

## SENSIBILIDADE À ACETILCOLINA DA SANGUESUGA *DIPLOBDELLA BRASILIENSIS* (PINTO, 1920)

POR

JOSÉ R. VALLE

Depois de Fühner em 1918 (1) e Minz em 1932 (2) terem verificado a grande sensibilidade do músculo dorsal eserinado de sanguessuga à acetilcolina, a preparação passou a ser usada com frequência na identificação daquela substância. Segundo Gaddum (3), a sensibilidade média da fita dorsal da *Hirudo medicinalis* L. é a correspondente a uma solução contendo 2 microgramas por litro; em outras palavras, o músculo mergulhado em Ringer, contendo eserina, se contrae na presença de acetilcolina a partir da concentração final de  $2 \times 10^{-9}$ . Como nenhum outro processo de microdosagem possui a sensibilidade da preparação em apreço, ficando em discussão somente a sua especificidade, é fácil de se compreender a importância de seu emprego, mormente nos estudos da mediação química parasimpática. Entretanto, nós não possuímos a clássica sanguessuga européia, daí a necessidade de se estudar, sob o ponto de vista farmacológico, a musculatura dorsal de hirudíneos facilmente obtidos em nosso meio.

XAVIER (4), em publicação recente, tratou do assunto, mas apenas presume ter utilizado a *Diplobdella brasiliensis* (PINTO, 1920). Carvalho (5), estudando a liberação da acetilcolina pelo coração da *Leptodactylus ocellatus* L., usou o músculo dorsal de sanguessuga sem poder determinar a espécie empregada. Lanari (6), na Argentina, examinou a *Argyrobdella ornata* (WEYENBERGH) e a *Semiscolex similis* (WEYENBERGH). Esta última espécie foi também usada por Cicardo (7) nas suas determinações do teor de K nos extratos de tecidos.

Em uma série de experiências tivemos a oportunidade de empregar exemplares de sanguessugas colhidas nas imediações do Butantan. Devemos a classificação ao prof. Ergasto H. Cordero, conhecido especialista de Montevideo. Trata-se da *Diplobdella brasiliensis* (PINTO, 1920) e da *Haementeria lutzi* (PINTO). Desde logo verificamos serem as primeiras mais apropriadas e pas-



samos a usá-las sistematicamente. Neste trabalho sôbre a excitabilidade farmacológica "in vitro" da musculatura dorsal da *Diplobdella brasiliensis*, damos os nossos resultados na presunção de que êles possam ser uteis àqueles que se dedicam a êstes estudos.

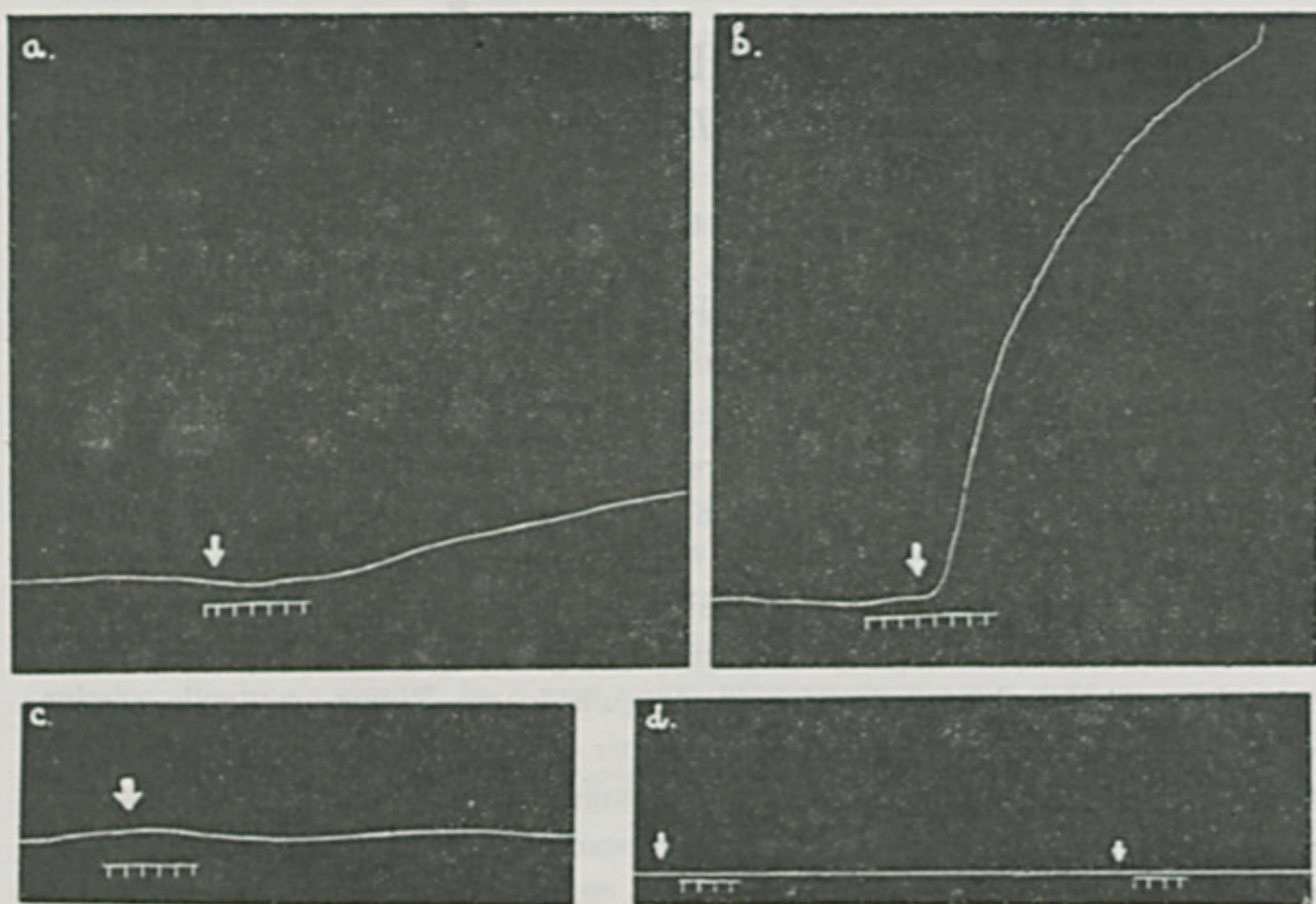


Fig. 1

Músculos dorsais eserinados de *Diplobdella brasiliensis* em líquido de Ringer. a) Acetilcolina a 1:3 bilhões; b) Acetilcolina a 1:300 milhões; c) Adrenalina a 1:300 mil; d) 1.<sup>a</sup> flecha, Histamina a 1:3 milhões; 2.<sup>a</sup> flecha, Histamina a 1:300 mil. (Tempo em todas as figuras: 6 segundos)

A *Diplobdella brasiliensis* foi descrita por Cesar Pinto (8) em 1920 sob o nome de *Limnibdella brasiliensis*, mas considerada em 1936 por E. H. Cordero (9) como fazendo parte do gênero *Diplobdella*, tipicamente neotrópico. É espécie vizinha da *Hirudo medicinalis* L.; apresenta três mandíbulas armadas de denticulos, cinco pares de olhos, somitos completos formados de cinco aneis, mas o caráter mais importante é que os orifícios sexuais estão separados só por quatro aneis. "Corpo sublanceolado e de secção elíptica; ao longo do dorso corre no terço médio uma larga faixa de cor parda, acompanhada de outras duas laterais mais delgadas. Entre as faixas se vê o fundo pardo, mais intenso inclusive nos bordos laterais, onde uma linha cinzenta clara delimita as faces dorsal e ventral. Em cada cinco aneis ha dois pares de manchas arredondadas pequenas no dorso. A face ventral tem a mesma coloração de fundo da



face dorsal. O corpo tem 103 e, às vêzes, 104 aneis. As faixas dorsais com os seus distintos tons dá a esta espécie um aspecto característico". (E. H. Cordeiro).

### MÉTODO

Empregamos exemplares de *Diplobdella brasiliensis* medindo em média 60 x 5 mms. e pesando de 200 a 500 mgs.. Eram distendidos sôbre uma cortiça, fixados por meio de alfinetes e abertos ventral e longitudinalmente com uma tesoura fina depois de secção das duas ventosas. Preparada a faixa dorsal livre dos órgãos internos e da cadeia nervosa, retirava-se uma fita muscular mediana, compreendida a pele, que era então presa a uma alavanca de vidro em L e levada para um frasco contendo líquido de Ringer ou de Locke diluido ao terço, oxigenado e mantido à temperatura do laboratório. A capacidade do frasco era em média de 30 ccs.; a extremidade livre da preparação era ligada por um fio de linha a uma alavanca inscritora para o registo das contrações longitudinais com carga de 2 gs. e ampliação de 1 x 6. Das sanguesugas maiores obtínhamos duas preparações musculares de 2 cms. cada uma.

Depois do completo relaxamento muscular a preparação era eserinaada, pela adição ao banho de sulfato ou de salicilato de eserina na concentração final de 1:300.000. De 20 a 30 minutos depois, ensaiava-se a solução de acetilcolina ou então extratos de tecidos previamente obtidos. O volume adicionado ao banho era de 0,5 a 1 cc. da solução. Usamos o cloridrato de acetilcolina "Roche", ampolas de 100 mgs. O sal era dissolvido em 20 ccs. de água bidistilada e desta solução eram obtidas as diluições a ensaiar com os cuidados exigidos quando se manuseia drogas muito ativas. As duas diluições mais empregadas continham 1 $\gamma$  e 0,1 $\gamma$  por cc..

Além dos efeitos da acetilcolina, estudamos também as reações à adrenalina (1:500.000 — 1:100.000), à histamina (1:500.000 — 1:100.000), à nicotina (1:600.000 — 1:300.000), à pilocarpina e à muscarina (1:50.000 — 1:10.000), ao bário (1:30.000) e à atropina (1:20.000).

Particularmente importante era a verificação dos efeitos do ion K. Empregamos soluções de KCl na concentração final no banho de 1:20.000 a ... 1:3.000.

Numa série de experiências com Ananias Porto e que serão publicadas em outro lugar, fizemos o ensaio do teor de acetilcolina em extratos de tecidos. O método de preparo destes extratos, descrito por Chang e Gaddum (10) e seguido por Reynolds (11) para demonstrar a liberação de acetilcolina no útero de coelhas depois do tratamento estrogênico, pode ser assim resumido:



O órgão a extrair é picado e triturado num gral com ácido tricloracético a 10%, 2 ccs. por g. de tecido. Deixa-se a papa à temperatura ambiente durante duas horas, agitando-se neste intervalo várias vezes. Filtra-se e lava-se o papel de filtro com ácido tricloracético a 7% que serve também para re-extrair o bagaço. O líquido claro obtido é lavado com éter, num funil de separação, tantas vezes quantas necessárias para remoção do ácido; 3 a 4 vezes são suficientes para o líquido não azular mais o papel de vermelho congo. Os extratos etéreos são desprezados e o líquido é avaporado em banho-maria, no vácuo, a temperatura inferior a 40°. Uma vez evaporado, o volume restante é acertado com água destilada de tal modo que, p. ex., 1 cc. = 1 g., depois neutralizado com soda 0,1 normal e, finalmente, ensaiado.

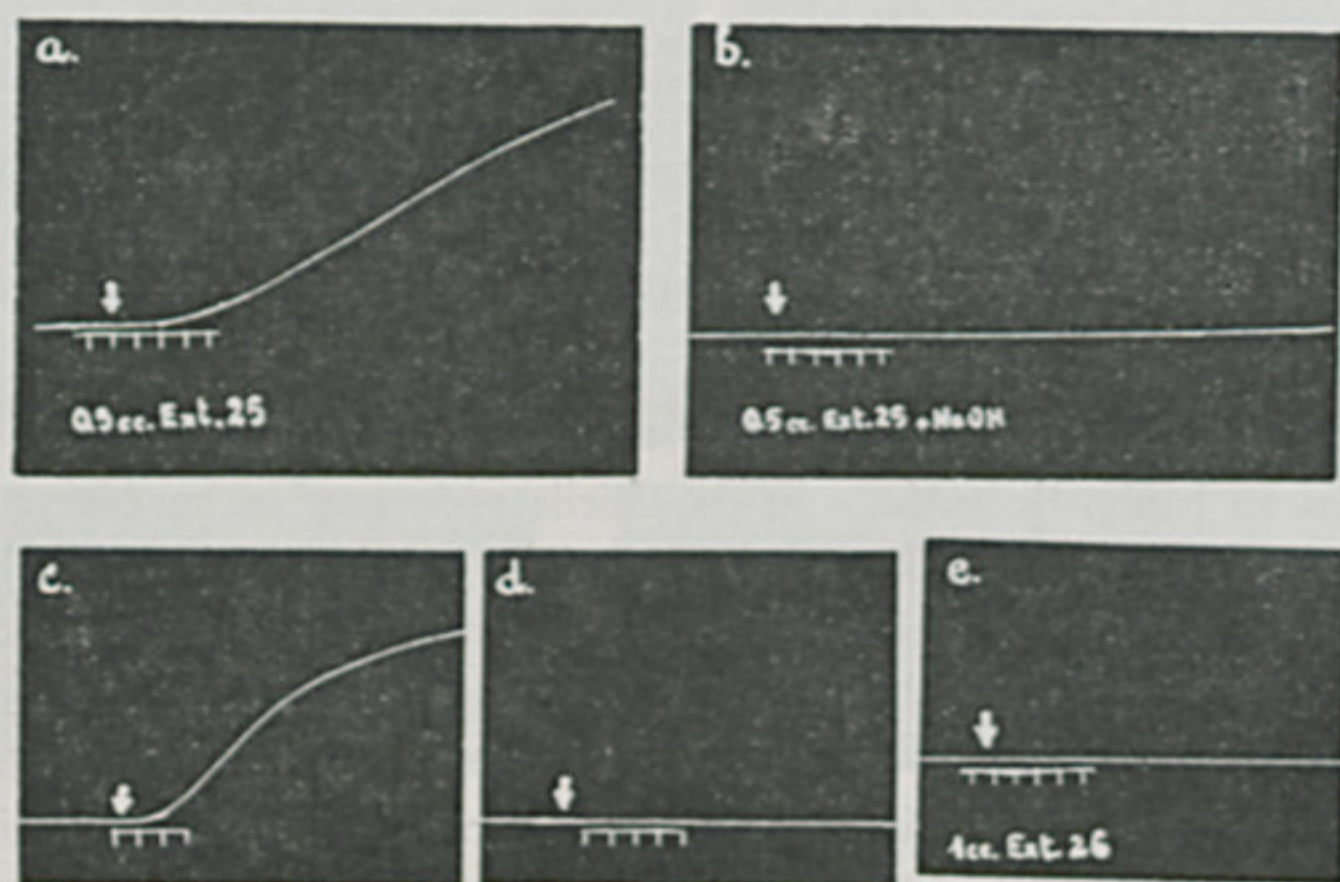


Fig. 2

Músculos dorsais eserinados de *Diplobdella brasiliensis* em Locke diluído ao terço. a) 0,5 cc. de um extrato obtido de órgãos genitais acessórios de ratos tratados com estradiol; b) O mesmo volume de extrato previamente tratado com soda; c) Acetilcolina a 1:600 milhões; d) A mesma dose de acetilcolina posta em contacto prévio durante 5 minutos com soro humano; e) 1 cc. de um extrato de baços de ratos tratados com substâncias estrogênicas.

A mesma preparação de sanguessuga pode ser utilizada no ensaio de diferentes extratos e, com o emprego de uma diluição conhecida de acetilcolina, é fácil calcular o seu teor no material examinado. O fator limitante é a contração persistente do músculo. A descontração pode ser apressada por mudanças repetidas do banho nutridor e, também, por leve tração na haste inscritora. Para cada nova verificação adicionava-se previamente ao banho a eserina na concentração referida.



Algumas vezes guardavamos a preparação em Ringer, à baixa temperatura de 3° a 6°, e repetiamos no dia seguinte a experiência nas condições assinaladas.

## RESULTADOS

Na maioria das preparações não foram registados movimentos espontâneos. Quando eles aparecem, deve-se pensar numa dissecação insuficiente. O automatismo é frequente na *Haementeria lutzi*; talvez porque, a parede muscular dorsal sendo mais espessa nesta espécie, é com mais dificuldade desembaraçada dos elementos nervosos. Nos nossos ensaios somente examinamos as preparações quiescentes *ab initio*.

A sensibilidade à acetilcolina do músculo dorsal eserinado da *Diplobdella brasiliensis* é variável com os exemplares. Encontramos reações francas desde a concentração final no banho, daquela droga, de 1:30 milhões até 1:3 bilhões. Como termo médio de sensibilidade, observada nas nossas condições experimentais, podemos dar 1:300 milhões.

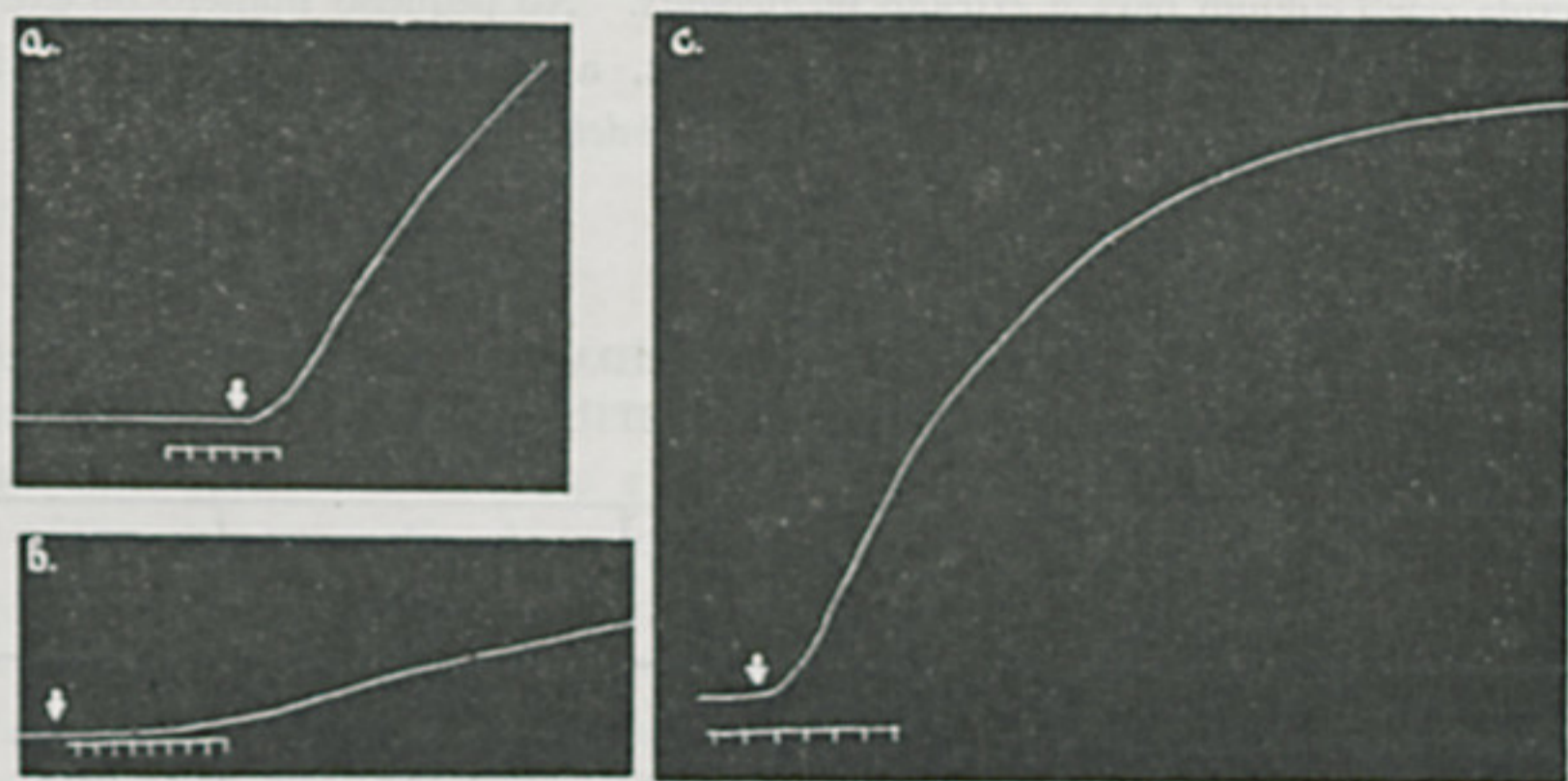


Fig. 3

Músculos dorsais eserinados de *Diplobdella brasiliensis* em Locke diluído ao terço. a) Cloreto de potássio a 1:10.000; b) Cloreto de potássio a 1:20.000; c) Nicotina 1:400.000.

A pilocarpina, a muscarina, o bário e a nicotina exercem efeitos excitantes. A contração tônica provocada pela nicotina é persistente. A adição prévia ao banho de atropina, não anula o efeito da acetilcolina.

Quando as preparações não foram utilizadas para os ensaios farmacológicos com as drogas acima mencionadas, elas mantêm no dia seguinte a sua



sensibilidade à acetilcolina. Em um caso, mesmo, a sensibilidade da preparação conservada 24 horas no frio, foi maior do que a registada na experiência inicial.

A preparação é praticamente insensível à adrenalina e à histamina nas concentrações referidas. Não é preciso acentuar a importância destes dados negativos quando se examina os efeitos farmacológicos de extratos orgânicos. O cloreto de potássio, ao contrário do referido por Chang e Gaddum para a *Hirudo medicinalis*, pode excitar, nas concentrações usadas, o músculo dorsal da *Diplobdella brasiliensis*. O efeito excitante do KCl parece, entretanto, menor do que o referido por Cicardo para a *Semiscolex similis*.

### COMENTÁRIOS E APLICAÇÕES

No Quadro 1 vemos a variação, com a espécie, da sensibilidade à acetilcolina do músculo dorsal eserinado de sanguessuga. Para melhor comparação consideramos a *Diplobdella brasiliensis* com a sensibilidade à acetilcolina metade da referida por Gaddum para a *Hirudo medicinalis*. No pequeno número de exemplares de *Haementeria lutzii* que examinamos, a sensibilidade encontrada foi igual à assinalada por Lanari para a *Argyrobdelella ornata*.

QUADRO 1

VARIAÇÃO, COM A ESPÉCIE, DA SENSIBILIDADE DO MÚSCULO DORSAL DE SANGUESUGA A ACETILCOLINA,

ESPÉCIE	$\gamma$ por litro	Concentração final no banho	Autor
<i>Hirudo medicinalis</i> LINNEU .....	2	$2 \times 10^{-9}$	Gaddum
<i>Diplobdella brasiliensis</i> (PINTO) ....	4	$4 \times 10^{-9}$	Valle
<i>Semiscolex similis</i> (WEYENB.) ....	10	$1 \times 10^{-8}$	Lanari
<i>Argyrobdelella ornata</i> (WEYENB.) ..	20	$2 \times 10^{-8}$	Lanari
<i>Haementeria lutzii</i> (PINTO) .....	20	$2 \times 10^{-8}$	Valle

Com fins comparativos também estudamos a sensibilidade à acetilcolina do músculo reto abdominal e do coração da *Leptodactylus ocellatus*. A primeira preparação se mostrou muito pouco sensível. Apenas havia contração nítida do músculo eserinado na concentração de 1:3 milhões de acetilcolina. O coração se apresenta mais sensível, entretanto a sua especificidade é mais discutida.



Do que ficou exposto concluimos que, entre nós, a *Diplobdella brasiliensis*, na dificuldade de obtenção da *Hirudo medicinalis*, deve ser o test preferido nos ensaios de identificação da acetilcolina ou nos estudos da mediação química parasimpática.

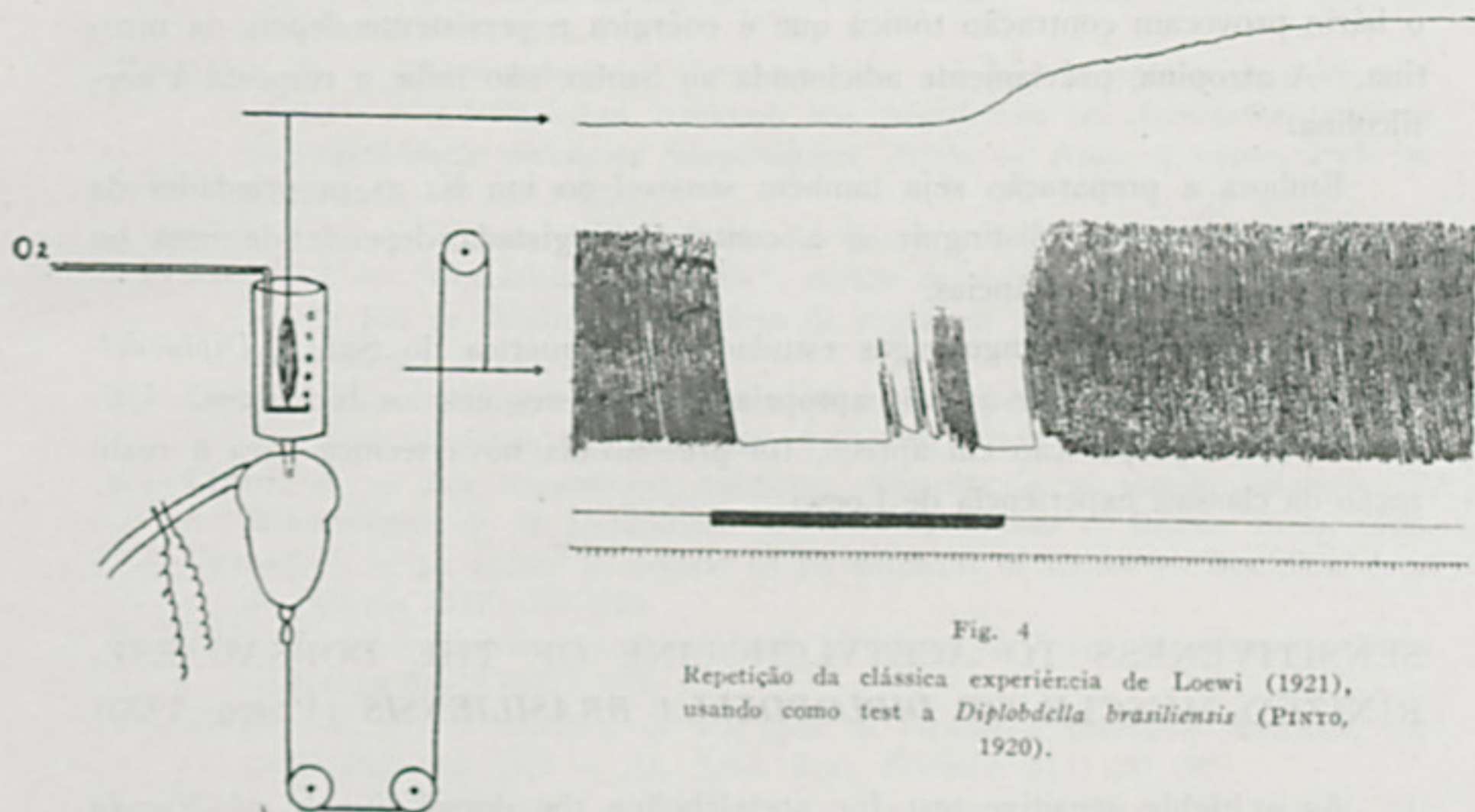


Fig. 4

Repetição da clássica experiência de Loewi (1921), usando como test a *Diplobdella brasiliensis* (PINTO, 1920).

A sensibilidade da preparação ao ion K não constitue fator limitante do seu emprego, dadas as propriedades conhecidas da acetilcolina: instabilidade em meio alcalino, à calcinação e à colinesterase do sôro.

Uma das aplicações desta preparação é o estudo, p. ex., da produção de acetilcolina pelo coração durante a excitação vagal. É uma velha experiência de 1921, mas sempre nova pelo seu valor objetivo. A clássica experiência de Loewi dos dois corações isolados de rãs foi repetida com nova técnica entre outros por Bain, em 1932 (12). Nós realizamos a experiência de outra maneira, empregando o coração do *Bufo marinus* e a sanguessuga mergulhada na cânula de perfusão. A figura dispensa as minúcias e mostra o resultado. Si a contração da sanguessuga, nestas condições, é devida à acetilcolina liberada ou ao ion K, tido como seu precursor, ou então a ambas as substâncias, é questão a ser esclarecida.

### SUMÁRIO

O músculo dorsal da sanguessuga *Diplobdella brasiliensis*, eserinado e "in vitro", é bastante sensível à acetilcolina e aos extratos orgânicos contendo esta



substância. A sensibilidade é variável conforme os exemplares, sendo o valor médio encontrado o correspondente à concentração final no banho de 1:300 milhões.

A adrenalina e a histamina são ineficazes. A pilocarpina, a muşcarina e o bário provocam contração tônica que é enérgica e persistente depois da nicotina. A atropina, previamente adicionada ao banho, não inibe a resposta à acetilcolina.

Embora a preparação seja também sensível ao ion K, as propriedades da acetilcolina permitem distinguir si a contração registada depende de uma ou de outra das duas substâncias.

Das espécies de sanguessugas estudadas na América do Sul, a *Diplobdella brasiliensis* parece ser a mais apropriada para êstes ensaios biológicos. Utilizando-se da preparação em apreço, foi preconizada nova técnica para a realização da clássica experiência de Loewi.

#### SENSITIVENESS TO ACETYLCHOLINE OF THE DORSAL ESERINIZED MUSCLE OF *DIPLOBDELLA BRASILIENSIS* (PINTO, 1920)

As a highly sensitive test for acetylcholine the dorsal muscle of *Hirudo medicinalis* L. is largely employed. This species is not available among us; therefore, we thought it interesting to verify the sensitiveness to that drug of *Diplobdella brasiliensis*, a neotropic *Hirudinae*, resembling the European leech. The dorsal muscle was isolated, transferred to a beaker with oxygenated Ringer's solution and treated with eserine. Although an individual variation may have existed, we can take the average sensitiveness as being 1:300 millions. According to Gaddum, the European leech is sensitive to 1:500 millions.

Adrenaline and histamine proved to be ineffective. Pilocarpine, muscarine, baryum and nicotine provoked tonic contraction, the former with a weak and the latter with a persistant effect. Atropine did not antagonize the action of acetylcholine. Potassium chloride also had a stimulating effect, but the active concentration found was only 1:20.000.

In connection with the usefulness of the test a modification of Loewi's classic experiment was performed. The heart of *Bufo marinus* L. and the leech immersed in the Straub's canule were employed. Also here, after the arrest of the heart by vagal stimulation, a little contraction of the dorsal eserinated muscle was noticed.



BIBLIOGRAFIA

- 1 — *Fühner, H.* — Untersuchungen über den Synergismus von Giften. IV. Die chemische Erregbarkeitssteigerung glatter Muskulatur — Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. **28**:51.1918.
- 2 — *Minz, B.* — Pharmakologische Untersuchungen am Blutegelpräparat zugleich eine Methode zum biologischen Nachweis von Acetylcholin bei Anwesenheit anderer pharmakologisch wirksamer körpereigener Stoffe — Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. **168**:292.1932.
- 3 — *Gaddum, J.* — Gefässerweiternde Stoffe der Gewebe. G. Thieme, Leipzig, 1936.
- 4 — *Xavier, A.* — "Diplobdella brasiliensis", espécie de sanguesuga comum nos arredores do Rio de Janeiro, como objeto de prova em farmacologia quantitativa — Brasil-Médico **54**(46):760.1940.
- 5 — *Carvalho, P.* — Dosagem de acetilcolina em músculos de sanguesugas brasileiras — Arq. Inst. Benjamin Baptista (Rio) **6**:73.1940.
- 6 — *Lanari, A.* — Los transmisores químicos. Contribución al estudio fisiológico y farmacológico de la acetilcolina. Tése. "El Ateneo". Buenos Aires, 1936.
- 7 — *Cicardo, V.* — La acción del potasio en los extractos de tejidos — Rev. Soc. Arg. de Biología **15**(7):318.1939.
- 8 — *Pinto, Cesar* — Contribuição ao estudo de hirudíneos do Brasil (3 artigos) — Brasil-Médico **34**(35,38,43).1920.
- 9 — *Cordero, E. H.* — Revisión de los tipos de hirudíneos brasileiros descriptos por Cesar Pinto em 1920 — An. Acad. Bras. Ciencias **8**(3):221.1936.
- 10 — *Chang, H. & Gaddum, J.* — Choline esters in tissue extracts — J. Physiol. **79**:255.1933.
- 11 — *Reynolds, S.* — Acetylcholine content of uteri before and after administration of oestrin to ovariectomized rabbits — J. Physiol. **95**:258.1939.
- 12 — *Bain, A.* — A method of demonstrating the humoral transmission of the effects of cardiac vagus stimulation in the frog — Quart. J. Exp. Physiol. **22**:269.1932.

(Trabalho da Secção de Endocrinologia do Instituto Butantan. Entregue em maio de 1941 e dado à publicidade em janeiro de 1942.)



