley Pedroso, Josiane Sant'anna, Renato Niyama de Lima, Adriano Banin, Tainah Babadópulos, Marinalva Sampaio, André Borges, Gustavo Mendes, Danielle dos Santos, Simone Cristine, Marinalva, Samara Bittencourt, Fernanda Moraes, Hugo do Valle, Carol e Marly. Agradeço por todo o conhecimento e amizade compartilhados no dia-a-dia de trabalho.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, Dra. Sisi Marcondes, Dr. Stephen Hyslop, Dr. Gabriel Forato Anhô, Dr. André Schenka, Dr. Heitor Moreno Junior, Dr. Edson Antunes, pela atenção dispensada durante o cumprimento dos créditos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elaine, Gildo, Agnaldo, Antonio, Adílson, Miguel Borges da Silva e Denise pelo competente trabalho que realizam.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado Acadêmico.

LISTA DE DROGAS	xiv
LISTA DE ABREVIACES	xvi
LISTA DE FIGURAS	xviii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii

1	INTRODU	25
1.1	Anatomia, inerva e hemodinica peniana	26
1.2	Mecanismos de contra e relaxamento de corpo cavernoso de mamferos	28
1.2.1	Mecanismos de contra: neurotransmiss simptica e rho-quinase	28
1.2.2	Mecanismos de relaxamento: Via NO-sGC-cGMP	29
1.3	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	30
1.3.1	Morfologia e fisiologia do pnis das serpentes	31
1.4	Evolu adaptativa de resistncia  tetrodotoxina em animais	33
1.4.1	Distribui filogentica da tetrodotoxina	34
	JUSTIFICATIVA E RELEVNCIA	35
	OBJETIVOS	36
2	MATERIAIS E MTODOS	37
2.1	Equipamentos	37
2.2	Drogas utilizadas	37
2.3	Animais de experimenta	38
2.4	Microscopia de luz e imunohistoqumica	38
2.5	Microscopia eletrnica de varredura	39
2.6	Anlise por western blot	40

2.7	Atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) do hemipênis	41
2.8	Isolamento e montagem <i>in vitro</i> do corpo cavernoso de <i>Crotalus</i> (CCC)	42
2.9	Corpo cavernoso de <i>Callithrix jacchus</i> (sagui) (CC)	43
2.10	Protocolos experimentais	43
2.11	Análise de dados	45
2.12	Análise estatística	45
3	RESULTADOS	46
3.1	Análise microscópica do hemipênis de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	46
3.2	Caracterização molecular, bioquímica e imunohistoquímica da via NO-cGMP-PDE5	49
3.2.1	Caracterização imunohistoquímica das enzimas NOS, sGC e PDE5	49
3.2.2	Atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) em corpos cavernosos de <i>Crotalus</i> .	51
3.2.3	Expressão protéica de sGC e PDE5A	51
3.3	Caracterização farmacológica da via NO-cGMP-PDE5	51
3.3.1	Caracterização da via de sinalização NO-cGMP-PDE5 em corpo cavernoso isolado do hemipênis de <i>Crotalus</i> (CCC)	51
3.4	Ausência de efeito de bloqueadores do canal de Na ⁺ em relaxamentos e contrações geradas por estimulação elétrica de campo (EFS).	53
3.5	Bloqueio, por tetrodotoxina, da contração de músculo esquelético de cascavel induzido por estimulação elétrica.	56
4	DISCUSSÃO	57
5	SUMÁRIO E CONCLUSÃO	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE DROGAS E SAIS

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Acetilcolina	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
Atropina	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
CaCl ₂	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Endotelina-1	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
Fenilefrina	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
Guanetidina	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
HCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
KCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Metformina	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
MgSO ₄	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
N ω -nitro-L-arginina metil éster	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
Nitroprussiato de sódio	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
ODQ	Sigma (St. Louis, Missouri, EUA)
Uretana	Sigma(St. Louis, Missouri, EUA)

ACh: acetilcolina
Ca²⁺: íon cálcio
CC: corpo cavernoso
EFS: estimulação elétrica de campo
E_{max}: resposta máxima
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
Epm.: erro padrão da média
ET-1: endotelina-1
GCs: guanilato ciclase solúvel
GDP: difosfato de guanosina
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
GTP: trifosfato de guanosina
PIC: pressão intracavernosa
L-Arg: L-arginina
L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster
NANC: não-adrenérgico não-colinérgico
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PKC: proteína quinase C
PLC: fosfolipase C
PDE5: fosfodiesterase tipo 5
PE: fenilefrina
pEC₅₀: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo
PI3K: fosfatidil-inositol 3-kinase
SNP: nitroprussiato de sódio

Figura 1: Estrutura molecular da TTX

Figura 2a: Processo de eversão do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus*. A – Região caudal de *Crotalus d. terrificus*. B – Hemipênis em processo de intumescência parcial. C – Par de hemipênis totalmente evertido.

Figura 2b: *Crotalus durissus terrificus*, MEV da região do ápice do hemipênis. SE – sulco espermático; CE - cilindro externo; CI – cilindro interno; MR – músculo retrator magno do hemipênis.

Figura 3: *Crotalus durissus terrificus*, MEV da região do ápice do hemipênis. CCI – corpo cavernoso interno; CE – cilindro externo; FML – feixe de músculo liso; CCE – corpo cavernoso externo; LA – lacunas; TA – túnica albugínea.

Figura 4: Região do capítulo do hemipênis – parede do corpo cavernoso externo e túnica albugínea – TA – compostas por músculo liso e tecido conjuntivo; EP – epitélio estratificado pavimentoso.

Figura 5: Corte transversal da região do corpo cavernoso interno exibindo: MR – músculo retrator; SP – sinusoide perpendiculares; SC – sinusoide central; TC – tecido conjuntivo.

Figura 6: Imunorreatividade (setas) de a. eNOS, b. nNOS (imunoperoxidase, aumento de 400X), c. SGC, d. PDE5 e e. actina de músculo liso (imunoperoxidase, aumento de 200X) em corpo cavernoso de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A=arteríola, N=nervo, S=endotélio sinusoidal. Painel f. 1, 2, 3 e 4, mostram imunorreatividade para eNOS, nNOS, sGC e PDE5A, respectivamente, no corpo cavernoso de camundongo, e 5 é um controle negativo, obtido pela omissão do anticorpo primário. Observe a falta de imunorreatividade nas estruturas trabeculares do hemipênis.

Figura 7: Western Blots representativos de sGC (A) e PDE5 (B) em aorta isolada, corpo cavernoso e pulmão de *Crotalus durissus terrificus*.

Figura 8: Curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh, 0.01-100 μ M) na ausência (controle - CTL) e presença de N ω -nitro-metil-éster (L-NAME, 100 μ M).

Figura 9: O doador de óxido nítrico, SNP (0.01-30 μ M) na ausência (controle - CTL) e presença do inibidor de sGC (ODQ, 10 μ M) e ativador BAY 41-2272 (0.01-10 μ M) em região não espiculada isolada do hemipênis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

Figura 10: Relaxamento dependente da frequência induzido pela estimulação elétrica (EFS): a. a fração não espiculada do hemipênis isolado de *Crotalus durissus terrificus* na ausência (controle - CTL) e presença do inibidor da NOS (L-NAME, 100 μ M), do inibidor de sGC (ODQ, 10 μ M) e do bloqueador de Na⁺, tetrodotoxina (TTX, 1 μ M). As colunas são a média $\pm$ S.E.M. de 3-6 cobras.

Figura 11: Relaxamento dependente da frequência induzido pela estimulação elétrica (EFS): b. corpos cavernosos de sagüi na ausência (control) e presença de L-NAME (100 μ M) e TTX (1 μ M).

Figura 12: Tempo de relaxamento de 50% para a recuperação de 50% após EFS em corpos cavernosos de *Callithrix jacchus* e *Crotalus durissus terrificus*.

Figura 13. Traçados representativos do relaxamento induzido por EFS (16 Hz) em a. tecidos do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* e b. corpos cavernosos de sagui. Trata-se de traçados representativos de seis cobras ou saguis.

Figura 14. Traçados representativos do bloqueio da contração causado pela tetrodotoxina em músculo esquelético de cascavel.

A presença de um par de órgãos copuladores, os hemipênis, é a característica mais singular do grupo Squamata, que reúne as serpentes e os lagartos. Para que ocorra a ereção, o hemipênis sofre ingurgitamento dos corpos cavernosos por sangue e linfa, além de contar com o auxílio da contração do músculo propulsor do pênis e o relaxamento do músculo retrator. O coito nestes animais pode durar até 28 horas, porém, os mecanismos envolvidos, as estruturas e sua base farmacológica de funcionamento são ainda pouco conhecidas.

O hemipênis consiste de dois corpos cavernosos funcionalmente concêntricos, um deles contendo feixes de fibras musculares lisas. Em mamíferos, sintases de NO neuronais e endoteliais estão presentes em estruturas neurais e no endotélio, respectivamente, enquanto a guanilato ciclase solúvel e PDE5 (fosfodiesterase tipo 5) estão expressas no músculo liso trabecular.

Partindo disto, para investigar as vias presentes no tecido das cobras, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas de relaxamento para a acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP), BAY41-2272 e tadalafil em corpos cavernosos de *Crotalus* (CCC) pré-contraídos com fenilefrina. Relaxamentos induzidos por estímulo elétrico (EFS) também foram feitos na ausência e presença de L-NAME (100 mM), ODQ (10 mM) e tetrodotoxina (TTX, 1 mM).

Em CCC pré-contraídos, o relaxamento dependente de frequência, gerado por EFS, durou três vezes mais do que aqueles em CC mamíferos. Embora estes relaxamentos sejam praticamente abolidos por L-NAME ou ODQ, eles não foram afetados pela TTX. Em contraste, o EFS promoveu relaxamento em corpos cavernosos de sagui que haviam sido incubados com TTX.

The presence of a pair of copulatory organs, the hemipenes, is the most unique feature of the group Squamata, which includes snakes and lizards. For an erection to occur, the hemipenes suffer engorgement of the corpora cavernosa with blood and lymph, besides counting with the aid of contraction of the propellant muscle and relaxation of penis retractor muscle. Coitus in these animals can last up to 28 hours, however, the mechanisms involved, the structures and their pharmacological basis are still little known.

The hemipenis consists of two concentric functionally cavernous bodies, one containing bundles of smooth muscle fibers. In mammals, neuronal NO synthases and endothelial cells are present in the endothelium and neuronal structures, respectively, whereas the soluble guanylate cyclase and PDE5 (phosphodiesterase type 5) are expressed in trabecular smooth muscle.

To investigate the tissue were constructed cumulative concentration-response curves for relaxation to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), BAY41-2272 and tadalafil in the corpora cavernosa of *Crotalus* (CCC) pre contracted with phenylephrine. Relaxations induced by electrical stimulation (EFS) was also tested in the presence and absence of L-NAME (100 mM), ODQ (10 mM) and tetrodotoxin (TTX, 1 mM).

In precontracted CCC, dependent relaxation frequency generated by EFS last three-times more than those in DC mammals. Although these relaxations are virtually abolished by L-NAME or ODQ, they were not affected by TTX. In contrast, EFS caused a relaxation of the corpus cavernosum in marmosets that had been incubated with TTX.

1.1. Anatomia, inervação e hemodinâmica peniana.

Em todos os mamíferos, o sêmen é depositado no trato reprodutivo feminino por um órgão intromitente, o pênis. Existem dois tipos básicos: a) pênis vascular, presente na maioria dos grupos, incluindo a ordem dos primatas e b) pênis fibroelástico, como na ordem dos artiodátilos (animais com casco e número par de dedos nas patas) ⁽¹⁻³⁾.

O pênis vascular humano é anatomicamente composto por três estruturas cilíndricas de tecido erétil: dois corpos cavernosos dorsalmente dispostos e unidos por um septo e, ventralmente localizado ⁽¹⁾, o corpo esponjoso, que contém a uretra peniana e se expande na porção distal para formar a glândula ⁽¹⁻³⁾. O corpo cavernoso contém tecido sinusoidal distensível, essencial para o processo erétil. Uma dura cápsula fibrosa não distensível, a túnica albugínea, reveste os corpos cavernosos e uma camada mais fina desta reveste o corpo esponjoso ⁽²⁾. A túnica albugínea é um tecido fibroso e compacto constituído por fibras de colágeno e fibras de elastina ^(1,4).

Na porção caudal, o corpo esponjoso se expande formando o bulbo uretral, envolto pelo músculo bulbocavernoso, enquanto a raiz dos corpos cavernosos está rodeada pelo músculo isquiocavernoso ⁽³⁾. Esta região é denominada crura dos corpos cavernosos ^(4,5).

Existem duas camadas de fáscias que envolvem o eixo do pênis por baixo da pele. A fáscia Dartos, mais superficial, é contínua com a fáscia de Scarpa (abdominal) e com a fáscia Dartos escrotal. A fáscia de Buck, mais profunda, cobre os corpos cavernosos e esponjosos ancorando-se no osso pélvico para os ligamentos suspensórios do pênis. O grau de ancoramento e o peso do órgão determinarão a angulação no estado de ereção ^(1,5).

O pênis é innervado por fibras autonômicas simpáticas, parassimpáticas e somáticas (sensoriais e motoras) ^(3,4). A partir da coluna espinhal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas confluem, formando o nervo cavernoso. O nervo adentra os corpos cavernosos e o corpo esponjoso para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência ⁽⁵⁾.

A via somatossensorial origina-se de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, da glândula, da uretra e no interior do corpo cavernoso. As fibras nervosas que partem dos receptores convergem para o nervo dorsal do pênis que se unem a outros nervos formando o nervo pudendo, responsável primário pelas sensações (fibras aferentes) e pela contração dos músculos bulbo cavernoso e isquiocavernoso (fibras eferentes) ^(3,5). A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase rígida da ereção, ao passo que a contração rítmica do músculo bulbo cavernoso é necessária para a ejaculação ⁽⁵⁾.

O suprimento de sangue arterial peniano é fornecido principalmente via artéria pudenda interna (ramo da divisão anterior da artéria ilíaca interna) que origina a artéria peniana e se divide em ramos terminais designados como artérias dorsal (irriga a glândula peniana), cavernosa (irriga os corpos cavernosos via múltiplas artérias helicinais), uretral ou esponjosa (irriga o corpo esponjoso, o tecido uretral e a glândula peniana), bulbar (irriga o bulbo peniano, na origem do órgão) ^(4,5). As artérias cavernosas são a principal fonte de sangue para a função erétil e variações anatômicas são comuns.

A drenagem venosa dos corpos cavernosos ocorre através de vênulas localizadas entre a periferia do tecido erétil e a túnica albugínea. Veias emissárias atravessam a túnica albugínea e drenam o sangue para a veia dorsal profunda através das veias crural e cavernosa ^(1,4).

1.2. Mecanismos de contração e relaxamento de corpo cavernoso de mamíferos

1.2.1. Mecanismos de contração: neurotransmissão simpática e rho-quinase

Em mamíferos, a neurotransmissão noradrenérgica desempenha papel essencial na regulação do tônus do músculo liso dos corpos cavernosos. Os vasos penianos e o músculo liso cavernoso recebem uma vasta inervação adrenérgica, a qual mantém o pênis no estado flácido através da atividade tônica destes nervos, causando a liberação maciça de noradrenalina ^(6,7). A noradrenalina estimula α -adrenoceptores (α -AR) e causa a contração da vasculatura peniana e do músculo liso trabecular do corpo cavernoso ⁽⁶⁾. Os mecanismos intracelulares decorrentes da atividade contrátil evocada pela ativação de α 1-AR incluem a ativação da fosfolipase C, com formação de inositol trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando assim ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio.

Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a miosina cinase (MLCK), levando ao aumento expressivo de fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20). Durante este processo, a MLC20 fosforilada interage com a α -actina resultando na contração do músculo liso. Além disso, agonistas α 1-AR causam contração desproporcional ao aumento concomitante e transitório da concentração intracelular de cálcio, indicando a existência de sensibilização ao cálcio decorrente da ação destes agonistas ⁽⁸⁾. Este efeito é mediado por proteínas que se ligam ao GTP, as quais recrutam outros sistemas intracelulares ^(9,10). O mecanismo mais importante de sensibilização ao cálcio durante a contração do músculo liso ocorre através da inibição da MLC fosfatase (MLCP), aumentando assim o grau de fosforilação da MLC20, ainda que na presença de atividade basal de MLCK.

A RhoA é uma proteína G de baixo peso molecular que apresenta-se ligada ao GTP (estado ativo) ou GDP (estado inativo), no qual encontra-se acoplada a uma proteína inibidora da dissociação de guanina (RhoGDI). Sabe-se que a atividade de proteínas G heterotriméricas estimuladas por agonistas que se ligam a receptores acoplados à G12/13 e Gq estimulam o aumento da ligação da RhoA ao GTP, causando assim sua ativação ⁽¹¹⁾. Uma vez ativa, a RhoA intensifica o grau de contração do músculo liso através de sua proteína alvo, Rho-cinase.

Esta, por sua vez, é uma serina/treonina cinase responsável por fosforilar a subunidade da MLCP que se liga à miosina (MYPT1), inibindo sua atividade e resultando no aumento da atividade da miosina e na promoção de contração celular ⁽¹⁰⁾.

Desta forma, o mecanismo de sensibilização ao cálcio mediado pelo sistema RhoA/Rhocinase contribui para a fase tônica da contração induzida por agonistas em músculo liso, causando maior grau de ativação da miosina, a qual tem papel relevante em algumas enfermidades, incluindo a disfunção erétil ^(12,13).

1.2.2. Mecanismos de relaxamento: Via NO-sGC-cGMP

Um vasto conjunto de evidências demonstra que o óxido nítrico (NO) é o componente central de um importante sistema de transdução de sinais que atuam no pênis para mediar a resposta erétil ^(6,14). O NO é constitutivamente produzido a partir da L-arginina pela ação das NO sintases (NOS), sendo liberado durante a neurotransmissão nitrérgica (ativação da nNOS) bem como do endotélio (ativação da eNOS) presente nos sinusóides ^(6,14). O NO se difunde para células musculares lisas adjacentes, causando ativação da guanilato ciclase solúvel, a qual converte GTP em GMPc. A elevação dos

níveis intracelulares de GMPc promove ativação de proteínas cinase específicas que fosforilam outras proteínas, ativam canais iônicos e levam à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa. O GMPc é hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim a resposta erétil.

Recentemente foram identificados estados distintos de oxidação da enzima guanilato ciclase solúvel ⁽¹⁵⁾. Através de ferramentas farmacológicas seletivas verificou-se que a guanilato ciclase solúvel existe em um estado não oxidado, estado este que permite a estimulação pelo óxido nítrico. O “inibidor” de guanilato ciclase solúvel ODQ, inibe seletivamente a estimulação da guanilato ciclase solúvel pelo óxido nítrico, visto que causa uma oxidação no grupo heme desta enzima, não permitindo a ligação do óxido nítrico a este grupo. Neste estado de oxidação, a guanilato ciclase solúvel não mais responde ao óxido nítrico, mas pode responder a estimuladores farmacológicos como o BAY-412272 ⁽¹⁶⁾.

1.3. *Crotalus durissus terrificus*

As cascavéis do gênero *Crotalus* compõem uma das ramificações da subfamília Crotalinae (família Viperidae, subordem Ophidia - Serpentes e ordem Squamata), que teve sua origem nas florestas da Serra Madre Ocidental, parte centro-norte do planalto mexicano. Após uma linhagem asiática atravessar para a América do Norte através do estreito de Bering, durante o final da época oligocena e início da miocena, há cerca de 23 milhões de anos ⁽¹⁷⁾, as cascavéis se dispersaram rumo a América do Sul originando cerca de 70 espécies e subespécies diferentes (<http://www.reptile-database.org>), que são

atualmente encontradas de forma descontínua, em habitats abertos, do sul do Canadá ao norte da Argentina^(17,18).

No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado por uma única espécie, a neotropical *Crotalus durissus*, sendo que, sete subespécies são reconhecidas no território^(17,18): *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. trigonicus*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*.

A subespécie sul-americana, *Crotalus durissus terrificus* é amplamente distribuída em território brasileiro, com exceção da floresta amazônica, mata atlântica e áreas litorâneas⁽¹⁷⁻²⁰⁾ e pode ser considerada um modelo adequado para estudos experimentais por ter sua biologia bem conhecida e ser de fácil manejo em cativeiro.

1.3.1. Morfologia e fisiologia do pênis das serpentes

Não obstante a importância funcional do órgão de cópula para a reprodução dos vertebrados amniotas, apenas mamíferos domésticos, primatas não-humanos e seres humanos tem o aparelho reprodutor descrito adequadamente. Todos os répteis têm fecundação interna, porém, os animais da ordem Squamata possuem uma característica singular: a presença de um par de órgãos copuladores denominados hemipênis⁽²¹⁻²³⁾. Essa estrutura da genitália masculina foi utilizada como uma característica sistemática pela primeira vez ainda no século XIX na tentativa de introduzir novas dimensões na classificação da subordem das serpentes⁽²²⁾.

Os hemipênis de cobras são órgãos membranosos tubulares emparelhados que se localizam na base da cauda e são separados dos tegumentos lateral e subcaudais por finas camadas de músculos superficiais e tecido conjuntivo⁽²²⁾.

Cada hemipênis é um órgão cilíndrico composto de duas camadas membranosas e eréteis, sendo que apenas um deles é inserido na cloaca da fêmea durante a copulação ⁽²³⁾. Quando retraído, a camada superficial é indiferenciada, contudo, a superfície interna que reveste o lúmen do órgão é atravessada por um sulco profundo bem definido e denominado sulco espermático. Situado entre a camada lisa e a camada sulcada, há um seio que se torna cheio de sangue no estado de ereção peniana. Este seio é dividido por uma série de projeções finas de tecido conjuntivo que se estendem ao longo do eixo longitudinal do órgão ligando as duas camadas. Essas projeções provavelmente funcionam para apoiar e unir as duas camadas, no processo de evaginação do órgão ⁽²²⁾.

Associado ao hemipênis há uma série de músculos especializados. Na região dorsal há um par de músculos propulsores que se estendem da base da cauda até a região posterior do hemipênis. Músculos retratores se inserem em cada hemipênis durante toda sua extensão, até a região apical ⁽²²⁾.

Apenas um órgão copulador é utilizado a cada vez, e geralmente os machos usam os hemipênis alternadamente entre cópulas distintas ⁽²³⁾. Para que ocorra a ereção, o hemipênis sofre ingurgitamento dos corpos cavernosos por sangue e linfa, além de contar com o auxílio da contração do músculo propulsor do pênis e o relaxamento do músculo retrator do pênis. O hemipênis que está em uso passa da cauda para o interior da cloaca e, na medida em que vai se tornando inflado, passa pela fenda da cloaca para ser projetar para o meio externo. Este processo é conhecido como evaginação do hemipênis. Quando em completa tumescência, o hemipênis exibe em sua superfície externa um elenco de estruturas relacionadas à cópula. Pode ser rugoso e apresentar

ornamentos como espinhos, franjas, cálices etc., que asseguram uma forte união quando o macho insere o hemipênis na cloaca da fêmea⁽²²⁾.

Durante a detumescência, que ocorre ao término da cópula, o músculo retrator do pênis se contrai e puxa o hemipênis de volta para o interior da cauda. Neste processo, o hemipênis é virado do avesso, de modo que a face externa, que exibe as estruturas relacionadas à cópula, torna-se interna, processo conhecido como invaginação do hemipênis⁽²²⁾.

1.4. Evolução adaptativa de resistência à tetrodotoxina em animais

A tetrodotoxina (TTX), uma neurotoxina de ocorrência natural envolvida em envenenamentos fatais, atua bloqueando seletivamente os canais de sódio voltagem dependentes (Na_v) de membranas excitáveis. Bloqueia o poro extracelular do canal e impede o influxo de íons de Sódio⁽²⁴⁾.

Foi isolada pela primeira vez a partir do baiacu, peixe ósseo da família Tetraodontidae também conhecido como fugu, e tem sido muito importante em estudos bioquímicos de canais de sódio, cálculo da densidade de canais em membranas

plasmáticas e na caracterização farmacológica (sensível/resistente a TTX) de diferentes isoformas destes canais⁽²⁵⁾. A terminação guanidina presente na estrutura (Fig. 1), em conjunto com os grupos hidroxilas, são partes essenciais para este bloqueio⁽²⁴⁾.

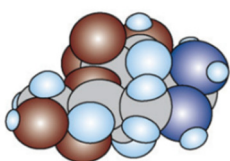
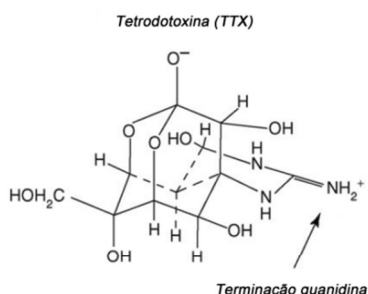


Figura 1: Estrutura molecular da TTX

Diferentes órgãos e células apresentam sensibilidades variadas à TTX. Canais de sódio cardíacos são menos sensíveis do que os canais de sódio presentes no cérebro e nos músculos lisos por exemplo. Adicionalmente, alguns cátions presentes no líquido extracelular podem também influenciar no processo de ligação da TTX ⁽²⁴⁾.

A resistência a esta toxina também foi observada e isto se dá, dentre outros fatores, pela presença de canais de sódio resistentes. Dois tipos de canal TTX-R (resistente) e TTX-S (sensível) possuem diferentes propriedades bioquímicas e biofísicas ⁽²⁴⁾.

Além de serem ativados e desativados em membranas com potencial mais positivo, a sensibilidade à toxina, a ativação do canal e as taxas de ativação são mais baixas e lentas em canais TTX-R quando comparadas aos canais TTX-S ⁽²⁴⁾.

Curiosamente, em um caso extremo ocorrido na América do norte, algumas populações de cobras (*Thamnophis sirtalis*), que se alimentam de tritões portadores de TTX, evoluíram para a resistência à TTX como forma de defesa à toxicidade da presa. No estudo, esta evolução foi relacionada a mutações nos canais de sódio Na_v ⁽²⁵⁾.

1.4.1. Distribuição filogenética da Tetrodotoxina

Além dos tetrodontídeos, a TTX é encontrada em outros organismos marinhos incluindo bactérias (*Vibrio*, *Pseudomonas* e *Nocardiopsis dassonvillei*), platelmintos (*Planocera spp.*), vermes (*Lineus spp.*), polvos (*Hapalochlaena maculosus*), caranguejos (*Carcinoscorpius spp.*) búzios predadores (*Charonia spp.*) e estrelas do mar (*Astropecten polyacanthus*). Também é encontrada em microrganismos de água doce e animais terrestres venenosos como salamandras (*Taricha granulosa* e *Cynops*

pyrrhogaster) e sapos (*Atelopus spp* e *Brachycephalus spp.*) ⁽²⁴⁻²⁶⁾. Esta ampla distribuição em diferentes linhas filogenéticas pode fornecer evidências de que a molécula e seus derivados se originam, na verdade, de microrganismos simbióticos ⁽²⁶⁾.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O corpo cavernoso é fundamental na promoção da ereção peniana em mamíferos e vem sendo estudado em humanos, animais de experimentação (rato, camundongo, porco, coelho) e animais domésticos. No caso dos répteis, mesmo sabendo que o coito das serpentes pode durar até mais de 24 horas, tanto a estrutura quanto a base farmacológica de funcionamento dos corpos cavernosos, têm sido amplamente negligenciadas.

Uma vez que na escala geológica os répteis são mais antigos que os mamíferos e que estes descendem diretamente de répteis Synapsida, a compreensão dos mecanismos de ereção nos répteis pode ajudar a melhor compreender a ereção em mamíferos, do ponto de vista funcional e, principalmente do evolutivo.

Sendo assim, como até o presente momento não existe nenhum estudo funcional caracterizando as principais vias responsáveis pelo processo de ereção nos répteis, iremos investigar se as vias farmacológicas mais comumente estudadas em corpo cavernoso isolado dos animais acima citados, tais como a do óxido nítrico e da Rhoquinase, respondem de maneira semelhante no hemipênis de répteis.

OBJETIVOS

Objetivo geral

1. Descrever os mecanismos de ereção em hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* a partir da compreensão da morfologia e farmacologia do órgão

Objetivos da investigação

- Investigar e descrever a morfologia do hemipênis
- Investigar a presença das enzimas relevantes ao fenômeno de ereção peniana
- Caracterizar os mecanismos farmacológicos relacionados ao relaxamento da musculatura lisa trabecular do hemipênis *in vitro*
- Curvas concentração resposta para avaliar a pertinência do sistema óxido nítrico (NO) - GMP cíclico (cGMP) – fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) na reatividade do corpo cavernoso de cobras cascavéis (hemipênis isolado);
- Curvas concentração resposta para investigação da presença de canais de sódio em corpo cavernoso isolado;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Microscópio de campo claro (Leica DM5000 B) conectado a uma câmera digital (Leica DFC360 FX, Leica, Alemanha). Banhos para órgão isolado (10 ml) suspensos entre transdutores isométricos e sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 6.0, ADInstruments, Colorado Springs, EUA). Estimulador Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA). Microscópio eletrônico de varredura EVO MA Zeiss 10. Sistema AdvanceTM para imunomarcção (Dako). Homoginizador Ultra-Turrax T25 (T-25; IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha).

2.2 Drogas utilizadas

Acetilcolina (ACh), N^ω nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), nitroprussiato de sódio (SNP), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), tetrodotoxina (TTX), L-citrulina e L-fenilefrina (PE) foram obtidas da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e L-[2,3,4,5- ³H]-arginina (atividade específica 2.0 TBq mmol⁻¹) foi fornecida pela Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido). Os compostos BAY 41-2272 e tadalafil foram fornecidos pela Pharma Research Centre, Bayer AG (Wuppertal, Alemanha) e pela BioLab Farmacêutica (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

As soluções estoque de ACh, SNP, L-NAME e PE foram preparadas em água deionizada e armazenadas em alíquotas, na temperatura de -20°C. BAY 41-2272, ODQ e tadalafil foram inicialmente preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0.3%.

2.3 Animais de experimentação

Todos os procedimentos experimentais utilizando cascavéis e/ou macacos (*Callithrix jacchus*) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP: 1655-1 e 2022-1, respectivamente) e foram realizados de acordo com os Princípios para Pesquisa Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA). O uso destes animais foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Sisbio: 18020-1 e 16951-1, respectivamente).

Os machos de *Crotalus durissus terrificus* (peso entre 400 – 750g) incluídos neste estudo foram obtidos no Serpentário do Centro de Estudos da Natureza da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil) enquanto os macacos *C. Jacchus* (peso entre 250 – 360g) foram fornecidos pelo Centro de Primatologia – FEEMA/CPRJ (Guapimirim, RJ, Brasil).

2.4 Microscopia de luz e imunohistoquímica

O hemipênis foi mecanicamente evertido pela injeção de formalina 10% na base da cauda e em seguida, retirado. Após um exame macroscópico, a região espiculada foi separada da região não-espiculada e foi cortada em fatias de 3 mm de espessura, as quais foram desidratadas, limpas com xileno e embebidas em parafina.

Seções transversais (4µm) foram cortadas e coradas com tricolor de Masson (para distinguir músculo liso de colágeno) ou imunomarcadas para eNOS, nNOS, sGC, PDE5 e actina de músculo liso. Três cortes de 4µm foram obtidos de cada bloco de parafina, colocados em lâminas silanizadas, desparafinizadas com xileno e reidratadas.

A atividade da peroxidase endógena foi paralizada incubando as lâminas com 3% H₂O₂ por 10 min. A recuperação antigênica foi feita pelo aquecimento das lâminas em tampão citrato (10 mM, pH 6,0) a 95 °C por 30 min. Como anticorpos primários, foram utilizados anti-eNOS (policlonal de coelho, diluído 1:200; Abcam), anti-nNOS (monoclonais de coelho, diluído 1:200; Abcam), anti-sGC (policlonal de coelho, diluído 1:400; Abcam), anti-PDE5 (policlonal de coelho, diluído 1:500; Abcam) e anti-actina de músculo liso (1A4 monoclonal, diluído 1:100, Dako).

As ligações antígenos-anticorpos primários foram detectadas através de um sistema AdvanceTM (Dako), e seguiu-se com a coloração com tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobenzidina (Sigma) e contra coloração com hematoxilina de Mayer. Todas as reações foram feitas utilizando controles adequados. Como controle positivo, tecido erétil do rato e como controle negativo, omissão do anticorpo primário.

Para estudos histológicos, as seções dos hemipênis foram coradas com hematoxilina-eosina e com tricolor de Masson. Os exames microscópicos e a documentação fotomicrográfica das sessões imunomarcadas foram feitos utilizando-se um microscópio de campo claro (Leica DM5000 B) conectado a uma câmera digital (Leica DFC360 FX, Leica, Alemanha).

2.5 Microscopia eletrônica de varredura

O hemipênis foi evertido mecanicamente, desta vez com glutaraldeído 2% e, em seguida, removido das cascavéis. Os tecidos foram fixados em glutaraldeído 2% (pH 7,2) por 24 horas e em seguida lavados três vezes (30 min cada) com cacodilato de sódio antes da imersão em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) por duas horas.

Os hemipênis foram posteriormente seccionados em três regiões, cada uma com a largura de 5 mm (ápice, base, meio). Após a fixação em OsO₄, as fatias de tecido foram lavadas novamente com cacodilato de sódio e em seguida com água destilada.

Os cortes de tecidos foram congelados diretamente em um coolstage a -20 ° C e examinadas com um EVO MA Zeiss 10, um microscópio eletrônico de varredura operado sob uma tensão de aceleração de 6 kV. As imagens foram armazenadas no formato Tiff (Targa Image File Format).

2.6 Análise por Western Blot

Os CCC's foram homogeneizados em tampão de quebra contendo Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM, SDS 1%, pirofosfato de sódio 19 mM e fluoreto de sódio 100 mM. O tecido lisado foi centrifugado a 10.000 g, e o sobrenadante foi coletado.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry [1]. Uma alíquota de 30 µg de proteína de cada amostra foi carregada por poço e resolvida por eletroforese em SDS-PAGE gel de poliacrilamida sob condições redutoras.

As proteínas foram posteriormente eletrotransferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Temecula, CA, EUA) que foram então bloqueadas com 5% de leite em solução tampão salina Tris contendo 0,05% Tween 20 e colocadas com anticorpos contra sGC (1:500; Abcam) e PDE5A (1:500; Abcam). Estes anticorpos reagem com guanilato ciclase β e com PDE5A de humanos, ratos e camundongos. Bandas imunorreativas foram detectadas através da incubação com um anticorpo secundário de coelho conjugado com peroxidase.

2.7 Atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) do hemipênis

O hemipênis foi removido e limpo em soro fisiológico e, em seguida, homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (100 mL) contendo L-citrulina (1 mM), leupeptina (10 µg/ml), inibidores de tripsina de soja (SBTI, 10 µg/mL), a aprotinina (2 µg/mL) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 1 mM). Os tecidos foram homogeneizados com um Ultra-Turrax T25 (T-25; IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) em 5 mL de solução tampão por grama de tecido (peso úmido), seguido por centrifugação a 12.000g por 10 min. A atividade da NOS foi medida no sobrenadante.

Resumidamente, alíquotas do sobrenadante (50 µl) foram incubadas em tampão, Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) modificado, contendo 91 mM CaCl₂, dinucleotídeo flavina adenina (FAD, 10 µM), NADPH (1 mM), calmodulina (1 µg/mL) e tetrabiopterin (BH₄, 100 µM), pré-equilibrado a 37°C por 5 min. Controles farmacológicos da atividade enzimática foram feitos em paralelo e consistiu de uma omissão de CaCl₂ e da adição de EGTA (1 mM) ou a adição de L-NAME (1 mM) ao meio de incubação. Alíquotas (10 µL) de [3H]-Larginina, foram adicionadas a cada amostra para dar ~200,000 dpm em um volume final de 100 µL.

Após incubação de 15 min a 37 ° C a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de tampão gelado (pH 5,4) contendo HEPES (20 mM), EGTA (1 mM) e EDTA (1 mM), seguido por agitação em vórtex. As amostras foram então colocadas em uma coluna de 0,6 mL de DOWEX 50wx8-200 (iônica: hidrogênio, malha seca 100-200; Sigma) pré-equilibrada com o tampão de parada. L-[³H]-citrulina foi eluído e a radioatividade foi determinada por contagem de cintilação líquida. Todas as medições foram feitas em duplicata. A concentração de proteínas foi determinada utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. A atividade foi expressa como pmol de L-

citrulline/mg de proteína/min. Os valores foram corrigidos pela quantidade de L-[³H]-citrulina encontrada na presença de L-NAME (1 mM).

2.8 Isolamento e montagem in vitro do corpo cavernoso de Crotalus (CCC)

As cobras foram sacrificadas com isoflurano seguido por quetamina - xilazina (70 e 10mg/kg, respectivamente). O corpo cavernoso de Crotalus (CCC) foi removido e imediatamente colocado em solução de Krebs-Henseleit, a 27°C, na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄.7H₂O, 1.17 e CaCl₂.2H₂O, 1.6.

Após a remoção desta estrutura, os corpos cavernosos foram isolados da porção espiculada. Foram obtidos 4 strips da porção não-espiculada e os tecidos foram montados em banhos para órgão isolado (10 ml) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%) e mantida à temperatura de 27°C (pH 7.4), sendo suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa.

As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 6.0, ADInstruments, Colorado Springs, EUA). Para estimulação elétrica dos nervos autonômicos (EFS), os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos paralelamente. A estimulação elétrica foi induzida através de um estimulador Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA), pela geração de pulsos de 1 ms de duração a 50 V em frequências variadas (4, 8 e 16 Hz). Um intervalo de 5 minutos foi dado entre cada estímulo.

2.9 Corpo cavernoso de *Callithrix jacchus* (sagui) (CC)

Os animais foram sacrificados com isoflurano seguido por quetamina - xilazina (110 e 9mg/kg, respectivamente). Após a penectomia, os corpos cavernosos (CC) foram dissecados em solução de Krebs, isolados e limpos dos tecidos adjacentes, e colocados também em banhos para órgão isolado (10 ml) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%) e mantida à temperatura de 37°C (pH 7.4), sendo suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa.

2.10 Protocolos experimentais

Para registrar o comportamento da tensão isométrica, o gancho de metal superior de cada tecido foi anexado a um transdutor de força (ADInstruments, MA, EUA) conectado a um sistema de aquisição de dados PowerLab-30/04 (Software Gráfico, versão 7.0; ADInstruments, Colorado Springs , CO, EUA). A tensão de repouso foi ajustado para cinco mN no início dos experimentos. Todos os strips foram estabilizados durante 60 minutos, tempo durante o qual a solução que o banho foi trocada a cada 15 min e a tensão de referência foi reajustada quando necessário.

Após o equilíbrio, curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (ACh; 0,01-100 μ M), nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01-30 μ M), BAY 41-2272 (um ativador da guanilato ciclase solúvel; 0,01-10 μ M) e tadalafil (um inibidor PDE5; 0,01-10 μ M) foram obtidas na ausência (controle - CTL) e presença de inibidores da NOS ou sGC, L-NAME (100 μ M) e ODQ (10 μ M), respectivamente, no CCC isolado pré-contráídos com PE (3 μ M).

Nesses experimentos, os inibidores foram incubados por 30 minutos antes do início das curvas concentração-resposta aos agonistas acima mencionados.

CCC e CC de sagui também foram utilizados na estimulação elétrica (EFS).

Dois eletrodos de platina paralelos foram colocados em ambos os lados de cada strip. O estímulo foi realizado a 80 V durante 10 s, 4, 8 e 16 Hz em pulsos de onda quadrada (largura de pulso de 0,5 ms; delay de 0,2 ms), utilizando um estimulador Grass S88 (Astro-Med, Parque Industrial, em Rhode Island, EUA) em tecidos pré-contráído com PE (3 μ M) na ausência (controle) e presença de L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M, somente CCC) e do bloqueador de canais de sódio, Tetrodotoxina (TTX, 1 μ M).

Guanetidina (30 μ M) e atropina (10 μ M) foram adicionadas ao banho no início dos experimentos de EFS para bloquear a resposta adrenérgica e colinérgica, respectivamente.

Contrações noradrenérgicas induzidas por EFS (na ausência de guanetidina) foram também feitas em CCC e CC usando os mesmos parâmetros elétricos mencionados.

Experimentos de EFS foram também realizados em músculo esquelético isolado - músculo adutor profundo da mandíbula externa de cascavel. Resumidamente, este músculo foi imerso em um banho de órgãos 5 mL, contendo solução de Ringer a 27°C, continuamente aerada com uma mistura de 95% de CO₂ 02:05% e, em seguida, foi estimulado eletricamente (8V, 1 Hz, 0.2 ms) por meio de um eletrodo bipolar de platina conectado a um estimulador Grass. O resultado contrações musculares isométricas foram registradas através de um transdutor de deslocamento. O sistema foi estabilizado por 20 minutos antes da adição de TTX (100 nM).

2.11 Análise de dados

Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM do número dos animais utilizados. O grau de relaxamento hemipeniano foi expresso como uma percentagem da pré-contracção induzida por fenilefrina (3 μ M) imediatamente antes da EFS e exposição a outros agentes (ACh, SNP, BAY 41-2272, tadalafil). A amplitude (percentual de relaxamento) e duração (tempo para 50% de relaxamento ou a contracção de 50%) foram calculadas para os experimentos com o EFS.

Análise de regressão não linear foi utilizada para determinar o pEC₅₀ com a restrição de que $\Phi = 0$. Todos os dados de concentração-resposta foram ajustados a uma função logística da forma: $E = E_{\max}/([1 + (10^c/10^x)^n] + \Phi)$, onde E é a resposta acima da basal, E_{max} é a resposta máxima obtida com ACh, SNP, BAY 41-2272 ou tadalafil, c é o logaritmo da EC₅₀ (concentração da droga que produz metade da resposta máxima), x é o logaritmo da concentração da droga, n é um parâmetro de ajuste de curvas exponenciais que define a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência das drogas acrescentadas. Todas as análises foram feitas utilizando o programa Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

2.12 Análise estatística

A significância estatística da diferença entre as médias foi determinada pelo teste t de Student para observações não pareadas. Os valores médios dos vários grupos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo método de Bonferroni como um teste post-hoc. Em todos os casos, $p < 0,05$ de significância.

3. RESULTADOS

3.1 Análise microscópica do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus*

O hemipênis evertido (Figura 2a) é formado por dois corpos cavernosos (Figura 02b – CE e CI) grosseiramente cilíndricos e concêntricos, constituídos por músculo liso e tecido conjuntivo. Células poligonais do epitelial pavimentoso de revestimento são observadas na superfície do hemipênis.

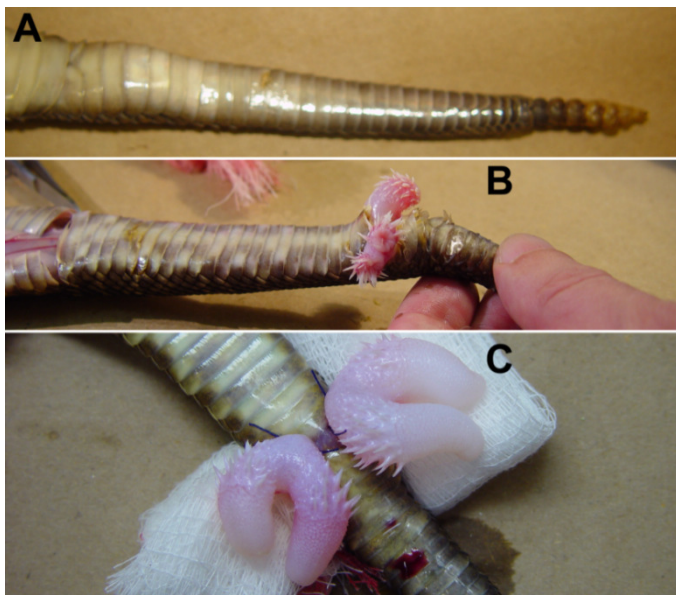


Figura 2a: Processo de eversão do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus*. A – Região caudal de *Crotalus d. terrificus*. B – Hemipênis em processo de intumescência parcial. C – Par de hemipênis totalmente evertido.

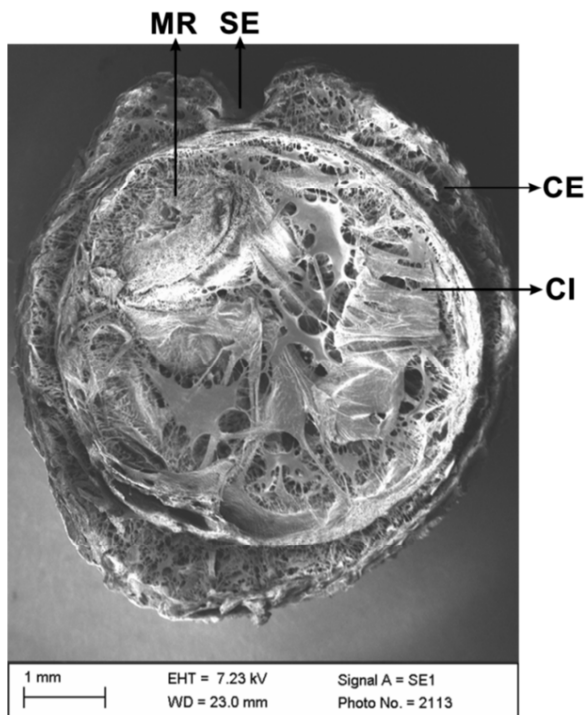


Figura 2b: *Crotalus durissus terrificus*, MEV da região do ápice do hemipênis. SE – sulco espermático; CE – cilindro externo; CI – cilindro interno; MR – músculo retrator magno do hemipênis.

Subjacente ao tecido epitelial e envolvendo o corpo cavernoso externo,

observa-se a túnica albugínea (Fig.3 – TA), formada de tecido conjuntivo frouxamente organizado. A túnica albugínea é interrompida por um sistema irregular de pequenas lacunas que mantêm comunicação uns com os outros e com canículos encontrados na região do tronco do hemipênis (Fig.3 - LA). Estes canálculos correm paralelamente aos espinhos que ornamentam o hemipênis.

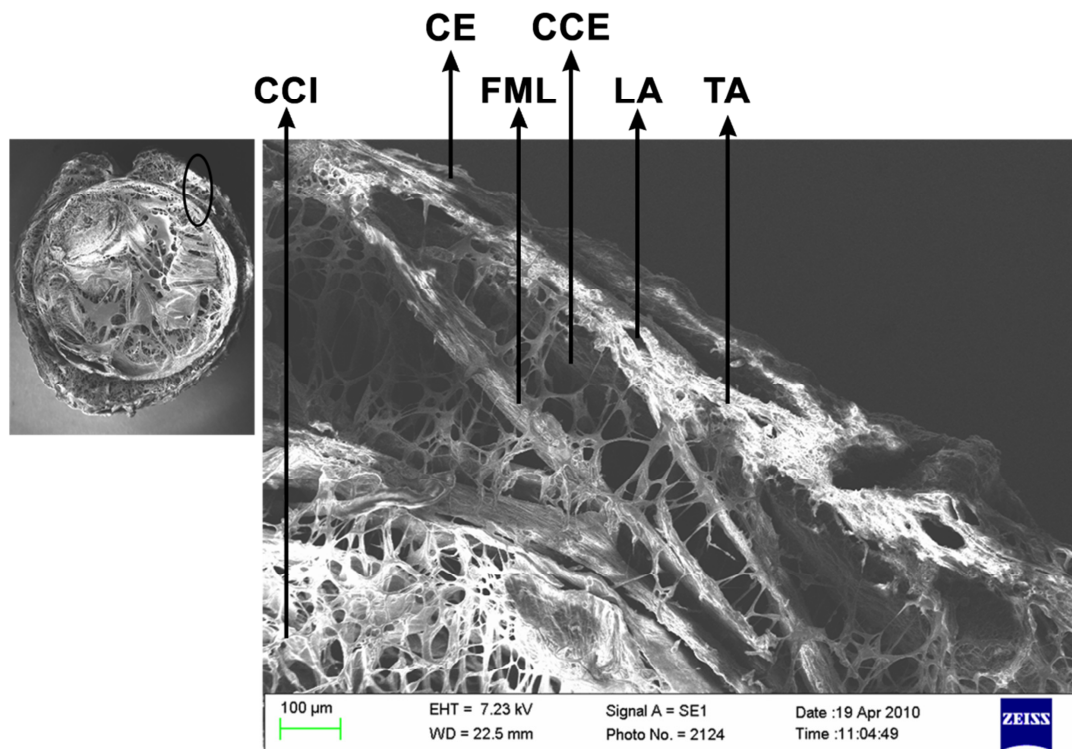


Figura 3: *Crotalus durissus terrificus*, MEV da região do ápice do hemipênis.

CCI – corpo cavernoso interno; CE – cilindro externo; FML – feixe de músculo liso; CCE – corpo cavernoso externo; LA – lacunas; TA – túnica albugínea.

O corpo cavernoso externo torna-se mais afilado no sentido cranial. Ele está envolto, abaixo da túnica albugínea, por uma parede circular de músculo liso entremeado com tecido conjuntivo. A parede circular interna, compartilhada pelos corpos cavernosos apresenta arquitetura tecidual semelhante à parede externa. Uma

trama de tecido conjuntivo e feixes de músculo liso dispostos radialmente estendem-se entre as paredes musculares do corpo cavernoso externo. Os feixes musculares e a trama de tecido conjuntivo vão se tornando mais escassos no sentido caudal.

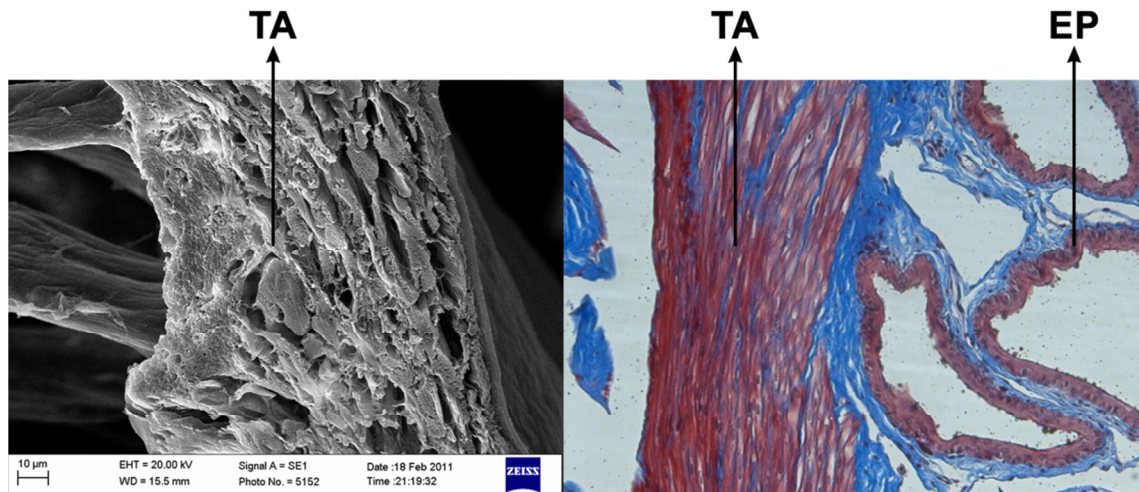


Figura 4: Região do capítulo do hemipênis – parede do corpo cavernoso externo e túnica albugínea – TA – compostas por músculo liso e tecido conjuntivo; EP – epitélio estratificado pavimentoso.

O corpo cavernoso interno alarga-se no sentido cranial e é atravessado ao longo de todo seu comprimento pelo músculo retractor magno do hemipênis (Fig. 5 – MR). Entre a face interna da parede muscular circular e o músculo retractor magno do hemipênis estende-se uma rede laminar de tecido conjuntivo que é mais conspícua na porção apical. Escassos feixes de músculo liso dispostos radialmente são observados somente na extremidade cranial do hemipênis.

O músculo retractor magno entra no hemipênis centralmente na região do pedúnculo. Ele torna-se bifurcado para acompanhar a bifurcação do próprio pênis. Cada ramo termina na extremidade cranial do lobo peniano ipsilateral (Fig. 5 – MR). O músculo retractor magno, formado por tecido muscular esquelético, é atravessado

centralmente em todo seu comprimento por um sinusóide estreito constituído por uma fina camada de músculo liso forrado de endotélio (Figs. 5 – SP). Sinusóides perpendiculares se comunicam com o sinusóide central e recebem ramos da artéria caudal que entram no músculo retractor magno caudalmente.

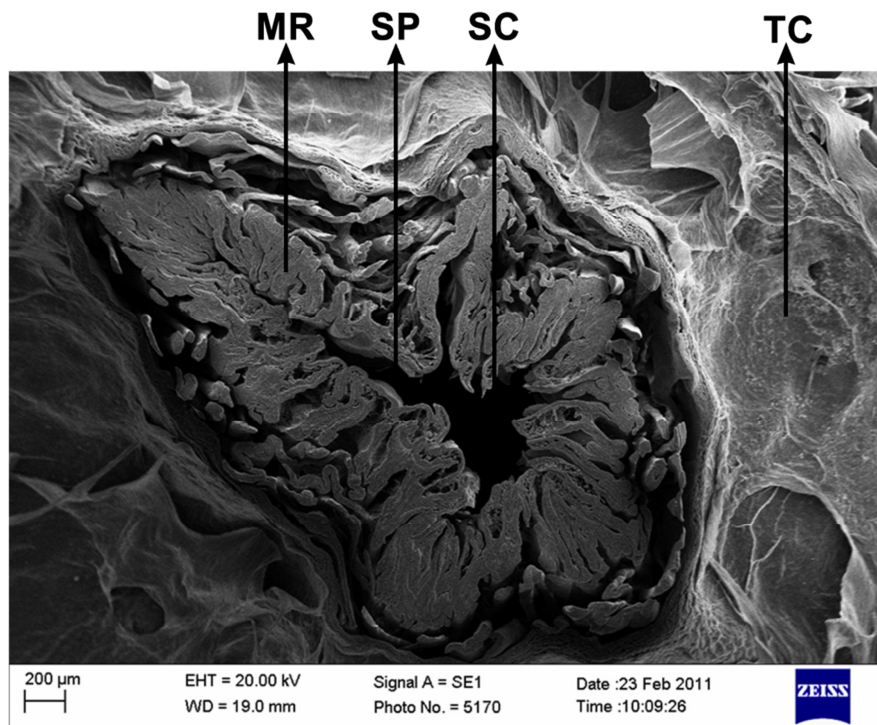


Figura 5: Corte transversal da região do corpo cavernoso interno exibindo: MR – músculo retractor; SP – sinusoide perpendiculares; SC – sinusoide central; TC – tecido conjuntivo.

3.2 Caracterização molecular, bioquímica e imunohistoquímica da via NO-cGMP-PDE5

3.2.1 Caracterização imunohistoquímica das enzimas NOS, sGC e PDE5

A imunomarcagem detectou eNOS e nNOS em estruturas trabeculares do CCC (Figuras 6a-b). O anticorpo para eNOS marcou especificamente o endotélio vascular

arteriolar [A] e sinusoidal [S], enquanto o anticorpo para nNOS reagiu de maneira menos específica com estruturas neurais e endotélio sinusoidal/arteriolar.

Figura 6c-d mostram coloração de sGC e PDE5 no músculo liso trabecular. A presença de fibras musculares lisas no tecido trabecular foi confirmada pela marcação para actina- α (Fig. 6e). Figura 6f 1-4 mostra coloração para eNOS, nNOS sGC e PDE5A no corpo cavernoso de camundongo, como controle positivo. Nenhuma imunorreatividade foi observada em CCC quando os anticorpos primários foram omitidos (Figura 6f-5).

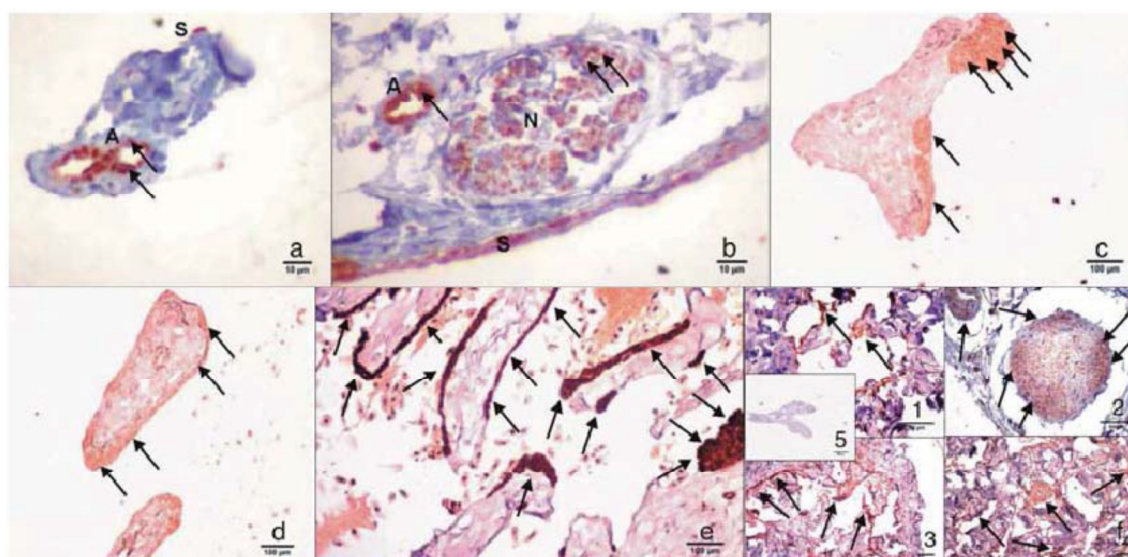


Figura 6: Imunorreatividade (setas) de a. eNOS, b. nNOS (imunoperoxidase, aumento de 400X), c. SGC, d. PDE5 e e. actina de músculo liso (imunoperoxidase, aumento de 200X) em corpo cavernoso de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A=arteríola, N=nervo, S=endotélio sinusoidal. Pannel f. 1, 2, 3 e 4, mostram imunorreatividade para eNOS, nNOS, sGC e PDE5A, respectivamente, no corpo cavernoso de camundongo, e 5 é um controle negativo, obtido pela omissão do anticorpo primário. Observe a falta de imunorreatividade nas estruturas trabeculares do hemipênis.

3.2.2 Atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) em corpos cavernosos de *Crotalus*.

No CCC, a atividade total e atividade cálcio-dependente da NOS foi de $2,9 \pm 2,0$ e $1,8 \pm 1,2$ pmol L-cit/mg/min ($n = 3$), respectivamente

3.2.3 Expressão protéica de sGC e PDE5A

Análises por Western blot utilizando anticorpos específicos para sGC (Figura 7a) e PDE5A (Figura 7b) detectou bandas imunorreativas com as massas moleculares esperadas para essas proteínas (70 e 89 kDa, respectivamente).

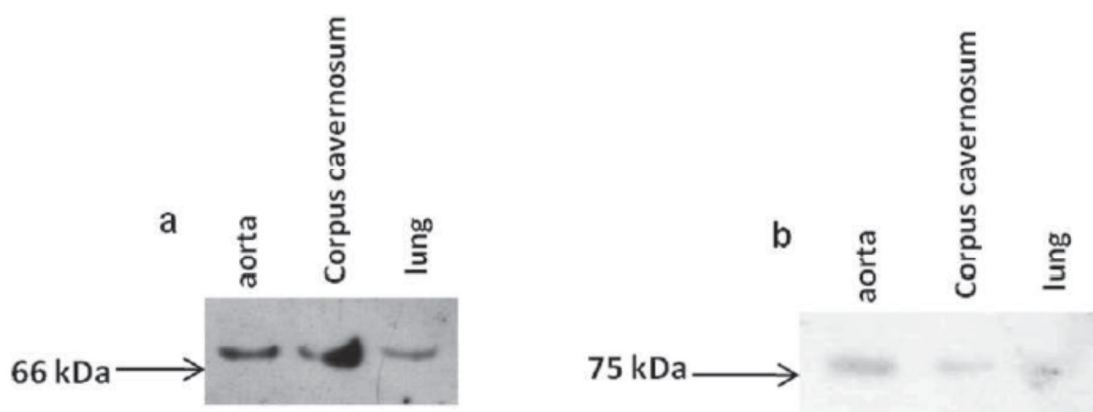


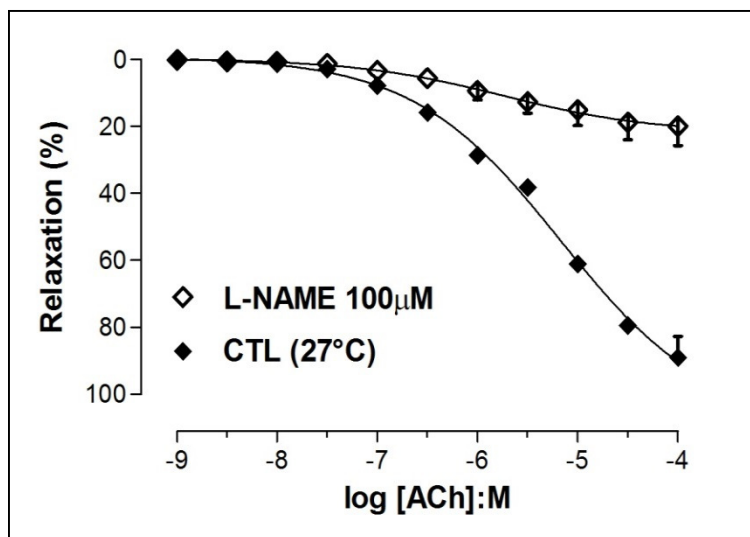
Figura 7: Western Blots representativos de sGC (A) e PDE5 (B) em aorta isolada, corpo cavernoso e pulmão de *Crotalus durissus terrificus*..

3.3 Caracterização farmacológica da via NO-cGMP-PDE5

3.3.1 Caracterização da via de sinalização NO-cGMP-PDE5 em corpo cavernoso isolado do hemipênis de *Crotalus* (CCC)

Fenilefrina ($0,01$ - 100 μ M, $pEC_{50} = 5,62 \pm 0,02$ μ M; $E_{max} = 16,42 \pm 0,27$ mN) produziu contração dependente da concentração do CCC. A adição de L-NAME (100 μ M) ou ODQ (10 μ M) aumentou o tônus basal (de $5,43 \pm 0,51$ para $13,90 \pm 0,71$ e

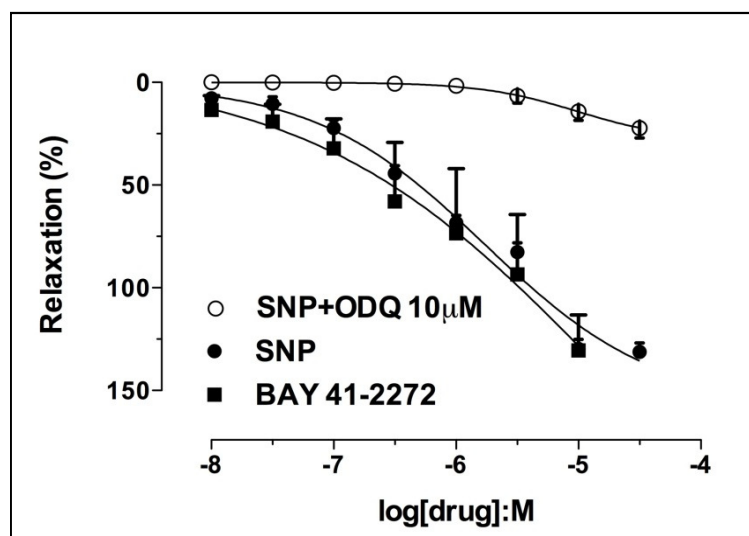
12,45 ± 0,51 mN, respectivamente). Em CCCs pré-contratados (PE 3 µM), acetilcolina (0,01-100 µM) promoveu relaxamento dependente da concentração com um pEC₅₀ = 5,16 ± 0,14 (n = 4), que foi sensivelmente reduzido por L-NAME (p < 0,001) (Figura 8).



*** P < 0,001 comparado com o grupo controle

Figura 8: Curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh, 0.01-100 µM) na ausência (controle - CTL) e presença de Nω-nitro-metil-éster (L-NAME, 100 µM).

SNP (0,01-30 µM) e BAY 41-2272 (0,0001-10 µM) causou relaxamento sustentada com valores de pEC₅₀ de 5,7 ± 0,17 (n = 4) e 5,84 ± 0,40 (n = 3-4), respectivamente (Figura 2); Tadalafil (0,01-10 µM) também causou relaxamento sustentado com um valor pEC₅₀ de 5,1 ± 0,08 (n = 4). Pré-tratamento com o inibidor de sGC, ODQ (10 µM), aboliu o relaxamento induzido pelo SNP (Figura 9).



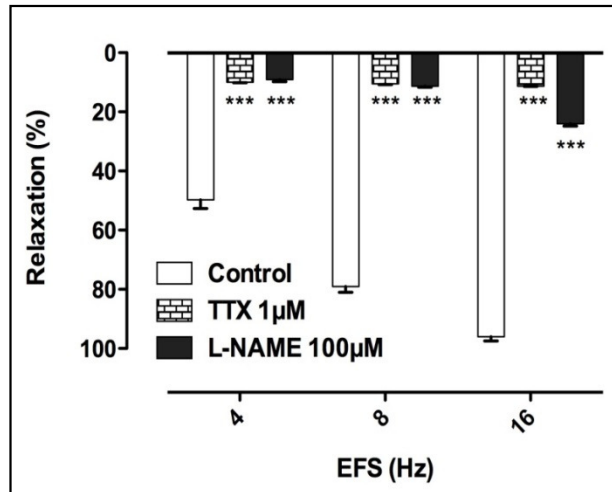
SNP – pEC50 = 5.7 ± 0.17 (n=4)
 BAY 41-2272 – pEC50 = 5.84 ± 0.40 (n=3-4)

Figura 9: O doador de óxido nítrico, SNP (0.01-30 μM) na ausência (controle - CTL) e presença do inibidor de sGC (ODQ, 10 μM) e ativador BAY 41-2272 (0.01-10 μM) em região não espiculada isolada do hemipenis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

3.4 Ausência de efeito de bloqueadores do canal de Na⁺ em relaxamentos e contrações geradas por estimulação elétrica (EFS).

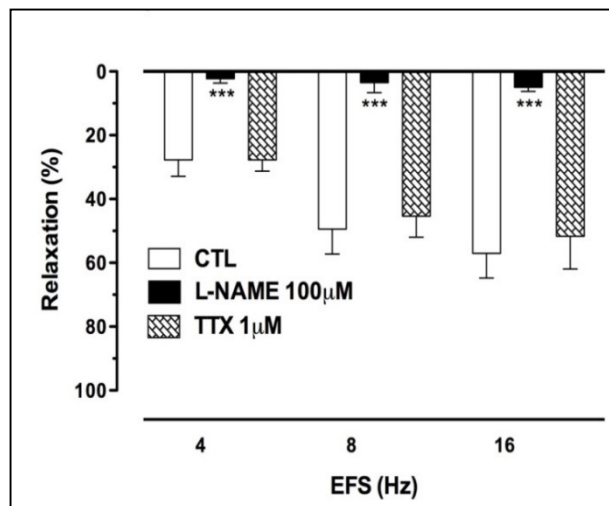
EFS (4, 8 e 16 Hz) causou relaxamento dependente de frequência em tecidos pré-contraídos que foi praticamente abolido pelo L-NAME (100 μM) em CCC (n = 4, figura 10, p <0,001) e CC de sagui (n = 3, figura 11, p <0,001).

A tetrodotoxina (1 μM, n = 4) não afetou o relaxamento promovido por EFS em CCC (Figura 10), enquanto que em CC de saguis, o relaxamento foi reduzido a um nível semelhante ao visto com L-NAME (p <0,001) (Figura 11).



*** P < 0,001 comparado com o grupo controle (n=3-6)

Figura 10: Relaxamento dependente da frequência induzido pela estimulação elétrica (EFS): a. a fração não espiculada do hemipenis isolado de *Crotalus durissus terrificus* na ausência (controle - CTL) e presença do inibidor da NOS (L-NAME, 100 µM), do inibidor de sGC (ODQ, 10 µM) e do bloqueador de Na⁺, tetrodotoxina (TTX, 1 µM). As colunas são a média ± S.E.M. de 3-6 cobras.



*** P < 0,001 comparado com o grupo controle (n=3-6)

Figura 11: Relaxamento dependente da frequência induzido pela estimulação elétrica (EFS): b. corpos cavernosos de sagui na ausência (controle) e presença de L-NAME (100 µM) e TTX (1 µM).

O tempo de relaxamento de 50% para a recuperação de 50% foi significativamente maior em CCC quando comparado a CC de sagui [214 $\pm$ 31s, 261 $\pm$ 60s e 392 $\pm$ 31s (CCC, n = 5) Vs 49 $\pm$ 3s, 79 $\pm$ 2 s e 95 $\pm$ 1s (CC de sagui, n = 3) para 4, 8 e 16 Hz, respectivamente] (Figura 12).

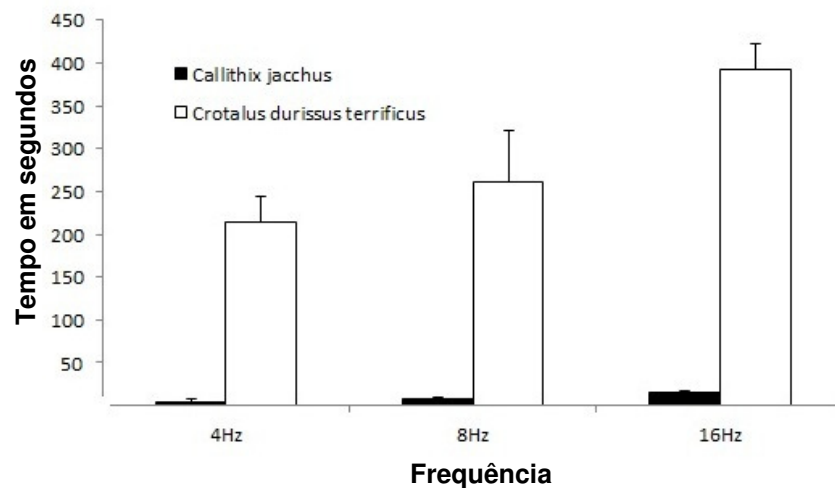
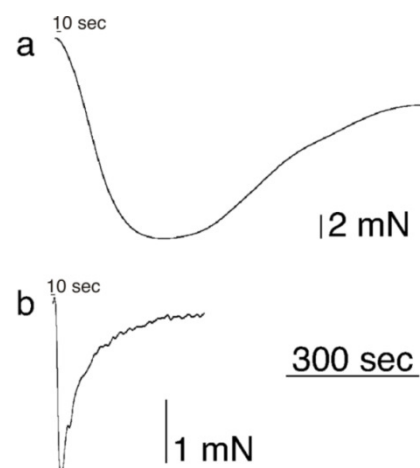


Figura 12: Tempo de relaxamento de 50% para a recuperação de 50% após EFS em corpos cavernosos de *Callithrix jacchus* e *Crotalus durissus terrificus*.

Quanto à resposta contrátil, o tempo de contração de 50% para a recuperação de 50% também foi maior em CCC comparado ao CC de sagui [116 s $\pm$ 8s e 13 $\pm$ 1s, 4-16 Hz, n = 3 cada].

Figura 13: Traçados representativos do relaxamento induzido por EFS (16 Hz) em a. tecidos do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* e b. corpos cavernosos de sagui. Trata-se de traçados representativos de seis cobras ou saguis.



3.5 Bloqueio, por tetrodotoxina, da contração de músculo esquelético de cascavel induzido por estimulação elétrica.

Tetrodotoxina (100 nM) praticamente aboliu (de $12,2 \pm 2,4$ para $2,5 \pm 0,5$ mN, $n = 3$) a amplitude da contração induzida pelo EFS.

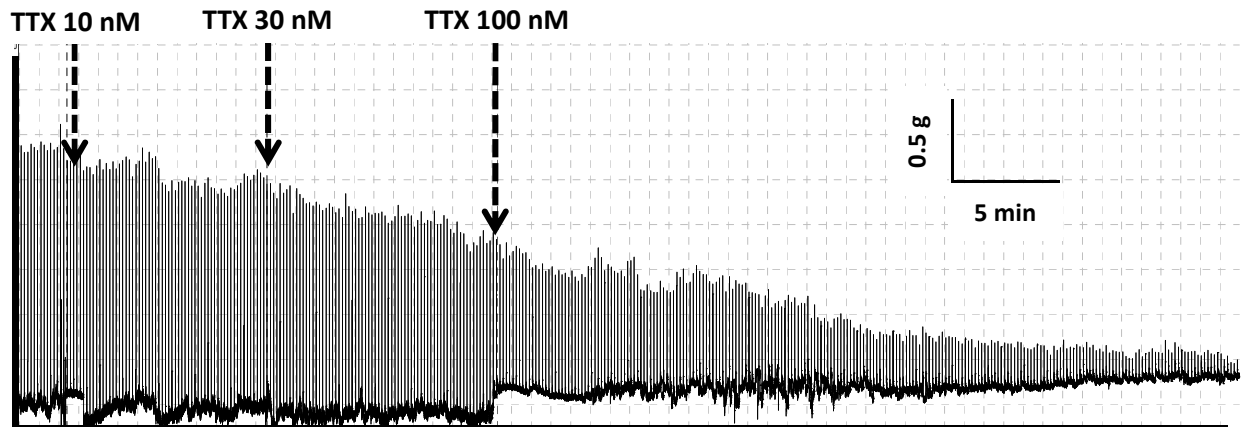


Figura 14: Traçados representativos do bloqueio da contração causado pela tetrodotoxina em músculo esquelético de cascavel.

4. DISCUSSÃO

Micrografia eletrônica de varredura de seções transversais do hemipênis confirmou a existência de trabéculas radiais da margem externa para a margem interna da camada do meio, semelhante a corpo cavernoso. Estas estruturas revelaram claramente a participação de fibras de músculo liso, entremeadas com feixes de colágeno, na estrutura das trabéculas. As imagens também revelaram semelhanças nas estruturas tridimensionais das camadas mais profundas e intermediárias, ou seja, a existência de dois corpos cavernosos funcionais, assim como no pênis de mamíferos, indicando, possivelmente, similaridades funcionais.

Este é o primeiro estudo a funcional e imunohistoquímico a explorar a via NO-cGMP-PDE5 em hemipênis isolado de serpentes (*Crotalus*). A acetilcolina libera NO do endotélio ativando receptores muscarínicos M3 ⁽²⁸⁾ enquanto que a EFS causa despolarização do nervo ^(29, 30). A constatação de que ambos os estímulos causam relaxamento do corpo cavernoso indica a presença de endotélio e terminais nitrérgicos neste tecido. O tadalafil, inibidor da PDE5, inibe a principal enzima responsável pela degradação do cGMP no músculo liso do corpo cavernoso.

O BAY 41-2272 estimula a porção heme da sGC, causando relaxamento da musculatura lisa. A constatação de que o tadalafil e o BAY 41-2272 provocaram relaxamento concentração-dependente do hemipênis, indica que esta via é altamente conservada entre espécies e contribui para o mecanismo de ereção em cascavéis.

Considerando que um pênis, aparentemente, estava ausente do ancestral hipotético das cobras ⁽³¹⁾, a aquisição desta via pode representar um exemplo de cooptação evolutiva ⁽³²⁾ da via NO-cGMP-PDE5.

Embora a conversão de L-arginina em L-citrulina tenha sido um indicativo para a presença de atividade da NOS neste tecido, as bandas imunorreativas detectadas em Western Blot diferem, em massa molecular, da eNOS e nNOS correspondente em mamíferos. Essas proteínas não foram clonadas em répteis e a demonstração destas enzimas por imunohistoquímica em vasos de vertebrados inferiores é equivocada e requer mais pesquisas ^(33, 34). Está atualmente sob investigação a possibilidade de que a NOS presente em répteis é de diferente massa molecular da sua relativa em mamíferos.

Em contraste com os corpos cavernosos de saguis, o relaxamento e a contração do CCC induzidos por EFS foram resistentes ao bloqueador de canal de Na⁺ TTX. A duração da contração e do relaxamento do CCC após a estimulação EFS foi muito maior do que a duração observada em saguis e outros mamíferos CC ⁽³⁵⁻⁴⁰⁾. Canais de Na⁺ TTXresistentes apresentam cinética de inativação mais lenta em relação aos canais TTXsensíveis ^(41,43).

Embora nossos resultados não nos permitem concluir que estes dois componentes estão relacionados, os achados aqui descritos podem fornecer uma base farmacológica para a duração extraordinária do coito em muitas espécies de serpentes. É improvável que a presença de espículas (ganchos) desempenha um papel essencial no longo coito, já que no Boidae (uma família de serpentes não-venenosas), o hemipênis não tem a parte espiculada ^(44,45) e mesmo assim, essas cobras tem relações sexuais muito longas.

Além disso, a análise histológica das mostraram que são compostos de uma matriz de colágeno altamente calcificada. Após a exposição prolongada à agentes descalcificantes (EDTA), uma matriz de colágeno quase acelular é detectada no núcleo dos espinhos. Foi constatado que esta matriz é pontuado por núcleos reticulados e, ocasionalmente, fibroblastos bem preservados, mas não células de músculo liso. Este

arranjo sugere ainda que o longo coito está associado à longa ereção. Está sob investigação se isto pode ser devido a não responsividade do músculo liso para contrair após o final do relaxamento nitrérgico ^(46,47). É interessante que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e algumas das suas toxinas causam ativação persistente do canais de Na⁺ por retardar ou bloquear a inativação desse canal ^(48,50). Além disso, esse veneno e uma de suas toxinas relaxam corpo cavernoso de coelho ^(51,52). O envenenamento por escorpião de crianças do sexo masculino está associado com priapismo ^(53,54). Estes resultados fornecem uma avaliação racional para que os inibidores da inativação do canal Na⁺ sejam tratados como uma possível ferramenta terapêutica para o tratamento da disfunção erétil.

Canais de Na⁺ TTX-resistentes foram previamente descritos na serpente *Thamnophis sirtalis*. Cogita-se que o aparecimento deste tipo de canal de Na⁺ é relacionado a coevolução, uma vez que algumas populações de salamandras do género *Taricha* possuem quantidades extremamente altas de TTX que fornecem uma defesa eficaz contra os predadores ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. No entanto, é pouco provável para explicar o aparecimento destes canais em CCC, uma vez que músculo esquelético de *Crotalus* é sensível a TTX.

Além disso, incompatibilidades fenotípicas em *T.sirtalis* e *Taricha granulosa* foram observadas em 1/3 dos locais de amostragem. Em todos os casos de incompatibilidade, os predadores estavam "à frente" da presa ⁽⁵⁸⁾, sugerindo que uma coevolução não é obrigatória. Nossos resultados indicam que o aparecimento dos canais de sódio TTXresistentes em serpentes pode estar mais relacionado com o aparecimento do hemipênis do que a co-evolução. Dados preliminares de nosso laboratório sugerem que esses canais não estão presentes em outros pênis de répteis, como o pênis da tartaruga *Chelonoides carbonaria*.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Os resultados aqui descritos mostram que a via NO-GMPcíclico-PDE5 é altamente conservada como um modulador do relaxamento de CC entre os vertebrados. Os canais de Na⁺ TTX-resistentes identificados em CCC podem ser responsáveis pela reação lenta da musculatura lisa observada após a estimulação do nervo e podem fornecer uma possível explicação para o coito tão prolongado em *Crotalus durissus terrificus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Anthony J. Edey, C. Jason Wilkins, Paul S. Sidhu CHAPTER 32 - Ultrasound of the penis. **Clinical Ultrasound (Third Edition)**, vol. 1, pages 621-631, 2011.
- (2) Giuseppe Cirino, Ferdinando Fusco, Ciro Imbimbo, Vincenzo Mirone. Pharmacology of erectile dysfunction in man. **Pharmacology & Therapeutics** vol. 111, pages 400–23, 2006.
- (3) B. P. Setchell and W. G. Breed. Chapter 17 - Anatomy, vasculature, innervation of the male reproductive tract. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**, vol. 1, pages 771-825. 2006.
- (4) Silva, F. H., Characterization of erectile dysfunction in obese mice fed a high-fat diet. 29/07/2011. 91f. Dissertação (Mestrado em farmacologia). **Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo. 2011.
- (5) Robert C. Dean, MD, Tom F. Lue, MD. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **Urol Clin N Am**, vol. 32, pages 379–395, 2005.
- (6) Andersson K. –E., Wagner G. Physiology of penile erection. **Physiol. Rev.**, vol. 75, pages 191-236, 1995.
- (7) Cellek S. Nitrgergic–noradrenergic interaction in penile erection: a new insight into erectile dysfunction. **Drugs Today**, vol. 36: 135–146, 2000.
- (8) Bradley, A. B.; Morgan, K. G. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. **The Journal of Physiology**, vol. 385, pages 437-448, 1987.
- (9) Karaki H., Ozaki O., Hori M., Mitsui-Sato M., Amano K., Harada K., Miyamoto S., Nakazawa H., Won K., Sato K. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. **Pharmacological reviews**, vol. 49, pages 157-230. 1997.

- (10) Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological reviews**, vol. 83(4), pages 1325-58, 2003.
- (11) Hirshman C. A, Emala C. W. Actin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq and Gi-2 activation of Rho. **The American Journal of Physiology**, vol. 277(3 Pt 1), pages L653-61, 1999.
- (12) Linder AE, Webb RC, Mills TM, Ying Z, Lewis RW, Teixeira CE. Rho-kinase and RGS-containing RhoGEFs as molecular targets for the treatment of erectile dysfunction. **Current Pharmaceutical design**, vol. 11(31), pages 4029-40, 2005.
- (13) Teixeira C. E., Jin L., Ying Z., Palmer T., Webb R. C. Ca²⁺ sensitization and the regulation of contractility in rat anococcygeus and retractor penis muscle. **Biochemical pharmacology**, vol. 69(10), pages 1483-92, 2005.
- (14) Lue T. F., Lee K. L. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Chinese Medical Journal**, vol. (4), pages 291-8, 2000.
- (15) Evgenov O. V., Pacher P., Schmidt P. M., Haskó G., Schmidt H. H., Stasch J. P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature reviews*. **Drug discovery**, vol. 5(9), pages 755-68, 2006.
- (16) Stasch J. P., Becker E. M., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowski K., Feurer A., Gerzer R., Minuth T., Perzborn E., Pleiss U., Schröder H., Schroeder W., Stahl E., Steinke W., Straub A., Schramm M. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Nature**, vol. 410(6825), pages 212-5, 2001.
- (17) Johara Boldrini-França, Carlos Corrêa-Netto, Marliete M.S. Silva, Renata S. Rodrigues, Pilar De La Torre, Alicia Pérez, Andreimar M. Soares, Russolina B. Zingali, Romildo A. Nogueira, Veridiana M. Rodrigues, Libia Sanz, Juan J. Calvete. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of proteomics**, vol. 73, pages 1758-76, 2010.

- (18) Wolfgang Wüster, Julia E. Ferguson, J . Adrian Qui Jada-Mascareñas, Catharine E. Pook, Maria Da Graça Salomão And Roger S. Thorpe. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, vol. 14, pages 1095–1108, 2005.
- (19) Ivo M.B. Francischetti, Maria E.C. Gombarovits, Jesus G. Valenzuela, Cecília R. Carlini, Jorge A. Guimarães. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, vol. 127, pages 23–36, 2000.
- (20) Marcelo L. Santoro, Maria C.C. Sousa-e-Silva, Luís R.C. Gonçalves, Selma M. Almeida-Santos, Diva F. Cardoso, Iara L. Laporta-Ferreira, Mitiko Saiki, Clóvis A. Peres, Ida S. Sano-Martins. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** vol. 122 pages 61–73, 1999.
- (21) M. Oisson and T. Madsen. “Sexual Selection and Sperm Competition in Reptiles”. **Sperm Competition and Sexual Selection**, pages 503-577, 1998.
- (22) Herndon G. Downling & Jay M. Savage. “A guide to the snake heimpenis: a survey of basic structure and systematic characteristics”. **Zoologica, Scientific Contributions of the New York Zoological Society**, vol. 45, Part I, 1960.
- (23) Richard R., Tokarz e Joseph B. Slowinski. “Alternation of hemipênis use as behavioural means of increasing sperm transfer in the lizard *Anolis sagrei*”. **Animal behavior**, vol. 40, pages 374-379, 1990.
- (24) V Suppiramaniam, E A Abdel-Rahman, M A Buabeid, and K Parameshwaran. Ion Channels. **Comprehensive Toxicology (Second Edition)**. vol. 13, pages 129-171, 2010.
- (25) Tuck Wah Soong¹ and Byrappa Venkatesh. Adaptive evol...ution of tetrodotoxina resistance in animals. **Trends in Genetics**. vol. 22, No.11, 2006.

- (26) Ahmed Al-Sabi, Jeff McArthur, Vitaly Ostroumov, Robert J. French. Matine toxins that target vol...tage-gated sodium channels. **Marine drugs**. vol. 4. Pages 157-192, 2006.
- (27) John N Wood. Sodium channels. **The Senses: A Comprehensive Reference**, vol. 5, pages 89-95, 2008.
- (28) Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, Moreland RB. Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. **Receptor**. vol. 5, pages 159–76, 1995.
- (29) Tong YC, Broderick G, Hypolite J, Levin RM. Correlations of purinergic, cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. **Pharmacology**. vol. 45, pages 241–9, 1992.
- (30) 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**, vol. 326, pages 90–4, 1992.
- (31) Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH, Wells KD. Herpetology. 2nd edition. **New Jersey: Prentice Hall**; 2001.
- (32) Gould S. The structure of evol...utionary theory. **Boston: Belknap Press**; 2002.
- (33) Donald JA, Broughton BR. Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. vol.142, pages 188–97, 2005.
- (34) Jennings BL, Donald JA. Mechanisms of nitric oxidemediated, neurogenic vasodilation in mesenteric resistance arteries of toad *Bufo marinus*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physio**. vol.298, pages R767–75, 2010.
- (35) Finberg JP, Levy S, Vardi Y. Inhibition of nerve stimulationinduced vasodilatation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol** vol.108. pages 1038-42, 1993.

- (36) Teixeira CE, Baracat JS, Zanesco A, Antunes E, De Nucci G. Atypical beta-adrenoceptor subtypes mediate relaxations of rabbit corpus cavernosum. **J Pharmacol Exp Ther.** vol. 309, pages 587–93, 2004.
- (37) Knispel HH, Goessl C, Beckmann R. Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation. **Urology.** vol 40, pages 471–6, 1992.
- (38) Hayashida H, Okamura T, Tomoyoshi T, Toda N. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. **J Urol.** vol. 155, pages 1122–7, 1996.
- (39) Okamura T, Ayajiki K, Toda N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. **Am J Physiol.** vol. 274(4 Pt 2):H1075–81, 1998.
- (40) Fernandes de Oliveira J, Teixeira CE, Arantes EC, de Nucci G, Antunes E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: Role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Urology.** vol 62, pages 581–8, 2003.
- (41) Roy ML, Narahashi T. Differential properties of tetrodotoxinsensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **J Neurosci.** vol 12, pages 2104–11, 1992.
- (42) Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron.** vol 28, pages 365–8, 2000.
- (43) Leffler A, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Cummins TR. Pharmacological properties of neuronal TTX-resistant sodium channels and the role of a critical serine pore residue. **Pflugers Arch.** vol 451, pages 454–63, 2005.
- (44) Vellard J. Morfologia del hemipenis y evolution de los ofidios. **Acta Zool Inst Miguel Lillo.** vol 3, pages 263–88, 1946.

- (45) Branch W. Hemipenis of Madagascan Boas *acrantophis* and *sanzinia*, with a review of hemipeneal morphology in the Boinae. **J Herpetol.** vol15, pages 91-9, 1981.
- (46) Kasakov L, Cellek S, Moncada S. Characterization of nitrenergic neurotransmission during short- and long-term electrical stimulation of the rabbit anococcygeus muscle. **Br J Pharmacol.** vol 115, pages 1149-54, 1995.
- (47) Cellek S, Moncada S. Nitrenergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: A comparison with other species. **Proc Natl Acad Sci USA.** vol 94, pages 8226-31, 1997.
- (48) Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur J Biochem.** vol 264, pages 287-300, 1999.
- (49) Gordon D, Philippe S, Gurevitz M, Zinn-Justin S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **J Toxicol Toxin Rev.** vol. 17, pages 132-59, 1998.
- (50) Jover E, Martin-Moutot N, Couraud F, Rochat H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry.** vol 19, pages 463-7, 1980.
- (51) Teixeira CE, Ifa DR, Corso G, Santagada V, Caliendo G, Antunes E, De Nucci G. Sequence and structure-activity relationship of a scorpion venom toxin with nitrenergic activity in rabbit corpus cavernosum. **FASEB J.** vol 17, pages 485-7, 2003.
- (52) Teixeira CE, Bento AC, Lopes-Martins RA, Teixeira SA, von Eickstedt V, Muscara MN, Arantes EC, Giglio JR, Antunes E, de Nucci G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrenergic nerve fibres. **Br J Pharmacol.** vol 123, pages 435-42, 1998.
- (53) Amitai Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. **Public Health Rev.** vol 26, pages 257-63, 1998.

- (54) Bawaskar HS. Diagnostic cardiac premonitory signs and symptoms of red scorpion sting. **Lancet**. Vol 1, pages 552-4, 1982.
- (55) Geffeney S, Brodie ED Jr, Ruben PC, Brodie ED 3rd. Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: TTX-resistant sodium channels. **Science**. Vol 297, pages 1336-9, 2002.
- (56) Geffeney SL, Fujimoto E, Brodie ED 3rd, Brodie ED Jr., Ruben PC. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. **Nature**, vol 434, pages 759-63, 2005.
- (57) Huey RB, Moody WJ. Neuroscience and evolution. Snake sodium channels resist TTX arrest. **Science**. vol 297, pages 1289-90, 2002.
- (58) Hanifin CT, Brodie ED. Phenotypic mismatches reveal escape from arms-race coevolution. **Plos Biol**. Vol 6, pages 471-82, 2008.

Role of a Novel Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel in the Nitroergic Relaxation of Corpus Cavernosum from the South American Rattlesnake *Crotalus Durissus Terrificus*

Rodrigo O. Capel, MSc,* Fabíola Z. Mônica, PhD,* Marcovan Porto, PhD,† Samuel Barillas, PhD,* Marcelo Nicolás Muscará, PhD,‡ Simone Aparecida Teixeira, PhD,‡ André Moreira Martins Arruda, MSc,* Lorenzo Pissinatti, MSc,* Alcides Pissinatti, PhD,§ André A. Schenka, MD, PhD,* Edson Antunes, PhD,* César Nahoum, MD,* José Carlos Cogo, PhD,¶ Marco Antonio de Oliveira, PhD,¶ and Gilberto De Nucci, MD, PhD*†

*Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil; †University Center IBMR, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ‡Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; §Veterinary Course, University Center of Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ, Brazil; ¶Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brazil

DOI: 10.1111/j.1743-6109.2011.02246.x

ABSTRACT

Introduction. Coitus in snakes may last up to 28 hours; however, the mechanisms involved are unknown.

Aim. To evaluate the relevance of the nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-phosphodiesterase type 5 (PDE5) system in snake corpus cavernosum reactivity.

Methods. Hemipenes were removed from anesthetized South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) and studied by light and scanning electronic microscopy. Isolated *Crotalus* corpora cavernosa (CCC) were dissected from the non-spiny region of the hemipenes, and tissue reactivity was assessed in organ baths.

Main Outcome Measures. Cumulative concentration-response curves were constructed for acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272), and tadalafil in CCC precontracted with phenylephrine. Relaxation induced by electrical field stimulation (EFS) was also done in the absence and presence of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μM), 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10 μM) and tetrodotoxin (TTX; 1 μM).

Results. The hemipenes consisted of two functionally concentric corpora cavernosa, one of them containing radiating bundles of smooth muscle fibers (confirmed by α-actin immunostaining). Endothelial and neural nitric oxide synthases were present in the endothelium and neural structures, respectively; whereas soluble guanylate cyclase and PDE5 were expressed in trabecular smooth muscle. ACh and SNP relaxed isolated CCC, with the relaxations being markedly reduced by L-NAME and ODQ, respectively. BAY 41-2272 and tadalafil caused sustained relaxations with potency (pEC₅₀) values of 5.84 ± 0.17 and 5.10 ± 0.08 (N = 3–4), respectively. In precontracted CCC, EFS caused frequency-dependent relaxations that lasted three times longer than those in mammalian CC. Although these relaxations were almost abolished by either L-NAME or ODQ, they were unaffected by TTX. In contrast, EFS-induced relaxations in marmoset CC were abolished by TTX.

Conclusions. Rattlesnake CC relaxation is mediated by the NO-cGMP-PDE5 pathway in a manner similar to mammals. The novel TTX-resistant Na channel identified here may be responsible for the slow response of smooth muscle following nerve stimulation and could explain the extraordinary duration of snake coitus. Capel RO, Mônica FZ, Porto M, Barillas S, Muscará MN, Teixeira SA, Arruda AMM, Pissinatti L, Pissinatti A, Schenka AA, Antunes E, Nahoum C, Cogo JC, de Oliveira MA, and De Nucci G. Role of a novel tetrodotoxin-resistant sodium channel in the nitroergic relaxation of corpus cavernosum from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *J Sex Med* **;**:**--**.

Key Words. cGMP; Nitric Oxide Synthase; Phosphodiesterase Type V; Snake Corpus Cavernosum; TTX-Resistant Sodium Channels

Quantification of cyproheptadine in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study

Gustavo Duarte Mendes^{a,b,c,*}, André Arruda^a, Lu Shi Chen^b, José Cássio de Almeida Magalhães^{a,c}, Khalid M Alkharfy^d and Gilberto De Nucci^{a,d}

ABSTRACT: A rapid, sensitive and specific method to quantify cyproheptadine in human plasma using amitriptyline as the internal standard (IS) is described. The analyte and the IS were extracted from plasma by liquid-liquid extraction using a diethyl-ether/dichloromethane (70/30; v/v) solvent. After removing and drying the organic phase, the extracts were reconstituted with a fixed volume of acetonitrile/water (50/50 v/v) + 0.1% of acetic acid. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Chromatography was performed isocratically using an Alltech Prevail C18 5 µm analytical column, (150 mm x 4.6 mm I.D.). The method had a chromatographic run time of 4 min and a linear calibration curve ranging from 0.05 to 10 ng/mL ($r^2 > 0.99$). The limit of quantification was 0.05 ng/mL. This HPLC/MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of cyproheptadine in two cyproheptadine + cobamamide (4 mg + 1 mg) tablet formulations (Cobactin® [cyproheptadine + cobamamide] test formulation supplied from Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda. and Cobavital® from Solvay Fama (standard reference formulation)). A single 4 mg + 1 mg [cyproheptadine + cobamamide] dose of each formulation was administered to healthy volunteers. The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 1-week washout interval. Since the 90% CI for C_{max} and AUCs ratios were all within the 80–125% bioequivalence limit proposed by the US Food and Drug Administration, it was concluded that the cyproheptadine test formulation (Cobactin®) is bioequivalent to the Cobavital® formulation for both the rate and the extent of absorption of cyproheptadine. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: cyproheptadine; healthy volunteer; plasma; pharmacokinetic; LC-MS/MS

Introduction

Cyproheptadine hydrochloride (CAS no. 969-33-5) is an antihistaminic and antiserotonergic agent with inhibitory activities for H-type calcium channels (Gunja *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2006; Feás *et al.*, 2009a, 2009b). It has anticholinergic and sedative effects. It is indicated for perennial allergic and vasomotor rhinitis, allergic conjunctivitis, mild and cold urticaria, and is a proven migraine prophylaxis, an appetite enhancer and, in adrenocorticotrophic hormone-dependent Cushing's syndrome, it normalizes cortisol indexes (Waternberg *et al.*, 1999). The collateral effects of cyproheptadine are drowsiness, coordination disturbances, increased appetite, weight gain, exacerbation of depression, dry mouth and urinary retention (Waternberg *et al.*, 1999). After an oral dose of 8 mg of cyproheptadine, the C_{max}, AUC and T_{max} for total cyproheptadine were 30 ng/mL, 206 ng h/mL and 4 h, respectively (Gunja *et al.*, 2004). Cyproheptadine has been determined in human plasma by CG-MS (Hasegawa *et al.*, 2006), in human serum by LC-MS (Gunja *et al.*, 2004), in animal urine by GLC (Hucker and Hutt, 1983), LC-MS-MS (Feás *et al.*, 2009a; Fente *et al.*, 2009) and

reversed-phase-HPLC (Kountourellis and Ebete, 1995), and in pharmaceutical syrup samples by LC-MS/MS (Feás *et al.*, 2009b).

Here we describe a fast, sensitive and selective method for measuring plasma cyproheptadine using liquid chromatography

* Correspondence to: G. D. Mendes, Department of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, Brazil. E-mail: gugamendes@terra.com.br

^a Department of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, Brazil

^b Galeno Research Unit, Campinas, Brazil

^c Faculty of Odontology, University Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), São Paulo, Brazil

^d Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

Abbreviations used: ANVISA, Brazilian National Sanitary Surveillance Agency; CAS, Chemical Abstract Service; FDA, Food and Drug Administration.