

EFEITOS DE IONS NA CONTRAÇÃO MUSCULAR DE MOLUSCO GASTRÓPODE

PEDRO ERNESTO HAESER

Depart. Fisiol. Geral — Inst. Biociências Univ.
São Paulo e Lab. Fisiol. Fac. Fil. Ciências e
Letras São Leopoldo. Caixa Postal, 11.230 São
Paulo — ZC 9 - Brasil.

INDICE

| | | |
|----|----------------------------------|-----|
| 1. | Introdução | 89 |
| 2. | Material e Método | 91 |
| 3. | Parte Experimental: | |
| | A. Solução Fisiológica | 94 |
| | a. Sódio | 96 |
| | b. Potássio | 97 |
| | c. Cálcio | 97 |
| | d. Magnésio | 97 |
| | e. Sulfato | 101 |
| | f. pH e Dióxido de Carbono | 101 |
| | g. Pressão Osmótica | 102 |
| | B. Gradientes iônicos | 104 |
| | a. Sódio | 104 |
| | b. Potássio | 106 |
| | c. Cálcio | 109 |
| 4. | Discussão | 114 |
| 5. | Resumo | 118 |
| 6. | Conclusões | 118 |
| 7. | Bibliografia | 119 |

RESUMO — Apresenta-se uma solução fisiológica para *Strophocheilus oblongus musculus*, tomando como ponto de partida das experiências, as quantidades dialisáveis do sangue, do mesmo gastrópode. Deu resultados satisfatórios a solução com a seguinte composição, calculada em g/L com sais anidros: NaCl : 1.356 g; KCl : 0.178 g; CaCl₂ : 0.688 g; MgCl₂ : 1.638 g; Na₂SO₄ : 0.135 g; NaHCO₃ : 0.714 g; Glicose : 3.6 g. Se a solução se destinar a estímulos à base de ACh deve-se excluir o MgCl₂ e aumentar o teor de glicose para um total de 12,6 g/L.

*

EFFECTS OF IONS ON THE CONTRACTION OF THE MUSCLE OF GASTROPOD MOLLUSC

ABSTRACT

1. A satisfactory physiological solution for ***Strophocheilus oblongus***, ***musculus*** according to the amount of potassium; calcium, magnesium, sulfat, ions similar to those dialysed from the blood of same gastropod, is presented, measured in g/L with anhydrous salts : NaCl : 1.356; KCl : 0.178 — CaCl₂ : 0.688 — MgCl₂ : 1.638 — Na₂SO₄ : 0.135 — NaHCO₃ : 0.714 — Glicose: 3.6. If the solution is destined to be stimulated by ACh, MgCl₂ must be added and increasing the content of glicose to a total of 12.6 g/L.

2. Afinity between magnesium and the cardiac fibers is studied.

3. Normal contraction of the penis retractor muscle (p.r.m.) with but 35% of total sodium existing in the blood occurs.

4. Decreasing of the amplitude of the contractions with 5 mEq/L of Sodium is registred.

5. Lacking Sodium in the solution does not allow the p.r.m. to contract when stimulated by ACh, 10⁻⁵.

6. In the long way from 100% (2.4 mEq/L) to 0% of Potassium in the solution (0.002 mEq/L the p.r.m. shows the same amplitude of contraction and the same relaxation time.

7. Near 0% of Potassium in the solution, the p.r.m. begins to contract spontaneously, but it is still possible to obtain contractions when stimulated by ACh.

8. Normal contractions of p.r.m. were obtained when the perfusion solutions is provided with Calcium from 1.5 mEq/L to 4.5 mEq/L.

9. The amplitude of contractions decrease when the amount of Calcium is reduced to near about 2.5 mEq/L, which corresponds to 10% of the ionic Calcium of the blood.

10. The p.r.m. does not react to $AChx10^{-5}$ when Calcium is lacking in the perfusion solution.

11. The low ionic content with which the r.p.m. of *Strophocheilus* functions may help to explain its ecology.

1.

INTRODUÇÃO

O estudo da fisiologia do sistema muscular encontra nos Moluscos material excepcionalmente interessante, não só pelas relações características existentes entre esse sistema e o circulatório que inclui seios sanguíneos, como pela capacidade destes animais de se adaptarem a diversos ambientes.

Realmente, devido à sua extensa distribuição, tanto em pleno oceano, em que é alta a salinidade, como nas regiões estuárias, onde o teor de sais é relativamente baixo, e ainda na água doce e mesmo na terra úmida, esses animais oferecem campo adequado para estudos referentes à influência dos ions no comportamento de certas estruturas, como por exemplo os músculos.

Com o intuito de avaliar também o papel dos ions habitualmente usados em soluções perfusoras na contração muscular, fomos levados, por sugestão do Prof. Dr. PAULO SAWAYA a estudar o comportamento do músculo retrator do penis (*m.r.p.*) de um molusco gastrópode terrestre, o *Strophocheilus oblongus musculus* (*S.o.m.*). Este caracol é bastante comum no Sul do Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul. Sawaya, Petersen 1962, p. 38)

Visamos neste estudo não somente avaliar a influência de ions em diversos gradientes na excitabilidade do *m.r.p.*, como contribuir, talvez, para um melhor entendimento da fisiologia do músculo.

Esperamos, assim, contribuir para o estudo da fisiologia da fibra muscular lisa de Invertebrados, investigação que constitui um dos programas de trabalho atualmente em curso

no Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo.

Os músculos da maioria dos moluscos em comparação com os de outros Invertebrados respondem com rapidez à Acetilcolina (ACh), sendo também rápido o tempo de relaxamento, e, por isso, escolhemos êste éster como excitante. Como acontece com outros músculos lisos de Invertebrados, por ex., o músculo longitudinal do corpo da *Holothuria grisea* (SAWAYA 1962, p. 5) e o músculo retrator da lanterna do Ouriço — *Echinometra locunter* (MENDES et al., no prelo), quando submetidos à ação da ACh, também o *m. p. r.* do *Strophocheilus* responde imediatamente ao estímulo e relaxa logo após a lavagem. Daí oferecer o referido *m.* quando estimulado pela ACh condições adequadas para o estudo da influência da variação iônica no fenômeno da contração, e possibilitar, talvez, uma correlação com o comportamento do animal.

Por outro lado, ao procurar utilizar o *m. r. p.* para o presente estudo, logo de início deparamos com a dificuldade de adotar uma solução adequada para a perfusão. Nesta pesquisa pudemos verificar, desde logo, que para o *m. r. p.* de *Strophocheilus* as soluções aconselhadas por RIPPLINGER, BINET, et. al., JULIEN et. al., ZETTLER e SCHLOSSER, para as várias espécies de *Helix*, não serviam, como foi assinado por JAEGER (1961). Verificamos também não ser adequada a fórmula de solução perfusora proposta por êste último autor (l.c.) pelo menos para os animais que tivemos em mão, pois as respostas do *m. r. p.* eram sucessivamente menores. À vista disso, preliminarmente, procuramos obter uma solução perfusora que satisfizesse às condições necessárias para o estudo das variações iônicas sobre o aludido músculo.

No presente trabalho, primeiramente apresentaremos os resultados conseguidos na preparação da solução fisiológica, e, a seguir, os referentes às variações dos gradientes iônicos.

A elaboração dêste trabalho foi possível graças à licença do Diretor da Faculdade de Fisiofologia, Ciências e Letras de São Leopoldo (RS) a cujo corpo docente temos a honra de pertencer para estagiar no Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo; ao Conselho Nacional de Pesquisas, à Reitoria da Universidade de São Paulo e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelas bolsas que sucessivamente nos concederam; ao Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo, pelas facilidades oferecidas colocando o equipamento e as drogas necessárias à nossa disposição. A todos deixamos aqui os nossos agradecimentos, que são extensivos também ao Prof. Dr. Antônio Barros de Ulhôa Cintra, da 1.^a Clínica Médica (U.S.P.) e ao Dr. Francisco Bastos de Jorge, Chefe do Laboratório da referida Clínica, pelo grande auxílio prestado na determinação do teor mineral do sangue do Molusco.

Cumpre-nos agradecer de modo especial ao Prof. Dr. Paulo Sawaya, Diretor do Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo, pela valiosa orientação dada ao presente trabalho, e aos Profs. Drs. Erasmo G. Mendes e Domingos Valente pelas sugestões apresentadas.

2.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os gastrópodes procediam de Santa Cruz do Sul (RS) e eram conservados no terrário do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, em condições tidas como ótimas, sendo alimentados com hortaliças variadas.

O *m.r.p.* era dissecado após a retirada da concha que, para isso, era quebrada com o auxílio de um alicate. A dis-

secção era feita rapidamente após retirada parcial do manto, isolando-se o *m.r.p.*, cujas extremidades de inserção eram atadas com fios de linha. Retirado o músculo, era o mesmo colocado no aparelho de perfusão, dentro da solução perfusôra, arejada por meio de um pequeno motor compressor. A seguir, conjugava-se a extremidade livre do músculo com uma alavanca inscritôra isotônica do tipo frontal, com a qual se obtinham os registros gráficos.

Não se usou anestesia durante o ato operatório. Cuidou-se de evitar ruptura dos órgãos do animal, especialmente da glândula do intestino médio, a qual, como se sabe, secreta um fluído com enzimas que, sem dúvida, viriam interferir no processo da contração.

Utilizou-se como excitante o Cloreto de Acetilcolina de Matheson-Coleman & Bell, na concentração de $10\mu\text{g}$ por ml.

A fim de preparar a solução fisiológica desejada, fomos levados a determinar o teôr iônico do sangue do *S.o.m.*. Para isso socorremo-nos do equipamento e da orientação técnica da 1.^a Clínica Medica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Serviço do Prof. Antonio Barros de Ulhôa Cintra, que permitiu recebermos o auxílio do Dr. Francisco Bastos de Jorge. Os resultados encontram-se no trabalho feito com a colaboração do Dr. De Jorge (1964). Apresentamos na Tabela I parte destes resultados.

De posse desses dados, preparamos várias soluções perfusôras, procurando verificar sua influência sôbre as contrações do *m.r.p.*. Com as soluções obtidas fizemos também a perfusão do coração isolado para comparação.

Tôdas as experiências se realizaram à temperatura do laboratório, i.é, entre 20-25°C. As relativas à investigação da solução fisiológica efetuaram-se no verão, e as referentes aos gradientes iônicos, no inverno.

Os animais que se apresentavam em hibernação ou estivação foram levados à vida ativa por aclimação prévia à tem-

TABELA I

Constituintes do sangue de *Strophocheilus oblongus musculus*

| Elementos determinados | Unidade | N.º de animais | Sangue antes da diálise | | Sangue depois da diálise | | Material dialisado % | |
|------------------------|-----------|----------------|-------------------------|-------|--------------------------|-------|----------------------|------|
| | | | Faixa de Variação | Média | Faixa de Variação | Média | | |
| Sódio | mEq/L | 9 | 32.0 | 35.2 | 33.6 | 0.0 | 0.0 | 100 |
| Potássio | mEq/L | 9 | 2.3 | 2.6 | 2.4 | 0.0 | 0.0 | 100 |
| Cloro | mEq/L | 5 | 48.0 | 61.5 | 53.0 | 0.0 | 0.0 | 100 |
| Cálcio | mg/100 ml | 9 | 47.5 | 53.5 | 50.8 | 25.1 | 26.8 | 48.8 |
| Magnésio | mEq/L | 9 | 33.7 | 39.0 | 36.7 | 2.0 | 2.2 | 94.0 |
| Cobre | mg/100 ml | 5 | 7.905 | 8.480 | 8.245 | 4.895 | 5.030 | 40.0 |
| Enxofre | mg/100 ml | 5 | 5.35 | 7.45 | 6.00 | 2.85 | 3.15 | 50.9 |
| Ceruloplasmína | mg/100 ml | 5 | 5.3 | 8.9 | 6.3 | 0.00 | 0.00 | ? |

(*) Segundo De Jorge, F. B., Ulhôa Cintra, A. B., Haeser, P. E., Sawaya, P. (1964)

peratura do laboratório e por administração de alimentos. A aclimação à temperatura fez-se à custa de água aquecida à ca. de 30°C lançada em jatos sôbre o animal.

Em tôdas as experiências procurou-se manter a mesma pressão osmótica (150 mOsm./L) da solução, fazendo-se a compensação com glicose. Usamos água bidestilada para as soluções, e para maior certeza da manutenção do teor iônico, fizemos ainda a determinação dos ions na solução. Determinamos o sódio e potássio pelo espectrofotômetro de chama; o cálcio pelo método de CLARK & COLLIP (1925); o magnésio pelo método de De JORGE et al. (1964).

O número de animais usados para experiência nunca foi inferior a cinco. Empregamos ca. de 500 *S.o.m.* todos adultos. Como se sabe, são animais hermofroditas.

As drogas utilizadas tôdas P. A. foram as seguintes: NaCl «Merck» Alemanha; KCl «Carlo Erba», Milão; NaHCO₃ «Carlo Erba, Milão; MgCl₂ «Baker & Adamson», nova York; Na₂SO₄ «Baker & Adamson», Nova York; Destrose «Baker Chemical», Nova Jersey.

3.

PARTE EXPERIMENTAL

A. *Solução Fisiológica*

De posse dos dados referidos na Tabela I, preparamos as soluções perfusôras para *S.o.m.*. A primeira solução, contendo qualitativa e quantitativamente tôdas as substâncias dosadas no sangue antes da dialise, mostrou-se completamente ineficaz, pois o músculo, banhando nesta solução, não respondeu a nenhum estímulo. O coração isolado bateu apenas durante poucos instantes. Estes resultados não foram de todo inesperados. A solução preparada continha Cobre, sob a forma de um sal inorgânico. Êste metal é reconhecidamente tó-

xico, mesmo em quantidades mínimas, mas a despeito da tolerância ao Cobre demonstrada por animais que possuem hemocianina (ZUKERKANDL, apud PROSSER-BROWN (1962) é provável que no caso do *S.o.m.* o metal tenha alguma ação tóxica, pelo menos na concentração usada. Por essa razão foi o mesmo eliminado da composição da solução definitiva. Além disso, quanto aos outros ions, JULIEN et al. (1955, p. 725), estudando a relação existente entre ions do sangue de *Helix*, e ions de uma solução fisiológica adequada para os mesmos, já haviam verificado que as quantidades existentes no sangue nem sempre eram as quantidades ótimas para uma solução perfusora. E como justificativa de sua opinião, lembram que, na dosagem dos diferentes componentes do sangue se obtém a quantidade total de cada um deles, abstraindo do modo de como ali se encontram, i.é, no estado iônico, ou ligados a uma molécula mais complexa. Referiram-se êstes autores ao Sódio e ao Potássio. À vista disso, preferimos compôr a solução fisiológica na base das quantidades de ions obtidos do sangue por dialise através de membrana de celofane, tal como consta da Tabela I, excetuando-se o Cobre.

Esta série de experiências com soluções feitas à base dos dados colhidos com a dosagem do material dializado, apresentou resultados mais positivos. Reduzindo e eliminando alguns componentes, e confrontando os diferentes resultados, chegamos a estabelecer a fórmula de uma solução satisfatória tanto para o *m.r.p.* como para o coração. Este, perfundido com esta solução, pulsou ininterruptamente durante 4 1/2 a 5 dias; os músculos retratores também funcionaram satisfatoriamente, pois, deixados no banho, responderam ao estímulo de ACh durante 5 e mais dias.

Seja lembrado, desde já, que a escolha da ACh como estimulante decorreu de uma série de experiências preliminares, nas quais se verificou que o limiar de contração estava em torno de 10^{-7} ($.1\mu\text{g/ml}$ sendo conveniente a concentração de $10\mu\text{g/ml}$).

De acôrdo com os resultados destas experiências, como foi dito, preparamos a seguinte solução perfusôra, calculada com sais anidros em g/L:

| | | | |
|---------------------------------|---|-------|---|
| NaCl | : | 1,356 | g |
| NaCl | : | 0,178 | g |
| CaCl ₂ | : | 0,688 | g |
| MgCl ₂ | : | 1,638 | g |
| Na ₂ SO ₄ | : | 0,135 | g |
| NaHCO ₃ | : | 0,714 | g |
| Glicose | : | 3,6 | g |

Se a solução se destinar à fisiologia dos retratores estimulados com ACh, deve-se excluir o MgCl₂, e aumentar o teor de glicose para um total de 12.6 g/L. Na parte correspondente ao Mg (p. 14) discutiremos os motivos da exclusão destes ions.

Examinando cada componente em separado, temos o seguinte (Tabela II):

a) *S ó d i o*

Média dosada no sangue: 33.6 mEq./L

Todo o sódio do sangue é dializável.

Já que todo o Sódio existente no sangue é iônico ou pelo menos ionizável, como indicam as taxas obtidas, usamos tôda a quantidade encontrada. Fizemo-lo sob a forma de cloreto, sulfato e bicarbonato. A alteração da taxa de Na para ± 10 mEq./L, não induziu diferenças nas respostas do *m.r.p.* no primeiro dia da experiência, segundo a análise da variância ($P > .05$). Contudo, do segundo dia em diante, registrou-se diferença significativa ($P < .05$ — corrigido o decaimento da amplitude da concentração causado pela fadiga muscular) em favor de soluções com menos sódio.

b) Potássio

Média dosada no sangue: 2.4 mEq./L
Todo o Potássio do sangue é dializável.

Como no caso precedente, colocamos na solução uma quantidade de Potássio correspondente a todo o ion dosado, para manter a relação Na/K em equilíbrio.

ARVANITAKI e CARDOT (1931, p. 186) assinalam que a relação Na/K conseguida pela dosagem do sangue de 4 espécies de *Helix* era igual à relação dos mesmos ions nas soluções fisiológicas empiricamente encontradas.

c) Cálcio

No sangue não dializado: 50.8 mg% (25.4 mEq./L)
Quantidade dializada: 24.8 mg% (12.4 mEq./L)

Confrontando os resultados de quatro soluções fisiológicas contendo respectivamente 12 mEq./L, 9 mEq./L, 6 mEq./L e 3 mEq./L de Cálcio, sob a forma de CaCl_2 , verificamos que o *m.r.p.*, sob a ação do referido estimulante, não acusa diferenças. O coração, porém, reagiu de modo diverso: a redução de 12 mEq./L para 6 mEq./L de Cálcio implicou numa diminuição de metade dos dias de sobrevivência, quando pulsava em solução fisiológica. Por êste motivo, conservamos na solução uma taxa de Cálcio correspondente ao Cálcio dializado.

d) Magnésio

No sangue não dializado: 36.7 mEq./L
Quantidade dializada : 34.5 mEq./L

O coração isolado destes moluscos, colocado em banho perfusor desprovido de Magnésio, mas com todos os demais ions nas concentrações acima indicadas, cessava de pulsar após 5-10 horas. No entretanto, era suficiente acrescentar, nesta ocasião, alguns cristais de MgCl_2 ao banho, para que o

órgão retomasse o ritmo normal. Das várias doses experimentadas, de 0 até 37 mEq./L, essa última se mostrou a mais eficiente.

É conhecida a afinidade do Magnésio pela fibra cardíaca. GLASSER e BRANDT (1959), por exemplo, injetaram Mg^{28} em cães e coelhos, sacrificando-os posteriormente, e — procedendo à contagem dos impulsos de cada órgão separadamente — localizaram no coração desses mamíferos a maior porcentagem do magnésio marcado injetado. A explicação desta afinidade, segundo estes autores, não seria de natureza histológica, mas fisiológica. O magnésio desempenharia «uma função importante no intrincado metabolismo do músculo cardíaco» (p 376).

Os resultados levaram-nos a estender a importância do Magnésio também para a sobrevivência do coração isolado de *Strophocheilus*, o que, aliás, concorda com as pesquisas de KRIJGHMAN e DIVARIS (1955, p. 21) e as de HILL (1958) sobre o mecanismo contractil e o «pacemaker» do coração dos moluscos. Segundo estes autores, o coração dos moluscos e o dos vertebrados têm muita semelhança farmacológica.

Em dosagens que fizemos do teor de Magnésio no tecido cardíaco deste gastrópode, encontramos 25,38 mEq. por 100 g de tecido, ao passo que nos músculos retratores, a quantidade de Magnésio foi apenas de 12 mEq. por 100 g de músculo, o que, vem justificar de algum modo a afinidade do tecido cardíaco por este ion.

Devemos lembrar que com o *m r p* os resultados foram completamente diversos. A ausência ou pequenas doses de Magnésio (2 a 3 mEq./L) não influíam nas respostas do *m.r.p.* à ACh, nem mesmo no segundo ou terceiro dia da experiência. Mas, em soluções com doses iguais de Cálcio (12 mEq./L) e crescentes de Magnésio (desde 5 mEq./L até 37 mEq./L) as respostas do *m.r.p.* eram progressivamente menores (Fig. 1).

Se, porém, em vez de 12 mEq./L de Cálcio se tomavam 14.5 mEq./L o bloqueio se verificava somente com doses maiores de magnésio (30 mEq./L) (Fig. 2).

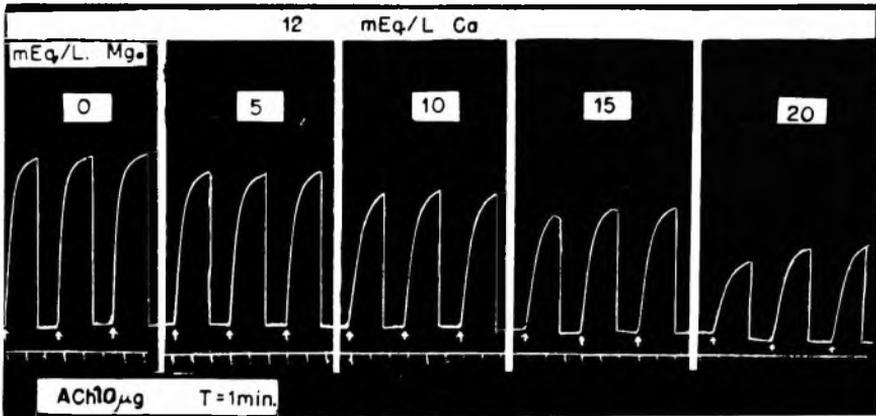


FIG. 1. Relação Ca/Mg — Respostas do m.r.p. a $10 \mu\text{g/ml}$ de ACh, em solução fisiológica com quantidade constante de Cálcio (12 mEq./L) e quantidades crescentes de Magnésio (de 0, 5, 10, 15, 20 mEq./L). Notar a ação bloqueadora do Magnésio inibindo a ação da ACh.

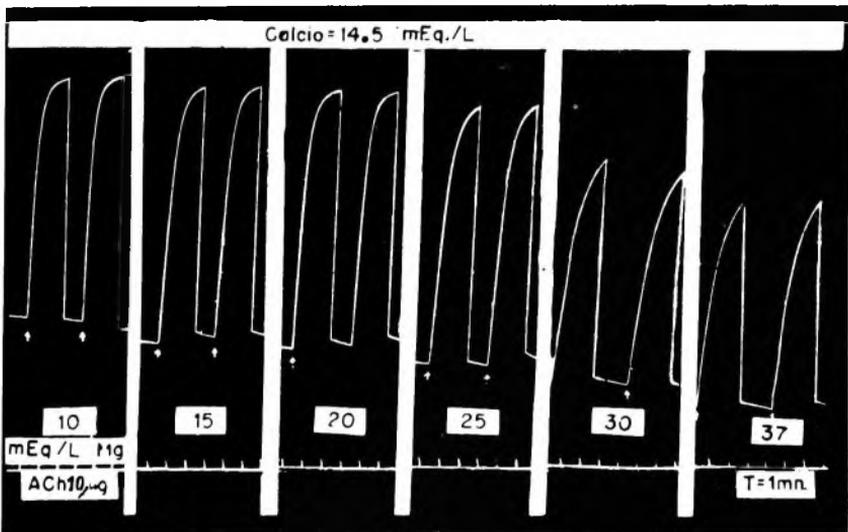


FIG. 2. Relação Ca/Mg — Respostas do m.r.p. à ACh ($10 \mu\text{g}$) em solução fisiológica com 14.5 mEq./L de Cálcio (dose maior do que no caso precedente) e com doses crescentes de Magnésio (de 10, 15, 20, 25, 30, 37 mEq./L). O bloqueio se verifica apenas a partir de 36 mEq./L de Magnésio.

Tudo leva a crer que se trata de um bloqueio da ACh pelo Magnésio. Com efeito, Del CASTILO e ENGBAEK (1954, p. 377), estudando a ação bloqueadora do Magnésio na transmissão neuromuscular no sartório de rã, verificaram uma drástica redução da amplitude do potencial de placa, e uma diminuição da excitabilidade direta das fibras musculares. Do confronto dos resultados concluíram que o principal efeito do Magnésio era diminuir a quantidade de ACh liberada pelo impulso nervoso motor. Com excesso de Cálcio eram necessárias doses maiores de Magnésio para haver o mesmo efeito inibidor. Portanto, a quantidade ativa de ACh, liberada por estímulo nervoso motor era dependente da relação Ca/Mg presente no músculo. HUTTER e KOSTIAL (1954, p. 237) estudaram o fenômeno no gânglio superior cervical do gato, chegando praticamente às mesmas conclusões. Também SATO et al. (1960, p. 86), ao analisarem a atividade elétrica do m. retrator da farínge de dois gastrópodes da família *Fruticolidae*, verificaram que a ausência do Magnésio ou o aumento do Cálcio na solução, produzia respostas maiores do músculo. Por isso, omitiram o Magnésio da solução. É de se notar que as soluções fisiológicas usadas para os gastrópodes, tanto por RAMSEY (1940, p. 99) como por SATO et al. (1.c.) são diferentes da nossa, na qual, como vimos, bastava a presença de 5mEq./L de Magnésio para se iniciar uma redução da contração muscular, em presença de 12 mEq./L de Cálcio.

JENKINSON (1957, p. 443), pesquisando a natureza do antagonismo entre os ions de Calcio e Magnésio na junção neuromuscular de rã, achou que tratava de uma competição entre estes ions pelo «receptor» que regula a quantidade de ACh

WOOD (1957, p. 136), trabalhando com insetos, sugere a existência de uma membrana em tórno de fibras e feixes musculares, que agiria como barreira seletiva de ions.

No nosso caso, dadas as características do *m.r.p.* serem mais semelhantes às dos m. esqueléticos dos Vertebrados, fato já lembrado por ABBOT e LOWY (1958, p. 385), parece-nos

admissível o fenômeno da competição entre Cálcio e Magnésio como lembrado por JENKINSON (1. c.).

e) *Sulfato*

Média de Enxofre (como SO_4) no sangue não dializado: 6.0 mg%.

Quantidade dializada: 3.05 mg%

Não encontramos na literatura consultada referências especiais sobre a possível função do Sulfato em soluções fisiológicas, não sendo nem mesmo referido por LOCKWOOD (1961) em sua ótima síntese sobre soluções fisiológicas.

Ao analisar a composição das principais soluções propostas por diferentes autores, encontramos em alguns, indicação de Sulfato de Magnésio, mas certamente mais em razão do Magnésio do que do Sulfato.

Em nosso estudo, notamos serem iguais as respostas do *m.r.p.* estimulado pela ACh e perfundido com ou sem Sulfato. Somente nos estímulos aplicados 24 horas após ter sido isolado, é que se registraram algumas diferenças nas respostas do músculo, respostas maiores com sulfato de sódio, e menores sem êle.

Tendo em conta êstes resultados, optamos pela inclusão do sulfato, pois pelo visto, parece deixar o músculo apto por mais tempo.

f) *pH — Dióxido de Carbono*

pH do sangue : 7,644

Dióxido de Carbono : 23,0 mEq./L

Segundo KERKUT e LAVERACK (1957, p. 99) que mediram o consumo de Oxigênio em tecidos de *Helix*, a taxa respiratória dêste gastrópode se elevou consideravelmente em presença de HCO_3 no Ringer. Por isso, e também pela baixíssima dose de PO_4 presente no sangue de *Strophocheilus*, re-

solvemos equilibrar o pH da solução com a adição de Bicarbonato. Fizemo-lo com 8.5 mEq./L de CO₂, adicionados sob a forma de 0.714 gr/L de NaHCO₃, obtendo um pH praticamente igual ao do sangue.

g) *Pressão Osmótica*

Pressão osmótica do sangue: 156 mOsm./L

Como se sabe, as soluções fisiológicas não precisam ter exatamente a pressão osmótica igual à do sangue dos respectivos animais.

ARVANITAKI e CARDOT (1931, p. 186), estudando a relação entre Ringer para o coração isolado de quatro espécies de *Helix* e a composição do sangue, mostraram que as soluções hipertônicas eram melhores.

Com razão afirma LOCKWOOD (1961, p. 250) que, estando a célula em estado dinâmico de troca com o meio, é pouco provável que ela tenha a mesma pressão osmótica deste meio, apesar de tender para a igualdade.

A pressão osmótica das soluções empregadas em nossas experiências com o *m.r.p.* foi de 150 mOsm./L. Verificamos ser este músculo insensível a variações de aproximadamente mais ou menos 20 mOsm./L. A adição de quantidade demasiadamente grande de glicose, para fins de compensação osmótica, pode acarretar uma excessiva densidade da solução. Por isso, tendo em vista a exclusão total do Magnésio na solução fisiológica e as grandes variações das concentrações dos demais ions, mantivemos na solução uma pressão osmótica levemente inferior, i.é., de 10 mOsm./L. a menos.

Experimentamos o Cloreto de Sódio para fins de compensação osmótica, como o fizeram BRECHT et al. (1964, p. 331) estudando tecido vascular de mamífero estimulado eletricamente, mas houve interferência iônica, manifestada pelo tipo irregular das respostas.

A Tabela II relaciona os ions dialisáveis do sangue, com as taxas usadas na solução fisiológica.

T A B E L A I I
 Confronto entre
 SANGUE de S.o.m. (Cfr. Tab. I) e SOLUÇÃO FISIOLÓGICA para o mesmo.

| Sangue de <i>Strophocheluis</i> | | | Solução Fisiológica | | Osmolaridade | |
|---------------------------------|---------------------|-------------|------------------------|-----------------------------|---|--------|
| Substâncias | Não dializado/litro | % dializada | Quant. dializada/litro | Constituição iônica p/litro | Quantidades de Substâncias usadas por litro (1) | mOsm/L |
| Na | 33.6 mEq | 100 | 33.6 mEq | 33.6 mEq | 1.356 g NaCl | 46.4 |
| K | 2.4 " | 100 | 2.4 " | 2.4 " | 0.135 g Na ₂ SO ₄ | 2.7 |
| Ca | 25.4 " | 48.8 | 12.4 " | 12.4 " | 0.714 g NaHCO ₃ | 8.5 |
| Mg | 36.7 " | 94 | 34.5 " | 34.5 " | | |
| S | 60 mg | 50.9 | 30.5 mg | 30.5 mg | | |
| | | | | | 0.178 g KCl | 4.7 |
| | | | | | 0.688 g CaCl ₂ | 18.5 |
| | | | | | 1.638 g MgCl ₂ | 49.5 |
| | | | | | (2) | |
| | | | | | Na ₂ SO ₄ | |
| | | | | | NaCl | |
| | | | | | KCl | |
| | | | | | CaCl ₂ | |
| | | | | | MgCl ₂ | |
| Cl | 53.4 mEq | 100(1) | 53.4 mEq | 72.5 mEq | Na ₂ SO ₄ | |
| HCO ₃ | 23.47 " | 100 | 23.4 " | 8.5 " | NaCl | |
| Glicose | 220 mg | — | | | KCl | |
| | | | | | CaCl ₂ | |
| | | | | | MgCl ₂ | |
| Osmol. | 156mOsm/l | | | | | 20.0 |
| pH | 7.64 | | | | | 150.3 |
| | | | | | | ca 8. |

(1) As taxas da Solução se referem a sais anídras.

(2) Se a Solução se destinar à fisiologia dos músculos estimulados com ACh deve-se excluir o MgCl₂, e aumentar o teor de glicose para um total de 12.6 g.

B. *Gradientes iônicos*

Procuramos estudar as reações do *m.r.p.* às variações do teor dos diversos ions entre 100% e 0%, partindo dos valores da solução indicada na Tabela II. O excitante foi ainda a ACh (10 $\mu\text{g/ml}$). Como foi dito, esta concentração de ACh nos pareceu a mais adequada e pode ser considerada fisiológica, pois a dose limiar é .1 $\mu\text{g/ml}$.

a) *Sódio*

O Sódio achava-se na solução fisiológica (SF) sob a forma de Cloreto de Sódio (23.2 mEq./L), de Sulfato de Sódio (1.9 mEq./L) e de Bicarbonato de Sódio (8.5 mEq./L). Fizemos soluções mais fracas de Sódio, reduzindo este ion proporcionalmente nos três compostos.

O *m.r.p.* banhado sucessivamente com estas soluções, e estimulado 4-5 vezes com ACh de 15 em 15 minutos, mostrou os seguintes resultados:

1) *SF 37 mEq./L Sódio até SF 22 mEq./L Sódio*

Não se verificaram diferenças nas reações do *m.r.p.* quando imerso sucessivamente nestas soluções e estimulado pela ACh. A amplitude das respostas e o tempo de relaxamento foram iguais (Fig. 3). Não houve contração espontânea na transição de uma solução para outra mais fraca, a não ser quando a diferença entre ambas era maior do que 7-8 mEq./L.

2) *SF 9 mEq./L Sódio*

Em torno de 9 mEq./L Sódio na solução, a amplitude das respostas continuava a mesma, mas, após a lavagem, o *m.r.p.* começava a relaxar ca. de 10 vezes mais lentamente. Contudo, o fenômeno não se repetia, motivo pelo qual julga-

mos não dever atribuí-lo necessariamente à falta de Sódio na solução.

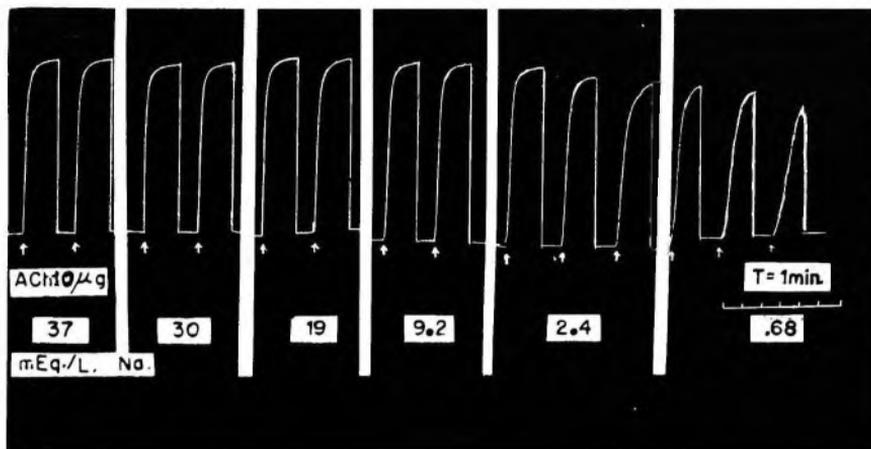


FIG. 3. Sódio — O m.r.p. responde com amplitude igual em Solução Fisiológica em concentrações decrescentes de Sódio, de 37 mEq./L até 9.2 mEq./L. — Em tôrno de 2.4 mEq./L de Sódio já houve diminuição da amplitude das contrações. Com .68 mEq./L ainda se puderam obter algumas respostas, seguindo-se repentina insensibilidade.

3) SF 5 mEq./L Sódio

Com esta quantidade de Sódio, as respostas geralmente ainda cotinuavam com a mesma amplitude, mas às vêzes entravam em declínio. O tempo de relaxamento era 10-20 vêzes maior do que o normal, que costumava oscilar entre 3-10 minutos. O registro obtido não diferia do correspondente a 9.2 de Sódio.

Com 2-3 mEq./L (Fig. 3) ou menos, o m. ainda respondia 2-5 vêzes ao estímulo, para logo se mostrar completamente insensível ao éster.

4) SF 0 mEq./L Sódio

Sem adicionar Sódio às soluções, o m. respondia ainda a 1-2 estímulos de ACh, e logo depois ficava completamente

insensível. Notou-se perda de Sódio pelo músculo pois os perfusados obtidos continham maior quantidade deste ion que na solução perfusora.

b) *Potássio*

Fizemos cinco soluções fisiológicas contendo Potássio em concentrações cada vez menores. Estimulado o m. com ACh cinco vêzes com intervalos de 10-15 minutos entre cada estímulo, houve respostas de amplitude igual em tôdas (Fig. 4). O tempo de relaxamento foi o mesmo. Ao passar de uma concentração para outra mais fraca, não havia indício de contração espontânea, a não ser quando da transição de uma solução com algum Potássio para outra praticamente sem Potássio (.0002 mEq./L), onde se observou uma série de diminutas contrações espontâneas, em nível acima da linha de base (Fig. 4 .0002). Terminadas estas contrações — que duravam ao máximo 60 minutos — as respostas do m.r.p. ao estímulo de ACh em solução com .0002 mEq./L de Potásio não diferiam das precedentes, obtidas nas demais soluções com Potássio. É importante ainda ressaltar que as amostras de solução sem Potássio, nas quais o m. permaneceu durante 10-15 minutos e depois contraiu à estimulação com ACh, acusavam um acréscimo de Potássio, em média de .030 mEq./L cada vez.

O fenômeno da perda, simples permuta, ou acúmulo de ions de Sódio e Potássio por uma fibra nervosa ou muscular, em soluções fisiológicas, com e sem estímulo, foi estudado por vários pesquisadores e sob vários aspectos. Em alguns casos o uso de Na^{24} e K^{42} facilitou esta pesquisa. Veja-se, por exemplo, BOYLE e CONWAY (1941), HODGKIN e KEYNES (1953), BUCHTAL (1956), HODGKIN e HOROWICZ (1959) e KEYNES e SWAN (1959).

Em nosso caso é digna de nota, a quantidade insignificante de Potássio do meio que parece suficiênte para possibilitar a contração. O problema se complica se nos lembrarmos que,

a restituição do Sódio para o meio externo através da membrana celular após a atividade, é muitas vezes dificultada pela falta de Potássio no meio extracelular.

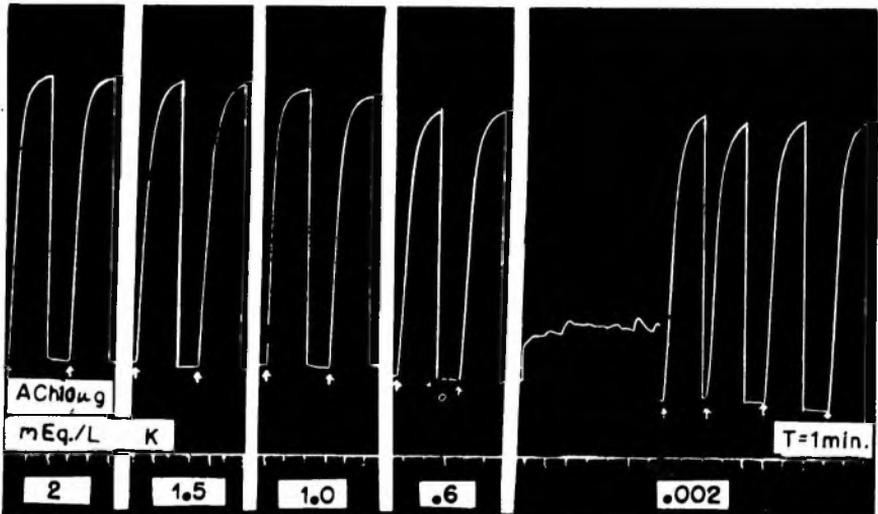


FIG. 4. Potássio — Respostas do m.r.p. à $10 \mu\text{g}$ de ACh em Solução Fisiológica com teor decrescente de Potássio de 2 mEq./L até .002 mEq./L — Não se verifica diminuição da amplitude das respostas. Contrações espontâneas na passagem da Solução Fisiológica de .6 mEq./L para .002 mEq./L de Potássio. Terminadas estas contrações, repetem-se respostas iguais às precedentes.

KEYNES (1954, p. 373), e KEYNES e SWAN (1959, p. 638) notaram que a saída de Sódio do músculo de rã era inibida parcialmente, quando se eliminava o Potásio da solução. Por sua vez, HODGKIN e KEYNES (1955, p. 52) assinalaram a mesma verificação para o axônio gigante de *Sepia* e *Loligo*.

Também nos glóbulos vermelhos (POST e JOLLY 1957) e em fatias de fígado incubado «in vitro» (JUDAH e AHMED 1964, p. 161) a saída de Sódio da célula está condicionada à existência de Potássio no líquido extracelular.

Devemos admitir que no m. de *Strophocheilus* as coisas são diferentes, ou que estes .0002 mEq./L de Potássio são suficientes, ou ainda recorrer a outras hipóteses.

A primeira que nos ocorre é a da possível substituição do Potássio por outro ion, analogamente ao que Ringer em 1883, descobriu, substituindo o Potássio de uma solução destinada a perfundir o ventrículo de rã, por Rubídio, e com menor vantagem — também por Césio. De então para cá, não poucos pesquisadores ampliaram esta descoberta da substituição, estendendo-a para outros animais e outros ions.

Assim, PANTIN (1925, p. 294, 306) substituindo o Potássio pelo Rubídio na solução, obteve resultados idênticos em movimento amebóide.

GALLEGO e DE NÓ (1947, p. 205) compararam os efeitos dos ions de Rubídio, Amonia, Césio e Lítio, com os efeitos do Potássio em idênticas concentrações sôbre o ciático de rã. Verificaram que os efeitos dos ions Rubídio e Potássio são praticamente iguais entre sí. Amonia, Césio e Lítio também despolarizam as fibras nervosas. Segundo SANDOW e MANDEL (1951) o Rubídio despolariza a membrana da fibra muscular da rã.

Baseando-nos nestes dados, poderíamos sugerir a hipótese de que — à falta de ions de Potássio o *m.r.p.* de *Strophocheilus* se tivesse valido de outro ion, possivelmente de Amonia proveniente de seu metabolismo, para substituir os ions de Potássio. Mas não temos indícios de uma tal substituição.

EDMAN e SCHILD (1961, p. 351), estudando a interação de ACh, Cálcio e despolarização na contração do útero de Rata, verificaram a existência de contração induzida por ACh com e sem despolarização, mas ambas dependentes da presença de Cálcio.

As contrações do m. do nosso gastrópode em solução isenta de Potássio, poderiam ser talvez das do tipo de contração sem despolarização.

Resumindo, três hipóteses poderiam ser lembradas para explicar as contrações do m. liso, obtidas em solução praticamente isenta de ions de Potássio:

a) A quantidade mínima de .002 mEq./L de Potássio existente na solução, acrescida de mais algum liberado pelo músculo, é suficiente;

b) Os ions de Potássio foram substituídos por outros que desempenham a mesma função, possivelmente Amônia proveniente da célula;

c) A ACh induziu contração sem que tivesse havido des-polarização.

Esta última hipótese nos parece mais provável, pois melhor se enquadra no fenômeno da contração visto em seu conjunto, principalmente considerando o papel desempenhado pelos ions de Cálcio. Esta hipótese poderia ser comprovada utilizando-se a técnica eletrofisiológica, de que ainda não dispomos.

c) *C á l c i o*

Como nas vêzes anteriores, fizemos várias soluções com teor de Cálcio decrescente, conservando, porém, inalterados os demais componentes.

- 1) *SF 12 mEq./L Cálcio*; 2) *SF 9 mEq./L Cálcio*;
3) *SF 6 mEq./L Cálcio* e 4) *SF 4.5 mEq./L Cálcio*

Estimulando-se o *m.r.p.* pela ACh após permanência de 15 minutos nas soluções com as doses de Cálcio acima indicadas, não se observou diferença na amplitude das respostas, nem no tempo de relaxamento. A pequena variação de amplitude entre as primeiras e as últimas respostas ao nosso ver podem ser atribuídas, possivelmente, à fadiga muscular (Fig. 5).

Retirando-se amostras das soluções nas quais o *m.r.p.* ficou durante 15 minutos, e após a contração, verificou-se um aumento de Cálcio em vários mEq./L. Infelizmente, os resultados colhidos nestas experiências ainda não nos permitem fornecer dados numéricos. Havia, portanto, uma liberação de Cálcio do músculo para o meio.

5) SF 3 mEq./L Cálcio e menos:

Em presença desta quantidade de Cálcio e de outras mais reduzidas, o *m.r.p.* respondia do mesmo modo, se bem que o relaxamento fôsse agora mais lento. Em concentrações abaixo do 3 mEq./L apareceram, às vêzes, respostas menores, quando não subita contratura.

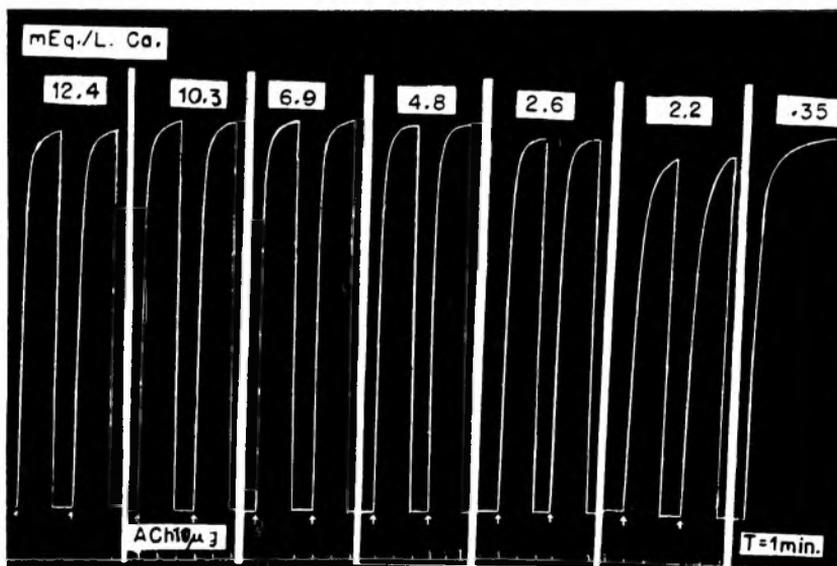


FIG. 5. Cálcio — Reação do *m.r.p.* à 10 µg/ml de ACh, quando se diminui a concentração de Cálcio na solução, de 12.4 mEq./L até .35 mEq./L — Amplitude e tempo de relaxamento normais — ainda com 4.8 mEq./L — Diminuição da amplitude com 2.2 mEq./L — Contratura com .35 mEq./L.

6) SF .35 mEq./L Cálcio

A concentração mais fraca de Cálcio que conseguimos obter foi de .35 mEq./L, taxa que corresponde às impurezas presentes nas substâncias empregadas.

Imerso em solução contendo esta quantidade mínima de Cálcio, o *m.* entra subitamente em contratura, a qual pode

ocorrer também com .5 ou 1 mEq./L de Cálcio. Levado ao relaxamento, responde ainda a alguns poucos estímulos com respostas em rápido declínio, para logo se tornar insensível.

Passando-se da SF 1) [12 mEq./L] diretamente para SF 6) [praticamente sem Cálcio], verifica-se uma contração, que pode durar uma hora ou mais. Com estímulos posteriores se obtêm respostas em linha decrescente mais suave (Fig. 6).

Amostras desta solução na qual *m. r. p.* esteve em repouso durante ca. de 15 minutos e no qual efetuou a contração, acusam um aumento de Cálcio. Graças, talvez, a êste ion liberado pelo tecido para o meio, obtêm-se ainda algumas contrações. Músculos insensíveis aos estímulos de $10\mu\text{g}$ de ACh, ainda tinham uma média de 600 mg de Cálcio em 100 g de pêso úmido, quantidade que provàvelmente representa o Cálcio intracelular ligado. Há uma recuperação da capacidade de contração (Fig. 6), quando banhado de novo por solução com Cálcio.

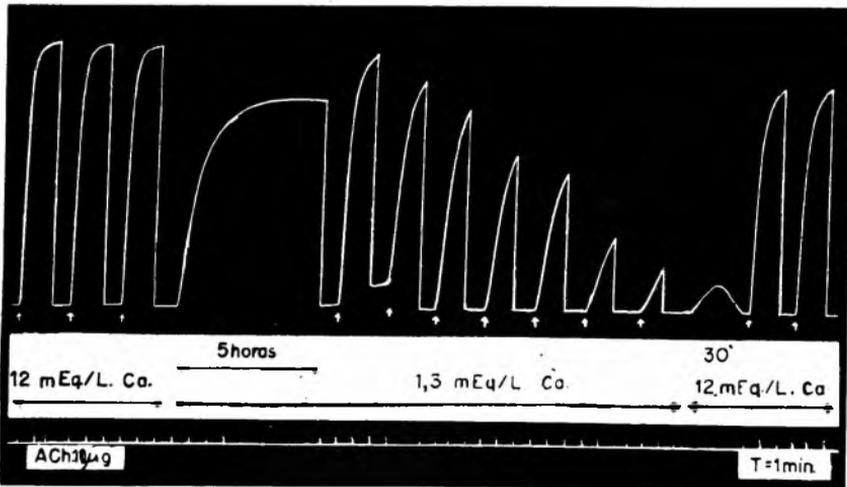


FIG. 6. Cálcio — Contrações do *m. r. p.* estimulado por ACh primeiramente em SF com Cálcio (12 mEq./L), depois em SF praticamente sem Cálcio (1,3 mEq./L). Notar a contração na passagem de uma solução para outra. Recuperação do *m.* após 30 minutos em SF com Cálcio.

Concluindo, podemos dizer que, com solução perfusora desprovida de Cálcio, não nos foi possível obter contração do músculo estimulado pela ACh. Esta é, aliás, uma conclusão invariável em tôdas as pesquisas similares.

No entretanto, se é inegável a importância do Cálcio na Fisiologia da contração muscular, difícil se torna precisar o papel que êle desempenha.

Desde a experiência de Heilbrunn (1940, p. 89) que colocou extremidades cortadas de fibras musculares em solução contendo Cálcio e verificou a entrada destes ions na fibra, seguida de rápida contração da mesma, a atenção dos fisiólogos se concentrou mais sôbre êste ion. Posteriormente, HEILBRUNN e WIERCINSKY (1947) analisaram as substâncias inorgânicas existentes na célula para saber qual delas seria a responsável pela contração da fibra muscular. Notaram que a única substância que injetada na fibra produzia a contração da mesma, era o Cálcio, WOOLLEY (1959, p. 37) estimulou o útero isolado de rata com ACh em presença de solução com quantidade normal de Cálcio, obtendo a contração esperada. Depois empregou sômente doses elevadas do mesmo, conseguindo idêntico efeito, e daí concluiu ser o Cálcio necessário para a contração, mas não a ACh. Quando a concentração de ions de Cálcio era suficiêntemente alta no líquido perfusor, os que atravessavam a membrana eram suficiêntes para levar o m. a contrair.

Em condições normais, porem, o animal não conta com uma concentração tão alta de Cálcio, e por isso depende do neurohumor.

Que a ACh não causava diretamente a contração já se sabia pela experiência de FATT e KATZ (1951) que injetaram esta substância diretamente dentro da fibra, e verificaram sua completa ineficiência, pois não produzia contração alguma.

Em outra experiência WOOLLEY (l.c.) eliminou os ions de Cálcio do SF, acrescentando VERSENE [(Sal tetrasódico do ácido etilenodiaminotetraacético (E.D.T.A.))] ao mesmo.

Nestas condições, nem mesmo grandes quantidades de ACh provocaram a contração.

À propósito desta importância do Cálcio, BIANCHI (1961) lembra o fato de se conseguirem contrações com Cafeína e Ryanodina, em soluções desprovidas de Cálcio. A contração, nestes casos, se deveria a uma mediação do Cálcio intracelular ligado.

Para WOOLEY (1963, p. 377), um receptor da membrana, provavelmente um lipídio, ligar-se-ia com a ACh, formando com êle um composto «receptor-ACh». Unido a êste composto, o Cálcio extracelular conseguiria atravessar a membrana, penetrando no interior da célula. Uma enzima, então, usando êste complexo como substrato, rompê-lo-ia, deixando o Cálcio livre para desencadear a contração da actomiosina. Cabeiria, portanto, àquele ion um papel preponderante no fenômeno, não tanto na gênese do potencial elétrico — ao qual WOOLEY parece não ligar muita importância — mas como desencadeador direto do fenômeno da contração. Os vários fatos sobre os quais WOOLEY (1.c.) estrutura sua teoria são de valia, e se prestam à interpretação dada.

Para JUDAH e AHMED (1964, p. 185), porém, o Cálcio teria outra função. Segundo êste pesquisador, que ampliou uma sugestão de FRANKENHAEUSER (1957, p. 259), êsse ion poderia ocupar duas posições, uma na membrana — e neste caso seria responsável pelo potencial de membrana — e outra, temporária, na qual estaria ligado a um transportador de Sódio (fosfoproteína). Na saída do Cálcio da membrana para o transportador de Sódio, dar-se-ia a despolarização, pois elevaria a permeabilidade da membrana para o Sódio. Aumentando o Sódio intracelular, chegar-se-ia a um ponto em que a competição entre o transportador e o Cálcio seria possível, com a conseqüente remoção do ion, voltando êste para sua posição original, i. é, para a membrana. No auge da despolarização, o lugar do Sódio estaria ocupado pelo Cálcio, e haveria então apenas uma inibição temporária do transporte ativo. Assim se explicaria o aumento e o decréscimo da per-

meabilidade da membrana ao Sódio, e também ao efluxo do Potássio. As mudanças de permeabilidade estariam condicionadas ao sistema de transporte e tudo seria um processo autodeterminante, capaz de uma operação cíclica.

4.

DISCUSSÃO

A) A solução fisiológica

As exigências e o comportamento de um órgão "in vitro" são bem diferentes dos do mesmo órgão, integrando o organismo, e formando um todo com êle.

Sobre êste ponto, com muita razão BEAMENT (1960, p. 100) chama a atenção para a cautela necessária na interpretação dos resultados «in vitro», e também para o fato de que uma solução fisiológica não é necessariamente igual ao sangue do animal para o qual se destina.

Segundo BROWN e DANIELLI (1964, p. 250) há cargas livres sôbre as membranas biológicas, e por isso as concentrações iônicas imediatamente em contáto com as células, podem ser diferentes daquelas do organismo como um todo.

Além disso, as proteínas polivalentes do sangue podem modificar a carga e, portanto, também a concentração iônica do lado externo da membrana celular. Soluções isentas de proteínas podem, por isso, ter uma concentração iônica diferente daquela do sangue, já que a carga do lado externo da membrana deve ser mantida em nível apropriado.

Comparando algumas soluções fisiológicas publicadas, com os componentes obtidos do sangue dos animais aos quais se destinam, verificamos que grande número delas — quiçá o maior — não representa quantitativamente a composição do sangue que deveriam substituir. Assim, por exemplo, JULLIEN et al. (1955a, p. 724) melhoraram extraordinariamente um Ringer para *Helix pomatia*, mudando a relação Na/K = 28, obtida da dosagem do sangue, para Na/K = 50.

No entretanto, para três outras espécies, as mudanças introduzidas não melhoraram em nada o Ringer feito exatamente à base das dosagens do sangue.

Já ARVANITAKI e CARDOT (1931, p. 186) ao contrário, haviam verificado que a relação $\text{Na/K} = 16,5$, no sangue de uma determinada espécie de *Helix* era exatamente a melhor também para a solução fisiológica. A relação $\text{Na} + \text{K/Ca}$ dos mesmos era quase igual.

Portanto, os resultados experimentais dirão qual a melhor proporção dos componentes, para cada espécie.

O método seguido na presente pesquisa tomou os dados fornecidos pela dosagem apenas como ponto de partida. Sobre eles foram experimentadas mais de 50 fórmulas diferentes, cujos resultados foram registrados e confrontados.

Em nosso caso, os componentes dialisáveis, do sangue proporcionam uma solução fisiológica satisfatória.

B) *Gradientes iônicos*

As hipóteses que tentam explicar o desencadeamento da contração muscular e a função específica dos diversos ions no mesmo fenômeno, não são poucas, e nossa intenção no presente trabalho não foi propor mais uma.

Limitamo-nos tão somente, a verificar quais os ions que influem diretamente na contração, e em que proporções exercem esta influência, tendo sempre em vista o funcionamento do músculo.

Os resultados obtidos com o Sódio e o Cálcio concordam com o que até hoje é certo em fisiologia muscular: que êstes dois ions são necessários ao fenômeno da contração. O papel do Potássio — que parece não fazer falta na solução, ou ser necessário apenas em quantidades milésimas — fica à espera de ulteriores pesquisas.

Na discussão dos resultados das numerosas experiências efetuadas, em virtude da escassez de informações sobre a musculatura lisa dos invertebrados, especialmente terrestres, procuramos relacioná-las com os já conhecidos e referentes à

musculatura estriada e mesmo à lisa de Vertebrados. Em muitos casos os músculos lisos de Invertebrados se aproximam, em suas reações aos dos Vertebrados, mesmo os estriados, especialmente quando estes últimos se acham sob a influência de agentes químicos que induzem os inibem as contrações.

Os elementos colhidos na preparação de uma solução perfusôra apropriada e no estudo dos gradientes iônicos permitem, ao nosso ver, também algumas considerações de interesse ecológico.

Como acentua HUNTER (1964, p. 103), a vida terrestre dos moluscos envolve a manutenção da água interna em ambiente aéreo de umidade variável, respiração do oxigênio gasoso e resistência a uma gama de temperaturas, mais amplas que em qualquer meio aquático.

Pelo que se conhece dos hábitos do *S.o.m.*, este molusco atende às condições acima indicadas por HUNTER justamente no que se refere à temperatura, já assinaladas na p. 98. Com a transferência deste gastrópode das regiões do Sul, onde as estações são mais bem marcadas, para São Paulo, onde a característica é uma grande variação térmica, houve necessidade de evitar-se a hibernação ou estivação. De fato, no laboratório em São Paulo, durante a época que corresponde ao inverno no Sul, o *Strophocheilus* mostra o reflexo de retração dentro da concha, iniciando assim a hibernação. O recurso que tínhamos, como já dissemos, era molhar o animal com água aquecida a ca. de 30° C e dar-lhe alimento, com o que conseguimos fazê-lo voltar à vida ativa.

No que se refere à água, lembramos ainda que HUNTER (1. c., p. 105) indica ser o maior problema fisiológico dos gastrópodes terrestres o controle da perda de água e umidade alta do ambiente. Justamente este ponto foi objeto de nossa consideração no estudo dos gradientes iônicos. Com a evaporação d'água haveria uma relativa concentração de ions, mas com a rápida absorção do líquido no laboratório, onde é sempre alto o estado higrométrico, haveria o risco de um de-

sequilíbrio iônico nos fluídos internos, o que, talvez não ocorreria no animal no seu «habitat» normal. O comportamento do *m.r.p.* e por certo dos demais músculos mostra, à evidência, ser grande a resistência dos mesmos ao possível desequilíbrio iônico, como bem se pode deduzir as inúmeras experiências acima relatadas, pois o sistema muscular, pelo menos tomando como referência o *m.r.p.*, funciona mesmo com quantidades relativamente pequenas dos respectivos ions.

À vista dos resultados destas experiências, podemos avaliar a extensa capacidade de o *S.o.m.* de adaptar-se a diferentes ambientes, podendo mesmo penetrar na água doce onde característica é a escassez de sais. Seu sistema locomotor, não será perturbado mesmo com taxas baixas de Sódio, menores ainda de Potássio (até .002 mEq./L) e mesmo mínimas de Cálcio (até 2.2 mEq./L) no líquido ambiente, relativas às concentrações destes ions nos tecidos do animal. Assim se compreende que o *Strophocheilus* possa passar da terra para a água e vice-versa, habitando sempre, porém, as regiões úmidas.

Sem dúvida, o Cálcio será o elemento limitante nas suas migrações, mas isto enquanto puder utilizar das reservas de que dispõe, que, como vimos, são elevadas. Sendo elas apreciáveis, o animal poderá resistir longo tempo em ambiente pobre de Cálcio, tendo tempo suficiente para procurar outro adequado em que possa refazer as suas reservas destes ions.

Chamou nossa atenção, em nossas determinações dos ions do sangue, a elevada taxa de Magnésio e ao mesmo tempo o seu efeito inibidor sobre a contração do *m.r.p.*. Não temos ainda elementos seguros para uma conclusão sobre este efeito. Aqui desejamos apenas lembrar que, possivelmente o Magnésio atue no sistema muscular durante a hibernação, estado que se caracteriza pela imobilidade do animal. Talvez, haja em tais condições um efeito anestésico do Magnésio que deveria ser mobilizado durante o estado hibernal.

Com estas considerações julgamos ter concorrido de algum modo para o melhor entendimento da ecologia do

S.o.m. cuja área de dispersão se restringe às regiões meridionais da América do Sul.

5.

RESUMO

Apresenta-se uma solução fisiológica para *Strophocheilus oblongus musculus*, tomando como ponto de partida das experiências, as quantidades dialisáveis do sangue, do mesmo gastrópode. Deu resultados satisfatórios a solução com a seguinte composição, calculada em g/L com sais anidros:

| | | | |
|---------------------------------|---|-------|---|
| NaCl | : | 1.356 | g |
| KCl | : | 0.178 | g |
| CaCl ₂ | : | 0.688 | g |
| MgCl ₂ | : | 1.638 | g |
| Na ₂ SO ₄ | : | 0.135 | g |
| NaHCO ₃ | : | 0.714 | g |
| Glicose | : | 3.6 | g |

Se a solução se destinar a estímulos à base de ACh, deve-se excluir o MgCl₂ e aumentar o teor de glicose para um total de 12,6 g/L.

Na segunda parte é estudada a fisiologia do *m.r.p.* verificando-se o comportamento deste m. quando estimulado com 10 μ g de ACh em banho de perfusão, cujos ions são variados na ampla faixa de gradientes que vai de 100% até 0%. Os dados obtidos são relacionados com a Ecologia do Gastrópode.

6.

CONCLUSÕES

1. Preparou-se uma solução fisiológica satisfatória para *Strophocheilus*, com doses de Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Sulfatos, iguais às que dialisavam do sangue do mesmo gastrópode.

2. Verificou-se uma afinidade entre Magnésio e a fibra cardíaca.
3. Funcionamento normal do *m.r.p.* com apenas 12 mEq./L de Sódio, ou seja com apenas ca. 35% do Sódio total existente no sangue.
4. Declínio da amplitude das respostas com 5 mEq./L de Sódio.
5. Na ausência de Sódio, o m. não contrai quando estimulado com ACh 10^{-5} .
6. Na ampla gama de: 2.4 mEq./L (100%) até 0,002 mEq./L de potássio (0%) o m. respondeu com igual amplitude de contração e igual tempo de relaxamento.
7. Na transição para 0% de Potássio o m. entra em contrações espontâneas.
8. Sem Potássio na solução perfusora, ainda conseguem contrações do m. estimulado pela ACh.
9. Funcionamento normal do m. com quantidades de Cálcio na ampla gama de 12 mEq./L até 4,5 mEq./L de Cálcio.
10. Diminuição da amplitude das contrações, com aproximadamente 2,5 mEq./L de Cálcio na solução, ou seja com 10% do Cálcio iônico do sangue.
11. Em solução perfusora desprovida de Cálcio, o m. não responde aos estímulos de ACh 10^{-5} .
12. O baixo teor iônico requerido para o funcionamento muscular do *S.o.m.* é um dos fatores que pode concorrer para a sua ecologia.

7

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, B. C. & LOWY, J. — 1958 — Contraction in Molluscan smooth Muscle *J. Physiol.* **141**: 385-397. London.
- ARVANITAKI, A. & CARDOT, H. — 1931 — Solutions équilibrées pour le coeur des Helix, en rapport avec la composition de l'hémolymphe. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **106**: 185-187.
- BEAMENT, J. W. L. — 1960 — Physical models in biology. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **14**: 83-101. Cambridge.

- BIANCHI, C. P. — 1961 — *J. Gen. Physiol.* **44**: 845, ap. SHANES, A. M. — 1963 — Movement of Calcium in Muscle and Nerve. Em Wasserman, R.H. — 1963 — The Transfer of Calcium and Strontium across biological membranes, XVII + 443 pp. Academic Press, London & New York.
- BOYLE, P. J. & CONWAY, J. — 1951 — Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol.* **100**: 1-63, London.
- BRECHT, K., ESTADA, J. A. & GOETZ, A. — 1964 — Zur Beeinflussung der Gefäßmotorik durch Ca^{++} und K^{+} — Ionen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277**(4): 330-340.
- BROWN, F. & DANIELLI, J. F. — 1964 — The Cell surface and Cell Physiology. Em: BOURNE, G. H. — *Cytology and Cell Physiology*. 3.a ed.: 239-310. Academic Press, London & New York.
- CASTILLO, J. DEL & ENGBAER, L. — 1954 — The nature of the neuromuscular block by magnesium. *J. Physiol.* **124**: 370-384. London.
- CLARK, E. P. & COLLIP, J. B. — 1925 — A Study of the Tisdall method for determination of blood serum calcium with a suggested modification. *J. Biol. Chem.* **63**: 461-464.
- DE JORGE, F. B., SILVA, A. G., ULHOA CINTRA, A. B. — 1964 — Determinação quantitativa de magnésio nos materiais biológicos. *Rev. Paul. Med.*, **64**: 224-236, São Paulo.
- DE JORGE, F. B., ULHOA CINTRA, A. B., HAESER, P. E. & SAWAYA, P. — 1964 — Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.* (no prélo).
- EDMAN, K. A. P. & SCHILD, H. O. — 1961 — Interaction of Acetylcholine, Calcium and Depolarization in the Contraction of Smooth Muscle. *Nature*, n. 4773, pp. 350-352. London.
- FATT, P. & KATZ, B. — 1951 — An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* **115**: 320-370, London.
- FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A. L. — 1957 — The action of Calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.* **137**: 218-244.
- GALLEGO, A. & DE NÓ, L. — 1947 — On the effect of several monovalent ions upon frog nerve. *J. Cell. & Comp. Physiol.* **29**: 189-206.
- GLASSER, W. & BRANDT, J. L. — 1959 — Localisation on magnesium²⁸ in the myocardium. *Am. J. Physiol.* **196**: 375-376.
- HEILBRUNN, L. V. — 1940 — The Action of Calcium on Muscle protoplasm. *Physiol. Zool.* **13**: 88-94, 1 t. Chicago.
- HEILBRUNN, L. V. & WIERCINSKY, F. J. — 1947 — The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* **29**: 15-22.

- HULL, A. V. — 1958 — The effects of certain neurohumors and of other drugs on the ventricule and radula protractor of *Busycon canaliculatum* and on the ventricule of *Strombus gigas*. *Biol. Bull.*, **115**: 471-482.
- HODGKIN, A. L. & HOROWICZ, P. — 1959 — Movements of sodium and potassium in single muscle fibers. *J. Physiol.*, **145**: 405-432.
- HODGKIN, A. L. & KEYNES, R. D. — 1953 — The mobility and diffusion coefficient of potassium in giant axons from *Sepia*. *J. Physiol.* **119**: 53-528.
- HODGKIN, A. L. & KEYNES, R. D. — 1955 — Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*. *J. Physiol.* **128**: 28-60.
- HUNTER, W. R. — 1964 — Physiological aspects of Ecology in Non-marine Molluscs em: K. M. Wilbur & C. M. Yonge, *Physiology of Mollusca*, p. 83-126, Academic Press, New York & London.
- HUTTER, O. F. & KOSTIAL, K. — 1954 — Effect of Magnesium and Calcium ions on the release of acetylcholine. *J. Physiol.* **124**: 234-241.
- JAEGER, C. P. — 1961 — Physiology of Mollusca. I. Action of Acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Bioch. & Physiol.*, **4**: 30-32. London.
- JENKINSON, D. H. — 1957 — The nature of the antagonism between Calcium and Magnesium ions at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* **138**: 434-444.
- JUDAH, J. D. & ARMED, K. — 1964 — The biochemistry of sodium transport. *Biol. Rev.* **39**: 160-193.
- JULLIEN, A., ACOLAT, L., RIPPLINGER, J., JOLY, M., VIEILLE-CES-SAY, CH. — 1955 — La teneur en ions Na, K, et Ca d'haemolymphe déterminé au photomètre à flamme et ses rapports avec la composition de solution artificielles aptes à assurer une activité de longue durée au coeur isolée chez *Helicidés*. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **149**: 723-726.
- KERKUT, G. A. & LAVERACK, M. S. — 1957 — The respiration of *Helix pomatia*, a balance sheet. *J. Exp. Biol.*, **34**: 97-105.
- KEYNES, R. D. — 1954 — The ionic fluxes in frog muscle. *Proc. roy. Soc. B.*, **142**: 359-382.
- KEYNES, R. D. & SWAN, R. C. — 1959 — The effect of external sodium concentration on the sodium fluxes in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, **148**: 591-625.
- KEYNES, R. D. & SWAN, R. C. — 1959 — Lithium permeability of muscle. *J. Physiol.* **147**: 626-638.
- KRIJGSMAN, B. J. & DIVARIS, G. A. — 1955 — Contractile and pacemaker mechanisms of the heart of molluscs. *Biol. Rev.* **30**: 1-39.
- LOCKWOOD, A. P. M. — 1961 — Ringer solution and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Bioch. Physiol.*, **4**: 241-289.

- MENDES, E. G., ABBUD, L. & ANCONA LOPEZ, A. A. — 1964 — Responses of the lantern muscle of the sea Urchin to drugs. (No prélo).
- PANTIN, C. F. A. — 1926 — On the physiology of amoeboid movement. The action of Calcium. *J. Exp. Biol.* **3**: 275-312.
- POST, R. L. & JOLLY, P. C. — 1957 — The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocytes membrane. *Biochem. biophys. Acta*, **25**: 118-128.
- PROSSER & BROWN — 1962 — *Comparative Animal Physiology*. Second Edition. IX+688 pp. W. B. Saunders Co. Philadelphia, London.
- RAMSAY, A. J. — 1940 — A nerve-muscle preparation from the snail. *J. exp. Biol.*, **17**: 96-115.
- RINGER, S. — 1883 — An investigation regarding the action of rubidium and caesium salts compared with the action of potassium salts on the ventricle of the frog's heart. *J. Phys.*, **4**: 370-379 apud: Lubin, M. & Schneider, P. B.: Exchange of K for Cs and Rb. *J. Physiol.*, **138**: 140-155.
- SANDOW, A. & MANDEL, H. — 1951 — Effects of potassium and rubidium on the resting potential of muscle. *J. Cell. comp. Physiol.*, **38**: 271-291.
- SATO, M., TAMARIGE, M. & OZEKI, M. — 1960 — Electrical activity of the retractor pharynx muscle of snail. *Jap. J. Physiol.*, **10**: 85-98.
- SAWAYA, P. — 1962 — On a bioassay for acetylcholine and on some properties of the longitudinal muscles of *Holothuria grisea* (Echinodermata). *Bol. Fac. Fil. Ci. U.S.P.* n. 261. *Zool.*, **24**:pp. 5-10. São Paulo.
- SAWAYA, P. & PETERSEN, J. A. — 1962 — Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (Molusco-Gastropode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. U.S.P.* n. 261, *Zool.*, **24**: 31-39.
- WOOLLEY, D. W. — 1963 — Transport of Calcium through Cell membrane by Certain Hormones. Em: Wassermann, R. H. The transf. of Calcium and Strontium across biological membranes. XVII+443 pp. Acad. Press. London, New York.
- WOOD D. W. — 1957 — The effect of ions upon neuromuscular transmission in a herbivorous insect. *J. Phys.*, **138**: 119-139.