

Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
SISTEMA DE CALICREÍNA TISSULAR EM CORPO
CAVERNOSO DE COELHO: EFEITO DO VENENO
DE *Phoneutria nigriventer*

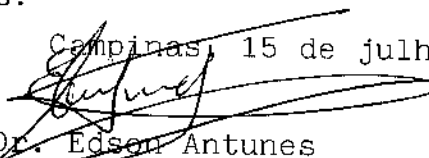
Orientador - Dr. Edson Antunes

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia

Campinas - 1994

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do Biólogo **Rodrigo Álvaro B. Lopes Martins**.

Campinas, 15 de julho de 1994


f. Dr. Edson Antunes
Orientador

M366c

22264/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
SISTEMA DE CALICREÍNA TISSULAR EM CORPO
CAVERNOSO DE COELHO: EFEITO DO VENENO
DE *Phoneutria nigriventer*

Orientador - Dr. Edson Antunes

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia

Campinas - 1994

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edson Antunes, pela orientação, incentivo, oportunidade e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Gilberto de Nucci, pela discussão do trabalho, pelas sugestões apresentadas, e pela oportunidade.

Aos amigos Marcelo Muscará, Antônio Carlos Bento, Renato Faro e Sócrates Penna, pela amizade e presença nos momentos mais difíceis.

À Maria das Dores Ponciano pela atenção, paciência e carinho.

Ao Dr. Claudio Sampaio e a Isabel, pela purificação da calicreína urinária de coelho, e pelo carinho e boa vontade quando da minha estadia na Escola Paulista de Medicina.

Ao Dr. James Burton pelas sugestões e por fornecer um novo inibidor seletivo de calicreína tissular (KIZD-06) utilizado neste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, pelo carinho, amizade e compreensão.

Ao Prof. Carlos Alberto Flores, pelas discussões, apoio e colaboração para o crescimento de todo o corpo discente.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, que me possibilitaram trilhar o caminho que me trouxe até este momento. Que estiveram sempre ao meu lado, apoiando-me em todas as horas, até mesmo nas mais despropositadas atitudes que possa ter tomado. A quem devo tudo nesta vida, e principalmente o que há de mais importante nela - a alegria e a perseverança de viver e conquistar.

Amo vocês, Dona Leila e Dr. Ronaldo.

Sem poder deixar de falar na minhas queridas irmã e sobrinha, Ana Cláudia e Marianinha, que tanto me fizeram exercitar as virtudes da fraternidade, amor, compreensão e até mesmo paternalismo. Amo Vocês.

À Simone, amor da minha vida, e que dispensa
qualquer comentário. Amo Você.

Ao Grande amigo e também orientador, Dr. Cesar R.D. Nahoum, sempre presente nas horas de aflição e conflitos, que com sabedoria deu-me as chaves de muitos enigmas que a vida me apresentou.

No tempo, nenhum conhecimento precede a experiência, todos começam por ela. No entanto, existem aqueles que não tem esta origem exclusiva, pois o conhecimento empírico é um composto daquilo que recebemos das impressões e daquilo que a nossa faculdade cognoscitiva lhes adiciona.

EMMANUEL KANT

ÍNDICE	
FOLHA DE ROSTO	02
AGRADECIMENTOS	03
DEDICATÓRIAS	04
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	12
1 - INTRODUÇÃO	
1.1- Calicreína	14
1.2 - Calicreína Tissular	15
1.3 - Calicreína Tissular no Trato Genital Humano	16
1.4 - Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	19
1.5 - Anatomia peniana de mamíferos	22
1.6 - Mecanismos fisiológicos do fenômeno de ereção peniana em mamíferos	23
1.7 - Calicreína Tissular e Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	25
1.8 - Objetivos	26
2 - MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 - Superfusão de Corpo Cavernoso em Cascata	27
2.2 - Diálise do Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	28
2.3- Purificação da Calicreína Tissular de Urina de Coelho	29
2.4- Purificação da Calicreína Plasmática de Coelho	30
2.5 - Análise Estatística	31
2.6 - Procedência das drogas	31

3 - RESULTADOS	33
3.1 - Envolvimento do Sistema de Caliceína Tecidual - Cininas na Resposta Relaxante evocada pelo Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> .	33
3.2 - Envolvimento do Óxido Nítrico no Relaxamento da Musculatura Lisa Caverosa Induzido pelo Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	35
4 -DISCUSSÃO	41
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6 - ABSTRACT	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do inibidor da enzima conversora de angiotensina (Captopril) sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por BK, PNV e GTN.

Figura 2 - Efeito do antagonista de receptores B₂ de bradicinina, HOE-140, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por BK, PNV, ACh e GTN.

Figura 3 - Efeito do inibidor de calicreína tissular, aprotinina, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos por PNV, PPK, BK e GTN.

Figura 4 - Efeito do novo inibidor seletivo de calicreína tissular, KIZD-06, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por PNV, ACh, RbUK e GTN.

Figura 5 - Efeito do L-NAME e da L-Arginina (e seus enantiômeros), sobre os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos por PNV, ACh e GTN.

RESUMO

O veneno de *Phoneutria nigriventer* causa formação de edema local em pele de coelho por um mecanismo que envolve a ativação do sistema de calicreína tissular. O veneno de *Phoneutria nigriventer* produz ainda ereções prolongadas em cães, coelhos, ratos e no homem. Visto que a calicreína tissular está envolvida no sistema reprodutor masculino, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do veneno de *Phoneutria nigriventer* sobre corpo cavernoso isolado de coelhos. Coelhos "New Zealand", machos, adultos (2-3 Kg) foram anestesiados e exsanguinados. Os pênis dos coelhos foram então retirados e os corpos cavernosos isolados e perfundidos em cascata (Vane, 1964). O veneno de *Phoneutria nigriventer* e demais agonistas foram administrados na forma de bolus; os antagonistas ou inibidores foram administrados continuamente por infusão. Veneno de *Phoneutria nigriventer* (3-100 μg), acetilcolina (0.1-100 nmol), bradicinina (1-3 nmol) e calicreína de pâncreas de porco (3-30 μg) induziram relaxamentos dose-dependentes da musculatura lisa cavernosa. O inibidor da síntese de EDRF N^ω -nitro L- arginina metil ester (10 μM), mas não seu enantiômero D-NAME (10 μM), aboliu completamente os relaxamentos induzidos pela acetilcolina, bradicinina e Veneno de *Phoneutria nigriventer* sem afetar o relaxamento induzido pelo gliceriltrinitrato. O efeito inibitório do L-NAME foi parcialmente revertido pela infusão de L-Arginina (300 μM), mas não de D-Arginina (300 μM). O inibidor de protease aprotinina (10 $\mu\text{g/ml}$), conhecido por inibir a síntese de bradicinina, aboliu os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa induzidos pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* e calicreína tissular. O inibidor de cininase, II captopril (1-10 μM), potencializou os relaxamentos induzidos pelo Veneno de *Phoneutria nigriventer*, bradicinina e calicreína tissular. O inibidor de calicreína tissular Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH₂ (KIZD-06, 1.3 μM) inibiu significativamente o relaxamento da musculatura

lisa cavernosa induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* sem afetar aqueles induzidos por GTN e ACh. O inibidor de calicreína plasmática obtido do feijão de soja (soybean trypsin inhibitor; 10 $\mu\text{g/ml}$) não afetou os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa induzidos pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, bradicinina, acetilcolina ou calicreína. O antagonista de receptores B₂ de bradicinina, HOE-140 (50nM) aboliu completamente os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* e bradicinina. Nossos resultados demonstram que o veneno de *Phoneutria nigriventer* ativa o sistema de calicreína tecidual levando à formação local de cininas e consequente liberação de EDRF (óxido nítrico) na musculatura lisa cavernosa de coelhos.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- CALICREÍNA

Calicreínas pertencem a um grupo de serino proteases encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. As calicreínas são divididas em dois grandes grupos: plasmáticas e tissulares (Fiedler, 1979; Movat, 1979). Os dois tipos diferem quanto ao peso molecular, ponto isoelétrico, especificidade de substrato, características imunológicas, tipo de cinina liberado e importância funcional (Bhoola et al, 1992). A calicreína plasmática é codificada por um único gene (Seidah et al, 1989) enquanto a calicreína tissular é codificada por uma família de genes com diferentes padrões de expressão genética específico para cada tecido (Qin et al, 1991). As calicreínas liberam peptídeos vasoativos (cininas), a partir de substratos endógenos (cininogênios), por ação enzimática (Müller-Esterl, 1989).

Os cininogênios são proteínas multifuncionais envolvidas em reações de cascata durante os processos de coagulação sanguínea e inflamação e, ainda atuam como inibidores protegendo células dos danos causados por cisteíno-proteases (Muller-Esterl, 1989). Em geral, a calicreína tissular forma calidina (Lys-bradicinina) a partir do cininogênio de baixo peso molecular e a calicreína plasmática forma a bradicinina a partir do cininogênio de alto peso molecular (Bhoola et al, 1992). Entretanto, a calicreína tissular é capaz de liberar cininas de ambos os tipos de cininogênios em experimentos *in vitro* (Girolami et al, 1986).

1.2 - CALICREÍNA TISSULAR

A calicreína tissular foi primeiramente denominada de calicreína glandular, devido às grandes quantidades da enzima presentes em glândulas exócrinas, como as salivares e pâncreas; entretanto, é também encontrada em testículos, próstata e rins.

A calicreína tissular é semelhante à tripsina em muitos aspectos, mas com uma alta especificidade para os sítios de clivagem de substrato polipeptídico. Sua principal função conhecida é a clivagem seletiva do cininogênio em duas ligações peptídicas, liberando um decapeptídeo vasoativo e espasmogênico (Lisil-bradicinina). A calicreína tissular é sintetizada sob a forma inativa de pró-enzima, sendo que sua etapa de ativação parece similar à de outras serino-proteases, como a quimiotripsina. O N-terminal Ile se liga ao Asp¹⁹⁴ (Kraut, 1977), e altera a estrutura tridimensional da proteína; dessa forma os sítios ativos são expostos, tornando-se acessíveis ao substrato. Portanto, pró-calicreína pode ser ativada por enzimas do tipo tripsina clivando Arg⁻¹ ou por enzimas que atuam no N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos com a Ile. A termolisina, uma metaloprotease obtida de bactérias, cliva o substrato no N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos, sendo cerca de 5 vezes mais potente que a tripsina em ativar a pró-calicreína urinária (Takada et al., 1985).

Apesar das etapas envolvidas na ativação da pró-calicreína tissular *in vitro* estarem bem caracterizadas, os processos intracelulares decorrentes de sua ativação permanecem indefinidos.

Durante as últimas três décadas, os sítios de síntese e armazenamento de calicreína tissular têm sido determinados em um grande número de tecidos pelo uso de técnicas tais como centrifugação diferencial, imunohistoquímica e hibridização.

Evidências claras de que a calicreína tissular é armazenada em organelas celulares foram somente obtidas na década de 60 (Bhoola & Ogle, 1966; Erdos et al. 1968). Com o advento das técnicas dos anticorpos específicos e hibridização *in situ*, a calicreína tissular foi localizada em diversos órgãos e tipos celulares tais como células β (Pinkus et al, 1983), células epiteliais da próstata (Schacetylcolinater et al, 1978; Kumamoto et al., 1989), glândulas da traquéia (Bhoola et al, 1989), mucosa nasal (Baumgarten et al, 1989) e outros. A descoberta recente da existência de calicreína tissular em neutrófilos, aliada à observação de que calicreína de alto peso molecular, pré-calicreína plasmática, e calicreína de baixo peso molecular aderem à superfície externa da membrana celular destas células, sugere a participação destas enzimas nos processos inflamatórios, especialmente no que se refere à diapedese de neutrófilos.

1.3 - CALICREÍNA TISSULAR NO TRATO GENITAL HUMANO

A iniciativa do estudo de calicreínas no trato genital partiu da identificação de uma potente cininogenase em vesículas seminais e próstata de cobaias. A enzima liberava um peptídeo com perfil farmacológico idêntico ao da bradicinina em preparações de plasma de diversas espécies de mamíferos (Bhoola et al., 1962).

As cininas são liberadas através de proteólise limitada por cininogenases do líquido seminal como a calicreína da próstata ou do acrossoma do espermatozóide.

A principal enzima inativadora de cininas presente no líquido seminal é a enzima conversora de angiotensina, também conhecida como cininase II (dipeptidil carboxipeptidase). A cininase II é inibida pelo captopril (Gross, 1981). Esta cininase II, dependente de androgênio, catalisa a conversão de angiotensina I a angiotensina II e inativa bradicinina pela liberação do C-terminal dipeptídico His-Leu e Phe-Arg. Em ratos, a maior atividade da enzima cininase II é observada nos testículos e epidídimo (Cushman & Cheung, 1971a,b; Hohlbrugger et al, 1982). Em homens, aproximadamente 70% da cininase II presente no líquido seminal é proveniente da próstata, onde está principalmente associada a estruturas macromoleculares identificadas como vesículas de membrana com diâmetro igual ou menor que 100 nm (Krassing et al, 1986). Entretanto, epidídimo e testículos também contém quantidades significativas da enzima (Krassnigg et al, 1989).

A importância das calicreínas e cininas na função reprodutiva começou a ser conhecida quando Schill e Haberland (1974) reportaram que a calicreína de pâncreas de porco estimulava a motilidade de espermatozoides humanos. A próstata foi reconhecida como a fonte mais provável da enzima (Fink et al, 1985), embora tenha sido também encontrada em testículos. Atualmente, é conhecido que em órgãos genitais humanos, a calicreína também se localiza em células de sertoli, células epiteliais do epidídimo e adenócitos da próstata (Saitoh et al, 1987; Kumamoto et al, 1989). A presença desta enzima em células de sertoli dos túbulos seminíferos sugere um papel funcional na espermatogênese, enquanto a localização no epidídimo parece estar

relacionada à maturação do esperma neste órgão. Entretanto, proteases prostáticas aumentam o fluxo sanguíneo testicular, aceleram a espermatogênese, promovem a maturação de fatores de crescimento do nervo e epiderme, causam liquefação de coágulos do líquido seminal, funções estas importantes na fisiologia da reprodução (Saitoh & Kumamoto, 1988; Clements et al, 1988).

Estudos multidisciplinares com grande número de pacientes com fertilidade reduzida mostraram que a administração sistêmica de calicreína pancreática foi capaz de aumentar a motilidade (pacientes com astenozoospermia) e o número de espermatozóides (pacientes com oligozoospermia). Acredita-se que este efeito ocorra por ação direta da calicreína tissular sobre o metabolismo do espermatozóide assim como por efeitos indiretos sobre a espermatogênese melhorando as funções das células de sertoli (Schill, 1977; Sato, 1980; Schroeder-Finckh et al, 1986; Saitoh et al, 1987).

Em condições clínicas, a calicreína pancreática pode ser administrada por via parenteral ou intramuscular (40 KU, três vezes por semana) ou, ainda, por via oral em forma de tabletes (600 KU por dia). O período de tratamento de três meses é significativamente mais efetivo do que tratamentos agudos, podendo ser estendido por até doze meses. Na administração oral, cerca de 3 a 5% da dose administrada é efetivamente absorvida (Fink et al, 1980).

Ainda não está claro se a produção de calicreína tissular no trato genital é dependente dos níveis de androgênio. Entretanto, é provável que isto ocorra visto que diversas proteases prostáticas são dependentes deste hormônio

(Schill et al, 1985), incluindo uma protease prostática canina identificada como da família das calicreínas (Lazure et al, 1984).

Apesar de ter sido encontrada em diversos sítios no trato genital masculino, e vir sendo intensamente estudada por diversos autores, vasta revisão bibliográfica não apresentou nenhum registro a respeito da identificação de calicreínas de qualquer tipo em corpo cavernoso.

1.4 - VENENO DE *Phoneutria nigriventer*

As aranhas do gênero *Phoneutria* são conhecidas desde a década de 20 como responsáveis pela maior parte dos acidentes de araneísmo no Brasil, principalmente na região sudeste. Duas espécies tem ocorrência significativa nesta região - *Phoneutria nigriventer* e *Phoneutria Keyserlingi*. Dentre estas duas espécies, a primeira representa 90% dos espécimes encontrados.

A aranha *Phoneutria nigriventer* tem tamanho médio de 33 mm e envergadura máxima observada de 150 mm. O tegumento é castanho escuro revestido de pelos que variam de marrom-amarelados a cinza escuros. A taxonomia do gênero *Phoneutria* tem sido baseada até agora nos elementos morfológicos, havendo, entretanto, ampla variação intra e inter-específica destes parâmetros (Eickstedt, 1979). Em *Phoneutria nigriventer*, o fator de diferenciação é o padrão de cor presente no abdômen, que consiste de um desenho formado por uma faixa clara mediana anterior ladeada por duas faixas mais estreitas. Estas faixas são seguidas por duas fileiras paralelas de manchas claras arredondadas, das quais partem linhas oblíquas de pontos claros em direção ao ventre.

O envenenamento causado por *Phoneutria nigriventer* foi primeiramente descrito por Brazil e Vellard (1925) que, em pesquisas posteriores, concluíram que o veneno é primariamente neurotóxico.

O principal sintoma do envenenamento causado por *Phoneutria nigriventer* em humanos é a dor local intensa que se irradia para os extremos subjacentes à picada. Pode provocar ainda espirros, lacrimejamento, perturbações visuais, sialorréia abundante, vômitos, evacuação intestinal, dispnéia, prostração, taquicardia, arritmias cardíacas, priapismos e morte. Estes sinais e sintomas são também observados no envenenamento experimental em ratos, cobaios e cães (Schenberg e Pereira-Lima, 1962). Do ponto de vista experimental, tem sido observado que o veneno de *Phoneutria nigriventer* contém neurotoxinas capazes de ativar canais de sódio dependentes de voltagem em preparações de nervo frênico diafragma de rato (Fontana and Vital-Brazil, 1985) causando um bloqueio neuro-muscular. Em aurículas isoladas de cobaio, o veneno de *Phoneutria nigriventer* também ativa canais de sódio, o que resulta na liberação de acetilcolina e noradrenalina. Isto determina o aparecimento de cronotropismo e inotropismo negativo e positivo (Vital-Brazil et al, 1988). Tais efeitos contribuem provavelmente para os distúrbios cardíacos observados no envenenamento. Este veneno contém ainda polipeptídeos capazes de produzir potenciais de ação repetitivos em nervo crural (Entwistle et al, 1982) e contrações dose-dependentes de músculo liso vascular de coelho (Antunes et al, 1990; Antunes et al., 1993; Marangoni et al, 1993; Bento et al, 1993). Estes resultados evidenciam a característica do veneno de induzir a liberação de neurotransmissores do sistema nervoso autonômico, assim como de estimulação nervosa de placa motora.

O priapismo é um importante efeito do envenenamento por *Phoneutria nigriventer* uma vez que se caracteriza por ereções prolongadas nas quais é constatada dor devido à duração da manutenção do estado de rigidez peniana, podendo levar a danos irreversíveis do tecido erétil, provocando perda da capacidade de cópula. Segundo Schenberg e Pereira-Lima (1962), estes eventos não são observados em animais sob efeito de anestesia. Este fato pode concorrer para uma possível ação sobre o sistema nervoso central no controle das ereções induzidas pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*. Por outro lado, uma vez que diversos anestésicos atuam via um bloqueio de canais de sódio, pode ser também levada em conta a hipótese de que esta não ocorrência de priapismos em animais anestesiados pode ser devido a um efeito desta natureza. Um fato que permanece para ser posteriormente estudado.

Um outro ponto passível de discussão seria um possível equívoco na utilização do termo priapismo para denominar as ereções prolongadas ocorrentes em animais, induzidas pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*. Isto porque é difícil constatar a presença de dor no animal, sendo esta a condição básica para aplicação do termo priapismo. No entanto, este termo será utilizado no decorrer deste trabalho já que foi originalmente proposto por Schenberg e Pereira-Lima (1962), e é aceito na literatura especializada.

Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela indução do estado de ereção prolongada, atingindo o priapismo, permanecem desconhecidos. No entanto, iremos discorrer brevemente à respeito da anatomia e dos mecanismos fisiológicos responsáveis pela indução de ereções penianas coitais em mamíferos.

1.5 - ANATOMIA PENIANA DE MAMÍFEROS

O pênis de mamíferos é, de modo geral, formado por dois corpos cavernosos e um esponjoso. O corpo esponjoso constitui o envoltório da uretra e a região da glândula. Os corpos cavernosos são envolvidos por um tecido fibroso resistente denominado túnica albugínea, e compreendem uma rede trabecular de capilares sinusoidais, tecido conjuntivo e nervos. Estes espaços lacunares, comunicantes entre si, são forrados em sua face luminal por células endoteliais garantindo um estreito relacionamento entre estas e o fluxo sanguíneo (Benson et al., 1980). O fluxo arterial deste tecido é proveniente das artérias cavernosas (direita e esquerda) e ramos terminais das artérias hipogástricas. A drenagem venosa é feita a partir de vênulas lacunares que drenam para vênulas do plexo sub-túnico, localizado entre o tecido erétil e a túnica albugínea. No terço distal do pênis, a partir deste plexo, veias emissárias cruzam a túnica albugínea e drenam para a veia dorsal profunda, por sua vez originada a partir de veias emissárias da glândula. A porção proximal do pênis (crura) é drenada pelas veias cavernosas crurais.

A inervação periférica do pênis consiste de nervos simpáticos do XI segmento torácico e II segmento lombar, e de nervos parassimpáticos e somáticos do II, III e IV segmentos espino-sacrais (McConnell & Benson, 1982). A inervação somática é realizada pelo nervo pudendo, composto de fibras aferentes das peles peniana e perineal, e por fibras eferentes que inervam a musculatura estriada do períneo.

1.6 - MECANISMOS FISIOLÓGICOS DO FENÔMENO DE EREÇÃO PENIANA EM MAMÍFEROS

As ereções penianas são desencadeadas por estímulos sensitivos locais dos órgãos genitais (ereções reflexogênicas) e/ou por estímulos psicogênicos de origem central (ereções psicogênicas). As reflexogênicas são iniciadas por estimulação dos receptores da pele e da glândula peniana, transmitidos pelo nervo dorsal do pênis e, finalmente, pelo nervo pudendo. As vias eferentes originam-se nos centros parassimpáticos sacrais atingindo os tecidos eréteis penianos através de fibras dos nervos pélvico e cavernosos. As ereções psicogênicas são mais complexas e menos compreendidas. Uma grande variedade de estímulos, incluindo visual, olfativo, gustativo, auditivo e tátil, promovem uma resposta erétil supra espinal. Assim, várias regiões do cérebro, incluindo o núcleo talâmico, o rinencéfalo e estruturas límbicas, estão envolvidas na modulação da ereção peniana psicogênica. Mecanismos eréteis psicogênicos e reflexogênicos agem, provavelmente, sinergicamente no controle da ereção.

O estado de flacidez peniano é mantido ativamente pela ação tônica de nervos simpáticos ou adrenérgicos. Durante este estado, a musculatura lisa trabecular dos corpos cavernosos e das artérias cavernosas e helicinais se mantém em contração permanente. Quando o bloqueio da atividade simpática se instala essas musculaturas relaxam (tumescência) permitindo o influxo arterial e, conseqüentemente, aumento progressivo da pressão sanguínea intracavernosa. No entanto, apenas o bloqueio da atividade adrenérgica não é, por si só, suficiente para que seja alcançado um estado de ereção peniana total. Os principais eventos responsáveis pelo estado de ereção total são o

relaxamento tanto da musculatura lisa cavernosa como das artérias helicinais resultando na expansão máxima dos espaços lacunares que terminam por comprimir os plexos venosos sub-albugíneos. Isto resulta em elevação da pressão sanguínea intracavernosa e dramática redução do efluxo venoso. Isto determina o equilíbrio funcional entre a pressão de perfusão das artérias cavernosas e a resistência ao efluxo sanguíneo pelas veias emissárias do plexo sub-albugíneo comprimido (mecanismo veno-corporal oclusivo). O estágio seguinte (detumescência peniana) é assegurado pela reativação do tônus adrenérgico (desbloqueio da atividade simpática; De Groot & Steers, 1988; Lue et al., 1986).

Como descrito acima, a ereção peniana é predominantemente mediada pelo sistema nervoso autonômico parassimpático. Porém, existem atualmente fortes evidências do envolvimento de mediadores não adrenérgicos-não colinérgicos (NANC) no processo da ereção peniana (Hedlund & Andersson, 1985; Saenz de Tejada et al., 1988). Em preparações de corpo cavernoso isolado de humanos foi demonstrado que estímulos elétricos evocam relaxamento deste tecido, mesmo na presença de antagonistas de receptores adrenérgicos e colinérgicos. Nos últimos anos, tem sido sugerido que o mediador NANC da ereção peniana seja representado essencialmente pelo fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; Furchgott & Zawadzki, 1980), quimicamente identificado como óxido nítrico (NO; Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987) ou um composto nitrosilado (Myers et al., 1990).

O EDRF (NO) é gerado nas células endoteliais a partir do nitrogênio presente no terminal guanidino do aminoácido arginina, em sua forma levógira. O processo de síntese de EDRF é inibido de maneira dose-dependente por alguns análogos da L-arginina, como o monometil-L-arginina (L-NMMA) e o

nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Esta inibição é parcialmente revertida pela L-arginina (mas não pela D-arginina) sugerindo que tais análogos inibem a formação de EDRF por competir com a L-arginina pelo sítio ativo da enzima responsável (NO-sintase).

Dentre os mediadores biológicos capazes de induzir liberação de EDRF, destacam-se, além da acetilcolina, a bradicinina (Cherry et al., 1982), substância P (Zawadzki et al., 1981), serotonina (Cocks & Angus, 1983), histamina (Toda, 1984) e outras.

1.7 CALICREÍNA TISSULAR E VENENO DE *PHONEUTRIA NIGRIVENTER*

Recentemente, demonstramos que o veneno de *Phoneutria nigriventer* aumenta a permeabilidade microvascular em pele de rato e coelho resultando na formação de edema local (Antunes et al, 1992). Este efeito ocorre através da geração local de cininas em decorrência da ativação do sistema de calicreína tissular (Marangoni et al, 1993). Estes resultados são baseados no fato de que a aprotinina (inibidor de proteases), mas não o inibidor de tripsina do feijão de soja (SBTI; inibidor de calicreína plasmática), reduz significativamente a exudação de plasma induzida pelo veneno. Além disso, o tratamento com antagonista de receptores B₂ de bradicinina (HOE-140) inibe de maneira significativa o aumento de permeabilidade vascular causado pelo veneno. Por outro lado, o tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina (captopril) potencia esta resposta, sugerindo que o efeito mencionado é mediado pelo sistema de calicreína tissular e formação de bradicinina. A fração presente no veneno, responsável pela ativação desse sistema foi recentemente purificada (Antunes et al, 1993).

1.8 - OBJETIVOS

Baseado nas observações de Schenberg e Pereira-Lima (1962) de que o veneno de *Phoneutria nigriventer* induz ereções penianas prolongadas em diversas espécies animais e, a partir de estudos prévios (Antunes et al, 1992, 1993; Marangoni et al, 1993) de que este veneno ativa o sistema de calicreína tissular, procuramos, neste trabalho, investigar o efeito do veneno de *Phoneutria nigriventer* sobre a musculatura lisa cavernosa isolada de coelhos e com isso contribuir para o entendimento do sistema de calicreína tissular em corpo cavernoso.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados coelhos machos New Zealand adultos (2-3 Kg) fornecidos pelo biotério central da UNICAMP.

Após anestesia com pentobarbital sódico (Sagatal®; 40 mg/Kg i.v.), o animal foi exsanguinado por canulação da artéria carótida. O pênis do coelho foi retirado na região de inserção na crura e imediatamente colocado em solução de Krebs. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado, removendo-se a camada de túnica albugínea. Usualmente, cada pênis de coelho fornecia apenas um segmento de corpo cavernoso dissecado (2-3 cm).

2.1 - SUPERFUSÃO DE CORPO CAVERNOSO EM CASCATA

Os segmentos de tecido cavernoso isolados foram mantidos em solução nutritiva de Krebs-Ringer até o momento do experimento, que nunca excedeu 1 hora após as cirurgias. Segmentos de 2-3 cm de corpo cavernoso foram montados em cascata (Vane, 1964) sob tensão de 2 g e perfundidos com solução de Krebs-Ringer aquecida a 37°C e aerada com 95% O₂ e 5% CO₂. Os tecidos foram ligados à alavancas auxotônicas conectadas a transdutores isotônicos (Harvard) para músculo liso. As respostas foram registradas em um polígrafo de 6 canais (Watanabe, WR 3101). Após estabilização dos tecidos (60-90 min), os mesmos foram continuamente infundidos (0.1ml/min) com indometacina (6 μM) com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas. O tônus dos tecidos foi induzido por infusão contínua (0.1 ml/min) de noradrenalina (3 μM). A sensibilidade dos transdutores foi então ajustada para produzir relaxamentos de magnitudes similares, usando-se o gliceriltrinitrato como padrão. A acetilcolina foi utilizada como controle para teste da integridade endotelial do tecido cavernoso .

Os agonistas foram administrados sob a forma de bolus (10 -100 μ l), enquanto os antagonistas foram administrados por infusão contínua (0.1 ml/min) por aproximadamente 20 minutos antes de injetar os agentes em estudo.

2.2 - DIÁLISE DO VENENO DE *Phoneutria nigriventer*

Visto que o veneno de *Phoneutria nigriventer* contém pequenas quantidades de histamina e serotonina, decidimos dialisar o veneno no sentido de excluir a participação dessas substâncias no ensaio biológico.

O veneno de *Phoneutria nigriventer* (3-4 ml de uma solução 0.1%) foi dialisado contra 2 litros de solução salina 0.9% por um período de 24 a 48 hs, a 4-6°C. A solução de diálise foi trocada quatro vezes durante este período. Foi retirada uma alíquota da solução de veneno antes de se iniciar a diálise para comparação subsequente com o material dialisado. O "cut off" da membrana de diálise foi de 10-12 KDa.

2.3 - PURIFICAÇÃO DA CALICREÍNA TISSULAR DE URINA DE COELHO.

Coelhos machos adultos New Zealand foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 40 mg/Kg, 1.v.). Após laparotomia, retirou-se a urina diretamente da bexiga. Esta foi acondicionada em frascos de vidro esterilizados e mantidas a -10°C até o momento de utilização do material.

O pool de 500 ml de urina proveniente de 25 coelhos foi primeiramente dialisada contra água destilada utilizando-se membrana de diálise com "cut off" de 20 Kda, a 4°C.

Alíquotas de 100 ml da urina dialisada foram então submetidas a uma cromatografia de troca iônica em DEAE - SEPHADEX G10 equilibrada com tampão Na_3PO_4 (0.05 M, pH=7.0) e condutividade 3 mMho. Como tampões de eluição foram utilizadas soluções de Na_3PO_4 (0.05 M/ NaCl 0.3M) pH=7.0 e Na_3PO_4 (0.05 M/ NaCl 0.6M) pH=7.0. Foram feitas dosagens de atividade do material não retido, eluído com 0.3M NaCl e 0.6M NaCl . A atividade da calicreína urinária de coelho só foi encontrada no material eluído com solução de NaCl 0.3M. O material eluído com solução de NaCl 0.3M foi dialisado, liofilizado e ressuspendido em solução salina 0.9% (10 ml), quando então foi submetido a cromatografia de afinidade em sistema FPLC-Superose 12. O material ativo que permaneceu ligado à coluna foi eluído, dialisado e novamente liofilizado.

2.4 - PURIFICAÇÃO DA CALICREÍNA PLASMÁTICA DE COELHO

Coelhos machos adultos New Zealand foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 40 mg/Kg, 1.v.). O sangue do coelho foi retirado por punção cardíaca e recolhido em tubos contendo polybrene (50 μ g/ml). O sangue foi centrifugado (3000 rpm, 15 min) e o plasma removido por aspiração, o qual foi mantido a -20°C até o momento do uso. O descongelamento do plasma foi realizado a 37°C na presença de benzamidina (10 mM), EDTA (10 mM) e polybrene (500 μ g/ml). O volume de plasma foi medido e filtrado em peneira plástica. Procedeu-se a diálise do material contra tampão fosfato de sódio 0.016M com NaCl 5 mM, azida sódica 0.02%, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM e polybrene 50 μ g/ml, pH = 7.8 e condutividade 1.6 mMho. Após a diálise, o plasma foi centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm para a precipitação de imunoglobulinas.

Foi então realizada uma cromatografia em DEAE-Sephadex, após a qual o material eluído foi novamente dialisado e, então, liofilizado. O conteúdo liofilizado foi ressuspendido e submetido à cromatografia de afinidade SBTI-Sepharose. A dosagem da atividade enzimática presente no material eluído foi realizada baseando-se na sua capacidade de hidrolisar o substrato sintético N-benzoyl - Pro-Phe-Arg-pNa (Motta et al, 1986; Sampaio et al, 1974).

2.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas relaxantes induzidas pela acetilcolina, bradicinina, calicreína de pâncreas de porco e veneno de *Phoneutria nigriventer* (médias \pm erro padrão das médias) foram calculadas tomando-se como 100 % o relaxamento máximo induzido pelo gliceriltrinitrato. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student pareado considerando-se $p < 0.05$ como significativo.

2.6 - PROCEDÊNCIA DO VENENO E DAS DROGAS

O veneno liofilizado de *Phoneutria nigriventer* foi fornecido pela seção de artrópodos peçonhentos do Instituto Butantan, São Paulo-SP. O veneno foi coletado das aranhas por estimulação elétrica e dessecado em um dessecador a vácuo contendo tabletes de hidróxido de sódio, à temperatura ambiente.

Acetilcolina, noradrenalina, indometacina, calicreína de pâncreas de porco, aprotinina e inibidor de tripsina extraído de soja (soybean trypsin inhibitor), N^{ω} -nitro L-arginina metil ester, L-arginina, e D-arginina foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O D-NAME foi adquirido da Bachem (Londres, GB). O captopril foi adquirido da Squibb Inc. (EUA). O gliceril trinitrato (ampolas contendo 1 mg/ml em solução isotônica) foi adquirido da Lipha Pharmaceuticals Ltd (West Drayton, Middlesex, Alemanha). O KIZD-06 (- Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH₂) é um inibidor de calicreína tissular recentemente sintetizado nos laboratório da Rational Drug Design da Boston

University Medical Center pelo Doutor James Burton. Tal composto possui seguintes características:

Sequência de aminoácidos - Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH₂; peso molecular - 737.7; Análise de aminoácidos - Pro 1.24, Phe 0.90, Aph n.d., Ser 0.86, Val 0.93, Gln 1.07; tempo de retenção em HPLC - 19.1 min em coluna de fase reversa ODS 1X25 cm.

A solução de Krebs (pH 7.4) contém a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄7H₂O 1.17, CaCl₂6H₂O 2.5, NaHCO₃ 25 e glicose 5.6.

3. RESULTADOS

O veneno de *Phoneutria nigriventer* (10 - 100 μg), acetilcolina (0.1 - 100 nmol), bradicinina (1-3 nmol), calicreína de pâncreas de porco (100-300 mU) e calicreína urinária de coelho (10 - 30 mU) induziram relaxamento dependente da dose nas preparações de corpo cavernoso de coelho, pré-contraídas pela noradrenalina (3 μM).

A calicreína plasmática de coelho não produziu qualquer efeito sobre as tiras de corpo cavernoso de coelho, pré-contraídas pela noradrenalina (3 μM ; figura 4).

3.1 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CALICREÍNA TISSULAR NA RESPOSTA RELAXANTE EVOCADA PELO VENENO DE *Phoneutria nigriventer*.

A infusão do inibidor de cininase II, captopril (1 μM), potenciou significativamente ($p < 0.01$) os relaxamentos induzidos pelo veneno (30 μg ; $40 \pm 4\%$ antes vs $62 \pm 7\%$ após; $n=9$), bradicinina (1nmol; $42 \pm 8\%$ antes vs 66 ± 9 durante a infusão; $n=8$) sem, no entanto, modificar os relaxamentos induzido pelo gliceriltrinitrato (1 nmol; Figura 1, $n=7$).

O antagonista específico de receptores de bradicinina B_2 , HOE-140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,DTic⁷,Oic⁸]-bradicinina, 50 nM), aboliu as respostas relaxantes induzidas pela bradicinina e veneno de *Phoneutria nigriventer*, sem afetar os relaxamentos induzidos pela acetilcolina ($76 \pm 6\%$ antes e 74 ± 6 durante a infusão; $n=6$) e gliceriltrinitrato (Figura 2, $n=6$). Por outro lado, o antagonista de receptores de bradicinina B_1 , [Leu⁹]des Arg¹⁰ KD (0.5 μM) não apresentou

efeito significativo sobre os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa induzidos pelo veneno, bradicinina ($45 \pm 12\%$ e $55 \pm 16\%$ antes versus 49 ± 9 e 59 ± 20 respectivamente; $n=6$) Resultados semelhantes foram obtidos com a caliceína de pâncreas de porco, acetilcolina e gliceriltrinitrato..

A infusão do inibidor de protease, aprotinina ($10 \mu\text{g/ml}$), conhecido por inibir a síntese de bradicinina, aboliu o relaxamento induzido pelo veneno e pela caliceína de pâncreas de porco (100 mU). O relaxamento evocado pela bradicinina (0.3 nmol) não foi modificado durante a infusão de aprotinina ($47 \pm 7\%$ antes e 49 ± 9 após); resultado similar foi observado para o gliceriltrinitrato (2.2 nmol ; Figura 3; $n=4$).

O inibidor específico de caliceína tissular KIZD-06 (- Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH₂; $1.3 \mu\text{M}$) aboliu os relaxamentos induzidos pelo veneno ($10 \mu\text{g}$) e pela caliceína urinária de coelho (10 mU) sem, no entanto, afetar o relaxamento induzido pela acetilcolina ($90 \pm 9\%$ antes vs 86 ± 2 após; 300 pmol) e gliceriltrinitrato (4.5 nmol); (Figura 4, $n=3$).

O inibidor de tripsina do feijão de soja (soybean; 10 mg/ml), conhecido por inibir o sistema de caliceína plasmática, não afetou significativamente os relaxamentos induzidos por gliceriltrinitrato, veneno de *Phoneutria nigriventer*, bradicinina e caliceína de pâncreas de porco (55 ± 12 , 54 ± 17 , 85 ± 26 e $35 \pm 6\%$ de relaxamento antes versus 67 ± 20 , 54 ± 8 , 98 ± 8 e $33 \pm 8\%$ de relaxamento durante a infusão do soybean, respectivamente, $n=4$).

3.2 - ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NO RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA INDUZIDO PELO VENENO DE *Phoneutria nigriventer*

A figura 5 ilustra que o inibidor da síntese de EDRF, N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME 1 μM), mas não o seu enantiômero inativo D-NAME (10 μM), aboliu os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa induzidos por acetilcolina, bradicinina e veneno de *Phoneutria nigriventer* sem modificar aqueles induzidos pelo gliceriltrinitrato. O efeito inibitório do L-NAME foi parcialmente revertido pela infusão da L-arginina (300 μM), mas não pelo seu enantiômero D-arginina (300 μM; Figura 5). A infusão do L-NAME induziu ainda a elevação do tônus basal da preparação em 59 ± 9% (P<0.05), que foi revertida pela infusão da L-arginina, mas não de D-arginina (Figura 5; n=6).

FIGURA 1 - Captopril ($1\mu\text{M}$) potenciou significativamente o relaxamento das tiras de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzido por bradicinina (BK, 1 nmol) e veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV, 30 μg) sem afetar aquele induzido pelo gliceriltrinitrato (GTN, 1 nmol). As tiras de corpo cavernoso foram superfundidas em cascata e pré-contraídas pela noradrenalina como descrito em Métodos. Este é um traçado representativo de sete experimentos.

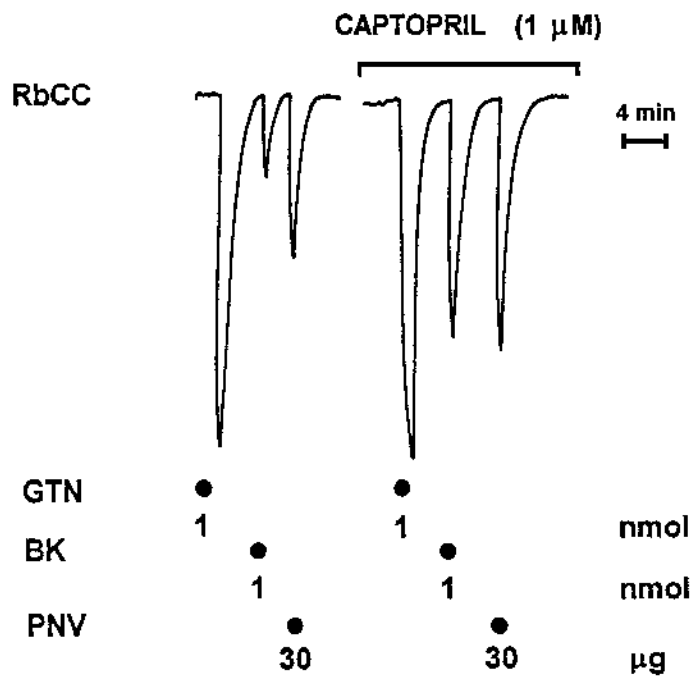


FIGURA 2 - O antagonista de receptores do tipo B₂ de bradicinina (BK) Hoe-140 (50 nM) aboliu o relaxamento das tiras de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos pela BK (3 nmol) e veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV, 10 µg). Os relaxamentos induzidos pelo gliceril trinitrato (GTN, 9 nmol) e acetilcolina (ACh, 30 nmol) não foram significativamente afetados pela infusão do Hoe-140. Este traçado é representativo de seis experimentos.

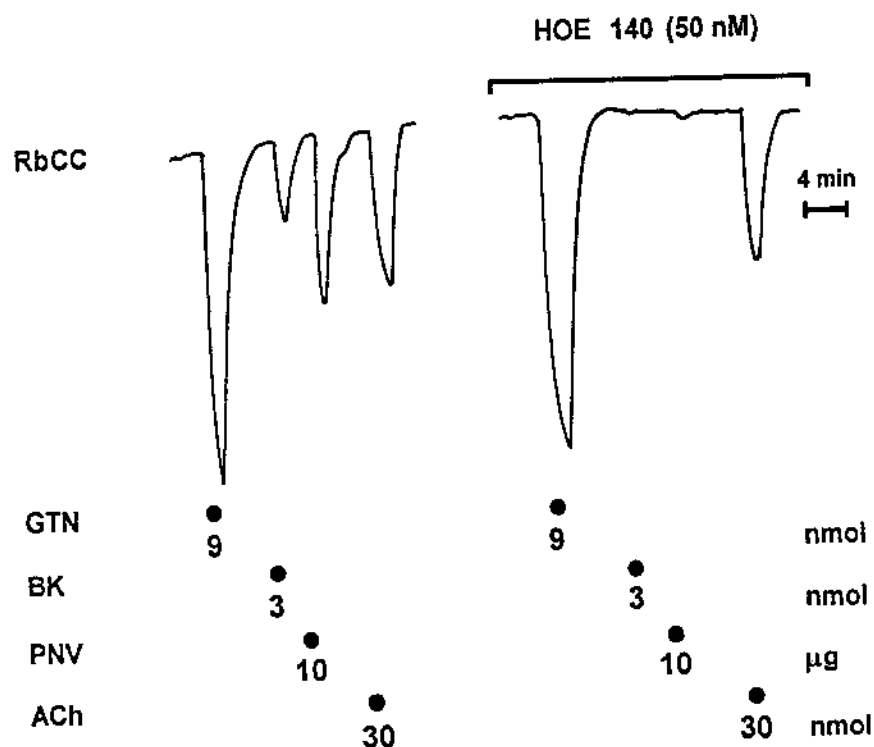


FIGURA 3 - A infusão de aprotinina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aboliu o relaxamento das tiras de corpo cavernoso de coelhos (RbCC) induzidos pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV, 3 μg) e caliceína de pâncreas de porco (PPK, 100 mU). Os relaxamentos induzidos pelo gliceril trinitrato (GTN, 2.2 nmol) e bradicinina (BK, 0.3 nmol) não foram significativamente afetados pela infusão de aprotinina. Este é o traçado representativo de quatro experimentos.

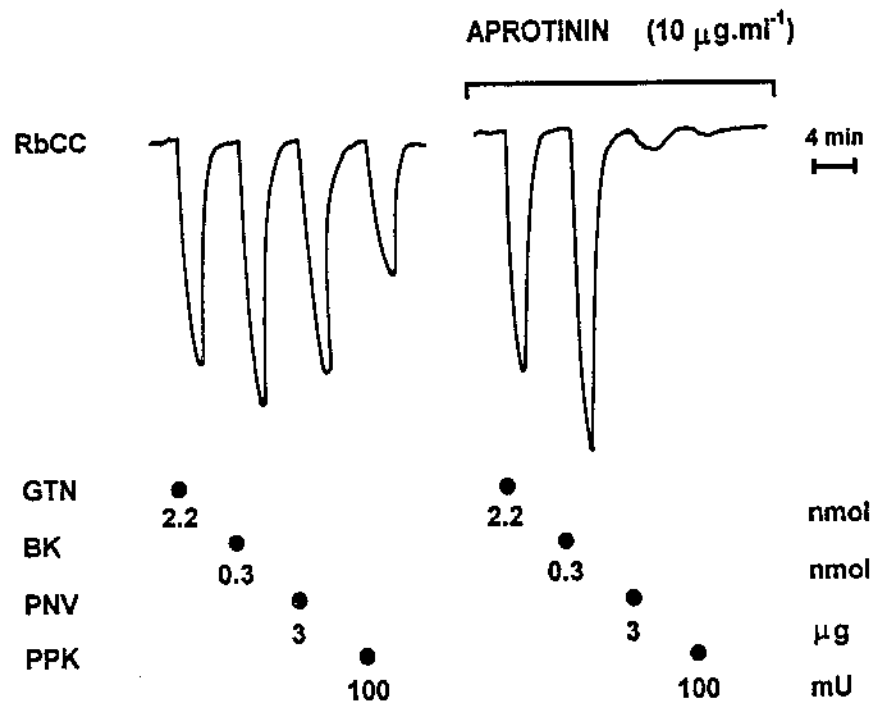


FIGURA 4 - O inibidor específico de caliceína tissular Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-Nh₂ (KIZD-06, 1.3 μ M) aboliu o relaxamento das tiras de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV, 10 μ g) e caliceína urinária de coelho (RbUK, 10 mU) sem afetar significativamente aqueles induzidos pelo gliceril trinitrato (GTN, 4.5 nmol) e acetilcolina (ACh, 300 pmol). A caliceína plasmática de coelho não produziu nenhum efeito sobre a preparação. Este é o traçado representativo de três experimentos

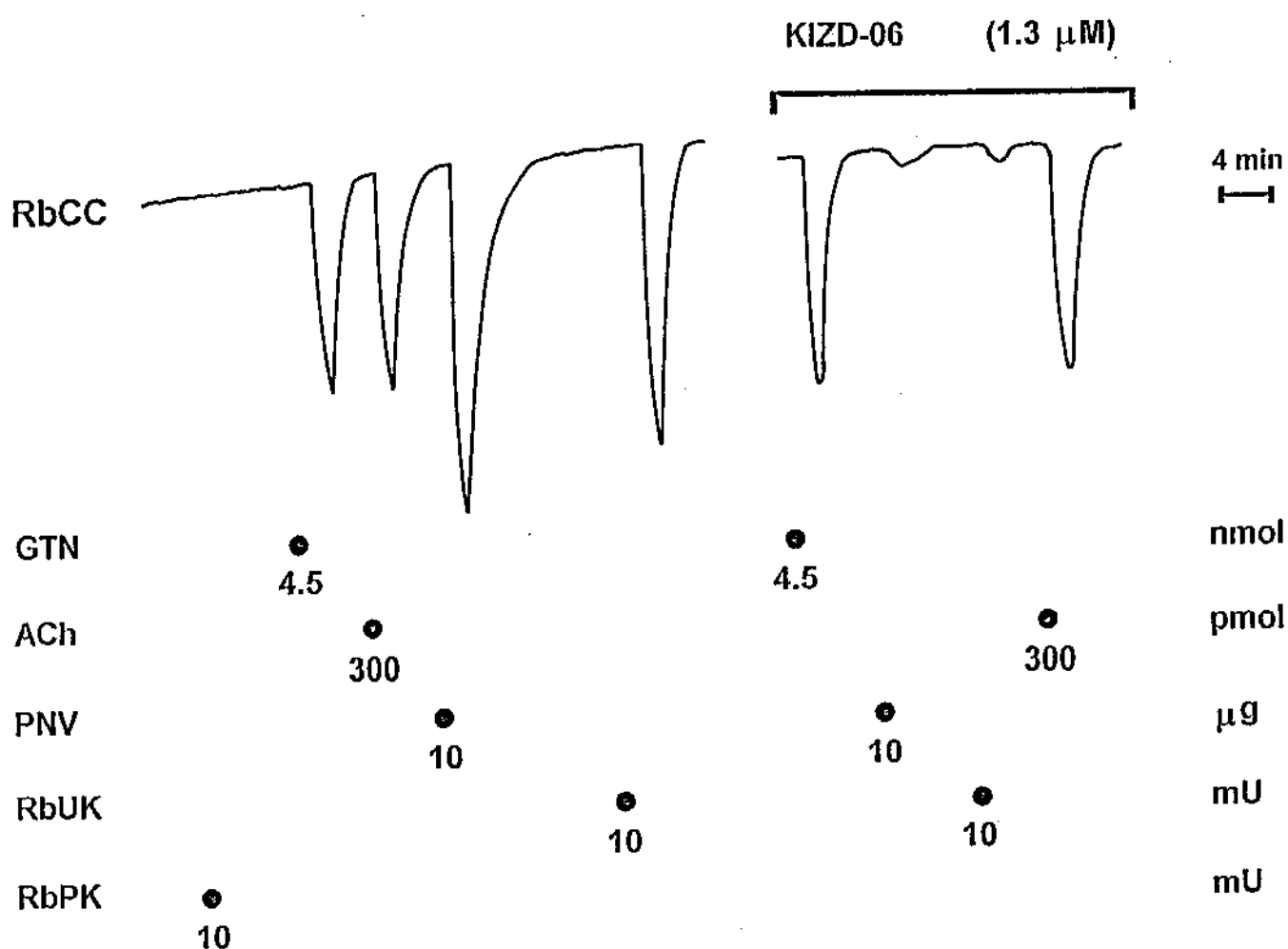
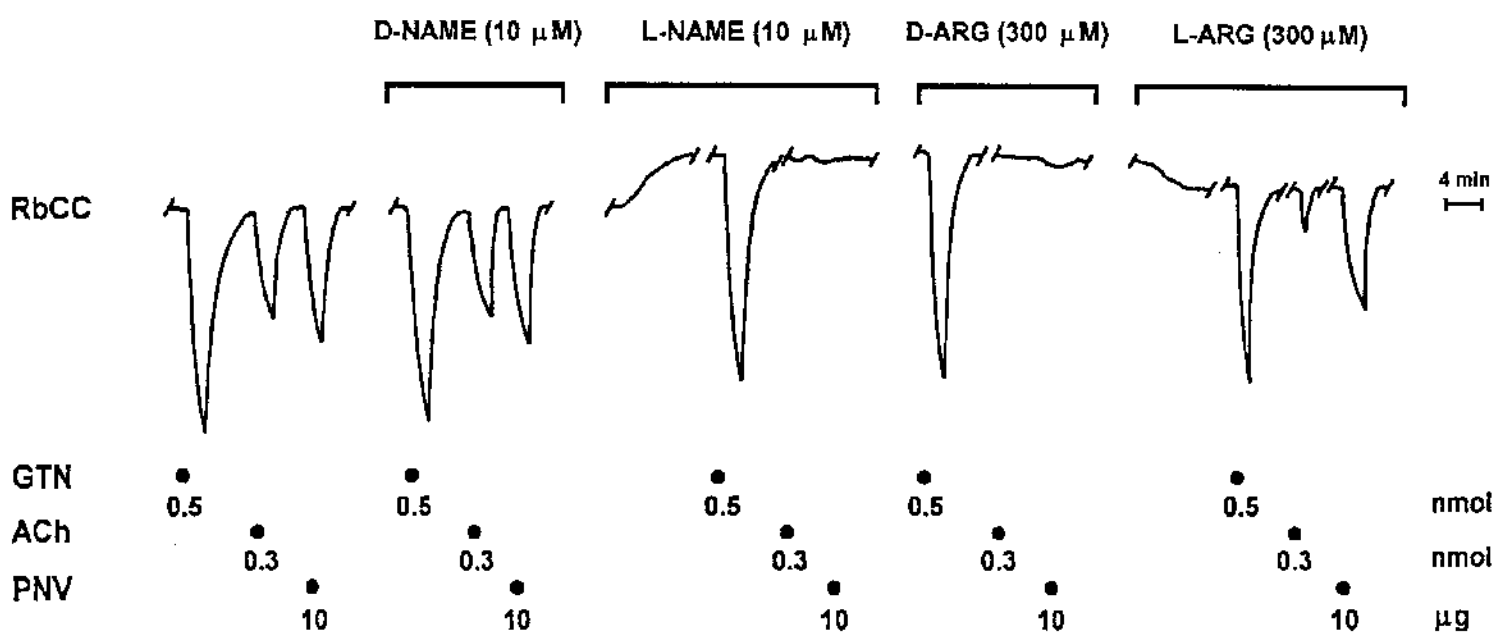


FIGURA 5 - Efeito do N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10 μ M), D-NAME (10 μ M, L-arginina (L-Arg, 300 μ M) e D-Arginina (D-Arg, 300 μ M) em tiras de corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de L-NAME (mas não D-NAME) aumentou o tonus da RbCC e aboliu os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh, 0.3 nmol) e veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV, 10 μ g). O relaxamento induzido pelo gliceriltrinitrato (GTN, 0.5 nmol) não foi significativamente afetado pela infusão de L-NAME. A infusão subsequente de L-Arg (mas não de D-Arg) reverteu parcialmente o aumento de tonus e também restaurou os relaxamentos induzidos pela ACh e PNV. Este é o traçado representativo de 6 experimentos.



4. - DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa de coelhos induzidos pelo veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* ocorrem por um mecanismo dependente da liberação de óxido nítrico, visto que estes relaxamentos foram completamente inibidos pelo inibidor da NO-sintetase L-NAME (Moore et al., 1989), mas não por seu enantiômero inativo D-NAME. A reversão do efeito inibitório do L-NAME pela L-arginina (mas não pela D-arginina) reforça ainda mais o envolvimento do óxido nítrico nesta resposta.

Dentre os mediadores biológicos capazes de induzir liberação de EDRF, destacam-se, além da acetilcolina, a bradicinina (Cherry et al., 1982), substância P (Zawadzki et al., 1981), serotonina (Cocks & Angus, 1983), histamina (Toda, 1984), e outras. Tais agentes vasoativos aliados a outros vasodilatadores não-dependentes do endotélio (prostaglandina E1, papaverina) têm se constituído importantes ferramentas para compreensão dos mecanismos fisiológicos da ereção peniana (Adaikan & Karim, 1977; Andersson et al., 1984; Adaikan et al., 1986; Kirkeby et al., 1989; Finberg & Vardi, 1990; Christ et al., 1990; Kimura et al., 1990; Kim et al., 1991; Knispel et al., 1991).

A liberação de NO aqui demonstrada representa a via final pela qual a calicreína tissular, localizada no corpo cavernoso, foi inicialmente ativada pelo veneno, resultando na formação local de cininas, ativação de receptores do tipo B₂ e, finalmente, na liberação do mediador final (NO).

O envolvimento do sistema de calicreína-cinina tissular no corpo cavernoso de coelhos é apoiado por três evidências sólidas: primeiro, o inibidor

de proteases aprotinina, conhecido por inibir a atividade enzimática de calicreínas (Vogel & Werle, 1970), inibiu seletivamente o relaxamento do corpo cavernoso isolado de coelho induzido pela calicreína tissular de pâncreas de porco, assim como o relaxamento induzido pelo veneno. Por outro lado, o inibidor de calicreína plasmática soybean (SBTI; Vogel & Werle, 1970), não produziu inibição significativa dos relaxamentos induzidos pela calicreína de pâncreas de porco e do veneno, indicando que a calicreína plasmática não participa no fenômeno analisado.

Segundo, o inibidor de cininase II, captopril, potenciou significativamente os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por bradicinina e veneno e, terceiro, o antagonista específico de receptores de bradicinina do tipo B₂ (HOE-140; Wirth et al, 1991) aboliu seletivamente os efeitos relaxantes da bradicinina e veneno. O fato do antagonista específico de receptores B₁ ([Leu⁹]des Arg¹⁰ KD) de bradicinina não modificar os relaxamentos induzidos pelo veneno e pela bradicinina, exclui a possibilidade do envolvimento desse tipo de receptores no fenômeno analisado.

Uma quarta evidência consiste em que um novo inibidor específico para calicreína tissular (KIZD-06) aboliu completamente os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos pelo veneno e pela calicreína tissular obtida de urina de coelho.

Apesar do veneno contrair musculatura lisa vascular de coelhos *in vitro* (Antunes et al., 1993; Marangoni et al, 1993; Bento et al., 1993), isto ocorre provavelmente devido à ausência de células endoteliais naquelas preparações. Tecidos de corpo cavernoso de coelho, da maneira como foram utilizados nestes experimentos, são caracterizados por uma rica rede de capilares sinusoidais recobertos por células endoteliais.

Nossa demonstração de que a ativação de receptores B₂ em tiras de corpo cavernoso de coelho induz à liberação de óxido nítrico não é surpreendente, visto que células endoteliais de diferentes fontes, seja em musculatura lisa vascular *in vitro* (Cherry et al., 1982) ou em cultura (Gryglewski et al., 1986; de Nucci et al., 1988; D'Orleans-Juste et al., 1989) assim como em sistemas *in vivo* (Vallance et al., 1989; Whittle et al., 1989; Rees et al., 1990) liberam óxido nítrico em resposta à bradicinina.

A observação de que a calicreína de pâncreas de porco relaxou o corpo cavernoso isolado de coelho por um mecanismo cinina-dependente indica que este tecido deve conter um tipo de cininogênio, "a priori" de baixo peso molecular, que estaria servindo de substrato para a calicreína tissular.

O veneno de *Phoneutria nigriventer* ativa o sistema de calicreína-cininas tissular (mas não plasmático) em pele de coelho *in vivo* (Marangoni et al., 1993). As calicreínas tissulares, codificadas por uma família de genes, são encontradas em uma grande variedade de tecidos, incluindo vasos (Oza et al., 1990, Nolly & Lema, 1982, Nolly et al., 1985). Entretanto, não foram descritas em tecido peniano, mais especificamente em corpo cavernoso. Em vista disso, podemos especular que o veneno causa relaxamento de corpo cavernoso isolado de coelho pela ativação de calicreína tissular localizada na região reconhecida como corpo cavernoso, liberando cininas localmente, mais provavelmente a lisil-bradicinina (calidina). Alternativamente, o veneno poderia estar atuando como um ativador dos precursores da calicreína tissular, denominados pré-calicreínas tissulares. As pré-calicreínas tissulares têm sido caracterizadas em urinas de humanos (Corthon et al., 1979; Spragg, 1993; Takada et al., 1985) e de ratos (Takaoka et al., 1984). Ao contrário do veneno, os ativadores das pré-calicreínas conhecidos como tripsina, termolisina (Takada

et al., 1985) e arginina esterase obtida de glândula submandibular de ratos (Kamada et al, 1990) são ativos somente em sistemas *in vitro*. Uma outra possibilidade de se explicar os resultados obtidos seria que o próprio veneno se constituísse em um tipo de caliceína tissular. Porém, embora o veneno de *Phoneutria nigriventer* contenha histamina, serotonina e outras enzimas (Schenberg & Pereira-Lima, 1978) não existem informações a respeito da existências de caliceínas em venenos de aranhas. Além disso, purificamos recentemente dois polipeptídeos capazes de aumentar a permeabilidade vascular em pele de coelho (Bento et al, 1994) e causar relaxamento de corpo cavernoso de coelho (Rego et al, 1994) cujo peso molecular varia de 14000 a 17000, valores bem abaixo daqueles descritos para caliceínas tissulares (24000 - 45000; Bhoola et al, 1992).

Nos órgãos genitais humanos, a caliceína tissular tem sido encontrada especificamente nas células de Sertoli, células epiteliais do epidídimo e adenócitos da próstata (Saitoh et al., 1987; Kumamoto et al., 1989). A presença de caliceína nestes tecidos sugerem um papel funcional na espermatogênese, maturação do espermatozoide e também no aumento de fluxo sanguíneo nos testículos (Saitoh & Kumamoto, 1988; Clements et al., 1988). Recentemente, foi demonstrado que o efeito da caliceína sobre pacientes com deficiências na motilidade dos espermatozoides, pode ser claramente atribuído a diminuição dos distúrbios da cauda, característicos de disfunções do epidídimo. A caliceína pode estar influenciando a maturação do espermatozoide no epidídimo, levando a um aumento progressivo de motilidade.

Clements e colaboradores (1988) reportaram que a expressão do gene da caliceína em próstata de rato é dependente de andrógeno e, ainda, que a testosterona pode estar diretamente envolvida neste fenômeno nas glândulas

sexuais. Os mecanismos vasculares efetores que dão início as ereções penianas, assim como os músculos estriados efetores, são sensíveis a testosterona, intensificando as ereções penianas, presumivelmente devido a maior força exercida pelo músculo bulboesponjoso sobre o bulbo peniano (Leipheimer & Sacetilcolinas, 1993)

Recentemente, Giuliano et al. (1993) demonstraram que a testosterona aumenta a resposta erétil cavernosa induzida por estimulação nervosa. No entanto, tais autores reportam que o sítio de ação da testosterona e seus metabólitos estão situados nos neurônios, ao invés de no tecido erétil propriamente dito. Neurônios parassimpáticos pós-ganglionares parecem ser o local exato de atuação dos hormônios esteróides.

A medição dos níveis de testosterona plasmática tem sido correntemente utilizada por urologistas como um dos parâmetros diagnósticos para disfunções sexuais de origem orgânica (Cará, 1993). Estas evidências podem sugerir que uma deficiência ou disfunção com relação aos níveis de andrógenos circulantes poderiam modular a produção de pré-caliceína, e conseqüente comprometimento das funções sexuais e reprodutivas.

Nossos resultados podem sugerir que o sistema de caliceína-cininas tissular presente no corpo cavernoso de coelhos pode representar importante papel na modulação do fenômeno fisiológico da ereção peniana.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaikan, P.G. & Karim, S.M.M. (1977). Effects of histamine on the human penis muscle *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* **45**, 261-265.

Adaikan, P.G., Kottegoda, S.R. & Ratnam, S.S. (1986). Is Vasoactive intestinal polypeptide the principal transmitter involved in human penile erection? *J. Urol.* **5**, 171.

Adaikan, P.G., Ng, S. C. & Ratnam, S.S. (1992). New cocktail for intracavernous injection-confirmation of functional histamine H₁ and H₂ receptors in cavernosum. *Int. J. Impotence Res.*, **4**, 4P.

Andersson, P.O., Bloom, S.R. & Mellander, S. (1984). Haemodynamics of pelvic nerve induced penile erection in the dog: possible mediation by vasoactive intestinal polypeptide. *J. Physiol.* **350**, 209-223.

Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, N.C.C., Fontana, M.D. & de Nucci, G. (1990). Pharmacological profile of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 508p

Antunes, E., Marangoni, R.A., Brain, S.D., & De Nucci, G. (1992). *Phoneutria nigriventer* (Armed Spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon.* **30**, 1011-1016.

Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, R.C.C. Hyslop, S. Fontana, M.D. & de Nucci, G. (1993). Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Brazilian J Med Biol Res.* **26**, 81-91.

Baumgarten, C.R., Scharfing, R., & Kunkel, G. (1989). Localization of glandular kallikrein in nasal mucosa of allergic and nonallergic individuals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247B**, 523-528.

Benson, G.S., McConnel, J., Lipshultz, L.I., Corriere, J. N. Jr. and Wood, J. (1980). Neuromorphology and neuropharmacology of the human penis: an in vitro study. *J. Clin. Invest.* **65**, 506.

Bento, A.C., Novello, J.C., Marangoni, S., Antunes, E., Giglio, J.R., Oliveira, B. & De Nucci, G. (1993). Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochemical Pharmacology.* **46**, 1092-1095.

Bento, A.C., Rego, E., Mariani-Pedroso, S.R., Giglio, J.R., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E. and de Nucci, G. (1994). Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increase in vascular permeability. *J. Biochem. Pharmacol.* *In Press.*

Bhoola, K.D., Bewley, J., Crothers, D.M., Gingi, M.I. and Figueroa, C.D. (1989). Kinin receptors on epithelial cells and smooth muscle of the tracheobronchial tree. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247A**, 421-427.

Bhoola, K.D. and Ogle, C.W. (1966). Subcellular localization of kallikrein, amylase and acetylcholine in the submaxillary gland of the guinea-pig. *J. Physiol.* **184**, 663-672.

Bhoola, K.D., May May Yi, R., Morley, J., and Schachetlinater, M. (1962). Release of kinin by an enzyme in the accessory sex glands of the guinea-pig. *J. Physiol.* **163**, 269-280.

Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K. (1992). Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacological Reviews*. **44**, 22-80.

Brazil, V. e Vellard, J. (1925). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantã*. **2**, 5-77.

Cará, A.M. (1993). A Histamina como possível mediador do fenômeno de ereção peniana em humanos. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Cherry, P.D., Furchgott, R.F., Zawadzki, V.J. & Jothianadan, D. (1982). Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 2106.

Christ, G., Stone, B. & Melmam, A. (1990). Age dependent variation in affinity and efficacy of Phenylephrine-induced contraction mediated by activation of alpha1-adrenoceptor in isolated human erectile tissue. *Int. J. Impotence Res.* **2**, 37.

Clements, J.A., Matheson, B.A., Wines, D.R., Brady, J.M., MacDonald, R.J. and Funder, J.W. (1988). Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *J. Biol. Chem.* **31**, 16132-16137.

Cocks, T.M. & Angus, J.A. (1983). Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature*, **305**, 627.

Corthon, J., Imanari, T., Yoshida, H., Kaizu, T., Pierce, J. & Pisano, J.J. (1979). Isolation of prokallikrein from human urine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **120B**, 575-579.

Cushman, D.W. & Cheung, H.S. (1971a). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.

Cushman, D.W. & Cheung, H.S. (1971b). Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Acta* **250**, 261-265.

D'Orleans-Juste, P., de Nucci, G., & Vane, J.R. (1989). Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **96**, 920-926.

de Grost, W.C. & Steers, W.D. (1988). Neuroanatomy and neurophysiology of penile erection. In: Tanagho, E.A., Lue, T.F., McClure, R.D. eds. *Contemporary management of impotence and infertility.* Baltimore Williams & Wilkins, 3-27.

de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walde, C., Warner, T., Vane, J.R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9797-9800.

Eickstedt, V.R.D. von. (1979). Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria Keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (Aranaeae; Labidognatha; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantã.* **42**, 95-126.

Entwistle, I. D., Johnstone, R.A.W., Medzihradszky, D. & May, T. E. (1982) Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**, 1059-1067.

Erdos, E.G., Tague, L.L., Miwa, I. (1968). Kallikrein granules of the submaxillary gland. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 667-674.

Fiedler, F. (1979). Enzymology of glandular kallikreins. In: *Brdikinin, kallidin and kallikrein*, ed. by E.G. Erdos, pp 103-161, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Finberg, J.P.M. & Vardi, Y. (1990). Modification of penile erection response by adrenoceptor agonists and antagonists in pithed rat. *Int. J. Impotence Res.*, **2**, 43.

Fink, E., Geiger, R., Witte, J., Biedermann, S., Seifert, J. & Fritz, H. (1980). Biochemical, Pharmacological and Functional aspects of glandular kallikreins. In *Enzymatic release of vasoactive peptides* (Gross, F. & Vogel, E., eds.), pp. 101-115, Raven, New York.

Fink, E., Schill, W.B., Fiedler, F., Krassinig, F., Geiger, R. and Shimamoto, K. (1985b). Tissue kallikrein in human seminal plasma is secreted by the prostate gland. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **366**, 917-924.

Fontana, M.D. & Vital Brazil. (1985). Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at isolated nerve phrenic diaphragm of the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **18**, 557-565.

Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **288**, 373.

Girolami, J.O., Alhenc-Gelas, F., Dos Reis, M.L., Bascands, J.L., Suc, J.M., Corvol, P. & Menard, J. (1986). Hydrolysis of high molecular weight kininogen by purified rat urinary kallikrein: identification of bradykinin as the kinin formed. *Adv. Exp. Med. Biol.* **198A**, 137-145.

Giuliano, F., Rampin, O., Schirar, A., Jardin, A., Rousseau, J.P. (1993). Autonomic Control of Penile Erection - Modulation by Testosterone in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology.* **5**, 6, 677-683.

Gross, F. (1981). Captopril. Profil eines neuen Antihypertensivums. *Münch. Med. Wochenscher.* **123**, 1803-1809.

Gryglewski, R.J., Moncada, S. & Palmer, R.M.J. (1986). Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **87**, 685-694.

Hedlund, H. and Andersson, K-E. (1985). Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J. Urol.*, **134**, 1245.

Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H. & Dahlheim, H. (1982). Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epididymis and vas deferens under different conditions. *J.Reprod.Fertil.* **65**, 97-103.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 9265.

Kamada, M., Furuhashi, N., Yamaguchi, T., Ikakita, M., Kizuki, K. & Moriya, H. (1990). Observation of tissue kallikrein activation by some serine proteases, arginine esterases in rat submandibular gland. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **166**, 231-237.

Kim, N., Azadzi, K.M., Goldstein, I. & Saenz de Tejada, I. (1991). A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, **88**, 112-118.

Kimura, K., Tamura, M., Kawanishi, Y., Imagawa, A. & Kagawa, S. (1990). Prostaglandins as possible neurotransmitter for contraction and relaxation in Human Corpus Cavernosum. *Int. J. Impotence Res.* **2**, 24.

Kirkeby H.J., Forman A., Sorensen S. & Andersson K. (1989). Effects of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and histamine on human penile cavernous tissue and circumflex veins. *Int. J. Impotence Res.* **1**, 181-188.

Knispel, H.H., Goessl, C. & Beckmann, R. (1991). Basal and Acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of Rabbit Cavernous Smooth Muscle. *J. Urol.* **146**, 1429-1433.

Krassnigg, F., Niederhauser, H., Placzek, R., Frick, J. & Schill, W. -B. (1986). Investigations on the functional role of angiotensin converting enzyme (ACE) in human seminal plasma. In *Kinins IV, Part A* (Greenbaum, L.M. & Margolius, H.S., eds), pp. 477-485, Plenum Publishing Corporation, New York-London.

Krassnigg, F., Niederhauser, H., Fink, E., Frick, J. & Schill, W. -B. (1989). Angiotensin convertin Enzyme (ACE) of human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. *Int. J. Androl.* **12**, 22-28.

Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **4**, 331-358.

- Kumamoto, Y., Saito, S., Ito, N., Shimamoto, K., Imura, O. (1989).** Localization of Kallikrein in Human male Genital Organ. *Advances Exp. Med. Biol.* **247B**, 189-193.
- Lazure, C., Leduc, R., Seidah, N.G., Chrétien, M., Dubé, J.Y., Chapdelaine, P., Frenette, G., Paquin, R. & Tremblay, R.R. (1984).** The major androgen-dependent protease in dog prostate belongs to the kallikrein family: confirmation by partial amino acid sequencing. *FEBS.* **175**, 1-7.
- Leipheimer, R. E.; Sacetilcolinas, B. D. (1993).** Relative Androgen Sensitivity of the Vascular and Striated-Muscle Systems Regulating Penile Erection in Rats. *Physiology & Behavior.* **54,6**, 1085-1090.
- Lue, T.F., Hricak, H., Schmidt, R.A. and Tanagho, E.A. (1986).** Functional evaluation of penile veins by cavernosography in papaverine induced-erection. *J. Urol.,* **135**, 479.
- Marangoni, R.A., Antunes, E., Brain, S.D. & de Nucci, G. (1993).** Activation by *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom of tissue-kallikrein-kinin system in rabbit skin *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.,* **109**, 539-543.
- McConnell, J. & Benson, G.S. (1982).** Innervation of human penile blood vessels. *Neurol. Urodynamics* **192**, 199-210.
- Moore, P.K., Al-Swayeh, O.A., Chong, N.W.S., Evans, R.A. & Gibson, A. (1989).** L-NG-nitro arginine (L-NOARG) a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.,* **99**, 408-412.

Motta, G., Sampaio, M.U. & Sampaio, C.A.M. (1986). Preparation and Characterization of Human Plasma Kallikrein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **19**, 629A.

Movat, H.Z. (1979). The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In: *Bradikinin, kallidin and kallikrein*, ed. by E.G. Erdos, pp 1-89, Springer-Verlag, Berlin, Heildeberg, New York.

Müller-Easterl., W. (1989). Kininogens, Kinins and kinships. *Thromb. Haemost.* **61**,2-6.

Myers, P.R., Minor Jr, R.L., Guerra Jr, R., Bates, J.N. & Harrison, D.G. (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature.* **345**, 161.

Nolly, H. & Lama, M.C. (1982). Vascular kallikrein: a kallikrein-like enzyme present in vascular tissue of rat. *Clin. Sci.* **63**, 249-251.

Nolly, H., Scicli, A.G. & Carretero, O. (1985). Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circ. Res.* **56**, 816-821.

Oza, N.B., Schwartz, J.H., Goud, M.D. & Levinsky, N.G. (1990). Rat aortic smooth muscle cells in culture express kallikrein, kininogen and bradykinase activity. *J. Clin. Invest.* **85**, 597-600.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* **327**, 524.

Pinkus, G.S., Maier, M., Seldin, D.C., Ole-Moiyoi, O., Austen, K.F., and Spragg, J. (1983). Immunohistochemical localization of glandular kallikrein in the endocrine and exocrine pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* **31**,1279-1288.

Qin, H., Kemp, J., Yip, M., Lam-Po-Tang, P.R.L. & Morris, B.J. (1991). Localization of human glandular kallikrein-1 gene to chromosome 19q13.3-13.4 by in situ hybridization. *Human Hered.* **41**.

Rees, D.D., Palmer, R.M.J., Schulz, R., Hodson, H.F. & Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 746-752.

Rego, E. Bento, A.C., Lopes-Martins, R.A.B., Giglio, J.R., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E. and de Nucci, G. (1994). Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the relaxation of rabbit isolated corpus cavernosum. *J. Biochem. Pharmacol. In Press*.

Saenz de Tejada, I., Goldstein, I. & Krane, R.J. (1988). Local control of penile erection. Nerves, smooth muscle, and endothelium. *Urol. Clin. North Am.* **15**, 9-15.

Saitoh, S. and Kumamoto, Y. (1988). Effect of kallikrein on testicular blood circulation. *Arch. Androl.* **20**,51-65.

Saitoh, S.,Kumamoto, Y., Shimamoto, K., and Limura, O. (1987). Kallikrein in the male reproductive system. *Arch. Androl.* **19**,133-147.

Sampaio, C.A.M., Wong, S-C., & Shaw, E. (1974). Human Plasma Kallikrein. Purification and preliminary characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 133-139.

Sato, H. (1980) Studies on the components of kallikrein-kinin system and treatment of male infertility. *Keio J. Med.* **29**, 19-38.

Schacetilcolinater, M., Maranda, B., and Moriwaki, C. (1978). Localization of glandula kallikrein in the coagulating and submandibular glands of the guinea-pig. *J. Histochem. Cytochem.* **26**,318-321.

Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A. (1962). Estudo Farmacológico do veneno de *Phoneutria fera*. *Ciência e Cultura.* **14,4**, 237-238.

Schenberg, S. & Pereira-Lima, F.A. (1978). Arthropod Venoms: Venoms of Ctenidae In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Ed. S. Bettini), **Vol. 48**, pp. 217-245. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Schill, W.B. and Haberland, G.L. (1974). Kinin-induced enhancement of sperm motility. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **355**, 229-231.

Schill, W.B. (1977). Kallikrein as a therapeutical means in the treatment of male infertility. In *Kininogenases. Kallikrein. Physiological Properties and Pharmacological Rationale.* pp. 251-280. Schattauer, Stuttgart-New York.

Schill, W.B., Krassnigg, F., Muller-Esterl, W. & Fink, E. (1985). Quantitative détermination of different proteins in normal and pathological semen. *Prot. Biol. Fluids.* **32**, 293-297.

Schroeder-Finckh, R., Hofmann, N. & Hartmann, R. (1986). Kallikrein - ein Beitrag zur andrologischen Krankheitslehre und - therapie. *Fertilität.* **2**, 171-178.

Seidah, N.G., Ladenheim, R., Mbikay, M., Hamelin, J., Lutfalla, G., Rougeon, F., Lazure, C. and Chretien, M. (1989). The cDNA structure of the rat plasma kallikrein. *DNA* **8**, 553-574.

- Spragg, J.** (1983). Characterization of purified human latent kallikrein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247b**, 195-200.
- Takada, Y., Skidgel, R.A., and Erdos, E.G.** (1985). Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem. J.* **232**, 851-858.
- Takaoka, M., Okamura, H., Kuribayashi, Y., Matsuoko, H., & Morimoto, S.** (1984). Activation of urinary inactive kallikrein by an extract from the rat kidney cortex. *Life Science.* **37**, 1015-1022.
- Toda, N.** (1984). Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 113.
- Vallance, P., Collier, J. & Moncada, S.** (1989). Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc. Res.* **23**, 1053-1057.
- Vane, J.R.** (1964). The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.* **23**, 360.
- Vital-Brazil, O.; Leite, G. B. & Fontana, M. D.** (1988). Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência Cult.* **40**, 181-185.
- Vital-Brazil, O. & Fontana, M.D.** (1993). Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle fibre membrane. *Toxicon*, **31**, 1085-1098.
- Vital-Brazil, O., Leite, G.B. & Fontana, M.D.** (1988). Modo de ação da peçonha da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) nas aurículas isoladas de cobaia. *Cienc Cult*, **40**, 181-185.

Vogel, R. & Werle, E. (1970). Kallikrein inhibitors. In *Handb Exp Pharmacol* (Ed. Erdos EG). Vol XXV, pp. 213-249, Springer, New York.

Wirth, K., Hock, F.J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H. G., Anagnostopoulos, H., Henke, St., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J. & Scholkens, B.A. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacology*. **102**, 774-777.

Zawadzki, J.V., Furchgott, R.F. & Cherry, P.D.(1981).The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. *Fed.Proc.* **40**, 689.

6 - ABSTRACT

The roles of the tissue kallikrein-kinin system and nitric oxide (NO) release in *Phoneutria nigriventer* venom-induced relaxations of rabbit corpus cavernosum (RbCC) smooth muscle have been investigated using a bioassay cascade. *Phoneutria nigriventer* venom (10-30 μg), porcine pancreatic kallikrein (100 mU), rabbit urinary kallikrein (10 mU), bradykinin (BK, 0.3-3 nmol), acetylcholine (ACh, 0.3-30 nmol) and glyceryl trinitrate (GTN, 0.5-10 nmol) caused relaxations of the RbCC strips. Captopril (1 μM) substantially potentiated *Phoneutria nigriventer* venom- and BK-induced RbCC relaxations without affecting those elicited by GTN. The bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,DTic⁷,Oic⁸]-BK, 50 nM), aprotinin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and the tissue kallikrein inhibitor Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH₂ (KIZD-06, 1.3 μM) significantly inhibited *Phoneutria nigriventer* venom-induced RbCC relaxations, without affecting those provoked by GTN and ACh. The B₁ receptor antagonist [Leu⁹]des Arg¹⁰BK (0.5 μM) and soybean trypsin inhibitor (SBTI, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) had no effect on *Phoneutria nigriventer* venom-induced RbCC relaxations. The relaxations induced by *Phoneutria nigriventer* venom, porcine pancreas kallikrein, BK and ACh were significantly inhibited by N ^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 μM) but not by D-NAME (10 μM). L-NAME did not affect GTN-induced relaxations. L-arginine (300 μM), but not D-arginine (300 μM), significantly reversed the inhibitory effect of L-NAME. Our results indicate that *Phoneutria nigriventer* venom activates the tissue kallikrein-kininogen-kinin system in RbCC strips leading to NO release and suggest a functional role for this system in penile erection