

## TEOR EM ACETILCOLINA DA GENITALIA DE RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HORMONAIIS

POR

JOSÉ R. VALLE &amp; ANANIAS PORTO

Em trabalhos anteriores com Thales Martins (1, 2) ficou demonstrado que a excitabilidade e a contratilidade farmacológica "in vitro" de canais deferentes, vesículas seminais e próstatas de ratos dependem das condições hormonais dos doadores. Nos ratos normais ou castrados tratados com testosterona, por exemplo, ao contrario do que se observa nos castrados ou tratados com estrogenos, a sensibilidade às drogas parasimpatomiméticas é bastante reduzida. Esta e outras alterações funcionais da musculatura lisa genital masculina já aparecem 30 horas depois da ablação das gônadas e se modificam 48 a 72 horas depois de uma única dose de propionato de testosterona ou de benzoato de estradiol (3). Procurando analisar estes fatos e considerando que tais alterações precedem as modificações morfológicas, mas podem depender ambas de fenômenos vasculares e metabólicos mais precoces, julgamos interessante procurar si os hormônios sexuais modificam o teor de acetilcolina daqueles órgãos, sobretudo depois dos dados de Reynolds (4), Reynolds e Foster (5) a propósito da concentração daquela substancia no útero de coelhas, gatas e ratas tratadas com estrogenos.

### MATERIAL E MÉTODO

Empregamos nestas experiencias um total de 295 ratos machos adultos de 130 a 250 g de peso, divididos em 53 grupos, 5 animais em média para cada grupo, e assim distribuidos: 50 normais, 30 castrados, 55 castrados injetados com óleo de sésamo, 62 castrados, injetados com propionato de testosterona na dose média de 5 mg. 89 castrados injetados com benzoato de estradiol na dose média de 05 mg e, finalmente, 9 castrados injetados com 0,5 e 1,0 mg de estilboestrol (\*). De

(\*) Agradecemos à Casa Schering o material hormonal (Testoviron, Progynon) e ao Prof. Jayme Pereira o estilboestrol, cedidos gentilmente para realização das nossas experiencias.

2 a 24, em média 6 dias, após a castração, os ratos eram sacrificados por decapitação de 2 a 10 em média 3 horas depois da injeção quando tratados. Foi obtido então o material para preparo de 116 extratos: 57 de genitália, isto é, canais deferentes, vesículas seminais e próstatas, e 59 testemunhas assim discriminados: 17 de intestino delgado, 13 de baço, 10 de cremasteres, 4 de pele escrotal e 15 de bexiga, próstata ventral e penis. O método seguido foi o de Chang e Gaddum (6) e usado por um de nós ao estudar a sensibilidade da *Diplobdella brasiliensis* (PINTO, 1920) á acetilcolina e aos extratos de tecidos (7). A genitália acessória de cada grupo de rato e os órgãos controles eram pesados, picados num gral em ácido tricloracético a 10% na proporção de 2 cm<sup>3</sup> por g de tecido. A papa permanecia á temperatura do Laboratório durante 2 horas, agitada neste intervalo varias vezes. Filtrava-se e reextraia-se o bagaço com solução de ácido tricloracético a 7%. O filtrado era lavado com éter em funil de separação tantas vezes quantas necessarias para remoção do ácido. Os extratos etéreos eram desprezados e o líquido obtido evaporado em banho-maria á temperatura inferior a 40°. O volume final era acertado com agua destilada de forma a 1 cm<sup>3</sup> corresponder a 1 g de tecido, depois neutralizado e, finalmente, ensaiado. Na maioria dos casos porém, depois da evaporação o material ficava na geladeira, congelado, para diluição e ensaio no dia seguinte. A neutralização do extrato era sempre feita no momento do ensaio.

A prova biológica com os extratos foi realizada empregando-se o músculo dorsal eserinado da sanguesuga *Diplobdella brasiliensis*, mergulhado em 30 cm<sup>3</sup> de Ringer e nas demais condições minuciosamente descritas em trabalho anterior (7). Examinamos alguns extratos usando o método da pressão arterial do gato e o do coração isolado da rã, *Leptodactylus ocellatus*. Em todos os casos a sensibilidade do *test* era comprovada pelo emprego de uma solução recente de cloridrato de acetilcolina "Roche" contendo 1  $\gamma$  ou 0.1  $\gamma$  por cm<sup>3</sup>. A dose de cada extrato para o músculo dorsal de sanguesuga foi habitualmente de 0.5 cm<sup>3</sup>, isto é, 0.5 g de tecido; quando era menor a sensibilidade da preparação, usavamos 1 cm<sup>3</sup> do extrato.

Em algumas experiencias a resposta obtida foi controlada quer pela alcalinização, quer pela calcinação do extrato, afastando-se assim a possibilidade da reação depender de outras substancias diferentes da acetilcolina, principalmente o potassio. No Quadro I vêm os dados relativos a alguns dos grupos experimentais. Nos grupos 47 a 50 os ratos receberam alem do oleo de sésamo puro ou dos hormonios nele dissolvidos, uma injeção subcutanea de 0.5 cm<sup>3</sup> de sulfato de eserina a 1 para 10 mil. Isto foi feito com o fito de se impedir a destruição da acetilcolina porventura liberada como consecuencia do tratamento hormonal.

## QUADRO I

## DADOS RELATIVOS A 30 DOS 105 EXTRATOS ENSAIADOS

Data	Grupo	No. do extrato	No. de ratos	Peso corporal médio (g)	Tempo de castração	Tratamento	Horas decorridas	Órgãos extraídos	Peso (mg)	Volume ensaiado e reação obtida	Sensibilidade da sangesuga à acetilcolina
11.10.40	16	25	6		24 dias	0.5mg benz. estradiol	4	Genitália (*) .....	1740	0.5 cm <sup>3</sup> ++	0.1 γ ++
	17	26	5		"	1.0mg estilboestrol	"	Baço .....	3300	1.0 " 0	
		27	4		normais	—	—	Genitália .....	850	0.5 " ++	
	18	28	4		"	"	—	Baço .....	2200	0.5 " 0	
		29	6		24 dias	0.5mg benz. estradiol	4	Genitália .....	3250	0.5 " +	
		30	6		"	"	—	Baço .....	3300	0.5 " 0	
9.1.40	27	51	5	175	2 dias	0.5mg benz. estradiol	2	Genitália .....	2850	0.5 " ++	0.1 γ ++
		52	"		"	"	2	Cremasteres .....	1700	0.5 " 0	
		53	"		"	"	2	Prost., bexiga, penis	2100	0.5 " ++	
	28	54	5	167	"	5.0mg prop. testost.	2	Genitália .....	2200	0.5 " ++	
		55	"		"	"	2	Cremasteres .....	1850	0.5 " +	
		56	"		"	"	2	Prost., bexiga, penis	1750	0.5 " ++	
14.1.41	29	57	5	155	3 dias	0.5mg benz. estradiol	4	Genitália .....	2400	0.5 " ++	0.2 γ ++
	30	62	"	154	"	5.0mg prop. testost.	"	Genitália .....	3000	0.5 " ++	
31.3.41	33	75	5	230	2 dias	5.0mg prop. testost.	5	Genitália .....	2800	1.0 " +	0.1 γ +
		76	"		"	"	5	Baço .....	4000	1.0 " 0	
	34	77	5	240	"	0.5mg benz. estradiol	"	Genitália .....	3250	1.0 " ++	
		78	"		"	"	5	Baço .....	3800	1.0 " 0	
24.4.41	35	79	5	200	54 horas	5.0mg prop. testost.	5	Genitália .....	3200	0.5 " +	0.1 γ +
		80	"		"	"	5	Baço .....	5000	0.5 " 0	
	36	81	5	220	"	0.5 cm <sup>3</sup> óleo sésamo	5	Genitália .....	4500	0.5 " ++	
		82	"		"	"	5	Baço .....	4700	0.5 " 0	
6.5.41	39	87	5	220	53 horas	0.5mg benz. estradiol	5	Intestino delgado ..	3500	0.5 " ++	0.1 γ +
		88	"		"	"	5	Genitália .....	3600	0.5 " ++	
	40	89	5	218	"	0.5 cm <sup>3</sup> óleo sésamo	"	Intestino delgado ..	5800	0.5 " ++	
		90	"		"	"	5	Genitália .....	3000	0.5 " ++	
16.5.41	43	95	4	206	6 dias	5.0mg prop. testost.	3	Genitália .....	1900	0.5 " +	0.1 γ +
		96	"		"	"	3	Intestino delgado ..	4400	0.5 " ++	
	44	97	5	181	"	0.5 cm <sup>3</sup> óleo sésamo	"	Genitália .....	2400	0.5 " +	
		98	"		"	"	5	Intestino delgado ..	4700	0.5 " ++	

(\*) Genitália = canais deferentes, vesículas seminais e glândulas coaguladoras.

## RESULTADOS E COMENTARIOS

Os resultados obtidos nos ensaios feitos com o emprego da musculatura dorsal de sanguessuga vêm resumidos no Quadro II. Dos 54 extratos de genitália examinados, somente 5 não deram efeito positivo. Si por um lado a amplitude de contração do musculo dorsal eserinado de sanguessuga e a proporção de respostas positivas foram maiores com os extratos de castrados e tratados do que de normais e castrados simples, a influencia do tratamento hormonal não ficou manifesta comparando-se a resposta aos extratos de tratados com oleo puro. Todos os 17 extratos controles de intestino foram positivos, em alguns casos a reação foi superior á registrada com os extratos de genitalia dos animais do mesmo grupo. Quanto aos extratos controles de baço, todos foram negativos; somente em 1 entre 10 extratos de cremasteres foi obtida uma resposta positiva. Nos 7 extratos de bexiga, próstata ventral e penis houve 3 respostas positivas e 4 negativas. Finalmente, os 4 extratos de pele escrotal foram todos inativos. Estes 3 últimos grupos de extratos de órgãos que dependem tambem das condições hormonais dos doadores, foram estudados para melhor análise dos resultados obtidos com os extratos de genitália. Si os hormonios sexuais liberassem acetilcolina ao nivel de toda a musculatura genital acessoria, a incidencia de resultados positivos deveria ser maior tambem nestes grupos. Como se póde vêr na fig. 1, a concentração de acetilcolina na genitália de ratos tratados com estradiol ou estiboestrol, foi praticamente a mesma apesar das doses diferentes dos estrogenos empregados; tambem nas Figs. 2 e 3 vê-se que não houve relação entre a intensidade das respostas e as condições hormonais dos doadores.

Embora tenha sido reduzido o número de provas realizadas empregando-se o método da pressão carotidiana de gatos, elas vieram corroborar os resultados acima descritos. Assim três extratos de genitália de ratos castrados e tratados com oleo puro, testosterona e estradiol e ainda eserinados, provocaram cada um efeito hipotensor de mesma intensidade, devido em grande parte, talvez, ao teor em histamina (fig 4). Nos ensaios efetuados pela técnica do coração isolado de rã observamos em certos casos diferenças de resposta conforme o extrato. Registrava-se, às vezes, aumento da amplitude sistólica invece de diminuição que seria o caso quer se tratasse da acetilcolina, quer do ion potassio. O reduzido número de provas, infelizmente, não permitiu maior esclarecimento deste fato.

Apesar das contraprovas pela alcalinização ou calcinação dos extratos, não se pode afastar categoricamente a presença do potassio cuja concentração, nos diferentes casos fica ainda para ser determinada.

Finalmente, em experiencias preliminares, tambem comparativas não se verificou um aumento do teor em acetilcolina nos extratos de uteros de ratas adultas castradas sacrificadas 3 horas depois da injeção de 0.1 mg de benzoato de estra-

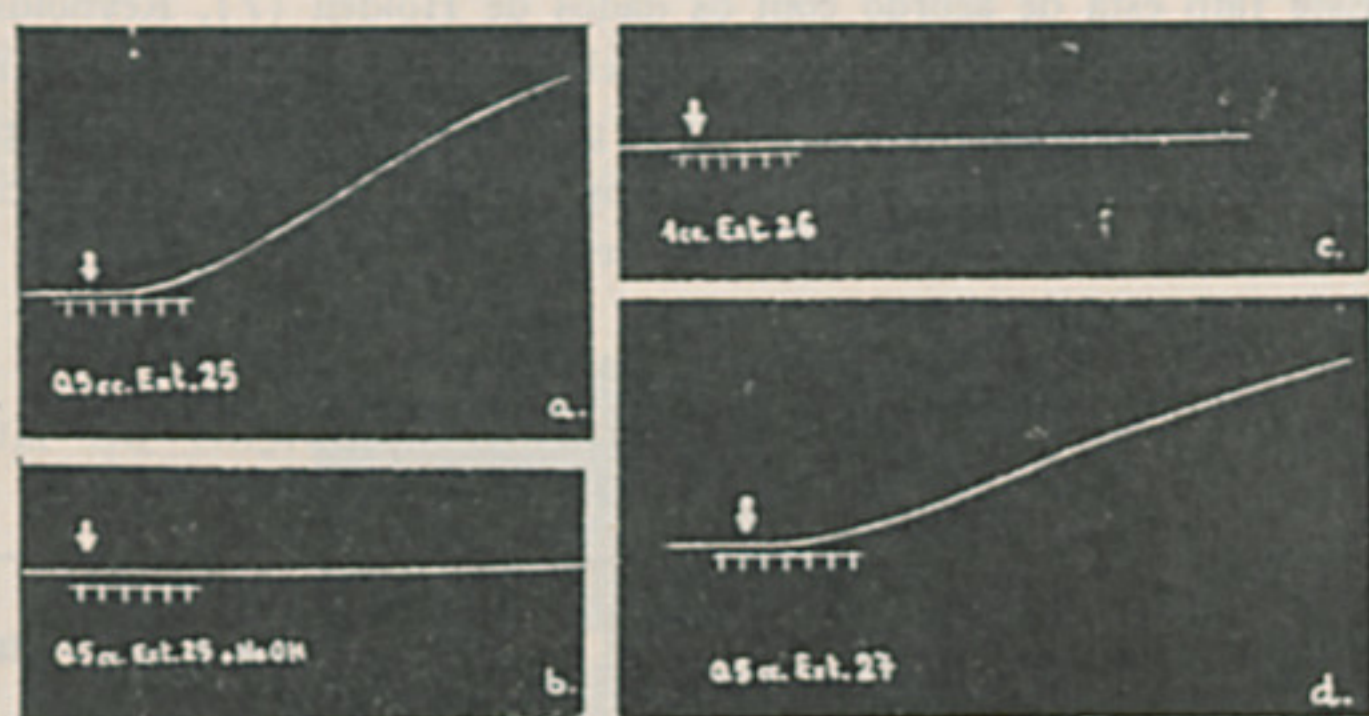


FIG. 1

Músculo dorsal eserinado de sanguessuga (preparação "in vitro"):

- Contração em resposta à adição ao banho nutritivo de 0.5 cm<sup>3</sup> do extrato n. 25, correspondente a 0.5 g de genitalia de ratos tratados com estradiol.
- Resultado da inativação alcalina do extrato n. 25.
- Efeito negativo da adição ao banho de 1 cm<sup>3</sup> do extrato n. 26, correspondente a 1 g de haços de ratos tratados com estilboestrol.
- Contração após a adição de 0.5 cm<sup>3</sup> = 0.5 g do extrato n. 27, obtido de genitalia de ratos tratados com estilboestrol.

Comparar as respostas positivas com as obtidas com os extratos de genitalia das figuras seguintes, 2 e 3.

(Em todas as figuras cada intervalo na linha de tempo corresponde a 5 segundos).

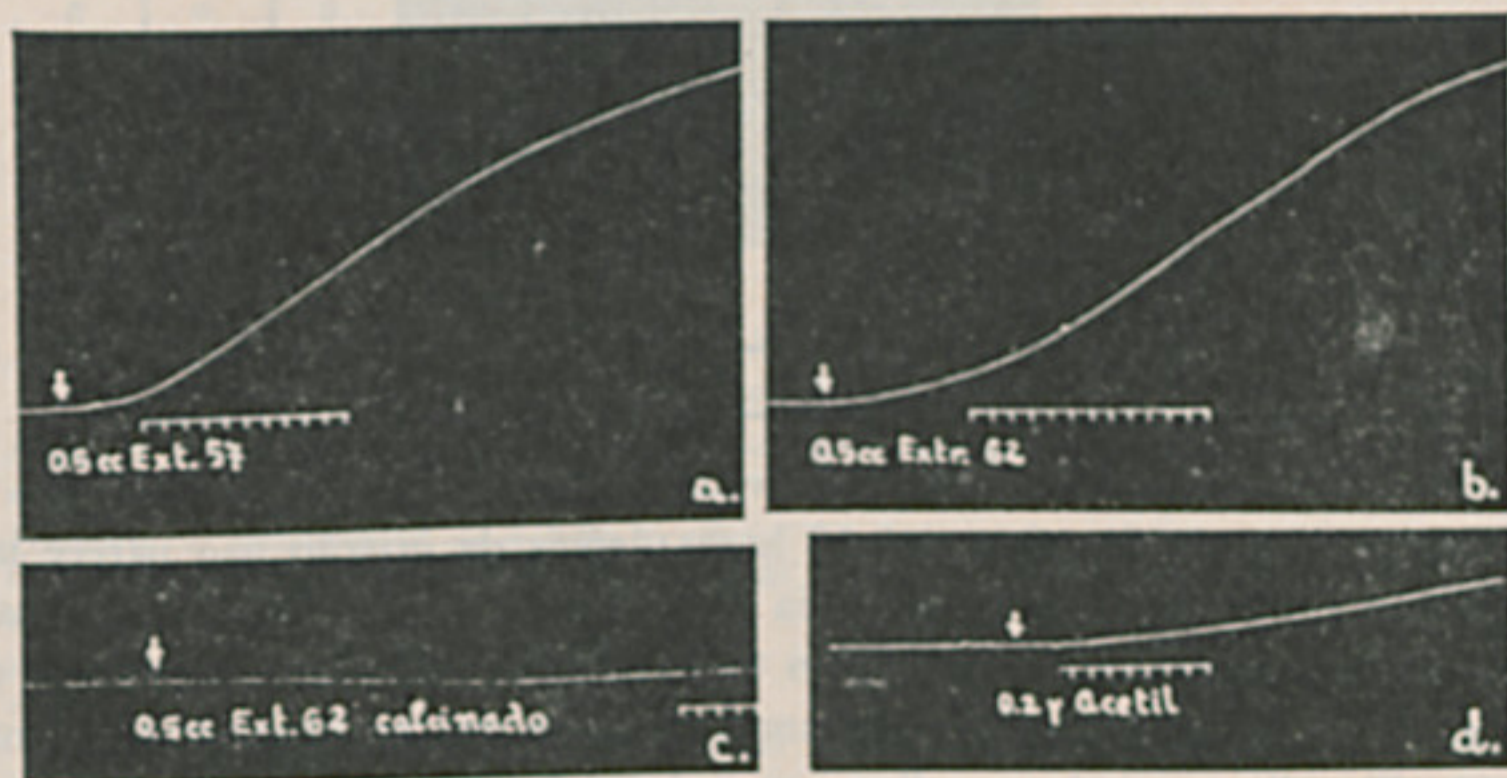


FIG. 2

Músculo dorsal eserinado de sanguessuga.

- Contração ampla após adição ao banho de 0.5 cm<sup>3</sup> = 0.5 g de extrato de genitalia de ratos tratados com estradiol (Ext. n. 57).
- Idem, idem, de ratos tratados com testosterona (Ext. n. 62).
- Efeito da calcinação do extrato n. 62.
- Sensibilidade da preparação a 0.2  $\gamma$  de acetilcolina. Estes resultados mostram que a concentração de acetilcolina na genitalia de ratos não parece depender do tratamento estrogênico.

diol. Este fato está de acordo com os dados de Holden (7), Reynolds e Foster (5) e indica que no rato, muito provavelmente, a acetilcolina não é a mediadora nos efeitos vasculares dos hormônios gonadais. Também outras pesquisas são necessárias para se decidir si, por exemplo, a histamina ou substâncias afins desempenham no caso um papel importante.

## QUADRO II

## DISTRIBUIÇÃO DOS EXTRATOS CONFORME A REAÇÃO DO MÚSCULO DORSAL ESERINADO DE SANGUESUGA

GRUPOS	Reação	Extratos de genitália	Extratos de intestino delgado	Extratos de baço	Extratos de cremaster	Extratos de pele escrotal	Extratos diversos	TOTAL
Normais	—	1		3				4
	+	7		0				7
	++	0		0				0
Castrados	—	2		2				4
	+	2		0				2
	++	2		0				2
Castrados + óleo de sésamo	—	0	0	2	1			3
	+	6	4	0	0			10
	++	4	3	0	0			7
Castrados + propionato de testosterona	—	0	0	2	4	2	2	10
	+	8	3	0	1	0	1	13
	++	4	1	0	0	0	0	5
Castrados + benzoato de estradiol	—	2	0	3	4	2	2	13
	+	7	4	0	0	0	0	13
	++	2	1	0	0	0	0	8
Castrados + estilboestrol	—	0	0	1				1
	+	0	1	0				1
	++	2	0	0				2
TOTAL		54	17	13	10	4	7	105

Em suma, o tratamento com testosterona, estradiol ou estilboestrol, nas condições experimentais descritas, até 10 horas depois da injeção não parece modificar o teor em acetilcolina da genitália masculina de ratos adultos castrados. É pouco provável portanto, que no rato a acetilcolina, ou outra substância deste tipo, esteja em jogo nos fenômenos mais precoces que se processam na intimidade da fibra lisa genital masculina e que dependiam dos hormônios gonadais.

## RESUMO

Procurando analisar as alterações funcionais da musculatura genital masculina, descritas em trabalhos anteriores, foram ensaiados 116 extratos de genitália, intestino delgado e baço de 295 ratos normais, castrados e injetados com subs-

tancias androgênicas e estrogênicas. O teor em acetilcolina destes extratos foi ensaiado em sanguesugas e, em alguns casos, também em gatos e rãs. Até 10 horas após a injeção os extratos de genitália e de intestino apresentaram quasi a mesma atividade independentemente das condições hormonais dos doadores.

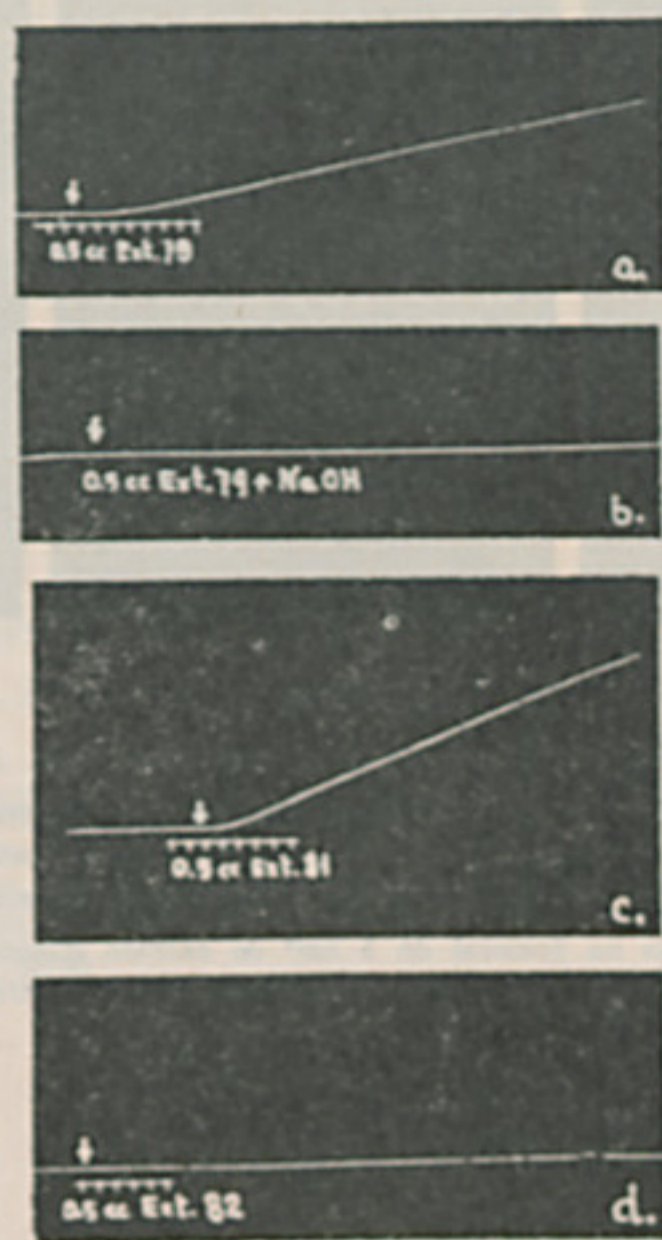


FIG. 3

Músculo dorsal eserinado de sanguesuga.

- Efeito da adição de 0.5 cm<sup>3</sup> = 0.5 g do extrato n. 79, obtido de genitália de ratos tratados com testosterona.
- Resultado da alcalinização do extrato n. 79.
- Contração após a adição de 0.5 cm<sup>3</sup> = 0.5 g do extrato n. 81, obtido de genitália de ratos tratados com óleo puro.
- Ausência de contração após 0.5 cm<sup>3</sup> = 0.5 g de extrato de baços de ratos tratados com óleo puro (Ext. n. 82).

Neste caso a concentração em acetilcolina do extrato de genitália de ratos tratados com óleo puro foi maior do que no de tratados com testosterona.

Os extratos de baço e de pele escrotal foram inativos assim como a maioria dos extratos de cremaster. É pouco provável, por conseguinte, que no rato a acetilcolina, ou outra substância próxima, esteja em jogo nos fenômenos mais precoces que ocorrem na intimidade da fibra lisa da genitália acessória masculina e que são dependentes das condições hormonais.

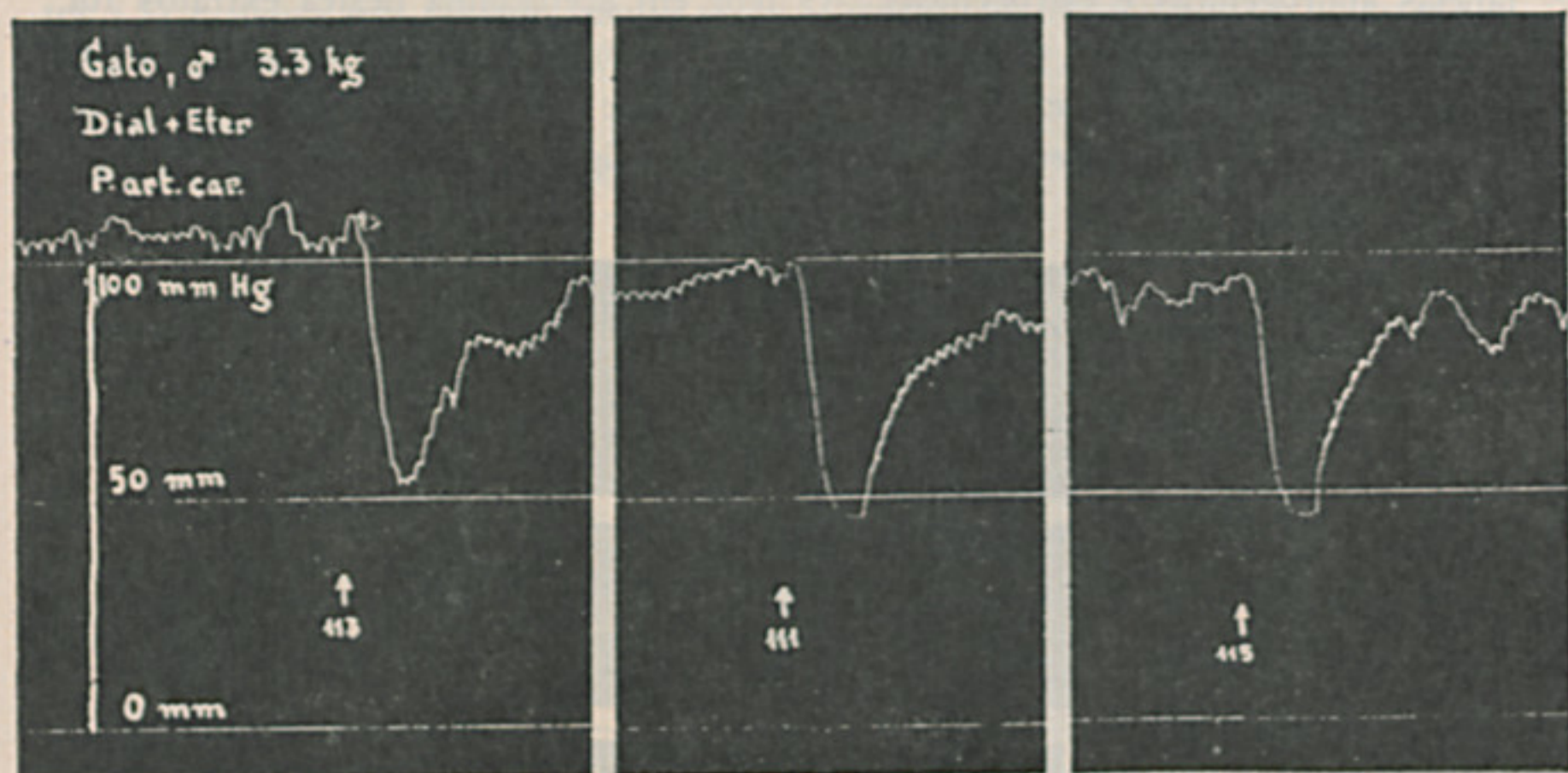


FIG. 4

Pressão arterial carotidiana de gato anestesiado com *Dial* e éter.

Extrato 111 — Genitália de ratos tratados com óleo puro

Extrato 113 — Genitália de ratos tratados com Testosterona

Extrato 115 — Genitália de ratos tratados com Estradiol

As flexas assinalam a injeção na femoral de 1 cm<sup>3</sup> do extrato diluído ao décimo. Notar que o efeito hipotensor foi da mesma intensidade nos três casos.

### ABSTRACT

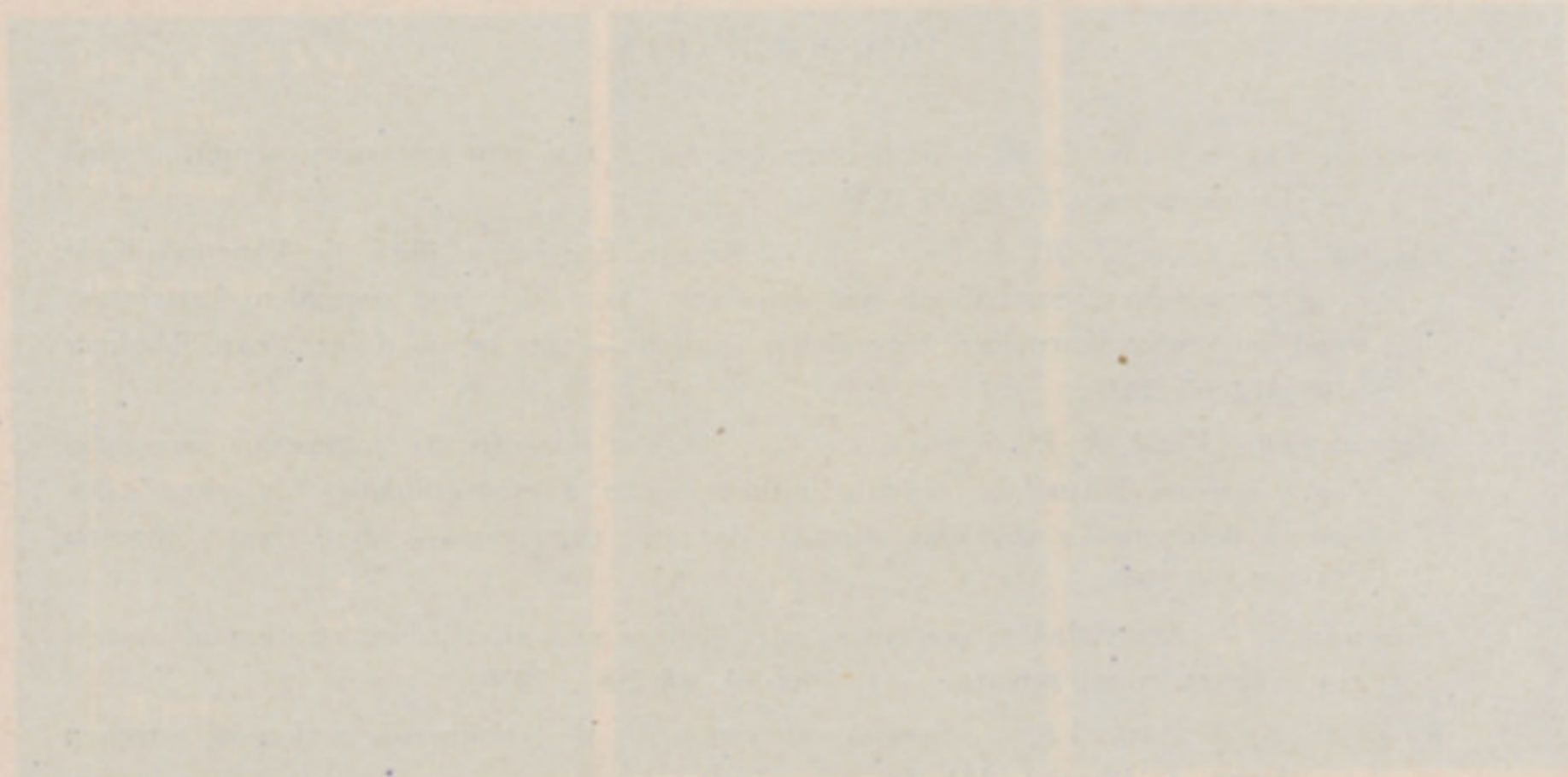
Previous works on hormonal control of the contractility and pharmacological reactivity "in vitro" of male genital organs had suggested an assay of the acetylcholine content of vasa deferentia, seminal vesicles and coagulating glands of normal, spayed, and testosterone, estradiol or stilboestrol treated rats. 116 extracts from genitals, small intestine, spleen, cremaster and scrotal skin were prepared according to the method of Chang and Gaddum and tested on dorsal muscle of eserinated leech *Diplobdella brasiliensis*. In some instances blood pressure of cats and isolated heart of frogs were also employed. Within 10 hours after the hormonal dosis subcutaneously injected, extracts of genitals and intestine exhibited quite the same activity whereas those of spleen and scrotal skin were negative. It was concluded that in rats the acetylcholine content of genital organs is not increased by androgens or estrogens. It is hardly possible, therefore, that in this species, under the action of gonadal hormones, acetylcholine or acetylcholine-like substances may have an important rôle in the initial processes occurring at the genital male musculature.



BIBLIOGRAFIA

1. *Martins, Th. & Valle, J. R.* — Endocrine control of the male accessory genital organs — *Endocrinology* 25:80-90.1939.
2. *Martins, Th.; Valle, J. R. & Porto, A.* — Neuere Ergebnisse über die Pharmakologie von Samenleiter, Samenblase und Prostata "in vitro" von normalen, kastrierten und mit Sexualhormonen behandelter Ratten — *Ztschr. f. d. ges. exp. Medizin* 105:512-521.1939.
3. *Martins, Th.; Valle, J. R. & Porto, A.* — Sobre a duração do tratamento necessario para que os hormônios sexuais influam sobre a contratilidade "in vitro" dos canais deferentes e vesículas seminais de ratos castrados — *Mem. Inst. Butantan* 14:129-136.1940.
4. *Reynolds, S.* — Acetylcholine content of uteri before and after administration of oestrin to ovariectomized rabbits. — *J. Physiol.* 95:258. 1939.
5. *Reynolds, S. & Foster, F.* — Species differences in the cholinergic action of estrogen — *Amer. J. Physiol.* 131:200-203. 1940.
6. *Chang, H. & Gaddun, J.* — Choline esters in tissue extracts — *J. Physiol.* 79:255-285. 1933.
7. *Valle, J. R.* — Sensibilidade á acetilcolina da sanguessuga *Diplobdella brasiliensis* (PINTO, 1920) — *Mem. Inst.*15:17-25. 1941.
8. *Holden, R. B.* — Vascular reactions of the uterus of the immature rat — *Endocrinology* 25(4):593-596. 1939.

(Trabalho da Secção de Endocrinologia do Instituto Butantan.  
Entregue para publicação em 11 de outubro de 1943 e  
dado á publicidade em dezembro de 1943).



El autor agradece a los miembros del jurado por su participación en el proceso de evaluación de esta tesis. Asimismo, agradece a los miembros de la familia por su apoyo y comprensión durante este proceso. Finalmente, agradece a los amigos por su compañía y apoyo durante este proceso.

Este trabajo de tesis fue desarrollado durante el periodo de tiempo comprendido entre el mes de agosto del 2010 y el mes de mayo del 2011. Durante este periodo de tiempo, el autor ha estado trabajando en estrecha colaboración con su supervisor, el Dr. [Nombre], quien ha brindado su apoyo y orientación durante todo el proceso. Asimismo, agradece a los miembros de la familia por su apoyo y comprensión durante este proceso. Finalmente, agradece a los amigos por su compañía y apoyo durante este proceso.