



RENATA LOPES RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO EM CORPO
CAVERNOSO ISOLADO DE *CROTALUS DURISSUS*
*TERRIFICUS***

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

RENATA LOPES RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO EM CORPO CAVERNOSO ISOLADO
DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS***

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI

CO- ORIENTAÇÃO : Prof. Dra. FABÍOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
RENATA LOPES RODRIGUES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.**

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

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

R618a Rodrigues, Renata Lopes, 1987-
Avaliação da contração em corpo cavernoso isolado de *Crotalus durissus terrificus* / Renata Lopes Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gilberto de Nucci.
Coorientador: Fabíola Taufic Monica Iglesias.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Crotalus*. 2. Corpo cavernoso. 3. Disfunção erétil. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Iglesias, Fabíola Taufic Monica. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of contraction in isolated corpus cavernosum from *Crotalus durissus terrificus*

Palavras-chave em inglês:

Crotalus

Corpus cavernosum

Erectile dysfunction

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Stephen Hyslop

Ana Paula Couto Davel

Data de defesa: 26-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RENATA LOPES RODRIGUES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI



2. PROF(A). DR(A). STEPHEN HYSLOP



3. PROF(A). DR(A). ANA PAULA COUTO DAVEL



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

Data: 26 de setembro de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, eles que sempre foram meus exemplos, meus formadores, meus orientadores da vida.

Dedico também ao meu irmão gêmeo, Daniel. Ele que é meu companheiro desde quando éramos duas “sementinhas”. Ele que considero como parte de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade, confiança e conhecimento repassado.

Agradeço, em especial, a minha co-orientadora Prof. Dra. Fabíola Taufic Monica, por toda dedicação, disponibilidade, paciência, ensinamentos e amizade.

Agradeço aos meus pais, Nenzinha e Helcio, grandes incentivadores e apoiadores em todas as etapas da minha vida.

Agradeço a todos os companheiros de laboratório por terem proporcionado momentos de descontração, amizade e aprendizado ao longo destes dois anos.

Em especial, agradeço à solicitude do meu amigo Julio, aos ensinamentos de Bau, e à amizade de Camila, Tuany, Fernanda Del e Lorenzo.

Agradeço aos docentes do Programa de pós-graduação em Farmacologia pelas aulas ministradas e pelo conhecimento repassado.

Agradeço o secretário do Programa de pós-graduação em Farmacologia Bruno Alves Pereira, pela disponibilidade e orientação em relação aos procedimentos do programa.

Agradeço a agência de fomento Capes pela bolsa concedida no período de mestrado.

Agradeço, ainda, a minha amiga, confidente e “housemate” Vanessa, pelas risadas e companheirismo na minha vida campineira.

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	xiii
LISTA DE ABREVIACOES	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xix
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT	xxvi
1. INTRODUÇÃO	28
1.1 Hemipenis de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	29
1.1.1 Aspectos morfológicos.....	29
1.1.2 Aspectos funcionais.....	32
1.2 Canais iônicos dependentes de voltagem e papel na liberação dos neurotransmissores	33
1.2.1 Canal de sódio dependente de voltagem (NaV).....	33
1.2.2 Canal de cálcio dependente de voltagem (CaV)	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Animais de experimentação	46
4.2. Ensaio funcional	46
4.2.1. Isolamento e montagem dos tecidos	46
4.2.2. Protocolos experimentais	47
4.2.2.1. Avaliação do efeito das catecolaminas em corpo cavernoso de coelho e <i>Crotalus</i>	47

4.2.2.2.	Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho e <i>Crotalus</i>	47
4.2.2.3.	Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica.	48
4.2.2.4.	Avaliação do efeito da veratridina, um ativador do canal de sódio 48	
4.3.	Dosagem de [³ H]-noradrenalina	49
4.4.	Análise dos resultados	50
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Ensaio funcionais	52
5.1.1.	Avaliação do efeito das catecolaminas em corpo cavernoso de coelho e <i>Crotalus</i>	52
5.1.2.	Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho e <i>Crotalus</i>	54
5.1.3.	Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica	57
5.1.4.	Avaliação do efeito dos anestésicos locais na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista alfa-adrenérgico	60
5.1.5.	Caracterização do efeito da veratridina, um ativador do canal de sódio 62	
5.1.6.	Avaliação do efeito dos bloqueadores do canal de cálcio dependentes de voltagem na contração induzida por estimulação elétrica e na contração induzida pelo ativador do canal de sódio	67
5.2.	Dosagem de [³ H]-noradrenalina	71
6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÃO	82
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
[³ H]-noradrenalina	PerkinElmer, Boston MA, EUA
Adrenalina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Bupivacaína	Cristália, Brasil
Desipramina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Dopamina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Fentolamina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Guanetidina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
KCl (Cloreto de potássio)	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Mibefradil	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Noradrenalina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Ropivacaína	Cristália, Brasil
Seleginina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Veratridina	Alomone Labs, Israel
ω -conotoxina GVIA	Alomone Labs, Israel
ω -conotoxina MVIIA	Alomone Labs, Israel
ω -conotoxina MVIIIC	Alomone Labs, Israel

LISTA DE ABREVIACES

LISTA DE ABREVIações

CaV: Canal de cálcio dependente de voltagem

CCC: corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus*

CCE: Corpo cavernoso externo

CCI: corpo cavernoso interno

CTL: controle

EFS: estimulação elétrica

MRM: músculo retrator magnus

NaV: canal de sódio dependente de voltagem

NMDG : N-metil-D-glucamina

NO: óxido nítrico

PE: fenilefrina

RbCC: corpo cavernoso de coelho

TTX: tetrodotoxina

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Subtipos de canais de cálcio voltagem dependentes (Catterall, 2011 – adaptado)	38
Tabela 2. Valores de pEC50 e de resposta máxima contrátil (%) frente as catecolaminas obtidos em corpo cavernoso isolado de coelho (n=4)	52
Tabela 3 Valores de pEC50 e de resposta máxima contrátil (%) às catecolaminas obtidos em corpo cavernoso isolado de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (n=4).....	53

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Avaliação macroscópica do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus*. A: Hemipênis invertido, B: Hemipênis evertido: 1) base 2) tronco 3) ápice 4) músculo retrator magnus (Capel et al., 2011)..... 29
- Figura 2:** Comparação entre a estrutura morfológica entre o corpo cavernoso de crotalus (painel a esquerda) e de humano (painel a direita). Corte transversal. EC: corpo cavernoso externo, IC: Corpo cavernoso interno, RM: Músculo retrator, CS: Corpo esponjoso, CC: Corpo cavernoso..... 30
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de varredura da região basal do hemipenis de *Crotalus durissus terrificus* mostrando o corpo cavernoso externo (CCE) e o corpo cavernoso interno (CCI), na parte central aparece o músculo retrator magnus (MRM) (Porto et al., 2013)..... 31
- Figura 4.** A) Relaxamento frequência-dependência induzido por estimulação elétrica (EFS) em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* na ausência (controle-CTL) e na presença de inibidor da NOS (L-NAME, 100 μ M) e do bloqueador de canal de sódio (TTX, 1 μ M). B) Traçado representativo do relaxamento induzido por estimulação elétrica (EFS) em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* (painel acima) e em corpo cavernoso de marmoset (mamífero) (Capel et al., 2011). 32
- Figura 5:** Estrutura primária das subunidades do canal de sódio dependente de voltagem (NaV) (Catterall, 2012)..... 33
- Figura 6.** Representação esquemática da subunidade alfa funcional do canal de sódio dependente de voltagem e a identificação dos sítios de ligação das neurotoxinas (Tytgat et al., 2011)..... 37
- Figura 7.** Estrutura das subunidades do canal de cálcio (Catterall et al., 2013) ... 39
- Figura 8.** Curvas concentração-resposta à noradrenalina (0.01-100 μ M), adrenalina (0.01-100 μ M, B) e dopamina (0.01-100 μ M, C) na ausência (CTL) e presença de fentolamina (10 μ M) em RbCC; n=4. 52
- Figura 9.** Curvas concentração resposta à noradrenalina (0.01-100 μ M), adrenalina (0.01-100 μ M, B) e dopamina (0.01-100 μ M, C) na ausência (CTL) e presença de fentolamina (10 μ M) em CCC; n=4. 53
- Figura 10.** Traçado representativo mostrando a contração induzida por estimulação elétrica na ausência e na presença de fentolamina 10 μ M em CCC. 54

Figura 11. Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica (8 e 16 Hz) em (A) RbCC e em (B) CCC. Neste experimento foram aplicados estímulos elétricos pareados, e os resultados são apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo. n=4, *p<0,05 em relação ao controle.	55
Figura 12. Traçados representativos da contração induzida por estimulação elétrica (EFS, 16Hz – círculo) em (A) corpo cavernoso de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (CCC) e em (B) corpo cavernoso de coelho (RbCC). Em (I) é mostrado o aumento de tônus imediatamente após o EFS; em (II) apresenta-se o mesmo traçado mostrando o retorno para o tônus basal.....	56
Figura 13. Efeito da substituição equimolar de sódio por N-metil D-glucamina (NMDG) na contração induzida por estimulação elétrica (EFS; •8 e ♦16 Hz) em (A) RbCC e em (B) CCC. Os resultados são apresentados em porcentagem em relação ao primeiro estímulo. *p<0,05, n=4.....	58
Figura 14. Traçados representativos do efeito da substituição equimolar de NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica (EFS; •8 e ♦16 Hz) na ausência e presença de guanetidina 30 µM e fentolamina 10 µM em CCC. Os registros são representativos de 3 experimentos.....	59
Figura 15. Efeito dos anestésicos locais na contração induzida por estimulação elétrica (8 e 16 Hz) e pela fenilefrina (PE, 10 uM) em A) RbCC e B) CCC. Os resultados foram apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo ou concentração de fenilefrina. n=4, * p<0,05 em comparação ao controle.	61
Figura 16. Traçados representativos mostrando o efeito da veratridina no (A) RbCC (n=4) e em (B) CCC na ausência (CTL) e na presença de fentolamina(10 uM). Os pontos no gráfico representam a média ± EPM (n=4).	62
Figura 17. Traçados representativos mostrando o efeito da tetrodotoxina (TTX) na contração induzida por veratridina (1-100 µM) em (A) corpo cavernoso de coelho (n=3) e em (B) corpo cavernoso de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (n=3).	63
Figura 18. Traçados representativos Efeito da substituição equimolar de cloreto de sódio (NaCl) por N-metil-D-glucamina (NMDG) na contração induzida por veratridina (1-100 µM) em (A) RbCC e em (B) CCC (n=3).....	64
Figura 19. Traçados representativos mostrando o efeito do anestésico bupivacaína na contração induzida por veratridina (1-100 µM) em (A) RbCC e em (B) CCC. (n=3)	65
Figura 20. Traçados representativos mostrando o efeito do anestésico ropivacaína na contração induzida por veratridina (1-100 µM) em (A) RbCC (n=3) e em (B) CCC (n=3)	66

Figura 21. Efeito dos bloqueadores dos canais de cálcio dependentes de voltagem neuronais na contração induzida por estimulação elétrica em (A) RbCC e (B) CCC. Os resultados foram apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo. N=4, * p<0,05 em comparação ao controle.	68
Figura 22. Efeito da ω -conotoxina GVIA na contração induzida por veratridina (1-100 μ M) em (A) RbCC (n=3) e de (B) CCC(n=3). Os registros são representativos de 3 experimentos para cada tecido.	69
Figura 23. Efeito da ω -conotoxina GVIA na contração induzida por veratridina (1-100 μ M) em (A) RbCC (n=3) e de (B) CCC (n=3). Os registros são representativos de 3 experimentos para cada tecido.	70
Figura 24. Liberação de [3 H]-noradrenalina em CCC. Traçado representativo (n=4) da liberação de [3 H]-noradrenalina (cpm/min) induzida por EFS. Este foi um experimento controle para mostrar que a estimulação elétrica induz um aumento no aumento do efluxo de [3 H]-noradrenalina.	72
Figura 25. Liberação de [3 H]-noradrenalina em RbCC. Traçados representativos da liberação de [3 H]-noradrenalina (cpm/min) induzida por EFS antes e após (A, EFS2) substituição equimolar do cloreto de sódio por N-metil D-glucamina (NMDG), (B, EFS2) ausência do CaCl ₂ extracelular, e (C, EFS2) na presença de TTX 1 μ M. (D) Efeitos da substituição iônica (n=3) e da TTX (1 μ M, n=3) na razão da fração de noradrenalina liberada (FR2/FR1) no RbCC. A Fração liberada foi calculada como a porcentagem liberada em relação a quantidade de radiatividade presente no tecido no tempo de coleta. *p<0.05 comparado com o controle.	72
Figura 26. Liberação basal de [3 H]-noradrenalina e da induzida pelo primeiro (EFS1) e segundo (EFS2) estímulo elétrico (16 Hz; 4 min) em (A) RbCCe em (B) CCC. O EFS não aumentou a liberação de [3 H]-noradrenalina no CCC. Este é um traçado representativo de 5 experimentos.	73
Figura 27. (A) Traçado representativo mostrando o aumento do tônus obtido após os dois períodos de EFS(16 Hz; 4 min) em (CCC). (B) Liberação basal de [3 H]-noradrenalina e a liberação induzida pelo primeiro (EFS1) e segundo (EFS2) estímulo elétrico (16 Hz; 4 min) em <i>Crotalus</i> (CCC). O EFS não aumentou a liberação de [3 H]-noradrenalina no CCC. Estes são traçados representativos de 5 experimentos.	74
Figura 28. Esquema ilustrativo mostrando os mecanimos pré-sinápticos presente em corpo cavernoso de <i>Crotalus</i> . AL: anestésicos locais; CAT: catecolaminas; EFS: estímulo elétrico; TTX: tetrodotoxina.	84

RESUMO

O fato da cópula em serpentes ser muito prolongada, chegando a mais de 20 horas, sem que os mecanismos farmacológicos estejam conhecidos, motivou o nosso grupo a estudar o hemipênis de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel). Diferentemente do observado em corpo cavernoso de outros mamíferos, o relaxamento induzido pela estimulação elétrica foi mais duradouro, além de resistente a ação da neurotoxina tetrodotoxina (TTX) em hemipênis de *Crotalus*. Uma hipótese inicial aventada foi que este canal, cuja cinética de abertura e fechamento é mais lenta, seria o responsável pelo relaxamento duradouro e, portanto, pelo coito mais prolongado. Baseado nestes resultados, e considerando que a resistência à TTX e duração prolongada também foram observadas na contração induzida pela estimulação elétrica, o objetivo do presente projeto foi caracterizar através de experimentos funcionais *in vitro* a contração mediada por agonistas ou pela estimulação elétrica. Os experimentos funcionais foram divididos em cinco etapas: 1) contração frente a noradrenalina, adrenalina e dopamina; contração frente a estimulação elétrica ou fenilefrina na presença de 2) tetrodotoxina (TTX), fentolamina e guanetidina; 3) neurotoxinas seletivas para os canais de sódio ou cálcio dependentes de voltagem; 4) após a troca de cloreto de sódio pela N-metil-D-glucamina (NMDG) e 5) determinação na noradrenalina triciada após estimulação elétrica em corpo cavernoso de *Crotalus* (CCC) e de coelho (RbCC). Em CCC todas as catecolaminas produziram contração dependente da concentração, sendo este efeito reduzido na presença de fentolamina. A estimulação elétrica induziu contração que foi dependente da frequência tanto em RbCC como em CCC, sendo esta contração devido, principalmente, à liberação de catecolaminas, uma vez que tanto a fentolamina como guanetidina praticamente aboliram esta resposta. Surpreendentemente, diferente de RbCC, em CCC a substituição equimolar de NaCl por N-metil-D-glucamina (NMDG) não causou nenhuma alteração na amplitude de contração frente a estimulação elétrica. Os anestésicos locais bupivacaína e ropivacaína reduziram significativamente a contração induzida pela estimulação elétrica em CCC e RbCC, enquanto a veratridina, um ativador deste canal, causou contração que foi dependente da liberação de catecolamina. Na presença das neurotoxinas

GVIIA ou MVIIA pudemos observar uma redução de, aproximadamente, 50 % na contração induzida pela estimulação elétrica em CCC e RbCC. As toxinas para os canais de sódio ou cálcio não interferiram na contração induzida pela fenilefrina. Em relação aos experimentos com noradrenalina triciada não foi detectado nenhum sinal de radioatividade no sobrenadante de CCC após a estimulação elétrica, indicando a baixa sensibilidade do método ou a liberação de outra catecolamina. Por outro lado, em RbCC na presença de TTX, NMDG e na ausência de Ca^{+2} houve uma redução significativa na fração de [^3H]-noradrenalina liberada após o estímulo elétrico, indicando a participação do influxo de sódio e de cálcio na neurotransmissão adrenérgica no RbCC. Os experimentos funcionais sugerem que em CCC a liberação de catecolaminas independe do influxo de sódio, porém é dependente do influxo de cálcio.

ABSTRACT

The snake's coitus may last up to 20 hours, although the pharmacological mechanism remains unknown. Conversely to mammalian corpus cavernosum (CC), the relaxation induced by electrical field stimulation (EFS) in *Crotalus* corpus cavernosum (CCC) was long-lasting and resistant to tetrodotoxin (TTX). Since TTX-resistant sodium current has much slower activation and inactivation kinetics than TTX-sensitive sodium current, one may speculate that the prolonged coitus was due to persistent sodium channel activation, and thus nitric oxide release. Based on these results and considering that TTX-resistant was also observed in EFS-induced contraction, the aim of this study was to characterize the contraction in CCC. The functional assays were divided in five steps: 1) concentration response curve to noradrenaline, adrenaline and dopamine in the absence and presence of phentolamine; contraction induced by electrical field stimulation (EFS) or phenylephrine (PE) in the presence of 2) TTX, phentolamine or guanetidide; 3) of blockers for voltage gated sodium- or calcium channels; 4) EFS- and PE-induced contraction after NaCl replacement by N-methyl-D-glucamine (NMDG); 5) quantification of titrated [³H] noradrenaline after EFS in RbCC and CCC. Noradrenaline, adrenaline, dopamine and EFS induced contraction, which were practically abolished in the presence of phentolamine or guanethidine in RbCC and CCC. Surprisingly, low sodium levels did not affect EFS-induced contraction in CCC, but abolished in RbCC. The sodium channel activator, veratridine induced contraction in both RbCC and CCC being this response abolished in the presence of phentolamine. Local anaesthetics, ropivacaine and bupivacaine and the neuronal N-type calcium channel blocker, GVIA and MVIIA reduced by, approximately, 50 % EFS-induced contraction, without affecting the contraction by PE. In CCC no radioactivity was detected after EFS stimulation, whereas in RbCC TTX, sodium or calcium ions removal a significant reduction on [³H]-noradrenaline release was observed. Our results suggest that EFS-induced contraction was independent on sodium influx, but rather dependent on calcium influx.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemipenis de *Crotalus durissus terrificus*

1.1.1 Aspectos morfológicos

As cobras e os lagartos são os únicos, entre os vertebrados, a apresentarem um pênis bilateral, simétrico e intromitente, denominado hemipênis. Os hemipenes são estruturas cilíndricas e bilaterais que se encontram na base da calda e estão presos à parede posterior da cloaca. Quando não está em uso, este órgão encontra-se totalmente invertido e encapsulado na cauda (Dowling&Savage, 1960). Durante o acasalamento há a abertura da cloaca e a intromissão é obtida através da eversão do órgão. Quando o hemipênis é evertido, ele encontra-se em um estado de tumescência incompleto, atingindo sua completa eversão após o contato com a fêmea (Edgren, 1953).

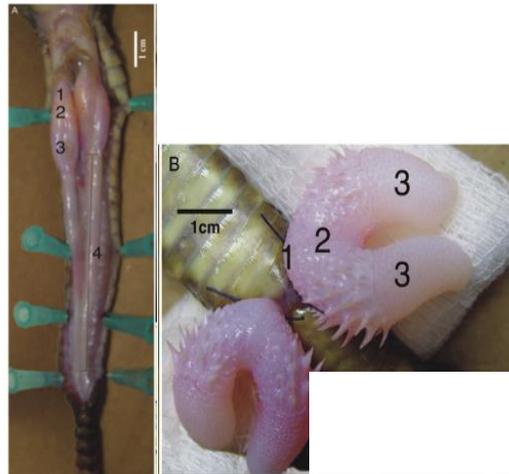


Figura 1: Avaliação macroscópica do hemipênis de *Crotalus durissus terrificus*. A: Hemipênis invertido, B: Hemipênis evertido: 1) base 2) tronco 3) ápice 4) músculo retrator magnus (Capel et al., 2011)

A cascavel apresenta dois hemipenes bilobulados. Cada hemipênis consiste essencialmente de dois cilindros concêntricos, denominados corpo cavernoso externo e corpo cavernoso interno. O hemipênis é coberto com um tecido epitelial

que limita externamente o corpo cavernoso externo e que cobre uma camada de tecido conectivo fibroso (a túnica albugínea) (Capel et al., 2011; Porto et al., 2013). O corpo cavernoso externo, internamente, é delimitado por um anel muscular composto de músculo liso entremeado com tecido conectivo. O tecido conectivo apresenta um aspecto sinusoidal, pois apresenta uma malha de espaços lacunares que se enchem de sangue durante a tumescência. Neste estado, o relaxamento muscular promove o crescimento do órgão. Já durante a detumescência há a contração dos anéis musculares, e o hemipênis é encurtado, semelhante ao fenômeno observado nos mamíferos. Além dos anéis de músculo liso, existem alguns feixes de músculo liso dispostos radialmente, organizados em sequência e fixados nos anéis musculares. Estes feixes de músculos radiais estão presentes por todo o comprimento do corpo cavernoso externo e atuam como suporte para controlar a expansão do corpo cavernoso externo durante a tumescência do hemipênis.

O corpo cavernoso interno é um cilindro oco feito de tecido conjuntivo frouxo. A superfície externa está em contato com o anel muscular do cavernoso externo (Porto et al., 2013).



Figura 2: Comparação entre a estrutura morfológica entre o corpo cavernoso de crotalus (painel a esquerda) e de humano (painel a direita). Corte transversal. EC: corpo cavernoso externo, IC: Corpo cavernoso interno, RM: Músculo retrator, CS: Corpo esponjoso, CC: Corpo cavernoso.

Atravessando o corpo cavernoso interno durante toda sua extensão existe um músculo esquelético denominado músculo retrator penis magnus que tem a

função de retrain o hemipênis. Este músculo tem início nas últimas vértebras caudais e adentra o corpo cavernoso interno para inserir na extremidade distal do hemipênis (Porto et al., 2013).

Outro músculo esquelético que participa do processo de ereção é o *músculo retrator penis basalis*, com função propulsora. Durante a ereção, o hemipênis é parcialmente evertido através deste músculo. Após este evento, um aumento na pressão hidrodinâmica causa a tumescência e a completa ereção (Porto et al., 2013).

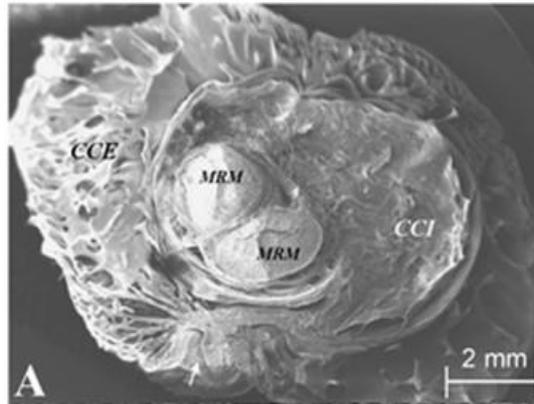


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura da região basal do hemipenis de *Crotalus durissus terrificus* mostrando o corpo cavernoso externo (CCE) e o corpo cavernoso interno (CCI), na parte central aparece o músculo retrator magnus (MRM) (Porto et al., 2013).

Comparando o hemipênis com o pênis de outros vertebrados, observa-se que ambos são cilindros flexíveis o suficiente para se ampliarem através de um mecanismo hidráulico, no qual há o preenchimento com fluido, antes da cópula. No entanto, o hemipênis apresenta algumas características únicas que fazem dele uma nova estrutura, entre elas: dois pênis alojados na cauda, presença de dois corpos cavernosos, organização concêntrica, ausência de um verdadeiro sinusóide e presença de músculo esquelético retrator.

1.1.2 Aspectos funcionais

Apesar das diferenças morfológicas, em um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, foi visto que o hemipenis de *Crotalus* apresenta os mesmos mecanismos de transdução de sinal (óxido nítrico-cGMP-fosfodiesterase V) envolvidos no relaxamento do músculo liso do pênis de mamíferos (Capel et al., 2011).

Um achado interessante deste mesmo trabalho foi a demonstração de que este relaxamento é bem mais duradouro quando comparado com mamíferos, o que pode estar relacionado com a extraordinária duração da cópula das cobras. Esta resposta lenta da musculatura lisa foi atribuída à presença de canais de sódio dependentes de voltagem resistentes ao bloqueio de tetrodotoxina (TTX-resistentes), cuja cinética de ativação e inativação é mais lenta comparada com os canais de sódio dependentes de voltagem TTX-sensíveis.

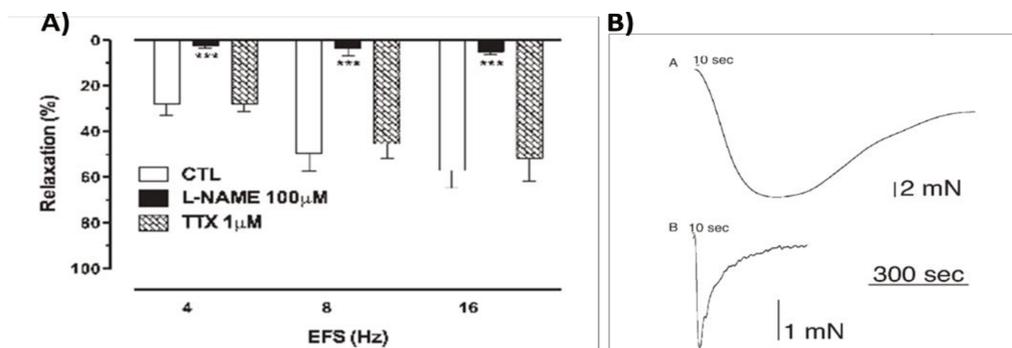


Figura 4 A) Relaxamento frequência-dependência induzido por estimulação elétrica (EFS) em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* na ausência (controle-CTL) e na presença de inibidor da NOS (L-NAME, 100 μM) e do bloqueador de canal de sódio (TTX, 1 μM). B) Traçado representativo do relaxamento induzido por estimulação elétrica (EFS) em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* (painel acima) e em corpo cavernoso de marmoset (mamífero) (Capel et al, 2011).

1.2 Canais iônicos dependentes de voltagem e papel na liberação dos neurotransmissores

1.2.1 Canal de sódio dependente de voltagem (NaV)

Os canais de sódio dependentes de voltagem (NaV) são proteínas e têm um papel essencial na geração e propagação do potencial de ação de células excitáveis como neurônios, miócitos, cardiomiócitos e células endócrinas. Quando estas células são despolarizadas, estes canais são ativados e inativados em milisegundos (Yu and Catterall, 2003). A estrutura do NaV consiste em uma subunidade alfa funcional (220–260 kDa, \approx 2000 aminoácidos) associada a uma ou mais subunidades betas regulatórias (22–36 kDa) (Figura 4) (Catterall et al., 2005; Catterall, 2012).

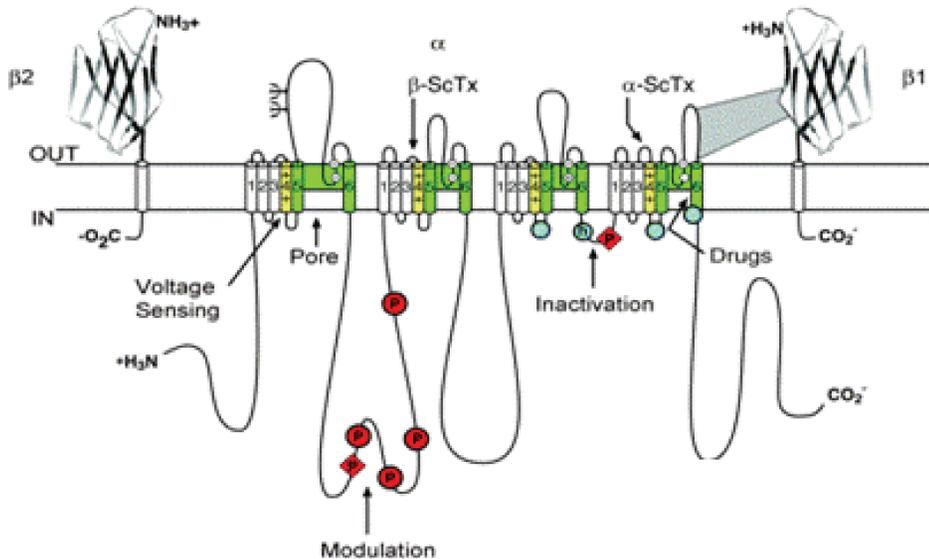


Figura 5: Estrutura primária das subunidades do canal de sódio dependente de voltagem (NaV) (Catterall, 2012).

Até recentemente, a estrutura cristalográfica do canal de sódio permanecia desconhecida, e as informações estruturais conhecidas do canal tinham sido deduzidas de maneira indireta. No entanto, em 2011, a estrutura cristalina do NaV bacteriano foi determinada. Com este estudo, o grupo forneceu informações importantes em relação as bases moleculares da ativação do sensor de voltagem, aos sítios de interação dos bloqueadores dos canais de sódio dependentes de voltagem e as estruturas responsáveis pela seletividade a condutância ao íon sódio (Payandeh et al., 2011).

Estudos anteriores, bem como a cristalografia realizada recentemente, mostraram que a subunidade alfa é composta de quatro domínios homólogos, DI–DIV, os quais contêm seis segmentos alfa-hélices transmembranas, S1–S6. Os quatro domínios apresentam um módulo sensor de voltagem formado pelos segmentos S1–4, e um módulo formador do poro formado pelos segmentos S5 e S6 e por uma alça curta conectora (Yu and Catterall, 2003).

O módulo sensor de voltagem detecta a mudança de voltagem, ou seja, a diferença de potencial elétrico, através do segmento S4 – sensível a voltagem. Esta estrutura cilíndrica alfa-hélice apresenta, de forma conservada, aminoácidos positivos a cada 3 posições. Em um modelo proposto por Catterall, estes resíduos positivos estão dispostos em direção a superfície intracelular da membrana devido ao potencial de repouso negativo da membrana. As cargas positivas estão estabilizadas pela formação de pares de íons neutros com as cargas negativas vizinhas de S1, S2, e/ou S3. Quando a membrana despolariza, o potencial de membrana negativo é aliviado, e os aminoácidos positivos se movem para fora (perpendicularmente ao plano da membrana), desencadeando uma série de alterações de conformação de todos os quatros domínios que resulta na abertura do poro e se inicia a ativação do canal (Catterall, 2000).

A seletividade iônica dos NaV é garantida através da região do poro do canal, formada pelos segmentos S5 e S6 e pela alça conectora entre eles (alça P). As alças P dos quatros domínios penetram na membrana formando a parte externa do poro. Dentro do poro, dois anéis determinam a seletividade iônica. O anel de seletividade interna é formado por 4 aminoácidos: Asp, Glu, Lys, e Ala em

DI, DII, DIII, e DIV, respectivamente (anel DEKA). E o anel externo de seletividade é formado da mesma maneira por 4 aminoácidos: Glu, Glu, Asp, and Asp em DI, DII, DIII, and DIV, respectivamente (anel EEDD). Os primeiros estudos que levaram a descoberta do anel DEKA fez uso das toxinas tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina (STX). A parte intracelular do poro é formada pelos quatros segmentos S6 (Yu and Catterall, 2003).

As alças citoplasmáticas que conectam os 4 domínios são sítios nos quais ocorrem a modulação e regulação do processo de abertura do canal. Muitos sítios de fosforilação são encontrados na primeira (entre DI-DII) e terceira alça (entre DIII-DIV). A fosforilação pode ser introduzida por isoformas de proteína quinase A (PKA) ou C (PKC) e resulta em diferentes funções, dependendo da quinase ou da isoforma do canal. Foi identificado também um sítio para ligação de anquirinas na alça que liga DII a III, o qual pode influenciar na cinética do fechamento do canal (Chahine et al., 2005). As pequenas subunidades beta associadas à subunidade alfa modulam a corrente de sódio e também regulam a expressão do canal na superfície celular (Patino and Isom, 2010). As subunidades betas são peças chaves para o complexo do canal uma vez que elas são necessárias para que a subunidade alfa apresente as características esperadas em relação à cinética de corrente e abertura dependente de voltagem (Yu and Catterall, 2003). Pelo menos 5 subunidades beta reguladoras ($\beta 1$ - $\beta 4$ e $\beta 1A$) de 4 diferentes genes (SNC1B-4B), sendo $\beta 1A$ um splice variante da subunidade $\beta 1$, foram identificadas até o momento. As subunidades beta podem ser ligadas através de ligações não covalentes ($\beta 1$ e $\beta 4$) ou covalentes ($\beta 2$ e $\beta 4$) para formar um heteromero com a subunidade alfa (Chahine et al., 2005).

As ferramentas farmacológicas comumente utilizadas para avaliar os NaV são importantes não somente porque atuam em diferentes regiões dos canais como também sua ativação resulta em diferentes respostas fisiológicas (Figura 5). Além destes locais, existem mais dois sítios diferentes: o sítio de ligação dos piretróides, onde se ligam alguns agentes inseticidas como o DDT; e o sítio dos anestésicos locais, onde os além destes fármacos, os anticonvulsivantes e alguns

antiarrítmicos (Tytgat et al., 2011) também podem atuar. O sítio dos anestésicos locais é formado pelos domínios I, III e IV do segmento S6, e sua ligação leva ao bloqueio do movimento iônico através do poro, estabilizando o canal no estado inativo (Catterall, 2012). A interação entre as neurotoxinas e os canais dependentes de voltagem pode ocorrer de duas maneiras, resultando na menor condutância ao íon ou alterando a cinética de abertura e fechamento do canal (Tytgat et al., 2011).

Nas células de mamíferos, até o momento, foram caracterizadas nove isoformas das subunidades alfa (classificadas como NaV 1.1–NaV 1.9). Assim, os NaV 1.1, 1.2, 1.3, e 1.6 estão expressos principalmente no sistema nervoso central; enquanto que os NaV 1.7, 1.8, e 1.9 são altamente expressos no sistema nervoso periférico; já as isoformas NaV 1.4 e 1.5 estão presentes na musculatura esquelética e na musculatura cardíaca, respectivamente (Goldin, 2001). Das nove isoformas, três são resistentes à TTX, como NaV 1.5, NaV1.8 e NaV1.9. Por resistência entenda-se K_d da ordem de μM (Tytgat et al., 2011).

Os canais de sódio dependentes de voltagem também foram identificados em diversos tipos de musculatura lisa. Em aorta de rato e em células isoladas deste tecido (Fort et al, 2009), bem como em artéria mesentérica de rato (Ho et al., 2013), foi verificado que Nav 1.2 e Nav 1.3 contribuem para a resposta contrátil dos miócitos. Estudo com cultura de célula de aorta de humano e de coelho revelaram que Nav 1.7 são expressos em condições de doença, e que eles exercem um papel na migração celular, na endocitose e na secreção, e ainda um possível papel na progressão da hiperplasia (Meguro et al., 2009). Os Nav, isoformas Nav 1.5 e 1.7, também estão presentes na células endoteliais, onde estão associados ao processo de angiogênese (Andrikopouloset al., 2011).

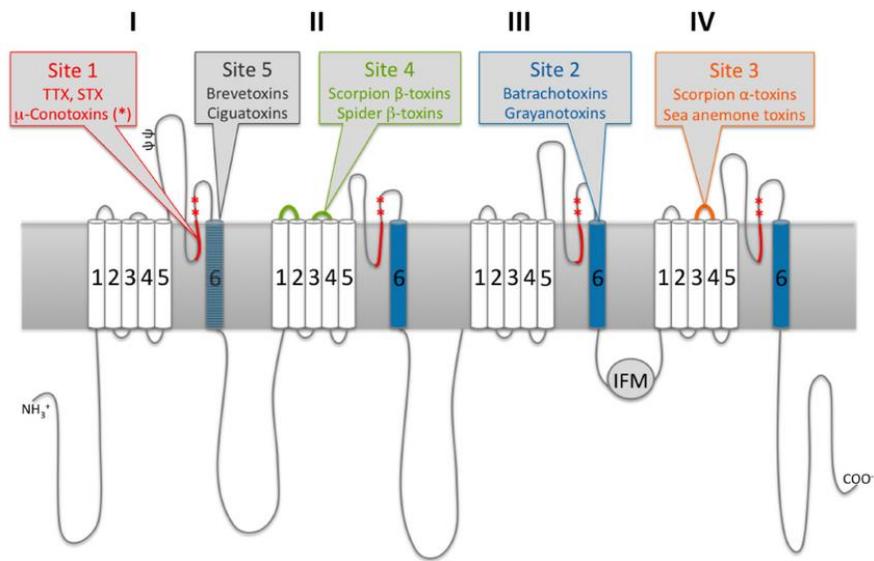


Figura 6. Representação esquemática da subunidade alfa funcional do canal de sódio dependente de voltagem e a identificação dos sítios de ligação das neurotoxinas (Tytgat et al., 2011).

1.2.2 Canal de cálcio dependente de voltagem (CaV)

Em mamíferos, a família dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) apresenta 10 subtipos, cada qual apresentam papéis distintos na transdução de sinal celular (tabela 1) (Catterall, 2011)

Tabela 1. Subtipos de canais de cálcio dependentes de voltagem (Catterall, 2011 – adaptado)

Tipo de corrente de Ca ²⁺	Subunidade α 1	Principais funções fisiológicas
L	Cav 1.1	Acoplamento entre a excitação e a contração em músculo esquelético, regulação da transcrição
	Cav 1.2	Acoplamento entre a excitação e a contração em músculo cardíaco e liso, secreção endócrina, influxo de cálcio neuronal em corpos celulares e dendritos, regulação da atividade enzimática e regulação da transcrição
	Cav 1.3	Secreção endócrina, marcapasso cardíaco, influxo de cálcio neuronal em corpos celulares e dendritos, transdução auditiva
	Cav 1.4	Transdução visual
P/Q	Cav 2.1	Liberação de neurotransmissor, influxo de cálcio em dendritos
N	Cav 2.2	Liberação de neurotransmissor, influxo de cálcio em dendritos
R	Cav 2.3	Liberação de neurotransmissor, influxo de cálcio em dendritos
T	Cav 3.1	Marcapasso e disparo repetitivo
	Cav 3.2	Marcapasso e disparo repetitivo
	Cav 3.3	

Os CaVs são compostos por uma subunidade α 1 e subunidades auxiliares β , α 2 δ e algumas vezes γ (figura 6). A subunidade α 1 de 190-250 kDa inclui o

poro, o sensor de voltagem, o modulo de abertura e a maior parte dos sítios de regulação. As subunidades auxiliares tem uma importante influência na função do canal. A subunidade beta intracelular é uma proteína hidrofílica de 50-65 kDa; sua estrutura é composto por um domínio SH3 e um domínio guanilato quinase, ambos com interações proteicas bem conhecidas. O domínio guanilato quinase se liga a um segmento alfa-hélice em uma alça intracelular que conecta os domínios I e II (figura 6), deixando o domínio SH3 disponível para interações com outros ligantes. A ponte dissulfeto transmembrana que liga a subunidade $\alpha_2\delta$ é codificada por um único gene, mas o prepolipeptídeo resultante é clivado pós-translacionalmente, ligado pela ponte dissulfeto e ancorado à proteína para fornecer as subunidade maduras α_2 e δ .

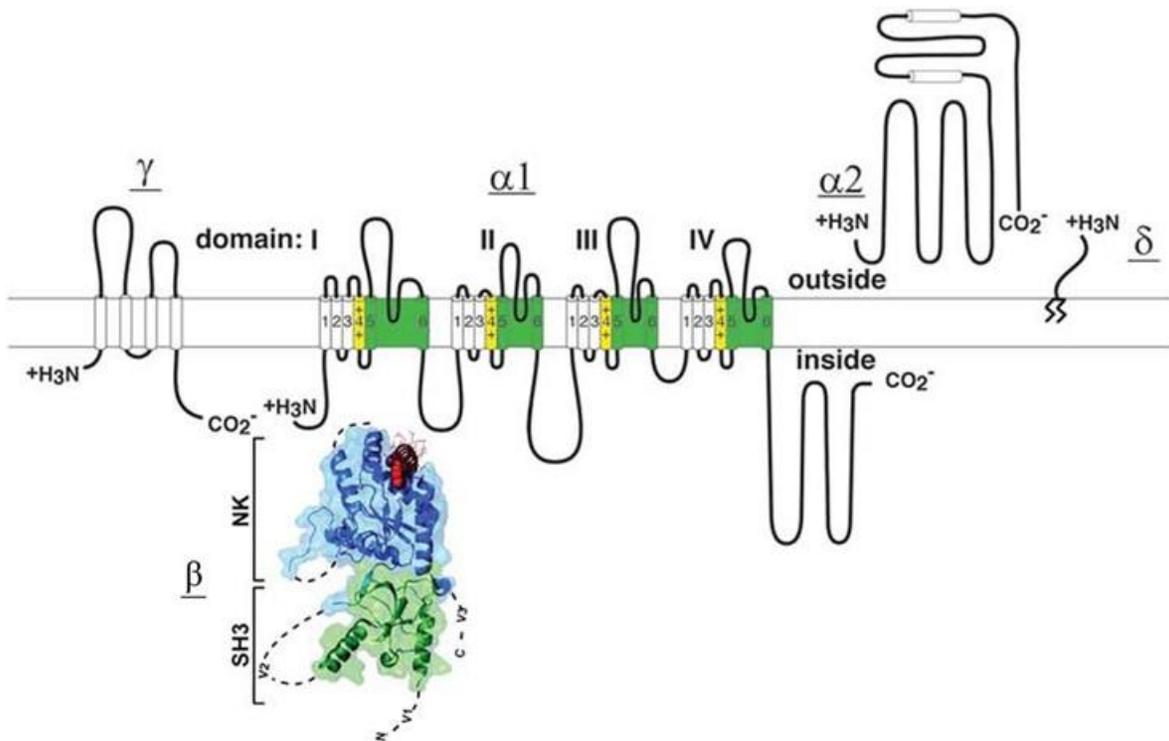


Figura 7. Estrutura das subunidades do canal de cálcio (Catterall et al., 2013)

O influxo de cálcio através dos canais CaV do tipo 2 é fonte predominante de Ca^{2+} para iniciação da excitose dos neurotransmissores. Os canais CaV 2.1

tem um papel maior na neurotransmissão na junção neuromuscular e na maioria das sinapses do sistema nervoso central. Em contraste, os canais CaV 2.2 são predominantes nas sinapses do sistema nervoso autônomo e em algumas sinapses do sistema nervoso central (Oliveira et al., 1994; Wright and Angus, 1996). Os CaV 2.3 também contribuem para a liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central (Catterall et al., 2013). A exocitose é desencadeada por proteínas sensores de cálcio denominadas sinaptotagminas (Sudhof, 2012), as quais se ligam a complexina e complexo SNARE (Tang et al., 2006), ocasionando a abertura do poro (Südhof, 2012).

A necessidade de cálcio para que ocorra a liberação de neurotransmissores já está amplamente documentada, no entanto, estudos recentes têm mostrado que receptores acoplados à proteína G sensíveis à voltagem também estão envolvidos neste processo (Kupchik et al., 2011; Parnas & Parnas, 2010; Kupchik et al., 2008). Esta hipótese defende que os receptores pré-sinápticos e autoinibitórios (como por exemplo, receptores muscarínicos M2) mantêm a maquinaria de liberação (complexo SNARE) bloqueada quando estão ligados ao agonista. Desta forma, durante o potencial de repouso, quando existe uma quantidade basal de neurotransmissores na fenda, a maior parte dos receptores está ligado ao agonista, já que os receptores apresentam uma alta afinidade pelo neurotransmissor; e, portanto, mantêm o neurônio em um estado de bloqueio tônico. De acordo com esta teoria, estes receptores acoplados a proteína G são sensíveis à voltagem. Com a despolarização, ocorre uma diminuição da afinidade destes receptores, o que leva a um desligamento do neurotransmissor do receptor, e conseqüentemente o bloqueio da maquinaria é desfeito, permitindo a liberação dos neurotransmissores. Com a repolarização, o receptor retorna para o estado de alta afinidade, e para o estado de bloqueio tônico. Os autores desta teoria acreditam que o cálcio e os receptores acoplados a proteínas G sensíveis à voltagem controlem de forma independente a exocitose, sendo os receptores acoplados a proteína G o responsável pelo início e término da liberação (Kupchik et al., 2008; Parnas & Parnas, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O fato da cópula em serpentes ser muito prolongada, chegando a mais de 20 horas (Hammerson, 1978), sem que os mecanismos farmacológicos estejam conhecidos, motivou o nosso grupo a estudar o hemipênis de *Crotalus Durissus terrificus* (cascavel). Trabalhos publicados pelo grupo mostraram que a via do óxido nítrico encontra-se conservada e funcionalmente ativa em aorta (Mónica et al., 2012) e hemipenis (Capel et al., 2011) de cascavel. Por outro lado, diferentemente do observado em corpo cavernoso de sagui e de outros mamíferos, o relaxamento e contração induzida pela estimulação elétrica foi mais duradouro além de resistente a ação da neurotoxina tetrodotoxina (TTX) em hemipenis (Capel et al., 2011). Uma vez que trabalhos de eletrofisiologia utilizando gânglio da raiz dorsal de rato e que expressam canais de sódio resistentes à TTX mostraram que a abertura e o fechamento deste canal são mais lentos quando comparados aos canais TTX-sensíveis (Roy & Narahashi, 1992; Leffler et al., 2005), uma hipótese inicial aventada é que esta cinética permitiria um maior tempo de abertura do canal e, portanto, maior liberação de NO. A resistência à TTX não é exclusiva do hemipenis e parece ser uma característica comum da ordem dos Squamatas, uma vez que em hemipenis e intestino de lagarto (*Tupinambis teguixim*) a TTX também não interferiu na reatividade frente à estimulação elétrica, porém reduziu significativamente a contração induzida pela estimulação elétrica em corpo cavernoso de jabuti (*Chelonoidis carbonaria*) (dados preliminares obtidos pelo nosso grupo). Uma vez que a fisiologia peniana envolve o conhecimento dos processos de tumescência e detumescência, procuramos caracterizar o efeito das neurotoxinas seletivas para os canais de sódio ou cálcio dependentes de voltagem bem como a modificação da composição do líquido nutritivo frente a contração induzida pela estimulação elétrica ou por agonistas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a contração induzida por agonistas e pela estimulação elétrica em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus*, comparando com os achados em corpo cavernoso isolado de coelho.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o efeito das alterações iônicas do líquido nutritivo Krebs na contração induzida pela estimulação elétrica ou por agonistas.
- Investigar os efeitos de bloqueadores e ativadores dos canais de sódio dependentes de voltagem na contração induzida pela estimulação elétrica ou por agonistas.
- Investigar os efeitos dos bloqueadores dos canais de cálcio dependentes de voltagem induzida pela estimulação elétrica ou por agonistas.
- Investigar a liberação pré-sináptica de noradrenalina triciada no hemipênis após estimulação elétrica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais de experimentação

Foram utilizados Coelhos New Zealand machos (2.5-3.0 kg), provenientes da Granja Anilab (Paulínia, SP) e cobras machos da espécie *Crotalus durrisus terrificus* (cascavel) provenientes do Instituto Butantan (São Paulo, SP) ou do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos, SP). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Ética de Uso Animal (CEUA/UNICAMP, n. 2720-1 e 1665-1) e pelo IBAMA (n. 18020-1).

4.2. Ensaio funcionais

4.2.1. Isolamento e montagem dos tecidos

Para o isolamento do corpo cavernoso, os coelhos foram anestesiados com ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e exsangüinados por secção dos vasos cervicais. O pênis do coelho foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado, após a remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Cada pênis forneceu quatro segmentos de corpo cavernoso, (RbCC, sigla em inglês para “rabbit corpus cavernosum”), medindo cerca de 1,5 cm.

As cobras foram primeiramente anestesiadas com isofurano dentro de um caixa hermética, seguida de uma injeção letal com ketamina/xilazina (100 e 70 mg/kg) aplicada em diferentes pontos do lado ventral do animal. Após realizar uma incisão ventral na região inferior à cloaca, os hemipenes invertidos foram expostos e removidos, e imediatamente colocados em solução de Krebs. Em seguida, os tecidos cavernosos foram dissecados, após a retirada do músculo esquelético retrator, da região espiculada e dos tecidos conectivos. Os dois lóbulos de cada hemipênis foram separados, e depois foram abertos e seccionados em duas tiras. Desta forma, cada animal forneceu oito segmentos de corpo cavernoso dissecados, com comprimento por volta de 1 cm), quatro segmentos provenientes de cada hemipênis (CCC, sigla em inglês para *crotalus corpus cavernosum*).

Os tecidos foram montados em câmaras de incubação de tecido (volume de 10 ml) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit composição (mM): NaCl (118), KCl (4,7), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1,2) e Glicose (5,6.); continuamente aeradas com mistura de O₂:CO₂ (95:5%), pH 7,3 a 7,5, mantidas à temperatura de 37° (coelho) ou a 27°C (cobra).

Os segmentos foram suspensos através de fio de algodão, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força. A tensão aplicada aos tecidos (5 mN) foi periodicamente ajustada até a estabilização, e a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 5.0, AD Instruments, Austrália).

4.2.2. Protocolos experimentais

4.2.2.1. Avaliação do efeito das catecolaminas em corpo cavernoso de coelho e *Crotalus*

Foram realizadas curvas concentração-resposta à noradrenalina, adrenalina e dopamina (0.00001- 1 mM), na ausência e na presença de fentolamina 10 µM, incubada por 30 minutos antes da contração. Foram determinadas os parâmetros de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{max}).

4.2.2.2. Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho e *Crotalus*

Os segmentos de RbCC e de CCC foram montados em um sistema de gancho para estimulação elétrica. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 50 V, duração de 0,2 milissegundos por 10 segundos nas frequências 4, 8 e 16 Hz. As estimulações elétricas (EFS, sigla em inglês para

“electrical field stimulation”) foram feitas na ausência e na presença de guanetidina 30 μM (droga que atua inibindo a neurotransmissão adrenérgica nos nervos pós-ganglionares), fentolamina 10 μM (antagonista alfa adrenérgico não seletivo), tetrodotoxina 1 μM ou 1 mM (bloqueador do canal de sódio dependente de voltagem, dos anestésicos locais ropivacaína e bupivacaína (10 e 100 μM), dos bloqueadores seletivos do Cav 2.1: ω -conotoxina MVIIC 100 nM e do Cav 2.2: ω -conotoxinas GVIA 100 nM e MVIIA 100 nM, e do bloqueador dos Cav 3.1, Cav3.2 e Cav 3.3: mibefradil 300 nM. Todas as substâncias foram adicionadas 30 minutos antes da estimulação.

4.2.2.3. Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica.

Os segmentos de RbCC e de CCC foram montados em um sistema de gancho para estimulação elétrica. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 50 V, duração de 0,2 milissegundos por 10 segundos nas frequências 8 e 16 Hz. As estimulações foram feitas na presença e na ausência da solução de Krebs modificada, na qual o NaCl foi substituído de maneira equimolar por N-metil-D-glucamina, com a seguinte composição em mM: N-metil-D-glucamina (118), KCl (4,7), CaCl_2 (2,5), MgSO_4 (1,2), NaHCO_3 (25), KH_2PO_4 (1,2) e Glicose (5,6).

4.2.2.4. Avaliação do efeito da veratridina, um ativador do canal de sódio

Foram realizadas curvas concentração-efeito à veratridina na ausência e na presença de fentolamina 10 μM , tetrodotoxina 1 μM , substituição equimolar do NaCl por N-metil-D-gucamina, ropivacaína (10 ou 100 μM) e bupivacaína (10 ou 100 μM) em segmentos de RbCC e de CCC.

4.3. Dosagem de [³H]-noradrenalina

Os ensaios de dosagem de [³H]-noradrenalina foram adaptados da metodologia descrita por Nap et al (2002). Os segmentos de corpo cavernoso de cobra e coelho foram incubados durante 2 horas em uma solução de Krebs continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5%); mantidas à temperatura de 37°C, no caso dos tecidos do coelho e 27°C, no caso dos tecidos da cobra; contendo 0.4 µM de [³H]-noradrenalina (atividade específica 14,8 Ci/mmol) e 1 µM seleginina (inibidor da MAO-B). Após o período de incubação, os tecidos foram lavados com Krebs sem radioativo, e em seguida foram montados em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) preenchidas com a solução Krebs contendo desipramina 1 µM (inibidor da recaptação de noradrenalina). Após o período de equilíbrio, foram coletadas, da câmara, amostras de 0,2 mL de Krebs, a fim de determinar o nível basal de liberação de [³H]-noradrenalina.

Os segmentos foram submetidos a dois períodos de 5 minutos de estimulação elétrica a uma voltagem de 50 V, duração de 0,2 milissegundos, na frequência de 16 Hz, no tempo de 20 e 80 minutos. O primeiro estímulo foi feito em Krebs comum, enquanto o segundo estímulo foi feito na presença de tetrodotoxina 1 µM, ou na presença de solução de Krebs modificada na qual o NaCl foi substituído de forma equimolar por N-metil D-glucamina; ou na ausência de CaCl₂. As alterações da solução de Krebs foram realizadas 20 minutos antes do segundo estímulo. No decorrer deste período, bem como durante e após os dois estímulos, foram coletadas, da câmara, amostras de 0,2 mL de Krebs, a fim de determinar o a liberação de [³H]-noradrenalina. Os tempos de coleta foram 0,5;10; 20; 21,25; 22,5; 23,75; 25;30; 35; 45; 60; 65; 70; 80; 81,25; 82,5; 83,75; 85, 90, 95 e 105 minutos. No ensaio com o CCC, os tempos de coleta sofreram algumas variações a fim de padronizar o método para aquele material. Ao final do experimento, os tecidos foram recolhidos e tratados com 2 mL de solução de Tissue Solubilizer (NCS-II, Amercham Biosciences). A radioatividade foi medida através do contador de citilação (Packard Tri-Carb 2900TR). A liberação de noradrenalina foi expressa como CPM/min ou como a porcentagem da

radioatividade liberada em relação a quantidade presente no tecido no momento da coleta (fração liberada - FR).

4.4. Análise dos resultados

As contrações provocadas pelas catecolaminas foram expressas como porcentagem (%) em relação à contração ao KCl (80 mM). As contrações provocadas pelo estímulo elétrico (EFS) e pelo ativador do canal de sódio foram expressas em seus valores absolutos (mN). Para avaliar o efeito de intervenções farmacológicas na contração induzida pelo estímulo elétrico, foram aplicados dois estímulos elétricos pareados, sendo o primeiro uma estimulação controle. Foi calculada a porcentagem (%) de contração em relação à estimulação controle.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações das variáveis, usou-se o teste "t" de STUDENT pareado. O programa Prisma (GraphPad Software) foi usado para estas análises. $p < 0.05$ foi aceito como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio funcionais

5.1.1. Avaliação do efeito das catecolaminas em corpo cavernoso de coelho e *Crotalus*

A dopamina, noradrenalina e adrenalina produziram contração que foi dependente da concentração, sendo este efeito praticamente abolido na presença do antagonista alfa-aderenrgico não seletivo fentolamina, tanto em RbCC (Figura 7, tabela 2) como em CCC (Figura 8, tabela 3).

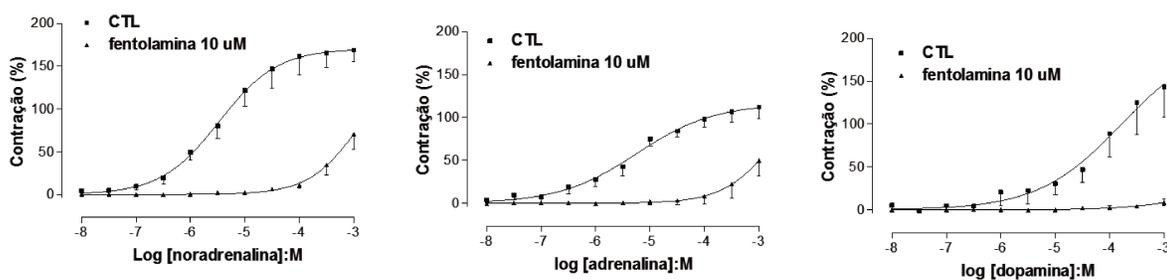


Figura 8. Curvas concentração-resposta à noradrenalina (0.01-100 μ M), adrenalina (0.01-100 μ M, B) e dopamina (0.01-100 μ M, C) na ausência (CTL) e presença de fentolamina (10 μ M) em RbCC; n=4.

Tabela 2. Valores de pEC₅₀ e de resposta máxima contrátil (%) frente as catecolaminas obtidos em corpo cavernoso isolado de coelho (n=4).

Catecolamina	pEC ₅₀	E _{max} (%)
Noradrenalina	5,2 ± 0,2	145,7 ± 11,7
Adrenalina	4,9 ± 0,1	149,5 ± 11,7
Dopamina	3,8 ± 0,5	231,1 ± 72,0

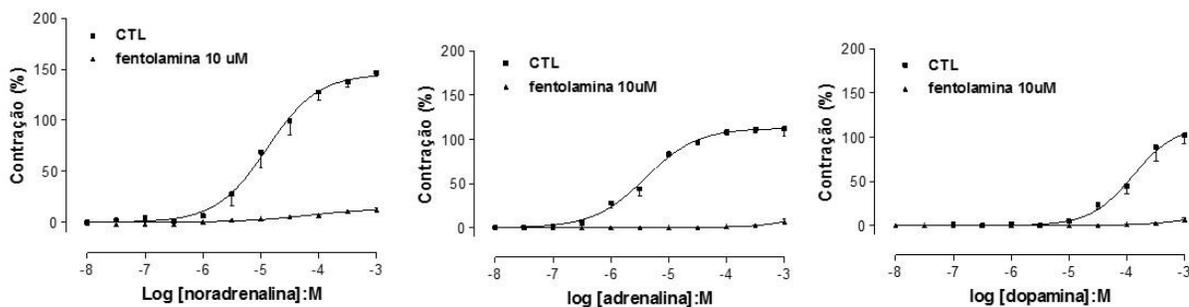


Figura 9. Curvas concentração resposta à noradrenalina (0.01-100 μM), adrenalina (0.01-100 μM , B) e dopamina (0.01-100 μM , C) na ausência (CTL) e presença de fentolamina (10 μM) em CCC; n=4.

Tabela 3 Valores de pEC_{50} e de resposta máxima contrátil (%) às catecolaminas obtidos em corpo cavernoso isolado de *Crotalus durissus terrificus* (n=4)

Catecolamina	pEC_{50}	Emáx (%)
Noradrenalina	$4,9 \pm 0,1$	$145,5 \pm 6,5$
Adrenalina	$5,4 \pm 0,1$	$112,6 \pm 2,9$
Dopamina	$3,9 \pm 0,1$	$113,0 \pm 11,1$

5.1.2. Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho e *Crotalus*

Tanto em RbCC como em CCC (Figura 9) observamos uma contração frente a estimulação elétrica dependente da frequência, sendo esta contração dependente da liberação de catecolaminas, uma vez que a fentolamina ou a guanetidina, que atua inibindo a neurotransmissão adrenérgica nos nervos pós-ganglionares, praticamente aboliram a resposta contrátil transmural em RbCC (Figura 10 A) e CCC (Figura 9 e 10 B). Assim como observado no trabalho previamente publicado pelo nosso grupo (Capel et al., 2011), a contração induzida pela estimulação elétrica também foi resistente a ação da TTX nas concentrações de 0.001 mM e 1 mM em CCC (Figura 10), enquanto em RbCC foi inibida por TTX 0.001 mM.

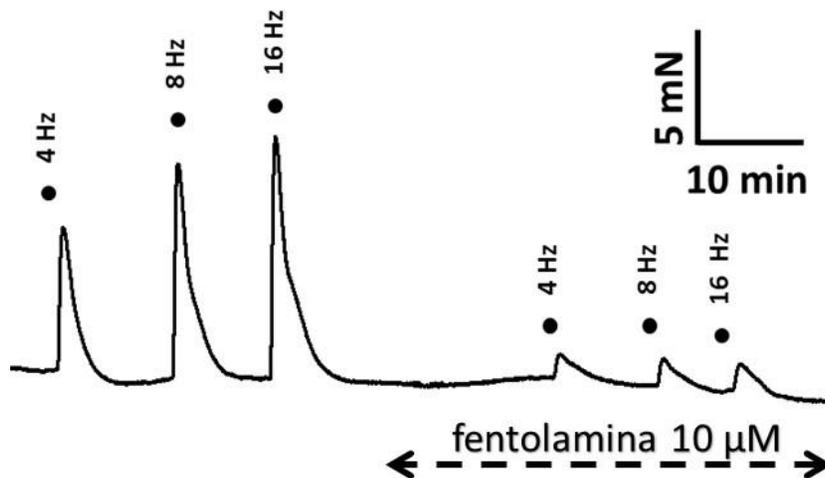


Figura 10. Traçado representativo mostrando a contração induzida por estimulação elétrica na ausência e na presença de fentolamina 10 µM em CCC.

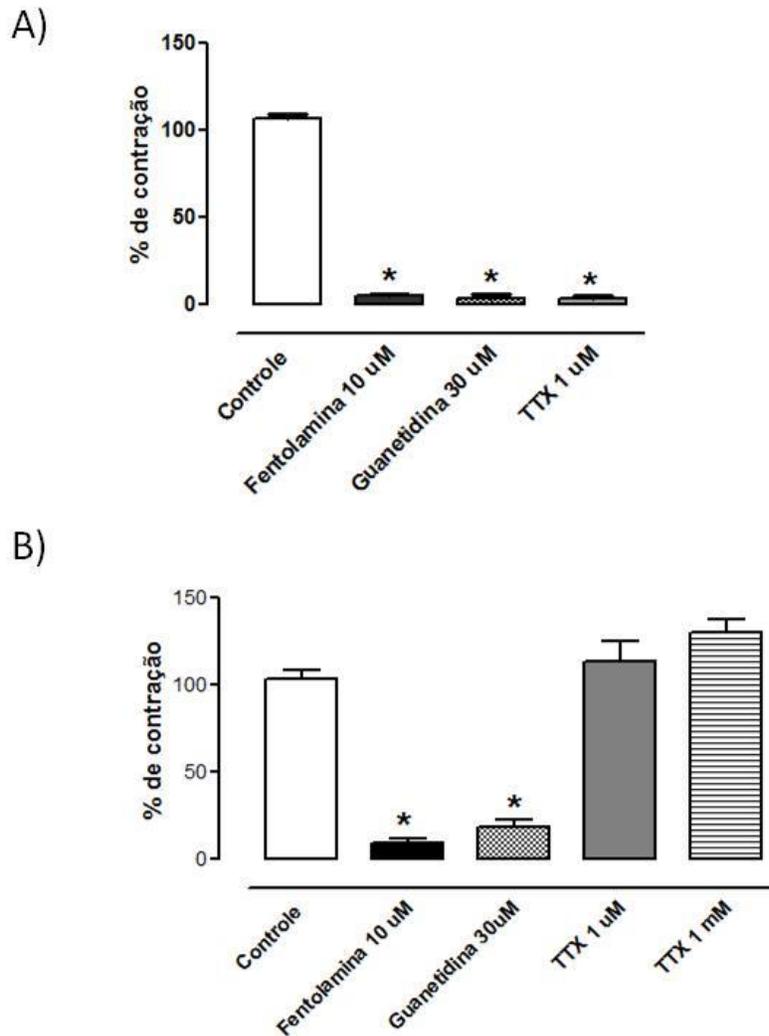


Figura 11. Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica (8 e 16 Hz) em (A) RbCC e em (B) CCC. Neste experimento foram aplicados estímulos elétricos pareados, e os resultados são apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo. n=4, *p<0,05 em relação ao controle.

Outra diferença interessante foi que a duração da contração no CCC foi maior em comparação ao RbCC, pois o tempo para atingir a máxima contração

(t_{max}) bem como o retorno aos níveis basais foi de, aproximadamente, 4 e 20 vezes maior, respectivamente em relação ao RbCC (Figura 11)

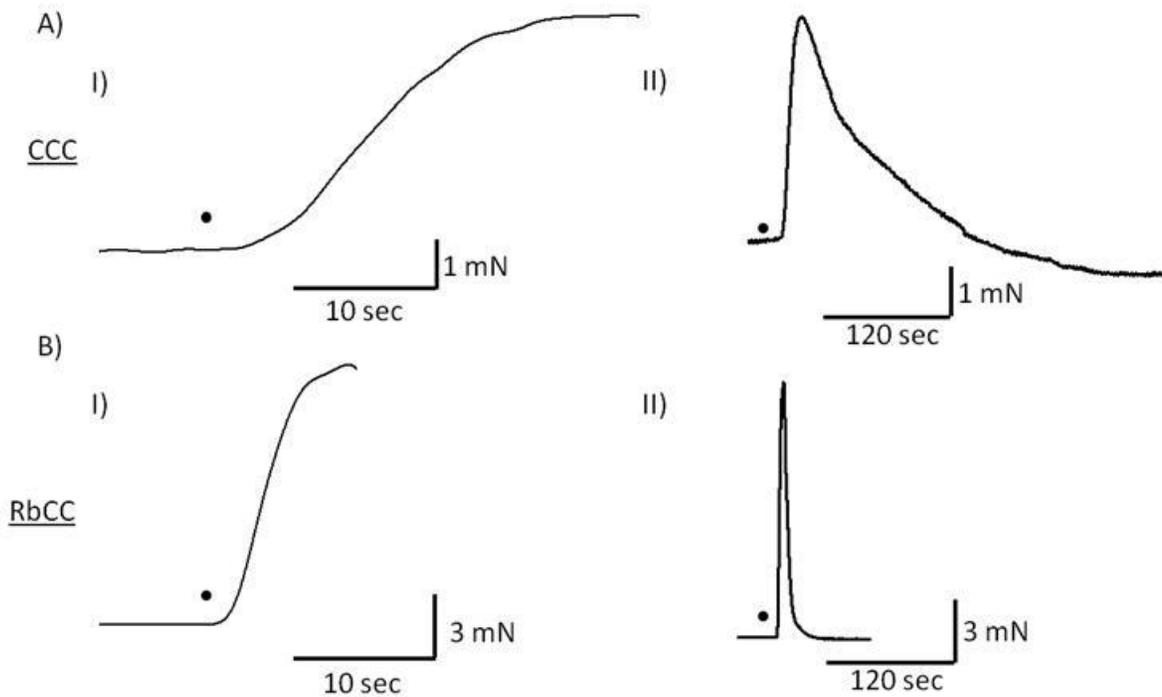


Figura 12. Traçados representativos da contração induzida por estimulação elétrica (EFS, 16Hz – círculo) em (A) corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* (CCC) e em (B) corpo cavernoso de coelho (RbCC). Em (I) é mostrado o aumento de tônus imediatamente após o EFS; em (II) apresenta-se o mesmo traçado mostrando o retorno para o tônus basal.

5.1.3. Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica

Em experimentos de eletrofisiologia utilizando gânglio da raiz dorsal e onde se pretende caracterizar a corrente que predomina quando a TTX encontra-se incubada, é comum a substituição eletrolítica do sódio e/ou potássio e/ou cálcio e/ou cloro (Blair & Bean, 2002).

A substituição equimolar de NaCl por N-metil-D-glucamina (NMDG) praticamente aboliu a resposta contrátil em RbCC (Figura 12A). Surpreendentemente, no caso do CCC não vimos nenhuma alteração na amplitude de contração frente a estimulação elétrica após a redução da $[Na^+]$ (figura 12B). É importante salientar que a substituição por NMDG não interferiu diretamente na reatividade da musculatura lisa, pois a amplitude de contração do agonista fenilefrina e da estimulação elétrica (Figura 12A) não se alteraram após o retorno do Krebs comum. Mesmo na presença de NMDG, tanto a guanetidina como a fentolamina praticamente aboliram a resposta contrátil à estimulação elétrica em CCC (Figura 13).

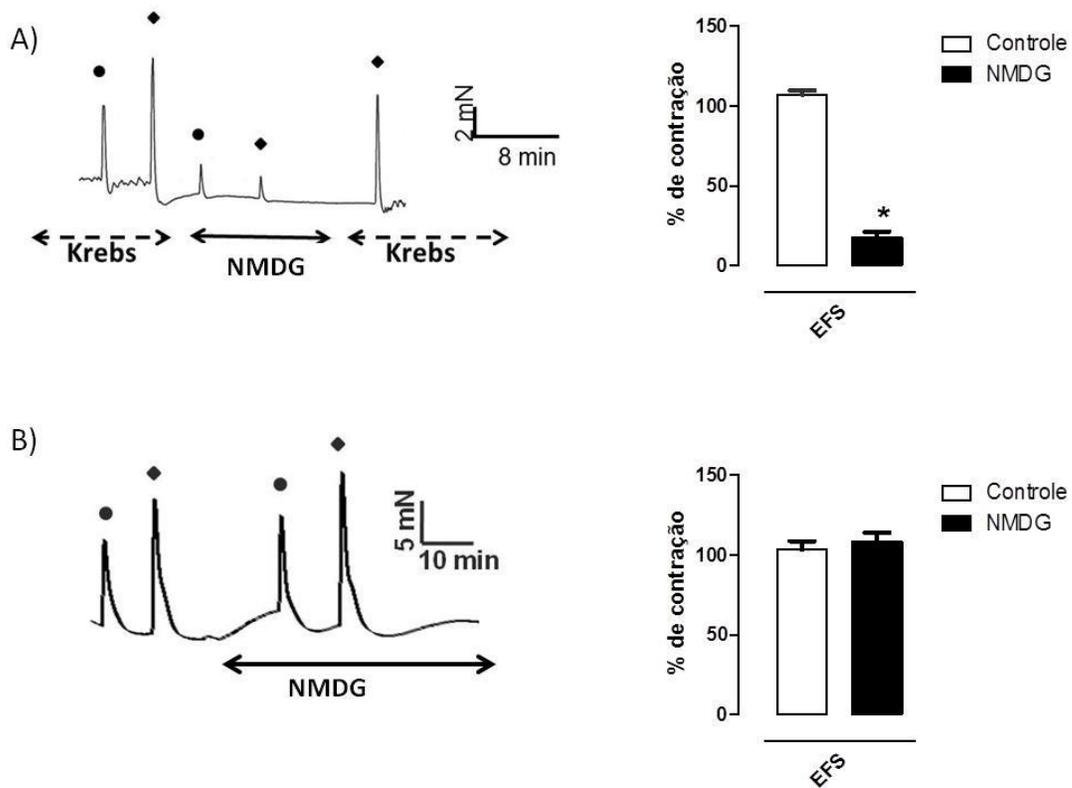


Figura 13. Efeito da substituição equimolar de sódio por N-metil D-glucamina (NMDG) na contração induzida por estimulação elétrica (EFS; •8 e ♦16 Hz) em (A) RbCC e em B) CCC. Os resultados são apresentados em porcentagem em relação ao primeiro estímulo. * $p < 0,05$, $n = 4$.

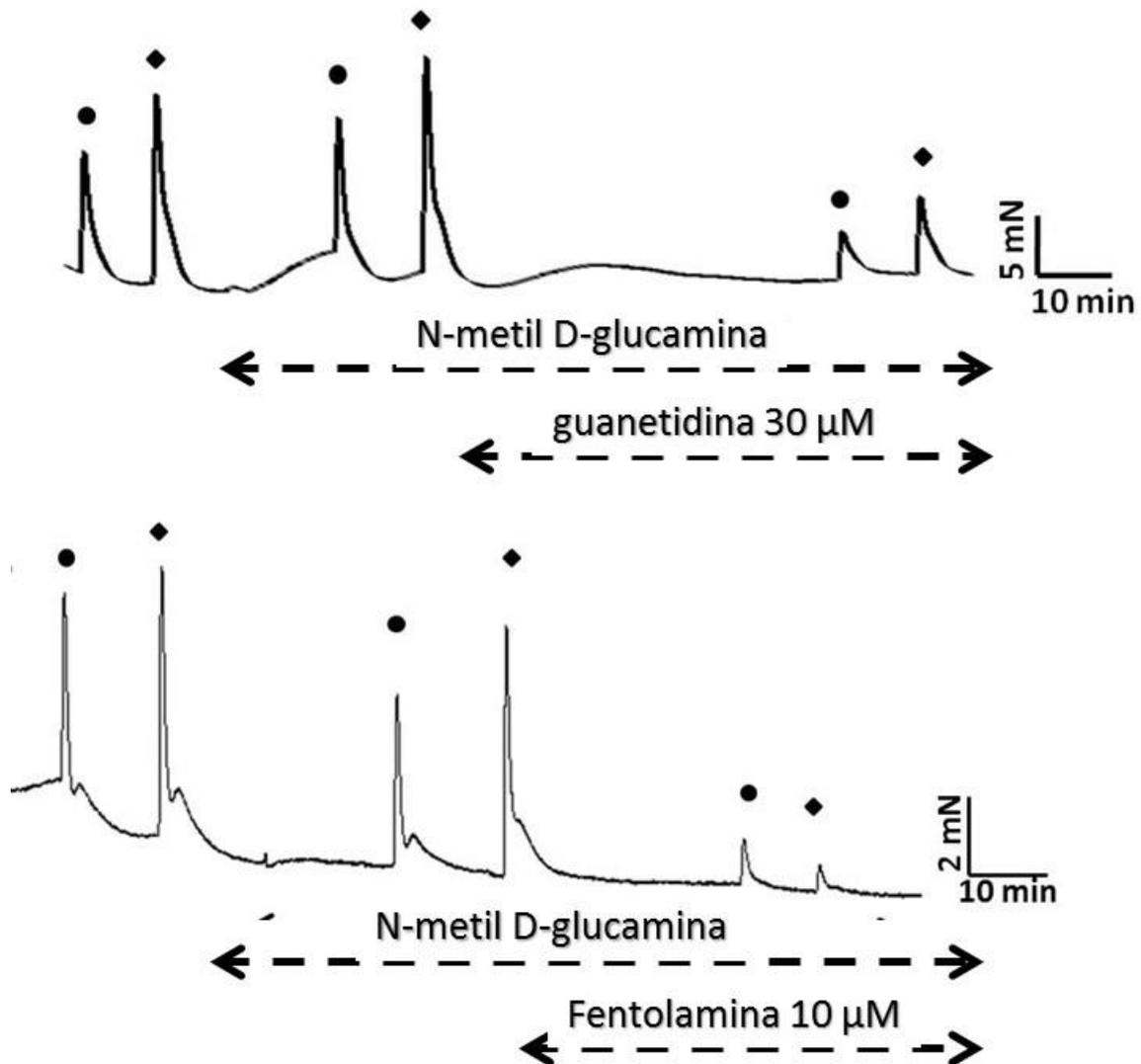
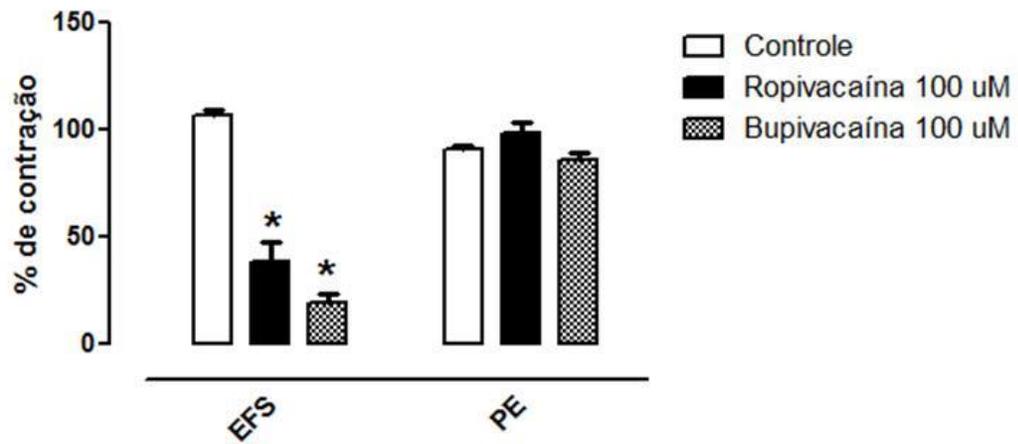


Figura 14. Traçados representativos do efeito da substituição equimolar de NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica (EFS; •8 e ◆16 Hz) na ausência e presença de guanetidina 30 μ M e fentolamina 10 μ M em CCC. Os registros são representativos de 3 experimentos.

5.1.4. Avaliação do efeito dos anestésicos locais na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista alfa-adrenérgico

A tetrodotoxina (TTX) é uma neurotoxina comumente utilizada nos experimentos de estimulação elétrica para avaliar se a resposta é de origem miogênica ou neurogênica. Assim, passamos a utilizar outras ferramentas farmacológicas que, sabidamente, atuam em canais de sódio dependentes de voltagem. Em RbCC, os anestésicos locais ropivacaína e bupivacaína (100 μ M) reduziram a resposta contrátil em, aproximadamente, 66% e 80%, respectivamente (Figura 14A). Por outro lado, a concentração de 10 μ M de ropivacaína e bupivacaína reduziu em 61% e 80%, respectivamente, a contração induzida pela estimulação elétrica em CCC (Figura 14B). Os anestésicos não alteraram a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (PE) 10 μ M, mostrando que a redução observada não é devido a uma ação direta na musculatura lisa (figura 14).

A)



B)

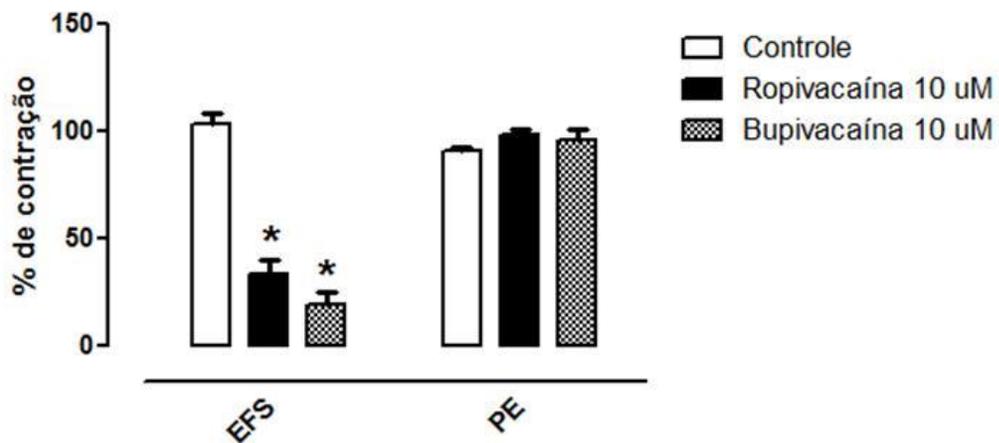


Figura 15. Efeito dos anestésicos locais na contração induzida por estimulação elétrica (8 e 16 Hz) e pela fenilefrina (PE, 10 uM) em A) RbCC e B) CCC. Os resultados foram apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo ou concentração de fenilefrina. n=4, * p<0,05 em comparação ao controle.

5.1.5. Caracterização do efeito da veratridina, um ativador do canal de sódio

A veratridina (10-100 μM), um ativador que atua no sítio 2 dos Nav, causou contração, sendo o efeito máximo atingindo após a concentração de 100 μM tanto em RbCC como em CCC. A fentolamina aboliu a resposta contrátil induzida pela veratridina em ambas espécies (Figura 15A e 15B), porém, tanto a TTX (Figura 16) como a substituição do NaCl pela NMDG (Figura 17) não afetaram a resposta contrátil em CCC, mas sim em RbCC.

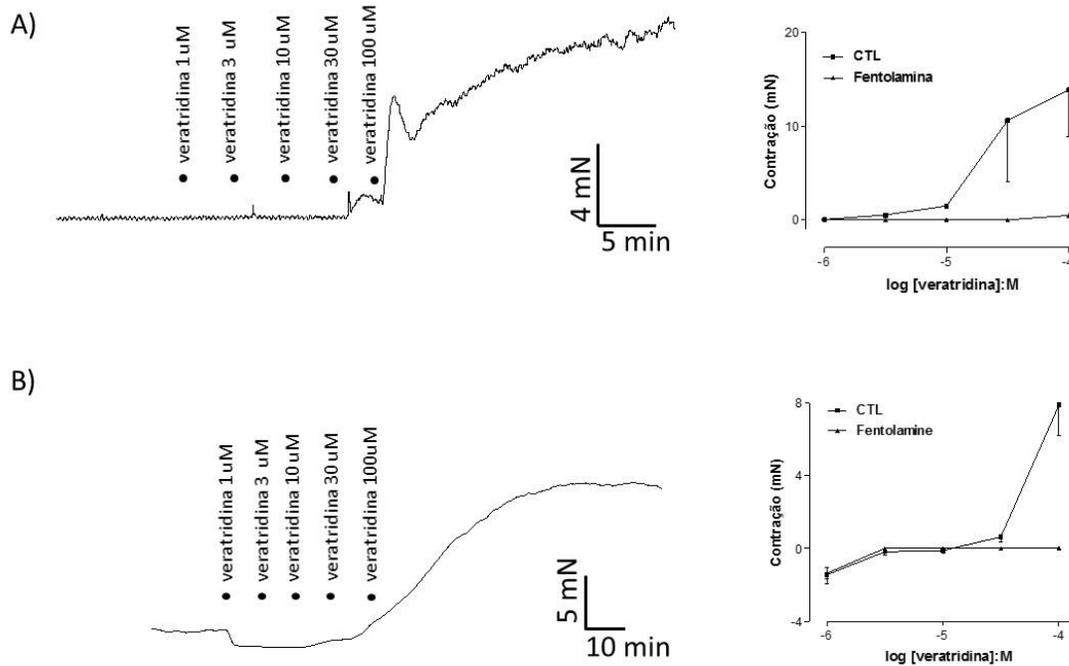


Figura 16. Traçados representativos mostrando o efeito da veratridina no (A) RbCC (n=4) e em (B) CCC na ausência (CTL) e na presença de fentolamina (10 μM). Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM (n=4).

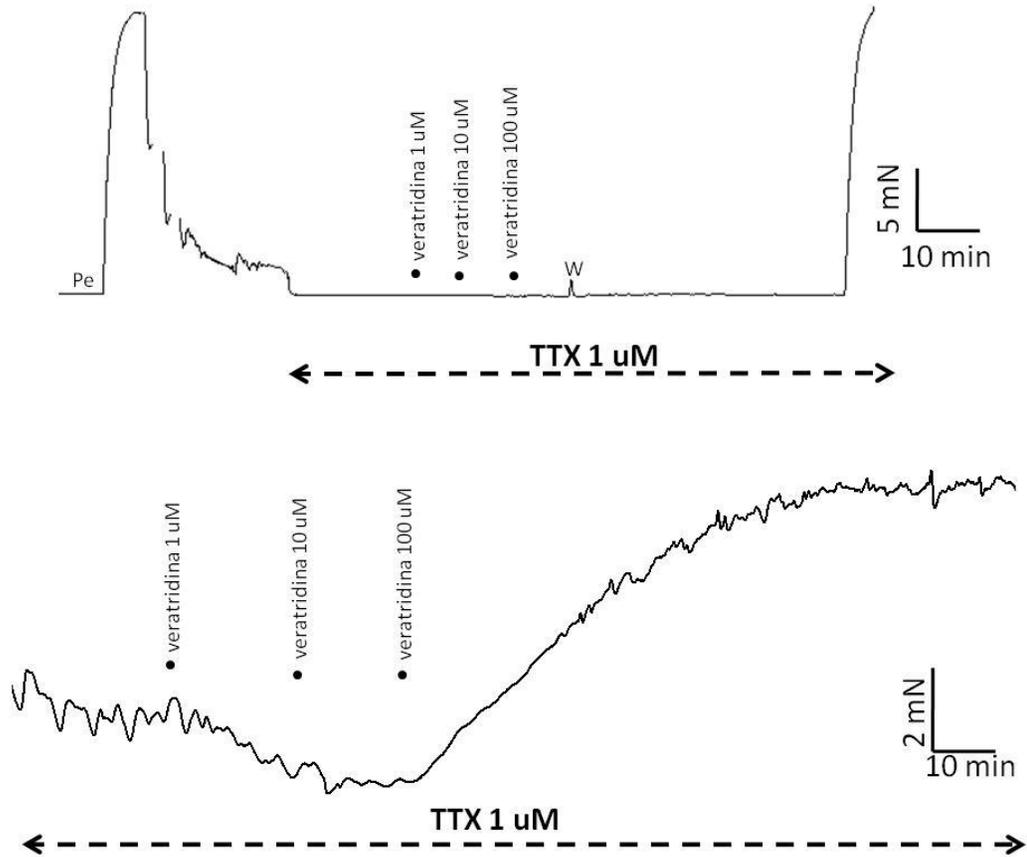


Figura 17. Traçados representativos mostrando o efeito da tetrodotoxina (TTX) na contração induzida por veratridina (1-100 μ M) em (A) corpo cavernoso de coelho (n=3) e em (B) corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* (n=3).

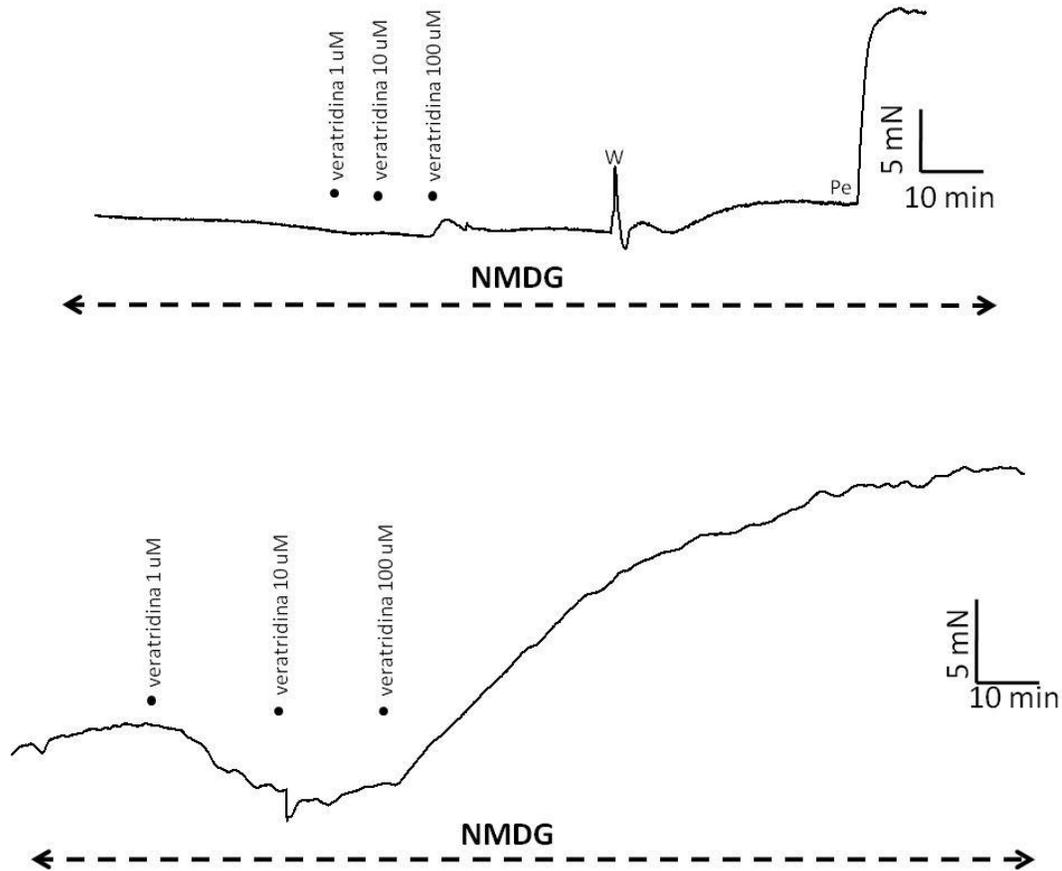


Figura 18. Traçados representativos Efeito da substituição equimolar de cloreto de sódio (NaCl) por N-metil-D-glucamina (NMDG) na contração induzida por veratridina (1-100 μM) em (A) RbCC e em (B) CCC (n=3).

Os anestésicos locais ropivacaína (Figura 18, 100 μM) e bupivacaína (Figura 19, 100 μM) aboliram a resposta contrátil frente a veratridina somente em RbCC. No caso do CCC observamos um deslocamento de cerca de 20 minutos no tempo para atingir a máxima contração.

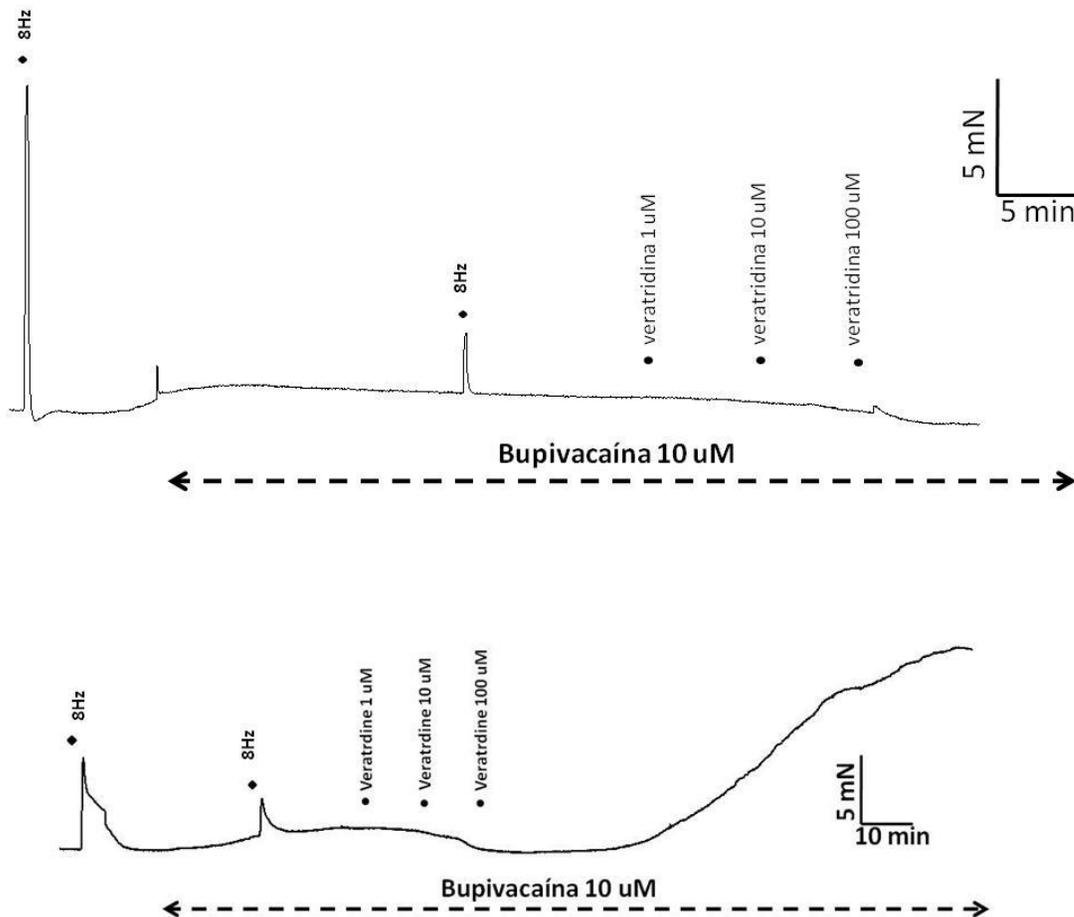


Figura 19. Traçados representativos mostrando o efeito do anestésico bupivacaína na contração induzida por veratridina (1-100 μM) em (A) RbCC e em (B) CCC. (n=3)

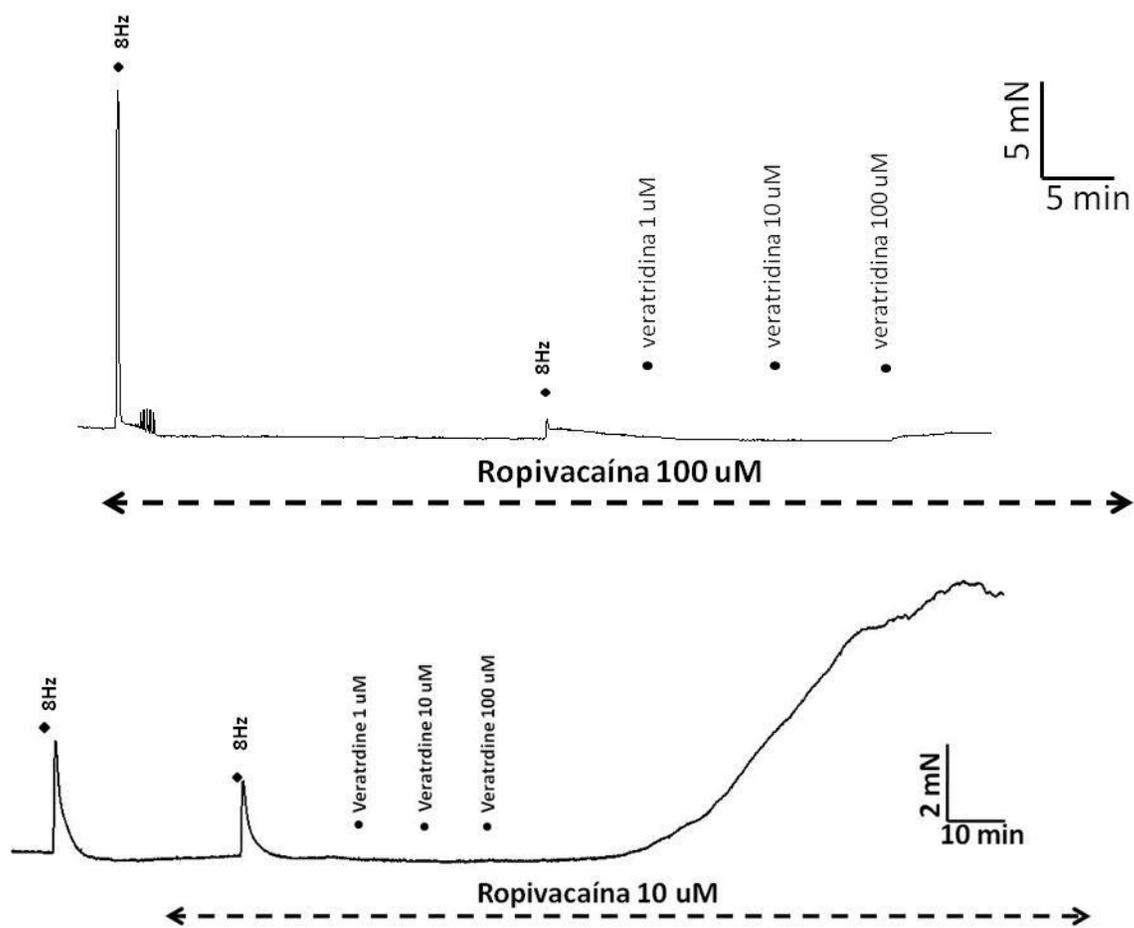


Figura 20. Traçados representativos mostrando o efeito do anestésico ropivacaína na contração induzida por veratridina (1-100 μM) em (A) RbCC (n=3) e em (B) CCC (n=3)

5.1.6. Avaliação do efeito dos bloqueadores do canal de cálcio dependentes de voltagem na contração induzida por estimulação elétrica e na contração induzida pelo ativador do canal de sódio

Os efeitos de bloqueadores do canal de cálcio dependente de voltagem seletivos para diferentes subtipos: ω -conotoxinas MVIIC (CaV 2.1), ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIA (Cav 2.2) e mibefradil (Cav 3.1, CaV 3.2 e CaV 3.3) foram avaliados. A contração induzida pela estimulação elétrica foi significativamente reduzida na presença das ω -conotoxinas GVIA e MVIIA 100 nM (n=4), sem alteração da resposta contrátil à fenilefrina. Os bloqueadores ω -conotoxinas MVIIC 100 nM (n=4) e mibefradil 300 nM (n=4) não alteraram a resposta ao estímulo elétrico e ao agonista (figura 20).

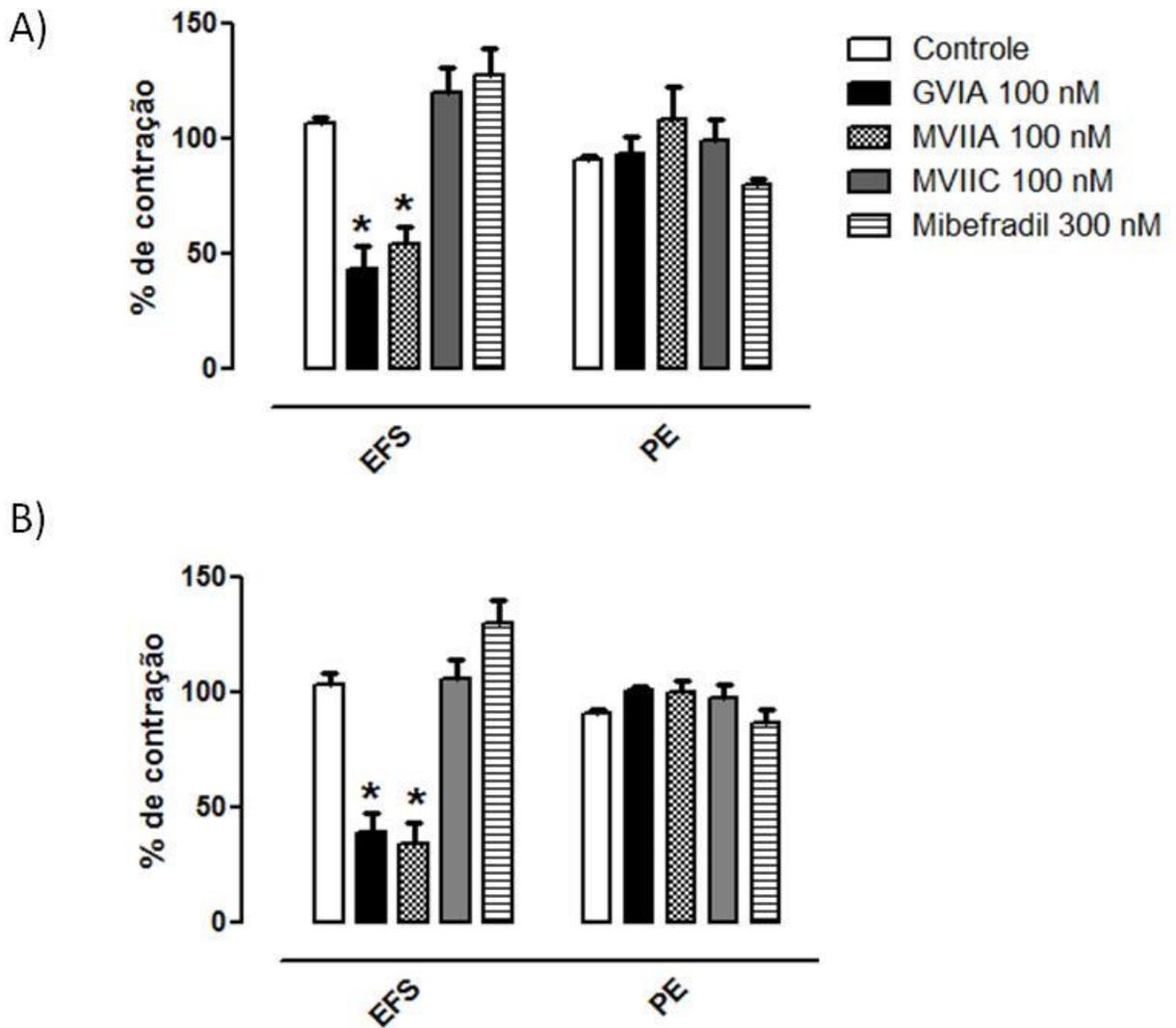


Figura 21. Efeito dos bloqueadores dos canais de cálcio dependentes de voltagem neuronais na contração induzida por estimulação elétrica em (A) RbCC e (B) CCC. Os resultados foram apresentados em % de contração em relação ao primeiro estímulo. N=4, * $p < 0,05$ em comparação ao controle.

Diferentemente do observado com os bloqueadores do canal de sódio, em RbCC, os bloqueadores do canal de cálcio ω -conotoxina GVIA (100 nM) e GVIA MVIIA (100 nM) não aboliram a contração induzida pela veratridina (100 μ M) (Figura 21A e 22A). O mesmo efeito foi observado em CCC. A única diferença observada entre as espécies foi que na cobra houve um deslocamento de tempo de início de contração (semelhante ao observado com a incubação dos bloqueadores de canal de sódio) (Figura 21B e 22B).

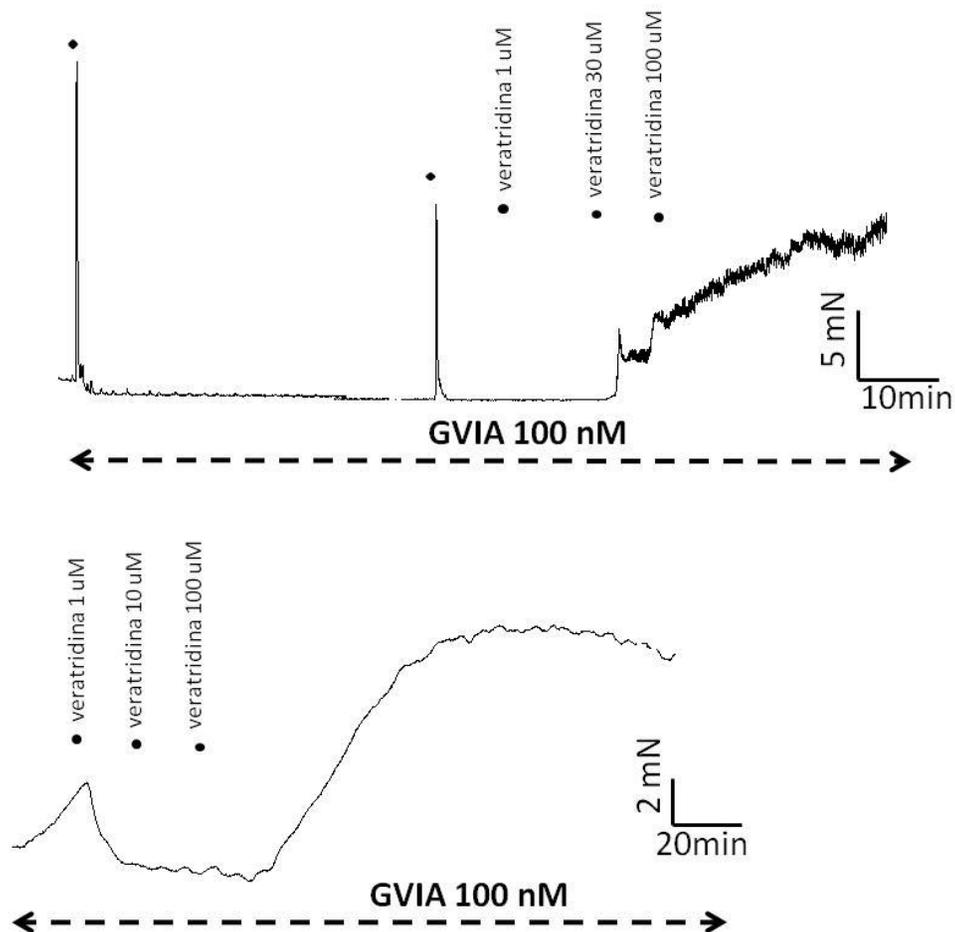


Figura 22. Efeito da ω -conotoxina GVIA na contração induzida por veratridina (1-100 μ M) em (A) RbCC (n=3) e de (B) CCC(n=3). Os registros são representativos de 3 experimentos para cada tecido.

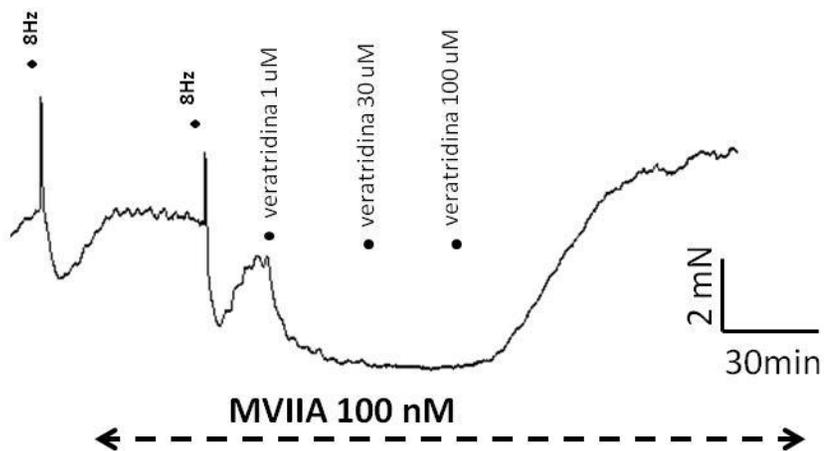
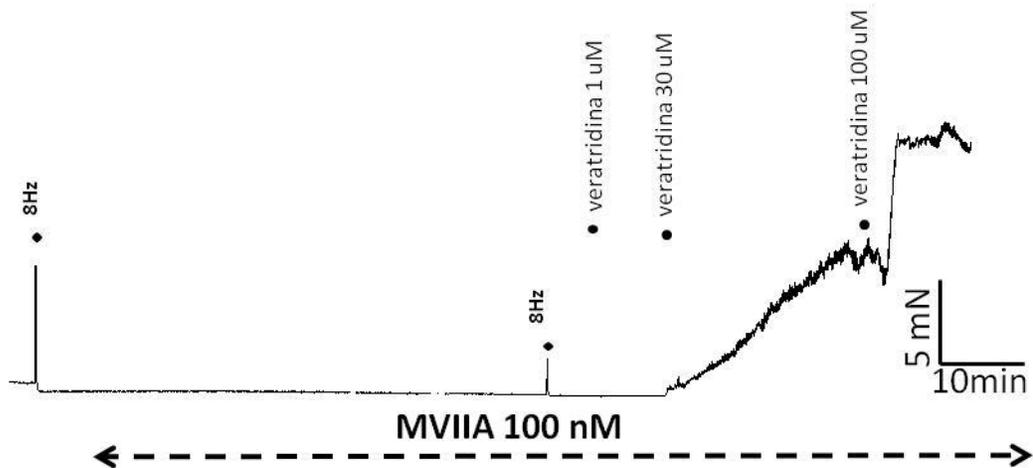


Figura 23. Efeito da ω -conotoxina GVIA na contração induzida por veratridina (1-100 μ M) em (A) RbCC (n=3) e de (B) CCC (n=3). Os registros são representativos de 3 experimentos para cada tecido.

5.2. Dosagem de [³H]-noradrenalina

Após 60 minutos de estabilização, a radioatividade detectada nas tiras de RbCC foi de 253987 ± 17208 DPM ($n=4$). A liberação basal de trício foi de 472 ± 110 DPM/min, o qual permaneceu relativamente constante ao longo do experimento. O estímulo elétrico provocou um aumento na liberação de [³H]-noradrenalina em aproximadamente 4.6 ± 0.5 vezes. O aumento na liberação foi equivalente entre o primeiro (EFS1) e o segundo estímulo elétrico (EFS2) (figura 23). A liberação de [³H]-noradrenalina induzida pelo estímulo elétrico reduziu 68% na presença do bloqueador de canal de sódio TTX 1 μ M ($n=4$). A substituição do NaCl por N-metilglucamina ou a ausência de cálcio extracelular reduziram 59% e 98%, respectivamente, a liberação deste neurotransmissor adrenérgico ($n=4$) (figura 24).

A liberação de [³H]-noradrenalina também foi avaliada no CCC. Após 60 minutos de estabilização, a radioatividade detectada nas tiras de CCC foi de 189788 ± 21326 DPM ($n=5$). A liberação basal de trício foi de 108 ± 112 DPM/min, mas esta não se manteve constante; houve oscilações ao longo do experimento (figura 25). Diferente do observado nos ensaios com RbCC não foi detectado um aumento na liberação de [³H]-noradrenalina após estímulo elétrico no corpo cavernoso da crotalus independente do tempo de estímulo (5, 10 e 30 minutos). Apesar da ausência de aumento de radioatividade, houve um aumento sustentado do tônus da musculatura durante o estímulo elétrico (figura 26).

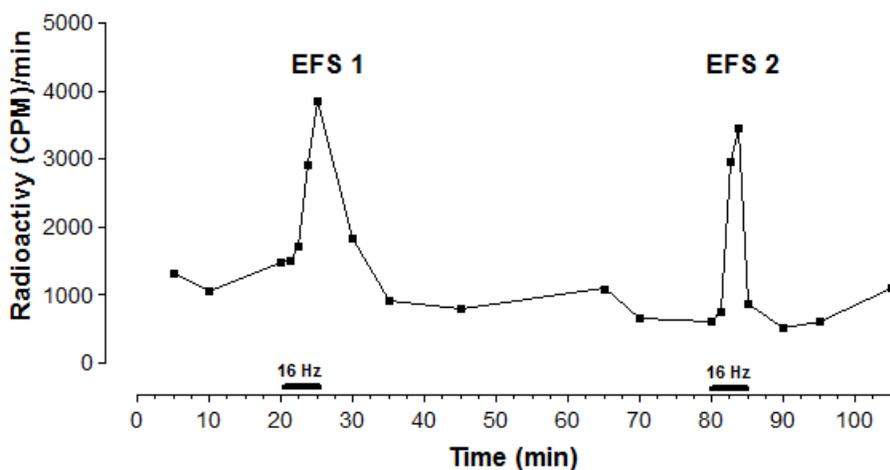


Figura 24. Liberação de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina em CCC. Traçado representativo (n=4) da liberação de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina (cpm/min) induzida por EFS. Este foi um experimento controle para mostrar que a estimulação elétrica induz um aumento no aumento do efluxo de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina.

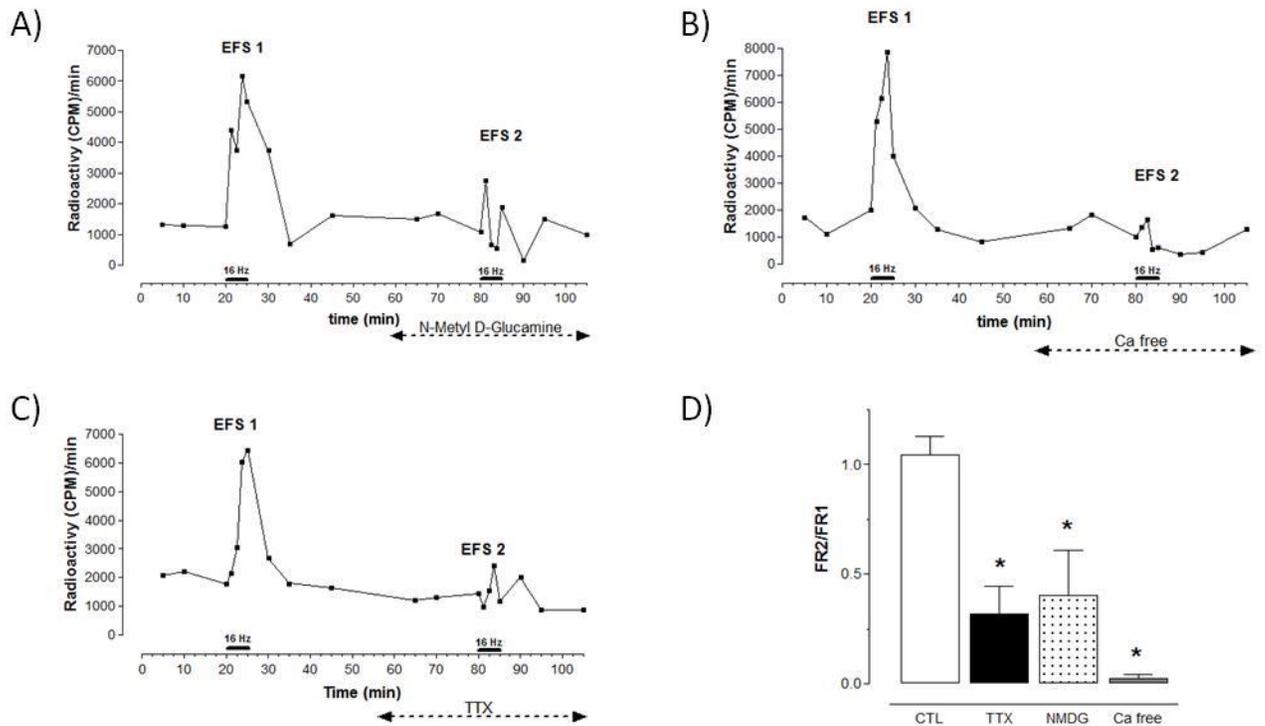


Figura 25. Liberação de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina em RbCC. Traçados representativos da liberação de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina (cpm/min) induzida por EFS antes e após (A, EFS2) substituição equimolar do cloreto de sódio por N-metil D-glucamina (NMDG), (B, EFS2) ausência do CaCl_2 extracelular, e (C, EFS2) na presença de TTX 1 μM . (D) Efeitos da substituição iônica (n=3) e da TTX (1 μM , n=3) na razão da fração de noradrenalina liberada (FR2/FR1) no RbCC. A Fração liberada foi calculada como a porcentagem liberada em relação a quantidade de radioatividade presente no tecido no tempo de coleta. * $p < 0.05$ comparado com o controle.

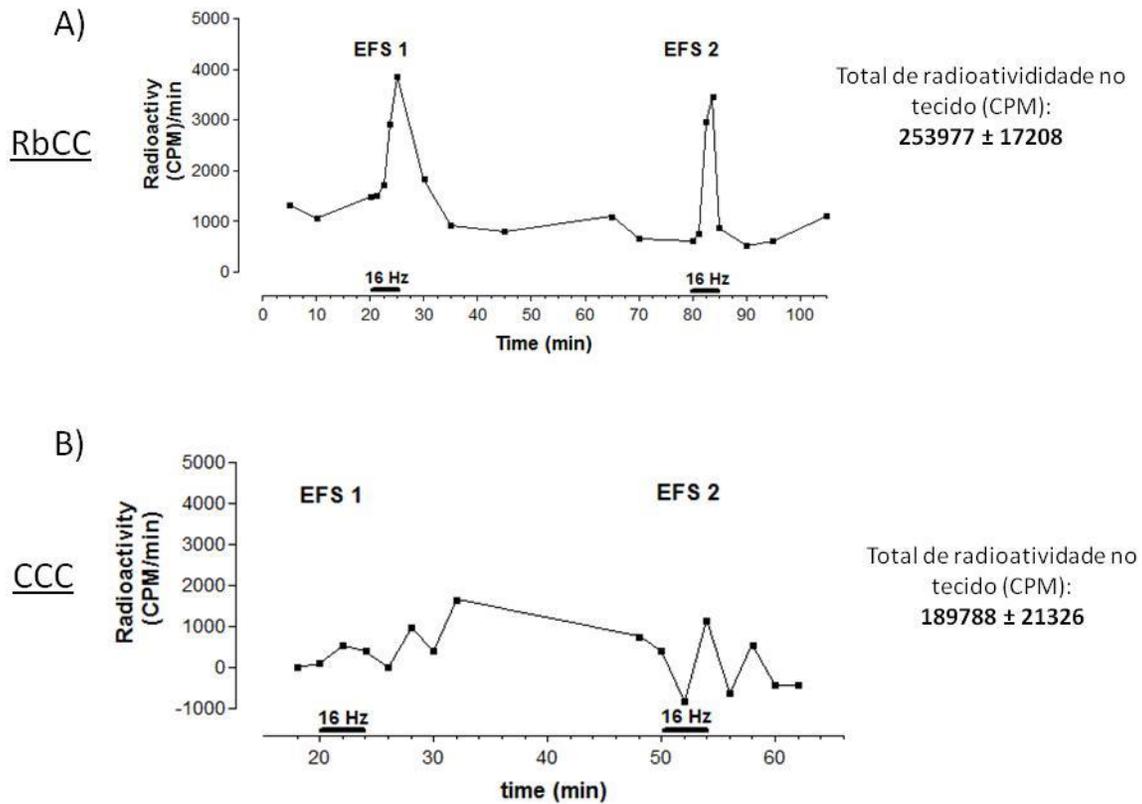


Figura 26. Liberação basal de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina e da induzida pelo primeiro (EFS1) e segundo (EFS2) estímulo elétrico (16 Hz; 4 min) em (A) RbCCe em (B) CCC. O EFS não aumentou a liberação de $[^3\text{H}]$ -noradrenalina no CCC. Este é um traçado representativo de 5 experimentos.

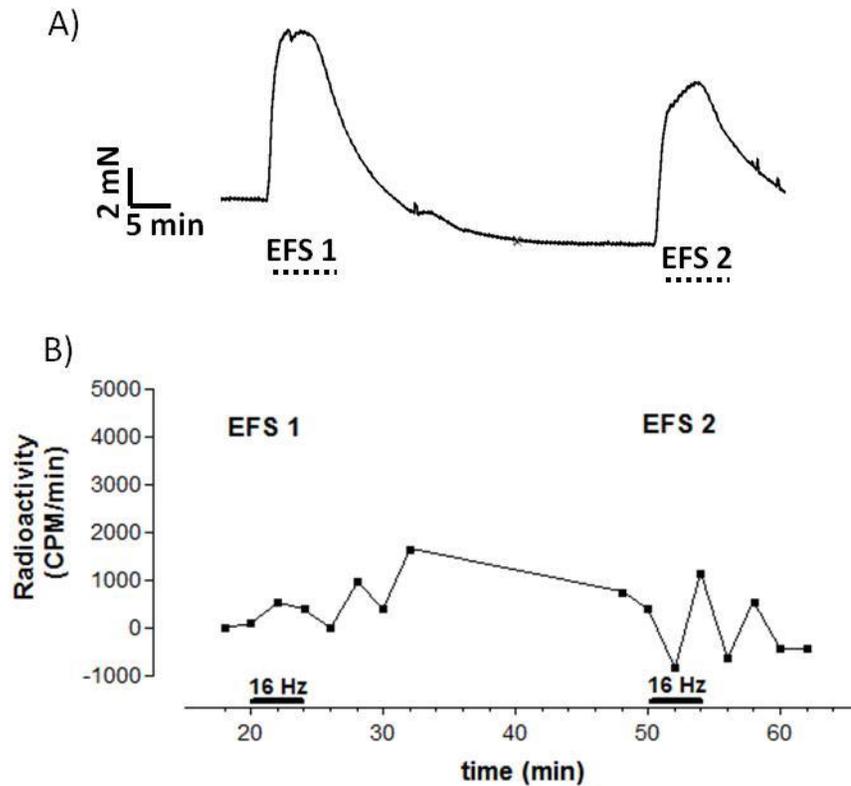


Figura 27. (A) Traçado representativo mostrando o aumento do tônus obtido após os dois períodos de EFS(16 Hz; 4 min) em (CCC). (B) Liberação basal de [³H]-noradrenalina e a liberação induzida pelo primeiro (EFS1) e segundo (EFS2) estímulo elétrico (16 Hz; 4 min) em *Crotalus* (CCC). O EFS não aumentou a liberação de [³H]-noradrenalina no CCC. Estes são traçados representativos de 5 experimentos.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a contração mediada pela estimulação elétrica em corpo cavernoso de *Crotalus durissus terrificus* foi resistente à ação da tetrodoxina e dependente da liberação de catecolaminas. Surpreendentemente, a redução da concentração de íons sódio não interferiu na contração induzida pela estimulação elétrica em CCC, porém, praticamente aboliu em RbCC, sugerindo em um primeiro momento que a neurotransmissão em CCC independe do influxo de sódio.

Em experimentos envolvendo estimulação elétrica de campo, a TTX é comumente utilizada para averiguar se a resposta observada é devido a liberação de substâncias oriundas de fibras nervosas. Se porventura esta toxina não interferir na reatividade da musculatura lisa frente a estimulação elétrica três principais hipóteses podem ser levantadas: 1) estimulação miogênica; 2) liberação de neurotransmissores de estruturas não neurais e 3) presença de canais de sódio na inervação acoplada à musculatura lisa que são resistentes à ação da TTX.

As isoformas NaV 1.5, NaV 1.8 e NaV 1.9 são resistentes a TTX e a saxitoxina. Por resistência entende-se constante de dissociação (Kd) da ordem de “ μM ”. Estas isoformas apresentam em comum o fato de seus genes estarem localizados no cromossomo humano 3p21-24. Outra característica semelhante nestas isoformas é que elas apresentam um aminoácido substituído na alça P do domínio DI (formadora do poro): no sítio 401 é encontrado um aminoácido não aromático. Estudos relacionam esta substituição como a responsável pela menor sensibilidade à TTX (Lee and Ruben, 2008). Como no CCC foi constatado que mesmo em concentrações extremamente elevadas (1 mM) não houve alteração na contração induzida pela estimulação elétrica, parece que a resistência à TTX neste tecido não seja uma questão de sensibilidade. Em mamíferos, não há relatos da participação dos canais de sódio TTX-resistentes na contração da musculatura cavernosa. Estes canais estão expressos na musculatura cardíaca e no gânglio da raiz dorsal, principalmente nos neurônios sensoriais nociceptivos, onde estão sendo estudados como alvos terapêuticos para analgésicos (Silos-Santiago, 2008).

Anteriormente à identificação de canais de sódio TTX-resistentes no corpo cavernoso de cascavel, a presença deste tipo de canal já havia sido identificada em musculatura esquelética de cobras do gênero *Thamnophis*. A presença destes canais foi atribuída a um processo de co-evolução entre o predador (*Thamnophis*) e a sua presa, um anfíbio que apresenta a toxina TTX em sua pele. De acordo com este trabalho, mutações no gene que codifica o Nav 1.4 teriam levado à alteração na afinidade de ligação à TTX (Geffeney et al. 2005). No entanto, esta mesma teoria não pode ser aplicada no presente trabalho, uma vez que em musculatura esquelética da face de *Crotalus* a resposta frente à estimulação elétrica foi sensível à TTX (Capel et al., 2011), além da cascavel não apresentar nenhuma presa que possua esta toxina. Vale ressaltar que a hipótese de co-evolução entre a cobra *Thamnophis* e sua presa foi questionada pelos próprios autores daquele trabalho quando verificaram a presença de espécies que evoluíram para uma resistência extrema à neurotoxina, muito acima da quantidade de toxina presente na presa (Hanifin et al., 2008).

Apesar da duração da contração frente a estimulação elétrica ter sido mais duradoura em CCC do que em RbCC, podemos dizer que ambas respostas foram dependentes da liberação de catecolamina, uma vez que a resposta foi abolida na presença do antagonista alfa-adrenérgico não seletivo ou da guanetidina, substância que causa depleção dos estoques neurais de catecolamina presentes nas vesículas (Villanueva et al., 2003). Trabalho prévio mostrou RNAm para as enzimas tirosina hidroxilase, dopamina descarboxilase, dopamina beta-hidroxilase e feniletanolamina-N-metil-transferase em célula endotelial de aorta de bovino em condições basais e durante o processo de hipóxia houve aumento tanto da expressão quanto da quantidade de catecolamina liberada (Sorriento et al., 2012). Se as catecolaminas oriundas das células endoteliais tem papel importante no controle do tônus vascular, novos experimentos precisam ser realizados. O conhecimento que se tem até o momento é que em vasos isolados de mamífero, como aorta (Nakanishi et al.1998), artéria pulmonar (Duggan et al., 2011) e artéria mesentérica (Keff et al., 1991), dentre outros, a contração frente à estimulação é abolida na presença de TTX e antagonistas alfa-adrenérgicos. Diferentemente do

sistema nervoso colinérgico, em que o papel fisiológico da acetilcolina oriunda de estruturas não neurais já está bem estabelecido, o mesmo não acontece para o sistema nervoso simpático.

Em experimentos de eletrofisiologia com células neurais que expressam canais TTX-resistentes é comum a substituição equimolar dos íons sódio e/ou potássio e/ou cloro e/ou cálcio com o intuito de estudar mais detalhadamente a corrente que predomina. A N-metil-D-glucamina (NMDG) ou bicarbonato de colina são comumente utilizados como substitutos do NaCl e NaHCO₃, respectivamente (Blair & Bean, 2002). Em um primeiro momento tentamos substituir todo o sódio do líquido Krebs, porém, com este manejo observávamos um aumento da tensão basal do CCC e RbCC, dificultando assim a realização dos experimentos funcionais. Assim, os experimentos funcionais passaram a ser realizados substituindo somente o NaCl por NMDG. Em RbCC a contração induzida pela estimulação elétrica foi abolida após substituição pelo NMDG, confirmando a importância do influxo de sódio para a liberação dos neurotransmissores de estruturas neurais acopladas à musculatura lisa cavernosa de mamíferos. Entretanto, em CCC nenhum efeito na resposta contrátil frente a estimulação elétrica foi observado após esta substituição, mostrando que a liberação de catecolamina independe do influxo de sódio. A partir de então duas outras hipóteses foram aventadas: 1) estariam presentes os canais de sódio nas estruturas do hemipênis? 2) estaríamos trabalhando com uma inervação dependente somente do influxo de cálcio?

Assim, passamos a utilizar outras ferramentas farmacológicas que atuam nos canais de sódio dependentes de voltagem, porém em sítios distintos ao da TTX e saxitoxina. Os anestésicos locais atuam de maneira mais eficaz quando o canal de sódio encontra-se no estado ativo ou inativo, mas não quando no estado em repouso, diminuindo assim a probabilidade de abertura do mesmo e, portanto, o influxo de sódio (Guo et al., 1991; Catterall, 2012). Tanto a ropivacaína como a bupivacaína reduziram significativamente a contração induzida pela estimulação elétrica, mas não pela fenilefrina em RbCC e CCC. Outro indicativo da presença dos canais de sódio no hemipênis foi o efeito contrátil da veratridina.

A veratridina é um alcalóide e uma neurotoxina proveniente de plantas do gênero *Liliaceae*, que se liga no sítio 2 do NaV. Os ligantes do sítio 2 são conhecidos como ativadores fazendo com que o canal permaneça mais tempo no seu estado ativo. Diversas propriedades são alteradas após a ligação ao sítio 2: (i) a dependência de voltagem na ativação é deslocada para um potencial mais negativo causando uma abertura em potenciais de repouso; (ii) a inativação é retardada ou inibida (iii) a condutância do sódio é reduzida; (iv) a seletividade iônica é alterada devido a uma diminuição na discriminação na permeabilidade iônica (Tytgat et al., 2011).

Em RbCC, a veratridina causou relaxamento sustentado em tecido pré-contráido com fenilefrina sendo este efeito abolido na presença de L-NAME ou TTX (Oliveira et al., 2003), enquanto que em aorta de rato a contração à veratridina foi devido a liberação de catecolaminas (Shinjoh et al., 1991). Apesar de alguns trabalhos mostrarem a presença dos canais de sódio dependentes de voltagem em músculo liso de mamífero, bem como sua participação na contração destes tecidos (Fort et al., 2009) o efeito contrátil da veratridina em RbCC foi devido, essencialmente, à ativação dos canais de sódio sensíveis à TTX presentes nos terminais simpáticos, uma vez que a fentolamina, TTX, anestésicos locais e menor concentração de sódio aboliram a resposta da veratridina em RbCC. Em CCC, a contração da fenilefrina foi abolida na presença de fentolamina e “retardada” na presença dos anestésicos locais, uma vez que o tempo para atingir a contração máxima foi significativamente maior em relação ao RbCC. Entretanto é importante reiterar que a concentração final dos anestésicos locais utilizada em CCC foi 10 vezes menor em relação aos protocolos do RbCC.

Em experimentos de eletrofisiologia com gânglio supraesofágico do crustáceo craca foi observado tanto corrente para cálcio e sódio em solução salina. Na presença de TTX (300 nM), tetraetilamônio e ausência de sódio o potencial de ação não foi alterado, sendo este efeito aumentado com concentrações crescentes de cálcio (1-20 mM) e abolido na ausência de cálcio e presença de cátions divalentes, que, apesar de inespecíficos para os diferentes subtipos de canais de cálcio, são ferramentas comumente utilizadas para bloquear

as correntes de cálcio. Estes achados levaram os autores a sugerirem que existe alta densidade de canais de cálcio no axônio desta espécie (Stockbridge & Ross, 1986). Assim, uma vez que na presença de concentrações elevadas de TTX (1 mM) e após substituição de NaCl por NMDG nenhuma alteração na resposta contrátil foi observada em CCC, estaríamos então trabalhando com uma inervação que dependesse prioritariamente do influxo de cálcio?

Os canais de cálcio Cav 2.1, Cav 2.2 e Cav 2.3 são expressos exclusivamente em neurônios, sendo os Cav 2.2 considerados os mais importantes na liberação de neurotransmissores acoplados à musculatura lisa, esquelética e cardíaca (Wright and Angus, 1996). Nossos resultados indicam que a neurotransmissão em CCC e RbCC, é dependente do influxo de cálcio devido principalmente os canais de cálcio do subtipo Cav 2.2, uma vez que na presença das ω -conotoxinas GVIA 100 nM ou MVIIA houve uma redução de, aproximadamente, 50 % da resposta contrátil à estimulação elétrica. Os subtipos Cav 2.1 e Cav 3.1, Cav 3.2 e Cav 3.3 parecem ter pouca importância na neurotransmissão adrenérgica deste tecido, já que a contração induzida por estímulo elétrico não foi alterada por drogas que bloqueiam seletivamente estes subtipos de canais.

A substituição dos íons cálcio por magnésio ou bário, como comumente ocorre em experimentos de eletrofisiologia, seria uma alternativa para avaliarmos o efeito da retirada do cálcio na contração frente à estimulação. Entretanto, não é possível com este manejo inferir sobre o papel do influxo de cálcio na neurotransmissão avaliando a contração do músculo liso, pois, nestas condições, não ocorrerá contração. Desta forma, uma alternativa para estudar a participação do influxo de cálcio na neurotransmissão, usando condições livres de cálcio, é avaliar a liberação de catecolaminas. A quantificação das catecolaminas pode ser obtida através da detecção de radiação beta de preparações pré-incubadas com [³H]-catecolaminas. Com este método é possível estudar, isoladamente, os efeitos pré-sinápticos de drogas e de substituições iônicas em tecidos periféricos. Baseado no método descrito por Nap et al (2002), padronizou-se uma metodologia usando o corpo cavernoso de coelho pré-incubado com [³H]-noradrenalina. Neste

tecido, foi visto que nas seguintes condições: presença do bloqueador do canal de sódio (TTX 1 μM), utilizando solução em que o NaCl foi substituído por NMDG, e na ausência de Ca^{+2} ; houve uma redução significativa na fração de [^3H]-noradrenalina liberada após o estímulo elétrico. Estes resultados indicam a participação do influxo de sódio e de cálcio na neurotransmissão adrenérgica no RbCC. Entretanto, em CCC não foi possível detectar nenhum aumento de radioatividade na solução de Krebs durante o período de estimulação elétrica do tecido, apesar do tecido estar funcionalmente ativo. Além disso, foi possível detectar radioatividade no tecido, indicando que houve incorporação de [^3H]-noradrenalina pelo corpo cavernoso da cascavel durante a pré-incubação. A ausência de resposta em CCC pode ser devido a uma baixa sensibilidade do método ou liberação de outras catecolaminas, como dopamina e adrenalina.

Estudos de imunohistoquímica para as enzimas que compõe a via adrenérgica, para os canais de sódio e cálcio bem como co-localização destes canais com as enzimas estão sendo realizados em RbCC e CCC. Estudos de transcriptoma das bibliotecas do cérebro, aorta e hemipenis da cobra estão sendo realizados paralelamente para avaliarmos o grau de similaridade do cDNA destas enzimas e canais com sequências previamente depositadas em banco de dados.

7. CONCLUSÃO

Resumo dos resultados

- A contração induzida pela estimulação elétrica em CCC foi devido à liberação de catecolaminas.
- A contração induzida pela estimulação elétrica em CCC não foi alterada após redução da concentração de íons sódio, porém, foi abolida em RbCC.
- A veratridina contraiu o CCC e o RbCC devido à liberação de catecolaminas, porém, na primeira espécie a redução da concentração de sódio não interferiu na resposta contrátil.
- Na presença de bupivacaína e ropivacaína a contração induzida pela estimulação elétrica foi significativamente reduzida em CCC e de RbCC.
 - Na presença dos bloqueadores dos canais de cálcio neuronais do subtipo 2.2 houve uma redução significativa da amplitude de contração mediada pela estimulação elétrica em CCC e RbCC.

Conclusão: Nossos dados sugerem que a liberação de catecolaminas independe do influxo de sódio, porém, isto não significa que não existam canais de sódio nas estruturas neurais do hemipenis, uma vez que ferramentas seletivas para estes canais interferiram positiva ou negativamente na reatividade da musculatura cavernosa. Por outro lado, fica clara a importância do influxo de cálcio na liberação das catecolaminas, uma vez que os canais do subtipo 2.2 estão expressos exclusivamente em estruturas neurais.

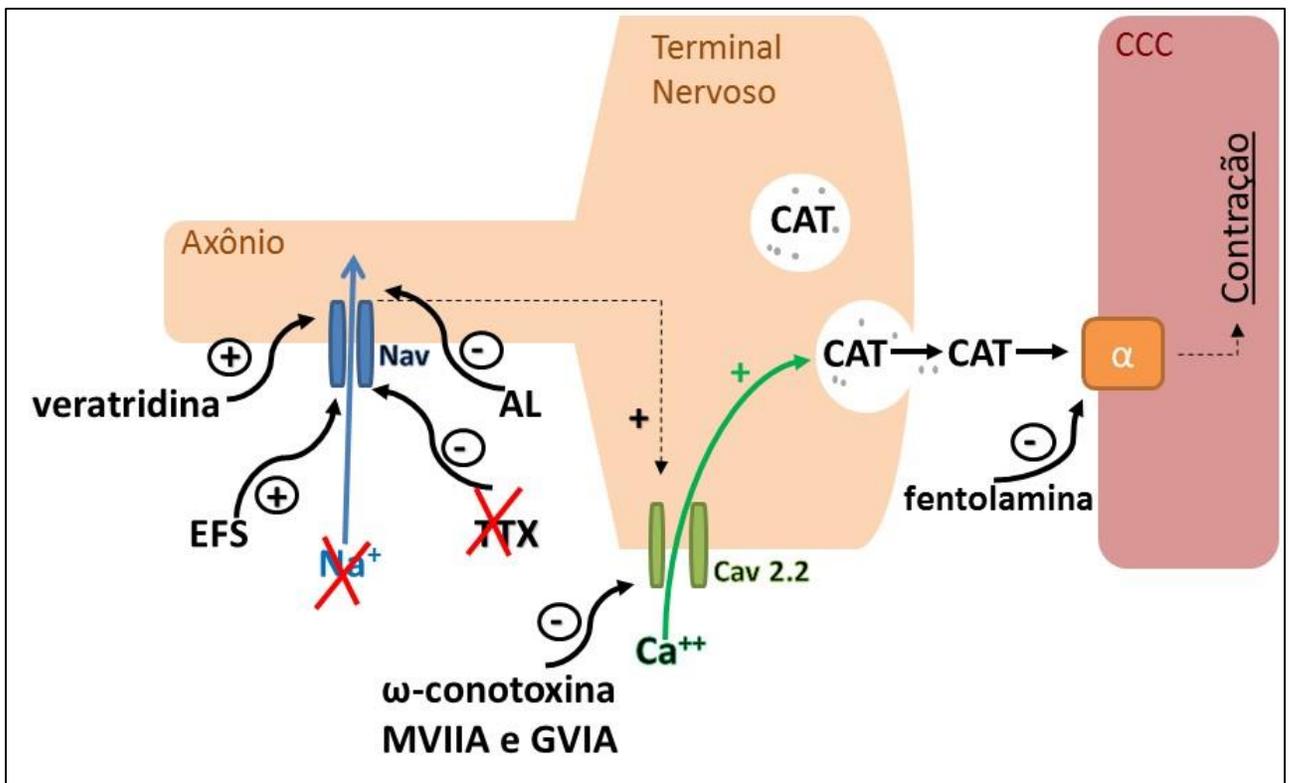


Figura 28. Esquema ilustrativo mostrando os mecanismos pré-sinápticos presente em corpo cavernoso de *Crotalus*. AL: anestésicos locais; CAT: catecolaminas; EFS: estímulo elétrico; TTX: tetrodotoxina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blair NT, Bean BP. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci.* 22,10277-90, 2002

Capel RO, Mónica FZ, Porto M, Barillas S, Muscará MN, Teixeira SA, Arruda AM, Pissinatti L, Pissinatti A, Schenka AA, Antunes E, Nahoum C, Cogo JC, de Oliveira MA, De Nucci G. Role of a novel tetrodotoxin-resistant sodium channel in the nitrenergic relaxation of corpus cavernosum from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *J Sex Med.* 8(6),1616-25, 2011.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4), 397-409, 2005.

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 26(1),13-25, 2000.

Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*3:a003947, 2011.

Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* 590, 2577–2589, 2012.

Catterall WA, Leal K, Nanou E. Calcium Channels and Short-term Synaptic Plasticity. *J Biol Chem.* 288(15),10742-9, 2013.

Chahine M, Ziane R, Vijayaragavan K, Okamura Y. Regulation of Na^v channels in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci.* 26(10),496-502, 2005.

Dowling GD, Savage JM. A guide to the snake hemipenis: A survey of basic structure and systematic characteristics. *Zoologica.* 45, 17-8, 1960.

Duggan DJ, Bieger D, Tabrizchi R. Neurogenic responses in rat and porcine large pulmonary arteries. *Pulm Circ.* 1,419-24, 2011

Edgren RA. Copulatory adjustment in snakes and its evolutionary implications. *Copeia* 162-4, 1953.

Fort A, Cordaillat M, Thollon C, Salazar G, Mechaly I, Villeneuve N, Vilaine JP, Richard S, Virsolvy A. New insights in the contribution of voltage-gated Na(v) channels to rat aorta contraction. *PLoS One*. 4(10):e7360, 2009.

Geffeney SL, Fujimoto E, Brodie ED 3rd, Brodie ED Jr, Ruben PC. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. *Nature*. 434, 759-63, 2005.

Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*. 63, 871-94, 2001.

Guo XT, Castle NA, Chernoff DM, Strichartz GR. Comparative inhibition of voltage-gated cation channels by local anesthetics. *Ann N Y Acad Sci*. 625,181-99, 1991.

Hammerson GA. Observation on reproduction, courtship, and aggressive-behavior of striped racer, *masticophis-lateralis-euryxanthus* (reptilia, serpents, colubridae). *J Herpetol*. 12, 253-5, 1978.

Hanifin CT, Brodie ED, Brodie ED. Phenotypic mismatches reveal escape from arms-race coevolution. *PLoS Biol*. 6(3):e60. doi: 10.1371/journal.pbio.0060060, 2008.

Keef KD, Hottenstein OD, Meehan AG, Anthony TL, Kreulen DL. Comparison of neurotransmission with nerve trunk and transmural field stimulation in guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol*. 441,367-83, 1991.

Kupchik YM, Barchad-Avitzur O, Wess J, Ben-Chaim Y, Parnas I, Parnas H. A novel fast mechanism for GPCR-mediated signal transduction--control of neurotransmitter release. *J Cell Biol*. 192(1),137-51, 2011.

Kupchik YM, Rashkovan G, Ohana L, Keren-Raifman T, Dascal N, Parnas H, Parnas I. Molecular mechanisms that control initiation and termination of physiological depolarization-evoked transmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(11), 4435-40, 2008.

Lee CH, Ruben PC. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels*. 2, 407-12, 2008.

Leffler A, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Cummins TR. Pharmacological properties of neuronal TTX-resistant sodium channels and the role of a critical serine pore residue. *Pflugers Arch*. 451(3), 454-63, 2005.

Mónica FZ, Rojas-Moscoso J, Porto M, Schenka AA, Antunes E, Cogo JC, De Nucci G. Immunohistochemical and functional characterization of nitric oxide signaling pathway in isolated aorta from *Crotalus durissus terrificus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 155, 433-9, 2012.

Nakanishi H, Matsuoka I, Ono T, Nakahata N. Contribution of endothelium in contractile response of isolated rabbit aortic preparation to electrical field stimulation *Fukushima J Med Sci*. 44, 23-33, 1998.

Nap A, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Characterisation of a modified approach to the study of sympathetic neurotransmission and its presynaptic modulation in the isolated rabbit thoracic aorta. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 46, 145-51, 2002.

Oliveira JF, Teixeira CE, Arantes EC, DeNucci G, Antunes E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Urology* 62, 581-8, 2003.

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu. Rev. Biochem*. 63, 823-67, 1994.

Parnas I, Parnas H. Control of neurotransmitter release: From Ca²⁺ to voltage dependent G-protein coupled receptors. *Pflugers Arch.* , 460(6),975-90, 2010.

Patino GA, Isom LL. Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel β subunits in development and disease. *Neurosci Lett.* 486(2),53-9, 2010.

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature.* 475(7356), 353-8, 2011.

Porto M, de Oliveira MA, Pissinatti L, Rodrigues RL, Rojas-Moscoso JA, Cogo JC, Metze K, Antunes E, Nahoum C, Mónica FZ, De Nucci G. The Evolutionary Implications of Hemipenial Morphology of Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *PLoS One.* 8(6):e66903, 2013.

Roy ML, Narahashi T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 12(6), 2104-11, 1992.

Shinjoh M, Nakaki T, Otsuka Y, Sasakawa N, Kato R. Vascular smooth muscle contraction induced by Na⁺ channel activators, veratridine and batrachotoxin. *Eur J Pharmacol* 205, 199–202, 1991.

Silos-Santiago I. The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels in pain states: are they the next target for analgesic drugs? *Curr Opin Investig Drugs.* 9(1):83-9, 2008.

Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension.* 60(1):129-36, 2012.

Stockbridge LL, Ross WN. A TTX-resistant propagating calcium action potential. *J Neurophysiol.* 56, 1669-79, 1986.

Südhof TC. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(1):a011353, 2012.

Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Südhof TC. A Complexin/Synaptotagmin-1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell.* 126, 1175–1187, 2006.

Tytgat J, Stevens M, Peigneur S. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol.* 2, 71, 2011.

Villanueva I, Piñón M, Quevedo-Corona L, Martínez-Olivares R, Racotta R. Epinephrine and dopamine colocalization with norepinephrine in various peripheral tissues: guanethidine effects. *Life Sci.* 73(1645-53, 2003.

Wright CE, Angus JA. Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channel antagonists on mammalian peripheral neurotransmission. *Br J Pharmacol.* 119, 49-56, 1996.

Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4(3), 207, 2003.

Fort A, Cordailat M, Thollon C, Salazar G, Mechaly I, Villeneuve N, Vilaine JP, Richard S, Virsolvy A. New insights in the contribution of voltage-gated Na(v) channels to rat aorta contraction. *PLoS One*, 4(10):e7360, 2009.

Ho WS, Davis AJ, Chadha PS, Greenwood IA. Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304(8), 739-47, 2013.

Meguro K, Iida H, Takano H, Morita T, Sata M, Nagai R, Nakajima T. Function and role of voltage-gated sodium channel NaV1.7 expressed in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296(1), 211-9, 2009.

Andrikopoulos P, Fraser SP, Patterson L, Ahmad Z, Burcu H, Ottaviani D, Diss JK, Box C, Eccles SA, Djamgoz MB. Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺

Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Biol Chem.* 286(19),16846-60, 2011.