

# Sôbre a ocorrência da Acetilcolina no tecido cardíaco de *Callinectes danae* Smith e seu efeito sôbre o coração dêste Crustáceo Decápodo

por

Paulo Sawaya

(Com 35 gráficos)

1. Generalidades .....	261
2. O material de experimentação e os métodos .....	264
Experiências com o coração de <i>Callinectes danae</i> :	
3. Ação da acetilcolina .....	267
4. Ação da eserina .....	268
5. Ação da atropina .....	269
6. Ação da nicotina .....	269
7. Ação da adrenalina .....	270
8. Ação dos macerados de corações de <i>Callinectes</i> .....	271
9. Ação do extrato de tecido cardíaco de <i>Callinectes</i> .....	272
10. Ação do extrato de tecido cardíaco de <i>Callinectes</i> sôbre o coração de Anfíbios .....	273
a) <i>Bufo marinus</i> .....	274
b) <i>Siphonops annulatus</i> .....	276
11. Discussão dos resultados .....	277
12. Summary .....	285
13. Literatura .....	289
14. Estampas .....	293

## I.

### Generalidades

Uma das aquisições mais recentes da fisiologia do sistema circulatório dos Crustáceos, especialmente dos Decápodos, refere-se à reação que o músculo cardíaco oferece a várias substâncias colí e adrenérgicas. O fato de Bacq, primeiramente em 1935 (p. 247), não haver encontrado uma colinesterase nos tecidos dos Crustáceos e, depois, tê-la isolado dos músculos dêstes animais, (Bacq, 1935a, p. 31), (Bacq & Nachmansohn 1937, p. 368), e ainda

o mesmo autor (Bacq 1935b, p. 55; 1937, p. 179) verificar a inatividade dos referidos músculos à acetilcolina, ou tê-la encontrado em quantidades mínimas em *Peneus caramote* (1935c, p. 244), levou vários pesquisadores a estudar o efeito desta substância em diferentes tecidos destes Artrópodos e de outros Invertebrados. Que os tecidos dos Crustáceos são sensíveis à acetilcolina já não resta a menor dúvida. Os recentes trabalhos de Hoadley (1934), de Marnay (1937; 1937a), de Marnay & Nachmansohn (1937), de Welsh (1937, 1938, 1939, 1939a, 1940), de Welsh & Haskin (1939), de Davenport (1940, 1941, 1942), de Davenport, Loomis & Opler (1940), de Obreshkove (1941), de Sawaya (1942), entre outros, dão indicações precisas a respeito desta sensibilidade. A maioria das experiências foi operada em Decápodos, em Estomatópodos ou em Ostrácodos. A diversidade do material de pesquisa e das substâncias utilizadas, é obvio, levou a não comparação dos resultados. Não obstante certos animais dentre estes Artrópodos serem insensíveis a algumas drogas, ficou demonstrado que, na grande maioria, a acetilcolina inflúe eficaz e intensamente sobre êles.

Por outro lado, a detenção deste éster nos órgãos desses Crustáceos contribuiu de maneira decisiva para o esclarecimento de uma série de fenômenos, alguns dos quais relacionados com a transmissão química do impulso nervoso. Neste particular são dignos de nota os trabalhos de Welsh (1939) sobre a extração da acetilcolina dos tecidos nervosos dos Decápodos (*Maia* e *Carcinus*), e sua não identidade com o chamado hormônio cromatofotrópico que ocorre nos pedúnculos oculares dos mesmos. Tanto esse autor (1939a, p. 233; 1940, p. 65) como Davenport (1941, p. 178), demonstraram a ação aceleradora da acetilcolina sobre o coração de *Homarus* de *Panulirus\** de *Carcinus* e de *Cancer*.

Se bem que tal reação do órgão central da circulação destes animais fosse muito evidente, ainda não foram verificadas até agora, pelo que pude vêr na literatura à disposição, senão quantidades insignificantes de acetilcolina no tecido cardíaco de vários Decápodos (Welsh 1939, p. 215).

São também de se acentuar, de um lado, os resultados negativos de algumas experiências de Bain (1929, p. 307), relativas à influência de determinadas drogas, tais como atropina e efedrina sobre o coração de *Maia squinado*, *Cancer pagurus* e *Carcinus moenas* e, de outro, a marcada aceleração do ritmo que sobre este órgão tem a adrenalina.

Este último ponto, relativo à influência da adrenalina sobre os batimentos cardíacos dos Crustáceos até agora estudados, é digno de reparo especial, visto como o animal reage aqui à maneira dos Vertebrados, i. é, por uma aceleração e aumento do tonus. Já com a acetilcolina a reação do Crustáceo dá-se no sentido inverso da dos Vertebrados. Nestes, é sabido, a substância provoca o retardamento das pulsações e naqueles, o contrário é o que se verifica.

Além disso, recentíssimas pesquisas de Wiersma & Novitski (1942, p. 260), em *Cambarus clarkii* vieram confirmar as experiências de Welsh (1939) e de Davenport (1941) sobre o imediato aumento da frequência e

(\*) No decorrer deste trabalho citar-se-ão ora *Palinurus* ora *Panulirus* segundo os respectivos autores. A última forma é a atualmente adotada (cf. Sawaya 1942a, p. 9).

da amplitude dos batimentos cardíacos com a perfusão pela acetilcolina. Ainda mais verificaram aqueles autores que a perfusão desta droga combinada com excitação do nervo acelerador produz idêntico efeito ao da excitação com altas frequências, o que lembra de certo modo, os resultados obtidos por Smith (1940, p. 64), no mesmo sentido, em *Homarus*.

Constitue agora ponto aberto à pesquisa o saber se a acetilcolina, atuando sobre o coração dos Crustáceos, determina o chamado "efeito de muscarina" ou "efeito de nicotina". Davenport, Loomis & Opler, já citados (1940, p. 507), na base de suas investigações sobre o coração de *Astacus trowbridgei* concluem que ainda é cedo para afirmar se realmente são encontradas nos Invertebrados as duas ações referidas, muscarínica e nicotínica da acetilcolina, bem conhecidas dos Vertebrados. Na continuação de suas indagações sobre este ponto, Davenport (1941, p. 184), tendo em vista os resultados de experiências com o coração de *Cancer magister* emite a hipótese segundo a qual a acetilcolina teria um "efeito de nicotina" sobre as células ganglionares e poderia ter um "efeito de muscarina" na junção mioneural. Minhas pesquisas relativas à influência da acetilcolina sobre a ritmicidade das contrações da glândula do intestino médio de Ostrácodo, *Strandesia bicuspis bicuspis* (Sawaya 1942, p. 136) levaram-me à convicção, pelo menos no limite das experiências efetuadas, de admitir antes um "efeito de muscarina" daquela droga.

Pelo exposto, muitos são ainda os pontos da fisiologia do sistema circulatório dos Crustáceos que requerem acurado estudo. Com o propósito de atacar alguns destes problemas, propuz-me efetuar uma série de experiências com o coração do *Callinectes danae* Smith, Crustáceo-Decápodo muito abundante no litoral brasileiro.

Aproveitando a oportunidade que me foi oferecida pelo Governo do Estado do Paraná, por intermédio do Museu Paranaense, de realizar pesquisas sobre a fauna marinha no litoral daquele Estado, no verão último, foi-me possível obter grande quantidade destes Artrópodos, permitindo assim tais pesquisas.

Primeiramente tive em mira estudar os efeitos da acetilcolina, da eserina da atropina, da adrenalina e da nicotina sobre o coração do animal, e depois verificar se a primeira destas substâncias também ocorre neste órgão. Uma vez comprovada a presença da acetilcolina ou de uma substância ativa a ela correspondente no tecido cardíaco de *Callinectes danae* procurei extraí-la e determinar suas propriedades por meio dos testes biológicos.

A primeira série de experiências foi realizada no litoral paranaense, na praia de Caiobá, onde consegui instalar o necessário laboratório de Fisiologia, graças ao valioso auxílio do Sr. Dr. José Loureiro Fernandes, dd. Diretor do Museu Paranaense e do Sr. Carlos Ihle que pôs o amplo edifício de sua propriedade à nossa disposição. As pesquisas foram mais tarde continuadas em Santos, na secção marinha do Instituto de Pesca Marítima. No laboratório de Fisiologia Geral e Animal, efetuei as contraprovas e, com o auxílio do Lic. Sr. Erasmo Garcia Mendes, consegui o isolamento da substân-

cia ativa do tecido cardíaco de *Callinectes danae*, tendo procedido aos testes biológicos, no coração do próprio *Callinectes* e nos de Anfíbios (*Bufo marinus* e *Siphonops annulatus*). As experiências no laboratório, em S. Paulo, tornaram-se necessárias, visto como os ensaios realizados em Caiobá deveriam ser confirmados em local onde pudessem ser repetidos com indispensável rigor.

No presente trabalho pretendo relatar os resultados destas pesquisas, com intuito de não só contribuir para o estudo da chamada "mediação química" nos Crustáceos, como, também, de indagar do comportamento de animais tão comuns no litoral brasileiro, sob a influência das determinadas substâncias usualmente utilizadas nos laboratórios de fisiologia e de farmacologia. Por sua vez, os testes com o coração do próprio *C. danae* e, também com o de *Siphonops annulatus* o singular Anfíbio Ápodo Sul-Americano, revelaram-se muito interessantes, dada a extrema sensibilidade, especialmente do último destes animais, ao supra mencionado éster. Este fato veio concorrer para que se pudesse penetrar um pouco mais no estudo da biologia do curioso Ginofônio. Finalmente, cumpre lembrar que a Fisiologia Comparativa defronta-se entre nós com a dificuldade de obtenção de animais apropriados para os exercícios dos estudantes; cada contribuição, portanto, no imenso campo desta ciência, será proveitosa em facilitando a tarefa de concorrer para o conhecimento da nossa fauna sob os modernos pontos de vista, como são os da Fisiologia Comparativa.

Aproveito esta oportunidade para agradecer ao Governo do Estado do Paraná e ao pessoal do Museu Paranaense, especialmente ao Dr. José Loureiro Fernandes e também ao Sr. Carlos Ihle, as facilidades que me proporcionaram para a execução do presente trabalho. Cumpra-me ainda estender os meus agradecimentos aos Srs. João de Paiva Carvalho, Francisco Ramos e Dr. Ayrton Gonçalves, pela acolhida no Instituto de Pesca de Santos, bem como ao Lic. Erasmo Garcia Mendes, 1.<sup>a</sup> assistente da cadeira de Fisiologia Geral e Animal, ao Lic. Domingos Valente e ao preparador João Eufrosino.

## 2.

### O material de experimentação e os métodos

A escolha de *Callinectes danae* Smith (*C. danae*) foi determinada principalmente pela relativa facilidade com que se obtém abundante material nas praias de São Paulo e do Paraná, tendo sido utilizados, no presente trabalho, cerca de 250 espécimes, em sua maioria adultos. Além disso, tal animal é um dos que apresenta maior porte entre os Decápodos que ocorrem mais frequentemente no litoral sul e, ao que me consta, não tem sido ainda objeto de pesquisa deste gênero. Em primeiro lugar, foram registradas as pulsações normais dos corações de *Callinectes* e, a seguir, experimentadas as substâncias. Todos os cardiogramas foram obtidos com o coração *in situ*. Medindo o coração dos maiores *C. danae* não mais que 20 mm. de diâmetro látero-lateral, e 10 mm. de diâmetro rostro-caudal, não foi possível efetuar a perfusão do coração isolado, tal como empregado em *Maia*, em *Carcinus* e em *Panulirus* por Welsh (1939, p. 202), resultando infrutíferas as tentativas efetuadas neste sentido,

especialmente pela carência de aparelhagem adequada, impossível de ser conseguida no momento atual.

Em Caiobá, os *C. danae* eram pescados numa zona regularmente batida da praia e trazidos para o laboratório que distava cerca de 100 m. daquele local. Eram mantidos em uma tina com água fresca do mar e imediatamente operados para ser exposto o coração. Para isto, descobriam-se as zonas proto-meso e urogástrica e a cardíaca, o que se conseguia com o auxílio de uma pinça forte (ossívora), abrindo-se a carapaça em ambas as regiões laterais, em linhas paralelas desde o ponto de articulação do 5. pe-reiópodo até o entalho orbitário. Os dois sulcos eram, a seguir unidos por um corte apanhando totalmente a região epigástrica. Depois, cuidadosamente se levantava a parte da carapaça compreendida entre as três secções retangulares. Uma vez desaderida dos tecidos profundos, era dobrada para cima e para trás, fazendo charneira na articulação entre as regiões intestinal e abdominal. Descoberta assim a região cardíaca, ficava à mostra o coração pulsátil, que era banhado continuamente com Ringer para crustáceos. Fixo o *Callinectes* horizontalmente em uma pranchêta, o coração era ligado a uma alavanca cardíaca por intermédio de um fio de algodão mercerizado, muito fino, provido de um gancho feito com alfinete entomológico n.º 000. As drogas eram injetadas na cavidade cardíaca por meio de uma seringa das habitualmente usadas para insulina, de modo a ficar todo o órgão imerso na solução.

*C. danae* como as demais espécies, é agressivo, evitando-se a mordedura pelas fortes "chelas" de que dispõe, cortando-se, previamente, os dáctilos de ambas. Tal manobra tornava-os inofensivos e tinha ainda a vantagem de provocar sangria, evitando assim o acúmulo de coágulos de sangue dentro do coração.

Foram experimentadas as seguintes substâncias: cloridrato de acetilcolina Roche, sulfato de eserina Merck, sulfato de atropina Riedel Haën, adrenalina Park Davis, nicotina Schering e macerados e extratos de corações de *Callinectes*. Os extratos foram preparados segundo a técnica preconizada por Chang & Gaddum (1933, p. 256). Nos capítulos, referentes a cada uma destas substâncias, especialmente macerados e extratos, serão dadas indicações mais pormenorizadas.

Tendo sido muito auspiciosos os ensaios empreendidos em Caiobá, relativamente à ação dos macerados de corações de *Callinectes* sobre o próprio coração destes animais, transportei para o laboratório de S. Paulo uma série destes órgãos conservados, alguns em glicerina pura neutra, e outros em álcool absoluto. Com este material e, também, com outro retirado de animais frescos provenientes de Santos, foi preparado o extrato, com o qual se procederam os testes biológicos, a saber, nos corações de Anfíbios (*Bufo marinus* e *Siphonops annulatus*) e nos do próprio *C. danae*.

Cuidado especial foi tomado com o ajustamento do pH das diversas soluções experimentadas, o Ringer inclusive, ao pH do sangue do *Callinectes*. Antes de proceder à perfusão, o coração era lavado abundantemente com Ringer. Em alguns exemplares os órgãos circunjacentes eram retirados e, em outros, mantidos. A adoção de uma ou outra destas técnicas

não produziu diferença apreciável. Sendo o coração de *C. danae* não muito resistente à exposição ao ar, a demora de extração dos demais órgãos, especialmente estômago e hepatopâncreas, muitas vezes ocasionava o não aproveitamento do exemplar, por cessarem as pulsações cardíacas. À vista disso, resolvi computar unicamente os resultados dos cardiogramas obtidos com o coração e os demais órgãos *in situ* tendo o cuidado de banhá-los abundantemente com Ringer para crustáceos, preparado segundo a fórmula preconizada por Pantin (1934), a saber: NaCl 0.6 mol., 1 000 partes; KCl, 0.6 mol., 25 partes; CaCl<sub>2</sub>, 0.4 mol., 35 partes; MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mol., 35 partes; NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mol., 2 partes.

Somente após a redação deste trabalho me foi dado lêr a recente publicação em que Harreveld (1936, p. 43) condensa os resultados das análises do sangue de *Astacus trowbridgei* e de *Cambarus clarkii* relativos ao teor em cations, ao ponto de congelação e ao pH, propondo uma nova fórmula para preparação de Ringer para crustáceos, de acordo com os dados colhidos das referidas análises. Sendo estes Decápodos últimos mencionados exclusivamente da água doce, o Ringer da fórmula de Harreveld somente poderia ser usado para Crustáceos desse "habitat". Acontece, porém, que, durante uma de minhas recentes excursões ao litoral de S. Paulo, obtive do rio Itanhaem, que banha a cidade do mesmo nome, em pleno ambiente de água quase doce, alguns *C. danae* e *C. ornatus*. Devo notar que este último, assim como *C. sapidus* podem habitar a água salobra e a doce, cf. Brues (1927, p. 566). Este fato levou-me a considerar mais de perto os efeitos do Ringer usado em Caiobá e em Santos sobre o coração de *C. danae*. Revendo a bibliografia sobre o assunto, pude vêr que as diversas fórmulas propostas por vários autores (Lindmann 1928, p. 591; Hoffmann 1914; Davenport 1941, p. 179 e outros) não são concordantes, sendo mais precisos os dados fornecidos para os Crustáceos de água doce, os quais, porém, podem ocorrer por vezes na água salobra. Verificações minuciosas sobre as soluções perfusoras para o coração dos Crustáceos, encontram-se em Cole, Helfer & Wiersma (1939, p. 393), os quais acham que a solução de van Harreveld é mais satisfatória para o coração de *Cambarus clarkii*. Modificações do ritmo do coração deste mesmo Decápodo sob a influência de vários sais foram publicadas por Lindmann (1929, p. 395), e merecem ser anotadas.

Não dispondo de dados seguros sobre a salinidade das águas que banham o litoral paulista e paranaense e dos rios que vão ter a essas regiões (Itanhaem por ex.), adotei a fórmula referida de Pantin, usada para *Carcinus* e *Maia*, que são tipicamente marinhos, sendo, porém, o primeiro eurihalino e o último estenohalino (Schwabe 1933, p. 233). Já em 1929, Schlieper (p. 156) concluía, de suas pesquisas sobre a osmoregulação dos animais aquáticos que *Carcinus* tem capacidade osmoreguladora, como os crustáceos de água doce. Quero crêr que o mesmo se dê com *C. danae*.

Um outro ponto relativo à técnica que me mereceu acurada atenção foi o referente à temperatura, que, como se sabe, tem grande influência na ritmicidade do coração dos crustáceos (Robertson 1906, p. 242; Garrey 1920, p. 56; 1920a, p. 49; Crozier & Stier 1927, p. 501; Seiwel 1930, p. 345)

e outros). Todas as experiências foram realizadas entre 22° e 25° C. As verificações de Mangold (1926, p. 512; 1926a, p. 521) e Potonié (1926, p. 545) mostraram que a atividade do coração dos crustáceos, *Carcinus* e *Astacus*, obedecem aproximadamente à regra de van't Hoff, variando dentro de determinadas oscilações da temperatura. Tais oscilações são praticamente desprezíveis dentro dos limites restritos das temperaturas em que realizei as experiências.

### 3.

#### Ação da Acetilcolina (\*)

Os resultados dos trabalhos de Welsh e de Davenport e seus colaboradores e outros, induziam a presumir, também no tecido cardíaco de *C. danae* a ocorrência de quantidades apreciáveis de acetilcolina (Ac.). Até agora foram encontrados apenas traços dessa substância no coração de outros Decápodos (Bacq 1935a, p. 31 em *Maia squinado*; Welsh 1939, p. 215 em *Carcinus*). Antes, porém, de pesquisar tal substância naquele tecido e de verificar a influência do extrato respectivo sobre o coração do próprio *Callinectes* houve mister conhecer a reação que o coração deste Decápodo ofereceria à Ac. Assim, poderia saber se o coração de *C. danae* reagiria à Ac., tal como o de vários outros Crustáceos, i. é, se as concentrações fracas do éster provocariam aumento da frequência e da amplitude dos batimentos, e as fortes determinariam tétano parcial ou total e parada sistólica (Welsh 1939a, p. 237).

Segundo a técnica descrita, foi injetada no coração de *C. danae* a Ac. nas seguintes dosagens  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ . O gráfico n. 1, correspondente à injeção de Ac.  $10^{-4}$ , é bastante expressivo. Indica, à evidência, que a Ac. provoca acentuada aceleração das pulsações cardíacas, com notável aumento da amplitude. É de se notar que o efeito da droga não é persistente, durando cerca de 10 minutos. A presença de uma esterase em *C. danae* tal como ocorre em outros Crustáceos, especialmente nos músculos de *Homarus* (Bacq & Nachmansohn 1937, p. 370; Marnay & Nachmansohn 1937, p. 1006; Marnay 1937, p. 1008; 1937a, p. 1010), deve ser a responsável pela degradação rápida da Ac. A reação ótima do coração de *C. danae* a esta substância foi na concentração de  $10^{-4}$ . O emprego da Ac.  $10^{-2}$  provocou inibição forte, porém, pouco demorada, tal como se nota no gráfico n. 2. Depois, porém, de 38 segundos, o coração voltou pouco a pouco à ritmicidade com aceleração das pulsações. Neste caso a amplitude primitiva não foi prontamente alcançada, e, sim, algum tempo depois, cerca de 3 minutos. Esta volta à amplitude anterior fez-se gradativamente. Em outros casos a inibição das pulsações cardíacas foi persistente, não recobrando o coração o ritmo normal, como se nota no gráfico n. 3. Tais fenômenos se verificaram também com Ac.  $10^{-3}$ . Em qualquer destes dois casos, a inibição dá-se sempre na diástole.

(\*) O cloridrato de Acetilcolina usado nestas experiências foi fornecido pela Produtos Roche Ltda., à qual apresento os meus agradecimentos.

Muito poucas foram as vezes em que, utilizando-se Ac.  $10^{-3}$ , o coração voltou a ter os batimentos normais após período inibitório extenso, sendo sempre a parada em sístole. O gráfico n. 4, porém, é bastante sugestivo. Após a injeção de Ac.  $10^{-8}$  houve curta inibição, voltando o órgão a pulsar, primeiro irregularmente, depois ritmicamente, mas não alcançando a intensidade primitiva.

Utilizando diluições maiores,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  vê-se que o coração de *C. danae* ainda é sensível, acelerando os batimentos. A ação da droga, porém, é fugaz (gráfico n. 5). O mesmo dá-se com Ac.  $10^{-7}$ .

Pelos gráficos obtidos verifica-se que o coração de *C. danae* reage à Ac. por uma aceleração e aumento da amplitude das pulsações nas concentrações a  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$ . Estes fenômenos são mais evidentes quando utilizadas as concentrações a  $10^{-4}$ . Em soluções mais concentradas ( $10^{-2}$ ) o órgão reage primeiramente por meio de acentuada inibição, retomando depois, pouco a pouco, a ritmicidade com marcada modificação dos caracteres das pulsações, primeiro ligeira aceleração, depois retardamento. Não obstante *C. danae* ser um Decápodo eurihalino, pelo menos é o que posso depreender do "habitat" variado deste Decápodo, é muito possível que a reação inibitória do coração às soluções mais concentradas de Ac. seja também ocasionada por diferenças de concentração do líquido perfundido. Em Caiobá, os *C. danae* foram colhidos numa zona da praia bem batida, em Santos a captura foi feita no canal e, em Itanhaem, tive oportunidade, como disse, de encontrá-los em zona de água salobra, cuja salinidade deve ser muito baixa, em pleno rio Itanhaem. Excede o âmbito deste trabalho a pesquisa das medidas das concentrações osmóticas destes *Callinectes*. É um ponto a ser investigado oportunamente. Devo anotar que foram inefetivas as perfusões com água do mar e com água destilada. A influência do extrato do próprio coração será estudada no capítulo 9.

#### 4.

### Ação da Eserina

É fato bastante conhecido que, nos Vertebrados, a eserina potencializa a ação da acetilcolina. Tal atividade da eserina foi também notada nos corações de *C. danae*. Antes, porém, de verificar esta ação potencializadora, pesquisei a reação do referido órgão à substância perfundida. A eserina age tal como a Ac., i. é, provocando aceleração e aumento da amplitude das pulsações cardíacas. Nas concentrações  $10^{-8}$  e  $10^{-2}$  (gráficos n. 6 e 7) a ação da droga é precedida de um período de inibição, ao qual segue uma aceleração não tão pronunciada como nos corações perfundidos com Ac. Uma volta ao ritmo normal não foi verificada. Quero crer que a ação aceleradora da eserina seja muito rápida em *C. danae*.

A potencialização da Ac. pela eserina é aqui também digna de nota, mas não difere do que já foi notado em outros crustáceos, especialmente por Welsh (1939) e outros.

## 5.

## Ação da Atropina

Como é sabido, o fato de a atropina abolir nos Vertebrados a ação da Ac. e correspondendo tal fenômeno à ação da muscarina, considera-se, todas as vezes que êle se repete com Ac., como tendo êsse êster o chamado "efeito de muscarina". Ao indagar da ocorrência do êster no tecido cardíaco de *C. danae*, julguei indispensável saber qual a reação dêste órgão à atropina, para melhor ajuizar, posteriormente, da ocorrência daquêle efeito da Ac. no coração do mencionado Decápodo.

Os corações de *C. danae* perfundidos com a solução  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  apresentaram sensível diminuição da amplitude e da frequência dos batimentos. Tal influência da droga processa-se gradativamente (gráficos n. 8 e 9) até abolir as pulsações. Um efeito inótrono positivo do alcalóide a  $10^{-3}$  é por vezes notado (gráfico n. 9). *C. danae* portanto, reage a esta droga como os demais Decápodos conhecidos, dependendo o efeito da concentração. Em vários *C. danae* após a perfusão com Ac., como foi referido no capítulo 3, procedeu-se à perfusão com atropina em concentrações diferentes. Aquí também, como em outros crustáceos, a atropina anula o efeito da Ac. (gráfico n. 10). Perfundindo-se primeiramente a atropina  $10^{-4}$  durante alguns segundos e, a seguir, a Ac.  $10^{-4}$ , a ação excitadora desta última substância é abolida (gráfico n. 11). Como se vê, em *C. danae* a ação aceleradora da Ac. é anulada pela atropina, o que corresponderia até certo ponto, em comparação ao quanto ocorre nos Vertebrados, ao chamado "efeito de muscarina".

## 6.

## Ação da Nicotina

A ação da Ac. sobre os órgãos efetores autônomos (músculos lisos e glândulas), é conhecido, mostra semelhanças com a da muscarina. Por sua vez, o efeito excitador daquele êster, em concentrações baixas, sobre as células ganglionares, e depressor, em concentrações altas, sobre tais elementos e também sobre os músculos voluntários, lembra a influência da nicotina. Isto quanto aos Vertebrados. Nos Invertebrados o assunto está longe de ser resolvido. O que ficou dito a respeito dos Vertebrados encontra-se significativamente representado nos sugestivos esquemas de Frey (1928, p. 234) elaborados na base das ações "nicotínica" e "muscarínica" da acetilcolina sobre os músculos estriados e lisos do intestino da *Tenca*. Já desde 1880 René du Bois-Reymond havia descrito (p. 25) esta singular disposição da musculatura do intestino delgado dêste Peixe *Ciprinidae* i. é, uma delgada camada de mm. estriados longitudinais externos, uma espessa camada de mm. estriados anelares, uma muito fina camada de mm. lisos longitudinais e uma espessa camada mais profunda de mm. lisos anelares.

Precedendo o estudo da reação do coração acetilcolinizado de *C. d. n. a. e.* à nicotina, procurei saber, primeiramente, qual o efeito deste alcalóide quando atuado isoladamente sobre o referido órgão. Foram perfundidos os corações *in situ* com sulfato de nicotina nas concentrações  $10^{-8}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . O gráfico n. 12 mostra que a nicotina a  $10^{-4}$  provoca diminuição da frequência e aumento da potência. O órgão, porém, logo reage retomando o ritmo normal. Tal reação é tanto mais lenta quanto maior for a concentração utilizada. Nas doses  $10^{-5}$  e  $10^{-8}$  não houve modificações tais que pudessem ser registradas. Perfundindo o mesmo órgão com nicotina a  $10^{-8}$  cessaram as pulsações (gráfico n. 13). Em alguns casos (3) a nicotina a  $10^{-8}$ , além de determinar retardamento das pulsações, provocou a parada súbita. A volta do coração com perfusão da nicotina a  $10^{-4}$  foi lenta, mas completa, sem haver necessidade de perfusão com o Ringer. O efeito característico inotrópico positivo é cronotrópico negativo do alcalóide é evidente nessa concentração. Nas concentrações mais fracas as reações do coração de *C. d. n. a. e.* são imperceptíveis.

## 7.

### Ação da Adrenalina

Desde 1907, pelos estudos de Carlson, determinou-se ação aceleradora da adrenalina sobre o coração do *Limulus polyphemus*.

Em 1929, Bain (p. 299) verificou que a adrenalina acelera o coração de *Carcinus* na concentração de  $10^{-7}$ . Welsh (1939, p. 234) demonstrou que o coração de *Panulirus* é sensível à adrenalina a  $10^{-6}$  e a  $10^{-5}$ . Uma notável aceleração é seguida por uma parada diastólica completa durante 4 minutos; depois, reiniciam-se os batimentos de amplitude e frequência grandemente aumentadas. É significativo voltar rapidamente a frequência ao normal e permanecer o aumento da amplitude durante cerca de 20 minutos depois de cessada a perfusão.

Os corações de *C. d. n. a. e.* reagem, até certo ponto, de modo semelhante. À perfusão de adrenalina a  $10^{-7}$  nota-se também aceleração seguida de paradas diastólicas de 2 a 3 segundos (gráfico n. 14). Tais paradas são cada vez menos duráveis, voltando o ritmo rapidamente ao normal. Adrenalina a  $10^{-4}$  e a  $10^{-3}$  não provoca as paradas aludidas, mas a aceleração é muito mais duradoura, cerca de 3 minutos. Fazendo-se atuar a droga em concentrações maiores ( $10^{-2}$ ) reaparecem as paradas diastólicas de intervalos mais longos (5-6 segundos). Empregando-se a atropina em diferentes diluições em correspondência ou não com as de adrenalina, verifica-se que o alcalóide modifica sensivelmente a ação do hormônio, mas não chega a anulá-la. Como se vê no gráfico n. 15 a atropina a  $10^{-3}$  fez cessar, mas não totalmente, a ação da adrenalina na mesma concentração. Atropina a  $10^{-3}$  perfundida durante muito tempo provoca a parada das pulsações (gráfico n. 16).

## 8.

**Ação dos macerados de corações de Callinectes**

Durante a estadia na praia de Caiobá, não dispondo de recursos, além dos indispensáveis para os primeiros ensaios do presente trabalho, procurei experimentar a perfusão dos macerados de corações do próprio Callinectes. A técnica utilizada foi a seguinte: — logo que os Crustáceos eram retirados do mar, procedia-se à abertura da carapaça (como foi indicado à p. 263); estando o coração em boas condições, i. é, pulsando regularmente, era extraído com o máximo cuidado após secção dos vasos respectivos; em geral, a amputação das "chelas" sangrava o animal de modo a permanecer menor quantidade de sangue dentro do coração. Este era, a seguir, lavado em líquido de Ringer para crustáceo ou em água do mar, e depois esmagado em um gral de porcelana com um ou outro destes líquidos. O macerado era filtrado e depois perfundido no coração dos Callinectes preparados como já foi dito à p. 263. O pH do líquido perfusor era ajustado para 7,5. Foram usados, em geral, corações pesando no total 250 mg. em 2 cc. de líquido. Além dos macerados de tecido cardíaco fresco, de Caiobá foram trazidos vários corações conservados em glicerina ou em álcool absoluto. No laboratório, em S. Paulo, com estes corações foram feitos macerados ou extratos após lavagem com Ringer, sendo os mesmos usados nos ensaios. A técnica da preparação do extrato será dada no capítulo respectivo, à p. 270.

O coração do *C. danae* reage muito significativamente à perfusão do macerado de coração do próprio animal. O gráfico n. 17 registra os batimentos de um coração já com aritmia acentuada. Iniciada a perfusão com o macerado, houve, logo no início, parada diastólica de 16 segundos, seguida de outras menores e depois uma acentuada aceleração com notável ritmicidade. No mesmo gráfico vê-se que a perfusão de atropina  $10^{-3}$  determina imediatamente a parada das pulsações; a seguir o órgão volta a pulsar, mas com ritmicidade diferente: frequência menor e amplitude maior. No macerado perfundido no coração cujas pulsações foram registradas neste gráfico (17), foi empregada a água do mar. Em outras experiências em que este veículo foi substituído pelo Ringer para crustáceos, os resultados foram semelhantes. Em todos os gráficos conseguidos, em número de 10, correspondendo a 5 corações, o efeito acelerador do macerado foi sempre bastante evidente, assim como a anulação de tal efeito pela atropina.

Pela análise de tais gráficos é de se deduzir que nos macerados, em água do mar ou Ringer, de tecido cardíaco de *C. danae* existe uma substância que influe sobre o coração do próprio animal, ocasionando, principalmente, aceleração e aumento da amplitude das pulsações, tal como o faz a acetilcolina. Reforça esta suposição o fato de tal efeito ser abolido pela atropina. Tendo empregado os corações totais, não é possível dizer ainda se a substância referida, de propriedades positivas inótropas e cronó-

tropas, provem do próprio tecido cardíaco ou dos gânglios nervosos aí localizados. Vários autores, especialmente Welsh (1939, p. 215), acentuam que, a taxa de Ac. nos músculos das pernas e nos extratos de coração de Crustáceos é muito pequena. No próximo capítulo será discutido este ponto.

## 9.

### Ação do extrato de tecido cardíaco de *Callinectes*.

Na preparação do extrato de tecido cardíaco foi empregada a técnica preconizada por Chang & Gaddum (1933, p. 256) para obtenção da Ac. em extratos de baço de cavalos, utilizando-se o álcool etílico para se conseguir aproveitamento de maior quantidade do éster. Sobre os diversos reagentes que podem ser usados para obtenção daquela substância e suas vantagens, há ampla referência da literatura no trabalho fundamental de Chang & Gaddum. Tendo por objetivo essencial, no presente estudo, verificar a presença da acetilcolina no tecido cardíaco de *C. danae* deixei de lado a tentativa de empregar outros reagentes que não os mencionados na técnica daqueles autores. Esta, em suas linhas gerais, foi a seguinte: extrairam-se 50 corações de *C. danae* pesando 0,530 grs. Após retalhamento com tesoura, foi o tecido submetido à ação do ácido tricloroacético a 10% na proporção de 2 cc. de ácido por grama de tecido, durante 2 horas. Em seguida, o extrato foi filtrado em filtro de Büchner e o resíduo lavado com ácido tricloroacético a 7%. Depois, em funil de separação, o extrato foi agitado 5 vezes com éter até se tornar apenas levemente ácido ao Congo. Foi deixado durante toda a noite na geladeira. No dia seguinte foi concentrado à baixa pressão, a 40°C. Antes de ser usado foi neutralizado com  $\text{NaHCO}_3$ .

Uma segunda extração foi feita empregando-se 3,430 gr. de tecido cardíaco. A concentração, em ambas as extrações, precedeu-se de modo a corresponder 1 cc do extrato a 10 gr. de tecido.

As preparações assim conseguidas foram mantidas constantemente na geladeira, ajustando-se o pH para 5,2. No momento de usar foi o pH abaixado para 7,2.

Algumas experiências foram realizadas em Santos e outras em S. Paulo. Os *Callinectes* desta última série de experiências foram mantidos em água do mar artificial, preparada segundo a técnica indicada por Péterfi (1928, p. 236). Em Santos eram eles operados logo depois de pescados.

Para confirmar a presença da Ac. em tais extratos, valí-me ainda dos testes do coração de *Bufo marinus* conforme indicação de Chang & Gaddum (l. c. p. 258) e de um outro, ao que me parece até agora ainda não adotado, o do coração de *Siphonops annulatus*. A ambos estes testes voltarei daqui a pouco.

O coração de *C. danae* perfundido com o extrato de tecido cardíaco diluído, 1 parte do extrato para 3 de Ringer ou água destilada, reage por paradas bruscas dos batimentos, primeiramente de curta duração, depois mais longas. Após um certo número de paradas, o coração acelera repenti-

namente as pulsações e aumenta a respetiva amplitude. Tais alterações não são permanentes, prolongam-se por 3 a 4 minutos, após o que as pulsações voltam à normalidade. O gráfico n. 18 mostra muito nítidamente tais modificações. Em alguns casos, gráfico n. 19, iniciada a perfusão do extrato diluído 2. (2 partes de extrato e 2 de Ringer), cessaram as pulsações durante um período mais demorado, ca. de 20 segundos. Pouco a pouco, aceleram-se os batimentos. Cessada a perfusão do extrato, ainda continuam os seus efeitos durante cerca de 15 segundos. Iniciada, no auge dessa atividade, a perfusão com atropina a  $10^{-5}$ , as pulsações tornam-se mais lentas, mas não se anulam. A abolição do efeito acelerador do extrato pela atropina dá-se na concentração  $10^{-3}$  desta substância, tal como ocorre com a acetilcolina (p. 267).

A perfusão do extrato não diluído notou-se o fenómeno interessante de intermitência dos períodos de aceleração com períodos de parada, ora sistólica, ora diastólica. Esta influência aceleradora do extrato foi prontamente modificada pela perfusão da atropina a  $10^{-3}$  (gráfico n. 20).

O estudo dos gráficos 17-20 informam sobre a ocorrência de uma substância positivamente inótropa e cronótropa nos macerados e nos extratos de tecidos cardíacos de *Callinectes danae*. A homogeneidade com que o coração deste Decápodo reage a tais preparações leva a admitir contenham elas a mesma substância ativa que age à maneira da acetilcolina. Esta ação é anulada pela atropina.

## 10.

### Ação do extrato de tecido cardíaco de *Callinectes danae* sobre o coração de Anfíbios

Dada a identidade de ação da substância ativa contida nos macerados e no extrato de tecido cardíaco de *Callinectes danae* com a acetilcolina, julguei indispensável, para me certificar de que é possível tratar-se desta substância, fazer alguns testes biológicos, valendo-me do coração de Anfíbios, material mais acessível, no momento, no laboratório. A pequena quantidade de extrato disponível não permitiu, como seria muito para se desejar, fossem efetuados outros testes biológicos reputados mais precisos, como vêm indicado por Minz (1932, p. 294), por Chang & Gaddum (l. c., p. 258), no moderno tratado de Goodman & Gilman (1941, p. 349) e em muitos outros trabalhos recentemente editados. Por outro lado, a tentativa de empregar o coração de *Siphonops annulatus*, Anfíbio da ordem dos *Gymnophiona* como teste da acetilcolina, tendo sido coroada de êxito, e não sendo intuito principal destas investigações senão o de verificar a ocorrência da acetilcolina no tecido cardíaco de *Callinectes danae* e estudar a influência na transmissão química do influxo nervoso, resolvi deixar para ocasião mais oportuna, especialmente quando maiores forem os recursos do laboratório de Fisiologia Geral e Animal, a ampliação deste estudo, especialmente no que se relaciona com a aplicação de outros testes da acetilcolina. Não dispondo, como seria necessário, de uma instalação apropriada à beira-mar, para a realização destas pesquisas, não resistindo quase os *Callinectes* ao

transporte de Santos para S. Paulo, e sendo necessárias quantidades consideráveis destes animais para obtenção do extrato ativo, em doses suficientes para as experiências, nesta parte do presente trabalho, referente aos testes, limitei-me, tão somente a obter os dados imprescindíveis com que pudesse comprovar a ocorrência de uma substância correspondente à acetilcolina no tecido cardíaco de *C. d. n. a. e.*

#### a) Ação do extrato sobre o coração de *Bufo marinus*.

A perfusão foi aqui realizada com o auxílio das cânulas de Symes, preferidas por permitirem, em qualquer momento, a substituição do líquido perfusor. Foram perfundidos 8 corações de *B. marinus* de peso entre 75 a 232 grs., todos machos. Além destes, foram feitas perfusões de acetilcolina a  $10^{-3}$  em dois animais afim de verificar a reação do órgão à substância sinteticamente preparada. Como se sabe, a acetilcolina determina um notável retardamento das pulsações do coração dos Vertebrados e, portanto, também no de *B. marinus*. No gráfico n. 21 vê-se tal efeito da acetilcolina a  $10^{-3}$  e a não persistência do mesmo. O fato da pouca durabilidade deste efeito possivelmente correrá por conta da degradação rápida do éster no tecido cardíaco do referido sapo.

Loewi e Navratil (1926, p. 688) mostraram que os extratos de tecidos de *Rã* e particularmente extratos do coração podem destruir a Ac. muito rapidamente. Clarck (1927, p. 123) sugere a possibilidade de ter havido erros nos cálculos daqueles autores que tomaram por base a relação entre a concentração e ação do éster e a quantidade da droga fixada pelo coração. De suas inúmeras experiências em que empregou, especialmente, o método da irrigação com solução fresca de Ac., Clarck (l. c.) deduz que o éster não produz completa parada do coração, porque uma pequena contração residual não é abolida, mesmo com o emprego de altas concentrações da droga. Por outro lado, verificou o aludido autor (p. 127) que o coração da *Rã* adquire uma determinada tolerância à Ac. quando submetido longamente à influência da substância. Não obstante, observou que realmente o coração desse Anfíbio destrói rapidamente a Ac., variando a velocidade de destruição consideravelmente em diferentes corações. Em *Bufo marinus* como disse, o efeito da Ac. em várias concentrações é relativamente de pouca duração. Na bibliografia compulsada não encontrei referência a este ponto com relação ao citado animal. O que posso adiantar, por enquanto, é que o comportamento do coração desse sapo, sob a ação da Ac., lembra, de certo modo, o da *Rã* nas mesmas condições descritas por Clarck. Outros resultados importantes dos estudos deste autor (l. c., p. 135) são as modificações sofridas pela Ac. devidas ao conteúdo iônico da solução do Ringer. Demonstrou o professor de Edinburg que a ação da Ac. é reduzida por um aumento da taxa de cálcio ou de potássio ou por aumento da alcalinidade. A redução da taxa de potássio, por sua vez, intensifica a ação do éster.

Em parte, os resultados de minhas experiências com o coração de *Bufo* e com o de *Siphonops* confirmam os resultados de Clark. No presente

trabalho foram computados apenas os gráficos da ação da Ac., esta diluída em água bi-distilada, deixando de lado, por enquanto, aqueles oriundos da ação da Ac. diluída em Ringer para anfíbios ou para crustáceos.

A Ac.  $10^{-4}$  (gráfico n. 22) não provoca modificações tão grandes no ritmo do coração de *Bufo marinus* como a Ac.  $10^{-3}$ . Aquí também a volta ao ritmo normal dá-se rapidamente. A Ac. a  $10^{-5}$  determinou ligeiras modificações da frequência e, em parte, aumento da amplitude. Iniciada e repetida a perfusão, há parada diastólica repentina das pulsações. No gráfico n. 23 registrou-se este fenômeno. Quero crêr se trate aquí de um efeito da penetração da Ac. em alta diluição no miocárdio, adicionado a um certo grau de distensão. Como se sabe, a distensão das fibras cardíacas é um fator de importância muito grande na manutenção de automatismo e da ritmicidade cardíaca, tanto in vivo como in vitro, nos Vertebrados e nos Invertebrados. Sobre este ponto, entre muitos outros, Dubuison (1933, p. 34) apresenta extensa bibliografía.

A perfusão do extrato ou do macerado diluído 3. (3 partes de extrato e 1 de Ringer) de tecido cardíaco de *Callinectes danae* teve efeito semelhante (gráfico n. 24). Comparando ambos os gráficos 21 e 24, vê-se que o extrato provoca parada diastólica duradoura, depois do que o coração reage voltando ao normal; do mesmo modo atuou a Ac.  $10^{-3}$ , e o gráfico n. 24 corresponde ao registro das pulsações tendo sido o coração de *Bufo* perfundido com 1 cc. do extrato diluído a 3. Isto quer dizer que 1 cc. do extrato diluído 3. produziu aproximadamente o mesmo efeito que gr. 0,0001 de Ac.

Também em *Bufo*, como em *Callinectes*, a atropina a  $10^{-5}$  aboliu a ação da acetilcolina, naquele acelerando as pulsações e neste anulando o efeito acelerador da substância contida no extrato perfundido.

Chang & Gaddum, em seu trabalho publicado em 1933, empregaram o teste da perfusão do coração de *Rã* (p. 258 e seguintes) na pesquisa da acetilcolina. Não obstante ser o coração desse animal de sensibilidade variável, (suponho tratar-se de *Rana temporaria* a mais comum na Inglaterra, visto como Chang & Gaddum não mencionam a espécie com que trabalharam) aduzem aqueles autores ser possível, com este método, verificar doses tão pequenas como 0,01  $\gamma$  de acetilcolina, ou ainda menores. Por outro lado, porém, é sabido que o coração de *Rã*, e quero crêr que também o das *Bufo* nidae em geral, pode ser influenciado por grande número de outras substâncias que conhecidamente ocorrem nos extratos de tecidos. Segundo aqueles autores, pequenas quantidades de ácido produzem efeito semelhante ao da Ac., o que exige perfeita e cuidadosa neutralização dos extratos antes do uso, de vez que, como é sabido, estes devem ser conservados em meio ligeiramente ácido para se manter ativa aquela substância. O cloreto de potássio (KCl) também produz efeito similar ao da Ac. e os sais de cálcio e a histamina provocam, no coração do Anfíbio aludido, aumento da amplitude dos batimentos. É obvio que a presença destas substâncias podem mascarar a da Ac. Chang & Gaddum (l. c., p. 259), de quem tiro estas indicações, ainda mencionam a adenosina, o ácido adenílico e o adenil pirofosfato, de influência no ritmo das pulsações do coração da *Rã* o que dificulta a investigação da acetilcolina com este teste. Acontece, porém, que o efeito devido à "cholina" e seus ésteres podem ser distinguidos daqueles devido a outras substâncias que podem ocorrer no corpo dos ani-

mais pela ação antagonica da atropina. Não obstante Chang & Gaddum acharem não ser sempre facil a aplicação do teste da atropina, em virtude da sensibilidade da preparação à Ac. às vezes ficar diminuida durante o curso da experiência, mesmo na ausência da atropina, no presente caso dos corações de *Bufo* fazendo atuar sobre eles a acetilcolina ou o extrato de tecido cardíaco de *Callinectes* tal ação antagonica foi sempre evidente.

Devo aduzir ainda as ponderadas considerações de Chang & Gaddum referentes à possível interferência de substâncias desconhecidas no uso do coração de *Rã* para o teste da acetilcolina. O caso da chamada substância R, figurado por estes autores, é muito sugestivo (p. 260). Nas minhas experiências com o extrato de tecido cardíaco de *Callinectes* um dos corações perfundidos de *Bufo* reagiu por uma notavel aceleração e aumento da amplitude dos batimentos, após curto período de parada do coração (gráfico n. 25).

É possível que aqui tenha havido interferência de substância ou substâncias contidas no extrato que não unicamente a Ac.. Embora tal fenômeno tenha acontecido uma unica vez, valerá à pena anotá-lo para ser levado em devida conta em futuras investigações com o extrato de tecido cardíaco de *Decápodos*.

À vista das recomendações especiais de Chang & Gaddum, no presente teste, em que foram utilizados corações de *Bufo* todas as precauções necessárias foram tomadas relativamente ao tratamento do extrato do tecido cardíaco de *Callinectes* e consequentemente ajustamento do pH. Não obstante a relativa pouca confiança que em geral se deposita neste teste, valeu êle para confirmar a ocorrência de uma substância ativa, correspondente à Ac., no tecido cardíaco de *C. danae*.

#### **b) Ação do extrato sobre o coração de *Siphonops annulatus*.**

Em trabalhos anteriores sobre a fisiologia do sistema circulatório de *Siphonops annulatus* (Sawaya 1940), verifiquei a acentuada resistência deste órgão à ação de certas substâncias, tais como, pilocarpina, atropina, estricnina, sendo particularmente característica tal resistência ao veneno mucoso do próprio *Siphonops* aí denominado sifonopsina.

Recentemente, em nota que ainda se acha no prélo, foram reunidos os resultados das investigações realizadas com o coração deste animal no sentido de se determinar a reação desse órgão às substâncias colí- e adrenérgicas. Tais resultados de 18 experiências levaram à verificação de que a reação à Ac.  $10^{-4}$  dá-se como nos demais Vertebrados, i. é, longa parada das pulsações, seguida de outras curtas, diminuição da frequência e da amplitude dos batimentos. Em alguns casos (5), porém em vez de redução da amplitude, houve aumento (gráfico n. 26). Fora destes casos, foi sempre observada a ação retardadora da acetilcolina sobre o coração de *S. an.* de intensidade cada vez maior nas maiores concentrações. Em todas as experiências registrou-se a ação antagonista da atropina, de modo geral, em concentração equivalente à da Ac. (gráficos n. 27 e 28). A perfusão desta substância juntamente com a atropina nas mesmas concentrações revelou anular-se completamente a ação da primeira delas. Perfundindo-se, porém, unicamente atropina  $10^{-3}$ , nota-se que o coração do *S. an.* fica, primeiro,

parcial, depois, totalmente bloqueado. Tal bloqueio se dá tanto mais rápida e intensamente quanto mais concentrado for o alcalóide. Deixo de parte esta ação singular do sulfato de atropina sobre o coração do *S. an*. Considerações sobre este ponto foram sumariadas na nota acima referida.

Em experiências ulteriores, registrei a extrema sensibilidade do coração de *S. an* à Ac; Mesmo na concentração de  $10^{-10}$  já são notáveis ligeiras modificações da frequência e da amplitude das pulsações (gráfico 29). Tais alterações são mais significativas na concentração a  $10^{-8}$  (gráfico n. 30). A anulação do efeito pela atropina, em concentração correspondente ou mesmo menor, dá-se rapidamente.

A introdução de um novo teste biológico para uma substância já tão pesquisada requereu, é natural, cuidados especiais. Os corações de *S. an* perfundidos com água bidistilada ou com Ringer para anfíbios não acusaram modificações perceptíveis nos respectivos traçados.

Tendo-se mostrado os corações dos *Siphonops* sensíveis à atropina, à eserina, à histamina, unicamente em concentrações muito altas, acima de  $10^{-8}$ , parece poderem constituir um bom teste para a acetilcolina, de vez que bastam soluções a  $10^{-8}$  desta substância para modificar as pulsações. E, de se notar, porém, que pequenas oscilações do pH são suficientes para alterá-las.

Isto posto, procurei verificar a ação do extrato de tecido cardíaco de *C. danae* nos corações de *S. an*.

As diluições 1, 2, e 3, do extrato foram respectivamente, 1, 2 e 3 partes do extrato e o restante de Ringer para crustáceos. Os gráficos n. 31-32-33 mostram as mudanças que se operam na frequência e na amplitude dos batimentos. É bem visível que já o extrato 1 inflúe, se bem que ligeiramente, nos batimentos. A perfusão com o extrato diluído 2, e 3 altera profundamente quer o ritmo, quer a intensidade, das pulsações. No gráfico n. 33 vê-se que o extrato não diluído primeiramente provoca sensível aritmia, depois, parada total das pulsações. A perfuração de atropina a  $10^{-2}$  pouco a pouco vai restabelecendo a ritmicidade (gráfico n. 34).

Como foi indicado na nota referida, das substâncias perfundidas unicamente a nicotina em concentrações menores ( $10^{-4}$ ) tem marcada influência sobre o coração de *S. an*. Pelo gráfico n. 35 vê-se, porém, que a parada se dá em sístole e não em diástole, como com a Ac., sendo o ritmo das pulsações caracterizado especialmente pela notável diminuição da amplitude dos batimentos.

Dos gráficos obtidos com a perfusão do coração de *S. an*, podemos ter indicações seguras de que este animal é altamente sensível ao extrato de tecido cardíaco de *C. danae*.

## II.

### Discussão dos resultados

O coração de *C. danae* como o de vários outros Crustáceos, mostrou-se bastante sensível à ação de diferentes drogas colí e adrenérgicas. Tal sensibilidade é mais pronunciada à Ac. e à adrenalina que à atropina

re à nicotina. Pela análise dos gráficos aqui apresentados verifica-se que, em grande parte, os resultados das experiências em *C. danae* e concordam com as de Davenport, Loomis & Opler (1940), de Davenport (1940, 1941) e de Welsh (1937, 1938, 1939, 1939a, 1940). Se bem que as pequenas diferenças entre os resultados aqui descritos e os conseguidos por esses autores possam ser levadas também à conta da diversidade do material e dos métodos de perfusão, creio que nas reações de *C. danae* e especialmente à Ac. e à atropina, tenha influência preponderante a taxa relativamente elevada de Ac. contida no tecido cardíaco. Este fato explicaria talvez a acentuada aceleração do coração de *C. danae* quando perfundido com Ac. em concentrações altas,  $10^{-4}$  por ex. (gráfico n. 1). O coração de *Panulirus* reage ao éster em concentração igual, com parada sistólica "da qual não volta senão depois de lavado durante vários minutos" (Welsh 1939a, p. 234). Fenômeno semelhante ao observado em *Panulirus* dá-se em *C. danae* quando perfundido com Ac.  $10^{-2}$  (gráfico n. 3), com parada definitiva do coração. Ac.  $10^{-2}$  (em um caso) e Ac.  $10^{-3}$ , portanto, doses ainda mais concentradas, mostram também efeito cronótropo positivo.

Fato característico na perfusão com este éster é que, em todas as concentrações usadas, antes que a aceleração cardíaca se manifeste, há um pronunciado período inibitório, que não se encontra nos gráficos de Davenport e nem nos de Welsh. Muito possivelmente, tal fenômeno tenha sua origem na perfusão *in situ* atuando as drogas diretamente sobre os elementos nervosos inibidores ou, o que acho mais verosímil, seja devido à distensão do músculo cardíaco, de vez que os corações dos Crustáceos mostram período refratário unicamente no início e durante a *sístole* (Carlson 1907, p. 7; de Boer 1928, p. 452) e são geralmente considerados susceptíveis ao tétanus, condições estas, entre outras que o diferenciam do coração dos Vertebrados.

Entre os vários pesquisadores há discordância relativamente à ocorrência de um período refratário e também quanto à obediência do coração dos Crustáceos à lei da inexcitabilidade periódica. Assim Viault e Jolyet (ap. Cosmovici 1925, p. 797) acham que o coração desses animais obedece a essa lei, enquanto que Cosmovici (l. c., 799) pretende ter demonstrado que tal não se dá, à vista de suas experiências em *Astacus*.

Ao demais, a distensão do músculo cardíaco é um fator extremamente importante na excitação e no entretenimento do automatismo do coração dos Invertebrados. É indispensável naqueles em que o sistema nervoso do coração parece ser ausente ou pouco desenvolvido. Nos Crustáceos e em *Limulus*, tem efeito cronótropo, inótropo e batimótropo positivo (Dubuisson 1933, p. 50). A influência da distensão sobre a ritmicidade cardíaca parece estar ligada à suplência nervosa do órgão, que é, em geral, bastante densa nos Crustáceos. Tal influência, correlacionada com os elementos nervosos do coração, é manifestada no *Limulus polyphemus*, como se deduz das experiências de Carlson (1907a, p. 152), de Dubuisson (1931, p. 195; 1931a, p. 263; 1933a, p. 666; 1933, p. 75). Uma distensão um pouco mais forte no momento da perfusão, quero crêr, provoque em *C. danae* inicialmente, a inibição apontada. Cessada a excitação mecânica, o órgão acelera os seus batimentos sob o estímulo da droga.

Além disso, o chamado pericárdio toma parte importante na regulação da atividade cardíaca dos Crustáceos, principalmente nos Decápodos, como foi bem demonstrado por Mangold (1925, p. 204) e por Dubuisson (1928, p. 20), e, sem dúvida, a distensão mecânica pelos flúidos introduzidos pode provocar distúrbios da ritmicidade pela tensão que ocasiona nos ligamentos daquele envoltório. Creio que assim se poderia explicar a inibição inicial que o coração de *C. danae* apresenta à perfusão das substâncias usadas nas experiências.

Quanto à duração do efeito da Ac. e a sua potencialização pela eserina, os resultados por mim obtidos concordam com os dos autores que trabalharam sobre este ponto, utilizando Decápodos diferentes. Talvez a presença de uma colinesterase no tecido cardíaco de *C. danae* possa explicar este fenômeno. Deve-se notar, porém, que, Simonart (1931, p. 763) e Bacq (1937, p. 174) notaram ausência de colinesterase no sangue de *Homarus*, e Welsh (1939a, p. 217) aventa a hipótese da Ac. agir como hormônio circulatório. Registro apenas a opinião de Welsh, visto ultrapassar os limites do presente trabalho a questão dos chamados hormônios circulatórios nos Invertebrados. Considerações desta ordem e muitas outras encontram-se nas resenhas de Demoor (1933, p. 542), de Cardot (1933, p. 625), de Dubuisson (1933, p. 41). No sangue dos Vertebrados (Boi) cumpre lembrar que o éster referido ocorre em muito pequena quantidade (Dudley 1933, p. 252).

Relativamente aos efeitos "muscarínico" e "nicotínico" da Ac., creio que em *C. danae* à vista da reação pouco acentuada à nicotina, o "efeito de muscarina" é mais evidente que o observado até agora por outros autores. Davenport Loomis & Opler (1940, p. 506) e Davenport (1941, p. 180), fazendo atuar nicotina  $10^{-4}$  no coração isolado de *Cancer* obtiveram, primeiramente, uma inibição em sístole e, depois, notável aceleração. Nicotina a 1:20.000, diz o último autor, produz aumento da frequência e da amplitude. O efeito não era reversível porque o coração voltaria aos batimentos originais somente após 15-20 minutos, aproximadamente, com lavagem pelo líquido perfusor. Nicotina em altas concentrações (1:4.000 e 1:3.000) têm efeitos vários. Nas minhas experiências, tal influência aceleradora somente foi verificada uma vez (gráfico n. 13) com nicotina a  $10^{-3}$ . Com o alcaloide a  $10^{-4}$  (gráfico n. 12) há, no início, ação cronótropa positiva e inótropa negativa. Pouco depois a ação se inverte. Com se vê, é justamente o contrário da ação da Ac. É possível que isto derive do fato de ter sido feita a perfusão in situ, agindo o alcaloide diretamente sobre os elementos nervosos. Nos Vertebrados sabe-se que a nicotina atua estimulando, e subsequentemente, paralisando os gânglios simpáticos, fato conhecido desde a clássica descrição de Langley & Dickinson (1889). Esta ação estimulante da nicotina é abolida pela eserina, possibilitando a libertação da Ac. (Feldberg & Vartiainen 1934, p. 119). Nos Crustáceos, Plateau (1880, p. 691) verificou a ação aceleradora da nicotina sobre o coração, e Carlson (1922, p. 562) assevera que este alcaloide é um forte estimulante. A perfusão do coração in situ de *C. danae* não confirmou os resultados destes autores. Além disso, pelo que diz Davenport (1941, p. 181), em corações isolados, nicotinizados de *Cancer* a Ac. atua provocando aumento da fre-

quência e da amplitude. Por outro lado, tratamento longo com a nicotina (1:4.000) produz irregularidade das pulsações, a qual é normalizada pela Ac.  $10^{-4}$ . Como se vê, ainda que aqui seja levada a discordância de resultados à conta da diversidade de material e de métodos, o que se pode deduzir da influência da nicotina sobre o coração de *C. danae* é que o efeito inótrópico positivo é evidente, mas o cronótrópico é negativo, o que está em oposição ao resultado dos autores já antes lembrados. A se confirmar tal efeito com nicotina, em *C. danae* quando for possível a perfusão do coração isoladamente, então se tornará mais acentuado o efeito muscarínico da Ac. Tanto mais que, como já foi visto, em *C. danae* a atropina abole o efeito da Ac.

Quanto à adrenalina, *C. danae* reage como os demais Decápodos, sendo concordantes os meus resultados com os de Welsh, já lembrados. Cumpre notar, porém, que, em todos os gráficos obtidos com o mesmo método de perfusão, o período inibitório característico de Ac. e dos extratos aqui se verifica. Em *C. danae* a adrenalina não atuou tão rápida e intensamente como em *Cancer* em *Carcinus* e em *Maia*, como foi verificado por Bain (1929, p. 299). É possível que o coração de *C. danae* perfundido isoladamente e não *in situ* também responda à adrenalina como os demais Decápodos anotados. É uma questão a verificar.

A ação antagonista da adrenalina à Ac. não se observa no coração dos Crustáceos, como é notório no dos Vertebrados (Morison & Acheson 1928, p. 149; Marnay & Nachmanshon 1937, p. 1265, entre outros). Os gráficos n. 15-16 mostram marcadamente este fenômeno. A atropina modifica sensivelmente o efeito da adrenalina, mas não o anula. Teria, por assim dizer, uma ação antagônica moderada. Tal resultado é oposto ao encontrado por Bain (l. c.), quando perfundiu corações de vários Decápodos.

A comparação dos registros das pulsações dos corações de *C. danae* durante a perfusão de macerados e extratos de tecido cardíaco do próprio animal com aqueles da Ac. leva a admitir que, realmente, o princípio ativo acelerador cardíaco, que se demonstrou existir nos referidos macerados e extratos, tem a mesma propriedade da Ac. Os testes biológicos realizados com o coração de *Bufo marinus* e de *Siphonops annulatus* aduzem forte evidência de que, efetivamente tal princípio corresponderia talvez à Ac. Ainda, tal evidência é reforçada quando se comparam os resultados aqui conseguidos com os de Welsh (1939, p. 214), que fez a extração do referido éster dos tecidos nervosos de *Carcinus* animal da mesma família (Portunidae) de *C. danae*.

Quanto a saber se tal substância ativa, aqui isolada do tecido cardíaco de *C. danae* provem do músculo ou dos elementos nervosos do coração, é uma questão que não se pode resolver no momento. É muito possível que o princípio ativo seja liberado mais pelos elementos nervosos cardíacos. Isto se verifica, por ex., espontaneamente, em grandes quantidades nos perfusatos, sem intervenção de estímulo, quando se lesam as células dos gânglios cervical superior e nodosum do nervo do gato, como o demonstram, entre muitas outras, de numerosos autores, as experiências de Rafaelo Lorente de Nó (1928, p. 332).

Os *Callinectes* possuem o sistema nervoso cardíaco denso. Na bibliografia à disposição, somente um trabalho, de Conant & Clark (1896), me foi dado lêr sobre os nervos cardíacos de *Callinectes hastatus*, hoje cognominado *C. sapidus* (cf. Rathbun 1939, p. 99). Segundo aqueles autores (p. 341), o coração dêste animal é suprido por nn. inibidores e aceleradores, provenientes do gânglio torácico. O n. inibidor cardíaco abandona o g. torácico juntamente com o chamado n. recorrente e, dirigindo-se dorsal e caudalmente, vai penetrar no coração pela face dorsal ao nível do orifício bronquio-cardíaco anterior. Os nn. aceleradores saem do g. em níveis diferentes. O primeiro aponta entre os nn. do maxilípedo 3. e o nervo I torácico, daí ascendendo em direção dorsal e caudal, quase em linha reta até o coração, no qual penetra juntamente com o n. inibidor. O segundo n. acelerador deixa o g. juntamente com o n. I torácico, com torna o conjunto dos nn. torácicos, depois se alonga para o dorsal em direção medial. Na altura do 1/3 caudal das brânquias, volta-se para trás lateralmente e vai atingir o coração pelo bordo rostral, logo abaixo do orifício brônquio-cardíaco. Visto no conjunto, o segundo n. acelerador descreve duas curvas formando um S, sendo a rostral de concavidades medial e a caudal, muito mais ampla, de concavidade lateral. As designações de nn. inibidor e acelerador são oriundas dos resultados nas experiências de Conant & Clark (l. c.) realizadas com a excitação elétrica de tais nn. Quero crêr que o sistema nervoso que supre o coração de *C. danae* tenha idêntica disposição.

Percorrendo a bibliografia a respeito da inervação cardíaca dos Decápodos, verifico que o assunto apresenta ainda vários pontos abertos à pesquisa, como a existência do chamado "nervo cardíaco de Lemoine", descrito por êste autor em 1868 (p. 99), cuja origem foi discutida e dada de modo diverso por Dogiel (1876, p. 1120; 1876a, p. 1161; 1877, p. 403). Por sua vez Yung (1878, p. 520), embora não tenha experimentado sobre o referido n. cardíaco, pretende ter confirmado em *Homarus*, e em *Cancer* as observações de Lemoine. Plateau 1880, p. 640 e outros também confirmaram a existência do referido nervo, ao passo que Jolyet e Viallanes (1893, p. 404) não o encontram em *Carcinus moenas* tendo localizado ambos os centros inibidor e acelerador cardíacos no gânglio torácico, o que é confirmado pelas pesquisas já citadas de Conant & Clark. Botazzi (1901, p. 665) confirmou os resultados dêstes autores e também os de Jolyet e Viallanes, relativamente à localização, no gânglio torácico, de ambos os centros inibidor e acelerador do coração. Em extenso resumo bibliográfico sobre a inervação do coração de Crustáceos, Brücke (1925, p. 921) também conclue que ocorre aí uma dupla inervação, achando-se o centro dos nn. na parte torácica da cadeia ganglionar. Esta mesma afirmação encontro em Clark (1927, p. 9).

Distribuição dos nn. que suprem o coração, muito próxima da que se encontra em *Callinectes* aquí sumariada, acha-se também descrita por Carlson (1905, p. 151) em *Palinurus*. Êste autor nada adianta sobre a presença do "nervo cardíaco de Lemoine" neste Estomatópodo. O mesmo se dá com Welsh (1939a, p. 235), que estudou a inervação do coração de *Panulirus*. No entretanto, Keim (1915, p. 509, fig. 7b, nca) descreve êste n. em *Astacus fluviatilis* (*Potamobius astacus*) e

figura-o originário do "nervus stomato-gastricus superior" sem contudo afirmar (l. c., p. 510) tenham suas fibras origem diretamente neste último. Talvez procedam elas do "nervus ventriculi impar superior". Mais recentemente, menção dêsse nervo cardíaco, sumariada na base da descrição de Keim, encontro em Hanström (1928, p. 452/3), o qual o coloca entre os nn. do sistema simpático em conexão com o tritocerebro. Cardot (1933, p. 645) na sua extensa "mise-au-point" do automatismo cardíaco nos Invertebrados, nada mais adianta além do que é referido por Hanström. Finalmente, ainda sobre o "nervo cardíaco de Lemoine", são dignas de nota as recentíssimas pesquisas de Wiersma & Novitski (1942, p. 260). De suas experiências em *Cambarus clarkii*, usando técnica especial, os autores chegaram à conclusão de que aquele n. não tem influência reguladora sobre o coração.

A inervação cardíaca dos Decápodos, pelo que acabo de resumir, é assunto relativamente complicado, e seu estudo aprofundado ultrapassa os limites deste trabalho. Quero apenas lembrar que não se pode excluir entre os nn. cardíacos de *Callinectes* a existência de nn. do sistema simpático. Se isto for exato, uma nova via para investigação estará aberta no estudo das relações entre os sistemas nervoso e cardíaco dos Decápodos.

Relativamente às celulas nervosas intra-cardíacas, devo notar que Dubuisson (1933, p. 15) apresenta pequena resenha bibliográfica, na qual se nota que, relativamente aos Crustáceos marinhos, o trabalho mais substancial é o de Alexandrowicz (1933), elaborado em vários Decápodos, salientando-se, dentre os *Brachyura*, *Maia squinado*, *Cancer pagurus*, *Eriphia spinifrons* e *Carcinus moenas*. Quanto aos de água doce, lembro que Newmywaka (1928, p. 219) descreve o plexo intracardíaco de *Pastacus* com, pelo menos, 16 células. De suas investigações, Alexandrowicz (p. 243) conclue que no coração dos Crustáceos Decápodos podem ser distinguidos três sistemas de elementos nervosos: a) sistema local de neurônios distribuídos no próprio coração; b) sistema de fibras ligando o coração com o sistema nervoso central, e c) sistema nervoso que supre as valvas das artérias, originando-se do coração e dos músculos do pericárdio. Em suas considerações fisiológicas (p. 237) é levado a crêr que os batimentos cardíacos nos Crustáceos são regulados pelo sistema nervoso descrito. Assim, o coração de *Maia* quando seccionado lateralmente, ao ser preparado para coloração, pulsa durante uma hora ou mais, com ritmo regular, enquanto o tronco ganglionar não for lesado. A localização das células nervosas sob os músculos dificulta a experiência de secção. Já em *Lygia oceanica* o tronco ganglionar não sendo coberto pelos feixes musculares, a secção é mais fácil. A experiência efetuada por Alexandrowicz (l. c., p. 238) mostra que o coração dêsse Isopodo incisado ao meio continua a bater, mas cada parte do coração contendo metade do tronco ganglionar pulsa com ritmo regular. É mesmo possível cortar o tronco nervoso em dois lugares e, então, poder-se-á perceber o ritmo separado das três porções do coração: Aliás, em 1931, o mesmo autor demonstrou (p. 1271) que o coração bi-dividido, mas, sem lesão do tronco ganglionar nervoso que fica à esquerda, ligando as duas partes como uma ponte, tem os batimentos síncronos.

Fenômenos que até certo ponto lembram os que aqui resumo do trabalho citado de Alexandrowicz foram observados em *Callinectes*. O coração

isolado deste Decápodo, se retirado cuidadosamente, também pulsa durante longo tempo quando mergulhado em Ringer para crustáceos. Em alguns exemplares, ao serem seccionados os corações para a preparação do extrato, as pequenas partes continuavam a pulsar aritmicamente. Não me foi dado efetuar a coloração dos elementos nervosos do coração de *C. danae* e nem encontrei referência na bibliografia a respeito, mas, quero crêr que, aqui também, como nos *Brachyura* estudados por Alexandrowicz, o sistema nervoso intracardíaco de *C. danae* seja muito complexo.

Um outro ponto que merece referência na fisiologia do coração de *C. danae* vem a ser o da conexão do músculo cardíaco com o chamado pericárdio. Já Mangold (1925, p. 199) afirmou que, embora o pericárdio seja dotado de propriedades contráteis, o ritmo de suas contrações é muito mais lento que o do próprio coração. Em *Cancer pagurus* aquele autor acha que as chamadas "flutuações do tonus do pericárdio" são de 27 para 80 pulsações do coração. Em *C. danae* também foi observado fenómeno semelhante. Alexandrowicz (1933, p. 242) objeta, porém, que o mesmo sistema de nn. segmentários supre os mm. das valvas e os do pericárdio, que trabalha com ritmo completamente diferente; por sua vez os mm. das valvas e os do coração que se contraem, embora alternadamente, mas com o mesmo ritmo, não mostram conexão alguma de seus elementos nervosos. Não é impossível, acrescenta esse autor, que esta conexão se dê ao longo do sistema nervoso central. Todavia, ele sugere uma outra explicação, que aqui transcrevo por me parecer interessante para o estudo da mediação química nos Crustáceos. Alexandrowicz supõe que os músculos das valvas estejam em contração tônica com os mm. do pericárdio, ambos sob a influência de influxos transmitidos pelo sistema comum de nn. segmentários. Supõe ainda que, na contração tônica os mm. das valvas possam ser relaxados em sístole mediante um estímulo, agindo sobre as valvas e produzido pelo próprio sangue. Pode ser que seja a pressão do sangue que force o caminho, ou talvez, alguma substância libertada durante a sístole de modo a promover o relaxamento do aparelho que fecha as valvas. De qualquer modo, a sequência rítmica da ação das valvas e do coração poderá ser coordenada dessa maneira sem conexão direta nervosa do respectivo aparelho muscular. Esta assincronia do pericárdio e a não conjugação dos mm. das valvas e os do miocárdio com os mesmos nn. segmentários induz à admissão da ocorrência de uma substância libertada no sangue que excita o automatismo e o ritmo do coração destes *Brachyura*. Tal hipótese adquire maior importância com o fato de ocorrer no tecido cardíaco pelo menos de *C. danae* uma substância com as propriedades da Ac. Segundo ficou dito à p. 273, o efeito de 1 cc. de extrato diluído 3. (3 partes de extrato para 1 de Ringer para Crustáceos) deste tecido, em coração de *Bufo marinus* corresponde ao de gr. 0,0001 de Ac. sobre o mesmo órgão. Dada a quantidade de tecido cardíaco de *C. danae* empregada, (gráfico n. 3), poder-se-ia dizer que neste tecido cardíaco ocorre quantidade apreciável de substância ativa aceleradora. Como se vê, pelo menos em *C. danae* a quantidade de éster não é tão pequena como Bacq (1935a, p. 31) e Welsh (1939, p. 215) encontraram em outros Decápodos. Aquela "substância libertada em sístole" referida por Alexandrowicz poderia muito bem ser a referida

substância ativa, abundante no tecido cardíaco de *C. danae* como se deduz das experiências aquí relatadas.

O comportamento do coração dos Anfíbios (*B. marinus* e *S. annulatus*) sob a perfusão dos extratos concentrados de *C. danae* vem em apóio do que acabo de dizer. Ambos estes Anfíbios mostraram-se tão sensíveis ao princípio ativo contido no extrato, como à Ac. Tal sensibilidade a este éster lembra aquela indicada para a *Rana temporaria* (Clark 1926, p. 530), sendo, porém, o coração do *S.* muito mais sensível à Ac. ( $10^{-10}$ ). Dada a abolição do efeito da Ac. pela Atropina no coração de Anfíbio ser constante (Clark 1926a, p. 547) em *R. temporaria* e o mesmo verifica-se com os perfusatos de extrato de tecido cardíaco de *C. danae* nos corações de *B. marinus* e de *S. annulatus*. É muito possível que o aludido princípio ativo corresponda à Ac., ou a uma substância mediadora tal como é lembrado por Cicardo em suas várias publicações (1938, p. 337; 1939, p. 20; 1939a, p. 157) sobre as diferentes maneiras dos mm. de *Bufo arenarum* reagirem à Ac.

Finalmente, à vista da natureza ganglionar do sistema nervoso cardíaco dos vários Decápodos até agora estudados, e talvez, portanto, de *Callinectes*, cabe aquí a conjetura de a apreciável quantidade de substância ativa existente no tecido cardíaco de *C. danae* ser produzida mais pelos elementos nervosos que pelos musculares, e que o éster seja realmente um mediador químico da transmissão do estímulo nervoso. Em apóio desta hipótese está o fato de, em *Astacus*, o batimento do coração originar-se nas células nervosas e prosseguir secundariamente no miocárdio (Rijlant 1932, p. 41). Se na junção neuro-muscular, onde sua ação é muito fraca, como pretende Katz (1936, p. 219) para os mm. das "chelas" de *Carcinus* e de *Maia* ou se no coração de *C. danae* ocorre uma disposição especial, é uma questão que não se poderá resolver antes do estudo sistemático da inervação intracárdiaca de *C. danae*.

Como resultado das experiências aquí relatadas, creio poder tirar as seguintes conclusões:

1. A Ac. provoca efeitos inótropos e cronótropos positivos no coração de *C. danae* na perfusão *in situ* em concentrações  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ .
2. Mesmo em concentrações mais fortes, a Ac. ainda determina ligeira aceleração dos batimentos cardíacos. Predominam, porém, em tais concentrações ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), inotropia e cronotropia negativas.
3. O coração de *C. danae* reage à eserina ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ) acelerando as pulsações com aumento da amplitude. Como nos demais crustáceos, a eserina também potencializa a ação da Ac.
4. Atropina ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) atua com efeito cronótrofo negativo e inótrofo ligeiramente positivo sobre o coração de *C. danae* e abole completamente o efeito da Ac.
5. Nicotina ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) atua com efeito cronótrofo negativo e inótrofo positivo. A cronotropia é mais acentuada que a inotropia. Diluições maiores do alcalóide são ineficazes de modo a permitir registro de alterações da ritmicidade do coração.

6. Adrenalina  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , provoca aceleração das pulsações do coração de *C. danae*, com ligeiro aumento da amplitude. Tal efeito é bastante diminuído, mas não completamente abolido, pela atropina.
7. À vista das conclusões 4.5, pode-se dizer que a "ação muscarínica" da Ac. é, de certo modo, evidente no coração de *C. danae*.
8. Nos macerados e nos extratos de tecido cardíaco de *C. danae*, existe um princípio ativo de propriedades acentuadamente cronótropa e inótropa positivas.
9. Os testes biológicos, em coração de *Bufo marinus* e de *Siphonops annulatus*, indicam que tal princípio ativo atua do mesmo modo que a Ac.
10. A quantidade deste princípio ativo obtida, comparando os efeitos do extrato com os da Ac., é bastante apreciável no tecido cardíaco de *C. danae*.
11. Esta notável quantidade de substância ativa existente no coração de *C. danae*, a suplência nervosa do m. cardíaco e as reações às drogas colí e adrenergicas, levam a presumir que neste Crustáceo aquela substância seja realmente um mediador químico do estímulo nervoso.
12. A sensibilidade de *S. annulatus* à Ac. recomenda-o como teste para o referido éster.

### Summary

#### THE OCCURRENCE OF ACETYLCHOLINE IN CARDIAC TISSUES AND ITS ACTION ON THE DECAPOD HEART (*Callinectes danae*)

The results of several experiments from Davenport (1941, p. 178) on *Cancer magister* Dana, Welsh (in various papers, 1937-1940) on *Maia Carcinus* and *Panulirus* about the reaction of the hearts to acetylcholine and nervous extracts, have indicated the possibility of the occurrence of this substance in the cardiac tissues of Decapods. Some experiments were performed to detect this ester of choline in the cardiac tissues. It is well known that the hearts of some Decapods react in different ways when submitted to some colí and adrenergic drugs. There has been found to be considerable variation in this response but not correlated with the occurrence of acetylcholine in the muscles of Decapod. Bacq and Welsh inform that the amount of this substance in Decapod heart tissue is very little. It seemed worth while to carry on more extensive experiments in order to isolate this ester from some Decapod hearts and to study the effect of the respective extract of cardiac tissue in the heart of the same animal.

*Callinectes danae* Smith (ca. 250 specimens) from Caiobá, sea-shore in the State of Paraná, and from Santos, were used for some experiments in the sea-shore and later on for extracting in the laboratory in S. Paulo. The small size of the heart did not permit the perfusion in the isolated heart. The preparation of the animal was made as follows: a large square piece of

the carapace was excised and folded over the abdomen. The heart was exposed and a hook placed in its posterior end. This hook was bound to the level of the kymograph by a very thin thread. The perfusion is made *in situ* for the removal of the organs takes some time, and the *C. danae* heart does not survive a long time the exposure to the air. The perfusing fluid is injected into the heart cavity so that the organ remains immersed in the solution. Before the injections of the drug solutions, the heart is washed with Ringer for Crustaceans. Care is taken in the preparation of this solution. The formula indicated by Pantin (1934) and that modified by Davenport (1941, p. 179) was chosen, for it is close to the sea-water constitution. The different kinds of Ringer solution mentioned in many papers were indicated more for freshwater than for the marine species. van Harrelved's formula (1936) gives good results for the first type Crustaceans.

In Caiobá (600 km. far from S. Paulo) *C. danae* was caught in the sea-shore near the rocks, in water well oxygenated, but in Santos some specimens were captured in the canal. As Rathbun (1930, p. 118, foot-note) points out, *C. danae* is perhaps the commonest swimming crab in Brazil, and probably they go out into the rivers. I have found some of them in the Itanhaen river (near Santos). There is a strong possibility that this Crab is euryhaline. It is known that some *Callinectes* may occur in brackish and freshwater (Brues 1927). In any case, it seemed to me that the Pantin's Ringer, modified by Davenport (1941, p. 179), in absence of more complete information about the blood constituents of *C. danae* is the preferable solution. I tried to perfuse the Pantin's Ringer, as indicated above, in the Decapod heart. The results showed no modification in comparison with the sea-water perfusion. Another point well considered is that of the temperature. It is well known from the papers of Dubuisson, Mangold, Potonié and others, that the temperature oscillations have great influence on the rhythm of the Crustaceans heart beats. In Caiobá, in Santos and in S. Paulo, the experiments were performed between 23° and 25° C. Within these limits the heart beatings are not modified.

The results of these experiments, in general, agree with those published by Welsh and Davenport. Nevertheless, some points want to be discussed. All records, except those of adrenalin perfusion, show a typical inhibitory period just after the beginning of the perfusion. These characteristic signs are not seen in most records of Davenport and Welsh. Probably the differences of material and methods may explain these differences. On the other hand, the reaction of *C. danae* heart to high and low concentrations of acetylcholine are different from that of *Cancer*, *Maia* and *Carcinus*. Here, in *C. danae* only high concentrations ( $10^{-2}$ ) of acetylcholine inhibit the heart. The ester solution at  $10^{-4}$  are shown to be the most favourable (Fig. n. 1). The same concentration of this ester had been demonstrated by Welsh to produce in *Carcinus* such a rapid firing of the pacemaker cells that the heart was unable to recover after each contraction, and a condition of systolic tetany followed. In *C. danae* heart the action of the drug in this concentration is quite different. The heart responds to low and high concentration (from  $10^{-6}$  to  $10^{-4}$ ) by the usual increase of frequency and amplitude. Acetylcholine  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  produce the characteristic sys-

toxic stoppage. Perhaps the perfusion in situ weakens the acetylcholine solution  $10^{-4}$ , but all records (Fig. n. 1, for instance) show the effect of the drug in which the heart was immersed for a long time.

As has been demonstrated in the hearts of the Crustaceans, eserine increases the sensitivity of acetylcholine. In *C. danae* it is the same, and that drug perfused alone produces increasing in frequency and in amplitude.

Atropin in various concentrations abolishes completely the effects of subsequently administered above-threshold concentrations of acetylcholine. The heart of *C. danae* reacts to atropine by increasing the amplitude and diminishing the frequency (Fig. n. 8-9).

Davenport (1940, 1941) and his collaborators, have demonstrated the effects of nicotine in the isolated *Cancer* hearts. The drug increases the frequency and amplitude. This effect, says Davenport, was not immediately reversible, for the heart would return approximately to its original beat only after some 15-20 minutes of washing with perfusion fluid. I have found some variation in the response of *C. danae* heart to this alkaloid. Figs. n. 12 shows the chronotropic negative and inotropic positive effects of nicotine  $10^{-4}$ , and in Fig. n. 13 it is evident that drug firstly produces the inhibition of the heart beatings and after, it increases in frequency. However, the prolonged action of the drug produces the diminishing of both frequency and amplitude. These results may be explained by the action of nicotine direct on the nervous elements supplying the *C. danae* heart. In any case, however, this nicotine effects indicates that those of acetylcholine are more "muscarine-like" than "nicotine-like"

Macerates in Ringer or in distilled or sea-water and extracts of cardiac tissues of *C. danae* were prepared in Caiobá, in Santos and in S. Paulo. The first assays with macerates indicated an appreciable amount of active substance in the heart of the same animal. This fact encouraged me to prepare the extract of cardiac tissue by the trichloroacetic acid method for the detection of acetylcholine as described by Chang & Gaddum (1933). It was possible to use 3,430 grs. of cardiac tissue only, corresponding 1 cc. of the concentrate to 10 grs. of tissue. This concentrate was diluted in Ringer for Crustaceans, distilled water or used without dilution. The records taken from the influence of the concentrate upon the *C. danae* heart and in the Amphibians hearts indicate that a large quantity of acetylcholine occur in the cardiac tissue of *C. danae*. By comparing the effects of acetylcholine  $10^{-8}$  in the *Bufo marinus* heart and that of the diluted concentrate (3 parts concentrate plus 1 of Ringer) in the same animal, it is found that the concentrate contains considerable quantity of the ester. Welsh has found only 2  $\gamma$  per gramm of nervous tissue of *Carcinus* and only small amount of active material from heart muscle and muscle was detected. Chang & Gaddum (1933) call attention to some biological tests of acetylcholine, and criticises frog heart test. The small quantity of concentrate did not permit me to perform the classical biological tests recommended by Minz (1932) on the leech muscle and others. I take my results as a preliminar assay, and I hope in the near future to obtain more concentrate of cardiac tissues of *C. danae* for the referred tests.

If these results here given are confirmed it is possible to admit the muscarine-like effect of acetylcholine on the Decapod heart, and the participation of active substance liberated by the cardiac tissue in the chemical mediation of the cardiac impulse. The suggestive hypothesis formulated by Davenport (l. c., p. 184) to explain the muscarine-like effect in the *Cancer* heart would be supported by the fact of chronotropic and inotropic effect of nicotine in *C. danae* heart.

The question what tissue from the *C. danae* heart is responsible for the large amount of active substance, the nervous cells or the muscles of the heart, naturally arises and is difficult to answer to it at the present time. The innervation of the *C. danae* is here discussed based on the data of Alexandrowicz (1931, 1933). In 1876 Conant & Clark described the nervous supplying of *Callinectes sapidus* heart. They said, and their results were confirmed by many other authors, that the inhibitor and accelerating centre is in the thoracic ganglion. The ganglion may then be considered the pacemaker of the heart and any substances which 1) affected the pacemaker activity of the ganglion cells, 2) facilitated transmission at myoneural junctions, or 3) acted on muscle cells directly might modify the frequency and amplitude of beat. These authors and Alexandrowicz, however, do not discuss the so called "cardiac nerve" described by Lemoine (1868). This nerve is originated from the stomato-gastric nervous system. The investigations of Keim (1951) have demonstrated the presence of this cardiac nerve in the *Astacus* heart, and Hanström (1928) places it in the sympathetic nervous system of *Callinectes*. Nevertheless, Wiersma & Novitski (1942, p. 260) in their latest experiments on *Cambarus clarkii* conclude that the nerve of Lemoine has no regulatory influence on the heart.

The new test of the common limb-less Amphibian, *Siphonops annulatus*, for acetylcholine and other accelerating and inhibitory heart substances, seems to me a new chapter for further investigations.

#### CONCLUSIONS:

1. Acetylcholine produces inotropic and chronotropic effects in *C. danae* heart, perfused in situ in concentrations from  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$ .
2. Higher concentrations of Ac. ( $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) produce a weak increase of the heart beatings. In these cases negative inotropy and chronotropy are predominating.
3. Eserine ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ) increases the frequency and the amplitude of the *C. danae* heart beatings. Eserine, as in other Decapods, potentialises the acetylcholine effects.
4. Atropine ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) has negative chronotropic and positive inotropic effects on the *C. danae* heart. It abolishes completely the acetylcholine effect.
5. Nicotine  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  acts on *C. danae* heart and produces the effects of atropine, but does not abolish the acetylcholine effect.

6. Adrenaline  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  accelerates the heart beatings, and increases slightly the amplitude. These effects will be diminished but not abolished by atropine.
7. Nicotine effects on the *C. danae* heart gives evidence of the so called muscarinic effect of acetylcholine.
8. Macerates and extracts of cardiac tissue of *C. danae* contains active substances which acts as acetylcholine.
9. Biological tests, on *Bufo marinus* and *Siphonops annulatus* hearts indicate that this substance acts like acetylcholine.
10. The quantity of this substance in the cardiac tissue of *C. danae* calculated by comparison of the referred biological tests, show a large quantity of that substance in the cardiac tissue.
11. This large quantity of active substance, the nerve supplying of the cardiac muscle and its response to the colic and adrenergic drugs indicates that in *C. danae* the acetylcholine acts as a chemical mediator.
12. The sensibility of *Siphonops annulatus* (*Amphibia-Gymnophiona*) indicates it for purpose of testing Acetylcholine.

## Bibliografia

- ALEXANDROWICZ, J. S. 1931. Quelques expériences sur le fonctionnement du système nerveux du coeur des Crustacés Isopodes. C. R. Soc. Biol., v. 108, pp. 170-172, Paris. — 1933. The Innervation of the Heart of the Crustacea. I. Decapoda. Quart. Journ. Micr. Sc., v. 75, N. S., pp.181-249, t. 13-15, London. — BACQ, Z. M. 1935. La choline-estérase chez les Invertébrés. C. R. Soc. Biol., v. 120, pp. 247-248, Paris. — 1935a. Recherches sur la Physiologie et la Pharmacologie du Système Nerveux Autonome. XVII. Les esters de la choline dans les extraits de tissus des Invertébrés. Archv. Intern. Physiol., v. 42, n. 1, pp. 24-42, Liège. — 1935b. Idem XIX. La choline-estérase chez les Invertébrés. L'insensibilité des Crustacés à l'acéticholine. Ibid., pp. 47-60. — 1935c. L'acétylcholine dans les tissus des Invertébrés. C. R. Soc. Biol., v. 120, pp. 243-245, Paris. — 1937. Nouvelles observations sur l'acétylcholine et la choline-estérase chez les Invertébrés. Archiv. Inter. Physiol., v. 44, n. 2, pp. 174-189, Liège. — BACQ, Z. M. & NACHMANSOHN, D. 1937. Choline-estérase in Invertebrate muscles. Journ. Physiol., v. 89, n. 4, pp. 268-371, London. — BAIN, W. A. 1929. The Action of Adrenaline and of certain drugs upon the isolated Crustacean Heart. Quart. Journ. Physiol., v. 19, n. 3, pp. 297-308, London. — De BOER, S. 1928. Vergleichende Physiologie des Herzens von Evertébraten. I. Untersuchungen bei *Maja verrucosa*. Zeit. vergl. Physiol., v. 7, n. 3, pp. 445-453, Berlin. Du Bois REYMOND, R. 1889. Ueber gestreife Darmmuskulatur insbesondere der Schleie. Inaug. Diss., medizinisch. Fak. z. Berlin, 46 pp., Berlin. — BOTAZZI, F. 1901. Ueber die Innervation des Herzens von *Scyllium canicula* und *Maja squinado*. Ztbl. f. Physiol., v. 14, pp. 665-666, Berlin. — v. BRÜCKE, E. TH. 1925. Die Bewegung der Körpersäfte, em: WINTERSTEIN, H.: Handb. d. vergl. Physiol., v. 1, pt. 1, pp. 827-1110, Jena. — BRUES, C. T. 1927. Occurrence of the marine Crab, *Callinectes ornatus* in brackish and fresh water. Amer. Nat., v. 61, pp. 566-568, resumo em Biol. Abst., v. 3, n.4 -6, refer. n. 10073, Menasha, Wisc. — CARDOT, H. 1933. L'automatisme cardiaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. Ann. Phy-

siol. et Physico-Chemie Biol., v. 9, pp. 586-666, Paris. — CARLSON, A. J. 1905 Comparative Physiology of the Invertebrate Heart. Biol. Bull., v. 8, n. 3, pp. 123-168, t. 4-8, Lancaster, Pa. — 1907. On the Point of Action of Drugs in the Heart with special Reference of the Heart of *Limulus*. Amer. Journ. Physiol., v. 17, pp. 17-235, Baltimore. — On the mechanism of the Stimulating Action of tension in the Heart. *Ibid.*, v. 18, pp. 149-249. — 1922. Note of the Action of Curare, Atropine and Nicotine on the Invertebrate Heart. Journ. Gen. Physiol., v. 4, n. 5, pp. 559-568, Baltimore. — CHANG, H. C. & GADDUM, J. H. 1933. Choline esters in tissue extracts. Journ. Physiol., v. 79, pp. 255-285, London. — CICCARDI, V. H. 1938. Acción de la Acetilcolina intraarterial sobre el gastrocnemio del sapo curarizado con diversas sustancias. Rev. Soc. Argentina Biol., v. 14, n. 5, pp. 331-338, Buenos Aires. — 1939. Acción comparativa del potasio y de la acetilcolina sobre los musculos de los batracios. *Ibid.*, v. 15, n. 1, pp. 12-21. — 1939a. Disociación entre excitabilidad neuromuscular y sensibilidad del musculo a las inyecciones intraarteriales de acetilcolina. Livro Homenagem Profs. Alvaro e Miguel Ozorio de Almeida, XLVIII + 649 pp., Rio de Janeiro. — CLARK, A. J. 1926. The Reaction between Acetyl Choline and Muscle Cells. Journ. Physiol., v. 61, n. 4, pp. 530-546, London. — 1926a. The Antagonism of Acetyl Choline by Atropine. *Ibid.*, pp. 547-556. — 1927. Comparative Physiology of the Heart. 157 pp. The Univ. Press. Cambridge. — 1927a. The Reaction between Acetyl-Choline and Muscle Cells. Journ. Physiol., v. 64, n. 2, pp. 123-143, London. — COLE, W. H., HELFER, R. G. & WIERSMA, A. G. 1939. A Perfusing Solution for the Crayfish Heart and Effects of its Constituents ions on the Heart. Physiol. Zool., v. 12, n. 4, pp. 393-399, Chicago. — CONANT, F. S. & CLARK, H. L. 1896. On the Accelerator and Inhibitory Nerves to the Crab's Heart. Journ. exp. Med., v. 1, pp. 341-347, t. 12-13, New York. — COSMOVICI, N. L. 1925. Le coeur d'*Astacus fluviatilis* obéit-il à la loi de l'inexcitabilité périodique du coeur? C. R. Soc. Biol., v. 97, pp. 797-800, Paris. — CROZIER, W. J. & STIER, J. B. T. 1927. Temperature and Frequency of cardiac Contractions in Embryos of *Limulus*. Journ. Gen. Physiol., v. 10, pp. 501-518. New York. — DAVENPORT, D. 1940. The Action of Acetylcholine and Nicotine on the Heart of Molluscs and Arthropods with particular reference to *Ariolimax*, *Astacus* and *Cancer*. Anat. Rec., v. 78, Supp. p. 69, Philadelphia. — 1941. The Effects of Acetylcholine, Atropine and Nicotine on the isolated Heart of the commercial Crab, *Cancer magister* Dana. Physiol. Zoöl., v. 14, n. 2, pp. 178-185, Chicago. — 1942. Further Studies in the Pharmacology of the Heart of *Cancer magister* Dana. Biol. Bull., v. 82, n. 2, pp. 255-260, Lancaster, Pa. — DAVENPORT, D., LOOMIS, J. W. & OPLER, C. F. 1940. Notes on the Pharmacology of the Heart of *Ariolimax columbianus* and *Ascatas trowbridgei*. *Ibid.*, v. 79, n. 3, pp. 498-507. — DEMOOR, J. 1933. Ce que représente l'automatisme du Coeur. Ann. Physiol. et Physico-Chemie Biol., v. 9, pp. 518-583, Paris. — DOGIEL, J. 1876. Anatomie du coeur des Crustacés. C. R. Ac. Sc. Paris, v. 82, pp. 1117-1120, Paris. — 1876a. Sur le coeur des Crustacés. *Ibid.*, pp. 1159-1160. — 1877. De la Structure et des Fonctions du coeur des Crustacés. Arch. Physiol. norm. et Pathol., v. 4, pp. 400-410, Paris. — DUBUISSON, M. 1928. Recherches sur la circulation du sang chez les Crustacés, 2e. note: Pressions sanguines chez les Décapodes Brachyures. Arch. Biol., v. 38, pp. 9-21, Liège. — 1931. *Idem*. VII. L'automatisme et le rôle du plexus nerveux cardiaque de *Limulus polyphemus*. Arch. Intern. Physiol., v. 33, pp. 257-260, Liège. — 1931a. *Idem*. IX. Nouvelles recherches sur le rôle de la distension des fibres cardiaques dans l'automatisme. *Ibid.*, v. 34, pp. 194-210. — 1933. L'état actuel de nos connaissances sur la Physiologie du muscle cardiaque des Invertébrés. Les Problèmes Biologiques, 130 pp. Les Presses Univ. France, Paris. — 1933a. Discussion des rapports sur l'automatisme cardiaque. Ann. Physiol. et Physico-Chemie Biol., v. 9, pp. 667-672, Paris. — DUDLEY, H. W. 1933. The alleged occurrence of acetylcholine

in ox blood. Journ. Physiol., v. 79, pp. 249-254, London. — FELDBERG, W. & VARTIAINEN, A. 1834. Further observations on the Physiology and Pharmacology of a Sympathetic Ganglion. Ibid., v. 83, n. 1, pp. 103-128. — FREY, E. 1928. Giftwirkungen an dem quergestreiften Schleiendarm. Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., v. 138 pp. 228-239, Leipzig. — GARREY, W. E. 1920. Dynamics of nerve cells. I. The temperature coefficient of the neurogenic rhythm of the heart of *Limulus polyphemus*. Journ. Gen. Physiol., v. 30, pp. 41-48, New York. — 1920a. Idem. II. The temperature coefficients of carbon dioxide production by the heart ganglion of *Limulus polyphemus*. Ibid. pp. 49-56. — 1941. The Action of Acetylcholine on the Heart of *Limulus polyphemus*. Amer. Journ. Physiol., v. 133, n. 2, pp. 288 (Proc.), Baltimore. — GOODMAN, L. & GILMAN, A. 1941. The Pharmacological basis of Therapeutics. XIII + 1383 pp. New York. — HANSTRÖM, B. 1928. Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere. XI + 628 pp. Berlin. — van HARREVELD, A. 1936. A physiological solution for freshwater Crustacean. Proc. Soc. exp. Biol. Med., v. 34, pp. 428-423, New York. — HOADLEY, L. 1934. Autotomy in the anomuran *Porecellana platycheles* (Permant). Biol. Bull., v. 67 n. 3, pp. 494-503, Lancaster, Pa. — HOFFMANN, P. 1914. ap. van HARREVELD, A. 1936. — JOLYET, F. & VIALLANES, H. 1893. Recherches physiologiques sur le Système Nerveux accélérateur et modérateur du cœur chez Crabe. Ann. Sc. Nat., sér. 8, Zoologie, v. 14, pp. 387-404, Paris. — KATZ, B. 1936. Neuro-muscular transmission in Crabs. Journ. Physiol., v. 87, n. 3, pp. 199-221, 2 t. London. — KEIM, W. 1915. Das Nervensystem von *Astacus fluviatilis* (*Potamobius astacus* L.) Zeit. wiss. Zool., v. 115, n. 4, pp. 485-545, Leipzig. — LANGLEY, J.N. & DICKINSON, W. L. 1888. ap. HENDERSON, V. E. & ROEPKE, M. H. 1937. Drugs affecting Parasympathetic Nerves. Physiol. Rev., v. 17, n. 3, pp. 373-407. — LEMOINE, V. 1868. Recherches pour servir à l'Histoire des Systèmes nerveux musculaire et glandulaire de l'Écrevisse. Ann. Sc. Nat., sér. 5, Zoologie, v. pp. 99-280, t. 6-11, Paris. — LINDMAN, V. E. 1928. The Physiology of the Crustacean Heart. I. The Effect of various ions upon the Heart Rhythm of the Crayfish, *Cambarus clarkii*. Physiol. Zoöl., v. 1, n. 4, pp. 576-592, Chicago. — 1929. Idem. II. The Effect of Lithium, Ammonium, Strontium, and Barium ions upon the Heart Rhythm of the Crayfish (*Cambarus clarkii*). Ibid., v. 2, n. 3, pp. 395-410. — LOEWI, O. & NAVRATIL, E. 1926. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitt. Über das Schicksal des Vagusstoffs. Pflüger's Arch. f. d. gesam. Physiol., v. 214, pp. 678-688, Berlin. — LORENTE DE NÓ, R. 1938. Liberation of Acetylcholine by the Superior Cervical sympathetic Ganglion and the nodosum Ganglion of the Vagus. Amer. Jour. Physiol., v. 121, n. 2, pp. 331-349, Baltimore. — MANGOLD, E. 1925. Studien zur Physiologie des Krebsherzens, besonders über eine aktive Funktion des "Pericard" bei *Cancer pagurus*. Zeit. vergl. Physiol., v. 2, n. 2, pp. 184-208, Berlin. — 1926. Weitere Studien zur Physiologie des Krebsherzens. II. Wärmestillstand und Wärmstarre des Herzens mariner Decapoden. Ibid. v. 3, n. 4, pp. 512-520. — 1926a. Idem. III. Der von der R. G. T. Regel Abweichende Einfluss der Temperatur auf die Herzfrequenz mariner Decapoden. Ibid., pp. 521-527. — MARNAY, A. 1937. Action de l'acétylcholine sur le muscle isolé. C. R. Soc. Biol., v. 125, pp. 1007-1009, Paris. — 1937a. Action de l'acétylcholine sur le muscle haché. Ibid., pp. 1009-1011. — MARNAY, A. & NACHMANSOHN, D. 1937. Cholinestérase dans le nerf de Homard. Ibid., pp. 1005-1007. — 1937a. Action de l'acétylcholine sur le muscle strié et son antagonisme avec l'adrenaline. Ibid., pp. 1265-1269. — MINZ, B. 1932. Pharmakologische Untersuchungen am Blutegelpräparat, zugleich eine Methode zum biologischen Nachweis von Azetylcholin bei Anwesenheit anderer pharmakologische wirksamer körpereiniger Stoffe. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., v. 168, pp. 292-304, Berlin. — MORISON, R. S. & ACHESON, G. H. 1938. A quantitative study of the Effects of Acetylcholine and Adrenaline on the Nictating Membrane. Amer. Journ. Physiol., v. 121, n. 1, pp. 149-156,

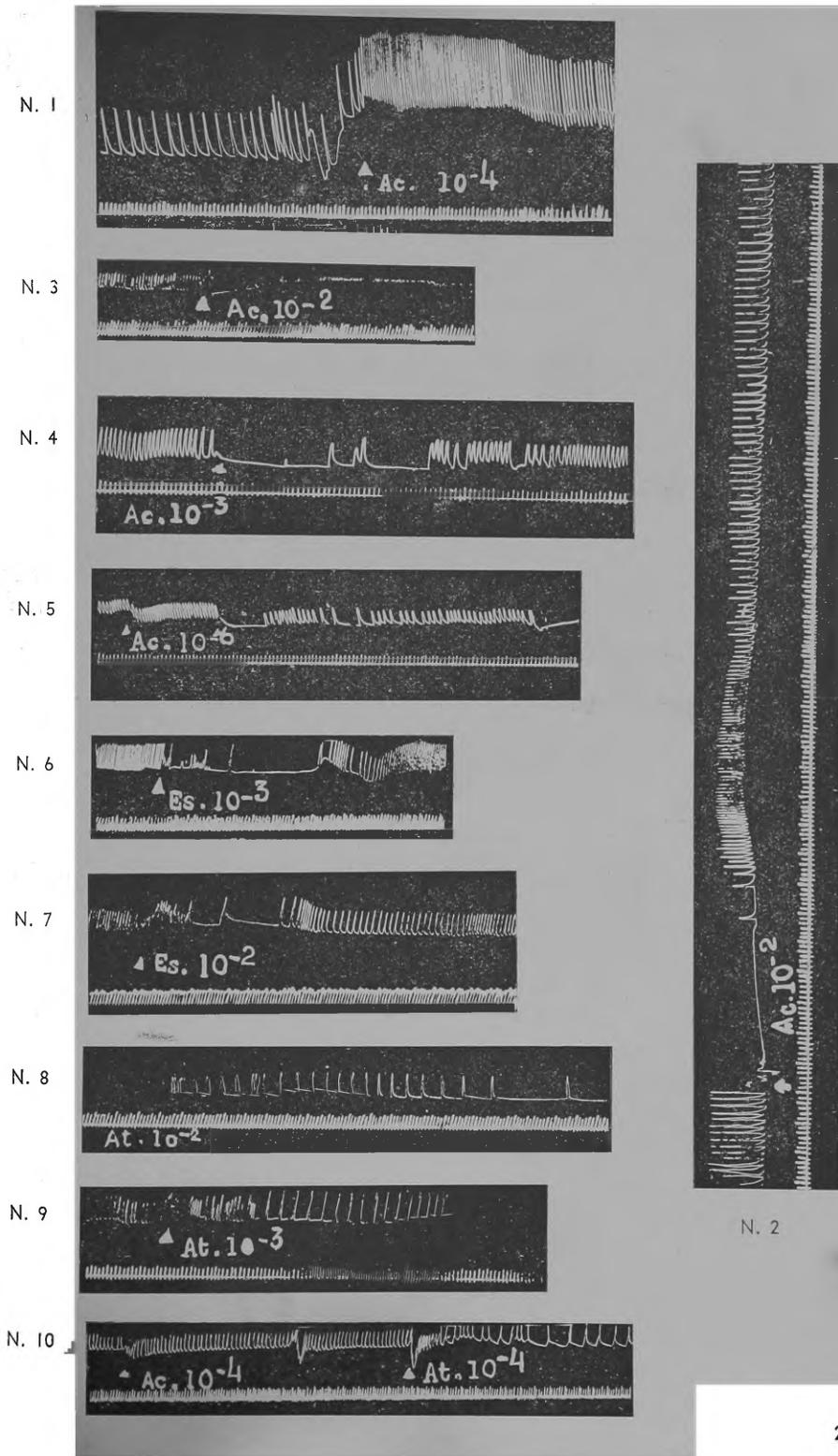
Baltimore. — NEWMYWAKA, G. N. 1928. Zur Frage über die Innervation des Herzens beim Flusskebs (*P. astacus*). Zool. Anz., v. 79, n. 7-8, pp. 209-222, Leipzig. — OBRESHKOVÉ, V. 1941. The Action of Acetylcholine, Atropine and Physostigmine on the Intestine of *Daphnia magna*. Biol. Bull., v. 81, n. 1, pp. 105-113, Lancaster, Pa. — PETÉRFI, T. 1928. Methodik d. wiss. Biologie, v. 2, Allg. Physiol., X + 1219 pp. Berlin. — PLATEAU, F. 1880. Recherches physiologiques sur le coeur des Crustacés Décapodes. Arch. Biol., v. 1, pp. 595-605, Liège. — PANTIN, C. F. A. 1934. On the excitation of Crustacean muscle. I. Journ. Exp. Biol., v. 11, n. 1, pp. 11-27, London. — POTONIÉ, H. 1926. Ueber den Temperatureinfluss auf die Hertzthätigkeit des Flusskrebsees. Zeit. verg. Physiol., v. 3, n. 4, pp. 528-546, Berlin. — RATHBUN, M. 1930. The Cancroid Crabs of America of the families Euryalidae, Portunidae etc. Bull. U. S. Nat. Museum, n. 152, XVI + 609 pp. Washington. — RIJLANT, P. 1932. Les automatismes du coeur de l'Écrevisse. C. R. Soc. Biol., v. 109, pp. 38-43, Paris. — ROBERTSON, T. B. 1906. Note on the Influence of Temperature upon the Rate of the Heart-Beat in a Crustacean (*Ceriodaphnia*). Biol. Bull., v. 10, n. 5, pp. 242-248, Lancaster, Pa. — SAWAYA, P. 1940. Sobre o veneno das glândulas cutaneas, a secreção e o coração do *Siphonops annulatus*. Bol. Fac. Fil. Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo XIX, Zool. n. 4, pp. 207-270, t. 18-19, S. Paulo. — 1942. Contribuição para a fisiologia do aparelho de apreensão dos alimento se da glândula do intestino médio de Ostrácodo. Ação das substâncias colinérgicas. Ibid. XXV, Zoologia n. 6, pp. 107-152, t. 1-4. — 1942a. Comentários sobre Crustaceos, Moluscos e Equinodermas etc. Historia Naturalis Brasiliae de Jorge Marcgrave, ed. bras. Museu Paulista, 19 pp. S. Paulo (numeração da separata). — 1943. Sensibilidade do coração de alguns Anfíbios à Acetilcolina. Anais Acad. Bras. Ciênc., v. 15, n. 4, pp. 101-110, Rio de Janeiro (no prélo). — SCHLIEPER, C. 1992. Neue Versuche über die Osmoregulation wasserlebender Tiere. Sitz. Gesell. z. Beförd. d. g. Naturwiss., z. Marburg., v. 64, n. 6, pp. 143-156, Berlin. — SCHWABE, E. 1933. Ueber die Osmoregulation vershiedener Krebse (Malacostracen). Zeit. vergl. Physiol., v. 19, n. 1, pp. 183-236, Berlin. — SEIWELL, H. R. 1930. Influence of Temperature on the Rate of Beating of the Heart of a Cladoceran. Journ. Exp. Zool., v. 57, n. 2, pp. 331-346, Philadelphia. — SIMONART, A. 1931. Contribution à l'étude de l'hydrolyse de l'acétylcholine par voie fermentative. Rev. Belge d. Sc. Médicales, v. 3, pp. 757-768, Louvain. — SMITH, R. I. 1940. Nervous inhibition in the Decapod Heart. Anat. Rec., v. 78, Suppl. p. 68, Philadelphia. — WELSH, J. H. 1937. The Eye-Stalk Hormone and Rate of eart Beat in Crustacean. Proc. Nat. Acad. Sc., v. 23, pp. 458-460, Washington. — 1939. Occurrence of Acetylcholine in Nervous Tissue of Crustaceans and its effect on the Crab Heart. Nature, v. 142, n. 3586, Suppl. p. 151, London. — 1939. Chemical Mediation in Crustaceans. I. The occurrence of Acetylcholine in Nervous Tissues and its Action on the Decapod Heart. Journ. Exp. Biol., v. 16, n. 2, pp. 198-219, London. — 1939a. Iden. II. The Action of Acetylcholine and Adrenaline on the Isolated Heart of *Panulirus argus*. Physiol. Zoöl., v. 12, n. 3, pp. 231-237, Chicago. — 1940. The Action of Acetylcholine on the Lobster Heart. Anat. Rec., v. 78, Supp. p. 68, Philadelphia. — WELSH, J. H. & HASKIN, H. H. 1939. Chemical Mediation in Crustaceans. III. Acetylcholine in Autotomy in *Petrolisthes armatus* (Gibbes). Biol. Bull., v. 76, n. 3, pp. 405-415, Lancaster, Pa. — WIERSMA, C. A. G. & NOVITSKI, E. 1942. The mechanism of the nervous regulation of the Crayfish Heart. Journ. Exp. Biol., v. 19, n. 3, pp. 255-265, 1 t., London. — YUNG, E. 1878. Recherches sur la structure intime et les fonctions du système nerveux central chez les Crustacés Décapodes Arch. Zool. exp. génér., v. 7, pp. 401-534, t. 27-30, Paris.

ESTAMPAS

### ESTAMPA I

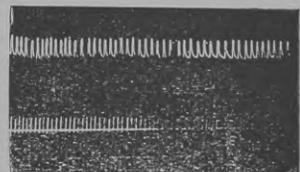
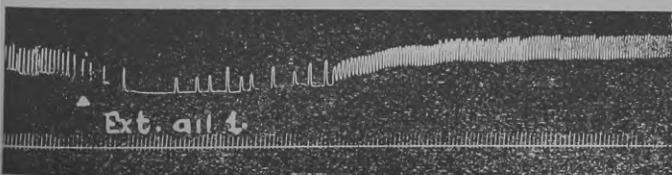
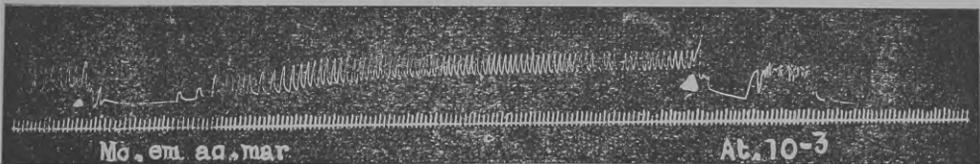
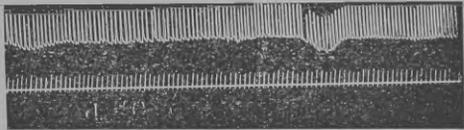
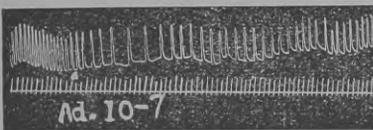
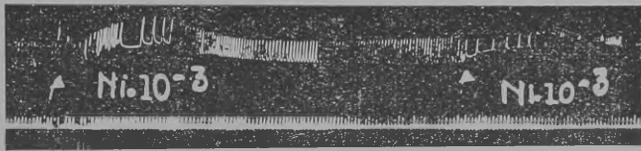
N. 1	—	Cardiograma de C. danae;	Acetilcolina $10^{-4}$
N. 2	—	" "	Acetilcolina $10^{-2}$
N. 3	—	" "	Acetilcolina $10^{-2}$
N. 4	—	" "	Acetilcolina $10^{-3}$
N. 5	—	" "	Acetilcolina $10^{-6}$
N. 6	—	" "	Eserina $10^{-3}$
N. 7	—	" "	Eserina $10^{-2}$
N. 8	—	" "	Atropina $10^{-2}$
N. 9	—	" "	Atropina $10^{-3}$
N. 10	—	" "	Acetilcol. $10^{-4}$ ; Atropina $10^{-4}$

Em todos os gráficos o tempo corresponde a 1 segundo.



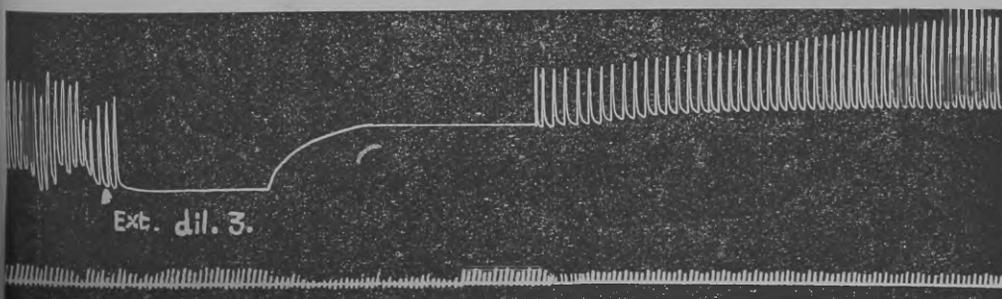
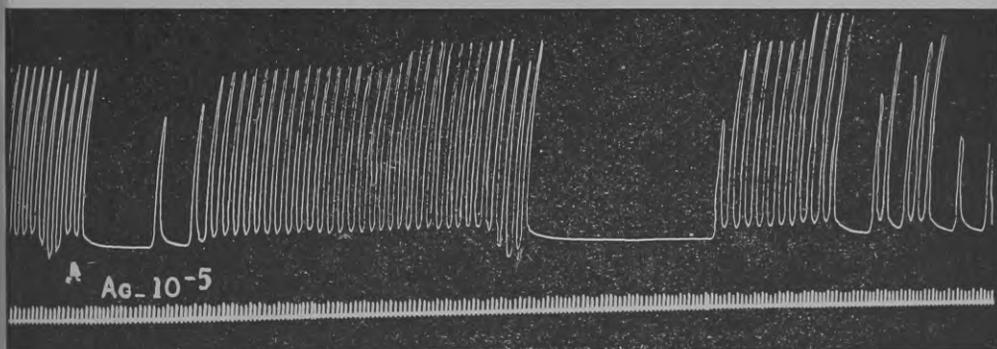
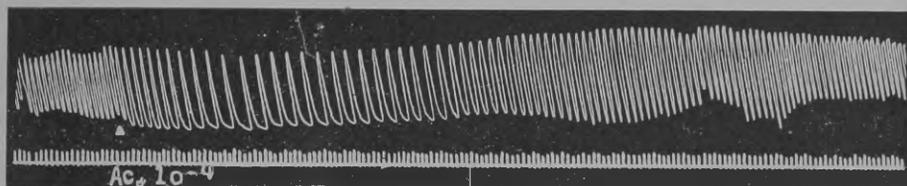
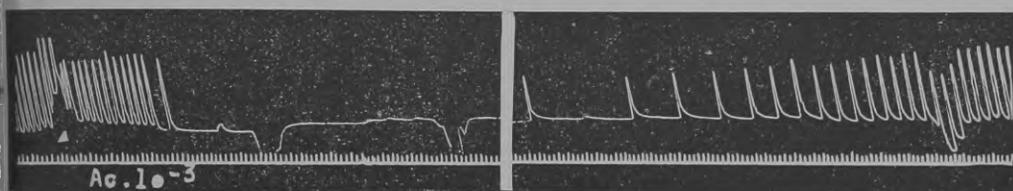
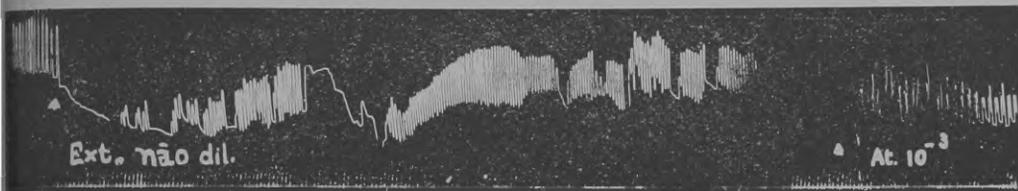
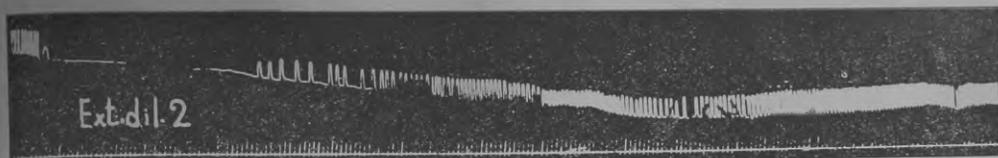
## ESTAMPA II

- N. 11 — Cardiograma de *C. danae*; Acetilcolina  $10^{-4}$  + Atropina  $10^{-4}$ .
- N. 12 — Cardiograma de *C. danae*; Nicotina  $10^{-4}$ .
- N. 13 — Cardiograma de *C. danae*; Nicotina  $10^{-3}$ ; Nicotina  $10^{-3}$ .
- N. 14 — Cardiograma de *C. danae*; Adrenalina  $10^{-7}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 20 segundos.
- N. 15 — Cardiograma de *C. danae*; Adrenalina  $10^{-7}$ ; Atropina  $10^{-3}$ .
- N. 16 — Cardiograma de *C. danae*; Adrenalina  $10^{-3}$ ; Atropina  $10^{-3}$ .
- N. 17 — Cardiograma de *C. danae*; Macerado de tecido cardíaco de *C. danae* em água do mar; Atropina  $10^{-3}$ .
- N. 18 — Cardiograma de *C. danae*; Extrato de tecido cardíaco de *C. danae* diluído 1. (1 parte de extrato em 3, de Ringer para crustáceos); o espaço entre os dois gráficos corresponde a 30 segundos.



### ESTAMPA III

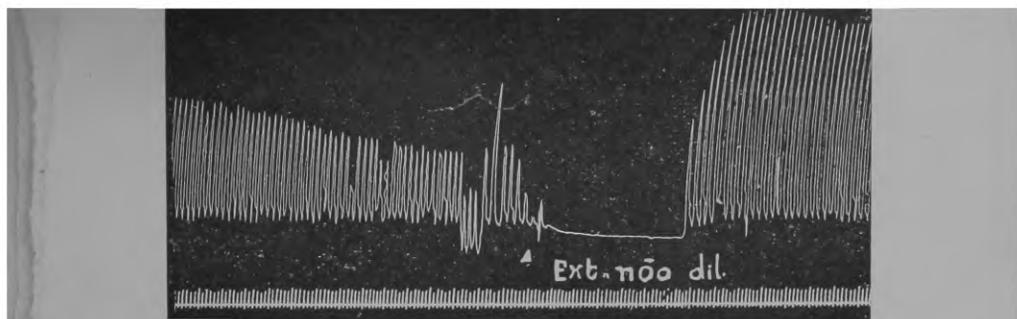
- N. 19 — Cardiograma de *C. danae*; Extrato diluido 2. (2 partes de extrato + 2 partes de Ringer para crustáceos) de tecido cardíaco de *C. danae*.
- N. 20 — Cardiograma de *C. danae*; Extrato não diluido de tecido cardíaco de *C. danae*; Atropina  $10^{-3}$ .
- N. 21 — Cardiograma de *B. marinus*; (142,5 grs.) Acetilcolina  $10^{-3}$ .
- N. 22 — Cardiograma de *B. marinus*; (150 grs.) Acetilcolina  $10^{-4}$ .
- N. 23 — Cardiograma de *B. marinus*; (230 grs.) Acetilcolina  $10^{-5}$ .
- N. 24 — Cardiograma de *B. marinus*; (207 grs.) Extrato diluido 3. de tecido cardíaco de *C. danae*. (3 partes de extrato e 1 parte de Ringer para Anfíbios)



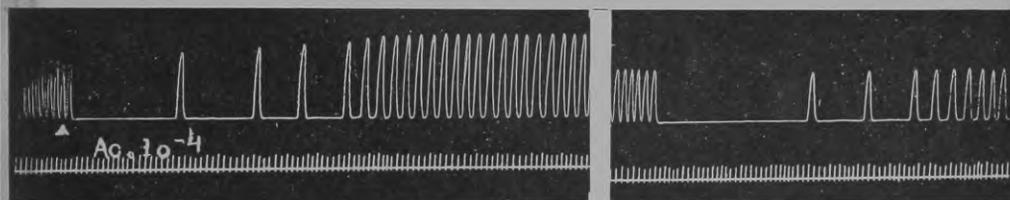
## ESTAMPA IV

- N. 25 — Cardiograma de *Bufo marinus*; (185 grs.) Extrato não diluído de tecido cardíaco de *C. danae*.
- N. 26 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Acetilcolina  $10^{-4}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 70 segundos.
- N. 27 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Acetilcolina  $10^{-6}$ ; Atropina  $10^{-5}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 30 segundos.
- N. 28 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Acetilcolina  $10^{-3}$ ; Atropina  $10^{-3}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 35 segundos.
- N. 29 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Acetilcolina a  $10^{-10}$ .
- N. 30 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Acetilcolina a  $10^{-6}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 45 segundos; Ringer para Anfíbios.

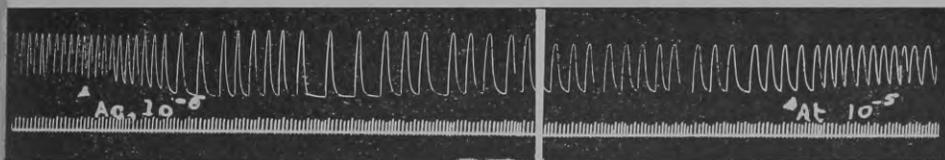
O peso de *S. annulatus* variou entre 25 e 30 grs.



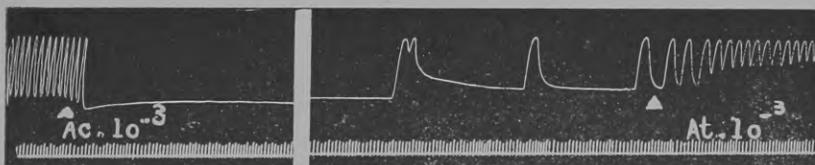
N. 25



N. 26



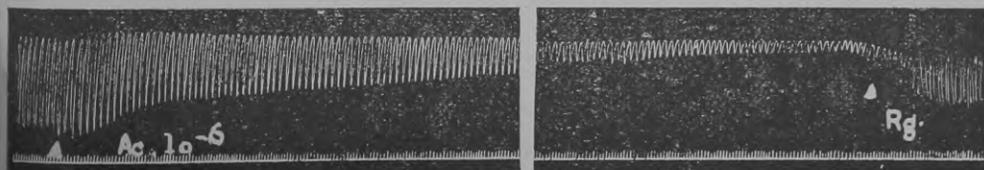
N. 27



N. 28



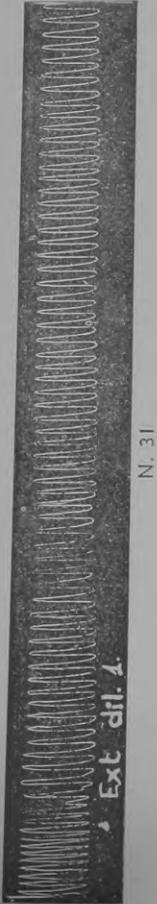
N. 29



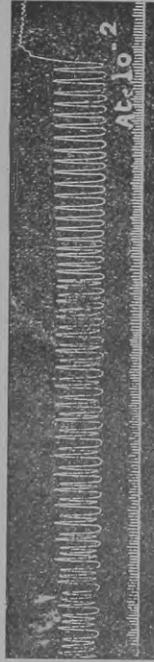
N. 30

## ESTAMPA V

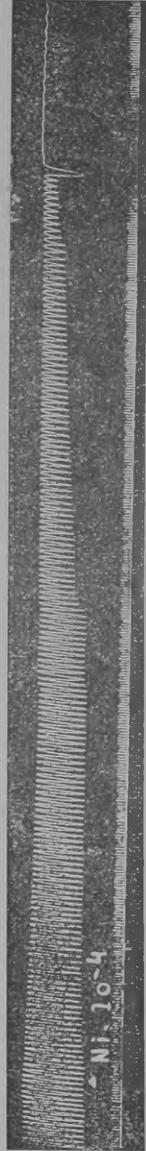
- N. 31 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Extrato diluido 1. (1 parte de extrato e 3 partes de Ringer para anfíbios) de tecido de *C. danae*.
- N. 32 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Extrato diluido 2. (2 partes de extrato e 2 partes de Ringer para anfíbios) de tecido de *C. danae*.
- N. 33 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Extrato não diluido de tecido cardíaco de *C. danae*; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 25 segundos.
- N. 34 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Extrato não diluido de tecido cardíaco de *C. danae*; Atropina  $10^{-2}$ ; o espaço entre os dois gráficos corresponde a 45 segundos.
- N. 35 — Cardiograma de *Siphonops annulatus*; Nicotina a  $10^{-4}$ .



N. 32



N. 35



N. 35