

EFFECTO DEL VENENO DE *Latrodectus mactans* EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y EN EL COMPORTAMIENTO SEXUAL EN *Oryctolagus cuniculus*

Effect of *Latrodectus mactans* venom in plasma nitric oxide levels and sexual behavior in *Oryctolagus cuniculus*

Huari Marín Gloria¹*, Jiménez Rodríguez Yhen¹, Julca Majo Alan¹, López Díaz Sandra¹, Llipo Miñano Andy¹, Mendoza Sicche Juan¹, Luis Reyna Martín¹, Becerra Urquiza Andrea¹, Guzmán Ruiz Liliana¹, Silva Correa Carmen².

Recibido: 01 de junio del 2014; Aceptado: 30 de junio del 2014

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del veneno de *Latrodectus mactans* en los niveles plasmáticos de óxido nítrico y el comportamiento sexual de *Oryctolagus cuniculus*. **Material y método:** Se capturaron 10 especímenes de *Latrodectus mactans* en las inmediaciones del campus de la Universidad Nacional de Trujillo en lugares secos, abrigados y oscuros. Se adquirieron 7 especímenes machos y 7 hembras de *Oryctolagus cuniculus* a los que se inyectó 0.1 mL de veneno de araña. Se determinaron los niveles de óxido nítrico (NO) indirectamente por la conversión en nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) que son los principales productos de degradación del NO, por el método de Método de Griess. Se evaluó el comportamiento sexual teniendo en cuenta los siguientes parámetros: frecuencia de monta, frecuencia de intromisiones, latencia de monta, latencia de intromisiones y latencia post eyaculatoria. **Resultados:** Se observó que los niveles de NO aumentaron en promedio a $7.75 \mu\text{mol/ml}$ con la administración de 0.1 ml del homogenizado de veneno de *Latrodectus mactans* ($p < 0.05$) comparados con la administración de 0.1 mL de Solución Salina Fisiológica (grupo blanco) que aumentó a $4.06 \mu\text{mol/ml}$ en promedio ($p < 0.05$). En el comportamiento sexual se observó un aumento en la frecuencia de monta, frecuencia de intromisiones y disminución en la latencia de intromisiones y latencia post eyaculatoria ($p < 0.05$). **Conclusiones:** El veneno de *Latrodectus mactans* eleva en forma significativa los niveles plasmáticos de óxido nítrico en *Oryctolagus cuniculus*, además estimula el comportamiento sexual de dichos especímenes.

Palabras clave: *Latrodectus mactans*, Óxido nítrico, comportamiento sexual.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of *Latrodectus mactans* venom in plasma levels of nitric oxide and the sexual behavior of *Oryctolagus cuniculus*. **Methods:** 10 specimens of *L. mactans* were caught near the campus of the National University of Trujillo from dry, warm and dark places. Seven male and seven female specimens of *Oryctolagus cuniculus* were purchased. The levels of nitric oxide (NO) was determined indirectly (Griess method) by conversion to nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) which are the main products of degradation of NO. Sexual behavior was evaluated through of parameters as mount frequency, intromission frequency, mount latency, intromission latency and post-ejaculatory latency. **Results:** Nitric oxide levels increased an average of $7.75 \mu\text{mol/ml}$ with administration of 0.1 ml of homogenized venom from *Latrodectus mactans* ($p < 0.05$) compared with administration of 0.1 mL of physiologic sodium chloride (white group) in which levels of nitric oxide increased only at $4.06 \mu\text{mol/ml}$ on average ($p <$

¹ Estudiantes y ²docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

*Autor para correspondencia: gamanda11@hotmail.com

0.05). Sexual behavior showed increase in frequency of mounts, intromission frequency and decrease in intromission latency and post ejaculatory latency ($p < 0.05$). **Conclusions:** *Latrodectus mactans* venom significantly elevated plasma levels of nitric oxide in *Oryctolagus cuniculus*, also stimulated sexual behavior of the specimen in study.

Key words: *Latrodectus mactans*, nitric oxide, sexual behavior.

INTRODUCCIÓN

La disfunción eréctil (DE) es un problema de salud de alta prevalencia y tiene una importante repercusión en la vida del varón afectado como en la de su pareja. Estudios epidemiológicos transversales de todo el mundo revelan que el 30% y 50% de los hombres de 40 a 70 años reportan algún grado de DE. Cerca de 150 millones de hombres en todo el mundo no son capaces de lograr y mantener una erección adecuada para una relación sexual satisfactoria. Los factores de riesgo incluyen la edad, el tabaquismo, la obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades cardíacas, ansiedad, y depresión^{1,2}.

La mayoría de casos se cree que es multifactorial y secundaria a alguna enfermedad, estrés, trauma (lesión de la médula espinal, cirugía pélvica y de próstata), o de efectos adversos de drogas, lo que puede interferir con la coordinación psicológica, neurológica (daño en los nervios del pene o del área pelviana), endocrino (disminución de la testosterona), vascular (incapacidad de los vasos sanguíneos para almacenar sangre) y muscular^{3,4}.

Una alteración en la relajación del músculo liso del tejido esponjoso puede ser causada, en parte, por el óxido nítrico (NO) insuficiente en el nervio del pene como consecuencia de una pérdida de terminaciones nerviosas nitrérgicas del cuerpo cavernoso o por un descenso de la expresión o actividad de la NOS neuronal (nNOS)⁵.

Los inhibidores de la 5- fosfodiesterasa (PDE-5) como el Sildenafil es el tratamiento más empleado en casos de DE. Existen algunos arácnidos cuyas mordidas son capaces de producir erecciones del pene, entre ellas se encuentran la araña conocida como viuda negra perteneciente al género *Latrodectus* del que se han descrito

alrededor de 40 especies, una de ellas es *Latrodectus mactans* cuyo veneno es 15 veces más tóxico que el de una víbora de cascabel y produce un síndrome neurotóxico conocido como latrodectismo⁶⁻¹¹.

La caracterización del veneno de *Latrodectus mactans* mostró la existencia de una familia de proteínas selectivamente tóxicas para los vertebrados, insectos o crustáceos: α -latrotoxina (α -LTX), α -latroinsectotoxina y α -latrocrustatoxina, respectivamente. Se ha demostrado que la α -LTX altera las propiedades de conducción de la membrana y desencadena la liberación de la acetilcolina, GABA y norepinefrina, provocando la estimulación excesiva de la placa motora, lo que se refleja en espasmos musculares, sudoración local, piloerección e hipertensión¹².

Investigadores de la Universidad de la Frontera de Chile, y de Sao Paulo, de Brasil, iniciaron estudios para detectar en el veneno de *Latrodectus mactans*, un antídoto para la DE, encontrando en su investigación una molécula capaz de inmovilizar a los espermatozoides, también una neurotoxina, la α -latrotoxina, un péptido, que al parecer actúa sobre los cuerpos cavernosos del pene, y cuyo concentrado aplicado en roedores en dosis pequeñas, tuvo un efecto rápido provocando erecciones sin las otras reacciones atribuidas al veneno. Sin embargo todavía no se realiza pruebas clínicas en humanos^{13,14}.

De allí el surge el problema de interés en esta investigación ¿Cuál es el efecto del veneno de *Latrodectus mactans* en los niveles plasmáticos de Óxido nítrico y en el comportamiento sexual de *Oryctolagus cuniculus*? Siendo la hipótesis que el veneno de *Latrodectus mactans* induce el incremento en los niveles plasmáticos de Óxido nítrico de *Oryctolagus cuniculus* por vasodilatación de

arteria cavernosa y por una relajación del músculo liso del tejido esponjoso del órgano masculino del espécimen; así mismo incrementando su comportamiento sexual.

MATERIAL Y MÉTODO

Material:

Material biológico:

- 7 especímenes de *Oryctolagus cuniculus*, machos de 8-9 meses de edad, y 7 especímenes hembras de 6-7 meses de edad aparentemente sanos con peso corporal promedio entre 2100–2200 g, procedentes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 10 arañas de la especie *Latrodectus mactans* capturadas en lugares abrigados, secos y oscuros del campus de la Universidad Nacional de Trujillo.

Método:

Preparación del inóculo:

Después de congelar las arañas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, se les extirpó las patas, los pedipalpos, se separó el exoesqueleto y se extrajeron los quelíceros (unidos las glándulas venenosas), con ayuda de un bisturí se aisló un par de glándulas por araña. Cada par de glándulas venenosas se colocaron en viales estériles con 0.2 ml de solución salina fisiológica (SSF). Se homogenizó y se almacenó a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso¹⁵.

Tratamiento de los grupos de experimentación:

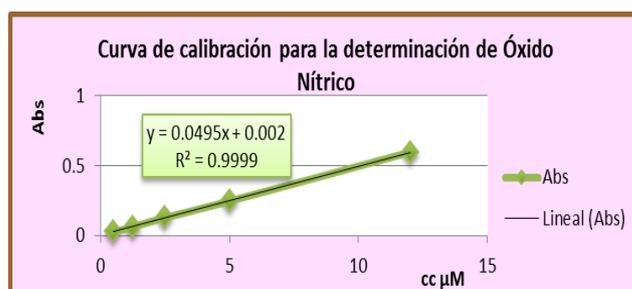
- Grupo Testigo:** 5 ejemplares de *Oryctolagus cuniculus* machos recibieron 0.1 ml de SSF vía subcutánea (SC).
- Grupo Experimental:** 5 ejemplares de *Oryctolagus cuniculus* fueron inyectados con 0.1ml de homogenizado de veneno de *Latrodectus mactans* vía SC.

Determinación de óxido nítrico (NO) por el Método de Griess (Cross, 1994):

Los niveles de NO, se determinaron indirectamente por la conversión en nitritos y nitratos, principales productos de degradación del NO y que son estables. El fundamento de

esta reacción se basa en la absorbancia del azocromóforo magenta, formado por la diazotación del nitrito con el ácido sulfanílico y el subsiguiente acoplamiento del N-(1-naftil) etilendiamina, bajo condiciones ácidas. Este sistema detecta al NO_2^- en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales. Las lecturas de la absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro a 550 nm y son referidas a la absorbancia de soluciones de nitrito de sodio estándar con la cual se elaboró la curva de calibración¹⁶.

A partir de una solución madre de NaNO_2 25mM, se prepararon diferentes concentraciones (0.5 μM , 1.25 μM , 2.5 μM , 5 μM , 12.5 μM), se añadió cantidad de agua suficiente para 0.250 ml y 0.250 ml del reactivo de Griess a cada tubo. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se agitó y se midió en espectrofotómetro a 550 nm¹⁶.



- Obtención de muestra:** Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca de *Oryctolagus cuniculus* en tubos heparinizados, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos para separar los elementos formes del plasma¹⁶.
- Desproteización del plasma:** A 1.6 ml de plasma se le agregó 1.2 ml de agua destilada, 0.2 ml de NaOH 1M y 0.2 ml de ZnSO_4 al 30%. Se agitó durante 1 minuto por 3 veces, obteniéndose una solución lechosa que se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos¹⁶.
- Reducción de los nitratos:** A 1 ml de plasma desproteizado, se agregó una alícuota de zinc metálico en polvo y se dejó reposar durante 1 hora y 45 minutos agitando el tubo cada 30 minutos; pasado este tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se

trasvasó para la reacción de Griess y su lectura en el espectrofotómetro¹⁸.

d. Reacción de Griess: A 1 ml de plasma desproteínizado se le agregó 0.5 ml de reactivo Griess A y 0.5 ml de reactivo Griess B, se dejó reposar 10 minutos (color magenta) se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 550nm, utilizando un estándar de nitritos¹⁶.

Determinación del efecto sobre el comportamiento sexual (Yakubu et al, 2007)

Los especímenes de *Oryctolagus cuniculus* hembras fueron inducidas en celo con la administración secuencial del benzoato de estradiol (10ug/100g de peso corporal) y progesterona (0.5mg/100g de peso corporal) a través de inyecciones subcutáneas, 48 horas y 4 horas, respectivamente antes del apareamiento. La receptividad de las hembras fue confirmada antes de la prueba exponiéndolas a los machos, aparte animales de control y de prueba. Las hembras más receptivas fueron seleccionadas para el estudio. El experimento se realizó en lugares secos. La observación de la conducta de apareamiento comenzó de inmediato y finalizó cuando el macho ya no mostraba interés sexual¹⁷.

Los parámetros evaluados fueron: **frecuencia de monta** (número de montas sin penetración desde el momento de la introducción de la hembra a la jaula del macho hasta la eyaculación), **frecuencia de intromisiones** (número de penetraciones desde la introducción de la hembra a la jaula del macho hasta la eyaculación), **latencia de monta** (intervalo de tiempo entre la introducción de la hembra y la primera monta del macho), **latencia de intromisiones** (intervalo de tiempo desde el momento de la introducción de la hembra a la primera penetración del macho. Por lo general es caracterizado por el empuje pélvico, y salto para desmontar y **latencia post eyaculatoria** (intervalo de tiempo entre la eyaculación y la primera penetración de las siguientes series)¹⁷.

Análisis de los Resultados:

Se aplicó el análisis de varianza ANOVA y prueba post hoc (test HSD de Tukey). Todos los análisis estadísticos se realizaron con un intervalo de confianza del 95%¹⁷.

RESULTADOS

Tabla 1. Concentración plasmática de NO en *Oryctolagus cuniculus* expuestos a solución salina fisiológica (blanco) y veneno de *Latrodectus mactans* (problema)

	Abs	cc NO µmol/ml	Promedio
blanco 1	0,218	4,36	4,06
blanco 2	0,186	3,72	
blanco 3	0,205	4,10	
problema 1	0,350	7,03	7,75
problema 2	0,420	8,44	
problema 3	0,445	8,95	
problema 4	0,327	6,57	

Tabla 2. Prueba Post hoc del efecto del veneno de *Latrodectus mactans* sobre los niveles plasmáticos de Óxido nítrico en *Oryctolagus cuniculus*

(I) Trata miento	(J) Tratam iento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Veneno L. mactan:	SSF	3,68750*	,52130	,000	2,2320	5,1430

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

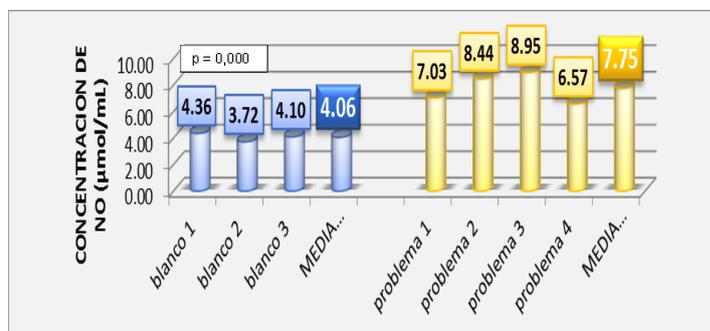


Fig. 1. Efecto del veneno de *Latrodectus mactans* sobre los niveles plasmáticos de Óxido nítrico en *Oryctolagus cuniculus*

Tabla 3: Comportamiento sexual de *Oryctolagus cuniculus* expuestos a solución salina fisiológica

	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3	Promedio
Frecuencia de monta	5	3	4	4,00
Frecuencia de intromisiones	3	2	2	2,33
Latencia de monta (seg)	183	262	94	179,67
Latencia de intromisiones (seg)	398	467	423	429,33
Latencia post eyaculatoria (seg)	638	584	513	578,33

Tabla 4: Comportamiento sexual de *Oryctolagus cuniculus* expuestos a *Latrodectus mactans*

	Problem a 1	Problem a 2	Problem a 3	Problema 4	Promedio
Frecuencia de monta	12	10	10	13	11,25
Frecuencia de intromisiones	6	5	4	5	5
Latencia de monta (seg)	111	218	163	254	186,5
Latencia de intromisiones (seg)	210	303	175	255	235,75
Latencia post eyaculatoria (seg)	181	123	195	240	184,75

Tabla 5. Prueba Post hoc del efecto del veneno de *Latrodectus mactans* sobre el comportamiento sexual en *Oryctolagus cuniculus*

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Frecuencia de monta						
Veneno <i>Latrodectus mactans</i>	SSF	7,50000*	1,16070	,000	4,2593	10,7407
Frecuencia de intromisiones						
Veneno <i>Latrodectus mactans</i>	SSF	2,75000*	,55277	,002	1,2067	4,2933
Latencia de monta						
Veneno <i>Latrodectus mactans</i>	SSF	,25000	93,67994	1,000	-261,3049	261,8049
Latencia de intromisiones						
Veneno <i>Latrodectus mactans</i>	SSF	-193,50000*	39,20069	,002	-302,9486	-84,0514
Latencia post eyaculatoria						
Veneno <i>Latrodectus mactans</i>	SSF	-393,50000*	55,9516	,000	-549,7172	-237,2828

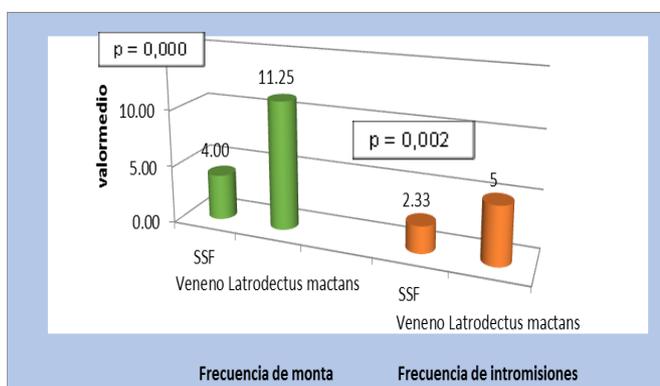


Fig. 2: Efecto del veneno de *Latrodectus mactans* sobre la frecuencia de monta y frecuencia de intromisiones en *Oryctolagus cuniculus*

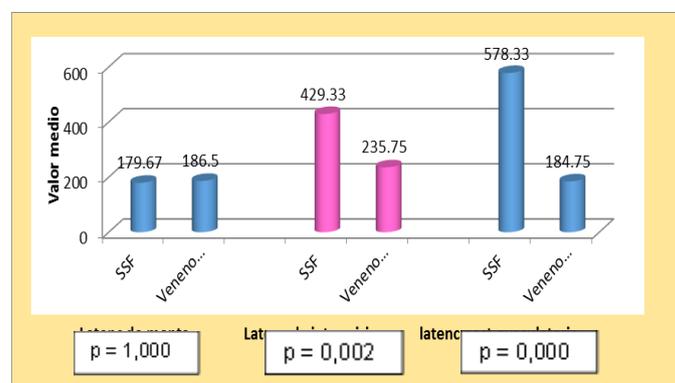


Fig. 3: Efecto del veneno de *Latrodectus mactans* sobre la latencia de monta y latencia de intromisiones en *Oryctolagus cuniculus*

DISCUSIÓN

En la tabla 1 y fig.1, se observa que la concentración de NO en sangre de *Oryctolagus cuniculus* es mayor en los especímenes que recibieron el veneno de *Latrodectus mactans* (7.75 $\mu\text{mol/mL}$) comparado con los que recibieron SSF (4.06 $\mu\text{mol/mL}$), $p < 0,05$, según se muestra en las comparaciones múltiples del test HSD de Tukey (Pruebas post hoc) de la tabla 2.

El aumento de NO en sangre de *Oryctolagus cuniculus* a nivel de músculo liso del cuerpo cavernoso inicia la respuesta eréctil. El NO se difunde hacia las células de músculo liso vascular adyacente donde se une a la enzima guanilato ciclasa soluble activándola (GCs) para catalizar la producción de GMPc a partir de GTP. La GMPc dilata arterias, ejerciendo su función a través de una cascada de proteincinasas, disminuyendo los niveles de Ca^{2+} intracelular, con lo que el músculo liso se relaja^{18, 19, 20}. El mecanismo de acción de la αLTX puede estar vinculado con una o más de las vías de la erección. La vía NO/sGC/cGMP/PKG sería la de mayor importancia. La vía cAMP/PKA, activada por mensajeros como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y las prostaglandinas E (PGE), es probable que tenga un papel complementario. En el cuerpo cavernoso humano el GMPc, es inactivado por la PDE5 y el AMPc por las PDE 3 y 4^{12, 21}.

La αLTX requiere su inserción en la membrana plasmática de las terminales neuronales presinápticas de los vertebrados, alterando las propiedades de conducción de la membrana y desencadenando la liberación masiva de prácticamente todos los neurotransmisores conocidos como la acetilcolina (Ach), GABA y noradrenalina (NA)¹².

La Ach activa la producción más sostenida de NO por el endotelio, actuando sobre receptores muscarínicos en la membrana de las células endoteliales, aumentando en ellas los niveles de Ca^{2+} y por ende de Ca^{2+} -Camodulina, que activa la eNOS. El NO así generado por el endotelio se añade al liberado por las terminaciones nerviosas contribuyendo a mantener la relajación del músculo liso cavernoso, y por tanto la erección. La NA,

actúa a nivel de la arteria cavernosa mediada por receptores α_2 y en el músculo trabecular por receptores α_1 . La actividad adrenérgica determina vasoconstricción de las arterias peneanas y del músculo liso trabecular, lo que resulta en una reducción del flujo arterial y el colapso de los espacios lacunares^{5, 22, 23}. Sin embargo, al comparar el efecto de la αLTX con el mecanismo biológico de una erección normal, donde los impulsos cerebrales viajan a través de las vías simpáticas (inhibiendo la liberación de NA), parasimpáticas (liberando NO y Ach) y somáticas (liberando Ach), se observa que sólo explica la Ach (elemento positivo para la erección) y la NA (elemento negativo para la erección), pues el mecanismo de liberación de NO aún no se ha investigado²⁴.

En la tabla 5 se observa que el veneno de *Latrodectus mactans* incrementa la frecuencia de monta, parámetro que mide el deseo sexual, de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$) es decir, a mayor valor de frecuencia de monta respecto al blanco, indica que se ha logrado estimular el deseo sexual en mayor proporción, sistema relacionado posiblemente con la liberación presináptica de dopamina, que actúa a nivel del área pre óptica frontal e hipotálamo anterior⁵.

En cuanto a la frecuencia de intromisiones, se observa que el veneno de *Latrodectus mactans* también aumenta este parámetro de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En la fig.2 se observa la media de frecuencia de intromisiones, que en el grupo blanco fue 2.33 penetraciones mientras que en el grupo problema fue 5. La frecuencia de intromisión mide la potencia sexual, por lo que un mayor valor de la frecuencia de intromisión indica que se ha logrado mantener la erección por mayor tiempo, debido a la relajación del musculo liso que induce el NO, por lo que se evidencia que el veneno de *Lactrodectus mactans* estimula el comportamiento sexual en *Oryctolagus cuniculus*⁵.

En la fig. 3 se aprecia que la latencia de monta fue mayor con el veneno de *Latrodectus mactans* que con SSF. No obstante, según la tabla 5 se puede afirmar que esta diferencia no es significativa ($p = 1.000$), es decir que el

veneno de *Latrodectus mactans* no actuaría significativamente sobre este parámetro. Otro parámetro evaluado fue la latencia de intromisiones, intervalo de tiempo desde el momento de la introducción de la hembra a la primera penetración del macho. Según la tabla 5, el veneno de *Latrodectus mactans* disminuiría este tiempo de forma significativa ($p = 0.002$). Esto podría ser debido a un mecanismo acción por la vía del óxido nítrico^{25, 26, 27}.

Finalmente en la tabla 5 se aprecia que el veneno de *Latrodectus mactans* disminuye la latencia post eyaculación de forma significativa ($p < 0,05$). La latencia Post-eyaculatoria es un parámetro que mide el tiempo de recuperación entre una sesión a otra de apareamiento, por lo que el veneno no sólo ayuda a mantener la erección por mayor tiempo pero sino que promueve una recuperación más rápida para una nueva sesión sexual⁵.

CONCLUSIONES

El veneno de *Latrodectus mactans* eleva en forma significativa los niveles plasmáticos de Óxido nítrico en *Oryctolagus cuniculus*, además estimula el comportamiento sexual de dicho espécimen.

Conflicto de intereses: No declara

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asociación Española de Andrología. Documento de Consenso Sobre Disfunción Eréctil. España: Asociación Española de Andrología. 2012
- Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Disfunción Sexual. Guía de Diagnóstico y Manejo. 2013
- Khera M, Goldstein I. Erectile dysfunction. Clin Evid. [Internet] 2009 [Consultado 20 abril 2014]; 06:1803. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3217797/>
- Castañeda B, Castro R, Gamarra F. Evaluación del efecto farmacológico del extracto de *Jatropha macranta* Muell. Arg "huanarpo macho" en pene aislado de conejo. Cultura. 2009; 23: 001-100.
- Tinco J. Efecto modulador de la erección por el extracto metanólico de *Jatropha macrantha* Müll. Arg. "huanarpo macho" en ratas con inducción de disfunción eréctil. [Tesis doctoral]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.
- Bonfim S, Abdo. Benefits and risks of testosterone treatment for hypoactive sexual desire disorder in women: a critical review of studies published in the decades preceding and succeeding the advent of phosphodiesterase type 5 inhibitors. Clinics. [Internet] 2014 [Consultado 20 abril 2014]; 69(4): 294-303. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971358/>
- Tsertsvadze A, Fink HA, Yazdi F, MacDonald R, Bella AJ, Ansari MT, et al. Oral phosphodiesterase-5 inhibitors and hormonal treatments for erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. Annals of Internal Medicine [Internet] 3 nov 2009 [Consultado 20/04/2014]; 151(9): 650-661. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195676>
- Corona G, Mondaini N, Ungar A, Razzoli E, Rossi A, Fusco F. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors in erectile dysfunction: the proper drug for the proper patient. J Sex Med. [Internet] Dic 2011 8(12):3418-32 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995676>
- Cappelleri JC, Althof SE, O'Leary MP, Tseng LJ. Analysis of single items on the Self-Esteem and Relationship questionnaire in men treated with sildenafil citrate for erectile dysfunction: results of two double-blind, placebo-controlled trials. BJU Int. [Internet] Abril 2008 [Consultado 20 abril 2014]; 101(7):861-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070194>
- Melnik T, Soares BG, Nasello AG. The effectiveness of psychological interventions for the treatment of erectile

- dysfunction: systematic review and meta-analysis, including comparisons to sildenafil treatment, intracavernosal injection, and vacuum devices. *J Sex Med.* [Internet] Nov 2008; [Consultado 20 abril 2014]; 5(11):2562-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564156>
11. King R, Juenemann K, Levinson IP, Stecher J, Creanga L. Correlations between increased erection hardness and improvements in emotional well-being and satisfaction outcomes in men treated with sildenafil citrate for erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* [Internet] Jul-Aug 2007; [Consultado 20 abril 2014]; 19(4):398-406. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361232>
 12. Rodríguez M, Prud'Homme M, Alagón A, et al. Stock R. Expresión de α -latrotoxina Recombinante Activa de *Latrodectus mactans* Utilizando el Sistema de Células de Insecto-Baculovirus. *BioTecnología.* 2009; 13(2).
 13. Ramírez L. Clima de emprendimiento organizado. [Internet] Chile. Ramírez. 2005. [Acceso 21 de abril del 2014]. Disponible en: <http://www.ceo.cl/609/article-67052.html>
 14. Binford GJ, Degan JA. *Elmundo.es* [Internet] 2005. [Acceso 23 de abril del 2014]. Disponible en: <http://www.elmundo.es/elmundo/2005/05/24/ciencia/1116948342.html>
 15. Chaman S, Esquivel N. Efecto histopatológico de los venenos *Haradus haradus*, *Loxosceles laeta* y *Latrodectus mactans* en *Oryctulagus cuniculus* y *Mus musculus var swiss*. Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo Farmacia y Bioquímica. 2001.
 16. Yakubu M, Akanji M, Oladiji A. Male Sexual Dysfunction and Methods used in Assessing Medicinal Plants with Aphrodisiac Potentials *Pharmacognosy Reviews Issue 1.* Ilorin. Nigeria. 2007(1):49 - 56.
 17. Cross C. "Reactive oxygen species and the lung". *Lancet*, 1994 (344):930 - 932.
 18. Andersson K. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Pharmacological Reviews.* 63 (4); 63:811– 859, 2011
 19. Karl A. Farmacología de la Erección Peneana. *Pharmacological Reviews, the american pharmacologyl experimetal Terapeuts – USA.* 2001(5):417-435
 20. Rakuambo N, Rakuambo J, Meyer M, Hussein A. Xanthone isolated from *Securidaca longepunculata* with activity against erectile Dysfunction, *Fitoterapia* 2004 (75):497–499.
 21. Escrig A. Papel del óxido nítrico en la erección del pene: implicaciones fisiopatológicas. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad de La Laguna, Medicina 1998.
 22. Oaki N, Jonson G, Lefer A. "Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am physiol*" 1990 (258):75 – 281.
 23. Mas M. Bases moleculares de la erección. monográfico: disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.* 2010; 63 (8): 589-598. España.
 24. Martínez J, Martínez C, Portillo L, et al. Disfunción Eréctil. Fisiología de la erección *Arch. Esp. Urol.* vol.63 no.8 Madrid oct. 2010
 25. Bivalacqua T, Champion H, Hellstrom W, Kadowitz P. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21:484489.
 26. Wareing M, Myers J, O'Hara M, Kenny L, Warren A, Taggart M, et al. Effects of a phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor on endothelium dependent relaxation of myometrial small arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:12831290.
 27. Escrig A, Marín R, Abreu P., Gonzalez-Mora JL, Mas M.(2002) Changes in mating behavior, erectile function, and nitric oxide levels in penile corpora cavernosa in streptozotocin-diabetic rats. *Biology of Reproduction* 66: 185-189