

Cleber Evandro Teixeira

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
RELAXAMENTO DE CORPO CAVERNOSO DE COELHO
INDUZIDO PELO VENENO DE *TITYUS SERRULATUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Farmacologia.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Farmacologia do Farmacêutico Cléber Evandro Teixeira.

Orientador: Prof

Camp

Campinas, 23 de junho de 1997


Prof. Dr. Edson Antunes

- Orientador -

T235c

31535/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	OC
N.º CHAMADA:	711unicamp
T235c	
V.	Ex.
FORMAÇÃO BC/	31535
PROJ.	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
VALOR	R\$ 11,00
DATA	30/03/97
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM-00 099922-7

T235c

Teixeira, Cleber Evandro

Caracterização farmacológica do relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* / Cleber Evandro Teixeira. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Édson Antunes

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido nítrico. 2. Ereção peniana. I. Édson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.





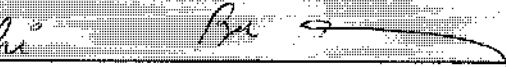
UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antunes 
2. Prof. Dr. Leineu Freire-Moraes 
3. Prof. Dr. Fabio Bucaritchi 

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

Data: 25/06/97

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Édson Antunes pela sua grande dedicação e presença marcantes durante o desenvolvimento deste trabalho, além da grande amizade construída ao longo do mesmo.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela oportunidade concedida e seu exemplo de dedicação, estando sempre predisposto a discutir o trabalho e apresentar sugestões.

Ao Prof. Dr. José F. Fracasso do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, pelo apoio e dedicação indispensáveis para meu desenvolvimento científico e, acima de tudo, pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. José R. Giglio e Eliane C. Arantes do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela colaboração efetiva durante o processo de cromatografia do veneno.

Aos amigos Antônio C. Bento e Rodrigo A. B. Lopes-Martins, pelo apoio e colaboração na aprendizagem da metodologia a ser utilizada e nas etapas iniciais deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo N. Muscará e aos pós-graduandos Simone A. Teixeira e Flávio R. A. Faro, pelos auxílios técnicos e contribuição nos ensaios de atividade de NOS cerebelar de coelho.

Aos pós-graduandos Cláudia O. Franklin, Luciana P. Nathan, Renata C. O. Zanardo, Renata Pereira, Renato R. A. Faro, Rogério C. Castro e Soraia K. P. Costa, pelo apoio sempre constante e pela efetiva cooperação durante o transcorrer deste trabalho.

Aos demais companheiros de pós-graduação do laboratório: Aldete Zappellini, Álister M. Cará, Éien C. T. Landucci, Heitor Moreno Jr., Heloísa H. A. Ferreira, Heryck J. Stella, José L. Donato, Luciana Bizeto, Marta V. Medeiros, Moacir S. Faria, Pamela M. Gonzáles, Ronilson A. Moreno, Sisi Marcondes, Sócrates C. Penna, Wellington Ribeiro e Wladimir M. Gordo pelo grande companheirismo, tendo assim, proporcionado um convívio sempre agradável.

Ao administrador Paulo S. Oliveira e à secretária Maria D. Ponciano pela eficiência e prestatividade.

À secretaria do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, pela eficiência e colaboração.

Aos auxiliares técnicos Aguinaldo F. Azevedo, Airton F. Paula e Miguel B. Silva pelo apoio indispensável.

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas em pró da realização deste trabalho.

Aos amigos de hoje e sempre Adriana H. Sayama, Ana L. P. Falco, Demian R. Iffa, Gláucia L. Molina, Graziela M. Costa, Idalmo J. V. Jr., José F. Italiani, Nadiany S. Barros, Patrícia M. S. Ramos e Vanderlei Stanojev pelo carinho e grande amizade.

Em especial a John Lennon, Paul McCartney, George Harrison e Ringo Starr, pelo exemplo de luta, perseverança e amor ao mundo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro recebido mediante a concessão da bolsa de Mestrado.



Aos meus Pais,
Vanderlei Teixeira e
Lidia Mascarim Teixeira
e à minha irmã
Gláucia Cristiane Teixeira
por estarem sempre ao meu lado,
e a quem devo tudo nesta vida...

"When you've seen beyond yourself then you may find, peace of mind,
is waiting there. And the time will come when you see we're all one,
and life flows on within you and without you"

THE
BEATLES



ÍNDICE

ii

Lista de abreviações	vii
Lista de materiais	ix
Resumo	xi
I. Introdução	
1. Anatomia e fisiologia da ereção peniana	1
2. Hemodinâmica da ereção	3
3. Neurotransmissão periférica e mecanismos de ativação	7
3.1. Mecanismos adrenérgicos	7
3.2. Mecanismos colinérgicos	8
3.3. Mecanismos não-adrenérgicos não colinérgicos	8
4. Descoberta do EDRF e posterior identificação como óxido nítrico	9
4.1. Óxido nítrico	10
4.2. Isoformas de óxido nítrico sintases	12
5. Neuropeptídeos	13
6. Canais de potássio e relaxamento de corpo cavernoso	15
7. Veneno de escorpiões	16
7.1. Morfologia externa dos escorpiões	17
7.2. <i>Tityus serrulatus</i>	18
7.3. Efeitos farmacológicos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	20
7.3.1. Sistema cardiovascular	20
7.3.2. Sistema respiratório e neuromuscular	21
7.3.3. Edema pulmonar	22
7.3.4. Sistema gastrintestinal	22
7.4. Mecanismo de ação de toxinas de escorpiões em nível molecular	23
Objetivos	26
I. Material e Métodos	
1. Superfusão de corpo cavernoso isolado em cascata	27
2. Efeito do L-NAME, D-NAME e TRIM sobre a atividade da óxido nítrico sintase cerebelar	28
3. Extração e cromatografia em CM-celulose-52 do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	29
4. Cálculos estatísticos	31

IV. Resultados	
1. Envolvimento do NO nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	32
2. Efeitos do TRIM sobre os relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	36
3. Efeitos do TRIM sobre a atividade enzimática da NOS cerebelar	37
4. Envolvimento da guanilato ciclase solúvel nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	38
5. Ausência de efeito da aprotinina, Hoe 140 e atropina nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	40
6. Envolvimento de canais de potássio nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	41
7. Envolvimento de canais de sódio nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	44
8. Envolvimento de via nitrérgica nos relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	46
9. Neurocininas e relaxamentos induzidos pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	48
10. Estudo do mecanismo de transdução do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> em corpo cavernoso de coelho	50
10.1. Efeitos do PMA e staurosporina	50
10.2. Efeitos da toxina pertussis	52
10.3. Efeitos da tapsigargina	53
11. Fracionamento do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	54
12. Ensaio biológico das frações do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	55
V. Discussão	57
VI. Conclusões	67
VII. Referências Bibliográficas	68
Summary	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo hipotético da ereção peniana	3
Figura 2: Reação de formação do óxido nítrico catalisada pela óxido nítrico sintase	10
Figura 3: Micrografias eletrônicas de tecido trabecular de macaco	11
Figura 4: Morfologia externa do escorpião	17
Figura 5: Escorpião amarelo (<i>Tityus serrulatus</i>)	19
Figura 6: Superfusão de músculo liso em cascata	28
Figura 7: Efeitos do L-NAME em corpo cavernoso de coelho	33
Figura 8: Efeitos do L-NIO em corpo cavernoso de coelho	33
Figura 9: Efeitos do L-NMMA em corpo cavernoso de coelho	34
Figura 10a: Efeitos do L-NAME em corpo cavernoso de coelho (gráfico)	34
Figura 10b: Efeitos do L-NIO em corpo cavernoso de coelho (gráfico)	35
Figura 10c: Efeitos do L-NMMA em corpo cavernoso de coelho (gráfico)	35
Figura 11: Efeitos do TRIM em corpo cavernoso de coelho	36
Figura 12: Curvas concentração vs. atividade bNOS para L-NAME, D-NAME e TRIM	37
Figura 13: Efeitos do azul de metileno em corpo cavernoso de coelho	38
Figura 14: Efeitos do ODQ em corpo cavernoso de coelho	39
Figura 15: Efeitos do Hoe 140 em corpo cavernoso de coelho	40
Figura 16: Efeitos da atropina em corpo cavernoso de coelho	40
Figura 17: Efeitos da glibenclamida em corpo cavernoso de coelho	42
Figura 18: Efeitos da apamina em corpo cavernoso de coelho	42
Figura 19: Efeitos da charibdotoxina em corpo cavernoso de coelho	43
Figura 20: Efeitos do TEA em corpo cavernoso de coelho	43
Figura 21: Efeitos da tetrodotoxina em corpo cavernoso de coelho	44
Figura 22: Infusão de TTX durante os relaxamentos induzidos pelo veneno	45
Figura 23: Efeitos do vermelho de rutênio e tetrodotoxina em corpo cavernoso de coelho	47
Figura 24: Efeitos da substância P em corpo cavernoso de coelho	48
Figura 25: Efeitos do SR 140333 em corpo cavernoso de coelho	49
Figura 26: Efeitos do PMA em corpo cavernoso de coelho	50

Figura 27: Efeitos da staurosporina em corpo cavernoso de coelho	v 51
Figura 28: Efeitos da toxina pertussis em corpo cavernoso de coelho	52
Figura 29: Efeitos da tapsigargina em corpo cavernoso de coelho	53
Figura 30: Cromatografia em CM-celulose-52 do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Isoformas de óxido nítrico sintases	13
Tabela 2: Características dos escorpiões perigosos do Brasil	18
Tabela 3: Sítios receptores para neurotoxinas no canal de Na ⁺	25
Tabela 4: Conteúdo protéico das frações obtidas do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	30
Tabela 5: Percentagens de relaxamento na presença de bloqueadores de canais de K ⁺	41
Tabela 6: Percentagem de relaxamento das frações ativas na presença de L-NAME	55
Tabela 7: Percentagem de relaxamento das frações ativas na presença de tetrodotoxina	56

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh	acetilcolina
ADP	adenosina-5'-difosfato
Ads	adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina-5'-trifosfato
Bk	bradicinina
BH ₄	5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
Cap	capsaicina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMK	cromacalina
D-Arg	D-arginina
D-NAME	N ^G -nitro-D-arginina metil éster
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
ET-1	endotelina-1
ET-3	endotelina-3
Gs	proteína G estimulatória
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GTN	gliceriltrinitrato
Hoe 140	D-Arg-[Hyp ³ , Thi ⁵ , DTic ⁷ , Oic ⁸]-Bk
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfato
IP ₄	inositol-1,3,4,5-tetrafosfato
K _{ATP}	canais de potássio dependentes de ATP
K _{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio
L-Arg	L-arginina
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	N ^G -iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N ^ω -nitro-monometil-L-arginina
NA	noradrenalina
NANC	não-adrenérgico não-colinérgico

NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NO ₂ /NO ₃ ⁻	nitrito/nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
bNOS	óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
NPY	neuropeptídeo Y
ODQ	H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-alquinoxalin-1-one]
PKC	proteína quinase C
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PTx	toxina pertussis
RbCC	corpo cavernoso de coelho
SNC	sistema nervoso central
SP	substância P
SR 48968	(S)-N-metil-N[4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidino)-2-(3,4-diclorofenil)butil]benzamida
SR 140333	(S)-1-(2-[3,4-diclorofenil)-1-(3-isopropoxifenilacetil)piperidin-3-il]etil)-4-fenil-1-azoniabiciclo[2,2,2]octano
TEA	tetraetilamônio
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil)imidazol
TSV	veneno de <i>Tityus serrulatus</i>
TTX	tetrodotoxina
VIP	peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Acetilcolina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Adenosina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Adenosina-5'-trifosfato	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Apamina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Aprotinina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
D-arginina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
L-arginina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
N ^G -nitro-D-arginina metil éster	Bachem (Londres, G.B.)
N ^G -nitro-L-arginina metil éster	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
N ^o -nitro-monometil-L-arginina	Research Biochemicals Int. (Nattick, E.U.A.)
Atropina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Azul de metileno	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Bradicinina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Capsaicina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
CGRP	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Charibdotoxina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Cloridrato de lidocaína	Cristália (São Paulo, Brasil)
Cromacalina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Forbol-12-miristato-13-acetato	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Glibenclamida	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Gliceriltrinitrato	Lipha Pharmaceuticals (Londres, G.B.)
Hoe 140	Hoescht AG (Frankfurt, Alemanha)
N ^G -iminoetil-L-ornitina	Research Biochemicals Int. (Nattick, E.U.A.)
Indometacina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Noradrenalina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
ODQ	Tocris & Cookson Inc. (St. Louis, E.U.A.)
Pentobarbital Sódico	May & Baker (Dagenham, G.B.)
SR 48968	Sanofi Recherche (Montpellier, França)
SR 140333	Sanofi Recherche (Montpellier, França)

Staurosporina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Substância P	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Tapsigargina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Tetraetilamônio	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Tetrodotoxina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Toxina pertussis	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
TRIM	Tocris & Cookson Inc. (St. Louis, E.U.A.)
Vermelho de rutênio	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
VIP	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)

O veneno de *Tityus serrulatus* (TSV) foi obtido por estimulação elétrica dos escorpiões da seção de Artrópodes do Instituto Butantan (São Paulo) e, posteriormente, liofilizado.

RESUMO



RESUMO

Tityus serrulatus é o escorpião mais perigoso da subfamília Tityinae no Brasil devido à alta toxicidade de seu veneno e sua vasta distribuição nos centros urbanos da região sudeste do país. As manifestações clínicas mais importantes do envenenamento humano pelo veneno de *Tityus serrulatus* são dor local intensa acompanhada de queimação no local da picada podendo durar de poucos minutos a várias horas. Estas manifestações podem ser acompanhadas por disfunções autonômicas como vômitos profusos, taquicardia, alterações pupilares, sialorréia, taquipnéia, salivação, distúrbios da pressão arterial, tremores, etc. O veneno de *Tityus serrulatus* atua sobre as terminações nervosas do sistema nervoso autônomo estimulando a liberação de acetilcolina ou catecolaminas de diferentes órgãos e tecidos.

Os tecidos eréteis de diferentes espécies animais são inervados por fibras nervosas excitatórias adrenérgicas, inibitórias colinérgicas e inibitórias não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) que, por sua vez, desempenha papel importante nos mecanismos neurais envolvidos na ereção peniana através da liberação de óxido nítrico (NO). Assim, as fontes potenciais de produção de NO em corpo cavernoso de coelho são os nervos NANC bem como o endotélio que reveste a rede de capilares sinusóides presentes no tecido cavernoso. Devido à estimulação NANC causar o relaxamento do corpo cavernoso, investigamos os efeitos do veneno de *Tityus serrulatus* no corpo cavernoso de coelho.

Os efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e suas frações no corpo cavernoso de coelho isolado foram investigados através de ensaios biológicos em cascata. Os tecidos foram continuamente infundidos com indometacina (5.6 μM) para inibir a geração de produtos da ciclooxigenase. O veneno bruto de *Tityus serrulatus* (400 mg) foi purificado em coluna CM-celulose-52.

Veneno de *Tityus serrulatus* (3-100 μg), acetilcolina (ACh; 0.3-30 nmol) e gliceril trinitrato (GTN; 0.5-10 nmol) relaxaram as preparações pré-contraídas pela noradrenalina (3 μM) de modo dose-dependente.

Os inibidores não-específicos da NO sintase (NOS) N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 10 μM), N^o-nitro-monometil-L-arginine (L-NMMA; 10 μM) e N^G-iminoetil-L-ornitina (L-NIO; 30 μM) aumentaram o *tonus* dos tecidos e inibiram os relaxamentos induzidos por ACh e pelo veneno de *Tityus serrulatus* sem afetar aqueles induzidos pelo GTN. O efeito inibitório foi revertido pela infusão de L-arginina (300 μM), mas não D-arginina (300 μM). O inibidor da NOS

neuronal 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM, 100 μM) não afetou o *tonus* nem os relaxamentos induzidos por ACh, bradicinina (Bk), veneno de *Tityus serrulatus* e GTN. O TRIM foi aproximadamente 1000 vezes menos potente que o L-NAME em inibir a NOS cerebelar de coelho *in vitro*, cuja atividade é medida pela conversão de [^3H]-L-arginina para [^3H]-L-citrulina.

O inibidor seletivo de guanilato ciclase solúvel H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-alquinoxalin-1-ona] (ODQ; 30 μM) também aumentou o *tonus* basal dos tecidos e aboliu os relaxamentos induzidos pelos agonistas mencionados acima. O azul de metileno (30 μM) também inibiu os relaxamentos induzidos pelo veneno, porém, ao contrário do ODQ, a inibição foi irreversível.

O inibidor de proteases aprotinina (Trasylo[®]; 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), o antagonista de receptores muscarínicos atropina (1 μM) e o antagonista de receptores B₂ Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK; 50 nM) não afetaram os relaxamentos de RbCC induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*. Bloqueadores de canais de K⁺ como a glibenclamida (10 μM), apamina (0.1 μM), charibdotoxina (0.1 μM) e tetraetilamônio (10 μM) também não afetaram os relaxamentos induzidos pelo veneno.

Capsaicina (3 e 10 nmol) relaxou os tecidos de maneira dose-dependente e não-taquifilática. O vermelho de rutênio (30 μM), inibidor das respostas induzidas pela capsaicina, reduziu marcadamente os relaxamentos de RbCC causados pela capsaicina, mas não afetou aqueles induzidos pelo veneno. L-NAME (10 μM) não apresentou efeito sobre os relaxamentos induzidos pela capsaicina. Por outro lado, o bloqueador de canais de sódio tetrodotoxina (TTX; 1 μM) aboliu os relaxamentos de RbCC induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* sem afetar os induzidos por capsaicina, ACh e GTN. A TTX (1 μM) também reverteu prontamente a resposta do veneno quando infundido durante a fase de relaxamento.

Das treze frações obtidas do veneno bruto de *Tityus serrulatus*, apenas as frações X, XI e XII causaram relaxamento de RbCC de modo dose-dependente, cujo efeito foi marcadamente inibido na presença de L-NAME (10 μM) ou tetrodotoxina (1 μM).

Nós propomos portanto que o veneno de *Tityus serrulatus* atua seletivamente sobre as fibras NANC, possivelmente nitrérgicas, e que o NO gerado no nervo se difunde através dos terminais relaxando o músculo liso vascular adjacente. Além disso, a NOS neuronal (bNOS) já foi detectada no pênis humano e de rato usando-se anticorpos NOS específicos e imunohistoquímica. A descoberta de que o TRIM, um inibidor seletivo para a bNOS em camundongos, não afetou a liberação de NO induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*, pode refletir sua potência reduzida sobre a enzima do coelho.

r
ir
e
in

o
ir
re

INTRODUÇÃO



1. Anatomia e Fisiologia da Ereção Peniana

No interior do pênis, há dois segmentos cilíndricos pareados que se comunicam formando os corpos cavernosos, e um corpo esponjoso que circunda a uretra formando a glândula peniana, na porção distal. Os corpos cavernosos separam-se no períneo para formar a crura, a qual se fixa bilateralmente à porção inferior do ramo ísqueo-púbico/ipsilateral. Os corpos cavernosos e o corpo esponjoso, que contém tecido erétil, são circundados por um tecido fibroso e compacto, a túnica albugínea. O tecido erétil é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes das lacunas e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (Goldstein *et al.*, 1982; Krane *et al.*, 1989; Saenz de Tejada *et al.*, 1991a).

As artérias cavernosas promovem fluxo sangüíneo arterial para os corpos cavernosos através das artérias de resistência helicinais que se abrem diretamente em espaços lacunares (Figura 1). A drenagem venosa dos corpos cavernosos ocorre através das vênulas, localizadas entre a periferia do tecido erétil e a túnica albugínea. As vênulas se fundem para formar as veias emissárias maiores as quais rompem a túnica albugínea, e drenam em veias penianas extra-túnica denominadas veias cavernosa e crural (Puech-Leao *et al.*, 1987; Krane *et al.*, 1989).

A inervação periférica do pênis consiste de terminações nervosas simpáticas que emergem do 11º segmento torácico até o 2º segmento lombar da medula espinhal e, parassimpáticas e somáticas que emergem do 2º, 3º e 4º segmentos sacrais. A inervação somática ocorre através do nervo pudendo, composto de fibras eferentes que inervam a musculatura estriada do períneo, havendo também fibras aferentes do pênis e da pele perineal (Krane *et al.*, 1989).

Durante a ereção, o pênis atua como um capacitor, acumulando sangue sob pressão (Saenz de Tejada *et al.*, 1991a) devido ao estado de relaxamento dos corpos cavernosos (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Aboseif & Lue, 1988). No estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos (Figura 1). Juntos, exercem resistência máxima contra o influxo arterial, estado no qual apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais. Enquanto os sinusóides estão contraídos (estado flácido), estas veias drenam livremente para veias extra-penianas.

Durante a ereção, os músculos lisos de arteríolas e sinusóides relaxam reduzindo, conseqüentemente, a resistência periférica. Assim, a dilatação das artérias cavernosa e helicinal levam ao aumento do fluxo sangüíneo nos espaços lacunares. O relaxamento do músculo liso trabecular dilata os espaços lacunares, causando expansão do pênis. A pressão sangüínea sistêmica transmitida através das arteríolas helicinais dilatadas expande o músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas e reduz o efluxo venoso no espaço lacunar e, dessa forma, o pênis é mantido rígido. Dessa forma, a pressão no espaço lacunar durante a ereção é resultado do equilíbrio entre a pressão de perfusão na artéria cavernosa e a resistência ao efluxo sangüíneo pelas vênulas sub-túnicas comprimidas. A redução do efluxo venoso pela compressão mecânica das vênulas sub-túnicas é conhecida como mecanismo de oclusão venosa (Shirai *et al.*, 1978); este mecanismo é responsável por levar a pressão intracavernosa a um valor próximo da pressão sistêmica arterial média (Lue & Tanagho, 1987; Aboseif & Lue, 1988).

Detumescência é o resultado da contração do músculo liso peniano. A ativação de nervos constritores simpáticos causa um aumento do *tonus* muscular das artérias helicinais e das trabéculas. Isto resulta na redução do influxo arterial e diminuição dos espaços lacunares, com descompressão das vênulas sub-túnicas e, conseqüentemente, aumento do efluxo sangüíneo dos espaços lacunares, promovendo o retorno do pênis ao estado flácido (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Lue & Tanagho, 1988; Krane *et al.*, 1989).

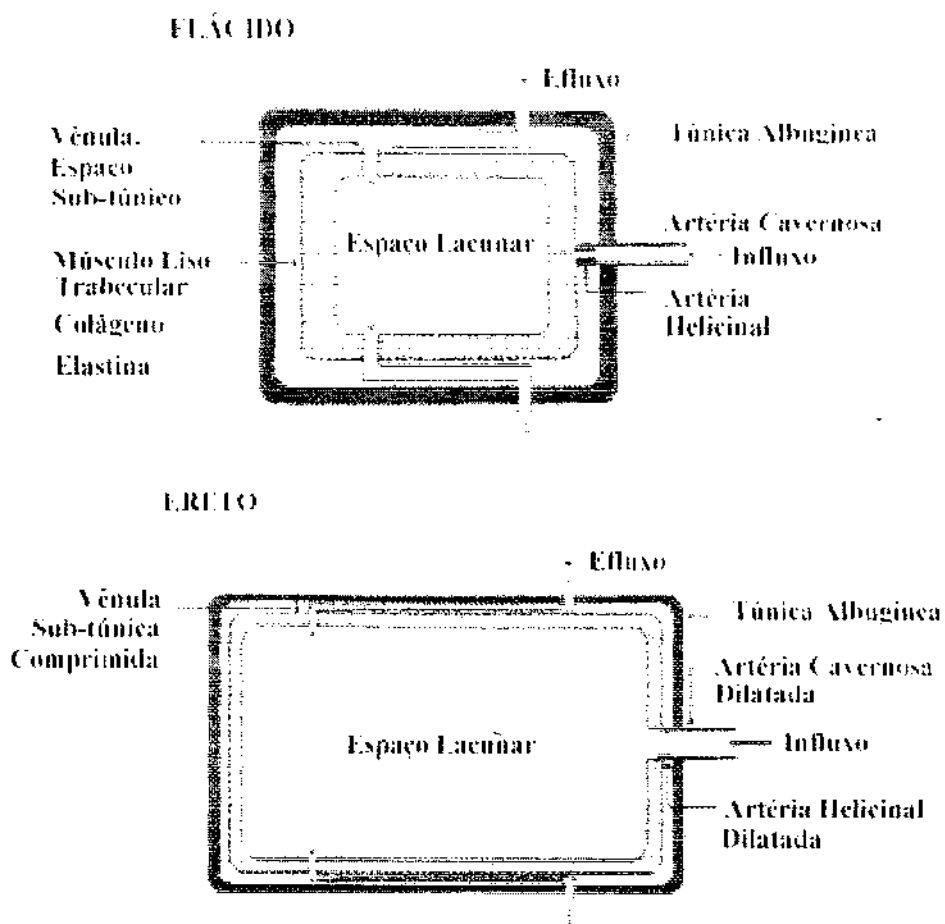


Figura 1: Mecanismo hipotético da ereção peniana (Krane *et al.*, 1989).

2. Hemodinâmica da Ereção

Durante a ereção, o volume do pênis aumenta pelo acúmulo de sangue, formando-se um ângulo entre 0 e 45° em relação ao plano horizontal. Neste estado, o pênis é mantido rígido e a pressão intracavernosa é próxima da pressão arterial média (Wagner, 1981). Além disso, da flacidez à ereção há um aumento médio de oito vezes do volume sanguíneo intrapeniano (Shirai *et al.*, 1976).

Há muitas controvérsias acerca dos mecanismos de ereção peniana e sua hemodinâmica. Inicialmente, foi introduzido o conceito que o relaxamento das artérias cavernosas, do músculo liso dos corpos cavernosos e do músculo retrator do pênis é condição essencial para a ereção (Kölliker, 1852). Posteriormente, foi criado o conceito que o tecido erétil promove a rigidez do pênis devido à resistência ao influxo sanguíneo para os corpos cavernosos ser menor do que a resistência ao efluxo (Eckhard, 1863; Eckhard,

1869). Há também resultados conflitantes a respeito do mecanismo de oclusão venosa durante a ereção, visto que alguns estudos demonstram que o fluxo sangüíneo das veias dorsais penianas é normal no cão anestesiado (Dorr & Brody, 1967; Andersson *et al.*, 1984). Foi então estabelecido que a ereção peniana pode ocorrer na ausência de um mecanismo que reduza o efluxo venoso dos corpos cavernosos (Shirai *et al.*, 1978; Shirai & Ishii, 1981), ou que a total obstrução não é necessária para que se obtenha uma ereção completa (Watanabe *et al.*, 1992). Entretanto, vários estudos demonstram a ocorrência de um efluxo venoso restrito em várias espécies, incluindo o cão e o homem (Aoki *et al.*, 1986; Jünemann *et al.*, 1986; Fournier *et al.*, 1987; Valji & Bookstein, 1987; Aoki *et al.*, 1989; Vardi & Siroky, 1990; Hanyu *et al.*, 1992; Vardi & Siroky, 1993). Esta discrepância pode ser explicada devido ao pênis possuir dois sistemas eréteis: a alta pressão dos corpos cavernosos e a baixa pressão do corpo esponjoso e glânde peniana (Purohit & Beckett, 1979; Carati *et al.*, 1987; Carati *et al.*, 1988). No cão, as veias penianas dorsais drenam somente para a glânde peniana sem apresentar relação com os corpos cavernosos. Mecanismos venooclusivos são demonstrados nos corpos cavernosos, mas não no corpo esponjoso (Purohit & Beckett, 1979). Assim, os corpos cavernosos podem constituir um "sistema fechado", enquanto que o corpo esponjoso é um "sistema de fluxo unidirecional", drenando livremente através de veias penianas. Portanto, a pressão nos corpos esponjosos é mantida primariamente por um estado de fluxo elevado através da glânde peniana, enquanto que a pressão intracavernosa depende de mecanismos de oclusão venosa durante a ereção (Vardi & Siroky, 1990).

Geralmente, é aceito que a ereção peniana é mediada principalmente via nervos pélvicos (Bell, 1972), embora a seqüência detalhada do evento não esteja completamente estabelecida. Após a estimulação dos nervos pélvicos no cão, nota-se que a resposta erétil parece ser resultado de dois principais eventos circulatórios. A primeira resposta corresponde a uma dilatação imediata dos vasos de resistência penianos, causando um grande influxo sangüíneo arterial enquanto que, a segunda resposta é caracterizada por um rápido preenchimento dos corpos cavernosos e, portanto, aumento na pressão intracavernosa (Andersson *et al.*, 1984). É proposto que este mecanismo parassimpático inicial é seguido pelo mecanismo muscular somatomotor, produzindo a rigidez peniana por compressão muscular dos corpos cavernosos distendidos através da contração dos músculos ísquiocavernosos (Jünemann *et al.*, 1989). Entretanto, em voluntários jovens não ocorre atividade elétrica nos músculos ísquio ou bulbocavernosos durante o

desenvolvimento de tumescência e ereção a menos que o indivíduo voluntariamente contraia tais músculos. Apenas durante a ejaculação se desenvolve um padrão bem definido de contração e atividade elétrica (Gerstenberg *et al.*, 1990).

A fase de detumescência é menos estudada do que a fase erétil. As mudanças hemodinâmicas durante a detumescência representam a reversão daquelas ocorridas durante a ereção: contração do músculo liso cavernoso, diminuição do fluxo arterial e completa restauração do efluxo venoso, tanto passiva (devido ao *tonus* intrínseco do músculo liso) quanto ativamente (aumento na atividade simpática), ou ambos. Em voluntários, a atividade elétrica do músculo liso do corpo cavernoso diminui durante a ereção sendo retomada na fase de detumescência (Wagner *et al.*, 1989).

Em cães, a ereção induzida por estimulação do nervo cavernoso compreende três fases de detumescência (Bosch *et al.*, 1991). Na fase inicial, é registrado um pequeno aumento na pressão, provavelmente devido a contração do músculo liso cavernoso; o fluxo arterial retorna aos níveis basais. Esta fase é, portanto, dependente do influxo arterial e da contração do músculo liso cavernoso. A segunda fase corresponde a um período de pequeno decréscimo na pressão associado a uma possível ocorrência de drenagem venosa. Durante a terceira fase, há um rápido decréscimo na pressão intracavernosa, enquanto a drenagem venosa é completamente restaurada.

O processo de ereção e detumescência pode ser resumido e dividido em várias fases diferentes. A *fase 0* corresponde à fase flácida. Quando o pênis está no estado flácido, há predomínio da estimulação simpática, fazendo com que as arteríolas e o músculo liso do corpo cavernoso permaneçam contraídos. O fluxo sanguíneo através da artéria cavernosa é mínimo, apenas para propósitos nutricionais. A atividade elétrica do músculo liso do corpo cavernoso durante este estado indica que as células estão contraídas (Wagner *et al.*, 1989). O efluxo venoso das veias subtúnicas para veias emissárias maiores encontra-se normal. A *fase 1* corresponde à fase de latência (preenchimento). Após a estimulação sexual, a atividade parassimpática aumenta, observando-se aumento no fluxo sanguíneo através das artérias pudenda interna e cavernosa, sem acarretar mudanças na pressão sanguínea sistêmica. A resistência periférica é diminuída devido à dilatação das artérias cavernosa e helicinal. O pênis se alonga, mas a pressão intracavernosa permanece inalterada. A *fase 2* corresponde à fase de tumescência. Em jovens normais, o aumento do influxo sanguíneo a partir do estado flácido é cerca de 25 a 60 vezes (Wagner, 1981). A pressão intracavernosa

aumenta rapidamente. Devido ao relaxamento do músculo liso trabecular, a conformação do tecido cavernoso é bastante realçada, causando a rigidez peniana e, conseqüentemente, a ereção. Ao final desta fase, o fluxo arterial diminui. A fase 3 corresponde à fase de ereção completa. O músculo liso trabecular expande e, juntamente com o volume sanguíneo aumentado, comprimem o plexo de vênulas subtúnicas contra a túnica albugínea, reduzindo o efluxo venoso (mecanismo de oclusão venosa) e aumentando a pressão intracavernosa até cerca de 10-20 mmHg abaixo da pressão sanguínea sistólica. Em coelhos, o aumento na resistência ao efluxo venoso é estimado em torno de 100 vezes (Saenz de Tejada *et al.*, 1991a). O fluxo venoso é ligeiramente maior do que durante o estado flácido. O fluxo pela artéria pudenda interna é reduzido em comparação à fase de preenchimento, mas ainda maior que no estado flácido. A fase 4 corresponde à fase de ereção rígida. A pressão intracavernosa aumenta acima da pressão sistólica como conseqüência da contração voluntária ou reflexogênica dos músculos ísquio e bulbocavernoso. Não há fluxo sanguíneo através da artéria cavernosa neste estado. A fase 5 corresponde à fase de transição. A atividade aumentada do sistema nervoso simpático leva ao aumento do *tonus* nas artérias helicinais e contração do músculo liso trabecular. O fluxo arterial é retomado a um nível baixo, porém o mecanismo venooclusivo ainda está ativado. A fase 6 corresponde à fase inicial de detumescência. Há um declínio moderado na pressão intracavernosa, indicando a retomada do efluxo venoso bem como a diminuição do fluxo arterial. Finalmente, a fase 7 corresponde à fase rápida de detumescência. A pressão intracavernosa decai rapidamente, o mecanismo veno-oclusivo torna-se inativado, o fluxo sanguíneo arterial retorna ao seu estado de pré-estimulação, e o pênis ao estado flácido.

3. Neurotransmissão Periférica e Mecanismos de Ativação

3.1. Mecanismos Adrenérgicos

Nervos adrenérgicos estão presentes em artérias cavernosa e helicinal, bem como no músculo liso cavernoso de humanos (Shirai *et al.*, 1972; Shirai *et al.*, 1973; Benson *et al.*, 1980; McConnel & Benson, 1982; Gu *et al.*, 1983) e de várias espécies animais (Dail, 1993). No estado de detumescência, estas estruturas são mantidas contraídas principalmente pela liberação de noradrenalina (NA) atuando em receptores α pós-sinápticos. Tal liberação pode ser modulada via receptores α_2 pré-sinápticos (Hedlund *et al.*, 1984; Molderings *et al.*, 1989). Mesmo na presença de atividade miogênica e de outros fatores constritores (prostanóides, endotelinas, neuropeptídeo Y), a modulação da atividade adrenérgica é um dos fatores mais importantes para a manutenção do estado contrátil do músculo liso do corpo cavernoso e da vasculatura peniana (Giuliano *et al.*, 1993).

As células do músculo liso do corpo cavernoso humano possuem uma quantidade de receptores α 10 vezes maior do que a de receptores β (Levin & Wein, 1980), sendo estimado que cada célula contenha cerca de 65000 sítios ligantes do tipo α (Costa *et al.*, 1993). Tanto a fenilefrina (seletiva para receptores α_1) quanto a clonidina (seletiva para receptores α_2) contraem o músculo liso do corpo cavernoso, sugerindo a presença de ambos os receptores neste tecido. Entretanto, a clonidina é menos potente e tem uma atividade intrínseca menor do que a fenilefrina e a NA (Hedlund & Andersson, 1985a; Kimura *et al.*, 1989; Christ *et al.*, 1990), favorecendo o ponto de vista da predominância funcional de receptores α_1 . Em tecido cavernoso humano já foram identificados três subtipos de receptores α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1C}) com predominância de α_{1A} e α_{1C} (Price *et al.*, 1993).

Em corpo cavernoso, a densidade de receptores β é apenas 1/10 da densidade de receptores α (Levin & Wein, 1980), mas tanto a isoprenalina quanto o salbutamol relaxam preparações de corpo cavernoso humano contraídas com NA e inibem a atividade contrátil espontânea (Adaikan *et al.*, 1981; Hedlund & Andersson, 1985a). Os relaxamentos induzidos por isoprenalina ou salbutamol podem ser bloqueados pelo propranolol, mas não pelo practolol (β_1) ou butoxamina (β_2), sugerindo que os receptores β em corpo cavernoso humano não são dos subtipos β_1 ou β_2 (Adaikan, 1979; Adaikan *et al.*, 1981). Entretanto,

outros estudos sugerem que em corpo cavernoso humano, estes receptores são do tipo β_2 (Dhabuwala *et al.*, 1985; Hedlund & Andersson, 1985a).

3.2. Mecanismos Colinérgicos

Recentemente, demonstrou-se que em células isoladas de músculo liso de corpo cavernoso humano são encontrados cerca de 45000 sítios ligantes para receptores muscarínicos (Costa *et al.*, 1993). Esta quantidade é cerca de 15 vezes inferior a de receptores α -adrenérgicos. Acredita-se que os receptores muscarínicos em corpo cavernoso humano sejam dos tipos M_2 e M_3 (Traish *et al.*, 1990).

É importante enfatizar que a atividade parassimpática não é apenas equivalente às ações da acetilcolina; outros transmissores podem ser liberados dos nervos colinérgicos. Assim, há pelo menos três mecanismos pelos quais a atividade parassimpática possa contribuir para a tumescência peniana e ereção, sendo que todos diminuem os efeitos da NA: (1) a liberação de NA pode ser inibida por estimulação de receptores muscarínicos nos terminais nervosos adrenérgicos, (2) os efeitos pós-sinápticos da NA podem ser atenuados pela liberação de um fator relaxante do endotélio mediada pelos receptores muscarínicos, e (3) os efeitos pós-sinápticos da NA podem ser neutralizados por fatores relaxantes, tais como o óxido nítrico (NO) e peptídeos vasodilatadores liberados dos terminais nervosos parassimpáticos (Klinge & Sjöstrand, 1977a; Hedlund & Andersson, 1985b; Saenz de Tejada *et al.*, 1988a).

3.3. Mecanismos Não-Adrenérgicos Não-Colinérgicos

A existência de uma inervação inibitória não-adrenérgica não-colinérgica (NANC) foi primeiramente demonstrada em músculo anococcígeno de rato e em músculo retrator de pênis bovino (Gillespie, 1972; Klinge & Sjöstrand, 1974). Possíveis mediadores dos nervos inibitórios NANC nestes músculos e na artéria peniana foram discutidos por Gillespie *et al.* (1990), que sugeriram o óxido nítrico (NO) como provável candidato.

Em músculo liso de corpo cavernoso isolado de várias espécies, o relaxamento provocado por estimulação elétrica pode ser bloqueado por inibidores da NOS (Ignarro *et al.*, 1990a; Holmquist *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Rajfer *et al.*, 1992).

A acetilcolina apresenta efeitos inibitórios, tanto pré quanto pós-juncionais, sobre a neurotransmissão adrenérgica em tecido erétil humano isolado. Entretanto, alguns experimentos em tecidos eréteis isolados mostram que a estimulação de receptores muscarínicos não inibe (Klinge & Sjöstrand, 1977b; Andersson *et al.*, 1983; Dail *et al.*, 1987) ou inibe pouco (Saenz de Tejada *et al.*, 1988a) os relaxamentos induzidos por estimulação elétrica. Além disso, a observação que a atropina não apresenta efeito inibitório nas ereções provocadas por estimulação visual ou por vibração local (Wagner, 1981) favorece a hipótese da existência de um mediador NANC para o processo de ereção peniana. O fato do bloqueio de receptores muscarínicos não afetar os relaxamentos induzidos por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho (Holmquist *et al.*, 1992a) e de rato (Dail *et al.*, 1987) aliado à observação que a acetilcolina endógena não é fator majoritário na geração de NO em tecido erétil (Holmquist *et al.*, 1992a), sugere um papel para o NO proveniente das terminações NANC como o principal mediador neuronal na ereção peniana (Burnett *et al.*, 1992).

4. Descoberta do EDRF e Posterior Identificação como Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadski relataram que a acetilcolina relaxava aorta isolada de coelho apenas na vigência de um endotélio íntegro. Posteriormente, tornou-se claro que os relaxamentos mediados pelo fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) estavam diretamente associados com níveis aumentados de GMPc nas células musculares lisas (Rapoport & Murad, 1983). Este mecanismo de relaxamento era semelhante ao dos nitrovasodilatadores, que também exercem seu efeito através da formação de GMPc (Katsuki & Murad, 1977; Katsuki *et al.*, 1977), mas de maneira independente do endotélio (Furchgott & Zawadski, 1980; Rapoport & Murad, 1983). As propriedades relaxantes dos nitrovasodilatadores mostraram ser dependentes da formação de óxido nítrico (NO) (Arnold *et al.*, 1977; Katsuki *et al.*, 1977). Estudos subsequentes revelaram que o EDRF era uma substância de meia-vida curta (Förstermann *et al.*, 1984; Griffith *et al.*, 1984) e que o óxido nítrico (NO) seria responsável pela atividade biológica desta substância (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). O aminoácido L-arginina foi estabelecido como substrato para a síntese

de NO/EDRF em células endoteliais e outros tipos celulares (Schmidt *et al.*, 1988; Palmer & Moncada, 1989).

4.1. Óxido Nítrico

Demonstrou-se inicialmente que a acetilcolina e vários outros agentes, podem liberar fatores relaxantes do endotélio vascular (Furchgott & Zawadski, 1980), e um destes fatores foi identificado como NO, sintetizado a partir da L-arginina por uma óxido nítrico sintase (NOS) (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1989; Ignarro, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Moncada, 1992) (Figura 2).

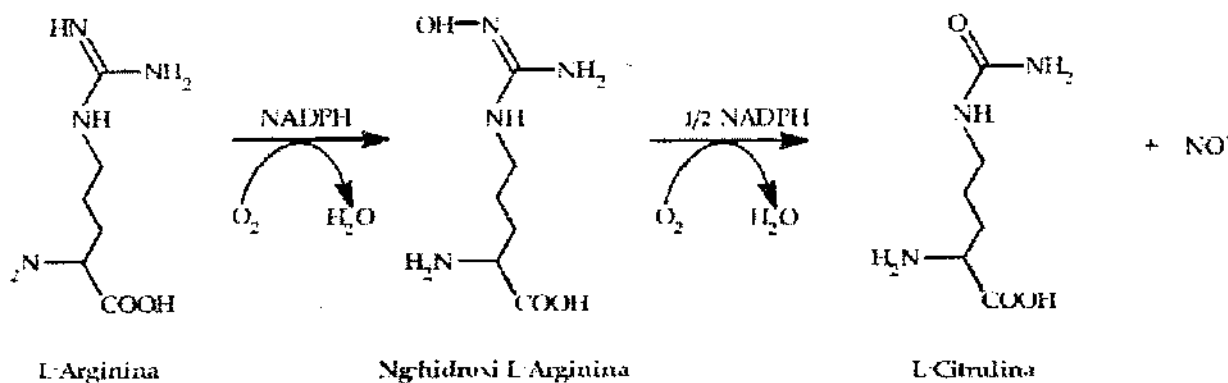


Figura 2: Reação de formação do óxido nítrico (NO) catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS).

Vários estudos demonstram que o relaxamento induzido por acetilcolina ou estimulação elétrica envolve a liberação de NO (ou alguma molécula estritamente relacionada) em corpo cavernoso humano e de coelho (Ignarro *et al.*, 1990a; Holmquist *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Knispel *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1992a; Bush *et al.*, 1992b; Holmquist *et al.*, 1992a; Knispel *et al.*, 1992a; Knispel *et al.*, 1992b; Rajfer *et al.*, 1992). Tanto o endotélio vascular quanto os próprios nervos que inervam o corpo cavernoso podem potencialmente ser a fonte de NO envolvida na ereção. Neste contexto, já foi demonstrada a presença de terminais nervosos próximos às células endoteliais (Figura 3).

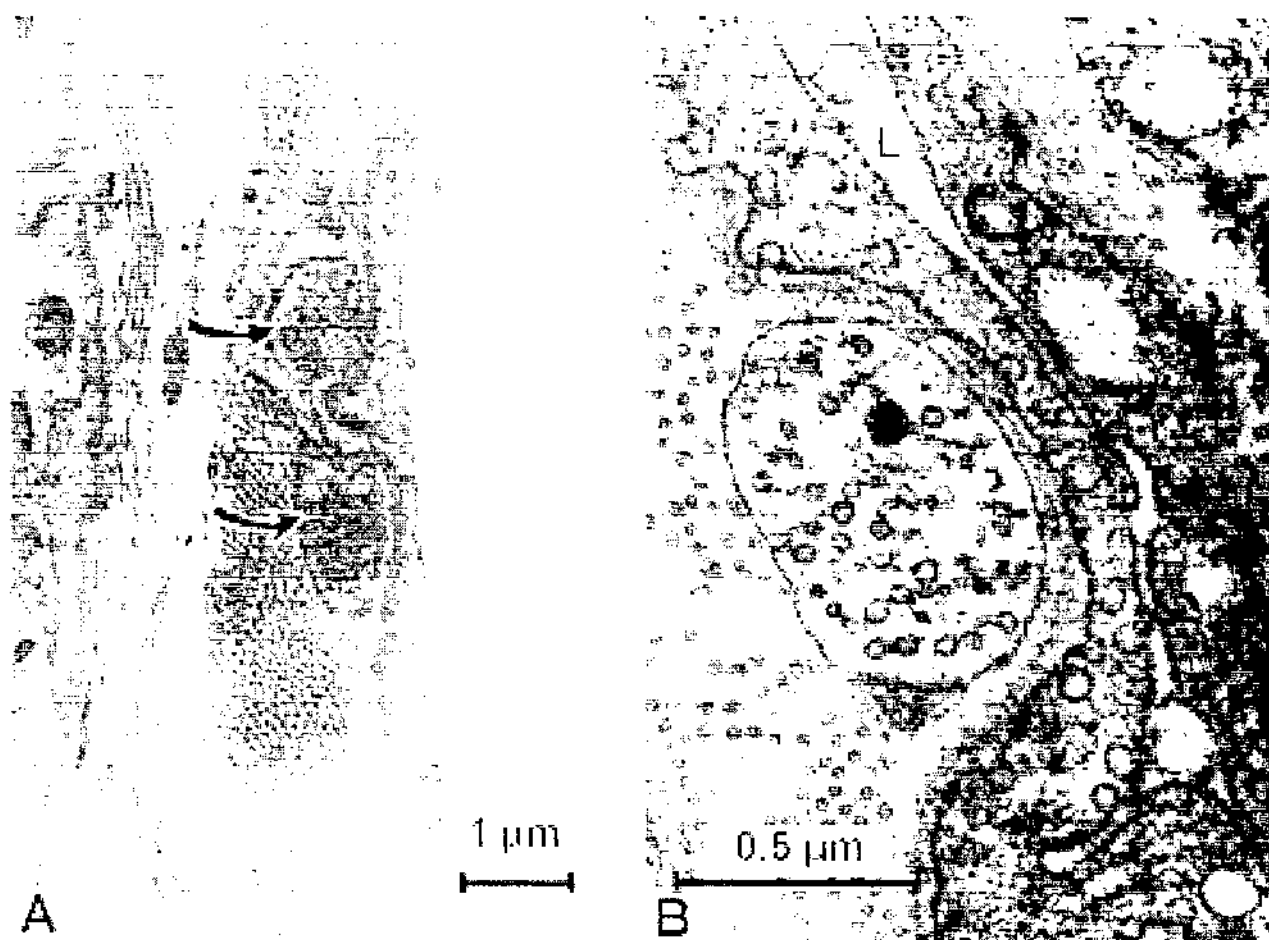


Figura 3: Micrografias eletrônicas de tecido trabecular em corpo cavernoso de macaco ("green monkey"). *A:* dois terminais axônicos (setas) próximos a uma célula endotelial. *B:* pequeno terminal nervoso adjacente a uma célula endotelial. O axônio está "exposto" e não revestido por uma célula de Schwann ou lâmina basal. O terminal contém vesículas claras e uma vesícula granular grande. A fenda entre o axônio e a célula endotelial é estreita e preenchida por lâmina basal (L) do endotélio sinusóide (Schmalbruch & Wagner, 1989).

O NO e outros vasodilatadores que atuam por liberação de NO (nitroglicerina, nitroprussiato de sódio, S-nitroso-N-acetilpenicilamina e linsidomina) estimulam a guanilato ciclase solúvel, levando ao aumento dos níveis de GMPc (Heaton *et al.*, 1990; Ignarro *et al.*, 1990a; Holmquist *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1992a; Bush *et al.*, 1992b; Holmquist *et al.*, 1992a; Kirkeby *et al.*, 1993). O efeito relaxante da estimulação elétrica pode ser aumentado pela inibição seletiva da GMPc fosfodiesterase (Ignarro *et al.*, 1990a; Bush *et al.*, 1992a; Bush *et al.*, 1992b; Holmquist *et al.*, 1993), demonstrando que o NO liberado de fontes neuronais atua por estimulação da guanilato ciclase solúvel.

4.2. Isoformas de Óxido Nítrico Sintases

O NO é produzido por ação das óxido nítrico sintases (NOS), as quais catalizam a conversão de L-arginina em NO e L-citrulina, em quantidades equimolares (Iyengar *et al.*, 1987; Stuehr & Griffith, 1992; Marletta, 1993; Knowles & Moncada, 1994). São conhecidas duas categorias de NOS: (a) enzimas constitutivas, reguladas por íons cálcio e calmodulina e, (b) enzimas induzidas, ligadas à calmodulina, porém, independentes de cálcio (Tabela 1). Ambos os tipos consistem de um grupo heme e um domínio de flavinãs ligados por um polipeptídeo que serve como sítio ligante para a calmodulina (Gerber & Montellano, 1995).

Na análise de frações subcelulares de células endoteliais em cultura, verificou-se que 95% da atividade enzimática da NOS estava diretamente correlacionada à fração particulada da enzima (fração ligada à membrana), contra apenas 5% de atividade na fração citosólica (Förstermann *et al.*, 1991a). Para sua atividade, a NOS endotelial requer cálcio/calmodulina, NADPH e 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄) (Förstermann *et al.*, 1991b).

No sistema nervoso central (SNC), a estimulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) leva à produção cálcio-dependente de NO (ou algum composto nitrosilado) que, por sua vez, estimula a guanilato ciclase do tecido cerebral. Estudos subseqüentes revelaram que a fração citosólica do cérebro contém uma enzima que produz NO a partir de L-arginina (Knowles *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1989). A presença de uma via de transdução de sinais envolvendo NO no SNC levou ao estudo da enzima-chave neste evento, a NOS neuronal. A enzima presente em células de neuroblastoma N1E-115 foi localizada exclusivamente no citosol (Gorsky *et al.*, 1989), utilizava L-arginina como substrato e requeria NADPH como cofator, além de ser regulada por cálcio e calmodulina (Förstermann *et al.*, 1990a).

A NOS derivada do endotélio é primariamente ligada à membrana, enquanto que a NOS derivada de neurônios é primariamente citosólica ou solúvel (Bredt & Snyder, 1989; Pollock *et al.*, 1991). A isoforma constitutiva de NOS está ausente em células musculares. Em vista disso, acredita-se que a isoforma constitutiva de NOS em corpo cavernoso está primariamente distribuída em tecido neuronal, provavelmente nos neurônios NANC que inervam o corpo cavernoso. Esta NOS é dependente de NADPH, cálcio, calmodulina, sendo a atividade enzimática maior na presença de BH₄ (Bush *et al.*, 1992c).

A NOS demonstrada em corpo cavernoso de rato e de coelho exibe grande atividade em virtude de sua capacidade de converter [³H]arginina em [³H]citrulina (Burnett *et al.*, 1992;

Bush *et al.*, 1992c). Em corpo cavernoso de coelho, a isoforma de NOS é constitutiva e citosólica (Bush *et al.*, 1992c) como aquela encontrada em neurônios cerebrais (Förstermann *et al.*, 1991c). Esta NOS citosólica presente em corpo cavernoso justifica o fato de que a estimulação neuronal NANC de corpo cavernoso causa relaxamento do músculo liso por mecanismos atribuídos à via L-arginina/NO/GMPc (Ignarro *et al.*, 1990a; Ignarro *et al.*, 1990b; Bush *et al.*, 1992c; Rajfer *et al.*, 1992).

Tabela 1: Isoformas de óxido nítrico sintases

Isoforma	Outro nome	Fração celular	Regulação	M (kDa)	Localização
NOS I	bNOS	Solúvel	Ca ²⁺ /calmodulina	155	Neurônios periféricos e centrais, ilhotas pancreáticas, etc.
NOS II	iNOS	Solúvel	Expressão induzida por citocinas e endotoxina	125	Macrófagos, hepatócitos, músculo liso, etc.
NOS III	eNOS	Particulada	Ca ²⁺ /calmodulina	135	Células endoteliais, células epiteliais renais

5. Neuropeptídeos

Foi demonstrada a ocorrência de vários peptídeos em nervos do músculo liso do corpo cavernoso e em vasos penianos de humanos e de vários animais (Lincoln *et al.*, 1991; Andersson, 1993; Dail, 1993; de Groat & Booth, 1993). Isto levou a especulações sobre suas funções como transmissores excitatórios ou inibitórios e/ou moduladores da neurotransmissão.

(1) Endotelinas: A endotelina 1 (ET-1; Yanagisawa *et al.*, 1988) possui um efeito vasoconstritor potente e duradouro e pode ser um dos fatores que contribuem para a manutenção da flacidez do pênis. Em corpo cavernoso de coelho, as contrações induzidas por ET-1 são atenuadas pela nimodipina (Holmquist *et al.*, 1990a). Tais contrações são reduzidas, mas não abolidas, em meio desprovido de Ca²⁺. Em corpo

cavernoso de coelho, o componente contrátil observado na ausência de Ca^{2+} é abolido por inibidores de proteína quinase C (PKC), o que sugere a hidrólise de fosfoinosítídeos (Holmquist *et al.*, 1992b). Devido às ETs não serem estocadas em grânulos (Nakamura *et al.*, 1990), a liberação de ETs deve ser preferencialmente regulada pela sua síntese do que por mecanismos de secreção. Altas concentrações de ETs podem ser alcançadas localmente e, desta forma, podem contribuir para um *tonus* sustentado do músculo liso (Saenz de Tejada *et al.*, 1991b), ou seja, pode ser importante para os mecanismos de detumescência e flacidez. Por outro lado, foi recentemente demonstrado que a ET-3 apresenta ação dilatadora da vasculatura peniana em ratos provavelmente mediada pela ativação de receptores ET_B , levando à liberação local de NO (Ari *et al.*, 1996), sugerindo um papel na manutenção da ereção peniana.

(2) Neuropeptídeo Y: O neuropeptídeo Y (NPY) está localizado juntamente com a NA em neurônios pós-ganglionares adrenérgicos e, combinado à NA, participa na resposta vasoconstritora de muitos vasos sangüíneos (Grundemar & Hakansson, 1993; Wahlestedt & Reis, 1993). O NPY não produz efeitos em corpo cavernoso ou em segmentos de artéria cavernosa (Hedlund & Andersson, 1985b). Também não se observou qualquer sinergismo do NPY e NA em corpo cavernoso de coelho (Yajima *et al.*, 1992).

(3) Polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP): Diversos estudos imunohistoquímicos demonstram a presença do VIP em nervos autonômicos de corpo cavernoso humano (Polak *et al.*, 1981; Gu *et al.*, 1983; Willis *et al.*, 1983; Steers *et al.*, 1984; Lincoln *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1991; Kirkeby *et al.*, 1992). A densidade de nervos que contém VIP excede a de nervos adrenérgicos (Gu *et al.*, 1983). Em corpo cavernoso humano, o VIP possui um efeito relaxante e inibitório pronunciado sobre atividade contrátil espontânea (miogênica) e sobre contrações induzidas por estímulo elétrico (Larsen *et al.*, 1981; Andersson *et al.*, 1983; Willis *et al.*, 1983; Steers *et al.*, 1984; Hedlund & Andersson, 1985b; Adaikan *et al.*, 1986; Hedlund *et al.*, 1994a; Hedlund *et al.*, 1994b); porém possui uma atividade relativamente menor sobre as contrações induzidas por NA (Willis *et al.*, 1981; Steers *et al.*, 1984; Hedlund & Andersson, 1985b; Kirkeby *et al.*, 1992; Pickard *et al.*, 1993; Hedlund *et al.*, 1994a; Hedlund *et al.*, 1994b). A incapacidade do VIP em promover ereção em voluntários sadios (Wagner & Gerstenberg, 1987) e em indivíduos impotentes (Adaikan *et al.*, 1986; Kiely *et al.*, 1989; Roy *et al.*, 1990) juntamente com a

demonstração dos efeitos do NO em tecidos eréteis, indica que o VIP provavelmente não é o principal mediador NANC da ereção peniana.

(4) Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP): Nervos do corpo cavernoso de várias espécies, tais como rato (Lamano Carvalho *et al.*, 1986), cão (Stief *et al.*, 1990), macaco (Stief *et al.*, 1993) e homem (Stief *et al.*, 1991) apresentam imunorreatividade ao CGRP. O CGRP é conhecido por ser um potente vasodilatador numa variedade de vasos sangüíneos humanos, onde acredita-se que induza um relaxamento dependente do endotélio (Crossman *et al.*, 1987). Este peptídeo também é capaz de relaxar artéria peniana bovina, principalmente por atuar diretamente no músculo liso (Alaranta *et al.*, 1991).

(5) Substância P (SP): A presença de nervos contendo SP em corpo cavernoso é bastante esparsa (Andersson *et al.*, 1983; Gu *et al.*, 1983; Lincoln *et al.*, 1991), e testes de imunorreatividade à SP mostram que estas fibras nervosas estão localizadas principalmente abaixo do epitélio da glândula peniana (Gu *et al.*, 1983). Em segmentos de corpo cavernoso humano contraídos por NA, a SP produz relaxamento moderado e transitório (Andersson *et al.*, 1983). Os relaxamentos evocados por SP são potencializados pela indometacina, reduzidos pelo CHAPS (o qual destrói o endotélio) e bloqueados por inibidores da síntese de NO, tais como o L-NMMA (Azadzi *et al.*, 1992). No cão anestesiado, a SP produz vasodilatação (Andersson *et al.*, 1984). Esta ação, em conjunto com o relaxamento observado em corpo cavernoso humano, pode ser explicada pelo fato da SP liberar NO do endotélio. Entretanto, SP contrai o músculo retrator do pênis bovino (Klinge & Sjöstrand, 1974) e, em segmentos de corpo cavernoso humano, observa-se efeitos contráteis sob tensão basal.

6. Canais de Potássio e Relaxamento de Corpo Cavernoso

Os vasos sangüíneos exibem graus variáveis de *tonus* o qual resiste à distensão devida ao fluxo sangüíneo e permite a regulação do suprimento de sangue a regiões específicas. Mudanças de *tonus* não afetam somente o fluxo sangüíneo local, mas também alteram a pressão sistêmica geral.

Recentemente, tem sido estudada intensamente a função dos canais de potássio (K^+) na modulação do *tonus* vascular. No coração (Noble, 1984), sistema nervoso central (North, 1989) e em músculo liso (Bülbring & Tomita, 1987), a abertura de canais de K^+ direciona o potencial de membrana para valores mais negativos, levando a célula para uma condição na qual a mesma torna-se menos excitável.

Devido ao músculo liso do corpo cavernoso conter vários tipos de canais de K^+ , espera-se que drogas que interfiram com estes canais possam afetar o relaxamento e a contração neste tecido. Agonistas de canais de K^+ como o pinacildil, nicorandil e cromacalina, relaxam vários tipos de células musculares lisas por abertura de canais de K^+ permeáveis ao $^{86}Rb^+$. Isto, por sua vez, hiperpolariza as células e previne a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Weston & Abbott, 1987; Cook, 1988; Hamilton & Weston, 1989; Quast & Cook, 1989; Robertson & Steinberg, 1990; Andersson, 1992).

O pinacidil, um derivado da cianoguanidina, abole a atividade contrátil espontânea de corpo cavernoso humano isolado, relaxa preparações contraídas por NA e inibe contrações induzidas por estimulação elétrica dos nervos. O pinacidil também deprime as contrações induzidas por baixas concentrações de K^+ e aumenta o efluxo de $^{86}Rb^+$ (Holmquist *et al.*, 1990b). Em corpo cavernoso isolado de coelho, a cromacalina, um derivado do benzopireno (mistura de 2 formas enantioméricas designadas BRL 38226 e BRL 38227) é de 3 a 4 vezes mais potente como agente relaxante do que o pinacidil (Holmquist *et al.*, 1990b). O nicorandil, que além de ser um agonista de canais de K^+ também atua como doador de NO, é um derivado das nicotinamidas e produz o relaxamento de preparações de corpo cavernoso humano e de artéria cavernosa (Hedlund *et al.*, 1994c).

7. Veneno de Escorpiões

Toxinas provenientes de venenos de escorpiões são proteínas que mimetizam os efeitos de estimulação nervosa (Moss *et al.*, 1974a; Moss *et al.*, 1974 b) e são bastante utilizadas como ferramentas no estudo de mecanismos referentes aos canais de sódio (Jaimovich *et al.*, 1982; Nagy, 1988; Vassilevet *et al.*, 1988) e de potássio (Blaustein *et al.*, 1991; Rogowski *et al.*, 1994; Vatanpour & Harvey, 1995). Tais toxinas possuem um valor inestimável na neurobiologia, sendo instrumentos valiosos no esclarecimento de fenômenos farmacológicos e fisiopatológicos. O conhecimento do modo e mecanismo de ação destas

toxinas vem evoluindo consideravelmente nas últimas décadas. Isto é devido, por um lado, ao seu isolamento em estado de pureza e conhecimento de sua estrutura química e; de outro, ao emprego de métodos de investigação não disponíveis ou pouco divulgados no passado.

7.1. Morfologia Externa dos Escorpiões

Os escorpiões, ou lacraus, têm o corpo dividido em cefalotórax, mesosoma e cauda, sendo que esta última apresenta um ferrão que se comunica com o telson ou vesícula, pelo qual é inoculado o veneno. Possuem também quatro pares de pernas, um par de pedipalpos e um par de quelíceras (Figura 4).

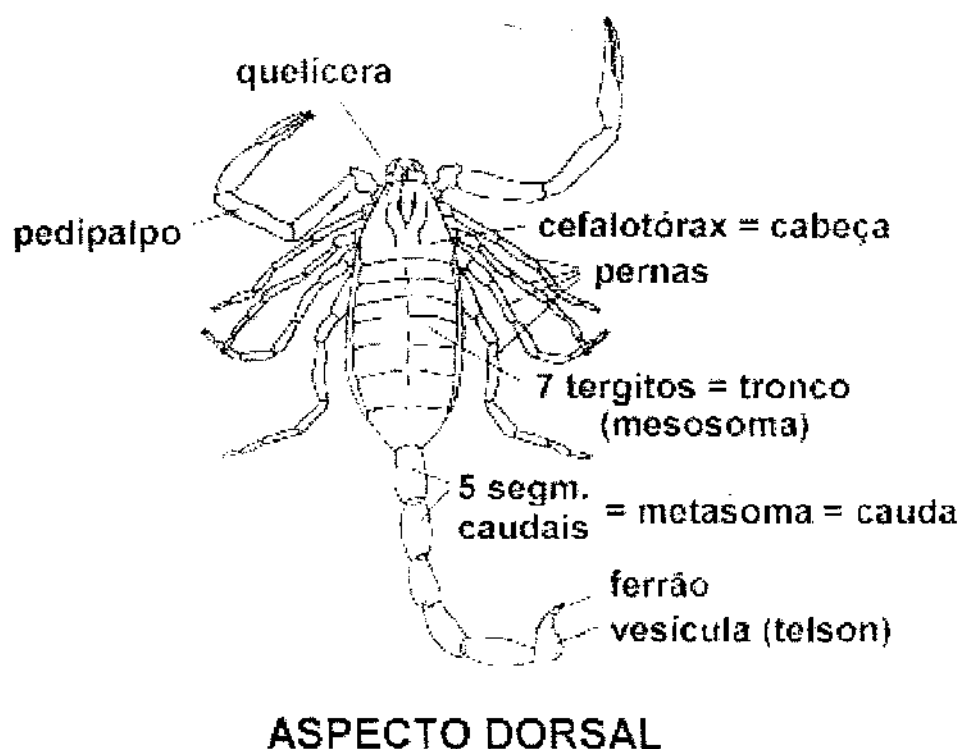
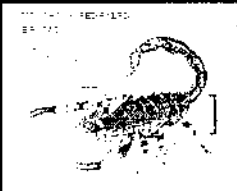



Figura 4: Morfologia externa do escorpião (Manual de vigilância epidemiológica, Inst. Butantan, pág. 32; 1993).

Os escorpiões perigosos no Brasil estão representados pelo gênero *Tityus* que é o mais rico em espécies, correspondendo a cerca de 60% da fauna escorpiônica neotropical. As espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* são as causadoras do maior número de acidentes (Tabela 2). São ativos à noite e abrigam-se durante o dia em lugares escuros. O

habitat é variável, estendendo-se desde ambientes úmidos sob cascas de árvores podres e camadas de folhas junto ao solo, até entulhos e madeiras empilhadas junto aos domicílios e nas várzeas dos córregos. Quando molestados, picam com o ferrão localizado na ponta da cauda; são comuns acidentes ao vestir roupas ou calçar sapatos, onde os escorpiões podem estar escondidos.

Tabela 2: Características dos escorpiões perigosos do Brasil

ESCORPIÃO	NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	TAMANHO	CARACTERÍSTICAS GERAIS
	<i>Tityus bahiensis</i>	escorpião marrom	6 a 7 cm	marrom escuro, patas manchadas, pedipalpos com mancha escura no fêmur e na tíbia
	<i>Tityus serrulatus</i>	escorpião amarelo	6 a 7 cm	tronco marrom escuro, pedipalpos, pata e cauda amarelas; no último segmento da cauda, lado ventral, uma mancha escura; cauda serrilhada no lado dorsal

7.2. *Tityus serrulatus*

Tityus serrulatus (Lutz & Mello, 1922) é conhecido como o escorpião mais perigoso do Brasil (Figura 5), devido à alta toxicidade de seu veneno e à vasta disseminação da espécie nos centros urbanos da região sudeste, sendo responsável por vários acidentes anualmente (Nishikawa, 1994). Geralmente, a maioria dos pacientes picados pelo escorpião apresenta apenas dor e parestesia no local da picada. A percentagem de ocorrência de envenenamento severo é baixa, em torno de 4.3%. Em tais condições, após a picada observa-se várias manifestações tais como dor, agitação, vômitos profusos, taquicardia, alterações pupilares, sialorréia, taquipnéia, salivação, distúrbios da pressão arterial, tremores, (Maurano, 1915; Magalhães, 1939; Freire-Maia, 1974, Bucarechi *et al.*, 1995). Adicionalmente, outra manifestação clínica decorrente do envenenamento severo é o priapismo, o qual corresponde a uma ereção bastante prolongada e dolorosa (Freire-Maia & Campos, 1989). Entretanto, a incidência de priapismo em pacientes picados pelo escorpião *Tityus serrulatus* é muito baixa. Por outro lado, em vários acidentes envolvendo

envenenamento severo decorrente da picada de escorpiões em outros países, houve incidência bastante alta quanto ao desenvolvimento do priapismo, como por exemplo na Índia (*Buthus tamulus*; Bawaskar, 1982) e em Israel (*Buthus quinquestriatus*; Amitai et al., 1984 e *Leiurus quinquestriatus*; Hershkovich et al., 1985).

Recentemente, foi relatado um acidente envolvendo um paciente de 58 anos de idade picado pelo escorpião *Tityus serrulatus* no pênis (Nishioka et al., 1993). O bloqueio da condução nervosa pelos nervos dorsais do pênis com lidocaína, levou ao alívio imediato da dor. Neste caso, também não se observou o desenvolvimento de priapismo.



Figura 5: Escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*).

7.3. Efeitos Farmacológicos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

7.3.1. Sistema cardiovascular

Em coração isolado de cobaia, o veneno bruto de *Tityus serrulatus* produz bradicardia de curta duração seguido por aumento na força e frequência cardíacas. Ambos os efeitos são indiretos e relacionados à liberação de acetilcolina e noradrenalina, respectivamente (Corrado *et al.*, 1968). A liberação de noradrenalina no átrio isolado de cobaia é demonstrada diretamente usando-se uma toxina extraída do veneno de *Tityus serrulatus* (Langer *et al.*, 1975).

A injeção da fração purificada do veneno, T1, no coração isolado de cobaia induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos. A injeção do veneno de *Tityus serrulatus* ou doses 10 vezes menores da toxina purificada Ts- γ no coração de cobaia isolado induz efeitos complexos os quais são divididos em 3 fases: uma fase inicial (taquicardia ou bradicardia) associada com um aumento na força contrátil; uma fase intermediária (oscilações da frequência cardíaca, força contrátil e fluxo coronariano); e uma terceira fase (taquicardia). A bradicardia e as oscilações no ritmo contrátil são de natureza colinérgica, enquanto que a taquicardia e o aumento na força de contração são de natureza adrenérgica (Silveira *et al.*, 1991).

De acordo com Magalhães (1938), a administração intravenosa do veneno de *Tityus serrulatus* em cães anestesiados induz hipertensão arterial devido à ação do veneno sobre a medula. Entretanto, a hipertensão evocada pelo veneno não é prevenida pelo bloqueio ganglionar, mas sim por antagonistas α -adrenérgicos. Portanto, a hipertensão não é devido a um efeito central do veneno, e sim, a um efeito periférico, através da estimulação de adrenoceptores α (Ramos & Corrado, 1954; Freire-Maia & Ferreira, 1961).

A hipertensão induzida em ratos anestesiados não é prevenida pelo hexametônio, porém é diminuída pela reserpina, guanetidina ou fenoxibenzamina. Além disso, a hipertensão é prevenida pela guanetidina em animais adrenalectomizados, indicando que a hipertensão observada é produto da liberação de catecolaminas das glândulas adrenais e de terminais nervosos pós-ganglionares (Freire-Maia & Diniz, 1970; Freire-Maia *et al.*, 1974). A hipertensão induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus* em cães é explicada

pelas suas ações em fibras pós-ganglionares simpáticas (Ramos & Corrado, 1954; Freire-Maia & Ferreira, 1961; Corrado *et al.*, 1974). Baseando-se nestes dados, pode-se postular que o efeito hipertensivo do veneno é devido à liberação de catecolaminas das glândulas adrenais e de terminais nervosos pós-ganglionares, com subsequente ativação de receptores α -adrenérgicos (Freire-Maia & Diniz, 1970; Freire-Maia *et al.*, 1974).

7.3.2. Sistema respiratório e neuromuscular

Segundo Magalhães (1938), a administração do veneno de *Tityus serrulatus* em cães produz complexas arritmias respiratórias como taquipnéia, hiperpnéia e paralisia respiratória, explicadas pelas ações do veneno sobre o sistema nervoso central.

A toxina T1 purificada do veneno de *Tityus serrulatus* produz tanto a estimulação quanto a paralisia dos movimentos respiratórios em ratos, dependendo da dose (Freire-Maia & Diniz, 1970; Freire-Maia *et al.*, 1973; Freire-Maia *et al.*, 1976a). A ataxia e respiração periódica induzidas pela toxina são prevenidas pela secção bilateral dos nervos vagos e desnervação dos corpos carotídeos. A apnéia observada em ratos intactos após a injeção da toxina é de longa duração em comparação com a observada em animais desnervados. Além disso, a anestesia local dos nervos vagos com lidocaína abole a apnéia induzida pela toxina. Assim, a hipótese é de que as arritmias respiratórias produzidas pela toxina do veneno no rato são principalmente decorrentes da estimulação de fibras aferentes viscerais, sendo, portanto, de natureza reflexa (Freire-Maia *et al.*, 1973; Freire-Maia *et al.*, 1976a).

O veneno de *Tityus serrulatus* induz a liberação de uma substância semelhante à acetilcolina do diafragma de rato inervado, mas não do desnervado. A liberação desta substância pode ser responsável pelas contrações observadas após a injeção do veneno (Vital Brazil *et al.*, 1973). Estudos eletrofisiológicos com tityustoxina sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato indica que a toxina induz um aumento na permeabilidade ao Na^+ , o que pode explicar a despolarização das membranas pré e pós-sinápticas (Warnick *et al.*, 1976). Estes dados indicam que o veneno de *Tityus serrulatus* apresenta ações pré e pós-sinápticas a nível de junção neuromuscular.

7.3.3. Edema pulmonar

A injeção intravenosa deste veneno em ratos induz edema pulmonar agudo (Rossi *et al.*, 1974). O bloqueio ganglionar com hexametônio ou o bloqueio β -adrenérgico com propranolol não modifica significativamente a magnitude do edema pulmonar induzido pela toxina T1, porém o bloqueio α -adrenérgico com fenoxibenzamina previne o edema (Freire-Maia *et al.*, 1978).

Recentemente, demonstrou-se que fatores cardiogênicos e não-cardiogênicos estão envolvidos na patogênese do edema pulmonar agudo após a picada do escorpião *Tityus serrulatus* em crianças (Amaral *et al.*, 1993). Experimentos em ratos indicam que um dos fatores não-cardiogênicos relacionados com o aumento da permeabilidade vascular no pulmão é o fator ativador de plaquetas ou PAF (Freire-Maia & de Matos, 1993).

7.3.4. Sistema gastrintestinal

Após a administração da fração T1 ou da toxina Ts- γ em ratos, ocorre o aparecimento de injúrias gástricas agudas na mucosa glandular, consistindo de úlceras lineares e circulares, e lesões puntiformes (Cunha-Melo *et al.*, 1991). Em animais injetados com as toxinas há um aumento no volume, acidez e secreção de pepsina do estômago, explicados pela liberação de acetilcolina e histamina (Gonzaga *et al.*, 1979; Cunha-Melo *et al.*, 1983; Cunha-Melo *et al.*, 1987; Cunha-Melo *et al.*, 1991). Portanto, a injeção das toxinas do veneno deste escorpião em ratos anestesiados é um bom modelo para indução de secreção ácida e úlceras gástricas em curto período de tempo.

A administração intravenosa da fração T1 em ratos anestesiados induz um aumento pronunciado do fluxo, no conteúdo protéico e nas atividades de calicreína e amilase do suco pancreático. A vagotomia bilateral subdiafragmática não previne a secreção pancreática induzida pela toxina, mas o tratamento dos ratos com atropina inibe esta secreção. É provável, portanto, que a secreção pancreática induzida pela toxina seja devida à ação da acetilcolina liberada de fibras nervosas pós-ganglionares em receptores muscarínicos (Novaes *et al.*, 1982).

A contração do íleo de cobaia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus* é prevenida pela cocaína ou atropina (Diniz & Gonçalves, 1960). Além disso, a incubação de segmentos

de íleo com o veneno libera uma substância semelhante à acetilcolina (Diniz & Torres, 1968), concluindo-se que a contração do íleo de cobaia evocada pelo veneno é indireta. Entretanto, a atropina não previne completamente a contração induzida pelo veneno no íleo de rato ou de cobaia (Cunha-Melo *et al.*, 1973, Freire-Maia *et al.*, 1976a). A fisostigmina potencializa as contrações induzidas pelo veneno e a liberação da substância semelhante à acetilcolina ocorre após estimulação de canais de Na^+ , pois a liberação é bloqueada pela tetrodotoxina (Freire-Maia *et al.*, 1976b; Freire-Maia *et al.*, 1976c).

O veneno de *Tityus serrulatus* causa relaxamento de duodeno de rato, sendo tal efeito devido à liberação de catecolaminas dos terminais nervosos presentes no intestino, com subsequente estimulação de adrenoreceptores α e β (Freire-Maia *et al.*, 1976b; Freire-Maia *et al.*, 1976c). Portanto, experimentos realizados pelo grupo de Freire-Maia demonstraram que a contração e/ou relaxamento do músculo liso intestinal induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* está relacionada à liberação de mediadores químicos como acetilcolina e catecolaminas.

7.4. Mecanismo de Ação de Toxinas de Escorpiões em Nível Molecular

Muitos investigadores já demonstraram que as toxinas de escorpião são proteínas de baixo peso molecular (em torno de 7000 Da) e compostas de uma cadeia de polipeptídeo cruzada e ligada por 4 pontes de dissulfeto (Rochat *et al.*, 1979).

É provável que a maioria dos efeitos das toxinas seja devida a ações diversas em canais de Na^+ (Catterall, 1980; Couraud & Jover, 1984). Já foram descritos 5 grupos de neurotoxinas que atuam em diferentes sítios receptores no canal de Na^+ (Tabela 3).

Os compostos guanidinos heterocíclicos tetrodotoxina e a saxitoxina ligam-se ao sítio receptor I. Estas toxinas inibem o transporte iônico pelo canal de Na^+ , por se ligarem a um sítio receptor comum, o qual acredita-se estar localizado próximo à face extracelular do canal (Narahashi, 1974; Hille, 1975; Ritchie & Rogart, 1977; Catterall, 1980).

As toxinas lipossolúveis veratridina, batrachotoxina, aconitina e graianotoxina ligam-se ao sítio receptor II (Ulbricht, 1969; Albuquerque *et al.*, 1971; Narahashi, 1974; Catterall, 1980). Tais toxinas causam persistente ativação dos canais de Na^+ durante o potencial de membrana em repouso devido ao bloqueio da fase de inativação do canal de Na^+ , levando ao retardamento do retorno do potencial de membrana necessário para ativação destes

canais. Estes efeitos resultam da ligação preferencial das toxinas com alta afinidade pelo estado ativado dos canais de Na^+ , com conseqüente estabilização destes canais (Catterall, 1977; Catterall, 1980). As neurotoxinas que atuam no sítio receptor II também alteram a seletividade iônica do canal de Na^+ (Catterall, 1980). Portanto, é provável que este sítio esteja localizado em uma região do canal que esteja envolvida na inativação e ativação voltagem-dependente além de estar ligada alostericamente ao poro transmembrânico do canal.

Toxinas de anêmona e certas toxinas de escorpião ligam-se ao sítio receptor III (Catterall, 1980; Strichartz *et al.*, 1987). Estas toxinas retardam ou bloqueiam a inativação do canal de Na^+ (Narahashi, 1974; Bergman *et al.*, 1976; Catterall, 1980; Strichartz *et al.*, 1987). Acredita-se que o sítio receptor III esteja localizado em uma região do canal de Na^+ que sofre mudança conformacional durante a ativação do canal, levando à reduzida afinidade pela toxina de escorpião. É provável que toxinas de escorpião e de anêmona liguem-se a estruturas sensíveis à voltagem envolvidas na ativação dos canais de Na^+ , retardando ou bloqueando o acoplamento da fase de ativação do canal à de inativação.

De acordo com Couraud *et al.* (1982), as toxinas purificadas de escorpiões originários da África ou Ásia (*Androctonus australis*, *Leiurus quinquestriatus* e *Buthus occitanus*) são denominadas α -toxinas e ligam-se ao receptor do sítio III, enquanto que toxinas purificadas de escorpiões norte-americanos (*Centruroides sculpturatus*) são denominadas β -toxinas e ligam-se a um sítio receptor diferente no canal de Na^+ (sítio IV). Estas toxinas conduzem a voltagem-dependência para ativação dos canais de Na^+ para potenciais de membrana mais negativos sem modificar a inativação do canal (Cahalan, 1975; Strichartz *et al.*, 1987). Além disso, tais toxinas não alteram a ligação de neurotoxinas ao sítio III e, estas, por sua vez, também não interferem com a ligação destas β -toxinas aos canais de Na^+ . As toxinas purificadas do escorpião sul-americano *Tityus serrulatus* apresentam diferentes sítios ligantes no canal de Na^+ . Assim, a tityustoxina (Gomes & Diniz, 1966) se liga ao sítio receptor III, sendo portanto uma α -toxina, enquanto que a Tstx-I (Toledo & Neves, 1976), também conhecida por γ -toxina (Possani *et al.*, 1977) e T₁ VIII (Sampaio *et al.*, 1983), ligam-se ao mesmo sítio receptor do *Centruroides*, sendo portanto uma β -toxina (Jover *et al.*, 1980; Couraud *et al.*, 1982; Barharin *et al.*, 1982).

As brevetoxinas e ciguatoxinas, toxinas poliéter lipossolúveis, ligam-se ao sítio receptor V (Catterall & Gainer, 1985; Lombet *et al.*, 1987). Estas toxinas causam despolarizações repetitivas dos nervos, interferem com a voltagem-dependência para ativação dos canais de Na⁺ e bloqueiam a inativação (Huang *et al.*, 1984; Benoit *et al.*, 1986). Foi demonstrado que as ciguatoxinas inibem a ligação das brevetoxinas nestes sítios (Lombet *et al.*, 1987).

Tabela 3: Sítios receptores para neurotoxinas no canal de Na⁺

Sítio	Toxina	Efeito
I	Tetrodotoxina Saxitoxina μ-Conotoxinas	Inibição da condutância iônica
II	Veratridina Batrachotoxina Aconitina Graianotoxina	Ativação persistente
III	α-Toxinas de escorpião Toxinas de anêmona	Inibição da inativação; prolonga ativação persistente
IV	β-Toxinas de escorpião	Modificam voltagem-dependência de ativação
V	Brevetoxinas Ciguatoxinas	Despolarizações repetitivas; modificam voltagem-dependência de ativação.

Catterall, 1980

OBJETIVOS



Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são:

- i. Comprovar a participação do óxido nítrico na resposta relaxante de corpo cavernoso de coelho evocada pelo veneno de *Tityus serrulatus*;
- ii. Comparar os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* com aqueles evocados pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (Lopes-Martins *et al.*, 1994) nesta mesma preparação;
- iii. Investigar o envolvimento de canais de K^+ nos relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*;
- iv. Identificar a fonte de liberação de NO após o estímulo do veneno (origem endotelial ou terminações NANC);
- v. Investigar o envolvimento de neurocininas nos relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* e os efeitos de substâncias capazes de ativar ou inibir a neurotransmissão NANC em corpo cavernoso de coelho;
- vi. Investigar os mecanismos de transdução de sinal intracelulares decorrentes do efeito relaxante de corpo cavernoso de coelho induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus*;
- vii. Promover o fracionamento do veneno bruto de *Tityus serrulatus* e investigar os efeitos farmacológicos das toxinas obtidas em corpo cavernoso de coelho.

MATERIAL E MÉTODOS



1. Superfusão de Corpo Cavernoso Isolado em Cascata

Foram utilizados coelhos machos New Zealand adultos (2-3 kg). Após anestesia com pentobarbital sódico (Sagatal; 40 mg/kg i.v.), os animais foram exsangüinados e o pênis retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado, após remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Cada pênis forneceu apenas um segmento de corpo cavernoso dissecado (2-3 cm).

Os segmentos de corpo cavernoso isolados foram mantidos em solução nutritiva de Krebs-Ringer até o momento do experimento, o que não excedeu uma hora após a remoção dos mesmos. Os tecidos foram montados em cascata (Vane, 1964) sob tensão de 2.5 g e superfundidos com solução de Krebs-Ringer aquecida à 37°C e aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Figura 6). Os tecidos foram ligados a 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 (90 min), os mesmos foram continuamente infundidos (0.1 ml/min) com indometacina (5.6 µM) com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas. O *tonus* dos tecidos foi induzido por infusão contínua (0.1 ml/min) de noradrenalina (3.0 µM). A sensibilidade dos transdutores foi então ajustada para produzir relaxamentos de magnitudes similares, usando-se o gliceriltrinitrato (GTN) 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 µl). Os antagonistas e inibidores foram administrados por infusão contínua (0.1 ml/min) por aproximadamente 20 minutos antes de administrar os agentes em estudo.

A composição da solução de Krebs utilizada foi (em mM): NaCl, **118**; NaHCO₃, **25**; glicose, **5.6**; KCl, **4.7**; KH₂PO₄, **1.2**; MgSO₄.7H₂O, **1.17** e CaCl₂.2H₂O, **2.5**.

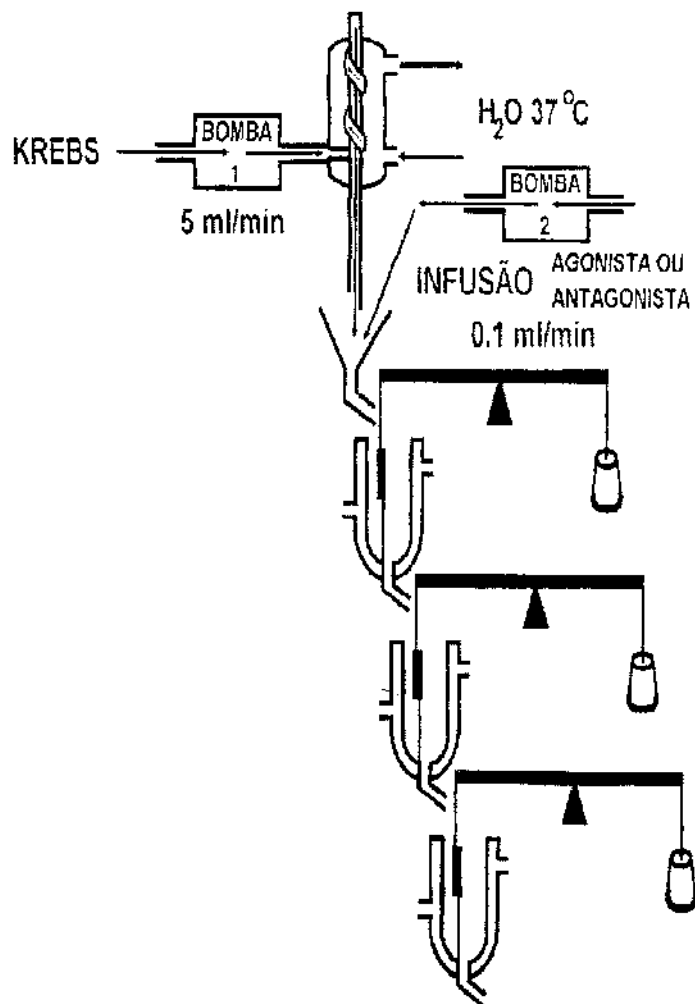


Figura 6: Superfusão de músculo liso em cascata.

2. Efeito do L-NAME, D-NAME e TRIM Sobre a Atividade da Óxido Nítrico Sintase Cerebelar

A ação *in vitro* do L-NAME (N^o-nitro-L-arginina metil éster), D-NAME e TRIM (1-(2-trifluorometilfenil)imidazol) foi estudada na preparação de homogenato de cerebelo de coelho pela capacidade destes compostos inibirem a conversão de [³H]L-arginina em [³H]L-citrulina, como descrito por Förstermann *et al.* (1990b). Os coelhos foram anestesiados com Sagatal (40 mg/kg, i.v.) e os cerebelos foram rapidamente removidos e homogenizados em tampão de incubação resfriado (50 mM tampão Tris-HCl, pH 7.4), contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de L-citrulina. Os homogenatos foram incubados por 30 minutos na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de CaCl₂ e 10 mM de L-arginina, contendo 100,000 dpm de [2,3,4,5-

^3H]Monohidrocloridrato de L-arginina à temperatura ambiente (25-27°C). Os inibidores da NOS, L-NAME, D-NAME ou TRIM (10 nM-3 mM), foram então adicionados aos homogenatos. O conteúdo protéico das amostras foi determinado de acordo com o método de Peterson (1977) e a atividade da NOS cerebelar foi expressa como pmol de L-citrulina produzido/min/mg de proteína.

A redução na produção de L-citrulina causada pelos inibidores foi expressa como percentagem da atividade máxima. A partir das curvas atividade vs. concentração, os valores de pI_2 (-log da concentração molar do inibidor que causa 50% de inibição) foram calculados.

3. Extração e Cromatografia em CM-Celulose-52 do Veneno de *Tityus serrulatus*

O veneno de *Tityus serrulatus* foi extraído e cromatografado segundo modificações do método descrito por Arantes *et al.* (1989), como segue:

Amostra de 400 mg do veneno dessecado de *Tityus serrulatus* foi suspensa em 2.0 ml de tampão NH_4HCO_3 0.01 M, pH 7.8 a 0°C. A suspensão foi centrifugada a 12100 x g, por 10 min a 0°C, numa centrífuga Sorvall RC2-B. O sobrenadante foi retirado e o resíduo novamente suspenso em duas porções de 1.0 ml de tampão gelado e centrifugado após cada extração. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos, a mistura deixada em repouso por 20 min a 0°C e novamente centrifugada a 12100 x g por 10 min. A seguir, foi separado o sobrenadante para ser aplicado à coluna, sendo que 10 μl do mesmo foram diluídos em 1.0 ml de NH_4HCO_3 0.01 M para leitura da absorbância em 280 nm.

Uma coluna de 2.4 cm X 63.0 cm foi preparada com CM-celulose-52 microgranular da Whatman. O tratamento da resina foi realizado da seguinte maneira: a resina foi suspensa em solução de NaOH 0.5 N e após 5 min, filtrada em funil de placa sinterizada sob pressão reduzida e exaustivamente lavada com água destilada até pH neutro. A seguir, foi suspensa em HCl 0.5 N por mais 5 min e novamente lavada em água destilada até pH neutro. Finalmente, a resina foi lavada com NH_4HCO_3 0.01 M, pH 7.8, deaerada e colocada na coluna.

Após o empacotamento da coluna, a mesma foi levada para a câmara fria (5°C) e lavada com NH_4HCO_3 0.01 M por uma noite, até equilíbrio completo testado por medida de condutividade. O fluxo foi então regulado para aproximadamente 25 ml/h. O extrato do

veneno bruto foi aplicado à coluna e inicialmente eluído com NH_4HCO_3 0.01 M, pH 7.8. A partir do tubo 150 iniciou-se um gradiente convexo de concentração de NH_4HCO_3 0.01 M a 1.00 M.

O sistema utilizado para obtenção do gradiente contínuo de concentração consiste de um kitassato de 500 ml, contendo inicialmente NH_4HCO_3 0.01 M, conectado à coluna e ao funil de separação contendo o tampão 1.0 M.

Foram coletadas frações de 3.0 ml, suas absorvâncias determinadas em 280 nm e locadas em função do número das mesmas. As frações correspondentes a cada pico de absorvância foram reunidas e liofilizadas até completa remoção do sal. A ausência de sais de amônio em todas as frações liofilizadas foi comprovada pelo teste qualitativo de Nessler.

Todas as frações (I-XIII) foram testadas em corpo cavernoso de coelho. As doses de todas as frações (exceto frações V e VI) foram previamente determinadas pelo cálculo do coeficiente de extinção (ϵ) de cada fração. Este coeficiente após determinado indica o conteúdo protéico (mg/ml) de determinada amostra em uma dada absorvância. Geralmente, é apresentado como o valor de absorvância para determinada fração, o qual indica o conteúdo de 1 mg/ml de proteína. Na tabela 4, encontram-se os valores de ϵ , a massa administrada de cada fração, bem como a dose real de cada uma, a qual corresponde ao conteúdo protéico contido em uma solução de 1 mg/ml.

Tabela 4: Conteúdo protéico das frações obtidas do veneno de *Tityus serrulatus*

Fração	$A_{280 \text{ nm}}$	ϵ	massa (μg)	conteúdo protéico (μg)
I	0.57	2.6	30	6.6
II-III	0.34	1.7	30	6.0
IV	0.09	2.3	30	1.2
VII	0.50	2.2	30	6.9
VIII	0.90	2.9	30	9.5
IX	3.17	3.9	30	24.3
X	0.24	1.9	30	3.8
XI	0.49	3.5	30	4.2
XII	0.37	3.7	30	3.0
XIII	2.27	4.6	30	14.9

4. Cálculos Estatísticos

As respostas relaxantes induzidas pelos diversos agonistas foram calculadas tomando-se como 100% o relaxamento sub-máximo induzido pelo GTN. Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias de relaxamento, calculadas tomando-se como 100% o relaxamento sub-máximo induzido pelo GTN e avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student pareado, considerando-se $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS



Em preparação de corpo cavernoso isolado de coelho (RbCC), agonistas tais como bradicinina (Bk; 0.3-10 nmol), acetilcolina (ACh; 0.3-30 nmol) e gliceriltrinitrato (GTN; 0.5-10 nmol) causam relaxamento de maneira dose-dependente e não-taquifilática (n=12). O veneno de *Tityus serrulatus* (TSV; 3-100 µg), induz relaxamentos imediatos seguidos de um retorno lento e, às vezes, parcial à linha de base (n=12). As respostas induzidas pelo veneno também ocorrem de maneira dose-dependente e não-taquifilática.

1. Envolvimento do NO nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

A figura 7 mostra que a infusão do enantiômero inativo D-NAME (10 µM; n=5) não afetou o *tonus* basal dos tecidos nem os relaxamentos induzidos por ACh (3.5 nmol) e TSV (30 µg). A infusão subsequente de L-NAME (10 µM; n=6) aumentou de maneira significativa o *tonus* dos tecidos e praticamente aboliu os relaxamentos induzidos pelo TSV (p<0.01) e ACh (p<0.01). A infusão de L-NAME não afetou os relaxamentos induzidos pelo GTN (4.5 nmol). A infusão subsequente de D-arginina (300 µM; n=5) não modificou o *tonus* basal, nem foi capaz de restaurar os relaxamentos induzidos por ACh e TSV. Entretanto, a infusão de L-arginina (300 µM; n=6) reverteu de maneira significativa o *tonus* aumentado dos tecidos e restaurou os relaxamentos induzidos pelo TSV (p<0.01) e acetilcolina (p<0.01) (Figura 7).

A infusão de outro inibidor da síntese de NO, L-NIO (30 µM; n=6), também inibiu de maneira significativa os relaxamentos induzidos por ACh (0.6 nmol; p<0.01) e TSV (100 µg; p<0.01) sem afetar aqueles induzidos pelo GTN (1.3 nmol). O L-NIO também aumentou significativamente o *tonus* das preparações (p<0.05). A subsequente infusão de L-arginina (300 µM; n=6) reverteu os efeitos do L-NIO sobre as respostas evocadas por ACh (p<0.01) e pelo TSV (p<0.01) (Figura 8).

A infusão de L-NMMA (10 µM; n=5) induziu aumento do *tonus* dos tecidos e reduziu os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol; p<0.05) e TSV (10 µg; p<0.05), sem afetar aqueles induzidos pelo GTN (1.3 nmol). A infusão subsequente de L-arginina (300 µM; n=5) restaurou parcialmente os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (p<0.05) e TSV (p<0.05), além de reverter de maneira significativa o *tonus* aumentado dos tecidos (Figura 9).

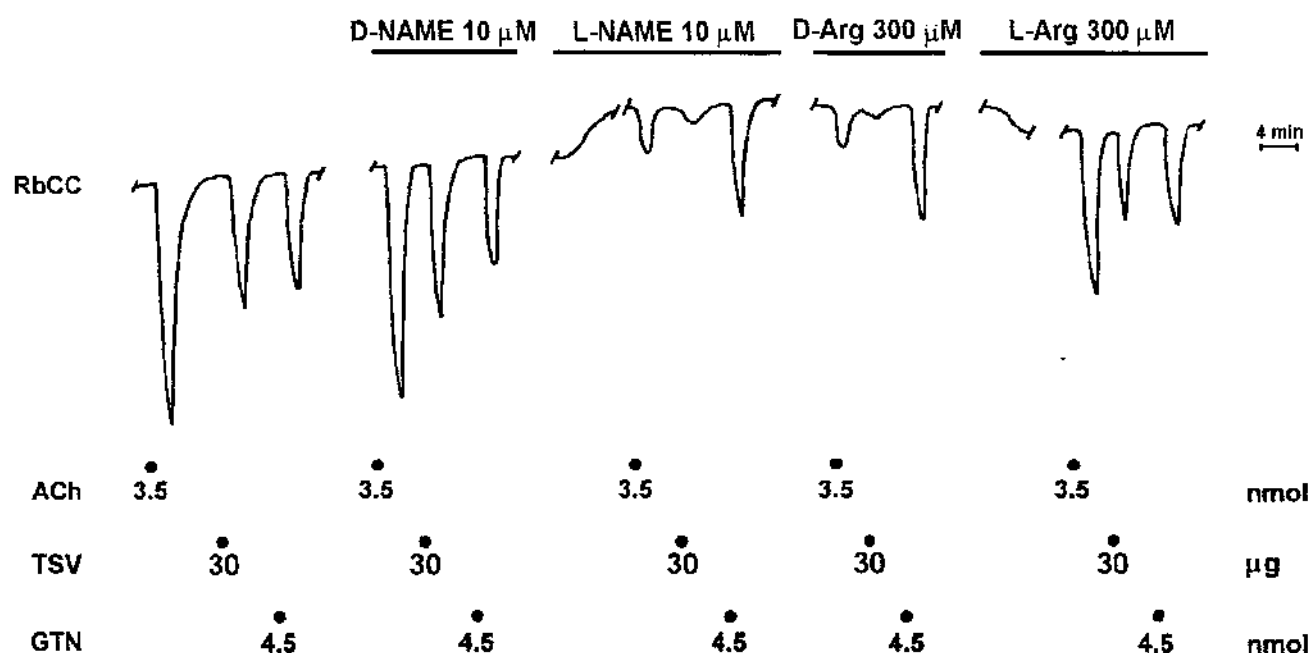


Figura 7: Efeitos do N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10 μ M), D-NAME (10 μ M), L-arginina (L-Arg, 300 μ M) e D-Arg (300 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de L-NAME, mas não D-NAME, produziu um aumento no *tonus* dos tecidos e inibiu os relaxamentos induzidos por acetilcolina (ACh) e pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). Os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN) não foram afetados de maneira significativa pela infusão de L-NAME. A infusão subsequente de L-Arg, mas não D-Arg, reverteu parcialmente o *tonus* aumentado dos tecidos e restaurou parcialmente os relaxamentos induzidos por ACh e TSV. O traçado acima é representativo de 5 experimentos.

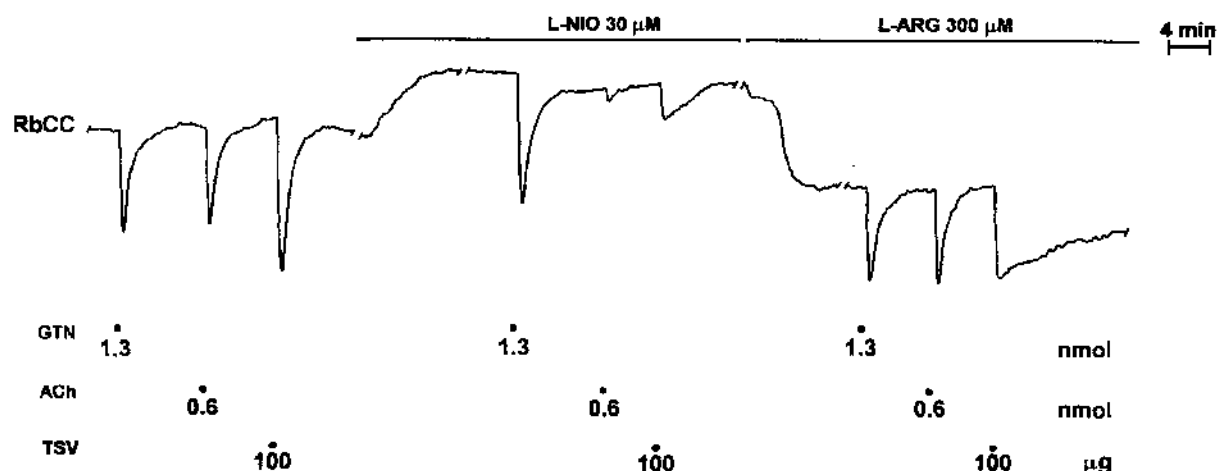


Figura 8: Efeitos do N^o-iminoetil-L-ornitina (L-NIO, 30 μ M) e L-arginina (L-Arg, 300 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de L-NIO produziu um aumento no *tonus* dos tecidos e inibiu os relaxamentos induzidos por acetilcolina (ACh) e pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). Os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN) não foram afetados de maneira significativa pela infusão de L-NIO. A infusão subsequente de L-Arg reverteu o *tonus* aumentado das preparações e restaurou parcialmente os relaxamentos induzidos por ACh e TSV. O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

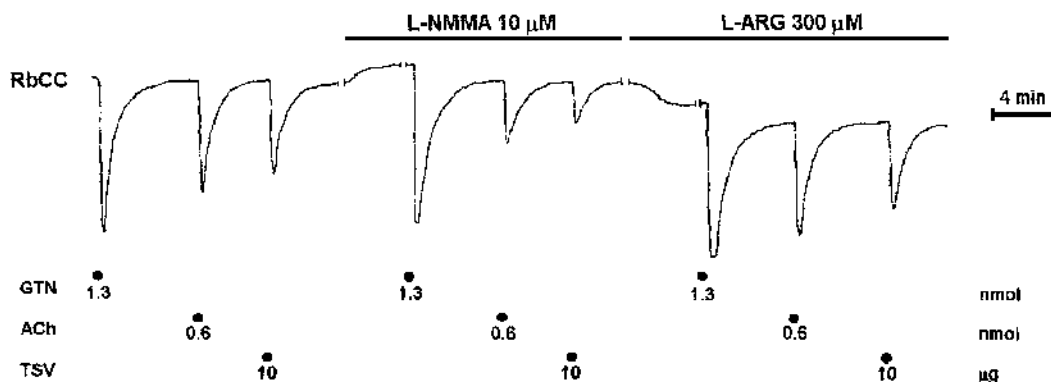


Figura 9: Efeitos do N^o-monometil-L-arginina (L-NMMA, 10 µM) e da L-arginina (L-Arg, 300 µM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão do L-NMMA aumentou o tonus dos tecidos e inibiu os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). Os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN) não foram significativamente afetados pela infusão de L-NMMA. Subseqüente infusão de L-Arg reverteu parcialmente o tonus aumentado dos tecidos e restaurou de modo significativo os relaxamentos induzidos por ACh e TSV. O traçado acima é representativo de 5 experimentos.

A figura 10 apresenta três histogramas contendo a média ± erro padrão dos valores de relaxamento dos corpos cavernosos induzidos pela ACh e TSV, referentes aos experimentos em que foi avaliada a participação do NO na resposta relaxante evocada pelo TSV.

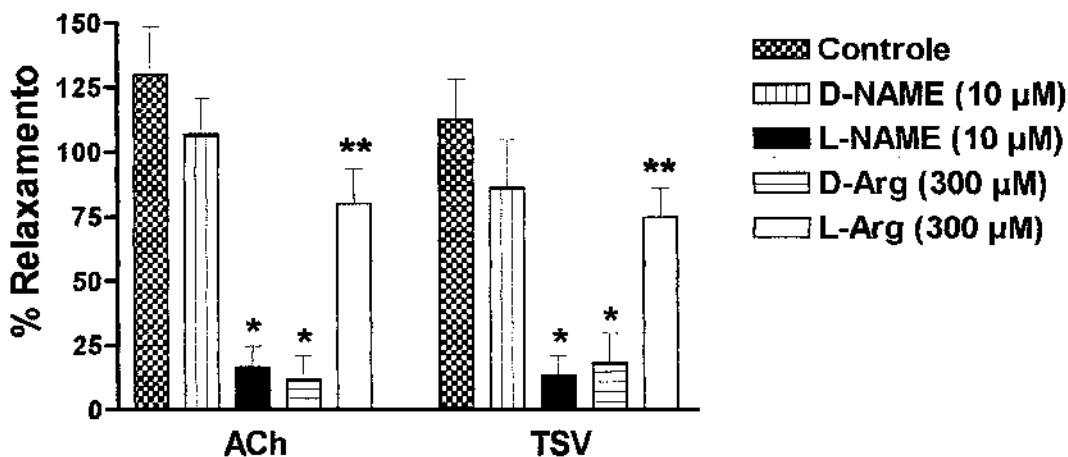


Figura 10a: Efeitos do N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), D-NAME, L-arginina (L-Arg) e D-Arg sobre os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por acetilcolina (ACh, 3.5 nmol) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV, 30 µg). Os dados representam médias ± erro padrão das médias de relaxamento como porcentagem dos relaxamentos sub-máximos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 4.5 nmol). * p < 0.01, em comparação com os valores de relaxamento sub-máximos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 4.5 nmol). ** p < 0.01, em comparação com os valores de relaxamento na presença do L-NAME.

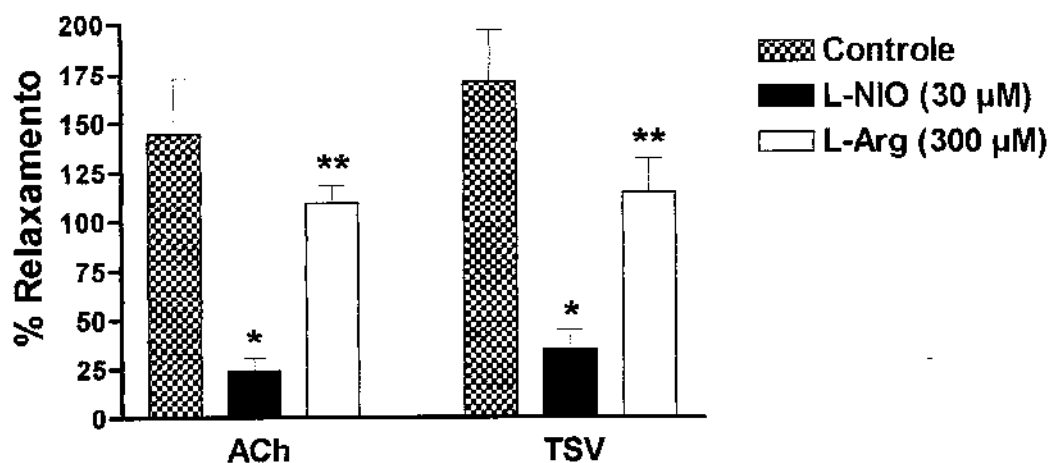


Figura 10b: Efeitos do N^G-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) e L-arginina (L-Arg) sobre os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por acetilcolina (ACh, 0.6 nmol) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV, 100 μg). Os dados representam médias ± erro padrão das médias de relaxamento como porcentagem dos relaxamentos sub-máximos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 1.3 nmol). * p<0.01, em comparação com os valores controles de relaxamento; ** p<0.01, em comparação com os valores de relaxamento na presença do L-NIO.

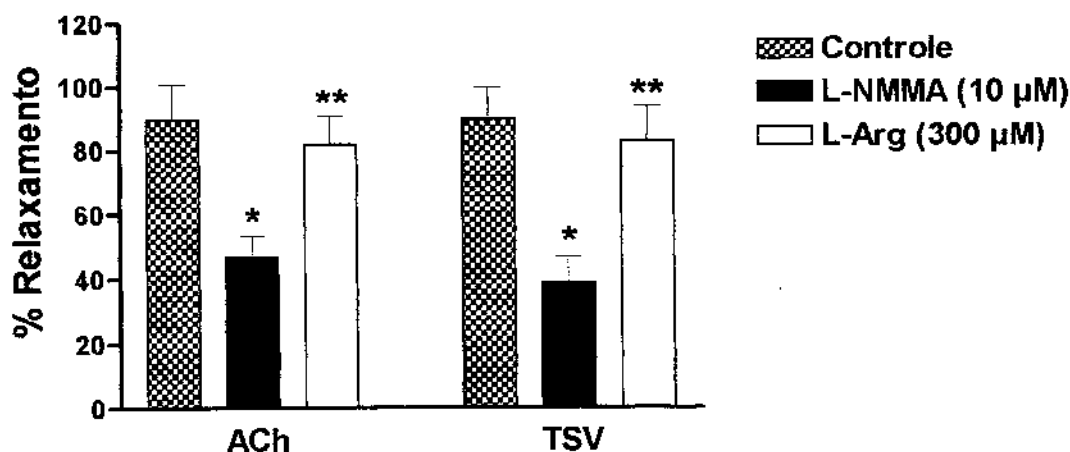


Figura 10c: Efeitos do N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA) e L-arginina (L-Arg) sobre os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por acetilcolina (ACh, 0.6 nmol) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV, 10 μg). Os dados representam médias ± erro padrão das médias de relaxamento como porcentagem dos relaxamentos sub-máximos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 1.3 nmol). * p<0.05, em comparação com os valores controles de relaxamento; ** p<0.05, em comparação com os valores de relaxamento na presença do L-NMMA.

2. Efeitos do 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM) Sobre os Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

A infusão de TRIM (100 μ M; n=4), um inibidor seletivo para bNOS em camundongos não promoveu alteração sobre o *tonus* basal dos tecidos nem afetou de modo significativo os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol; $66 \pm 18\%$ antes e $66 \pm 18\%$ durante a infusão de TRIM), Bk (10 nmol; $48 \pm 11\%$ antes e $49 \pm 10\%$ durante a infusão de TRIM) ou TSV (30 μ g; $90 \pm 5\%$ antes e $86 \pm 4\%$ durante a infusão de TRIM). Os relaxamentos induzidos pelo GTN (1.3 nmol) também não foram significativamente afetados por este inibidor (Figura 11).

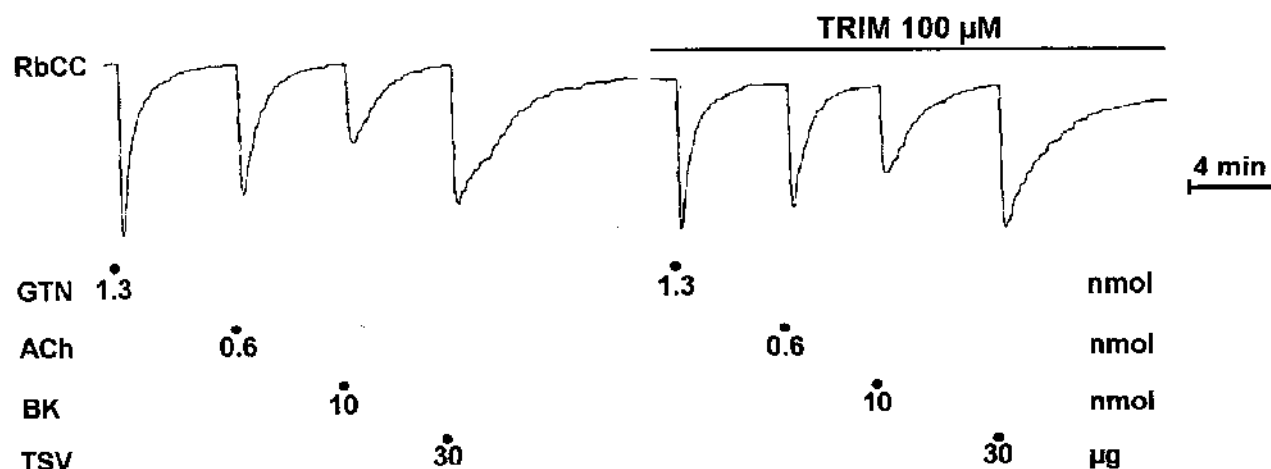


Figura 11: Efeitos do 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM, 100 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão do TRIM não alterou de maneira significativa os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk), veneno de *Tityus serrulatus* (TSV) ou gliceriltrinitrato (GTN). O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

3. Efeitos do TRIM Sobre a Atividade Enzimática da NOS Cerebelar

Visto que o TRIM não modificou o relaxamento induzido pelo TSV, passamos a investigar se, a exemplo do camundongo, o TRIM apresenta-se como inibidor potente de bNOS em coelhos. Assim, verificamos que a atividade máxima da NOS nos homogenatos (na ausência de inibidores) foi 5.96 ± 0.31 pmol L-citrulina/min/mg de proteína ($n=3$). Quando o Ca^{2+} foi omitido do meio de incubação, a conversão de L-arginina para L-citrulina foi inibida em mais de 90%, confirmando assim que a atividade enzimática medida nos homogenatos é devido à NOS dependente de Ca^{2+} . Das curvas concentração vs. atividade da NOS, os valores derivados de pI_2 foram 5.82 ± 0.45 , 3.63 ± 0.14 e 3.15 ± 0.22 para L-NAME, D-NAME e TRIM, respectivamente ($n=3$) (Figura 12).

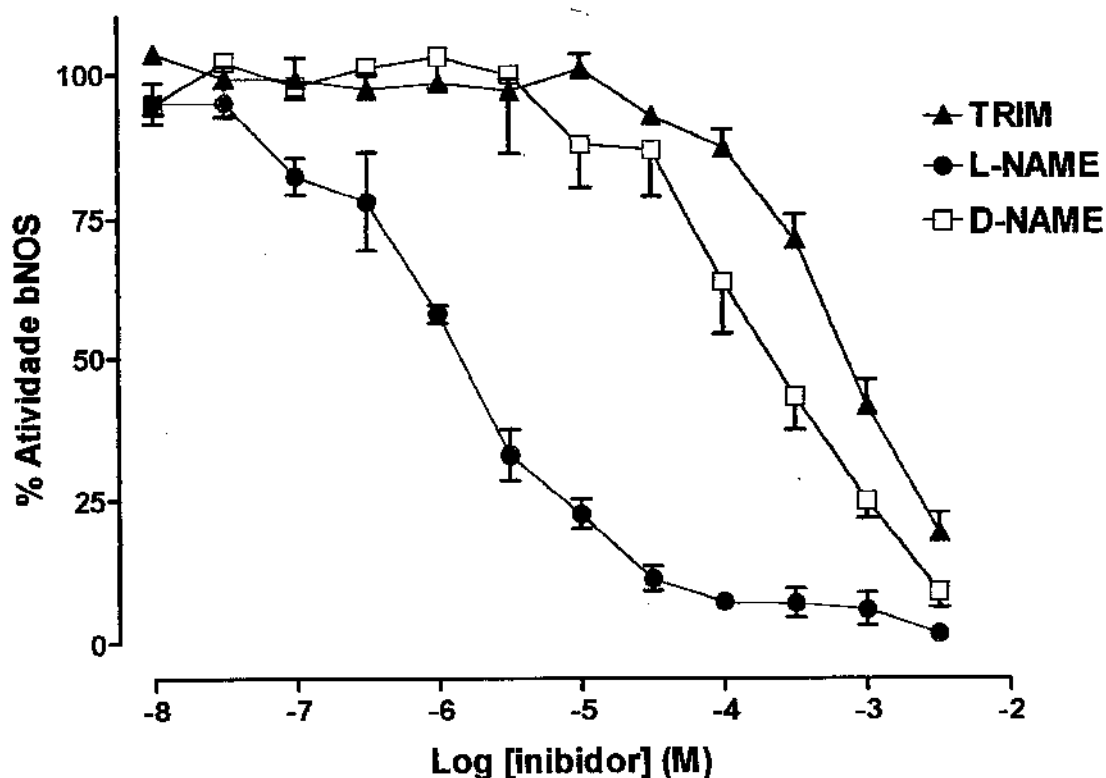


Figura 12: Curvas concentração *in vitro* vs. atividade da bNOS (óxido nítrico sintase cerebelar) obtidas para o 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM, triângulos azuis), N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, círculos vermelhos) e N^ω-nitro-D-arginina metil éster (D-NAME, quadrados vazios). Os valores derivados de pI_2 para L-NAME, D-NAME e TRIM foram 5.82 ± 0.45 , 3.63 ± 0.14 e 3.15 ± 0.22 , respectivamente. Cada ponto nas curvas é média de 3 experimentos.

4. Envolvimento da Guanilato Ciclase Solúvel nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

A infusão de azul de metileno (30 μ M; n=4) produziu um aumento transitório no *tonus* dos tecidos e inibiu os relaxamentos induzidos pelo TSV (10 μ g; $96 \pm 5\%$ antes e $33 \pm 10\%$ durante a infusão de azul de metileno; $p < 0.01$), ACh (0.6 nmol; $88 \pm 3\%$ antes e $37 \pm 11\%$ durante a infusão de azul de metileno; $p < 0.05$) e GTN (1.3 nmol; 100% antes e $68 \pm 11\%$ durante a infusão de azul de metileno; $p < 0.05$) (Figura 13).

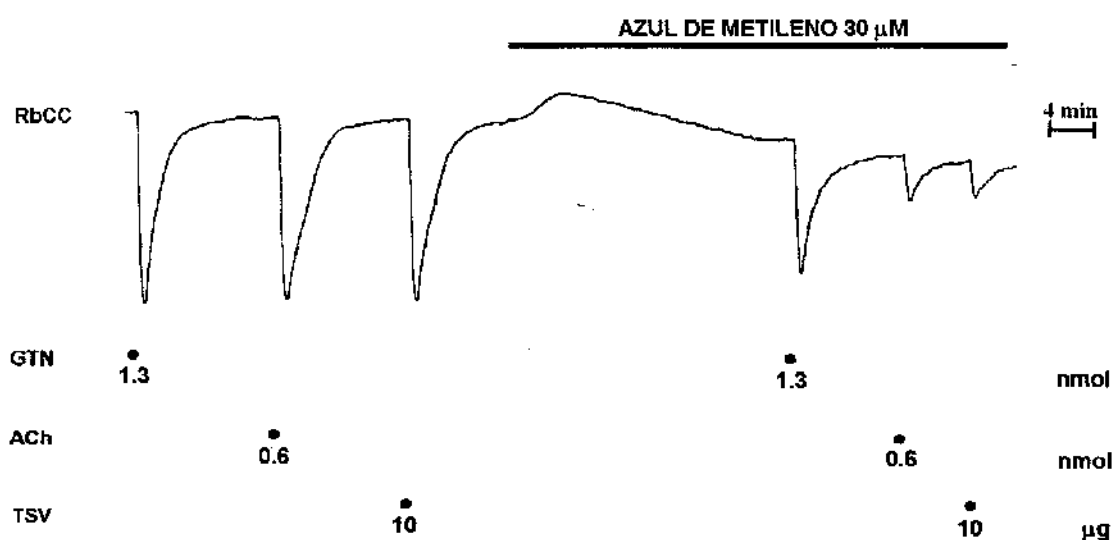


Figura 13: Efeitos do azul de metileno (30 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de azul de metileno produziu um aumento transitório no *tonus* das preparações e inibiu significativamente os relaxamentos induzidos por acetilcolina (ACh) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). Os relaxamentos evocados pelo gliceriltrinitrato (GTN) foram parcialmente inibidos. O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

A infusão do ODQ (30 μ M; n=4), um potente inibidor da atividade de guanilato ciclase solúvel estimulada por NO, aboliu os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol; $66 \pm 18\%$ antes e $1 \pm 0,5\%$ durante a infusão de ODQ; $p < 0.01$), Bk (10 nmol; $49 \pm 10\%$ antes e 0% durante a infusão de ODQ; $p < 0.01$) e TSV (30 μ g; $85 \pm 4\%$ antes e $5 \pm 1\%$ durante a infusão de ODQ; $p < 0.01$). Os relaxamentos de RbCC induzidos por GTN (1.3 nmol) também foram significativamente inibidos pelo ODQ ($98 \pm 1\%$ inibição; $p < 0.01$). Os relaxamentos evocados por estes agentes foram significativamente ($p < 0.01$) restaurados 15 minutos após o término da infusão de ODQ (Figura 14).

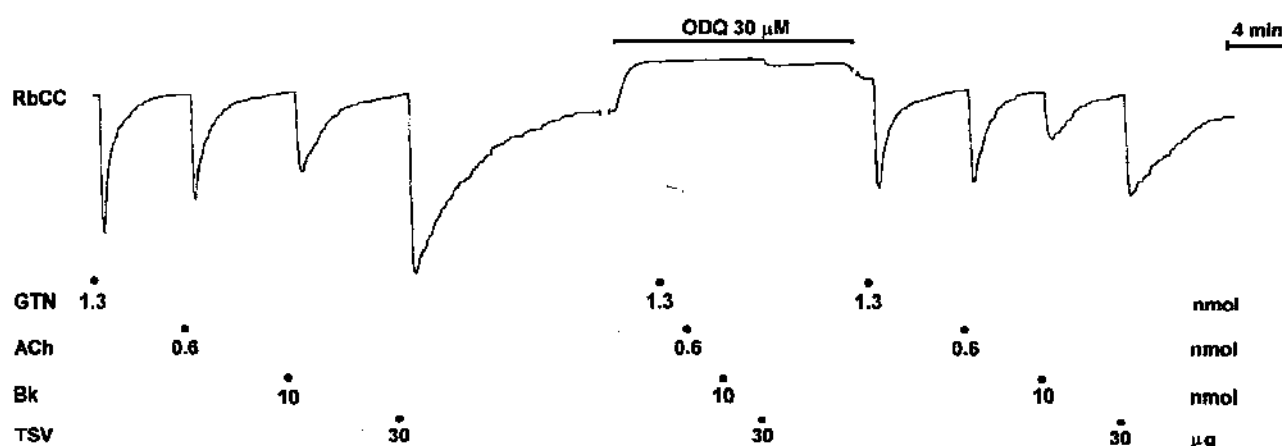


Figura 14: Efeitos da infusão do H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-alquinoxalin-1-ona] (ODQ, 30 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de ODQ aumentou o *tonus* dos tecidos e aboliu as respostas relaxantes induzidas pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk) e veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). Após o término da infusão de ODQ, os relaxamentos de RbCC induzidos por estas substâncias foram parcialmente restaurados. O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

5. Ausência de Efeito da Aprotinina, Hoe 140 e Atropina nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

O inibidor de proteases, aprotinina (Trasylool, 10 µg/ml; n=4), não afetou os relaxamentos de RbCC induzidos pelo TSV (10 µg; 84 ± 23% antes e 62 ± 34% durante a infusão de aprotinina), ACh (0.6 nmol; 141 ± 16% antes e 148 ± 46% durante a infusão de aprotinina) ou GTN (1.3 nmol).

O antagonista de receptores B₂ da bradicinina, Hoe 140 (50 nM; n=5), reduziu drasticamente os relaxamentos de RbCC induzidos por Bk (1 nmol; 88 ± 6% antes e 16 ± 9% durante a infusão de Hoe 140; p<0.01), sem afetar aqueles induzidos pelo TSV (10 µg; 98 ± 11% antes e 95 ± 10% durante a infusão de Hoe 140) ou GTN (0.5 nmol) (Figura 15).

O antagonista de receptores muscarínicos, atropina (1 µM; n=5), praticamente aboliu o relaxamento de RbCC induzido por ACh (1.2 nmol; 117 ± 8% antes e 10 ± 4% durante a infusão de atropina; p<0.01) sem afetar significativamente aqueles induzidos pelo TSV (10 µg; 95 ± 10% antes e 69 ± 6% durante a infusão de atropina) (Figura 16).

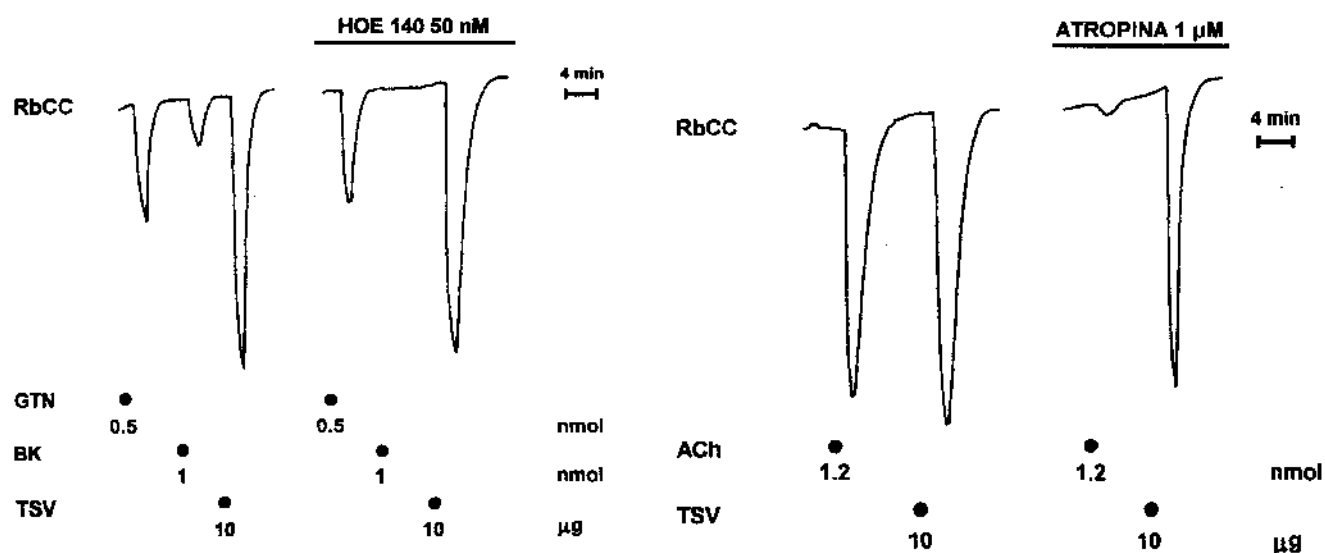


Figura 15: O antagonista de receptores B₂ da bradicinina (Bk). Hoe 140 (50 nM), aboliu os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos pela Bk. Os relaxamentos evocados pelo gliceriltrinitrato (GTN) e pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV) não foram significativamente afetados pela infusão de Hoe 140. O traçado acima é representativo de 5 experimentos.

Figura 16: O antagonista de receptores muscarínicos, atropina (1 µM), praticamente aboliu os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por acetilcolina (ACh) sem afetar, de maneira significativa, a resposta relaxante evocada pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 5 experimentos.

6. Envolvimento de Canais de Potássio nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

A cromacalina (CMK), agonista de canais de potássio ATP-dependentes (10 e 30 nmol), causou um relaxamento duradouro e dose-dependente de RbCC ($51 \pm 9\%$ e $95 \pm 19\%$ de relaxamento, respectivamente; $n=6$). A infusão do antagonista desta classe de canais de K^+ , glibenclamida (10 μM ; $n=6$), reduziu significativamente os relaxamentos induzidos pela CMK (30 nmol; $p<0.01$) sem afetar aqueles induzidos por ACh (0.6 nmol) ou TSV (10 μg) (Tabela 5; Figura 17). Por outro lado, os relaxamentos de RbCC induzidos por CMK (30 nmol) não foram significativamente afetados pelo L-NAME (10 μM ; $30 \pm 6\%$ antes e $27 \pm 4\%$ durante a infusão de L-NAME; $n=4$).

A apamina (100 nM; $n=6$), bloqueador de canais de potássio ativados por Ca^{2+} , não apresentou efeito significativo sobre os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol), CMK (10 nmol) ou TSV (30 μg) (Tabela 5; Figura 18). Similar à apamina, a charibdotoxina (100 nM; $n=6$), outro bloqueador de canais de potássio ativados por Ca^{2+} , não afetou de modo significativo os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol), Bk (10 nmol) ou TSV (30 μg) (Tabela 5; Figura 19).

A infusão do bloqueador não-seletivo de canais de K^+ , tetraetilamônio (TEA, 10 μM ; $n=4$), não alterou de modo significativo as respostas relaxantes de RbCC evocadas por ACh (0.6 nmol), CMK (30 nmol) ou TSV (10 μg) (Tabela 5; Figura 20).

Tabela 5: Percentagens de relaxamento na presença de bloqueadores de canais de K^+

Bloqueador	Relaxamento (%)							
	CMK		ACh		TSV		Bk	
	antes	durante	antes	durante	antes	durante	antes	durante
Glibenclamida	96 ± 19	$11 \pm 6^*$	112 ± 11	98 ± 8	125 ± 11	103 ± 11	n.d.	
Apamina	83 ± 10	98 ± 20	100 ± 4	97 ± 5	76 ± 18	91 ± 18	n.d.	
Charibdotoxina	n.d.		105 ± 29	109 ± 30	95 ± 30	92 ± 30	49 ± 14	50 ± 14
Tetraetilamônio	48 ± 8	46 ± 13	64 ± 13	80 ± 11	60 ± 9	69 ± 14	n.d.	

* $p<0.01$, comparado com o respectivo controle, n.d.: não determinado.

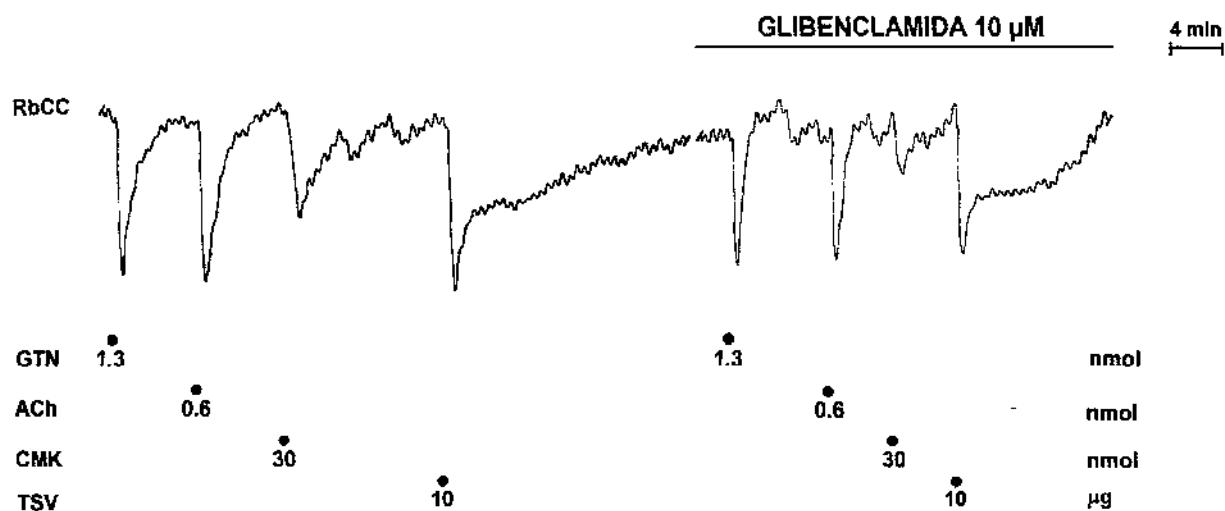


Figura 17: Efeitos da glibenclamida (10 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de glibenclamida inibiu os relaxamentos de RbCC induzidos pela cromacalina (CMK), porém não afetou de modo significativo os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

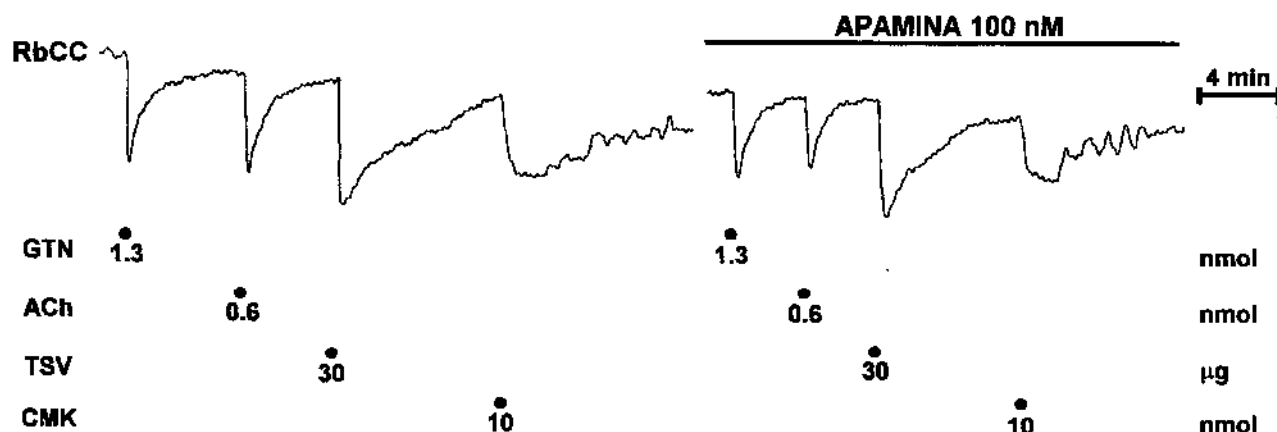


Figura 18: Efeitos da apamina (100 nM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de apamina não alterou de maneira significativa os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh), cromacalina (CMK) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

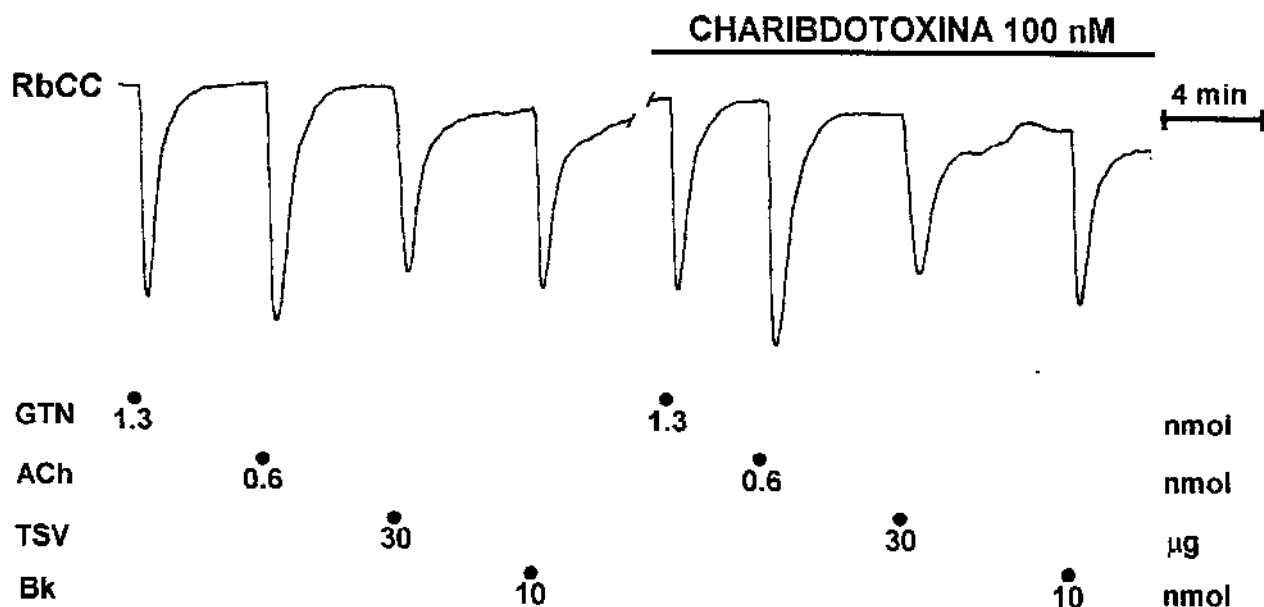


Figura 19: Efeitos da charibdotoxina (100 nM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de charibdotoxina não promoveu alterações significativas nas respostas relaxantes evocadas pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

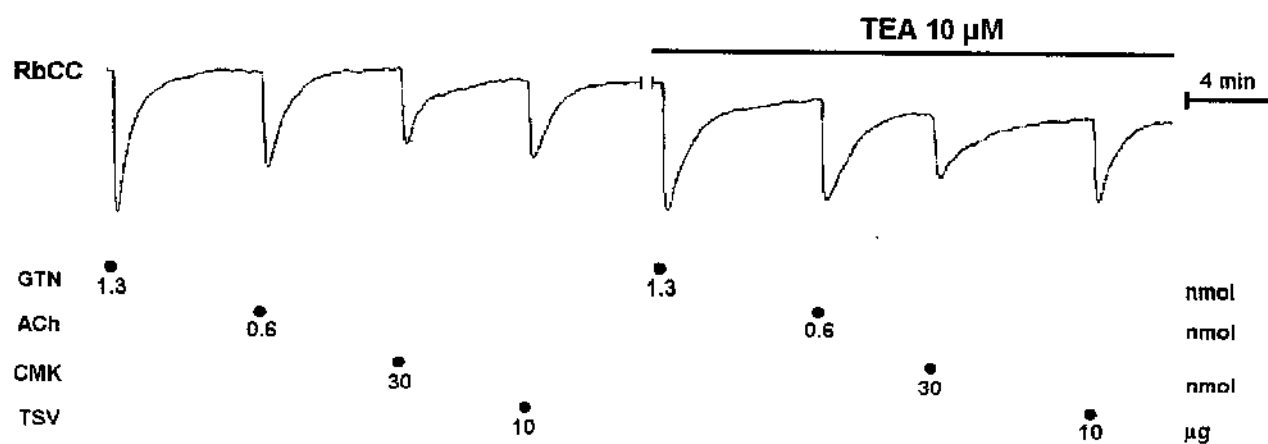


Figura 20: Efeitos de tetraetilamônio (TEA, 10 µM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de TEA não alterou de modo significativo os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh), cromacalina (CMK) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

7. Envolvimento de Canais de Sódio nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

O bloqueador de canais de sódio, tetrodotoxina (TTX, 1 μ M; n=6), aboliu os relaxamentos induzidos pelo TSV (10 μ g; $66 \pm 9\%$ antes e $4 \pm 3\%$ durante a infusão de TTX; $p < 0.01$), sem afetar aqueles induzidos por Bk (10 nmol; $75 \pm 9\%$ antes e $74 \pm 7\%$ durante a infusão de TTX), ACh (0.2 nmol; $80 \pm 1\%$ antes e $91 \pm 10\%$ durante a infusão de TTX) ou GTN (1.3 nmol) (Figura 21).

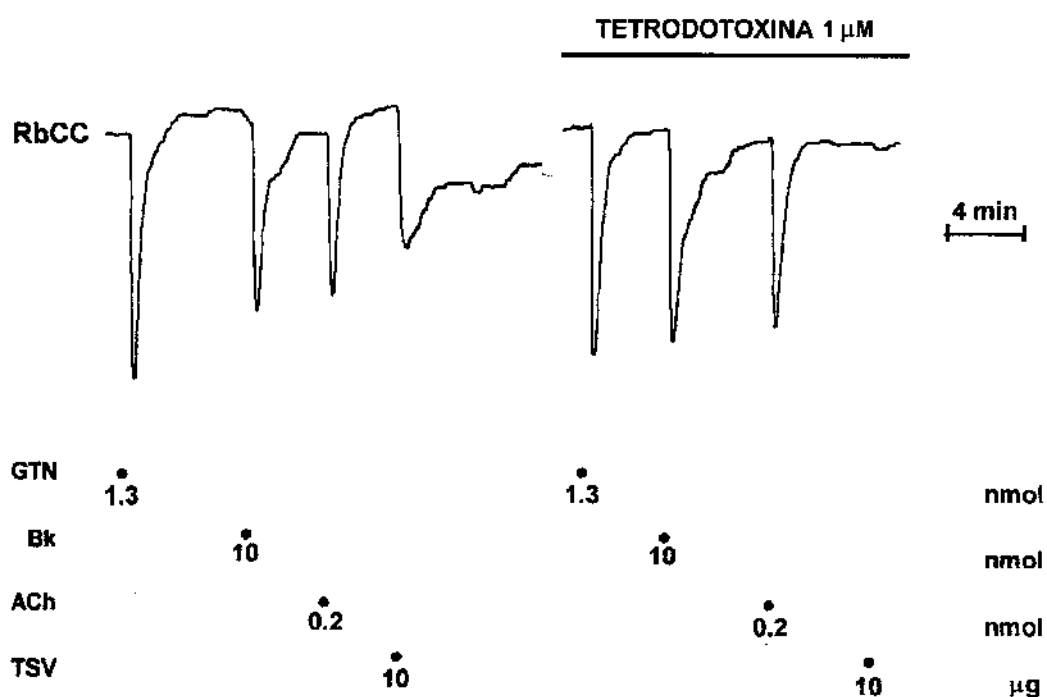


Figura 21: Efeitos da tetrodotoxina (TTX, 1 μ M) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de TTX aboliu especificamente os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV), sem afetar de maneira significativa aqueles evocados pelo gliceriltrinitrato (GTN), bradiginina (Bk) ou acetilcolina (ACh). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

Durante o desenvolvimento do componente lento da resposta, a infusão de TTX ($1 \mu\text{M}$) promoveu retorno imediato da resposta ao *tonus* basal ($n=3$) (Figura 22).

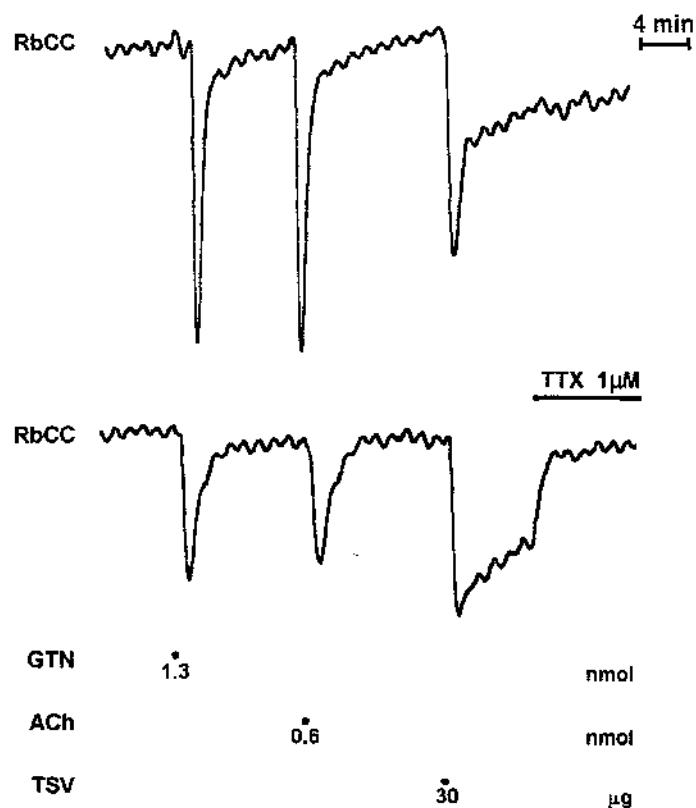


Figura 22: Efeitos da infusão de tetrodotoxina (TTX, $1 \mu\text{M}$) durante a resposta relaxante induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus* (TSV) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). O traçado superior apresenta o padrão da resposta relaxante induzida pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh) e TSV. A infusão de TTX durante o desenvolvimento da resposta induzida pelo TSV no traçado inferior, promoveu o retorno imediato ao *tonus* basal da preparação. O traçado acima é representativo de 3 experimentos.

8. Envolvimento de Via Nitrérgica nos Relaxamentos Induzidos pelo Veneno de *Tityus serrulatus*

A capsaicina ativa terminações nervosas de fibras aferentes sensitivas primárias promovendo a liberação de neuropeptídeos tais como SP e CGRP. Assim, a capsaicina tem sido bastante utilizada como ferramenta de pesquisa no estudo dos terminais NANC (Holzer, 1988).

Doses de capsaicina (Cap) entre 3 e 10 nmol induziram relaxamentos de RbCC de maneira dose-dependente e não-taquifilática. A infusão de vermelho de rutênio (30 μ M; n=6), antagonista funcional da capsaicina, não afetou de maneira significativa os relaxamentos induzidos por ACh (0.6 nmol; $88 \pm 20\%$ antes e $83 \pm 13\%$ durante a infusão de vermelho de rutênio), Bk (10 nmol; $49 \pm 9\%$ antes e $55 \pm 8\%$ durante a infusão de vermelho de rutênio) e TSV (10 μ g; $81 \pm 17\%$ antes e $68 \pm 16\%$ durante a infusão de vermelho de rutênio). Nesta concentração, o vermelho de rutênio reduziu significativamente os relaxamentos induzidos por capsaicina nas doses de 3 nmol ($16 \pm 6\%$ antes e $3 \pm 1\%$ durante a infusão de vermelho de rutênio; $p < 0.05$) e 10 nmol ($53 \pm 12\%$ antes e $19 \pm 8\%$ durante a infusão de vermelho de rutênio; $p < 0.05$). A infusão subsequente de tetrodotoxina (TTX, 1 μ M; n=6) não afetou de maneira significativa os relaxamentos de RbCC induzidos por capsaicina (10 nmol; $71 \pm 6\%$ antes e $68 \pm 6\%$ durante a infusão de TTX) e ACh (0.6 nmol; $79 \pm 1\%$ antes e $90 \pm 10\%$ durante a infusão de TTX), porém aboliu aqueles induzidos pelo TSV (30 μ g; $66 \pm 9\%$ antes e $4 \pm 2\%$ durante a infusão de TTX; $p < 0.01$) (Figura 23).

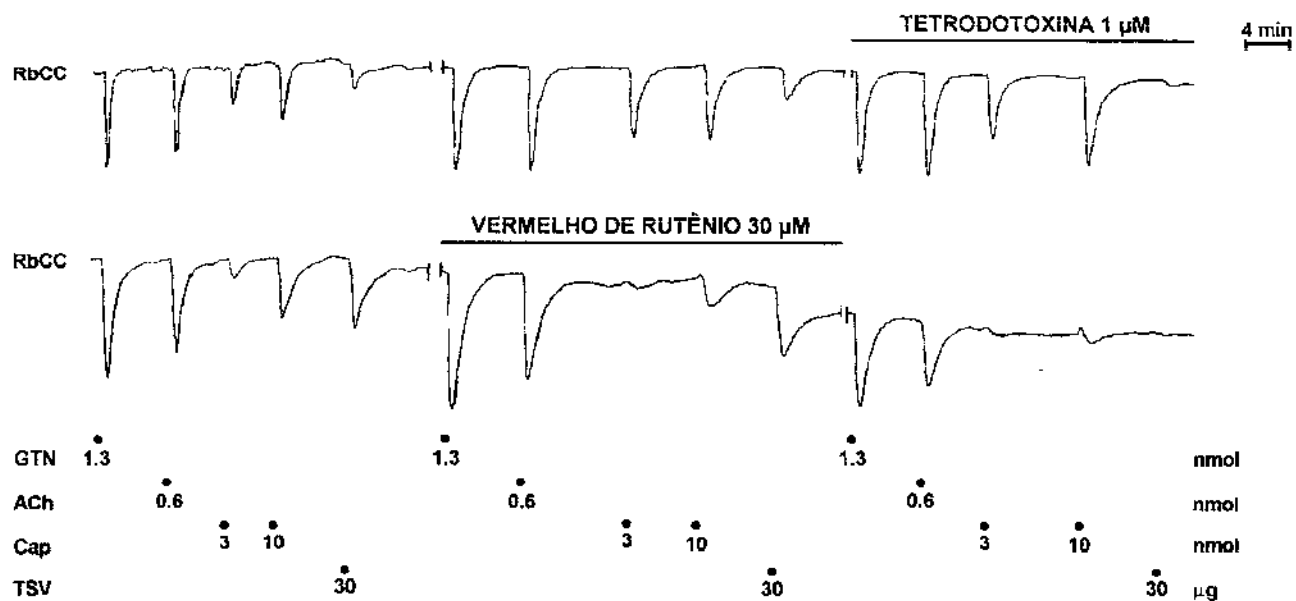


Figura 23: Efeitos da infusão do vermelho de rutênio (30 μM) e da tetrodotoxina (1 μM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de vermelho de rutênio no segundo tecido inibiu de maneira significativa os relaxamentos induzidos pela capsaicina (Cap) sem afetar as respostas induzidas pelo veneno (TSV). A infusão subsequente de tetrodotoxina em ambos os tecidos aboliu os relaxamentos induzidos pelo TSV, sem interferir de modo significativo com aqueles evocados pela Cap. Os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN) ou acetilcolina (ACh) não foram significativamente alterados pela infusão das duas substâncias. O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

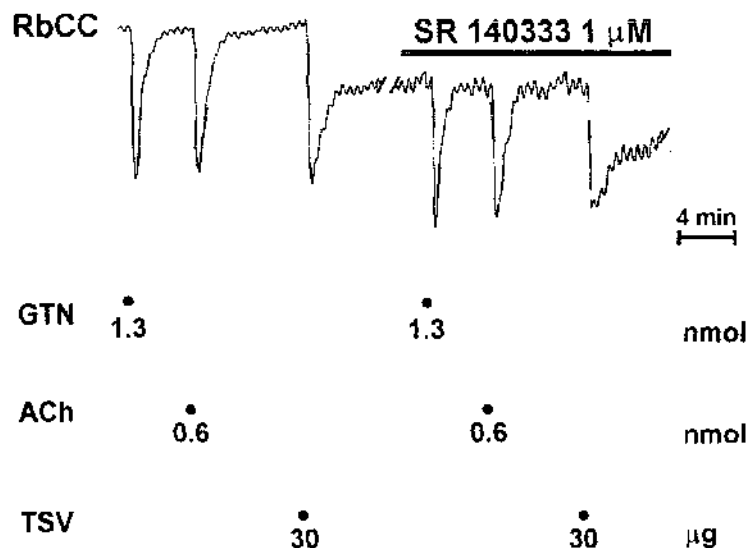


Figura 25: Efeitos da infusão do SR 140333 (1 μM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão do SR 140333 não interferiu de modo significativo nos relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN), acetilcolina (ACh) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

Em doses de até 2 nmol, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) não apresentou efeitos relaxantes significativos em RbCC ($n=4$, não mostrado). A administração do peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 0.6 and 2 nmol) causou pequeno relaxamento dos tecidos ($8 \pm 3\%$ e $19 \pm 4\%$, respectivamente). Os relaxamentos induzidos pelo VIP (2 nmol) não foram significativamente afetados pela infusão de L-NAME (10 μM ; $16 \pm 6\%$ antes e $14 \pm 5\%$ durante a infusão de L-NAME; $n=4$).

10. Estudo do Mecanismo de Transdução do Veneno de *Tityus serrulatus* em Corpo Cavernoso de Coelho

10.1. Efeitos do PMA e Staurosporina

A infusão do ativador de proteína quinase C (PKC), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 100 nM; n=6), não promoveu alteração do *tonus* basal dos tecidos nem alterou os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol; $92 \pm 16\%$ antes e $95 \pm 18\%$ durante a infusão de PMA) ou TSV (10 μ g; $94 \pm 15\%$ antes e $79 \pm 16\%$ durante a infusão de PMA). Os relaxamentos de RbCC induzidos pelo GTN (1.3 nmol) não foram significativamente alterados por esta substância (Figura 26).

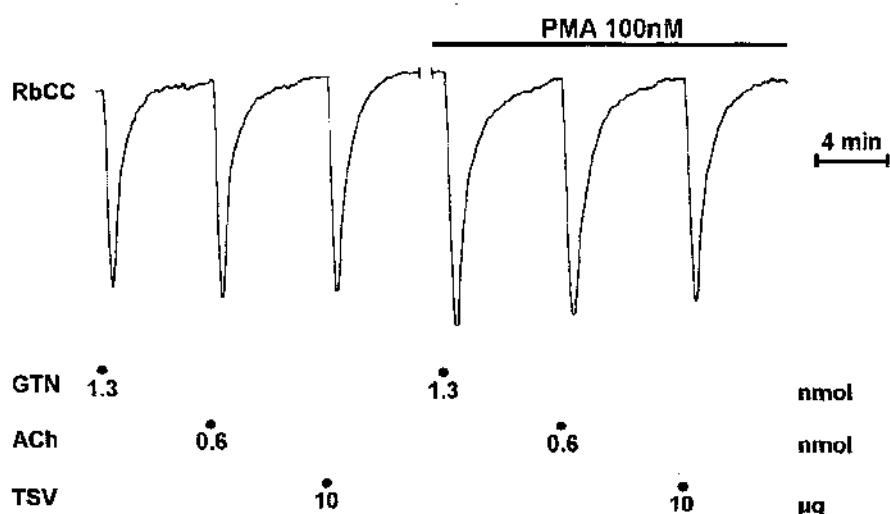


Figura 26: Efeitos do forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 100 nM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de PMA não alterou de modo significativo os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh), gliceriltrinitrato (GTN) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 6 experimentos.

Adicionalmente, o inibidor inespecífico de PKC, staurosporina (150 nM; n=4), não alterou o *tonus* dos tecidos. A infusão de staurosporina não alterou de modo significativo os relaxamentos de RbCC induzidos por ACh (0.6 nmol; $86 \pm 7\%$ antes e $89 \pm 3\%$ durante a infusão de staurosporina), Bk (30 nmol; $50 \pm 12\%$ antes e $55 \pm 5\%$ durante a infusão de staurosporina), adenosina (Ads, 0.1 μ mol; $89 \pm 11\%$ antes e $94 \pm 9\%$ durante a infusão de staurosporina) ou TSV (30 μ g; $70 \pm 11\%$ antes e $78 \pm 7\%$ durante a infusão de staurosporina). As respostas relaxantes evocadas pelo GTN (1.3 nmol) também não foram alteradas de maneira significativa pela staurosporina (Figura 27).

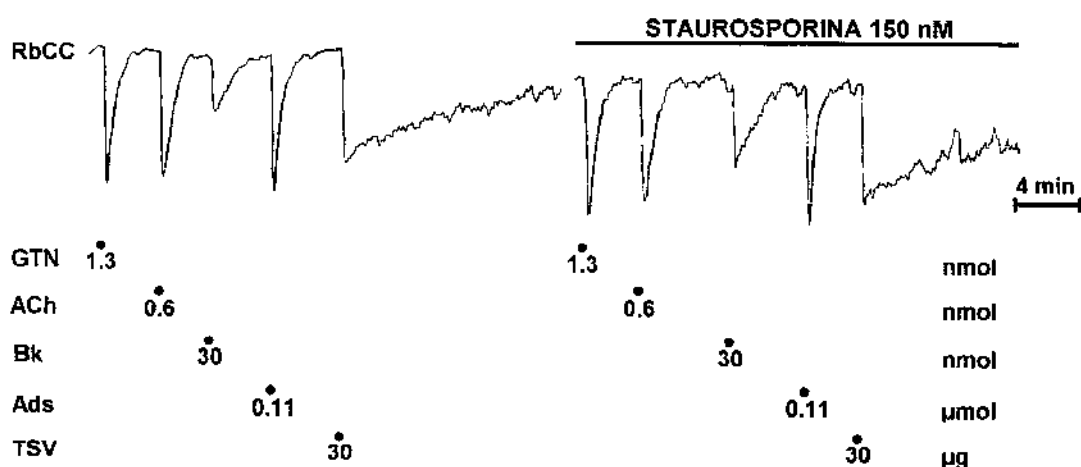


Figura 27: Efeitos da staurosporina (150 nM) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de staurosporina não alterou de modo significativo os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk), adenosina (Ads), gliceriltrinitrato (GTN) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

10.2. Efeitos da Toxina Pertussis

A infusão do inibidor de proteína G estimulatória (Gs), toxina pertussis (10 ng/ml; n=4), não modificou o *tonus* dos tecidos e não apresentou efeito sobre as respostas relaxantes induzidas por ACh (0.6 nmol; $109 \pm 4\%$ antes e $107 \pm 5\%$ durante a infusão de toxina pertussis), Bk (30 nmol; $30 \pm 9\%$ antes e $38 \pm 13\%$ durante a infusão de toxina pertussis) ou TSV (30 μ g; $92 \pm 14\%$ antes e $96 \pm 7\%$ durante a infusão de toxina pertussis). Os relaxamentos de RbCC induzidos pelo GTN (1.3 nmol) também não foram afetados de modo significativo (Figura 28).

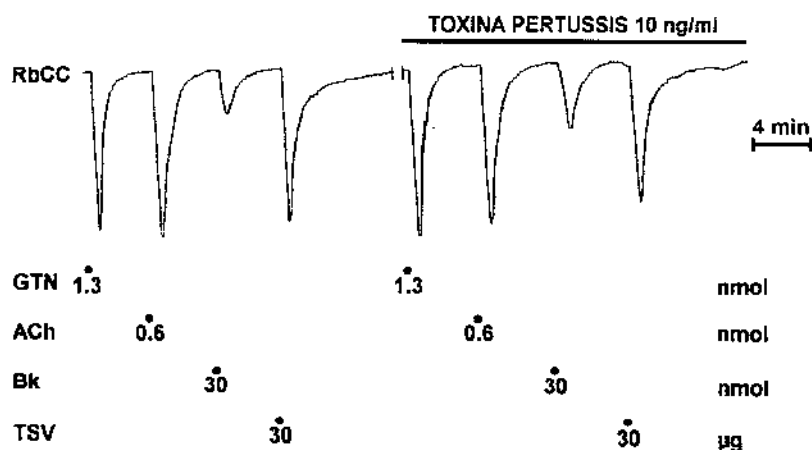


Figura 28: Efeitos da toxina pertussis (10 ng/ml) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de toxina pertussis não alterou de modo significativo os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk), gliceriltrinitrato (GTN) ou veneno de *Tityus serrulatus* (TSV). O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

10.3. Efeitos da Tapsigargina

A infusão do inibidor da bomba Ca^{2+} -ATPase, tapsigargina ($1 \mu\text{M}$; $n=5$), não promoveu alteração do *tonus* basal dos tecidos, porém, inibiu os relaxamentos de RbCC induzidos pelos diversos agonistas: ACh (0.2 nmol ; $92 \pm 16\%$ antes e $45 \pm 19\%$ durante a infusão de tapsigargina; $p<0.01$); Bk (10 nmol ; $61 \pm 17\%$ antes e $40 \pm 13\%$ durante a infusão de tapsigargina; $p<0.01$); Ads (37 nmol ; $72 \pm 15\%$ antes e $30 \pm 13\%$ durante a infusão de tapsigargina; $p<0.01$) e trifosfato de adenosina (ATP, 18 nmol ; $55 \pm 11\%$ antes e $9 \pm 5\%$ durante a infusão de tapsigargina; $p<0.01$). Os relaxamentos induzidos pelo TSV ($30 \mu\text{g}$) também foram significativamente reduzidos na presença de tapsigargina ($112 \pm 8\%$ antes e $52 \pm 4\%$ durante a infusão de tapsigargina; $p<0.01$). Os relaxamentos induzidos pelo GTN (1.3 nmol) não foram significativamente alterados na presença de tapsigargina (Figura 29).

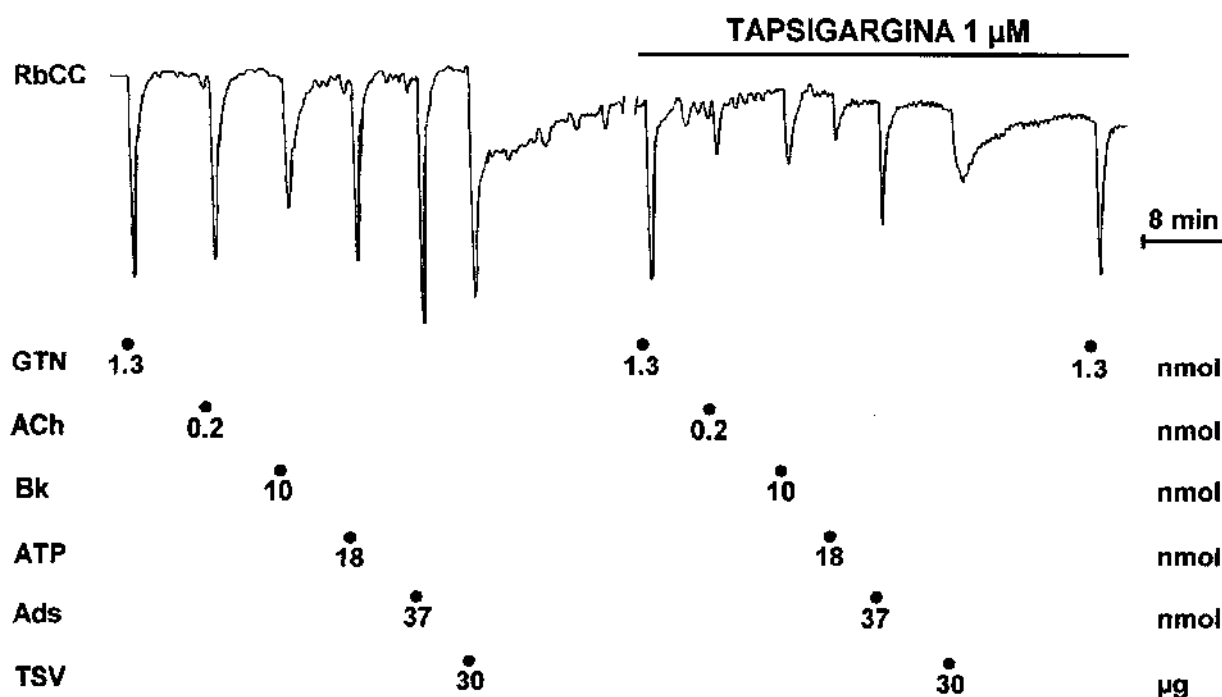


Figura 29: Efeitos da tapsigargina ($1 \mu\text{M}$) em corpo cavernoso de coelho (RbCC). A infusão de tapsigargina inibiu de modo significativo os relaxamentos induzidos pela acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk), trifosfato de adenosina (ATP); adenosina (Ads) e veneno de *Titivus serrulatus* (TSV). Os relaxamentos induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN) não foram significativamente alterados. O traçado acima é representativo de 5 experimentos.

11. Fracionamento do Veneno de *Tityus serrulatus*

O extrato do veneno bruto de *Tityus serrulatus*, aqui designado veneno solúvel, obtido como descrito no item II.3. e cromatografado em coluna de CM-celulose-52, forneceu as frações denominadas I (29.79%), II-III (7.85%), IV (0.68%), V (3.15%), VI (1.22%), VII (3.43%), VIII (19.26%), IX (6.98%), X (4.01%), XI (3.58%), XII (2.97%) e XIII (12.29%) (Figura 30). A percentagem de recuperação para esta cromatografia foi de 95.21% em termos de $A_{280 \text{ nm}}$.

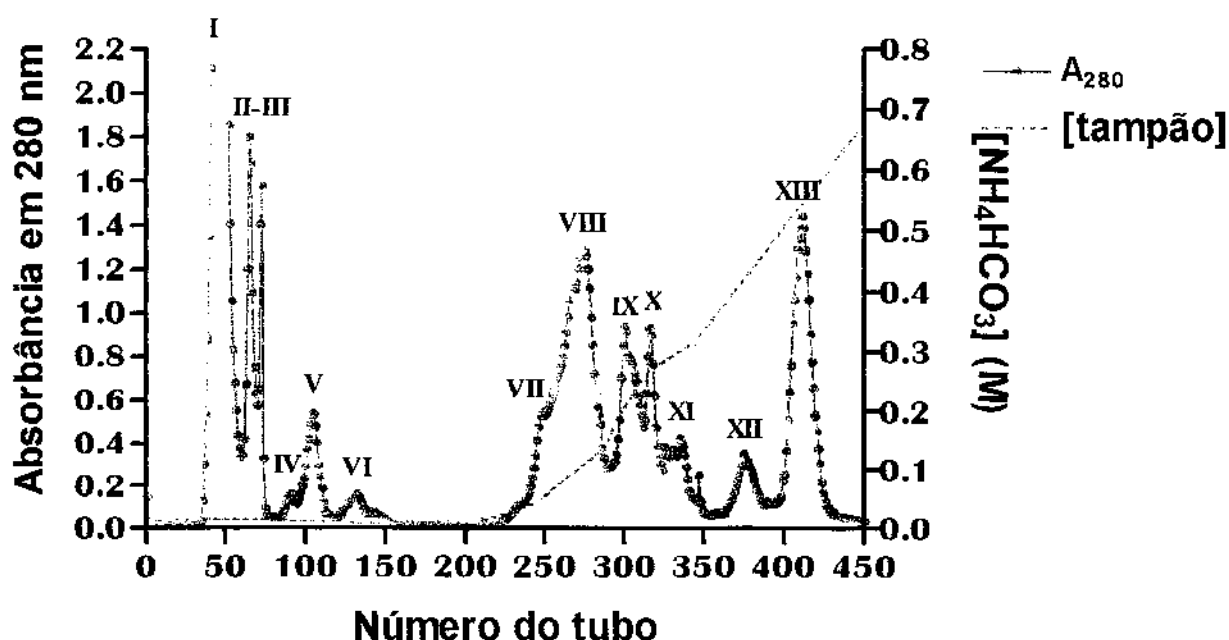


Figura 30: Cromatografia em CM-celulose-52 do extrato obtido de 400 mg do veneno de *Tityus serrulatus*. Coluna de 2.4 cm X 63.0 cm, equilibrada com tampão NH_4HCO_3 0.01 M, pH 7.8. Fluxo: 26.7 ml/h; volume coletado por tubo: 3.0 ml; temperatura: 5°C. A coluna foi inicialmente eluída com NH_4HCO_3 0.01 M, pH 7.8, iniciando-se a seguir, um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0.01 a 1.0 M.

12. Ensaio Biológico das Frações do Veneno de *Tityus serrulatus*

De todas as frações obtidas da cromatografia do veneno solúvel, as frações I-IX e XIII (acima de 80 µg) não apresentaram efeito em corpo cavernoso de coelho (RbCC) (não-mostrado, n=6). Por outro lado, as frações X (1.2-12 µg), XI (1.4-14 µg) e XII (1-10 µg) foram capazes de relaxar a musculatura lisa do RbCC de maneira dose-dependente e não-taquifilática. O veneno de *Tityus serrulatus* (TSV, 30 µg; n=8) causou $65 \pm 8\%$ de relaxamento, enquanto as frações X (3.8 µg; n=8), XI (4.2 µg; n=8) e XII (3.0 µg; n=8) causaram $44 \pm 8\%$, $56 \pm 12\%$ e $54 \pm 10\%$ de relaxamento, respectivamente.

Os relaxamentos induzidos pelas toxinas X, XI e XII ocorreram através da liberação de NO visto que as respostas relaxantes foram inibidas pelo L-NAME (10 µM; n=4) e revertidas pela L-arginina (300 µM; n=4) (Tabela 6). O relaxamento também foi sensível à ação da tetrodotoxina (1 µM; n=4) (Tabela 7).

Tabela 6: Percentagem de relaxamento das frações ativas obtidas do veneno de *T. serrulatus* na presença de L-NAME

Agente	Relaxamento (%)		
	Controle	L-NAME (10 µM)	L-Arginina (300 µM)
Acetilcolina (0.6 nmol)	104.8 ± 6.26	15.0 ± 0.71*	80.0 ± 3.76 [#]
Fração X (3.8 µg)	47.0 ± 9.43	1.0 ± 1.00*	35.5 ± 6.79 [#]
Fração XI (4.2 µg)	51.8 ± 13.51	5.5 ± 3.77*	41.0 ± 13.01 [#]
Fração XII (3.0 µg)	58.5 ± 8.97	8.3 ± 2.32*	45.5 ± 7.96 [#]
TSV (30 µg)	61.8 ± 13.29	9.3 ± 4.68*	47.8 ± 11.06 [#]

*p<0.01 em comparação com os valores controles de relaxamento.

[#]p<0.01 em comparação com os valores de relaxamento na presença do L-NAME.

Tabela 7: Percentagem de relaxamento das frações ativas obtidas do veneno de *T. serrulatus* na presença de tetrodotoxina

Relaxamento (%)		
<u>Agente</u>	<u>Controle</u>	<u>Tetrodotoxina (1 μM)</u>
Acetilcolina (0.6 nmol)	75.0 \pm 18.37	77.0 \pm 16.50
Fração X (3.8 μ g)	41.0 \pm 13.75	0.0 \pm 0.00*
Fração XI (4.2 μ g)	60.8 \pm 22.04	8.8 \pm 7.18*
Fração XII (3.0 μ g)	49.3 \pm 19.01	6.8 \pm 6.10*
TSV (30 μ g)	78.3 \pm 4.89	8.5 \pm 5.89*

*p<0.01 em comparação com os valores controles de relaxamento.

DISCUSSÃO



O presente estudo demonstra claramente que o veneno de *Tityus serrulatus* induz relaxamentos em corpo cavernoso isolado de coelho. O relaxamento induzido pelo veneno é dependente da liberação de NO, pois observou-se inibição significativa do mesmo durante infusão de inibidores não-seletivos da NOS, tais como L-NAME, L-NIO e L-NMMA. Tais efeitos não foram observados com o enantiômero inativo D-NAME, comprovando ser uma inibição estereoespecífica (Moore *et al.*, 1989; Ishii *et al.*, 1990; Mülsch & Busse, 1990; Rees *et al.*, 1990a; Rees *et al.*, 1990b). Além disso, a infusão de L-arginina, mas não D-arginina, reverteu o efeito inibitório do L-NAME, reforçando o envolvimento do NO na resposta evocada pelo veneno de *Tityus serrulatus*. A observação que o *tonus* dos tecidos se encontra aumentado durante a infusão destes compostos sugere que, em corpo cavernoso de coelho, há uma liberação basal de NO, o que corrobora com estudos prévios, os quais também demonstram este efeito em outras preparações, tais como junção cólon-ílica de cão (Ward *et al.*, 1992), íleo de cobaia (Wiklund *et al.*, 1993) e corpo cavernoso de coelho e humano (Holmquist *et al.*, 1992a).

A guanilato ciclase solúvel, um dos “receptores” fisiológicos para o NO, contém um grupamento heme, no qual o NO interage para ativar a enzima (Gerzer *et al.*, 1981). O azul de metileno inibe a capacidade dos doadores de NO de ativar a guanilato ciclase solúvel (Katsuki *et al.*, 1977). Isto levou ao emprego generalizado deste composto como inibidor seletivo desta enzima. De fato, nossos resultados indicam que o azul de metileno promoveu uma inibição significativa dos relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*, acetilcolina e pelo doador de NO, gliceril trinitrato. Devido à capacidade do azul de metileno de oxidar íons Fe^{2+} , há evidências atuais de que este composto inibe também a NOS, que contém um grupo heme (Klatt *et al.*, 1992; McMillan *et al.*, 1992; White & Marletta, 1992). Entretanto, isto é controverso visto que o azul de metileno é prontamente reduzido pela citocromo P-450 redutase, por aceitar elétrons dos domínios de flavina também presentes na NOS (Kelner *et al.*, 1988) indicando que esta redução é independente do grupo heme da NOS (Klatt *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1995). O ODQ foi recentemente descrito como um inibidor seletivo e potente da guanilato ciclase solúvel especificamente ativada pelo NO (Garthwaite *et al.*, 1995). Este composto inibe seletivamente a guanilato ciclase solúvel em tecido vascular e plaquetas (Moro *et al.*, 1996), além de inibir tanto relaxamentos nitrérgicos quanto aqueles induzidos por doadores de NO em músculo anococcígeno de coelho (Cellek *et al.*, 1996), tornando-se uma ferramenta bastante útil na compreensão do papel do GMPc nas

ações biológicas do NO. De fato, nossos resultados mostraram que o ODQ praticamente aboliu o relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus*, confirmando novamente a participação do NO nestas respostas. Ao contrário do azul de metileno, o qual promove a oxidação de íons Fe^{2+} tornando a atividade inibitória irreversível, o ODQ promove uma inibição reversível. Isto indica, provavelmente, que NO e ODQ competem pelo mesmo sítio ligante, ou sítios adjacentes ao grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (Brunner *et al.*, 1996). Em conjunto, estes resultados demonstram que o relaxamento induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* em corpo cáavernoso de coelho está diretamente relacionado à ativação da guanilato ciclase solúvel no músculo liso.

O veneno de *Phoneutria nigriventer* (aranha armadeira) relaxa corpo cavernoso de coelho devido à ativação do sistema de calicreína tissular e liberação subsequente de NO (Lopes-Martins *et al.*, 1994). No entanto, o antagonista de receptores B_2 de bradicinina, Hoe 140, e o inibidor de calicreínas, aprotinina, não foram capazes de inibir o relaxamento do corpo cavernoso induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus*, o que demonstra claramente que esta via não é responsável pela liberação de NO em resposta ao veneno de escorpião. Além disso, a incapacidade do veneno de *Tityus serrulatus* em ativar o sistema de calicreína tissular foi confirmada na microcirculação cutânea de coelhos *in vivo* onde este veneno, ao contrário daquele de *Phoneutria nigriventer* (Marangoni *et al.*, 1993), não causa formação de edema local (Antunes *et al.*, comunicação pessoal).

O veneno de *Tityus serrulatus* libera neurotransmissores tais como acetilcolina ou catecolaminas de preparações musculares isoladas (Diniz & Torres, 1968; Langer *et al.*, 1975; Freire-Maia *et al.*, 1976b). Assim, investigamos se o relaxamento de corpo cavernoso poderia ser decorrente da liberação de acetilcolina da preparação. Entretanto, a observação de que o bloqueio de receptores muscarínicos pela atropina não inibiu o relaxamento induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* indica que o sistema colinérgico não está envolvido. A participação do sistema adrenérgico foi obviamente descartada visto que a ativação do mesmo resulta em contração, ao invés de relaxamento de corpo cavernoso.

O NO relaxa células de músculo liso por estimulação da guanilato ciclase solúvel, com conseqüente acúmulo de GMPc e modificação de vários processos intracelulares dependentes de GMPc (Lincoln & Connwell, 1991; Lincoln & Connwell, 1993), incluindo a ativação de canais de K^+ através de proteínas quinases dependentes de GMPc (Robertson *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1993). O NO pode também ativar diretamente canais de K^+

dependentes de Ca^{2+} (K_{Ca}) em membranas de músculo liso vascular por um mecanismo independente do acúmulo de GMPc (Bolotina *et al.*, 1994). Nossos resultados mostraram que a cromacalina (agonista de canais de K^+) relaxou o corpo cavernoso e este efeito foi seletivamente bloqueado pela glibenclamida, indicando a presença de canais funcionais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) funcionais em tecido erétil. Entretanto, os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* não foram modificados por antagonistas de canais de K_{Ca} (apamina e charibdotoxina), K_{ATP} (glibenclamida) ou voltagem-dependentes (tetraetilamônio), indicando que canais de K^+ não estão envolvidos no mecanismo de transdução das respostas induzidas pelo veneno de *Tityus serrulatus* em corpo cavernoso.

Toxinas de venenos de escorpiões contém proteínas que mimetizam os efeitos de estimulação nervosa (Moss *et al.*, 1974a; Moss *et al.*, 1974b). Neurotoxinas de escorpião têm sido extensivamente utilizadas para o estudo dos mecanismos de ativação dos canais de sódio (Jaimovich *et al.*, 1982; Nagy, 1988; Vassilevet *et al.*, 1988). Estas são classificadas de acordo com os mecanismos de ação farmacológica nestes canais. Por exemplo, α -toxinas (procedentes das espécies norte-africanas e asiáticas) bloqueiam a fase de inativação do canal de Na^+ , prolongando assim o potencial de ação. As β -toxinas (procedentes das espécies americanas) reconhecem outro sítio nos canais de sódio e não são dependentes do potencial de membrana para sua ação (Jover *et al.*, 1980; Wheeler *et al.*, 1983). Os venenos de escorpiões sul-americanos, incluindo o *Tityus serrulatus*, contém α e β -toxinas (Barharin *et al.*, 1982).

A tetrodotoxina (TTX), toxina obtida dos peixes tetrodontes, contém um grupo guanidino, constituído por um cátion orgânico conhecido por sua capacidade de atravessar canais de sódio (Hille, 1971). A presença deste grupo é essencial para a ação farmacológica desta toxina, pois o cátion orgânico adentra o canal de sódio, tornando-o impermeável ao restante da molécula. Como resultado, a passagem de íons sódio através do canal é fisicamente impedida, cuja consequência é o bloqueio da condução iônica (Smythies *et al.*, 1971; Catterall, 1986). De acordo com o exposto, demonstramos que a tetrodotoxina inibiu especificamente os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* e, além disso, restaurou prontamente ao *tonus* basal os relaxamentos já instalados. Isto indica que a liberação de NO pelo veneno é precedida por despolarização de fibras nervosas. Sabendo-se que o sistema adrenérgico é responsável pela contração do

corpo cavernoso e que o sistema colinérgico não está envolvido nos relaxamentos induzidos pelo veneno, a nossa hipótese é que o veneno de *Tityus serrulatus* libera NO em corpo cavernoso de coelho através da estimulação de fibras nervosas NANC. Esta hipótese é corroborada por estudos prévios mostrando que o veneno de *Tityus serrulatus* libera um fator neurogênico (ainda não-identificado) de fibras nervosas e terminais periféricos de nervos ciático ou safeno, capazes de promover aumento da permeabilidade vascular e formação de edema nas áreas supridas por estes nervos (Garcia-Leme *et al.*, 1977).

De fato, tecidos eréteis são densamente inervados por fibras nervosas inibitórias do tipo NANC (Gillespie, 1972; Klinge & Sjöstrand, 1974), as quais exercem funções essenciais nos mecanismos neurais durante a ereção peniana, através da liberação de NO (Ignarro *et al.*, 1990a; Kim *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Rajfer *et al.*, 1992). Assim, as fontes potenciais de NO em preparações de corpo cavernoso podem ser tanto fibras nervosas NANC como também o endotélio que reveste a rede de capilares sinusóides presentes no tecido cavernoso.

A NOS, enzima que catalisa a conversão de L-arginina em NO e L-citrulina, compreende três isoformas estruturalmente distintas: neuronal (bNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). Dessa forma, tem havido grande procura na descoberta de inibidores seletivos para cada isoforma desta enzima, uma vez que podem ser úteis para a compreensão dos efeitos farmacológicos do NO em diversos sistemas biológicos e, possivelmente, no tratamento de uma grande variedade de doenças (Ogden & Moore, 1995). Recentemente, foi descrito que o 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM) é um potente inibidor das isoformas neuronal e induzível da NOS, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos (Handy *et al.*, 1995). Entretanto, nossos resultados mostram que o TRIM (mesmo em doses elevadas) não foi capaz de inibir os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*. Este resultado a priori descarta a possibilidade de que o veneno relaxa esta preparação por promover a liberação de NO de terminações nervosas NANC, após ativação de uma bNOS. Entretanto, em preparação de bNOS de cerebelo de coelho *in vitro*, o TRIM mostrou-se praticamente ineficaz em inibir a enzima (cerca de 1000 vezes menos potente comparado ao L-NAME), indicando, possivelmente, que as ações do TRIM sejam específicas para o camundongo, mas não para outras espécies animais, tais como o coelho.

A capsaicina, substância conhecida por ativar neurônios sensoriais primários (Jancsó *et al.*, 1977), tem sido usada como uma importante ferramenta farmacológica no campo de pesquisa sobre terminais nervosos NANC. Uma vez que é capaz de ativar terminais nervosos periféricos resultando em despolarização e descarga de potenciais de ação, a capsaicina leva a uma variedade de respostas biológicas incluindo hiperalgesia (Bernstein *et al.*, 1981; Carpenter & Lynn, 1981; Stjärne *et al.*, 1989) e edema neurogênico (Buckley *et al.*, 1990). Após a excitação de fibras nervosas NANC (principalmente aquelas do tipo C) pela capsaicina, observa-se a liberação de neuropeptídeos dos terminais nervosos aferentes ativados (Holzer, 1988; Maggi & Meli, 1988). Os neuropeptídeos liberados pela capsaicina dos terminais de fibras nervosas aferentes compreendem a substância P, neurocinina A, CGRP e VIP (Holzer, 1988; Maggi & Meli, 1988; Saria *et al.*, 1988; Maggi *et al.*, 1989). Dentre estes peptídeos, a substância P tem sido descrita como liberador de NO de tecido endotelial, levando à vasodilatação local ou sistêmica (Andersson *et al.*, 1984). Por outro lado, o VIP não requer a liberação de NO para promover seu efeito relaxante em tecidos eréteis (Pickard *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que a capsaicina causou relaxamentos independentes tanto da liberação de NO (resistentes ao L-NAME) quanto da estimulação nervosa (resistentes à tetrodotoxina). Além disso, o vermelho de rutênio, um antagonista funcional da capsaicina (Buckley *et al.*, 1990; Amann & Maggi, 1991), reduziu acentuadamente os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos pela capsaicina, porém não afetou aqueles induzidos pelo veneno. Isto sugere que é improvável que o veneno ative fibras C do sistema NANC causando a liberação de neuropeptídeos e, conseqüentemente, liberação de NO do endotélio sinusoidal dos corpos cavernosos. A observação de que a substância P promove contração dependente de receptores NK₁, ao invés de relaxamentos, reforça a hipótese que o relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* não resulta da ativação de neurônios sensíveis à capsaicina e liberação subsequente deste peptídeo. Isto está de acordo com estudos prévios mostrando a escassez de nervos imunorreativos à substância P em tecido erétil humano (Andersson *et al.*, 1983; Gu *et al.*, 1983). Além disso, tanto o VIP quanto o CGRP foram ineficazes em promover o relaxamento de corpo cavernoso de coelho, o que exclui a participação destes neuropeptídeos no mecanismo de ação do veneno de *Tityus serrulatus*.

Demonstrou-se recentemente que terminais nervosos do sistema NANC podem liberar diretamente NO (ou alguma substância doadora de NO) em diversas preparações tais como anococcígeno de rato (Gillespie & Sheng, 1989; Gillespie *et al.*, 1989), junção íleo-cólon de cão (Boeckxstaens *et al.*, 1990) e traquéia de cobaia (Tucker *et al.*, 1990). Esta evidência foi baseada na inibição da resposta NANC pela oxihemoglobina e por geradores de ânions superóxidos, na instabilidade do neurotransmissor, na potenciação da resposta por L-arginina e na sua inibição por análogos da L-arginina. Assim, a despolarização das terminações NANC decorrente de estimulação elétrica pode levar ao influxo de cálcio que, por sua vez, ativa a NOS presente nestes nervos (Sheng *et al.*, 1992). O NO sintetizado difunde-se prontamente dos nervos autonômicos NANC (nervos nitrérgicos) para a célula-alvo (o músculo liso), sem o envolvimento de vesículas ou limitação pela membrana plasmática neuronal (Snyder, 1990). Isto, obviamente, levanta a possibilidade que o veneno de *Tityus serrulatus* especifica e diretamente ativa nervos nitrérgicos presentes no tecido cavernoso e, dessa forma, o relaxamento seria resultado do NO liberado dos terminais nervosos sem o envolvimento do endotélio sinusoidal.

Venenos e toxinas de várias espécies de escorpiões podem causar despolarização generalizada dos nervos periféricos levando à descarga acentuada de neurotransmissores, o que pode justificar a potencial letalidade do envenenamento tanto em humanos quanto em animais de laboratório. Foi recentemente demonstrado que o veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* apresenta atividade relaxante bastante pronunciada no músculo anococcígeno de rato. Tal atividade é bloqueada pela tetrodotoxina, demonstrando que os relaxamentos são precedidos por estimulação nervosa, e pelo L-NAME, confirmando o envolvimento da via L-arginina-NOS-NO nestas respostas (Gwee *et al.*, 1995). Portanto, apesar das investigações a respeito dos efeitos de venenos de escorpião sobre a transmissão NANC serem escassos, este estudo envolvendo o veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* corrobora os efeitos observados do veneno de *Tityus serrulatus* em nosso estudo, pois ambos demonstram a participação da neurotransmissão NANC e do NO em músculo anococcígeno de rato e em corpo cavernoso de coelho, respectivamente.

Na tentativa de elucidar o mecanismo de transdução responsável pela liberação de NO em resposta ao veneno de *Tityus serrulatus*, usamos ferramentas farmacológicas (PMA,

staurosporina, toxina pertussis e tapsigargina) freqüentemente utilizadas em várias preparações biológicas e cujos mecanismos de ação são relativamente bem compreendidos.

A liberação de NO do endotélio estimulada por agonistas é iniciada por um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} pela via do fosfatidilinositol (Newby & Henderson, 1990). O esvaziamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} sensíveis ao IP_3 induz ao influxo de Ca^{2+} extracelular. É provável que o Ca^{2+} extracelular adentre a célula endotelial através de canais catiônicos não-seletivos (Olesen *et al.*, 1988; Hallam *et al.*, 1989), cuja ativação é desencadeada tanto por elevação do Ca^{2+} citoplasmático quanto por formação de IP_4 (Lückhoff & Clapham, 1992).

A tapsigargina depleta os estoques de Ca^{2+} intracelulares, reduzindo marcadamente (Dolor *et al.*, 1992) ou abolindo (Macarthur *et al.*, 1993) a mobilização subsequente de Ca^{2+} intracelular dependente de agonistas tais como ADP, bradicinina ou histamina em células endoteliais bovinas ou humanas. Ao invés do rápido aumento transitório dos níveis de Ca^{2+} intracelulares induzido por estes agonistas, a tapsigargina promove um desenvolvimento lento e elevação prolongada dos níveis de Ca^{2+} , requerindo a presença de Ca^{2+} extracelular. Além disso, em vários tipos celulares a tapsigargina é um agente de ação rápida, cuja atividade inibitória da Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático é irreversível (Dolor *et al.*, 1992).

A elevação sustentada dos níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células endoteliais, através de um aumento do influxo de Ca^{2+} , determina a produção e liberação de NO e, subsequente redução de Ca^{2+} nas células adjacentes do músculo liso vascular (Wang *et al.*, 1996). Além disso, a L-arginina potencializa a produção de NO, reduz parcialmente a concentração de Ca^{2+} intracelular no endotélio e reduz marcadamente o conteúdo de Ca^{2+} nas células do músculo liso vascular, demonstrando os efeitos autócrinos e parácrinos do NO (Shin *et al.*, 1992). A tapsigargina é capaz de depletar estoques intracelulares de Ca^{2+} através da inibição da bomba Ca^{2+} -ATPase que, por sua vez, desencadeia o influxo de Ca^{2+} extracelular via canais de Ca^{2+} sensíveis à nifedipina, levando à ativação da NOS, e geração subsequente de NO (Moritoki *et al.*, 1994; Petkov & Boev, 1996). Assim, em aorta torácica de rato, a tapsigargina induz relaxamentos dependentes do endotélio e da produção de GMPc (Moritoki *et al.*, 1994). Em nossos experimentos, a tapsigargina não alterou o *tonus* basal dos tecidos, porém inibiu de modo significativo os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*, bem como aqueles induzidos pela acetilcolina,

bradicinina, ATP e adenosina. É provável que tal efeito inibitório seja causado pela inibição da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático presente no músculo liso trabecular do corpo cavernoso, tendo conseqüência a manutenção de níveis sustentados de Ca^{2+} citoplasmático, mesmo na presença da ativação da guanilato ciclase solúvel induzida pelo NO. Entretanto, nos respostas relaxantes induzidas pelo gliceriltrinitrato, não se observou alteração significativa durante a infusão de tapsigargina.

A proteína quinase C (PKC) representa outro importante sistema de segundo-mensageiro envolvido na regulação da contração de células musculares lisas. A adição de um ativador de PKC, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), reduz a expressão de iNOS nestas células, cujo efeito ocorre a nível transcripcional (Geng *et al.*, 1994). Estas observações sugerem que a ativação da PKC está envolvida na regulação negativa do gene de expressão da iNOS e no fenômeno de contração do músculo liso vascular. O PMA inibe a liberação de EDRF de células endoteliais de aorta bovina estimulada por vários agonistas (De Nucci *et al.*, 1988) além de inibir o relaxamento em resposta a vários agentes que liberam NO diretamente como o nitroprussiato de sódio na aorta de rato (Obianime & Dale, 1989), de coelho (Urquhart & Broadley, 1991) e artéria coronária de cão (Sheridan *et al.*, 1991), bem como o A23187 na aorta de coelho (Izzo & Peach, 1987) e artéria femural de cão (Rubanyi *et al.*, 1989). Adicionalmente, o PMA inibe o relaxamento do músculo liso e geração de GMPc causados pela acetilcolina e pelo NO na aorta de rato (Morrison & Pollock, 1990). Tais evidências sugerem que a ativação da PKC pode não somente inibir a produção de NO nas células endoteliais, mas também o efeito relaxante direto do NO sobre as células do músculo liso vascular (Murphy *et al.*, 1994). Todavia, na dose utilizada de PMA (100 nM) os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos pela acetilcolina, gliceriltrinitrato ou veneno de *Tityus serrulatus* não foram afetados na presença desta substância. Estudos subseqüentes serão conduzidos no intuito de verificar o efeito de doses elevadas desta substância sobre os relaxamentos induzidos pelos agentes citados acima.

Estudos conduzidos com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais as citocinas induzem a NOS no músculo liso vascular demonstram que a staurosporina (inibidor de PKC) não afeta a indução da NOS ou produção de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ estimulada por interleucina 1β (Kanno *et al.*, 1993). Outras evidências sugerem que o NO exerce um controle de feedback negativo sobre a ativação da PKC (Nishizawa *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que a inibição da PKC pela staurosporina não apresenta quaisquer efeitos inibitórios sobre o

sistema NO-GMP cíclico e de acordo com os nossos resultados, os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* não foram afetados de modo significativo pela staurosporina.

Demonstrou-se recentemente que a toxina pertussis (PTx), inibidor de proteína G estimulatória (Gs) não apresenta efeitos sobre os relaxamentos de artéria mesentérica bovina induzidos por estimulação elétrica (Leckstrom *et al.*, 1993). As subfamílias G₀ e G_i de proteínas G são sensíveis à PTx e estão implicadas na inibição da adenilato ciclase e na modulação de vários canais iônicos e fosfolipase C em certos sistemas. Entretanto, a incapacidade da PTx em inibir os efeitos da bradicinina em células endoteliais indica que outras proteínas G podem estar associadas aos receptores B₂. De modo semelhante, os relaxamentos de corpo cavernoso de coelho induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*, acetilcolina ou bradicinina não foram alterados de maneira significativa pela PTx. Isto sugere que durante o mecanismo de transdução evocado pelo veneno, não parece haver um acoplamento de proteínas G sensíveis à PTx com os canais de sódio ativados pela despolarização das fibras NANC ou canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes, ativados subsequente à abertura dos canais de sódio.

Pelo exposto acima, notamos que, provavelmente, o mecanismo intraneuronal de transdução do veneno não envolve aqueles clássicos descritos para outros tipos celulares. Mais recentemente, tem sido descrito que a ativação de terminações nervosas sensoriais dependem de canais de Ca²⁺ do tipo N (Zigmunt *et al.*, 1993; Zigmunt *et al.*, 1995) e, nesse sentido, antagonistas seletivos desta classe de canais (ω -conotoxinas) poderiam ser ferramentas importantes para a compreensão do mecanismo de transdução de sinais induzido pelo veneno.

Em resumo, o NO oriundo de fibras nitrérgicas tem sido proposto como um dos principais mediadores do sistema NANC em tecido erétil (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Burnett *et al.*, 1992; Knispel *et al.*, 1992). A bNOS já foi inclusive localizada nas fibras NANC de corpo cavernoso de coelho (Bush *et al.*, 1992). Os presentes resultados nos permitem concluir que o veneno de *Tityus serrulatus* ativa terminações nervosas nitrérgicas, no qual o primeiro passo seria a ativação de canais de Na⁺ presentes nos terminais nervosos, com conseqüente liberação do neurotransmissor (NO).

Venenos de algumas espécies de escorpião contém várias proteínas básicas neurotóxicas, além de outros componentes como sais, compostos orgânicos e proteínas

ácidas (Watt & Simard, 1984). O veneno de *Tityus serrulatus* vem sendo investigado extensivamente durante as três últimas décadas e muitas das toxinas que constituem o veneno já foram descritas (Gomez & Diniz, 1966; Possani *et al.*, 1977; Jonas *et al.*, 1986; Arantes *et al.*, 1989; Marangoni *et al.*, 1990; Sampaio *et al.*, 1991; Marangoni *et al.*, 1995). Os processos para o fracionamento de venenos de escorpião incluem uma combinação de filtração em gel e cromatografia (além de recromatografias) de troca iônica. De acordo com os resultados obtidos as frações X, XI e XII obtidas do veneno de *Tityus serrulatus* promoveram relaxamento de corpo cavernoso de coelho, o qual mostrou ser dependente da liberação de NO oriundo de terminações NANC, visto que o L-NAME e a tetrodotoxina inibiram estas respostas de modo eficaz. A caracterização bioquímica e farmacológica destas toxinas tem por objetivo elucidar e complementar os resultados obtidos com o veneno bruto, tornando tais substâncias ferramentas bastante úteis no entendimento do processo fisiológico da ereção peniana.

CONCLUSÕES



O veneno de *Tityus serrulatus* relaxa o corpo cavernoso de coelho através da liberação de óxido nítrico (NO), visto que os relaxamentos foram afetados por inibidores da síntese de NO e inibidores da guanilato ciclase solúvel;

O veneno de *Tityus serrulatus* não atua por ativação do sistema de caliceína tissular nem por liberação de acetilcolina de fibras nervosas parassimpáticas, pois não se observou inibição dos relaxamentos decorrente do bloqueio de receptores B₂ e de receptores muscarínicos, respectivamente;

A observação de que os vários bloqueadores seletivos de canais de K⁺ utilizados não interferiu com os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* exclui a participação destes canais no mecanismo de transdução do veneno;

A tetrodotoxina inibiu especificamente os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus*, indicando que a liberação de NO evocada pelo veneno é precedida por ativação nervosa;

A descoberta de que os relaxamentos induzidos pelo veneno de *Tityus serrulatus* não foram afetados pelo vermelho de rutênio indica que o veneno, ao contrário da capsaicina, não atua por ativação de fibras sensoriais primárias do tipo C;

Portanto, é proposto que o veneno de *Tityus serrulatus* atue por desencadear a liberação de NO de nervos seletivamente nitrérgicos em corpo cavernoso de coelho;

O veneno de *Tityus serrulatus* e suas frações ativas podem ser utilizados como ferramentas farmacológicas para o entendimento do mecanismo de ativação de nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) em tecidos eréteis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ABOSEIF SR & LUE TH (1988) Hemodynamics of penile erection. *Urol. Clin. North Am.*, **15**: 1-7.
- ADAIKAN PG (1979) *Pharmacology of the Human Penis* (MS thesis). Singapore: Univ. of Singapore, 1-213.
- ADAIKAN PG & KARIM SMM (1981) Adrenoceptors in the human penis. *J. Auton. Pharmacol.*, **1**: 199-203.
- ADAIKAN PG, KOTTEGODA SR & RATNAM SS (1986) Is vasoactive intestinal polypeptide the principal transmitter involved in human penile erection? *J. Urol.*, **135**: 638-640.
- ADRIAN TE, GU J, ALLEN JM, TATEMOTO K, POLAK JM & BLOOM SR (1984) Neuropeptide Y in the human male genital tract. *Life Sci.*, **35**: 2643-2648.
- ALARANTA S, UUSITALO H, HAUTAMÄKI AM & KLINGE E (1991) Calcitonin gene-related peptide: immunohistochemical localization in, and effects on, the bovine penile artery. *Int. J. Impotence Res.* **3**: 49-59.
- ALBUQUERQUE EX, DALY JW & WITKOP B (1971) Batrachotoxin: chemistry and pharmacology. *Science Wash. DC*, **172**: 995-1002.
- AMANN R & MAGGI CA (1991) Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sci.*, **49**: 849-856.
- AMARAL CFS, REZENDE NA & FREIRE-MAIA L (1993) Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am. J. Cardiol.*, **71**: 242-245.
- AMENTA F, CAVALLOTTI C, DE ROSSI M, FERRANTE F & GEPETTI P (1987) Vasoactive intestinal polypeptide in the penis of old rats. *J. Neural Transm.*, **70**: 137-143.
- AMITAI Y, MINES Y, AKER M & GOITEIN K (1984) Scorpion sting in children. A review of 51 cases. *Clin. Pediatr.*, **24**: 136-140.
- ANDERSSON KE, HEDLUND H, MATTIASSON A, SJÖGREN C & SUNDLER F (1983) Relaxation of isolated human corpus spongiosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation. *World J. Urol.*, **1**: 203-208.
- ANDERSSON KE (1992) Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol. Toxicol.*, **70**: 244-254.
- ANDERSSON KE (1993) The pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol. Rev.*, **45**: 253-308.
- ANDERSSON PO, BLOOM SR & MELLANDER S (1984) Hemodynamics of pelvic nerve induced penile erection in the dog: possible mediation by vasoactive intestinal polypeptide. *J. Physiol. Lond.*, **350**: 209-224.
- AOKI H, TAKAGANE H, BANYA Y, FUJIOKA T, SEO K, KUBO T & OHHORI T (1986) Human penile hemodynamics studied by a polarographic method. *J. Urol.*, **135**: 872-876.

- AOKI H, TAKAGANE H, MATSUZAKA J, BANYA Y, FUJIOKA T, NAKAYA S, KUBO T & OHHORI T (1989) Quantitative analysis of outflow pathway of corpora cavernosa by pressure flow technique. *J. Urol.*, **141**: 645-650.
- ARANTES EC, PRADO WA, SAMPAIO SV & GIGLIO JR (1989) A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. *Toxicon*, **27**: 907-916.
- ARI G, VARDI Y, HOFFMAN A & FINBERG JPM (1996) Possible role for endothelins in penile erection. *Eur. J. Pharmacol.*, **307**: 69-74.
- ARNOLD WP, MITTAL CK, KATSUKI S & MURAD F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3203-3207.
- AZADZOI KM, KIM N, BROWN ML, GOLDSTEIN I, COHEN RA & SAENZ DE TEJADA I (1992) Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.*, **147**: 220-225.
- BARHANIN J, GIGLIO JR, LEOPOLD P, SHIMID A, SAMPAIO SV & LAZDUNSKY M (1982) *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *J. Biol. Chem.*, **257**: 12553-12558.
- BAWASKAR HS (1982) Diagnostic cardiac premonitory signs and symptoms of red scorpion sting. *Lancet*, ii: 552-554.
- BELL C (1972) Autonomic nervous control of reproduction: circulatory and other factors. *Pharmacol. Rev.*, **24**: 657-736.
- BENOIT E, LEGRAND AM & DUBOIS JM (1986) Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon*, **24**: 357-364.
- BENSON GS, McCONNELL J, LIPSHULTZ LJ, CORRIERE JN Jr & WOOD JG (1980) Neuromorphology and neuropharmacology of the human penis. *J. Clin. Invest.*, **65**: 506-513.
- BENSON GS (1983) Penile erection: in search of a neurotransmitter. *World J. Urol.*, **1**: 209-212.
- BERGMAN C, DUBOIS JM, ROJAS E & RATHMAYER W (1976) Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. *Biochim. Biophys. Acta*, **455**: 173-184.
- BERNSTEIN JE, SWIFT RM, SOLTANI K & LORINCZ AL (1981) Inhibition of axon reflex vasodilation by topically applied capsaicin. *J. Invest. Dermatol.*, **15**: 394-395.
- BLAUSTEIN MP, ROGOWSKI RS, SCHNEIDER MJ & KRUEGER BK (1991) Polypeptide toxins from the venoms of Old World and New World scorpions preferentially block different potassium channels. *Mol. Pharmacol.*, **40**: 932-942.

- BOECKXSTAENS GE, PELCKMANS PA, BULT H, DE MAN JG, HERMAN AG & VAN MAERCKE YM (1990) Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur. J. Pharmacol.*, **190**: 239-246.
- BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ & COHEN RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**: 850-853.
- BOSCH RHLH, BENARD F, ABOSEIF SR, STIEF CG, LUE TF & TANAGHO EA (1991) Penile detumescence: characterization of three phases. *J. Urol.*, **146**: 867-871.
- BOWMAN A & DRUMMOND AH (1984) Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **81**: 665-674.
- BREDT DS & SNYDER SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 9030-9033.
- BREDT DS, HWANG PM & SNYDER SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature*, **347**: 768-770.
- BRUNNER F, SCHMIDT K, NIELSEN EB & MAYER B (1996) Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**: 48-53.
- BUCARETECHI F, BARACAT ECE, NOGUEIRA RJN, CHAVES A, ZAMBRONE FAD, FONSECA MRCC & TOURINHO FS (1995) A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **37**: 331-336.
- BUCKLEY TL, BRAIN SD & WILLIAMS TJ (1990) Ruthenium red selectively inhibits oedema formation and increased blood flow induced by capsaicin in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 7-8.
- BÜLBRING E & TOMITA T (1987) Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, **39**: 49-96.
- BULT H, BOECKXSTAENS GE, PELCKMANS PA, JORDEANS FH, VAN MAERCKE YM & HERMAN AG (1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, **345**: 346-347.
- BURNETT AL, LOWENSTEIN CJ, BREDT DS, CHANG TSK & SNYDER SH (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science Wash. DC*, **257**: 401-403.
- BUSH PA, ARANSON WJ, BUGA GM, RAJFER J & IGNARRO LJ (1992a) Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, **147**: 1650-1655.

- BUSH PA, ARANSON WJ, RAJFER J, BUGA GM & IGNARRO LJ (1992b) Comparison of nonadrenergic, noncholinergic, and nitric oxide-mediated relaxation of corpus cavernosum. *Int. J. Impotence Res.*, **4**: 85-93.
- BUSH PA, GONZALEZ NE & IGNARRO LJ (1992c) Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**: 308-314.
- CAHALAN MD (1975) Modification of sodium gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *J. Physiol. Lond.*, **244**: 511-534.
- CARATI CJ, CREED KE & KEOGH EJ (1987) Autonomic control of penile erection in dogs. *J. Physiol. Lond.*, **384**: 525-538.
- CARATI CJ, CREED KE & KEOGH EJ (1988) Vascular changes during erection in the dog. *J. Physiol. Lond.*, **400**: 75-88.
- CARPENTER SE & LYNN B (1981) Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, **73**: 755-758.
- CATTERALL WA (1977) Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.*, **252**: 8669-8676.
- CATTERALL WA (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**: 15-43.
- CATTERALL WA & GAINER M (1985) Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon*, **23**: 497-504.
- CATTERALL WA (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 953-985.
- CELLEK S, KASAKOV L & MONCADA S (1996) Inhibition of nitregeric relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.*, **118**: 137-140.
- CHRIST GJ, MAAYANI S, VALCIC M & MELMAN A (1990) Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in α -adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 375-381.
- COOK NS (1988) The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**: 21-28.
- CORRADO AP, ANTÔNIO A & DINIZ CR (1968) Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*), an unusual sympathetic postganglionic stimulant. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **164**: 253-258.
- CORRADO AP, RICCIOPO NETO F & ANTÔNIO A (1974) The mechanism of the hypertensive effect of Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello). *Toxicon*, **12**: 145-150.

- COSTA PM, SOULIE-VASSAL L, SARRAZIN B, REBILLARD X, NAVRATIL H & BALI JP (1993) Adrenergic receptors on smooth muscle cells isolated from human penile corpus cavernosum. *J. Urol.*, **150**: 859-863.
- COURAUD F, JOVER E, DUBOIS JM & ROCHAT H (1982) Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon*, **20**: 9-16.
- COURAUD F & JOVER E (1984) Mechanism of action of scorpion toxins. In: *Handbook of Natural Toxins*, edited by A. Tu. Marcel Dekker, New York, vol. **2**, p. 659-678.
- CROSSMAN D, McEWAN J, MACDERMOT J, MACINTYRE I & DOLLERY CT (1987) Human calcitonin gene-related peptide activates adenylate cyclase and releases prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **92**: 695-701.
- CUNHA-MELO JR, FREIRE-MAIA L, TAFURI WL & MARIA TA (1973) Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon*, **11**: 81-84.
- CUNHA-MELO JR, GONZAGA HMS, ALZAMORA F & FREIRE-MAIA L (1983) Effects of purified scorpion toxin (tityustoxin) on gastric secretion in the rat. *Toxicon*, **21**: 843-848.
- CUNHA-MELO JR, ALMEIDA AP, GONZAGA HMS, GOMEZ MV & FREIRE-MAIA (1987) Effect of scorpion toxin on gastric histamine and acetylcholine content in the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **20**: 393-401.
- CUNHA-MELO JR, TOPPA NH, MARTINS P, COLARES CN, CASTRO YS & FREIRE-MAIA L (1991) Acute gastric mucosal injury induced by toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom: a novel experimental model in the rat. *Toxicon*, **29**: 1395-1402.
- DAIL WG, MOLL MA & WEBER K (1983) Localization of vasoactive intestinal polypeptide in penile erectile tissue and in the major pelvic ganglion of the rat. *Neuroscience*, **10**: 1379-1386.
- DAIL WG, MCGUFFEE L, MINORSKY N & LITTLE S (1987) Responses of smooth muscle strips from penile erectile tissue to drugs and transmural field stimulation. *J. Auton. Pharmacol.*, **7**: 287-293.
- DAIL WG (1993) Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: *The Autonomic Nervous System. Nervous Control of the Urogenital System*, edited by C. A. Maggi. London, Harwood, vol. **6**, chapt. 3, p. 69-101.
- DANIEL EE, VAN BREEMEN C, SCHILLING WP & KWAN CY (1995) Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**: 551-557.
- DE GROAT WC & BOOTH AM (1993) Neural control of penile erection. In: *The Autonomic Nervous System. Nervous Control of the Urogenital System*, edited by C. A. Maggi. London, Harwood, vol. **6**, chapt. 13, p. 465-513.

- DE NUCCI G, GRYGLEWSKI RJ, WARNER TD & VANE JR (1988) Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2334-2338.
- DHABUWALA CB, RAMAKRISHNA VR & ANDERSON GF (1985) Beta adrenergic receptors in human cavernous tissue. *J. Urol.*, **133**: 721-723.
- DINIZ CR & GONÇALVES JM (1960) Separation of biologically active components from scorpion venom by zone electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 470.
- DINIZ CR & TORRES JM (1968) Release of an acetylcholine-like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. *Toxicon*, **5**: 227-236.
- DOLOR RJ, HURWITZ LM, MIRZA Z, STRAUSS HC & WHORTON AR (1992) Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am. J. Physiol.*, **262**: C171-C181.
- DORR LD & BRODY MJ (1967) Hemodynamic mechanisms of erection in the canine penis. *Am. J. Physiol.*, **213**: 1526-1531.
- ECKHARD C (1863) Untersuchungen über die Erektion des Penis beim Hunde. *Beitr. Anat. Physiol.*, **3**: 123-166.
- ECKHARD C (1869) Zur Lehre von dem Bau und der Erektion des Penis. *Beitr. Anat. Physiol.*, **4**: 69-88.
- FEELISCH M (1991) The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**: Suppl. 3: S25-S33.
- FÖRSTERMANN U, TROGISCH G & BUSSE R (1984) Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.*, **106**: 639-643.
- FÖRSTERMANN U, MÜLSCH A, BÖHME E & BUSSE R (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res.*, **58**: 531-538.
- FÖRSTERMANN U, GORSKY LD, POLLOCK JS, ISHII K, SCHMIDT HHHW, HELLER M & MURAD F (1990a) Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol. Pharmacol.*, **38**: 7-13.
- FÖRSTERMANN U, GORSKY LD, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, HELLER M & MURAD F (1990b). Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **168**: 727-732.
- FÖRSTERMANN U, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, HELLER M & MURAD F (1991a) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is

present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1788-1792.

FÖRSTERMANN U, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, MITCHELL JA, KOHLHAAS KL, HELLER M & MURAD F (1991b) Characterization and purification of particulate EDRF synthase from bovine aortic endothelial cells. *FASEB J.*, **5**: A1728.

FÖRSTERMANN U, SCHMIDT HHHW, POLLOCK JS, SHENG H, MITCHELL JA, WARNER TD, NAKANE M & MURAD F (1991c) Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.*, **42**: 1849-1857.

FOURNIER GR, JÜNEMANN KP, LUE TF & TANAGHO EA (1987) Mechanisms of venous occlusion during canine penile erection: an anatomic demonstration. *J. Urol.*, **137**: 163-167.

FOVAEUS M, ANDERSSON KE & HEDLUND H (1987) Effects of some calcium channel blockers on isolated human penile erectile tissue. *J. Urol.*, **138**: 1267-1272.

FREIRE-MAIA L & FERREIRA MC (1961) Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial, produzidas pelo veneno de escorpião, no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **59**: 11.

FREIRE-MAIA L & DINIZ CR (1970) Pharmacological action of a purified scorpion toxin in the rat. *Toxicon*, **8**: 132.

FREIRE-MAIA L, AZEVEDO AD & COSTA VAL VP (1973) Respiratory arrhythmias produced by purified scorpion toxin. *Toxicon*, **11**: 255-258.

FREIRE-MAIA L, PINTO GJ & FRANCO I (1974) Mechanism of cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **188**: 207-212.

FREIRE-MAIA L; AZEVEDO AD & LIMA EG (1976a) Pharmacological blockade of the cardiovascular and respiratory effects produced by tityustoxin in the rat. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, edited by A. Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum, New York, vol. **2**, p. 287.

FREIRE-MAIA L, CUNHA-MELO Jr, GOMEZ MV, TAFURI WL, MARIA TA, CALIXTO SL & FUTURO-NETO HA (1976b) Studies on the mechanism of action of tityustoxin. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, edited by A. Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum, New York, vol. **2**, p. 273.

FREIRE-MAIA L, CUNHA-MELO Jr, FUTURO-NETO HA, AZEVEDO AD & WEINBERG J (1976c) Cholinergic and adrenergic effects of tityustoxin. *Gen. Pharmac.*, **7**: 115-121.

FREIRE-MAIA L, ALMEIDA HO, CUNHA-MELO Jr, AZEVEDO AD & BARROSO J (1978) Mechanism of the pulmonary edema induced by intravenous injection of scorpion toxin in the rat. *Agents Actions*, **8**: 113.

- FREIRE-MAIA L & CAMPOS JA (1989) Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: *Natural toxins: characterization, pharmacology and therapeutics*, edited by C. L. Ownby and G. V. Odell. Stillwater, Oklahoma, p. 139-159.
- FREIRE-MAIA L & DE MATOS IM (1993) Heparin or a PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Toxicon*, **31**: 1207-1210.
- FURCHGOTT RF & ZAWADSKI JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376.
- GARCIA-LEME J, PIMENTA AF, RAULINO-FILHO M & DINIZ CR (1977). Sensory nerves and inflammation: evidence for the release of a neurogenic permeability factor by tityustoxin. *J. Path.*, **124**: 165-176.
- GARTHWAITE J, SOUTHAM E, BOULTON CL, NIELSEN EB, SCHMIDT K & MAYER B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, **48**: 184-188.
- GENG YJ, WU Q & HANSSON GK (1994) Protein kinase C activation inhibits cytokine-induced nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1223**: 125-132.
- GERBER NC & DE MONTELLANO PRO (1995) Neuronal nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, irreversible inhibition by phenyldiazene, and active site topology. *J. Biol. Chem.*, **270**: 17791-17796.
- GERSTENBERG T, LEVIN RJ & WAGNER G (1990) Erection and ejaculation in men. Assessment of the electromyographic activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles. *Br. J. Urol.*, **65**: 395-402.
- GERZER R, BOHME E, HOFMANN F & SCHULTZ G (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.*, **132**: 71-74.
- GILLESPIE JS (1972) The rat anococcygeous muscle and its response to nerve stimulation and to some drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **45**: 404-416.
- GILLESPIE JS & SHENG H (1989) A comparison of haemoglobin and erythrocytes as inhibitors of smooth muscle relaxation by the NANC transmitter in the BRP and rat anococcygeous and by EDRF in the rabbit aortic strip. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 445-450.
- GILLESPIE JS & XIAORONG L (1989) The effect of arginine and L-N-monomethyl arginine on the response of the bovine retractor penis to stimulation of its NANC nerves. *Br. J. Pharmacol.*, **97**: 453P.
- GILLESPIE JS, LIU X & MARTIN W (1989) The effects of L-arginine and N^G-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeous to NANC nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 1080-1082.

- GILLESPIE JS, LIU X & MARTIN W (1990) The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In: *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System*, edited by S. Moncada and E. A. Higgs. Amsterdam, Elsevier, chapt. 17, p. 147-164.
- GIULIANO F, BERNABE J, JARDIN A & ROUSSEAU JP (1993) Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J. Urol.*, **150**: 519-524.
- GOLDSTEIN AMB, MEEHAN JP, ZAKHARY R, BUCKLEY PA & ROGERS FA (1982) New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology*, **3**: 259-266.
- GOMEZ MV & DINIZ CR (1966) Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem. Inst. Butantan*, **33**: 899.
- GONZAGA HMS, ALZAMORA F, CUNHA-MELO Jr & FREIRE-MAIA L (1979) Gastric secretion induced by scorpion toxin. *Toxicon*, **17**: 316-318.
- GORSKY LD, FÖRSTERMANN U, ISHII K & MURAD F (1989) Production of an EDRF-like activity in the citosol of N1E-115 neuroblastoma cells. *FASEB J.*, **4**: 1494-1500.
- GRIFFITH TM, EDWARDS DH, LEWIS MJ, NEWBY AC & HENDERSON AH (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, **308**: 645-647.
- GRUNDEMAR L & R HAKANSSON (1993) Multiple neuropeptide Y receptors are involved in cardiovascular regulation. Peripheral and central mechanisms. *Gen. Pharmacol.*, **24**: 785-796.
- GU J, POLAK JM, PROBERT L, ISLAM KN, MARANGOS PJ, MINA S, ADRIAN TE, MCGREGOR GP, O'SHAUGHNESSY DJ & BLOOM SR (1983) Peptidergic innervation of the human male genital tract. *J. Urol.*, **130**: 386-391.
- GWEE MCE, CHEAH LS & GOPALAKRISHNAKONE P (1995) Involvement of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway in the relaxant responses of the rat isolated anococcygeus muscle to a scorpion (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) venom. *Toxicon*, **33**: 1141-1150.
- HALLAM TJ, JACOB R & MERRITT JE (1989) Influx of bivalent cations can be independent of receptor stimulation in human endothelial cells. *J. Biochem.*, **259**: 125-129.
- HAMILTON TC & WESTON AH (1989) Cromakalim and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, **20**: 1-9.
- HANDY RLC, WALLACE P, GAFFEN ZA, WHITEHEAD KJ & MOORE PK (1995). The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase *in vitro*, in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **116**: 2349-2350.
- HANYU S, IWANAGA T, TAMAKI M, KANO K & SATO S (1992) Increase in venous outflow from the corpora cavernosa during mild erection in dogs. *Urol. Int.*, **48**: 58-63.

- HEATON JPW (1990) Synthetic nitrovasodilators are effective, in vitro, in relaxing penile tissue from impotent men: the findings and their implications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **67**: 78-81.
- HEDLUND H, ANDERSSON KE & MATTIASSON A (1984) Pre- and postjunctional adreno- and muscarinic receptor functions in the isolated human corpus spongiosum urethane. *J. Auton. Pharmacol.*, **4**: 241-249.
- HEDLUND H & ANDERSSON KE (1985a) Comparison of the responses to drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Auton. Pharmacol.*, **5**: 81-88.
- HEDLUND H & ANDERSSON KE (1985b) Effects of some peptides on isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *Acta Physiol. Scand.*, **124**: 413-419.
- HEDLUND P, ALM P, HEDLUND H, LARSSON B & ANDERSSON KE (1994a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal peptide, and helospectin in human penile erectile tissue: localization and functional effects (Abstract). *Int. J. Impotence Res.* **6**, Suppl. 1: A7.
- HEDLUND P, ALM P, HEDLUND H, LARSSON B & ANDERSSON KE (1994b) Localization and effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human penile erectile tissues. *Acta Physiol. Scand.*, **150**: 103-104.
- HEDLUND P, HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1994c) Effects of nicorandil on human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Urol.*, **151**: 1107-1113.
- HERSHKOVICH Y, ELITSUR Y, MARGOLIS CZ, BARAK N, SOFER S & MOSES SW (1985) Criteria map audit of scorpion envenomation in Negev, Israel. *Toxicon*, **23**: 845-854.
- HILLE B (1971) The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J. gen. Physiol.*, **58**: 599-619.
- HILLE B (1975) The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin: a structural hypothesis. *Biophys. J.*, **15**: 615-619.
- HOLMQUIST F, ANDERSSON KE & HEDLUND H (1990a) Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand.*, **139**: 113-122.
- HOLMQUIST F, ANDERSSON KE & HEDLUND H (1990b) Effects of pinacidil on isolated human corpus cavernosum penis. *Acta Physiol. Scand.*, **138**: 463-469.
- HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1991) L-N^G-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. *Acta Physiol. Scand.*, **141**: 441-442.
- HOLMQUIST F, ANDERSSON KE & HEDLUND H (1992a) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J. Physiol. Lond.*, **449**: 295-311.

- HOLMQUIST F, PERSSON K, GARCIA-PASCUAL A & ANDERSSON KE (1992b) Phospholipase C activation by endothelin-1 and noradrenaline in isolated penile erectile tissue from rabbit. *J. Urol.*, **147**: 1632-1635.
- HOLMQUIST F, FRIDSTRAND M, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1993) Actions of 3-morpholininosydnonimin (SIN-1) on rabbit isolated penile erectile tissue. *J. Urol.*, **150**: 1310-1315.
- HOLZER P (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, **24**: 739-768.
- HUANG JM, WU CH & BADEN DG (1984) Depolarizing action of a red tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**: 615-621.
- IGNARRO LJ, HARBISON RG, WOOD KS & KADOWITZ PJ (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**: 893-900.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE & CHAUDHURY G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9265-9269.
- IGNARRO LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**: 535-560.
- IGNARRO LJ, BUSH PA, BUGA GM, WOOD KS, FUKOTO JM & RAJFER J (1990a) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**: 843-850.
- IGNARRO LJ, BUSH PA, BUGA GM & RAJFER J (1990b) Neurotransmitter identity doubt. *Nature*, **347**: 131-132.
- ISHII K, CHANG B, KERWIN JF Jr, HUANG ZJ & MURAD F (1990) N^G-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of EDRF formation. *Eur. J. Pharmacol.*, **176**: 219-224.
- IYENGAR R, STUEHR DJ & MARLETTA MA (1987) Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6369-6373.
- IZZO NJ Jr & PEACH MJ (1987) Phorbol esters inhibit production but not action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Fed. Proc.*, **45**: 503 (A1089).
- JANCSÓ G, KIRÁLY E & JANCSÓ-GÁBOR A (1977) Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, **270**: 741-743.

- JAIMOVICH E, BARHANIN J, LAZDUNSKI M, ILDEFONSE M & RAUGIER O (1982) *Centruroides* toxin, a selective blocker of surface Na⁺ channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 3896-3900.
- JONAS P, VOGEL W, ARANTES EC & GIGLIO JR (1986) Toxin γ of the scorpion *Tityus serrulatus* modifies both activation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. *Pflügers Arch.*, **407**: 92-99.
- JOVER E, COURAUD F & ROCHAT H (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**: 1607-1614.
- JÜNEMANN KP, LUE TF, FOURNIER GR & TANAGHO EA (1986) Hemodynamics of papaverine- and phentolamine-induced penile erection. *J. Urol.*, **136**: 158-161.
- JÜNEMANN KP, LUE TF, LUO J, JADALLAH SA, NUNES LL & TANAGHO EA (1987) The role of vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter in penile erection. *J. Urol.*, **138**: 871-877.
- JÜNEMANN KP, PERSSON-JÜNEMANN C, TANAGHO EA & ALKEN P (1989) Neurophysiology of penile erection. *Urol. Res.*, **17**: 213-217.
- KANNO K, HIRATA Y, IMAI T & MARUMO F (1993) Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **22**: 34-39.
- KASAKOV L, CELLEK S & MONCADA S (1995) Characterization of nitrenergic neurotransmission during short- and long-term electrical stimulation of the rabbit anococcygeous muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1149-1154.
- KATSUKI S & MURAD F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.*, **23**: 330-341.
- KATSUKI S, ARNOLD WP & MURAD F (1977) Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **3**, 239-247.
- KEAST JR & DE GROAT WC (1989) Immunohistochemical characterization of pelvic neurons which project to the bladder, colon, or penis in rats. *J. Comp. Neurol.*, **288**: 387-400.
- KEAST JR & DE GROAT V (1992) Segmental distribution and peptide content of primary afferent neurons innervating the urogenital organs and colon of male rats. *J. Comp. Neurol.*, **319**: 615-623.
- KELNER MJ, BAGNELL R, HALE B & ALEXANDER MN (1988) Methylene blue competes with paraquat for reduction by flavo-enzymes resulting in decreased superoxide production in the presence of heme proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**: 422-426.

- KIELY EA, BLOOM V & WILLIAMS V (1989) Penile response to intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide alone and in combination with other vasoactive agents. *Br. J. Urol.*, **64**: 191-194.
- KIM N, AZADZOI V, GOLDSTEIN V & 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.
- KIMOTO Y & ITO Y (1987) Autonomic innervation of the canine penile artery and vein in relation to neural mechanisms involved in erection. *Br. J. Urol.*, **59**: 463-472.
- KIMURA K, KAWANISHI Y, TAMURA M & IMAGAWA A (1989) Assessment of the alpha-adrenergic receptors in isolated human and canine corpus cavernosum tissue. *Int. J. Impotence Res.*, **1**: 185-189.
- KIRKEBY HJ, FAHRENKRUG J, HOLMQUIST F & OTTESEN B (1992) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide histidine methionine (PHM) in human penile corpus cavernosum tissue and circumflex veins: localization and in vitro effects. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**: 24-30.
- KIRKEBY HJ, SVANE D, POULSEN J, TOTTRUP A, FORMAN A & ANDERSSON KE (1993) Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. *Acta Physiol. Scand.*, **149**: 385-392.
- KLATT P, SCHMIDT K & MAYER B (1992) Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem. J.*, **288**: 15-17.
- KLINGE E & SJÖSTRAND NO (1974) Contraction and relaxation of the retractor penis muscle and the penile artery of the bull. *Acta Physiol. Scand.*, **420**: 1-88.
- KLINGE E & SJÖSTRAND NO (1977a) Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission : a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **100**: 368-376.
- KLINGE E & SJÖSTRAND NO (1977b) Comparative study of some isolated mammalian smooth muscle effectors of penile erection. *Acta Physiol. Scand.*, **100**: 354-367.
- KNISPEL HH, GOESSL C & BECKMAN R (1991) Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. *J. Urol.*, **146**: 1429-1433.
- KNISPEL HH, GOESSL C & BECKMAN R (1992a) Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation. *Urology*, **40**: 471-476.
- KNISPEL HH, GOESSL C & BECKMAN R (1992b). Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. *Urol. Res.*, **20**: 253-257.
- KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RMJ & MONCADA S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5159-5162.

- KNOWLES RG & MONCADA S (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.*, **298**: 249-258.
- KÖLLIKER A (1852) Das anatomische und physiologische Verhalten der cavernösen Körper der Sexualorgane. *Verh. Phys. Med. Ges. Würz-burg*, **2**: 118-133.
- KRANE RJ, GOLDSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1989) Impotence. *N. Engl. J. Med.*, **321**: 1648-1659.
- LAMANO CARVALHO TL, HODSON NP, BLNK MA, WATSON PF, MULDERY PK, BISHOP PK, BLOOM SP & POLAK JM (1986) Occurrence, distribution and origin of peptide-containing nerves of guinea-pig and rat male genitalia and the effects of denervation sperm characteristics. *J. Anat.*, **149**: 121-141.
- LANGER SZ, ADLER-GRACHINSKY E, ALMEIDA AP & DINIZ CR (1975) Prejunctional effects of a purified toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. Release of ³H-noradrenaline and enhancement of transmitter overflow elicited by nerve stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **287**: 243-259.
- LARSEN JJ, OTTOSEN B, FAHRENKRUG J & FAHRENKRUG L (1981) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the male genito-urinary tract, concentration and motor effect. *Invest. Urol.*, **19**: 211-213.
- LARSSON LL, FAHRENKRUG J & SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL OB (1977) Occurrence of nerves containing vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the male genital tract. *Life Sci.*, **21**: 503-508.
- LECKSTROM A, AHLNER J, GRUNDSTROM N & AXELSSON KL (1993) Involvement of nitric oxide and peptides in the inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) response in bovine mesentery artery. *Pharmacol. Toxicol.*, **72**: 194-198.
- LEVIN RM & WEIN AJ (1980) Adrenergic alpha-receptors outnumber beta-receptors in human penile corpus cavernosum. *Invest. Urol.*, **18**: 225-226.
- LI CG & RAND MJ (1990) Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediated non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur. J. Pharmacol.*, **191**: 303-309.
- LINCOLN J, CROWE R, BLACKLEY PF, PRYOR JP, LUMLEY JSP & BURNSTOCK G (1987) Changes in the VIPergic, cholinergic and adrenergic innervation of human penile tissue in diabetic and non-diabetic impotent males. *J. Urol.*, **137**: 1053-1059.
- LINCOLN J, CROWE R & BURNSTOCK G (1991) Neuropeptides and impotence. In: *Impotence: Diagnosis and Management of Male Erectile Dysfunction*, edited by R. S. Kirby, C. Carson, and G. D. Webster. Oxford, Butterworth-Heinemann, chapt. 1, p. 27-31.
- LINCOLN TM & CORNWELL TL (1991) Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels*, **28**: 129-137.

- LINCOLN TM & CONRWELL TL (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.*, **7**: 328-338.
- LOMBET A, BIDARD JN & LAZDUNSKI M (1987) Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Lett.*, **219**: 355-359.
- LOPES-MARTINS RAB, ANTUNES A, OLIVA MLV, SAMPAIO CAM, BURTON J & DE NUCCI G (1994) Pharmacological characterization of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 81-86.
- LÜCKHOFF A & CLAPHAM DE (1992) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺-permeable channel. *Nature*, **355**: 356-358.
- LUE TH & TANAGHO EA (1987) Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J. Urol.*, **137**: 829-836.
- LUE TH & TANAGHO EA (1988) Functional anatomy and mechanism of penile erection. In: *Contemporary management of impotence and infertility*, edited by E. A. Tanagho, T. H. Lue and R. D. McClure. Baltimore, Williams & Wilkins, 39-50.
- LUO D, DAS S & VINCENT SR (1995) Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase. *Eur. J. Pharmacol.*, **290**: 247-251.
- LUTZ A & MELLO O (1922) Descrição de 5 espécies brasileiras dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. *Folha méd.*, **4**: 25-26.
- MACARTHUR H, HECKER M, BUSSE R & VANE JR (1993) Selective inhibition of agonist-induced but not shear stress-dependent release of endothelial autacoids by taspigargin. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 100-105.
- MAGALHÃES OC (1939) The scorpionic syndrome. *J. Trop. Med. Hyg.*, **42**: 1-5.
- MAGALHÃES OC (1938) Scorpionism. *J. Trop. Med. Hyg.*, **41**: 393.
- MAGALHÃES OC (1946) Escorpionismo. IV Memória. Monografias Inst. Oswaldo Cruz, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- MAGGI CA & MELI A (1988) The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.*, **19**: 1-43.
- MAGGI CA, SANTICIOLI P, DEL BIANCO E, GEPPEPPI P, BARBANTI G, TURINI D & MELI A (1989) Release of VIP- but not CGRP-like immunoreactivity by capsaicin from the human isolated small intestine. *Neurosci. Lett.*, **98**: 317-320.
- MARANGONI RA, ANTUNES E, BRAIN SD & 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.

- MARANGONI S, GHISO J, SAMPAIO SV, ARANTES EC, GIGLIO JR, OLIVEIRA B & FRANGIONE B (1990) The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Protein Chem.*, **9**: 595-601.
- MARANGONI S, TOYAMA MH, ARANTES EC, GIGLIO JR, SILVA CA, CARNEIRO EM, GONÇALVES AA & OLIVEIRA B (1995) Amino acid sequence of TsTX-V, an α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K^+ permeability of β -cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1243**: 309-314.
- MARLETTA MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, **268**: 12231-12234.
- MAURANO HR (1915) Do escorpionismo. Tese - Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rodrigues & Cia (Jornal do comércio) Rio de Janeiro.
- McCONNELL J & BENSON GS (1982) Innervation of human penile blood vessels. *Neurorol. Urodyn.*, **1**: 199-210.
- McMILLAN K, BREDT DS, HIRSCH DJ, SNYDER SH, CLARK JE & MASTERS BSS (1992) Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 11141-11145.
- MOLDERINGS GJ, GÖTHERT M, VAN AHLEN H & PORST H (1989) Noradrenaline release in human corpus cavernosum and its modulation via presynaptic α_2 -adrenoceptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **102**: 261-267.
- MONCADA S, PALMER RMJ & HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 109-142.
- MONCADA S (1992) The L-arginine: nitric oxide pathway. The 1991 Ulf von Euler Lecture. *Acta Physiol. Scand.* **145**: 201-227.
- MOORE PK, AL-SWAYEH OA, CHONG NWS, EVANS R, MIRZAZADEH S & GIBSON A (1989) L- N^G -nitroarginine (L-NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 905P.
- MORITOKI H, HISAYAMA T, KONDOH W & TAKEUCHI S (1994) Thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor, relaxes rat aorta via nitric oxide formation. *Life Sci.*, **54**: PL153-158.
- MORO MA, RUSSEL RJ, CELLEK S, LIZASOAIN I, SU Y, DARLEY-USMAR VM, RADOMSKI MW & MONCADA S (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 1480-1485.
- MORRISON KJ & POLLOCK D (1990) Impairment of relaxations to acetylcholine and nitric oxide by a phorbol ester in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 432-437.

- MOSS J, COLBURN RW & KOPIN IJ (1974a) Scorpion-toxin induced catecholamine release from synaptosomes. *J. Neurochem.*, **22**: 217.
- MOSS J, THOA NB & KOPIN IK (1974b) On the mechanism of scorpion-toxin induced release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **190**: 39.
- MÜLSCH A & BUSSE R (1990) N^G-nitro-L-arginine (N⁵-[imino(nitro-amino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **341**: 143-147.
- MURPHY TV, CROSS KM, DUNNING PM GARLAND CJ (1994) Phorbol esters impair endothelium-dependent and independent relaxation in rat aortic rings. *Gen. Pharmacol.*, **25**: 581-588.
- NAGY K (1988) Mechanism of inactivation of single sodium channels after modification by chloramine-T, sea anemone toxin and scorpion toxin. *J. Membrane Biol.*, **106**: 29-40.
- NAKAMURA S, NARUSE M, DEMURA H & UEMURA H (1990) Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry*, **94**: 475-477.
- NARAHASHI T (1974) Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.*, **54**: 813-889.
- NEWBY AC & HENDERSON AH (1990) Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu. Rev. Physiol.*, **52**: 661-674.
- NISHIKAWA AK, CARICATI CP, LIMA MLR, DOS SANTOS MC, KIPNIS TL, EICKSTEDT VRD, KNYSAK I, DA SILVA MH, HIGASHI HG & DIAS DA SILVA W (1994) Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, **32**: 989-998.
- NISHIOKA SA, SILVEIRA PVP & PEREIRA CAD (1993) Scorpion sting on the penis. *J. Urol.*, **150**: 1501.
- NISHIZAWA S, YAMAMOTO S & UEMURA K (1996) Interrelation between protein kinase C and nitric oxide in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.*, **18**: 89-95.
- NOBLE D (1984) The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J. Physiol.*, **353**: 156-159.
- NORTH RA (1989) Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 13-28.
- NOVAES G, CATANZARO OL, BERALDO WT & FREIRE-MAIA L (1982) Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon*, **20**: 847-854.
- OBIANIME AW & DALE MM (1989) The effect of relaxants working through different transduction mechanisms on the tonic contraction produced in rat aorta by 4 β -phorbol dibutyrate. *Br. J. Pharmacol.*, **97**: 647-656.

- OGDEN JE & MOORE PK (1995) Clinical potential and molecular biology of nitric oxide synthase and its inhibitors. *Trends Biotechnol.*, **13**: 70-79.
- OLESEN S, CLAPHAM DE & DAVIES PF (1988) Hemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*, **331**: 168-170.
- PALMER RMJ, FERRIGE AG & MONCADA S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.
- PALMER RMJ & MONCADA S (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**: 348-352.
- PETERSON GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**: 346-356.
- PETKOV GV & BOEV KK (1996) The role of sarcoplasmic reticulum and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in smooth muscle tone of the cat gastric fundus. *Pflügers Arch.*, **431**: 928-935.
- PICKARD RS, POWELL PH & ZAR MA (1991) The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **104**: 755-759.
- PICKARD RS, POWELL PH & ZAR MA (1993) Evidence against vasoactive intestinal polypeptide as the relaxant neurotransmitter in human cavernosal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 497-500.
- POLAK JM, GU J, MINA S & BLOOM SR (1981) Vipergeric nerves in the penis. *Lancet* **ii**: 217-219.
- POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MITCHELL JA, WARNER TD, SCHMIDT HHHW, NAKANE M & MURAD F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 10480-10484.
- POSSANI LD, ALAGON AC, FLETCHER PL Jr. & ERICKSON B (1977) Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**: 394-403.
- PRICE DT, SCHWINN DA, KIM JH, CARSON III CC, CARON MG & LEFKOWITZ RJ (1993) Alpha₁ adrenergic receptor subtype mRNA expression in human corpus cavernosum (Abstract). *J. Urol.*, **149**: 285A.
- PUECH-LEAO P, REIS JM, GLINA S & REICHELTA AC (1987) Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum: diagnosis and treatment. *Eur. Urol.*, **13**: 163-165.
- PUROHIT RC & BECKETT SD (1979) Penile pressures and muscle activity associated with erection and ejaculation in the dog. *Am. J. Physiol.*, **231**: 187-195.

- QUAST U & COOK NS (1989) Moving together K^+ channel openers and ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 431-435.
- RAJFER J, ARANSON WJ, BUSH PA, DOREY FJ & IGNARRO LJ (1992) Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum on response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 90-94.
- RAMOS AO & CORRADO AP (1954) Efeito hiperpiético do veneno de escorpião (*Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*). *An. Fac. Med. Univ. São Paulo*, **28**: 81.
- RAND MJ & LI CG (1990) Nitric oxide mediates non-adrenergic, non-cholinergic relaxation in some neuro-effector systems: examples of nitrenergic transmission. XIth International Congress of Pharmacology, Amsterdam. *Eur. J. Pharmacol.*, **183**: 1144.
- RAND MJ (1992) Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **19**: 147-169.
- RAND MJ & LI CG (1995) Discrimination by the NO-trapping agent, carboxy-PTIO, between NO and the nitrenergic transmitter but not between NO and EDRF. *Br. J. Pharmacol.*, **116**: 1906-1910.
- RAPOPORT RM & MURAD F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, **52**: 352-357.
- REES DD, PALMER RMJ, SCHULZ R, HODSON HF & MONCADA S (1990a) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 746-752.
- REES DD, SCHULZ R, HODSON HF, PALMER RMJ & MONCADA S (1990b) Identification of some novel inhibitors of the vascular nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. In: *Nitric oxide from L-arginine: a bio-regulatory system*, edited by S. Moncada and E. A. Higgs. Elsevier, Amsterdam, pp 485-487.
- RITCHIE JM & ROGART RB (1977) The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1-49.
- ROBERTSON BE, SCHUBERT R, HESCHELER J & NELSON MT (1993) cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K^+ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **265**: C299-C303.
- ROBERTSON DW & STEINBERG MI (1990) Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise. *J. Med. Chem.*, **33**: 1529-1541.
- ROCHAT H, BERNARD P & COURAUD F (1979) Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: *Advances in Cytoparmacology*, edited by B. Ceccarelli and F. Clementi. Raven, New York, vol. **3**, p. 325-334.

- ROGOWSKI RS, KRUEGER BK, COLLINS JH & BLAUSTEIN MP (1994). Tityustoxin K α blocks voltage-gated noninactivating K $^{+}$ channels and unblocks inactivating K $^{+}$ channels blocked by α -dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 1475-1479.
- ROSSI MA, FERREIRA AL & PAIVA SM (1974) Fine structures of pulmonary changes induced by Brazilian scorpion venom. *Arch. Pathol.*, **97**: 284.
- ROY JB, PETRONE RL & SAID S (1990) A clinical trial of intracavernous vasoactive intestinal peptide to induce penile erection. *J. Urol.*, **143**: 302-304.
- RUBANYI GM, DESIDERIO D, LUISI A, JOHNS A & SYBERTZ EJ (1989) Phorbol dibutyrate inhibits release and action of endothelium-derived relaxing factor(s) in canine blood vessels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**: 858-863.
- SAENZ DE TEJADA I, GOLSTEIN I, BLANCO R, COHEN RA & KRANE RJ (1985) Smooth muscle of the corpora cavernosae: role in penile erection. *Surg. Forum*, **36**: 623-624.
- SAENZ DE TEJADA I, BLANCO R, GOLDSTEIN I, AZADZOI K, DE LAS MORENAS A, KRANE RJ & COHEN RA (1988a) Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am. J. Physiol.*, **254**: H468-H472.
- SAENZ DE TEJADA I, BLANCO R, GOLDSTEIN I, KRANE RJ, WOTIZ HH & COHEN RA (1988b) Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum II. Acetylcholine synthesis. *Am. J. Physiol.*, **254**: H468-H472.
- SAENZ DE TEJADA I, MOROUKIAN P, TESSIER J, KIM JJ, GOLDSTEIN I & FROHRIB D (1991a) Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am. J. Physiol.*, **260**: H1590-H1595.
- SAENZ DE TEJADA I, CARSON MP, DE LAS MORENAS A, GOLDSTEIN I & TRAISH AM (1991b) Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am. J. Physiol.*, **261**: H1078-H1085.
- SAMPAIO SV, LAURE CJ & GIGLIO JR (1983) Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, **21**: 265-278.
- SAMPAIO SV, ARANTES EC, PRADO WA, RICCIOPPO NETO F & GIGLIO JR (1991) Further characterization of toxins T₁IV (TsTX-III) and T₂IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, **29**: 663-672.
- SANDERS KM & WARD SM (1992) Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.*, **262**: G379-G392.
- SARIA A, MARTLING CR, YAN Z, THEODORSON-NORHEIM E, GAMSE R & LUNDBERG JM (1988) Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenylpiperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**: 1330-1335.

- SCHMALBRUCH H & WAGNER G (1989) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibres in the penile cavernous tissue of green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Cell Tissue Res.*, **256**: 529-541.
- SCHMIDT HHHW, NAU H, WITTFOHT W, GERLACH J, PRESCHER K-E, KLEIN MM, NIROOMAND F & BÖHME E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, **154**: 213-216.
- SCHMIDT HHHW, WILKE P, EVERS B & BÖHME E (1989) Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 284-291.
- SEO HG, TATSUMI H, FUJII J, NISHIKAWA A, SUZUKI K, KANGAWA K & TANIGUCHI N (1994) Nitric oxide synthase from rat colorectum: Purification, peptide sequencing, partial PCR cloning and immunohistochemistry. *J. Biochem.*, **115**: 602-607.
- SHENG H, SCHMIDT HHHW, NAKANE M, MITCHELL JA, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U & MURAD F (1992) Characterization and location of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br. J. Pharmacol.*, **106**: 768-773.
- SHERIDAN FM, HORWITZ LD & McMURTRY IF (1991) Effects of phorbol esters on canine coronary artery constriction and dilation *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, **261**: H236-H242.
- SHIN WS, SASAKI T, KATO M, HARA K, SEKO A, YANG WD, SHIMAMOTO M, SUGIMOTO T & TOYO-OKA T (1992) Autocrine and paracrine effects of endothelium-derived relaxing factor on intracellular Ca^{2+} of endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**: 20377-20382.
- SHIRAI M, SASAKI K & RIKIMARU K (1972) Histochemical investigation on the distribution of adrenergic and cholinergic nerves in human penis. *Tohoku J. Exp. Med.*, **107**: 403-404.
- SHIRAI M, SASAKI K & RIKIMARU A (1973) A histochemical investigation of the distribution of adrenergic and cholinergic nerves in the male genital organs. *Tohoku J. Exp. Med.*, **111**: 281-291.
- SHIRAI M, NAKAMURA M, ISHII N, MITSUKAWA N & SAWAI Y (1976) Determination of intrapenial volume using ^{99m}Tc -labeled autogenous red blood cells. *Tohoku J. Exp. Med.*, **120**: 377-383.
- SHIRAI M, ISHII N, MITSUKAWA S, MATSUDA S & NAKAMURA M (1978) Hemodynamic mechanism of erection in the human penis. *Arch. Androl.*, **1**: 345-349.
- SHIRAI M & ISHII N (1981) Hemodynamics of erection in men. *Arch. Androl.*, **6**: 27-32.
- SILVEIRA NP, MORAES-SANTOS T, AZEVEDO AD & FREIRE-MAIA L (1991) Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin γ) on the isolated guinea-pig heart. *Comp. Biochem. Physiol.*, **98C**: 329-336.

- SJÖSTRAND NO, ELDH J, SAMUELSON UE, ALARANTA S & KLINGE E (1990) The effects of L-arginine and N^G-monomethyl L-arginine on the inhibitory neurotransmission of the human corpus cavernosum penis. *Acta Physiol. Scand.*, **140**: 297-298.
- SMYTHIES JR, BENINGTON F & MORIN RD (1971) Model for the action of tetrodotoxin and batrachotoxin. *Nature*, **231**: 188-190.
- SNYDER SH (1990) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science*, **257**: 494-496.
- STEERS WD, McCONNELL J & BENSON GS (1984) Anatomical localization and some pharmacological effects of vasoactive intestinal polypeptide in human and monkey corpus cavernosum. *J. Urol.*, **132**: 1048-1093.
- STIEF CG, BENARD F, BOSCH R, ABOSEIF S, WETTERAUER U, LUE TF & TANAGHO E (1990) A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis. *J. Urol.*, **143**: 392-397.
- STIEF CG, WETTERAUER U, SCHAEBSDAU FH & JONAS U (1991) Calcitonin-gene-related peptide: a possible role in human penile erection and its therapeutic application in impotent patients. *J. Urol.*, **146**: 1010-1014.
- STIEF CG, BENARD F, BOSCH R, ABOSEIF S, WETTERAUER U, LUE TF & TANAGHO E (1993) Calcitonin gene-related peptide: possibly neurotransmitter contributes to penile erection in monkeys. *Urology*, **41**: 397-401.
- STJÄRNE P, LUNDBLAD L, LUNDBERG JM & ÄNGGARD A (1989) Capsaicin and nicotine-sensitive afferent neurones and nasal secretion in healthy human volunteers and in patients with vasomotor rhinitis. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 693-701.
- STRICHARTZ G, RANDO T & WANG GK (1987) An integrated view of the molecular toxicology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.*, **10**: 237-267.
- STUEHR DJ & GRIFFITH OW (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **65**: 287-346.
- TANIGUCHI J, FURUKAWA KI & SHIGEKAWA M (1993) Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.*, **423**: 167-172.
- TOLEDO D & NEVES AGA (1976) Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrualtus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**: 249-254, 1976.
- TRAISH AM, CARSON MP, KIM N, GOLDSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1990) Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. *J. Urol.*, **144**: 1036-1040.

- TUCKER JF, BRAVE SR, CHARALAMBOUS L, HOBBS AJ & GIBSON A (1990) L-N^G-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **100**: 663-664.
- ULBRICHT W (1969) The effects of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.*, **61**: 18-71.
- URQUHART RA & BROADLEY KJ (1991) Comparison of adenosine receptor agonists with other vasodilators on noradrenaline-, potassium- and phorbol ester-contracted rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **130**: 319-322.
- VALJI K & BOOKSTEIN JJ (1987) The veno-occlusive mechanism of the canine corpus cavernosum: angiographic and pharmacologic studies. *J. Urol.*, **138**: 1467-1470.
- VANE JR (1964) The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol. Chemoter.*, **23**: 360-373.
- VANHOUTTE PM (1987) The end of the quest? *Nature*, **327**: 459-460.
- VARDI Y & SIROKY MB (1990) Hemodynamics of pelvic nerve induced erection in a canine model. I. Pressure and flow. *J. Urol.*, **144**: 794-797.
- VARDI Y & SIROKY MB (1993) Hemodynamics of pelvic nerve induced erection in a canine model. II. Cavernosal inflow and occlusion. *J. Urol.*, **149**: 910-914.
- VASSILEVET PM, SCHEUER T & CATTERALL WA (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in the sodium channel inactivation. *Science*, **241**: 1658-1661.
- VATANPOUR H & HARVEY AL (1995) Modulation of acetylcholine release at mouse neuromuscular junctions by interaction of three homologous scorpion toxins with K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1502-1506.
- VITAL BRAZIL O, NEDER AC & CORRADO AP (1973) Effects and mechanism of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. *Pharmacol. Res. Comm.*, **5**: 137-150.
- WAGNER G (1981) Erection. Physiology and Endocrinology. In: *Impotence, Physiological, Psychological, Surgical Diagnosis and Treatment*, edited by G. Wagner and R. Green. New York, Plenum, chapt. 3, 24-36.
- WAGNER G & GERSTENBERG T (1987) Intracavernous injection of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) does not induce erection in man per se. *World J. Urol.*, **5**: 171-177.
- WAGNER G (1988) Electrical activity of the corpus cavernosum: functional and pharmacological perspectives. In: *Proceedings of the Third Biennial World Meeting on Impotence*. Boston, MA: Int. Soc. Impotence Res., p. 7.
- WAGNER G & GERSTENBERG T (1988) Human in vivo studies of electrical activity of corpus cavernosum (EACC) (Abstract). *J. Urol.*, **139**: 327A.

- WAGNER G, GERSTENBERG T & LEVIN RJ (1989) Electrical activity of corpus cavernosum during flaccidity and erection of the human penis: a new diagnostic method? *J. Urol.*, **142**: 723-725.
- WAHLESTEDT C and REIS DJ (1993) Neuropeptide Y-related peptides and their receptors - are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**: 309-352.
- WANG Y, SHIN WS, KAWAGUCHI H, INUKAI M, KATO M, SAKAMOTO A, UEHARA Y, MIYAMOTO M, SHIMAMOTO N, KORENAGA R, ANDO J & TOYO-OKA T (1996) Contribution of sustained Ca^{2+} elevation for nitric oxide production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca^{2+} transient in vascular smooth muscle cells in coculture. *J. Biol. Chem.*, **271**: 5647-5655.
- WARD SM, MCKEEN ES & SANDERS KM (1992) Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory junction potentials in canine ileocolonic sphincter. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 776-782.
- WARNICK JE, ALBUQUERQUE EX & DINIZ CR (1976) Electrophysiological observations on the action of purified scorpion venom, tityustoxin, on nerve and skeletal muscle of the rat. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **198**: 155-167.
- WATANABE H, ISHIGOOKA M, KUBOTA Y, IJIMA Y, SASAGAWA I & NAKADA T (1992) Human penile hemodynamics by xenon-133 clearance method in physiological erection. *Eur. Urol.*, **22**: 247-249.
- WATT DD & SIMARD JM (1984) Neurotoxic proteins in scorpion venom. *Toxicol. Toxin Rev.*, **3**: 181-221.
- WEI MQ & WAGNER G (1992) Extracellular calcium and contractility of porcine smooth muscle of corpus cavernosum. *Int. J. Impotence Res.*, **4**: 211-218.
- WESTON AH & ABBOTT A (1987) New class of antihypertensive acts by opening K^+ channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, **8**: 283-284.
- WHEELER P, WATT DD & LAZDUNSKY M (1983) Classification of Na^+ channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch.*, **397**: 164-165.
- WHITE DA & MARLETTA MA (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochem.*, **31**: 6627-6631.
- WIKLUND NP, LEONE AM, GUSTAFSSON LE & MONCADA S (1993) Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. *Neuroscience*, **53**: 607-611.
- WILLIS E, OTTESEN B, WAGNER G, SUNDLER F & FAHRENKRUG J (1981) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a possible neurotransmitter involved in penile erection. *Acta Physiol. Scand.*, **113**: 545-547.

- WILLIS EA, OTTESEN B, WAGNER G, SUNDLER F & FAHRENKRUG J (1983) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a putative neurotransmitter in penile erection. *Life Sci.*, **33**: 383-391.
- YAJIMA M, KOHNO S, BABA K, KOMURA H, HARAGUCHI C, IWAMOTO T & OSADA T (1992) The coexistence of neuropeptide Y and norepinephrine in rabbit corpus cavernosum penis: an in vitro study. *Int. J. Impotence Res.* 4, Suppl. 1: 9-12.
- YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K & MASAKI T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415.
- ZYGMUNT PM, ZYGMUNT PKE, HÖGESTÄTT ED & ANDERSSON KE (1993) Effects of ω -conotoxin on adrenergic, cholinergic and NANC neurotransmission in the rabbit urethra and detrusor. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1285-1290.
- ZYGMUNT PKE, ZYGMUNT PM, HÖGESTÄTT ED & ANDERSSON KE (1995) NANC neurotransmission in lamina propria of the rabbit urethra: regulation by different subsets of calcium channels. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1020-1026.

SUMMARY



SUMMARY

Tityus serrulatus is the most dangerous scorpion of the subfamily Tityinae in Brazil because of the high toxicity of its venom and its widespread distribution in populous urban centers of southeastern region of the country. The most important clinical manifestations of the human envenomation by *Tityus serrulatus* are intense local pain and an immediate local burning sensation which may last from few minutes to several hours. These manifestations may be accompanied by autonomic dysfunctions such as vomiting, diaphoresis, tachycardia, mydriasis, tachypnea, excessive salivation, arterial pressure disturbances, tremors, etc. *Tityus serrulatus* venom is known to act on nerve endings of the autonomic nervous system to stimulate the release of either acetylcholine or catecholamines from different organs and tissues.

The erectile tissues from different animal species are innervated by adrenergic excitatory, cholinergic inhibitory and non-adrenergic non-cholinergic (NANC) inhibitory nerve fibers which in turn is believed to play a pivotal role in the neural mechanisms involved in penile erection through the release of NO. Thus, the potential sources of NO production in the rabbit corpus cavernosum preparation employed in this study are both NANC nerves and the endothelium covering the network of sinusoidal capillaries supplying the cavernosal tissue. Since NANC nerve stimulation causes corpus cavernosum relaxation, we have investigated the effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum.

The effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its fractions on the rabbit isolated corpus cavernosum (RbCC) was investigated using a bioassay cascade. The tissues were continuously infused with indomethacin (5.6 μM) to inhibit the generation of cyclooxygenase products. Dried *Tityus serrulatus* venom (400 mg) was purified using a CM-cellulose-52 column.

Tityus serrulatus venom (3-100 μg), acetylcholine (ACh; 0.3-30 nmol) and glyceryl trinitrate (GTN; 0.5-10 nmol) dose-dependently relaxed RbCC preparations precontracted with noradrenaline (3 μM).

The non-specific NO synthase (NOS) inhibitors N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 μM), N^o-nitro-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 10 μM) and N^o-iminoethyl-L-ornithine (L-NIO; 30 μM) increased the tone of the RbCC tissues and markedly reduced both ACh- and *Tityus serrulatus* venom-induced RbCC relaxations without affecting those evoked by GTN. The inhibitory effect was reversed by infusion of L-arginine (300 μM), but not D-arginine (300 μM). The neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM, 100 μM) affected neither the

tone of the RbCC nor the relaxations induced by ACh, bradykinin (Bk), *Tityus serrulatus* venom and GTN. TRIM was approximately 1,000 times less potent than L-NAME in inhibiting rabbit cerebellar NOS *in vitro*, as measured by the conversion of [³H]-L-arginine to [³H]-L-citrulline.

The selective soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-alquinoxalin-1-one] (ODQ; 30 μ M) also increased the basal tone of the RbCC and abolished the relaxations induced by the agonists mentioned above. Methylene blue (30 μ M) also inhibited the relaxations induced by *Tityus serrulatus* venom but, in contrast to ODQ, the inhibition was irreversible.

The protease inhibitor aprotinin (Trasylo[®]; 10 μ g.ml⁻¹), the muscarinic receptor antagonist atropine (1 μ M) and the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK; 50 nM) did not affect the RbCC relaxations induced by *Tityus serrulatus* venom. Potassium channel antagonists such as glybenclamide (10 μ M), apamin (0.1 μ M), charybdotoxin (0.1 μ M) and tetraethylammonium (10 μ M) also failed to affect the venom-induced relaxations.

Capsaicin (3 and 10 nmol) relaxed the RbCC tissues in a dose-dependent and non-tachyphylactic manner. Ruthenium red (30 μ M), an inhibitor of capsaicin-induced responses, markedly reduced the RbCC relaxations caused by capsaicin, but failed to affect the RbCC relaxations induced by *Tityus serrulatus* venom. L-NAME (10 μ M) had no effect on the capsaicin-induced RbCC relaxations. On the other hand, the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX; 1 μ M) abolished the RbCC relaxations induced by *Tityus serrulatus* venom without affecting those evoked by capsaicin, ACh and GTN. Tetrodotoxin (1 μ M) also promptly reversed the response to the venom when infused during the relaxation phase.

The bioassay cascade of thirteen different toxin components purified from the whole venom revealed that only fractions X, XI and XII caused dose-dependent RbCC relaxations and this was markedly reduced by either TTX (1 μ M) or L-NAME (10 μ M).

We propose therefore that *Tityus serrulatus* venom acts selectively on NANC fibers, possibly nitrenergic nerves, and that the NO generated in the nerve diffuses through the nerve endings to relax the adjacent vascular smooth muscle. Indeed, neuronal NOS (bNOS) has been detected in both the rat and human penis using a specific NOS antibody and immunohistochemistry. The findings that TRIM, a specific neuronal NOS inhibitor in the mouse, did not affect the NO release induced by *Tityus serrulatus* venom, may reflect its reduced potency on the rabbit enzyme.