CHANG YONG-CHIANG

PARÂMETRO DE CABO ELÉTRICO DA MEMBRANA MUSCULAR SOMÁTICA DE PANSTROGYLUS megistus (HEMIPTERA)

Tese de Doutoramento apresentada ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Chang Yong-Chiang
Out. 9, 1978

1978

Conteudo

Páginas

Conteudo.....1

Lista de ilustrações.....2

Lista de Tabelas.....2

Capítulo 1. Prefácio.....3

Capítulo 2. Introdução. Mecanismo de Bioeletrogênese.....4

Secção 1. Bioeletrogênese em Geral.....4

Secção 2. Bioeletrogênese comparativa.....12

Secção 3. Bioeletrogênese nos Insetos.....19

Secção 4. Finalidade dêste Trabalho.....23

Capítulo 3. Método.....24

Secção 1. Preparação.....24

Secção 2. Montagem.....27

Secção 3. Cálculo dos dados.....29

Capítulo 4. Resultado.....29

Capítulo 5. Discussão.....37

Secção 1. Consideração técnica.....37

Secção 2. Composição iônica dos parâmetros de cabo.....38

Secção 3. Excitabilidade.....41

Capítulo 6. Conclusão.....42

Capítulo 7. Sumário.....42

Summary.....43

Capítulo 8. Referências bibliográficas.....44

Lista de Ilustrações

Páginas

Fig. 1. Circuito equivalente da membrana excítavel.....5

Fig. 2. Carácter do eletrodo do potássio das membranas excítaveis...13

Fig. 3. Potencial de ação.....16

Fig. 4. Descarga rítmica.....18

Fig. 5. Histologia dêste músculo.....25

Fig. 6. Método do cálculo da resistência e da capacitência.....28

Fig. 7. Efeito de osmose no $\mathcal{E}_m$.....30

Fig. 8. Efeito de tampão e de pH no $\mathcal{E}_m$.....30

Fig. 9. Carácter do eletrodo do potássio.....31

Fig. 10. Efeito da substituição de Na pela colina.....32

Fig. 11. Carácter do eletrodo de cloro.....32

Fig. 12. Efeito dos ions alcalino-terrosos no $\mathcal{E}_m$.....33

Fig. 13. Efeito do KCN no $\mathcal{E}_m$.....34

Fig. 14. Efeito de temperatura no $\mathcal{E}_m$.....34

Fig. 15. Gráfico de V-i e o efeito de K na retificação.....35

Fig. 16. Efeito do Ca na retificação.....36

Lista de Tabelas

Tabela 1. Potencial de repouso.....13

Tabela 2. Potencial de ação.....16

Tabela 3. Descarga rítmica.....18

Tabela 4. Valores do parâmetro de cabo na retificação.....36

Capítulo 1

Prefácio

Êste trabalho faz parte de uma serie de estudos de eletrogênese da membrana intermediária (Prosser, 1967; Toide, Kuriyama, Tashiro and Ito, 1975) nêste laboratório. O interesse por êste tipo de membrana é baseado na convicção que mais informação sobre o fenômeno de excitação pode ser obtida pelo estudo da membrana intermediária, porque êste tipo da membrana mostra mais variação em sua excitação, enquanto que as membranas de tipo de tudo-ou-nada e de tipo graduado são especializadas apenas para performar a certa função sob o comando. Êste interesse foi iniciado durante a observação do trabalho em músculos somático e visceral de Ascaris lumbricoides no laboratório de Del Castillo em Pôrto Rico entre 1960 e 1962. O estudo próprio dêste autor foi iniciado com o músculo de minhoca no laboratório de Carlos Chagas e A. P. Carvalho no Instituto de Biofísica, então Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, em 1963, e foi continuado no laboratório de fisiologia desta Universidade depois 1967. Seus trabalhos foram citados e resumidos nas monografias de Huddart (1975) e Jamieson and Lee (1976).

A idéia de apresentar o presente trabalho como uma tese foi sugerida por J. B. Sales, professor de Zoologia, Universidade Federal do Ceará, e então candidato a mestre em entomologia nesta Universidade, cuja colaboração resultou em um artigo (Chang and Sales, 1977) e dois abstractos (Chang e Sales, 1975; Sales and Chang, 1976) nêste laboratório. A permissão para ingresso no programa de pós-graduação pelo Padre J. S. Moure, coordenador do curso de entomologia desta Universidade, possibilitou a apresentação desta tese. O fornecimento dos animais para as experiências por A. M. Borba, professor de Parasitologia desta Universidade tornou possivel a realização dêste trabalho. O material de cosumo usado nêste trabalho foi fornecido pelo Departamento de Ciências Fisiológicas desta Universidade e os equipamentos usados foram adquiridos através dos auxílios No. 8475/67 e 2668/70 do Conselho Nacional de Pesquisas e No. 981/68 de CAPES. As experiências foram feitas entre Novembro, 1976, e Abril, 1977. A consulta das referências para esta tese terminou no 1977.

Capítulo 2

Introdução

Mecanismo da Bioeletrogênese

O tema do estudo desta tese é a bioeletrogênese. A bioeletrogênese, como o termo implica, é a produção de fenômeno elétrico pelo sistema biológico. Uma descrição dêste mecanismo é apresentada em três secções nêste capítulo.

Secção 1

Bioeletrogêneee em Geral

Os conceitos básicos da bioeletrogênese estabelecidos nos anos cinqüêntas foram desafiados nêstes últimos dêz ou quinze anos pelo estudo de outros tipos de células excítaveis. Muitas teorias tradicionais, como a especificação dos ions, como K e Na, responsaveis para a polarização e para a excitação, a utilização do potencial de ação de tudo-ou-nada como uma indicação da presença da excitação e a aplicação do exemplo artificial, como o potencial de ação, para explicar a excitação em natureza, já não são mais adequadas ou válidas para explicar o mecanismo de bioeletrogênese num ponto de vista moderno. Embora várias tentativas tenham sido feitas (e. g., Woodbury, 1960, 1965, 1973; Grundfest, 1966, 1971, 1975) para estabelecer um conceito mais compativel com a fisiologia moderna, a tradição dos últimos vinte ou trinta anos ainda está influindo tanto autores como leitores, nem o presente autor está livre desta influência, embora um esforço, evidenciado nos parágrafos seguintes, foi feito para descrever o mecanismo de bioeletrogênese com a mínima influência tanto como possivel dos conceitos tradicionais.

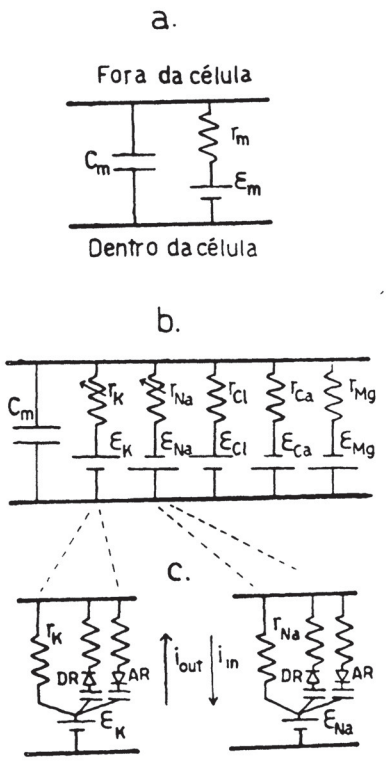
A bioeletrogênese discutida nêste capítulo se refere apenas a do nervo e do músculo animal, embora a excitabilidade, uma manifestação de bioeletrogênese, se verifique em todas as células, inclusive a vegetal. No mecanismo de bioeletrogênese das células muscular e nervosa, considera-se apenas sua membrana celular. O papel do citoplasma na eletrogênese ainda é pouco conhecido (porem, ver Troshin, 1952; Thomas and Gorman, 1977). É convencional descrever a estrutura de um organismo antes de discutir sua função.

Mas neste caso, a estrutura anatómica da membrana celular revelada pela histologia e histoquímica não ajuda no esclarecimento de sua função. A estrutura da membrana celular usada na fisiologia é representada pelo circuito equivalente (Fig. 1). Embora êste circuito é considerado como a estrutura realística em fisiologia, sua correlação com o aspecto anatómico não pode ser estabelecida. Êste circuito é básicamente um circuito harmônico que contem três parâmetros de cabo, uma pilha que fornece um potencial, $\mathcal{E}_m$, um capacitor que fornece uma capacitência, C_m, e um resistor que fornece uma resistência, r_m. A versão mostrada na Fig. la é símplificada. Cada um

Fig. 1

Circuito equivalente da membrana excítavel

a. Circuito da membrana excítavel de Hodgkin-Huxley. C_m, o capacitor da membrana. r_m, o resistor da membrana. $\mathcal{E}_m$, a pilha da membrana.



b. Circuito equivalente com seus resistores e pilhas divididos para cada ion separadamente.

c. Circuito equivalente com seus r_K e r_{Na} mostrados em maior detalhe. As flechas em Fig. 1b são representadas nesta figura como mais dois resistores em paralêlos com o r_K e o r_{Na}, ligados com dois diodos em direções opostas, representando as direções das retificações, e mais dois capacitores representando a limiar de iniciação da retificação. DR, a retificação retardada. AR, a retificaçao anômala. i_{out}, a corrente em direção para fora da célula. i_{in}, a corrente em direção para dentro da célula. O resistor símples (sem diodo e sem capacitor) representa a SPVC.

dêstes três parâmetros de cabo é subdividido em seguida. O potencial, $\mathcal{E}$, não é fornecido por uma pilha mas é uma soma algebráica de pelo menos duas pilhas em direções opostas. O metabolismo celular fornece uma energia, E, que bombea o ion j com a carga Z através o resistor R_j na membrana em uma direção determinada. Seu trabalho, $W = \mathcal{E} Z_j F$ ("F" é o número de Faraday). Desde que o ion é bombeado através a membrana, sua distirbuição em ambos os lados da membrana não é equilibrada. A difusão dêste ion em direção para reequilibrar-se crea outro trabalho, $W = RT \ln [j]_o/[j]_i$, onde "R", a constante de gas, "T", a temperatura absoluta, os colchetes, [ ], a concentração dêste ion, "o", o exterior da célula e "i", o interior da célula. As magnitudes dêstes dois trabalhos são diferentes. Quando esta diferença é mantida constante, i. e., não há variação de [j] em respeito do tempo, t, e do local, x, na membrana, $\partial[j]/\partial t + \partial[j]/\partial x = 0$, êstes dois trabalhos estão em um <u>estado estavel</u>,

$$\mathcal{E} Z_j F = RT \ln [j]_o/[j]_i$$

O potencial, $\mathcal{E}$, é medido como o potencial da membrana, $\mathcal{E}_m$, pela equação de Nernst (Bernstein, 1902),

$$\mathcal{E}_m = RT/Z_j F \ln [j]_o/[j]_i$$

Desta equação, segue-se que a condição de equilíbrio nunca pode ser atingida a menos que a célula morra enquanto $[j]_o = [j]_i$ e $\mathcal{E}_m = 0$ (Osterhout, 1922). Quando o potencial da membrana, $\mathcal{E}_m$, é formado por um ion só, e. g., o potássio, o termo constante, $RT/Z_j F$, mais o fator de conversão de ln para o log, é 58, e a equação de Nernst é,

$$\mathcal{E}_m = 58 \log |K|_o/|K|_i$$

Quando se-traça as duas variáveis, $\mathcal{E}_m$ e $\log [k]_o$, em um gráfico (Curtis and Cole, 1942), obtem-se uma linha reta com um coeficiênte 58 de inclinação (Fig. 2, linha pontilhada). A membrana nesta condição está simulando um eletrodo perfeito do potássio, i. e., ambas as pilhas de metabolismo e de difusão são fabricadas por um, e mesmo, ion, o potássio. Contudo, na realidade, não é só um ion que contribue para o $\mathcal{E}_m$ mas são muitos, a equação de Nernst deve ser ampliada para incluir pelo menos os cinco ions, K, Na, Cl, Ca e Mg, mais abundantes ao redor da membrana assím como a equação de campo constante (Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949),

$$\mathcal{E}_m = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o + P_{Ca}[Ca]_i + P_{Mg}[Mg]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i + P_{Ca}[Ca]_o + P_{Mg}[Mg]_o}$$

A letra "P" representa a permeabilidade de cada ion, que é uma função de mobolidade, μ, dêste ion na membrana. A equação é chamada de campo constante porque durante o estado estavel, o campo elétrico, Ψ, produzido pelo movimento dêste ion em cada ponto na espessura, x, da membrana tambem é constante, $d\Psi/dx = 0$. O circuito equivalente tambem é modificado por dividir os parâmetros de cabo, r_m e $\mathcal{E}_m$, em cinco unidades, cada uma servindo para um ion (Fig. 1b). Nêste caso, se o $\mathcal{E}_m$ é traçado no gráfico contra a mudança da concentração de apenas um dos ions, como o K, a linha não é mais reta mas uma curva como as linhas solidas na Fig. 2. Portanto, na prática, não existe uma membrana que simule um eletrodo perfeito de um ion só. O termo, eletrodo perfeito do potássio, é aplicado relativamente àquelas linhas com menos curvatura na baixa $[K]_o$ e com a inclinação aproximadamente de 58 na alta $[K]_o$ e o termo, eletrodo imperfeito do potássio, é aplicado aquelas linhas com a maior curvatura e com a inclinação mais afastada de 58. A curvatura destas linhas representa a proporção de contribuição dos ions alem do K no $\mathcal{E}_m$. Frequentamente, nas membranas com o carácter de eletrodo imperfeito do potássio, a contribuição dos outros ions é maior que a do potássio. Para determinar quais são os ions que contribuem nêste caso, a experiência de retirada de cada ion de solução extracelular, ou da injeção eletroforética do ion intracelularmente, pode ser praticada. Um inibidor farmacológico tambem pode ser usado para o mesmo fim, e. g., tetraetilamônio para inibir a condutência do potássio, g_K (Armstrong, 1971), ouabaina para a g_{Na} (Gorman and Marmor, 1974) e latânio para a g_{Ca} (Hagiwara and Takahashi, 1967). Para distinguir se o movimento dêstes ions em questão é devido sòmente a difusão ou se tambem foi bombeado pelo metabolismo, a bomba metabólica pode ser inibida pela baixa temperatura ou por um inibidor metabólico (Wareham, Duncan and Bowler, 1974; Duncan, Wareham and Bowler, 1976).

O outro parâmetro de cabo, o capacitor da membrana, C_m, tambem é feito por um ion porque sua capacitência, representado a carga em

ambos os lados da membrana, igual a carga dos ions distribuidos nos dois lados pelo potencial de pilha. Sua magnitude pode ser calculada pela equação de amortecimento universal do circuito harmônico,

$$\mathcal{E}_m = L \frac{d^2Z}{dt^2} + R \frac{dZ}{dt} + \frac{Z}{C_m}$$

Omite-se o primeiro termo da bobina, $L \frac{d^2Z}{dt^2}$, e resolve-se esta equação com a lei de crecimento natural, o potencial no capacitor da membrana, $\mathcal{E}_C$, representado pelo $\frac{Z}{C_m}$, em cada instante é,

$$\mathcal{E}_C = \mathcal{E}_m (1 + e^{-\frac{t}{RC}})$$

A técnica de sua medida será descrita em detalhe na Secção 2, Capítulo 3.

O terceiro parâmetro de cabo, a resistência, r_m, ou a condutência, g_m, dos resistores pode ser calculado baseado na equação de Hodgkin-Huxley (1952),

$$g_m = i/(\mathcal{E}_m - \mathcal{E}_j)$$

onde o $\mathcal{E}_j$ é o potencial de equilíbrio do ion j, e sua diferença com o $\mathcal{E}_m$, $\mathcal{E}_m - \mathcal{E}_j$, é a força eletromotríz para a corrente i. A técnica de medida da g_m é a fixação de voltagem, ou polarização (Araki and Otani, 1951), descrita em detalhe em Secção 2, Capítulo 3. Na membrana excítavel, esta equação coincide com a lei de Ohm sòmente no SPVC (Lorkovic, 1976). Além desta faixa, a resistência varia. Portanto, um resistor variavel ("potenciômetro" pelo nome popular) é desenhado em seu lugar (flecha em Fig. 1b). Nas referências mais modernas (e. g., Wiederhold, 1977), o resistor em série com um diodo e um capacitor é usado para designar não sòmente sua variação mas tambem a iniciação e a direção de sua variação. A Fig. 1c é uma adaptação feita aquí de várias fontes (Kandel and Tauc, 1966; McAllister, 1969; Lorkovic, 1976; Wiederhold, 1977), onde sòmente os resistores para os ions K e Na são mostrados mas deve ser entendido pelos leitores que os resistores para os outros ions são semelhantes. É facil de ver que uma corrente de valor baixo so pode passar através do resisotr simples na esquerda, portanto, só uma resistência fixa dêste resistor foi medida. Quando a corrente é alta, a descarga do capacitor embaixo do diodo liga o ramo na direita com

outro resistor. O soma de dois resistores em paralêlo diminui a resistência. Êste fenômeno, a diminuição da resistência na polarização com a corrente alta, chama-se "retificação" em fisiologia. Os dois diodos determinam as direções da corrente que pode causar uma retificação. Convencionalmente, a retificação causada pela corrente em direção para fora da célula, i_{out}, chama-se "retificação retardada" (Katz, 1949) e a retificação causada pela corrente em direção para dentro da célula, i_{in}, chama-se "retificação anômala" (Hodgkin, Huxley and Katz, 1949). Os adjetivos, "retardada" e "anômala" são históricos mas não são descritivos, e servem hoje como abreviações para termos mais descretivos, como "a retificação na membrana para a corrente em direção para interior, ou para exterior, da célula". A retificação é uma medida da variabilidade de resistência, r, ou condutência, g, no resistor iônico, e indica a excitabilidade desta membrana em relação a êste ion. Por exemplo, uma membrana sem excitabilidade, como a da célula epidermal do Tenebrio molitor (Popowich and Caveny, 1977), não mostra retificação pela corrente com o valor que causa uma retificação em outra membrana, portanto, esta membrana é "óhmica", pois obdece a lei de Ohm em todas faixas de corrente. As membranas que tem excitabilidade espontânea, i. e., sem necessidade de estímulo elétrico, como no motoneurônio do gato, não só mostram retificação mas tambem um aumento de resistência durante a polarização, conhecido como a inclinação negativa no traçado V-i (Eckert and Lux, 1974; Wilson and Wachtel, 1974; Schwindt and Crill, 1977).

A membrana em repouso não significa que a função dos três parâmetros de cabo está parada ou está em equilíbrio mas que a função dêstes três parâmetros de cabo está procedendo com a mesma velocidade e com a mesma direção, i. e., em um estado estavel. Quando há uma variação na velocidade ou na direção da função de um dos parâmetros, a membrana está em condição de "excitação". Uma vêz que os três parâmetros de cabo estão ligados num mesmo circuito, a variação de um induz a variação de todos três. Há muitos sistemas para classificar a condição de excitação da membrana, incluindo a classificação baseada no curso temporal da variação do potencial durante a excitação (Grundfest, 1966, 1971, 1975) e a classificação baseada no movimento do ion mais proeminente durante a excitação (Hagiwara, 1973; Reuter, 1973). Desde que uma excitação deve envolver a alteração em todos os três parâmetros

de cabo, o potencial, a resistência e a capacitência, a classificação não será completa se so se der énfase ao potencial. A diferença da participação dos ions na excitação é em gráus e não absoluta, portanto, tambem é dificil explicar eficientemente a excitação nesta maneira. Um sistema aceitavel para todos os autores só poderá ser desenvolvido no futuro quando haja mais conhecimento sobre a excitação. Nesta tese, será adotada a classificação baseada na causa da excitação. A excitação pode ser dividida em quatro categorias. (1) A excitação é causada artificialmente, como por um estímulo elétrico no laboratório. (2) A excitação é iniciada por uma causa interna a mesma célula, portanto, a excitação espontânea. (3) A excitação é transmitida de outra célula em sua vizinhança. (4) A excitação não pode ser iniciada por qualquer causa conhecida embora a membrana nervosa, ou muscular, seja classificada como excítavel.

O estudo de primeira categoria de excitação, a excitação causada por um estímulo artificial, marcou o início do estudo da neurofisiologia (Hodgkin, 1951; Hodgkin and Huxley, 1952; Keynes, 1951). Esta excitação ocorre nas membrans com o potencial de repouso mantido sòmente pelo K. Sua resistência em SPVC (Lorković, 1976) está na fiaxa de Kohm-cm2 (Cole, 1942) e sua capacitência na faixa de $\mu F/cm^2$ (Cole, 1969). A retificação pode ocorrir além desta faixa. Sob estímulo elétrico no laboratório, os valores dêstes três parâmetros de cabo variam como um fenômeno de excitação. A seqüência destas variações foi descrita em detalhe por Dodge (1961). A variação do potencial durante a excitação é designada como o "potencial de ação" (Action potential). A denominação dos componentes do potencial de ação é complicada e conflitante entre os autores. Para melhor clareza, sòmente um termo será usado nesta tese para designar cada um, mas não os dois, dos componentes. A discrepância no uso dos termos com outros autores, como Woodbury (1960, 1965, 1973), será notada nesta tese. O termo "potencial de ação" (não espiga) refere o curso temporal inteiro desta variação do potencial, i. e., a partir do estímulo até o fim da resposta. O ato de produzir o potencial de ação é "evocar" (to evoke). O ato de visualizar o potencial de ação é "registrar" (to record) (não capitular) da membrana (from the membrane) (não na membrana). O potencial de ação é registrado no papel (on the paper)

(não do papel) como um resultado a estudar. O primeiro componente do potencial de ação, uma variação do potencial por indução eletrotônica do estímulo é "artefato" (Artefact) (não artifato). A variação máxima do potencial durante a resposta é a "espiga" (Spike) (não potencial de ação). Quando a variação do potencial ocorre em ambas as direções, os termos, "espiga despolarizante" (Depolarizing spike) e "espiga hiperpolarizante" (Hyperpolarizing spike), são usados. O tempo entre o artefato e o início da primeira espiga é "latência" (Latency). Um platô (Plateau) e um pós-potencial (Afterpotential) depois da espiga estão presentes em alguns casos. A excitação da segunda categoria, a excitação espontânea (Spontaneous excitation), ocorre nas membranas com seu potencial de repouso mantido por mais de um ion (Grundfest, 1961, 1971, 1975). Sua resistência está na faixa de Mohm-cm^2 (Carpenter, 1973) que pode diminuir e aumentar na polarização (Eckert and Lux, 1976) e sua capacitência é pouco menor que da primeira (Carpenter and Gunn, 1970). Os componentes da variação do potencial nesta

Erratum,

Falta o seguinte entre as linhas 9 e 10 da página 47,

ELDER, H. Y. Muscle structure.. In: P. N. R. USHERWOOD (Ed.). Insect muscle. Academic Press, N. Y.. Pp. 1-74, 1975.

... ciclo da excitação nesta membrana é o resultado da sobrecompensação durante a recuperação do ciclo prévio da excitação. Esta explicação é adequada para a excitação rítmica, como no músculo cardíaco do coelho e no músculo liso de taenia coli da cobaia, mas não explica a causa que inicia uma excitação sem outra excitação prévia e sem a influência da outra célula, i. e., a excitação espontânea pela definição real. A causa atual dêste tipo de excitação espontânea ainda não foi verificada embora êste tipo de excitação seja registrado das membranas musculares intermediárias (Prosser, 1967; Toide, Kuriyama, Tashiro and Ito, 1975) e se admita que tambem existe nas membranas de alguns neurônios.

A terceira categoria, a excitação transmitida de outra célula, não será discutida nesta tese, porque não é relevante a seu conteudo. A quarta categoria, a membrana excítavel sem a excitabilidade, foi registrada

das membranas de alguns músculos de tipo intermediário, como a da minhoca (Chang, 1975b) e das membranas dos neurônios de alguns insetos (Pitman, Tweedle and Cohen, 1972; Orchard and Finlayson, 1977; Hengstenberg, 1977). A razão desta ausência, ou baixa, excitabilidade ainda não é clara. É sugerido por Hengstenberg (1977) que esta membrana está em condição "refratária" (refractoriness) porque esta membrana pode ser revertida a ser excítavel pela variação de seu potencial de repouso ou pela aplicação de um agente farmacológico (Pitman, Tweedle and Cohen, 1972). Uma explicação tentativa é apresentada na Discussão desta tese.

Para resumir, a eletrogênese da membrana excítavel, como discutida nesta Secção, é uma reação de três parâmetros de cabo no circuito equivalente aos ions no ambiente. Quando esta reação está procedendo em velocidade constante e na mesma direção, a membrana é considerada como na condição de repouso. As taxas de reação nesta condição são medidas como os valores dêstes três parâmetros de cabo em repouso. Quando há uma alteração da velocidade ou direção nesta reação, a membrana é considerada como em condição de excitação. O fenômeno da excitação pode ser classificado por vários métodos. Nesta Secção, a excitação é classificada em quatro categorias conforme a causa de sua iniciação.

Secção 2

Bioeletrogênese comparativa

Nesta Secção, é feita uma tentativa para classificar os animais conforme o mecanismo da eletrogênese na membrana de seu tecido excítavel. O potencial de repouso, $\mathcal{E}_m$, pode ser dividido em duas categorias, o formado sòmente por um ion, como o K, e o formado por mais que um ion. Na prática, os valores de potencial de repouso dos vários animais podem ser comparados com o valor hipótetico do potencial formado sòmente pelo equilíbrio entre a $[K]_o$ e a $[K]_i$, que aproxima 100 mV. A Tabela 1 mostra que nenhum dêstes potenciais de repouso é formado exatamente por sòmente o K, mas os das membranas 1, 2,3 são mais próximos a êste valor porque a participação do K em sua formação é maior e os das membranas 4, 5,

Tabela 1

Potencial de repouso

Ions K	Na	Cl	Faixa de ε_m em mV	No. da linha na Fig. 2	Tecidos	Referências
x			60 - 90	1	Músculo somático de círaca, Balanus nubilus.	Hagiwara, Chichibu and Naka, 1964.
x				2	Axônio gigante da lula, Loligo pealii.	Curtis and Cole, 1942.
x				3	Músculo esquelético da rã, Rana pipiens.	Ling and Gerard, 1950.
x	x		30 - 60	4	Neurônio de caramujo, Limnea stagnalis.	Sattelle, 1974.
x	x			5	Taenia coli da cobaia, Cavia porcellus.*	Kuriyama, 1963.
x	x	x		6	Músculo somático de Ascaris lumbricoides.	Del Castillo, De Mello and Morales, 1964.
x	x			7	Músculo de 2ndo grupo de Pheretima hawayana.	Chang, 1975b.

* O nome científico não foi citado na referência.

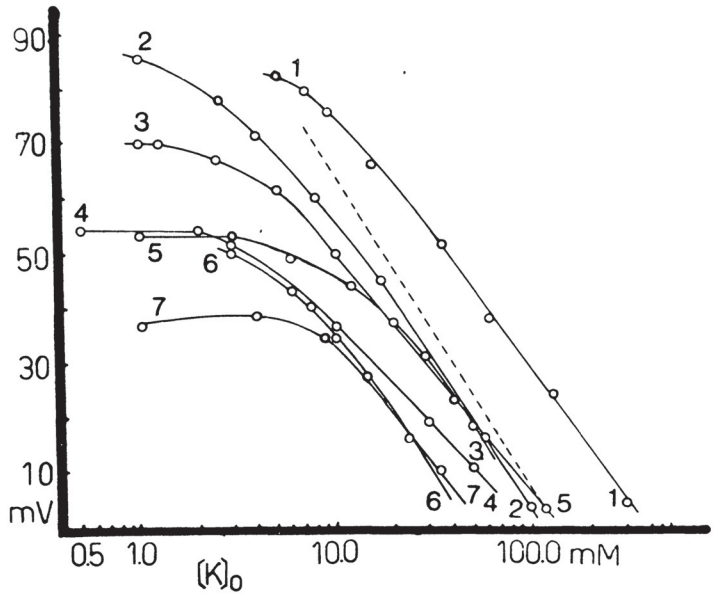


Fig. 2

Carácter do eletrodo do potássio das membranas excítaveis

Os números em cada linha referem-se aos números na Tabela 1. Linha pontilhada, o carácter hipótetico do eletrodo perfeito do potássio. Abscissa, concentração extracelular do potássio, $[K]_o$, logarítmica. Ordenada, o potencial de repouso, ε_m.

6 e 7 são mais distantes porque a participação de outros ions além de K, como Na e Cl, tambem é relativamente importante. A Fig. 2 mostra outra maneira de comparar as componentes iônicas no potencial de repouso dêstes sete animais na Tabela 1, com o potencial hipótetico formado sòmente pelo ion K. A variação do $\mathcal{E}_m$ medida da membrana é traçada contra a variação da $\log[K]_o$ nêste gráfico. A variação do potencial hipótetico é diretamente proporcional à variação da $\log[K]_o$ conforme a equação de Nernst e aparece como uma linha reta (pontilhada na Figura) com uma inclinação de 58 mV/10 x $\log|K|_o$. O número 10 é a base do logaritmo comúm. Aquí, ainda nenhum dêstes sete potenciais de repouso se-comporta exatamente como o potencial hipótetico mas as primeiras três linhas tem longos trechos aproximadamente retos na alta $[K]_o$ com as inclinações aproximadamente 58 mV/10 x $\log[K]_o$. Todas as sete linhas sólidas mostram uma curvatura na faixa de baixa $[K]_o$. O gráu desta curvatura indica aproximadamente a participação dos outros ions além do K. Pode ver-se que as primeiras três linhas sólidas mostram menor participação dos outros ions enquanto que as últimas quatro linhas sólidas mostram maior participação dos iòns alem do K na formação de seu potencial. Nota-se que esta classificação não coincide com a classificação apresentada na sistemática dos animais. Os vertebrados e os invertebrados são separados nestas duas categorias. Uma omissão importante da Tabela 1 e Fig. 2 é a participação do ion Ca na formação do $\mathcal{E}_m$, por ser ainda pouca observada e incompletamente entendida (Carnay and Tasaki, 1971; Piek, 1975; Takahashi and Yoshii, 1976).

Os outros dois parâmetros de cabo, a resistência de repouso, R_m, e a capacitência de repouso, C_m, são ainda menos estudados que o potencial de repouso, $\mathcal{E}_m$. A resistência de repouso, R_m, é o valor da resistência da membrana abaixo de limiar de sua excitação. É um valor variavel continuado, que pode ser dividido aproximadamente em duas partes, o valor no segmento óhmico, ou SPVC (Lorkovic, 1976), e o valor durante a retificação. O valor da R_m na SPVC de muitas membranas excítaveis em diversos animais está dentro da faixa de Kohm-cm^2 (Cole, 1942). Mas o valor da R_m na membrana neuronal da lesma, Aplysia californica, é cem vezes maior que êste valor (Carpenter, 1970). Pela escassês de dados, ainda

não pode ser feita uma tabela nôva para os valores da R_m dos animais além da de Cole (1942). Tambem os valores da R_m na retificação são hoje disponíveis só em casos isolados. As membrana inexcítaveis, como a da célula epidermal de Tenebrio molitor (Popowich and Caveny, 1977), não tem o diodo para retificação, portanto, não possuem valor além do que de SPVC. A membrana neuronal de Aplysia californica (Gallin and Wiederhold, 1977) e de outros gastropodos (Cnnor and Stevens, 1971) só tem os diodos em direção para fora da célula em paralêlo com os resistores para o K e para o Na, responsaveis para a retificação retardada pela corrente em direção para fora da célula. A membrana do axônio gigante da lula, Loligo pealii, só tem o diodo em direção para dentro da célula em paralêlo com o resistor para o K, que sòmente permite a passagem de corrente com o valor crescente do valor do E_m para o E_K, para causar uma retificação anômala (Grundfest, 1971). As membranas dos músculos esqueléticos do rato (Lorkovic, 1976) e da rã, Rana pipiens (Freygang and Adrian, 1961), só tem o diodo em direção para dentro da célula em paralêlo com o resistor para o Na, que sòmente permite a passagem da corrente com valor decrescente do E_K para o E_m, para causar uma retificação anômala. A resistência do sistema dos resistores nas membranas com excitação rítmica, como as do neurônio do caramujo, Helix pomatia (Eckert and Lux, 1974) e do gato (Wilson and Wachtel, 1974; Schwindt and Crill, 1977), pode diminuir e aumentar na polarização. A estrutura do circuito responsavel por êste efeito ainda não é clara. Nosso conhecimento da capacitência de repouso, C_m, é ainda menor do que o da resistência de repouso, R_m. Seus valores nas membranas excítaveis de diversos animais estão ao redor de 1 $\mu F/cm^2$ (Cole, 1942). Durante a medida da C_m, especialmente nos músculos esqueléticos dos vertebrados, a capacitância do sistema tubular, como RS e TTS, pode se confundir com a leitura da capacitência da membrana (Hodgkin and Nakajima, 1972).

Todas as membranas excítaveis exibem uma ou mais categorias de excitação. A categoria 1, a excitação produzida por estímulo elétrico no laboratório, ocorre nos exemplos citados na Tabela 2. As variações do potencial da membrana, o potencial de ação, durante esta excitação são mostradas na Fig. 3. Desde que todos os potenciais de ação são evocados

Tabela 2

Potencial de ação

Ions Na	Ca	Cl	No. na Fig. 3	Tecidos	Referências
x	x	x	1	Eletroplaca da raia elétrica, Raja erinacea.	Cohen, Bennett and Grundfest, 1961.
x		x	2	Músculo esquelético da galinha, Gallus gallus.*	Fukuda, 1974.
x	x		3	Neurônio de Aplysia californica.	Geduldig and Jung, 1968.
x	x		4	Músculo somático da craca, Balanus nubilus.	Hagiwara and Naka, 1964.
x	x		5	Músculo somático da minhoca, Pheretima communissima.	Hidaka, Ito, Kuriyama and Tashiro, 1969b.
x			6	Axônio da lula, Loligo pealii.	Hodgkin and Huxley, 1945.
x			7	Músculo esquelético da rã, Rana pipiens.	Jenerick and Gerard, 1953.
x			8	Músculo somático da minhoca, Pheretima hawayana.	Chang, 1975b.

* O nome científico não foi citado nesta referência.

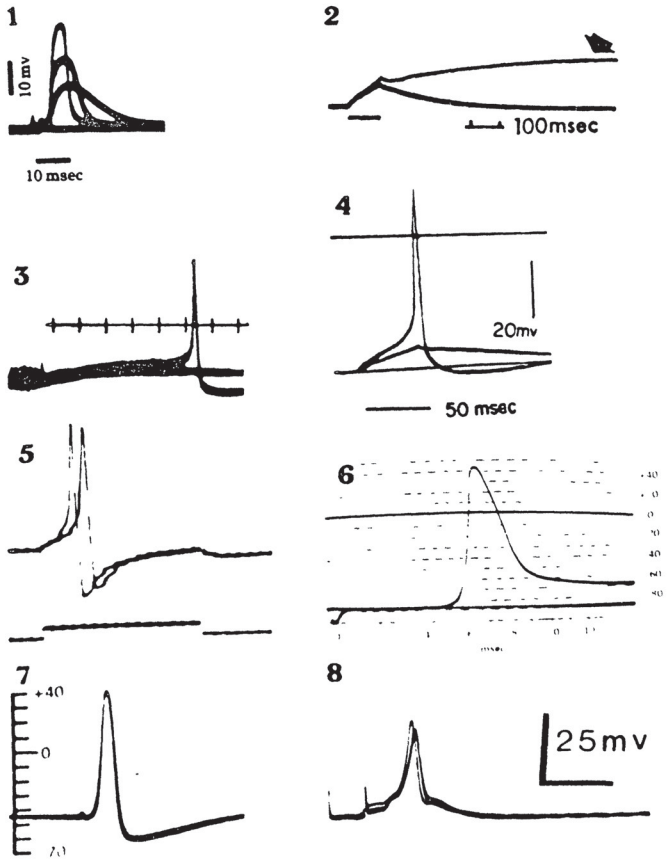


Fig. 3

Potencial de ação

Os números nesta figura são os mesmos que na Tabela 2. A flecha na Fig. 3.2 indica a espiga de cloro precidida pela espiga do sódio.

pelo estímulo elétrico, o artefato está presente em todos casos na Fig. 3 como uma indicação mais saliente nesta categoria. As latências mais curtas (menos que 1.0 msec) do potencial de ação foram registradas das membranas do axônio da rã (Lorente de Nó, 1948), dos neurônios do gato (Lloyd, 1943) e da rã (Brookhart, Machne and Fadiga, 1959). As latências mais longas foram registradas das membranas do músculos das minhocas, Pheretima hawayana (16.7 msec em Chang, 1975b) e P. communissima (50 msec em Hidaka, Kuriyama and Tashiro, 1969) e do músculo do estômago da cobaia (200 msec em Ito, Kuriyama and Sakamoto, 1970). As latências mostradas na Fig. 3 são as intermediárias. A espiga despolarizante no potencial de ação pode ser de tipo de tudo-ou-nada, i. e., com o amplitude de valor fixo, como a das membranas das células rápidas do músculo da rã, Rana temporaria (Kuffler, 1953) e do camarão, Astacus fluviatillus (Fatt and Ginsborg, 1958), e tambem pode ser de tipo graduado, i. e., com sua amplitude proporcional à intensidade do estímulo, como as das células lentas dos mesmos dois musculos citados. A espiga despolarizante de tipo graduado tambem foi registrada do músculo de segundo grupo da minhoca, Pheretima hawyana (Chang, 1975b) e dos músculos lisos de taenia coli da cobaia (Kuriyama and Tomita, 1965). A espiga despolarizante pode ser formada pela corrente de diversos ions, como Na, Ca ou Cl, mostrados na Tabela 2. Em alguns casos, como Fig. 3.2, duas espigas despolarizantes com os cursos temporais diferentes por Na (primeira, aguda) e por Cl (segunda, indicada pela flecha) são formadas. A espiga hiperpolarizante está ausente em alguns potenciais de ação. Quando presente, como no caso 5, é formada sòmente pela corrente de ion K. Ainda não está claro se os outros ions tambem podem formar uma espiga hiperpolarizante. O platô é pouco observado no potencial de ação. Apenas existe um caso em inseto (ver a Secção 3 deste Capítulo).

A segunda categoria, a excitação rítmica, tambem está presente nos tecidos de diversos animais como nos exemplos citados na Tabela 3 e Fig. 4. Em lugar de artefato no potencial de ação, a figura mais saliente da descarga rítmica é o potencial de marca-passo que pode ser visto como uma recuperação contínua da espiga hiperpolarizante do cíclo prévio da excitação

Tabela 3

Descarga rítmica

Corrente Na	Corrente Ca	No. na Fig. 4	Tecidos	Referências
x	x	1	Neurônio de Aplysia californica.	Carpenter and Gunn, 1970.
x	x	2	Taenia coli da cobaia, Cavia porcellus.*	Bülbring, 1962.
x		3	Músculo somático da minhoca, Pheretima hawayana.	Chang. 1969.
x		4	Músculo somático de Ascaris lumbricoides.	De Bell, Del Castillo and Sánchez, 1963.
x		5	Músculo cardíaco do coelho, Oryctolagus cuniculus.*	Hoffman and Cranfield, 1960.
x		6	Músculo cardíaco da rã, Rana pipiens.	Hutter and Trautwein, 1956.
	x	7	Músculo somático da minhoca, Pheretima communissima.	Hidaka, Ito, Kuriyama and Tashiro, 1969.

* O nome científico não foi citado nesta referência.

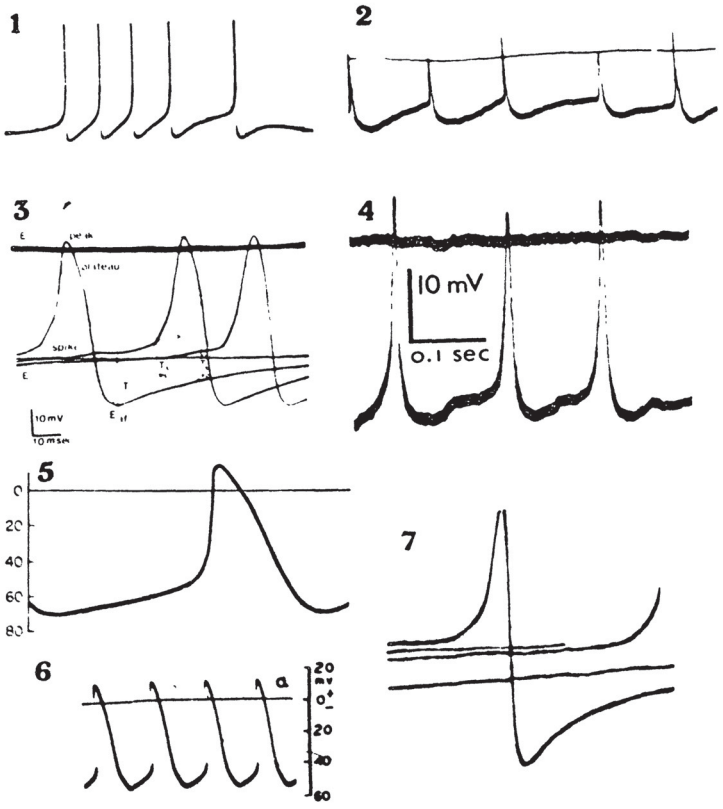


Fig. 4

Descarga rítmica

Os números nesta figura são os mesmos que na Tabela 3.

(Grundfest, 1967). Os ions que formam sua espiga despolarizante são citados na Tabela 3. O platô ocorre nos casos 3, 5 e 6 mas é menos claro nos outros casos. Entre as células de mesmo tecido de mesmo animal, como os neurônios de Aplysia californica, algumas podem descarregar rítmicamente e outras não (Eckert and Lux, 1976). Nos vertebrados, o músculo esquelético geralmente não se descarrega rítmicamente mas os músculos liso e cardíaco sim. Muitos músculos somáticos dos invertebrados, classificados como músculos intermediários por Prosser (1967) e por Toide, Kuriyama, Tashiro and Ito (1975), podem descarregar rítmicamente e podem tambem responder ao estímulo elétrico. Alguns músculos intermediários e alguns neurônios podem iniciar uma excitação sem o cíclo prévio da excitação (Toide, Kuriyama, Tashiro and Ito, 1975), i. e., a excitação espontânea, cuja origem deve ser atribuida a outro mecanismo ainda não verificado.

A quarta categoria, a membrana excítavel mas sem excitabilidade, foi observada apenas nos neurônios dos insetos, cujo mecanismo será discutido em detalhe em Secção 3 de Capítulo 2 e em Secção 3 de Capítulo 5.

Secção 3

Bioeletrogênese nos insetos

O mecanismo básico da eletrogênese nos insetos é o mesmo que nos outros animais. A única razão de separar os insetos num secção especial é para dar uma descrição mais detalhada porque o resultado desta tese foi conseguido com um inseto. Porém, há alguns carácteres que ocorrem mais freqüêntamente na eletrogênese dos insetos que na dos outros animais. A eletrogênese no músculo dos insetos foi descrita em duas revisões recentes (Piek, 1975; Huddart, 1975) e a da seu nervo foi descrita em duas revisões mais antiguas (Narahashi, 1963; Treherne and Beamont, 1965).

Uma diferença mais proeminente entre a eletrogênese dos insetos e dos outros animais é que o $\mathcal{E}_m$ da célula excítavel dos insetos não pode ser calculado a partir dos potenciais de equilíbrio dos ions

(Huddart, 1966a, b, 1967) com as equações mencionadas na Secção 1 dêste capítulo, porque a distribuição dos ions principais, como K, Na, Cl, Ca e Mg na hemolinfa e no citoplasma, especialmente dos insetos herbívoros endopterigotos, como as mariposas, é muito diferente, ou mesma contrária a do axônio da lula (Duchateau, Florkin et Leclercq, 1963; Huddart, 1969c). A explicação dêste fenômeno foi encontrada no estudo do axônio da barata, Periplanta americana, embora sua distribuição iônica não seja tão estranha como nas mariposas. Há duas membranas, em lugar de uma, em redor das células dêste tecido (Treherne and Pichon, 1972). A concentração iônica na hemolinfa não reage diretamente com a intracelular, mas com a extracelular através da membrana perineurica e o potencial da membrana plásmica é formado pelo potencial de equilíbrio entre as concentrações extracelular e intracelular. Portanto, há três espaços, o espaço sangüineo (Bennett, Buchan and Treherne, 1975), o espaço extracelular (Yamasaki and Narahashi, 1959a) e o espaço intracelular no axônio da barata, Periplanta americana. Esta estrutura é semelhante com a da barreira hemato-encefálica do gato (Somjen, 1975), especialmente porque a membrana perineurica da barata tambem é formada pelas células semelhantes as da glia. Quando a membrana perineurica é perfurada artificialmente, o potencial da membrana plásmica é influido pela concentração sangüinea (Thomas and Treherne, 1975). Tambem foram encontradas (Ashhurst, 1968) duas membranas ao redor das células musculares da barata, Periplanta americana, uma lámina básica e uma membrana plásmica. O fenômeno da isolação da membrana plásmica do espaço sangüineo tambem é considerado possivel (Piek, 1975).

Um outro carácter especial observado freqüentamente dos insetos é a formação de seu $\mathcal{E}_m$ pela $\mathcal{E}_K$ ativo. Os $\mathcal{E}_m$s dos músculos de oito insetos (Fig. 1a em Piek, 1975), do axônio da barata, Periplanta americana (Yamasaki and Narahashi, 1959b), do neurônio de bicho-pau, Carausius morosus (Orchard, 1976) e do músculo das mariposas, Antherea polyphemus (Rheuben, 1972), Ephestia kuehniella (Deitmer, 1977) e Pseudaletia sequax (Chang and Sales, 1977) só diminuem quando a $[K]_o$ é muita alta com uma inclinação muita menor que 58 mV/10 x $\log[K]_o$. Foi encontrado (Huddart and Wood, 1966) que a membrana muscular da barata, Periplanta americana, pode regular a razão $\frac{[K]_o}{[K]_i}$ alterada

artificialmente depois que todos os outros ions foram retirados ou com seus condutências inibidas. Sua membrana só mostra o carácter do eletrodo imperfeito do potássio quando o transporte ativo do $\mathcal{E}_K$ foi inibido por DPN ou CN (Wareham, Duncan and Bowler, 1974). Esta condição é diferente da membrana do axônio da lula, Loligo pealii, onde seu transporte ativo é sempre igual à difusão do K e seu $\mathcal{E}_K$ sempre pode ser calculado apenas pela difusão.

A resistência da membrana em repouso, R_m, e a capacitência da membrana em repouso, C_m, do músculo de cinco insetos (Tabela 6.6 em Huddart, 1975), do tecido nervoso dos ortópteros (Yamasaki and Narahashi, 1959b; Orchard and Finlayson, 1977) e do músculo da mosca, Sarcophaga bullata (Patlak, 1976) são semelhantes as dos outros animais (Cole, 1942, 1969) com a exceção do caso da larva da libélula, Aeshna verticalis (Malpus, 1968), em que a C_m é grande, cinqüênta vezês maior que citada em Cole (1969) e a R_m é pequena, a metade de citada em Cole (1942), ou um décimo das de outros insetos (Huddart, 1975). Os valores das R_m e C_m medidos da mariposa, Antherea polyphemus, adulta (Rheuben, 1972) e da larva de Pseudaletia sequax (Sales and Chang, 1976; Deitmer, 1977), tambem estão fora da faixa dos outros insetos. Enquanto polarizadas, as membranas do músculo da mariposa, Ephestia kuehniella (Deitmer, 1977), do tecido nervoso dos ortópteros (Narahashi, 1961; Orchard and Finlayson, 1977) e do músculo da mosca, Sarcophaga bullata (Patlak, 1976) mostram as duas retificações semelhantes as dos outros animais.

A descarga rítmica foi registrada do músculo cardíaco da mariposa, Hyalophora cercopia (McCann, 1963), cujo curso temporal é semelhante a do músculo cardíaco do coelho. O mecanismo iônico de sua eletrogênese é tambem tido (McCann, 1965, 1970) como semelhante a do músculo cardíaco do coelho. A descarga rítmica do músculo intestinal da barata, Periplanta americana, é semelhante em seu curso temporal à do primeiro grupo do músculo somático da minhoca, Pheretima hawyaana, com o potencial de marca-passo, a espiga despolarizante, o platô e a espiga hiperpolarizante (Nagai and Brown, 1969), mas é diferente da taenia coli da cobaia, Cavia porcellus. O primeiro grupo do músculo somático da larva da mariposa, Pseudaletia sequax, tambem descarrega espontaneamente (Deitmer, 1977; Chang and Sales, 1977). Seu mecanismo ainda está sendo estudado nêste laboratório.

Ainda que a composição anatômica de células musculares, i. e., a percentagem das células lentas e rápidas num músculo, é considerada mais uniforme no inseto (Huddart, 1975) que no crustâceo, dois tipos de potencial de ação, graduado (Werman, McCann and Grundfest, 1961; Usherwood, 1967; Malpus, 1968) e tudo-ou-nada (Belton and Grundfest, 1962; Wood, 1963; McCann and Reece, 1967; Deitmer and Rathmayer, 1976) podem ser evocados dos diversos insetos. O axônio gigante da barata, Periplanta americana, responde ao estímulo com o potencial de ação de tipo de tudo-ou-nada (Narahashi, 1961). O potencial de ação graduado pode ser evocado do primeiro grupo muscular mas não dos outros grupos da larva da mariposa, Pseudaletia sequax (Chang and Sales, 1976). A corrente de Na forma a espiga despolarizante do potencial de ação do músculo do gafanhoto, Locusta migratoria (Wood, 1963), do axônio da barata, Periplanta americana (Narahashi, 1966) e do neurônio da mariposa, Philosamia cynthia (Yamaguchi, Lockshin and Woodward, 1972). A corrente de Ca forma a espiga despolarizante do músculo das mariposas, Philosamia cynthia (Yamaguchi, Lockshin and Woodward, 1972) e Ephestia kuehniella (Deitmer and Rathmayer, 1976) e do neurônio de bicho-pau, Carausius morosus (Orchard, 1976). A alta $[Mg]_o$ na hemolinfa é observada dos muitos insetos, portanto, a corrente do Mg é tambem tida como um fator na formação da espiga despolarizante do músculo de Tenebrio molitor (Belton and Grundfest, 1962) e da mariposa, Antherea polyphemus (Weevers, 1966). O platô não foi observado do potencial de ação dos insetos na condiçao normal mas pode aparecer no potencial de ação do neurônio da barata, Periplanta americana, tratado pelo DDT (Narahashi and Yamasaki, 1960). A espiga hiperpolarizante foi registrada do potencial de ação do neurônio da barata, Blatta orientalis (Luco, 1964).

As membranas dos neurônios da barata, Periplanta americana, (Pitman, Tweedle and Cohen, 1972), do bicho-pau, Carausius morosus (Orchard and Finlayson, 1977) e da mosca, Calliphora erythrocephala (Hengstenberg, 1977) não respondem ao estímulo elétrico em Ringer normal. A da barata pode ser tornada excítavel sòmente após a denervação e o tratamento com a colchicina e as da bicho-pau e da mosca podem ser tornadas excítaveis sòmente após seus potenciais de repouso foram alterados pela polarização. Fenômeno semelhante foi pouco observado entre os outros animais. O primeiro grupo da célula

muscular da minhoca, Pheretima hawayana, não responde ao estímulo elétrico mas tem descarga espontânea (Chang, 1969, 1975b). Uma explicação satisfatória para êste fenômeno, a inexcitabilidade da membrana excítavel, ainda não é desponivel. O aumento da excitabilidade na membrana do neurônio da barata pela colchicina está relacionado com a alteração da corrente axo-plásmica (Pitman, 1975). A ausência da excitabilidade na membrana do neurônio da mosca no Ringer normal é considerada como devida a condição "refratária" (Hengstenberg, 1977). O estudo dos parâmetros de cabo destas membranas ainda não foi feito, portanto, ainda não existe hoje explicação para esta variação da excitabilidade baseada na estrutura destas membranas.

Secção 4

Finalidade dêste trabalho

A finalidade dêste trabalho é descrever o mecanismo de eletrogênese desta membrana. A eletrogênese do inseto é um desafio aos neurofisiologistas quem são familizados com os mecanismos da eletrogênese desenvolvidos do estudo da lula. Desde a publicação dos trabalhos monumentais, premiados de Nobel, sobre a neurofisiologia da lula (Hodgkin, 1951; Hodgkin and Huxley, 1952), a eletrogênese de poucos casos dos outros animais tambem foi explicada pela mesma teoria. A questão persiste que será esta é a única teoria da eletrogênese? Existe mecanismo da eletrogênese básicamente diferente do da lula? Uma das respostas a esta questão seria obtida pelo estudo da eletrogênese do inseto (Huddart, 1971). A eletrogênese do inseto apresenta uma maior diferença com o da lula do que a encontrada dos outros animais estudados, como os exemplos citados na Secção 3 dêste Capítulo. Entre êles, o conceito da membrana excítavel sem excitabilidade aparece como uma anomalia nos conceitos tradicionais da eletrogênese. Pela opinião dêste autor, esta apenas representa uma membrana excítavel que não responde ao mesmo estímulo efeitivo para a lula. Como entendida, a eletrogênese de um grande maioria dos animais ainda não foi estudada, uma classificação dos animais baseada em sua eletrogênese poderia feita sòmente depois preenchidos os vazios do conhecimento da eletrogênese. Há indicação

hoje que esta classificação baseada na eletrogênese deveria ser diferente da classificação existente na sistemática, que é baseada totalmente na anatomia dos animais. Verificando os casos citados na Secção 2 dêste Capítulo, o axônio da lula, um molusco, apresenta a espiga despolarizante formada pela corrente de Na em seu potencial de ação igual a do músculo esquelético da rã, um vertebrado; mas outro molusco, Aplysia, apresenta a espiga despolarizante formada pela corrente de Ca em seu potencial de ação, semelhante ao da taenia coli da cobaia, outro vertebrado. Espigas hiperpolarizantes formadas pela corrente do K existem nos potenciais de ação dos diversos animais não relatados taxonômicamente, como o sapo, a Ascaris, a cobaia e a minhoca. Portanto, o estudo da eletrogênese do inseto representa uma etapa gigantesca no entendimento do mecanismo geral da eletrogênese. O esforço dêste trabalho está limitado a medida dos valores dos três parâmetros de cabo desta membrana, a fim de responder uma das questões no futuro, a base estrutural da inexcitabilidade na membrana excítavel.

Capítulo 3

Método

Secção 1

Preparação

O músculo usado para êste trabalho é Musculus dorsoventralis do mesotorax do Panstrogylus megistus (Burmeister, 1835), adulto. Êste inseto vem sendo mantido no biotério do Departamento de Parasitologia por muitas gerações, alimentado com sangue de galinha viva imobilizada. Mais de dêz espécies dos animais transmissores da doença de Chagas com o nome popular "barbeiro" são criados nêste biotério para o estudo desta doença. Êste espécie, entretanto, foi escolhido para o estudo da bioeletrogênese por seu grande tamanho conveniente para a disecação e manipulação no laboratório. Uma vêz que êste inseto é criado artificialmente, sua identificação esta perpeitamente reconhecida. O gênero Panstrogylus pertence a subfamília Triatominae da família Reduviidae da

ordem Hemiptera. Este espécie foi chamada inicialmente como Conorrhinus megistus (Burmeister, 1835) (Pinto, 1931). Este nome permaneceu durante o estudo da doença humana causada pelo Trypanosoma cruzi transmitida por êste inseto (Chagas, 1909). Há ainda mais três nomes para êste animal em época anterior, Lamus megistus (Stål, 1859); Panstrogylus megistus (Berg, 1879) e Triatoma megista (Neiva, 1914). Em 1931, seu nome foi unificado como Panstrogylus megistus (Burmeister, 1835) (Pinto, 1931).

O musculus dorsoventralis do mesotorax dêste animal foi escolhido para êste estudo por seu grande tamanho. Êste músculo corresponde ao músculo No. 34 em Larsen (1945) embora êste espécie não esteve mencionada nêste artigo. Sua dimensão in situ é de quase 3 mm em comprimento menos os dois apodemos que o ligam a cutícula nas paredes dorsal e ventral, e menos que 1 mm de espessura. Após disecação, retrai-se um pouco. Histológicamente, êste músculo é de tipo fibrilar (Elder, 1975) com sua secção transversal de forma poligonal (Fig. 5) com fibrilas grossas (2-5 µ em diametro) e pouco sarcoplasma. No cálculo de sua área de superfície,

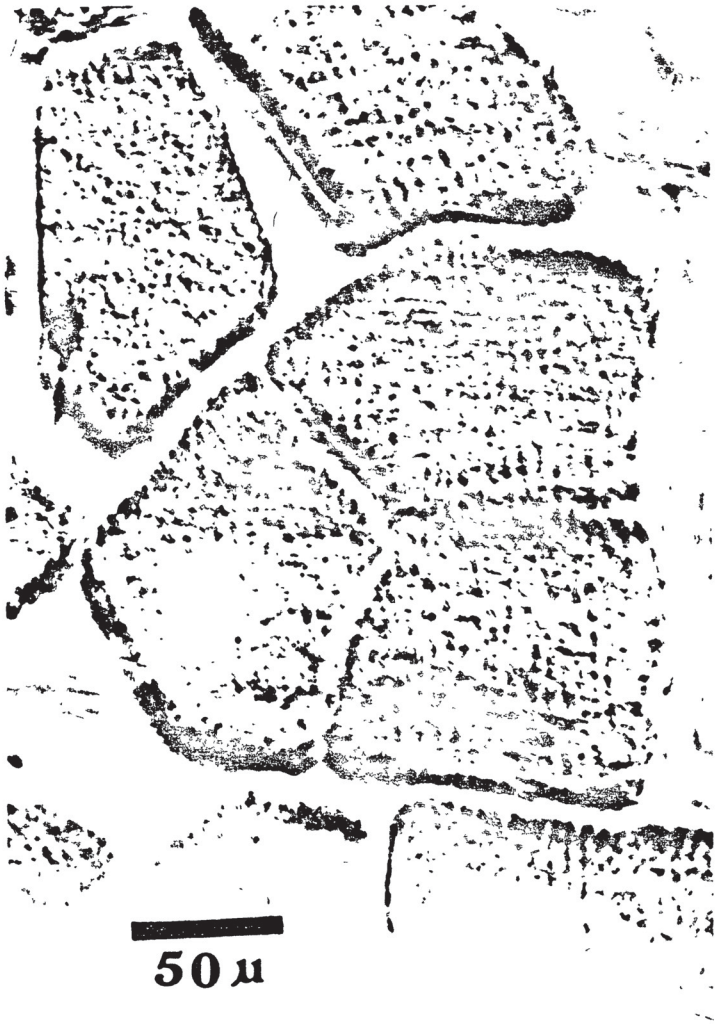


Fig. 5

Histologia dêste músculo

Corte transversal do musculus dorsoventralis do mesotorax do adulto de Panstrogylus megistus, visto pelo contraste de interferência sem corante com o microscópio ótico Ortholux. Os grânulos dentro de cada célula são as miofibrilas.

...udo, a secção transversal foi considerada como uma elipse com seu semieixo a = (63.7 ± 1.7)μ e seu semieixo b = (40.8 ± 1.1)μ em 51 células de 3 indivíduos. A área de superfície celular assím calculada é de (1.0 ± 0.3) x 10^{-3} cm^2 sem incluir suas invaginações (RS e TTS) não visíveis ao microscópio ótico.

Só foi usado o músculo de indivíduos adultos com mais de 2.5 cm de comprimento. O músculo das ninfas não foi usado no trabalho porque é pouco desenvolvido e contem muito tecido gorduroso. O músculo foi disecado com seus apodemos ligados nos dois pedaços de cutícula que serviram como pontos de fixação pelas alfinetes inoxidaveis na parafina branca no fundo de câmara de registro (Erlanger and Gasser, 1937) feita de acrílico. Quando se retirou muito tecido conjuntivo dêste músculo durante a disecação, seu ε_m diminuiu rápidamente, possivelmente pela perda das traqueias dentro do tecido conjuntivo, que mantem seu metabolismo. Canulação das traqueias não é praticavel por seu pequeno tamanho e a oxigenação do Ringer não é efetiva porqur a preparação não absorve o oxigênio do ambiente sem traqueia. O âr que permaneceu nas traqueias aparentemente manteve a preparação isolada em boa condição durante o curso da experiência. Devido a permanência da cutícula na preparação, a visualização com a luz transmitida não foi satisfatória. Um sistema de luz refletida foi providenciado com um sistema do condensador feito com lentes de vidro. A visualização de preparação durante a penetração de eletrodo foi efetuada com microscópio estereoscópico Leitz, ou Zeiss SM3. Todas as experiências foram conduzidas na temperatura do ambiente, 21° - 23° C, menos a experiência em Fig. 14 em qual a temperatura foi diminuida com contrôle semiautomático (Chang, Cruz, Carvalho and Assme, 1974) a partir de temperatura normal, 21° C, até 5° C. Não existe um Ringer para êste animal. O Ringer para o Rhodnius prolixus (Ramsey, 1953) foi inicialmente usado baseado na especulação que o Rhodnius prolixus é taxonômicamente próximo a Panstrogylus megistus, que contem apenas três ions, Na, 158 mM; K, 5 mM e Cl, 163 mM. Foi decidido, depois de várias testes (ver Resultado), adicionar 50 mM de sacarose e nenhum tampão para tornar êste Ringer mais adequado para êste animal. Todos

outros materiais das experiências foram adicionados sem modificar s composição básica dêste Ringer. Todos os compostos inorgânicos, do Ringer normal e das experiências, está expressos em milimoles, mM, corrigidos com o coeficiente de disociação, G (Heilbrunn, 1943). Todas as drogas são expressas em peso/volume, gm/cc.

Secção 2

Montagem

As montagens de estimulação e de registro convencionais são usadas nêste laboratório. A montagem para a estimulação consiste de um estimulador do sistema 160 de Tektronix, ou 571 de AEL, isolado por um transformador ou ligado diretamente a um par dos eletrodos feitos de fio de platina No. 30 montado no manipulador universal feito com o acrílico e parafuso. A montagem para o registro do potencial da membrana consiste de um osciloscópio 502, ou 503, de Tektronix, e um amplificador de alta impedência, NF-1 de AEL (agora a Cia. Stoelting) ligado ao microeletrodo de vidro com a resistência de 5-10 Megohm preenchido com 3 M de KCl através de uma meia célula de filamento de AgCl-Ag (Ling and Gerard, 1949) montado no micromanipulador 56-3 de CSI. A montagem para o registro da resistência e da capacitência da membrana consiste de um ponte de Wheatstone, P-1 de AEL (agora a Cia. Stoelting), que é uma comercialização transistorizada da ponte usada por Araki and Otani (1955) e por Frank and Fuortes (1956). Ambos os sistemas de estimulação e de registro são dirigidos para passar através da unidade PAD2A desta ponte onde a voltagem, V_0, de pulso quadrado foi convertida para a corrente, i, pelo resistor monitor, r_0, de 10^8 ohm na unidade PF-3 (traço superior, Fig. 6). A queda da voltagem através da resistência e da capacitência do eletrodo foi balanceada pela unidade PIA. Só a queda da voltagem, V_m, através da membrana, deformada pela capacitência aparece no osciloscópio (traço inferior, Fig. 6). Diferentemente de sistema usado por Fatt and Katz (1951) e, recentemente, por Zolovick, Norman and Fedde (1970), a vantagem dêste sistema é que se usa um só microeletrodo. A sua desavantagem é que a constante de espaço, λ, da

membrana não pode ser medida e, conseqüentemente, a resistência longitudinal, R_l, não pode ser calculada. Desde que a distância entre o sistema de estimulação e o sistema do registro é zero (o mesmo eletrodo), esta desavantagem não introduz nenhuma inacurácia ou inconveniência. O princípio de funcionamento desta ponte foi descrito anteriormente (Chang, 1972). A câmera C4G de Cia. Grass foi usada para fotografar os registros da tela do osciloscópio.

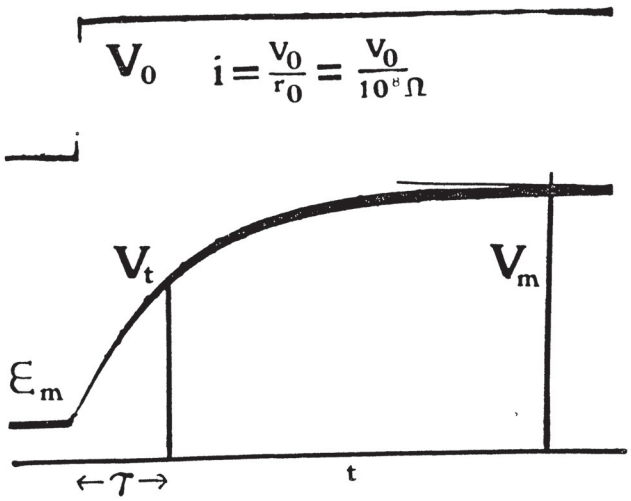


Fig. 6

Método do cálculo da resistência e da capacitência

Imagens de dois traços na tela do osciloscópio registradas através P-1. O traço superior, o pulso quadrado aplicado, V_0, cuja corrente, i, foi monitorada pelo resistor monitor de 10^8 ohm no PF-3. O traço inferior, a alteração da voltagem da membrana a partir do $\mathcal{E}_m$ por i. A resistência efetiva da membrana, r_m, é calculada pela alteração máxima, V_m, dividida por i no gráfico de V-i (Fig. 15, 16). A capacitência efetiva da membrana, c_m, é calculada pela constante de tempo, τ, na V_t que é 2/3 da V_m com a equação de crecimento natural (Pp. 8).

Secção 3

Cálculo dos dados

O valor do potencial da membrana em repouso, $\mathcal{E}_m$, foi lido da tela do osciloscópio sem fotografar e traçado diretamente em um histograma. Uma vez que a distribuição de $\mathcal{E}_m$ desta população de células é normal sem as complicações apresentadas da minhoca (Chang, 1975a) ou da larva da mariposa, Pseudaletia sequax (Chang and Sales, 1977), a figura dêste histograma não foi apresentado no Resultado. Seu valor aparece nas figuras com uma média ± êrro padrão de 20 - 40 células em cada ponto.

O valor da resistência efetiva da membrana, r_m no SPVC e nas retificações foi obtido da tangente de cada segmento da curva no gráfico de V-i (Fig. 15, 16). Êstes gráficos foram traçados pela alteração da voltagem, V_m, através da membrana a partir do $\mathcal{E}_m$ contra a corrente, i, aplicada em direção ao exterior e ao interior da célula. Esta direção se refere a direção do movimento da corrente positiva mas não a direção do movimento do eletron (Adrian, 1969). O valor da resistência específica, R_m, foi calculado pela r_m x area em ohm-cm^2. O valor da capacitência efetiva, c_m, foi calculado pela constante de tempo, τ, nas 2/3 da queda de voltagem, V_m, onde $\tau = r_m c_m$ e $c_m = \tau / r_m$ (traço superior na Fig. 6). O valor da capacitência específica, C_m, foi calculado pela c_m/area em $\mu F/cm^2$.

Capítulo 4

Resultados

O $\mathcal{E}_m$ desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, medido no Ringer para o Rhodnius prolixus (ponto zero na Fig. 7) foi menor que 40 mV e sofreu uma diminuição depois de 10 minutos nêste Ringer. Quando 50 mM de sacarose foi adicionada, o $\mathcal{E}_m$ permaneceu em 55.5 ± 2.3 mV. Ulterior adição de sacarose até 200 mM manteve o $\mathcal{E}_m$ entre 50 - 60 mV (Fig. 7) das 23 preparações. Portanto, 50 mM de sacarose foi usada em todas Ringers nêste trabalho. O valor de 55.5 ± 2.3 mV foi considerado como o valor do $\mathcal{E}_m$ em condição normal. O traço na medida do $\mathcal{E}_m$ foi sempre reto sem interrupção do MEPP ou da descarga espontânea.

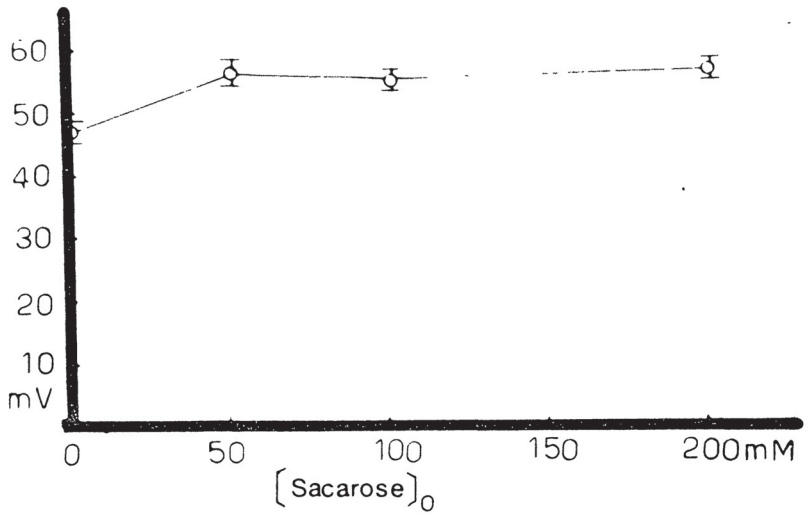


Fig. 7

Efeito de osmose no $\mathcal{E}_m$

Sacarose foi adicionada (abscissa) ao Ringer do Rhodnius prolixus (ponto zero). A ordenada mostra a alteração do $\mathcal{E}_m$ da membrana muscular de Panstrogylus megistus.

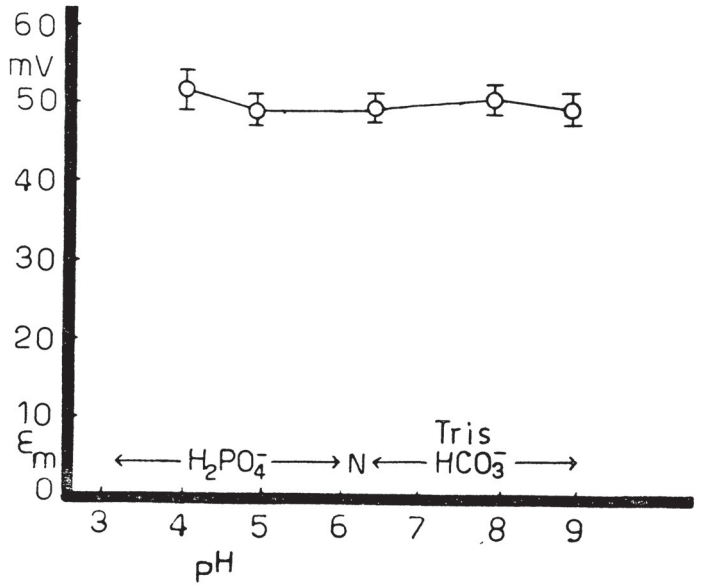


Fig. 8

Efeito de tampão e de pH no $\mathcal{E}_m$

Ordenada, $\mathcal{E}_m$. Abscissa, valor de pH. N, Ringer normal para Panstrogylus megistus = Ringer para Rhodnius prolixus + 50 mM de sacarose, sem tampão, pH = 6.4.

Nenhuma alteração do ε_m foi observada quando a preparação foi estimulada intracelularmente ou extracelularmente em Ringer normal e na alteração iônica.

Ao contrário do que acontece com o músculo da barata, Periplanta americana (Duncan, Wareham and Bowler, 1976), o ε_m dêste músculo não é sensivel aos tampões de HCO_3^-, $H_2PO_4^-$ ou Tris. A Fig. 8 mostra que a mudança do ε_m entre pH de 4 a 9 causado por êstes três tampões não foi significante. Portanto, nenhum tampão foi usado para êste Ringer. Seu pH permanece em 6.4 semelhante ao de muitos outros Ringers para os insetos (Tabela 7 em Narahashi, 1961).

O carácter do eletrodo do potássio desta membrana foi testado pela adição do K_2SO_4 ao Ringer normal (a direta de ponto N na abscissa da Fig. 9) e pela retirada do KCl do Ringer normal (a esquerda do ponto N na abscissa da Fig. 9). O ε_m começou diminuir em mais que 10 mM da $[K]_o$ com uma inclinação de 40 mV/10 x $\log[K]_o$ (linha A). A contribuição da condutência de Na em repouso ao ε_m foi testada retirando a $[Na]_o$ completamente e substituindo-a por Tris, titulado (titrated) com o HCl para manter o pH normal (Geduldig and Junge, 1968) na linha B, Fig. 9. Uma hiperpolarização de 7 mV foi observada. Sua sensibilidade aumentou para 5 mM da $[K]_o$ mantendo se a mesma inclinação de ε_m contra $\log[K]_o$. Esta experiência

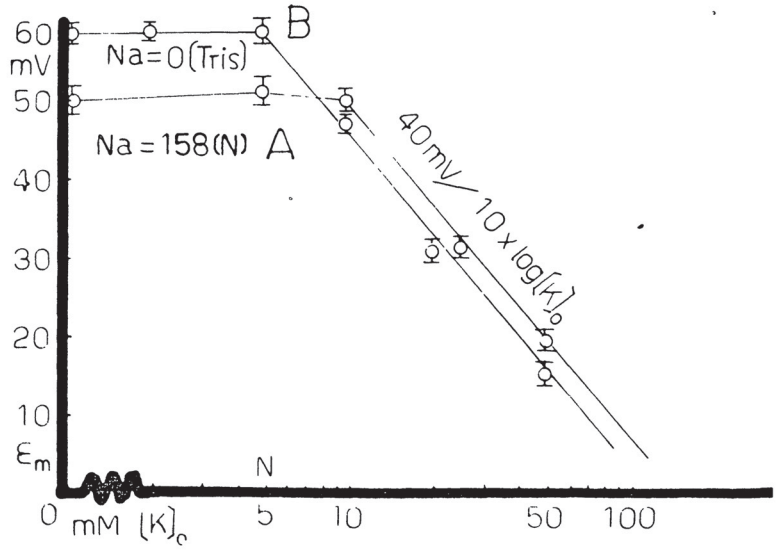


Fig. 9

Carácter do eletrodo do potássio

Ordenada, ε_m. Abscissa, a concentração extracelular do potássio, $[K]_o$, em escala logarítmica. Linha A, em Ringer normal. Linha B, em Ringer sem Na (substituido por Tris). O número a direta da linha é o valor de sua inclinação.

não pode ser feita pela substituição do Na pelo cloreto de colina, porque a colina tem um forte efeito despolarizante sobre esta membrana em menos de 30 minutos (Fig. 10).

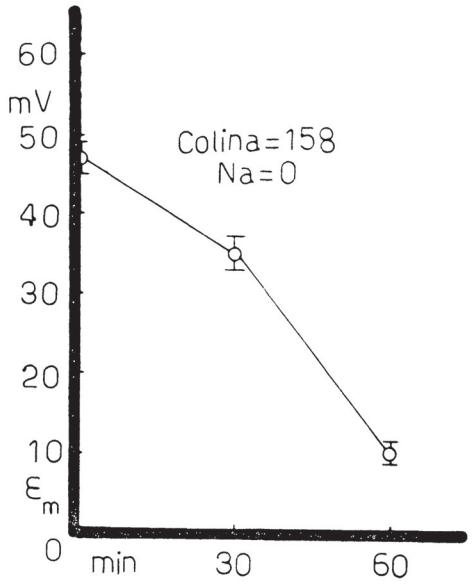


Fig. 10

Efeito da substituição do Na pela colina

Ordenada, ε_m. Abscissa, o tempo em minutos.

Por outro lado, esta membrana mostra um carácter do eletrodo imperfeito do cloro quando o NaCl do Ringer normal (N) foi substituido gradualmente pelo Na_2SO_4 (Fig. 11). O ε_m diminuiu a partir do 163 mM de

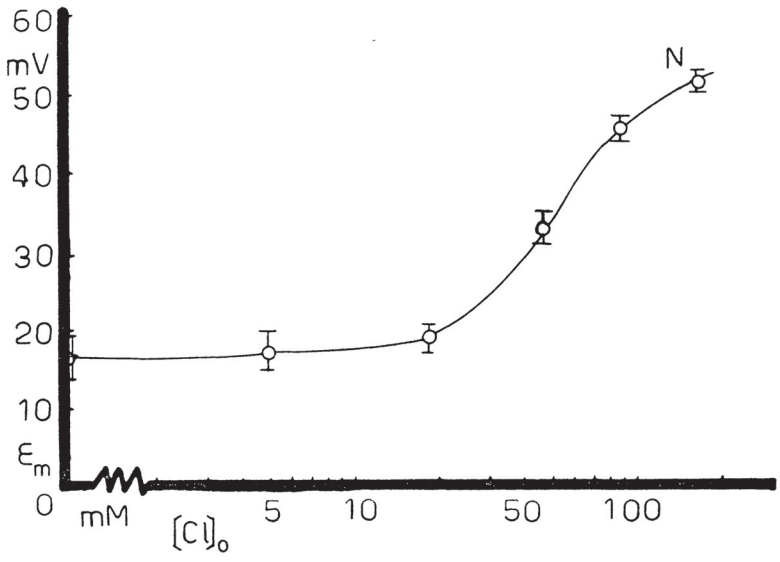


Fig. 11

Carácter do eletrodo de cloro

Ordenada, ε_m. Abscissa, a concentração extracelular do cloro, $[Cl]_o$, em escala logarítmica. N, em Ringer normal.

$[Cl]_o$(N) até 18 mM com uma inclinação de 35 mV/10 x $\log[Cl]_o$. A ulterior diminuição até $[Cl]_o = 0$ foi conseguida pela substituição de KCl por K_2SO_4, que manteve o ε_m em 15 mV.

Já que êste Ringer não contem Ca nem Mg, a adição de $[Ca]_o$ até 10 mM despolarizou a membrana para baixo de 10 mV (linha inferior, Fig. 12) mas a adição de mesma quantidade de $[Mg]_o$ não pareceu influir o ε_m (linha superior, Fig. 12). Quando a $[K]_o$ foi retirada, esta despolarização do Ca só atinge a metade desta faixa (linha central, Fig. 12).

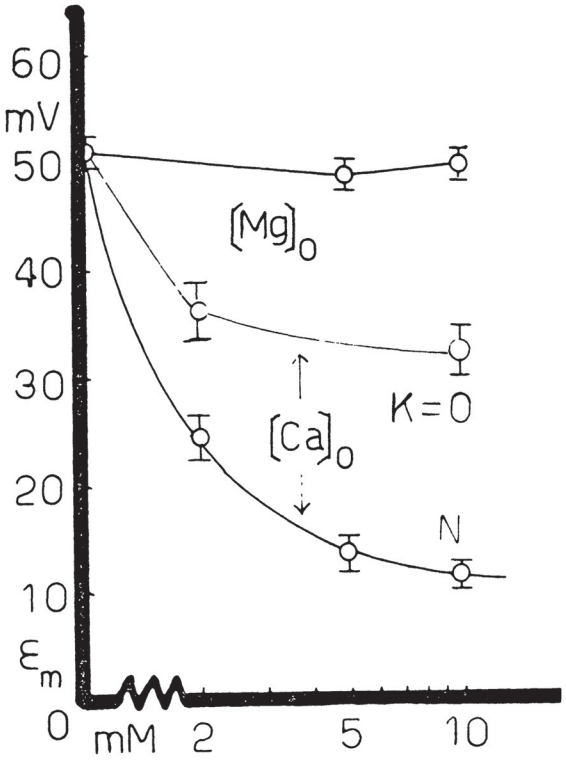


Fig. 12

Efeito dos ions alcalino-terrosos no ε_m

Ordenada, ε_m. Abscissa, a concentração extracelular do cálcio, $[Ca]_o$, e do magnésio, $[Mg]_o$, em escala logarítmica. O ponto zero representa o valor no Ringer normal.

Para testar a bomba metabólica na manutenção dêste ε_m (Wareham, Duncan and Bowler, 1974), o KCN foi adicionado ao Ringer normal. A Fig. 13 mostra que a adição de 10^{-5} gm/cc (1.5 mM) de KCN diminuiu o ε_m em uma curva sigmóide semelhante ao efeito de 10^{-3} gm/cc de NaCN no músculo da barata, Periplanta americana (Fig. 4 em Wareham, Duncan and Bowler, 1974). Quando foram adicionadas mais altas concentrações de KCN, como 10^{-4} e 10^{-3}, o ε_m diminuiu em linha quase reta. A temperatura do Ringer na câmera foi diminuida a partir da temperatura de ambiente, 22° C, até 5° C (Fig. 14). O ε_m manteve-se no mesmo nível até 10° C. Em 5° C, foi observada uma despolarização de 8 mV.

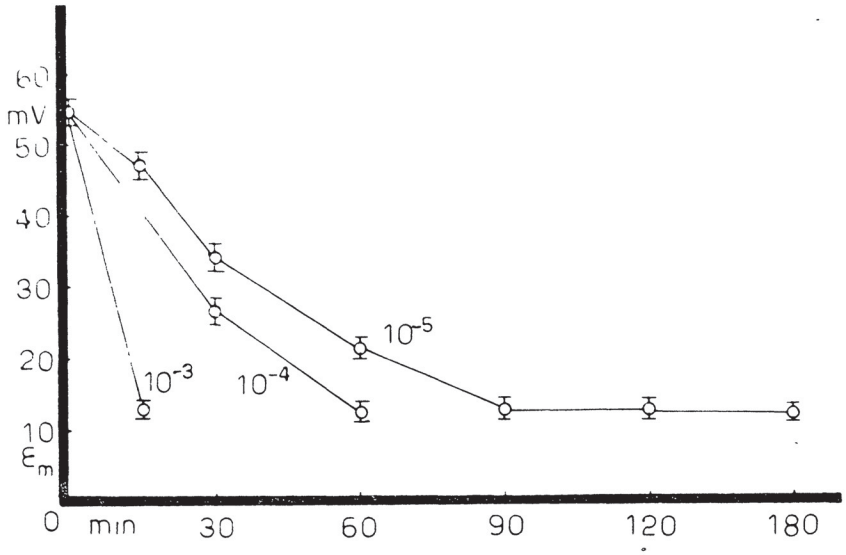


Fig. 13

Efeito do KCN no ε_m

Ordenada, ε_m. Abscissa, o tempo em minutos depois a adição de KCN ao Ringer normal. O número em cada linha indica a concentração de KCN usado em peso/volume.

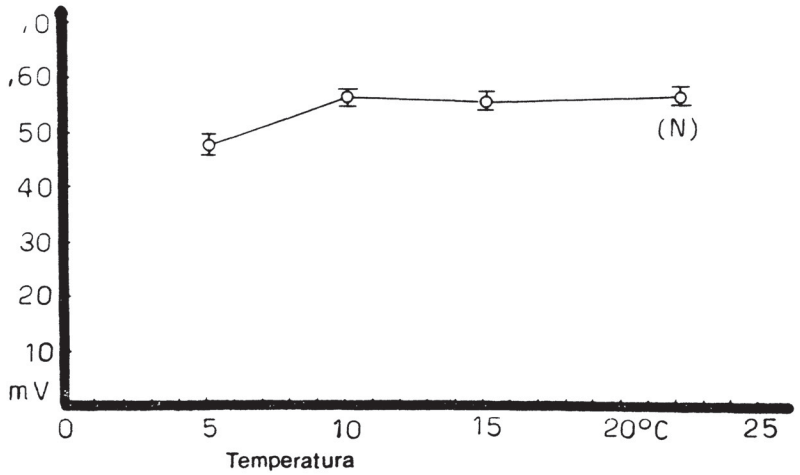


Fig. 14

Efeito de temperatura no ε_m

Ordenada, ε_m. Abscissa, a temperatura em °C. N representa o valor do ε_m em temperatura do ambiente, 22°C.

A variação do potencial da membrana de 11 (onze) preparações devido a corrente aplicada durante a experiência de polarização está traçada no gráfico V-i (Fig. 15). Em Ringer normal (curva N), os dados formam uma curva sigmóide. A resistência específica, R_m, medida pela corrente menor que 5×10^{-9} A em ambas as direções é calculada do segmento de SPVC desta curva como 2113 ± 705 ohm-cm^2 e sua capacitência específica, C_m, nêste segmento é 7.0 ± 4.3 uF/cm^2. Esta resistência

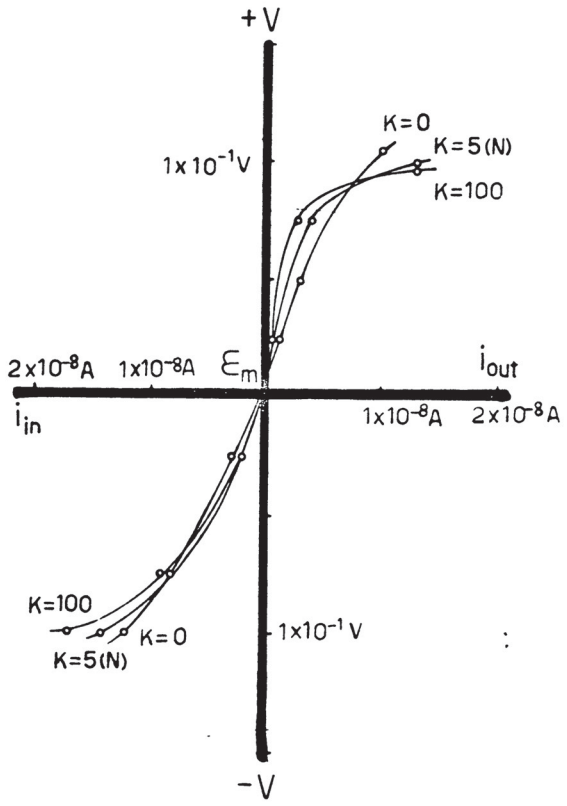


Fig. 15

Gráfico de V-i e o efeito de K na retificação

O ponto de origem é o ε_m. Ordenada, a alteração do potencial da membrana, (ε_m + V) em volta, pela corrente (abscissa) aplicada do aparelho P-1 (ver a Fig. 6) em A (ampere). N, em Ringer normal com 5 mM da $[K]_o$. K = 0, em solução sem K. K = 100, em solução de 100 mM da $[K]_o$. Os pontos representam as médias de 11 medidas, com seus êrros padrões omitidos para maior clareza (para seus valores, ver a Tabela 4).

específica começa diminuir quando a alteração do ε_m pela corrente acrescentada em ambas as direções foi maior que 60 mV. Os valores mínimos da R_m e da C_m nas retificações retardada (DR) e anômala (AR) estão listados na Tabela 4.

O aumento da $[K]_o$ até 100 mM não alterou a forma desta curva significativamente com relação a normal (curva K = 100). Mas a retirada total de K (curva K = 0) diminuiu as retificações retardada e anômala (para os valores, ver a Tabela 4). A mudança da curva V-i nas variações da $[Na]_o$ e $[Mg]_o$ foi insignificante com relação a normal, mas a adição de 5 mM da $[Ca]_o$ no Ringer de K-livre quase recuperou a retificação retardada para o valor apróximadamente ao normal (R_m = 120 ± 36 ohm-cm^2) (Fig. 16). Sua retificação anômala não foi recuperada nesta solução.

Tabela 4

Os valores do parâmetro de cabo na retificação

Experiências / Unidades / Parâmetros	r_m Megohm	R_m ohm-cm^2	τ Msec	c_m µµF	C_m µF/cm^2
Ringer normal (N)					
K = 5 mM					
SPVC	211 ± 11	2113 ± 705	14.8 ± 3.4	70 ± 13	7.0 ± 4.3
DR	1.69 ± 0.39	1.69 ± 0.52			
AR	16.1 ± 5.9	16.1 ± 7.5			
K = 0					
SPVC	130 ± 50	1800 ± 500	10.0 ± 2.8	55.6 ± 18	5.6 ± 1.8
DR	90 ± 30	900 ± 300			
AR	60 ± 17	600 ± 172			
K = 100 mM					
SPVC	400 ± 120	4000 ± 1200	25.5 ± 8.5	63.8 ± 24	6.4 ± 2.4
DR	4 ± ——	40 ± 0.1			
AR	8 ± ——	80 ± 0.2			

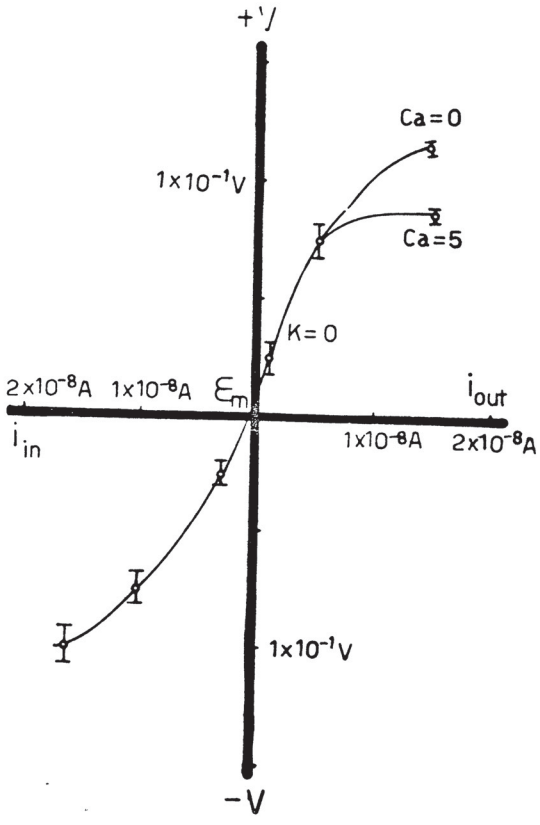


Fig. 16

Efeito do Ca na retificação

A experiência foi feita na solução sem K (K = 0). A curva Ca = 0 foi feita antes da adição da $[Ca]_o$, que corresponde à curva K = 0 na Fig. 15 (outra preparação). A curva Ca = 5 é o efeito de 5 mM da $[Ca]_o$ nesta curva.

Capítulo 5

Discussão

Secção 1

Consideração Técnica

Para comprovar a autenticidade dos resultados, i. e., cada resultado é conseguido na condição desejada dêste projeto, várias considerações técnicas devem ser tomadas. A primeira questão é quantas membranas uma solução deve penetrar para exercer sua função nesta preparação, a célula muscular de Panstrogylus megistus. A célula nervosa (Treherne and Pichon, 1972) e a célula muscular (Ashhurst, 1968) de vários espécies de barata tem duas membranas em lugar de uma (ver a Secção 4, Capítulo 2), portanto, o tempo de equilíbrio para uma dada solução de teste leva duas ou três horas na Periplanta americana (Wareham, Duncan and Bowler, 1974) e uma hora no caso do coleoptero, Tenebrio molitor (Belton and Grundfest, 1962). Esta comparação é melhor demonstrada no efeito de colina. A colina não despolariza a membrana muscular da mariposa, Antherea polyphemus, imediatamente depois da aplicação (Rheuben, 1972) e despolariza a membrana muscular da barata, Periplanta americana, duas horas depois da aplicação (Wareham, Duncan and Bowler, 1974). A despolarização desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, pela colina ocorre em menos que 30 minutos (Fig. 10) igual ao tempo tomado pela membrana muscular da minhoca, Pheretima hawayana (Chang, 1969), que só tem uma membrana. Pode ser considerada que a membrana desta preparação, o músculo de Panstrogylus megistus, não constitui uma barreira para difusão tão significante como a de Tenebrio molitor (coleoptero), Periplanta americana (ortoptero) ou Antherea polyphemus (lepidoptero), mas é semelhante a da minhoca (anelido). Deve ser lembrado que êste tempo de equilíbrio inclui o tempo de distribuição passiva através da membrana e o ajustamento ativo das concentrações pela membrana. Se o último efeito é especialmente importante no inseto, o primeiro efeito deve levar muito menos que 30 minutos nesta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus.

A segunda questão é a homogeniadade da população das células musculares desta preparação, o musculus dorsoventralis de Panstrogylus megistus. Pelo sentido exato, cada célula nervosa ou muscular tem sua função especial em cada orgão. Nunca duas células exercem a mesma função. A definição da homogeniadade, portanto, depende da apreciação dêste trabalho. As células musculares da larva da mariposa, Pseudaletia sequax, podem ser divididas em três grupos distintos pelo valor de seu potencial de repouso (Chang and Sales, 1977) e as células musculares da minhoca, Pheretima hawayana, podem ser divididas em dois grupos pela mesma apreciação (Chang, 1975a). Um exemplo em outro extremo, o potencial de repouso registrado da membrana muscular da larva de Tenebrio molitor (belton and Grundfest, 1962), e de bicho-pau, Carausius morosus (Orchard, 1976), é distribuido em uma curva normal. O potencial de repouso registrado da membrana desta preparação, o musculus dorsoventralis de Panstrogylus megistus, é distribuido em uma curva normal como o de Tenebrio molitor e de Carausius morosus, mas não como o de Pseudaletia sequax. Por esta apreciação, as células musculares desta preparação são consideradas como homogêneas até que uma diferença em outras funções além do potencial de repouso possa ser encontrada.

Secção 2

Composição iônica dos parâmetros de cabo

Os valores dos três parâmetros de cabo desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, em repouso estão dentro das faixas citadas para os poucos casos conhecidos nos insetos. O $\mathcal{E}_m$ registrado desta preparação é semelhante com os na Fig. 6.28 em Huddart (1975), na Fig. 1 em Piek (1975), em Belton and Grundfest (1962), em Orchard and Osborne (1977) e em Patlak (1976). Nenhum dos dados citados acima foi registrado de hemiptero, a que esta preparação pertence. O caso mais próximo taxonômicamente ao desta preparação nêstes dados é Tenebrio molitor, um coleoptero. Os $\mathcal{E}_m$s dos insetos em Fig. 6.28 em Huddart (1975) e Fig. 1 em Piek (1975) podem ser divididos em dois grupos conforme a seu valor e seu carácter do eletrodo do potássio como na Fig. 2 dêste trabalho. Insetos de mesma ordem, como

o ortoptero, foram separados em diferentes grupos por esta classificação. O valor do $\mathcal{E}_m$ desta preparação cabe em mesmo grupo do que de Tenebrio molitor, mas o carácter do eletrodo de potássio desta preparação cabe num grupo diferente do de Tenebrio molitor. A R_m em SPVC desta preparação é da mesma ordem que a dos quatro insetos na Tabela 6.6 em Huddart(1975), menos a da libélula, Aeshna verticalis, e os valores citados em Werman, McCann and Grundfest(1961), em Jan and Jan(1976), em Popowich and Caveny(1977) e em Orchard and Finlayson(1977). A C_m em SPVC desta preparação é pouco mais alta que a constatada nas mesmas fontes, menos a da libélula.

O $\mathcal{E}_m$ desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, é formado pelo $\mathcal{E}_K$, $\mathcal{E}_{Cl}$, e a permeabilidade passiva de Na. É notavel que êste $\mathcal{E}_m$ é formado por um mecanismo de g_K diferente do dos outros insetos. A $[K]_o$ no Ringer para esta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, é mais baixa do que nos outros insetos e está na mesma faixa que para a rã. A $[K]_i$ estimada da Fig. 9 é 122 mM e o $\mathcal{E}_K$ é aproximadamente -80 mV. Êste é uma anomalia entre os casos conhecidos dos insetos porque o $\mathcal{E}_K$ da membrana muscular da barata, Periplanta americana, é menos negativo que o $\mathcal{E}_m$ (Wareham, Duncan and Bowler, 1974; Duncan, Wareham and Bowler, 1976). Só dois terços, ou 42 mV de seu $\mathcal{E}_m$ é formado pelo $\mathcal{E}_K$. O outro terço, ou 18 mV, dêste $\mathcal{E}_m$ é formado por um bomba metabólica, i/g_m (Huddart and Wood, 1966). É impossivel, por êste fato, perceber uma bomba metabólica na formação do $\mathcal{E}_m$ desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus. O efeito dos tampões no $\mathcal{E}_m$ da membrana muscular da barata, Periplanta americana, é exercido através de sua bomba metabólica (Wareham, Duncan and Bowler, 1974; Duncan, Wareham and Bowler, 1976). Os tampões são quase sem efeito nesta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus. A baixa temperatura rebaixou 18 mV no $\mathcal{E}_m$ da barata (Wareham, Duncan and Bowler, 1974), que é exatamente a contribuição da bomba metabólica no $\mathcal{E}_m$. A baixa temperatura rebaixou sòmente 8 mV no $\mathcal{E}_m$ desta preparação. Descontando 5 mV devido a diminuição da mobilidade iônica de 23° C para 5° C, o efeito da baixa temperatura no $\mathcal{E}_m$ desta preparação é muito insignificante. O CN pode diminuir o $\mathcal{E}_m$ desta preparação, a membrana

muscular de Panstrogylus megistus, em uma concentração de um porcento da usada para a membrana muscular de Periplanta americana (Wareham, Duncan and Bowler, 1974; Duncan, Wareham and Bowler, 1976). Isto tambem é uma comprovação que a bomba metabólica nesta preparação tem capacidade muita pequena, se é que existe. A contribuição do $\mathcal{E}_{Cl}$ no $\mathcal{E}_m$ desta preparação (Fig. 11) é quase tanta como a soma de $\mathcal{E}_K$ e $\mathcal{E}_{Na}$. Isto se assemelha aos casos citados nos três insetos (Wood, 1965; Huddart, 1967) e em Ascaris lumbricoides (Del Castillo, De Mello and Morales, 1964a). Portanto, os ions K e Cl são os dois componentes mais importantes na formação do $\mathcal{E}_m$ desta preparação. A contribuição da g_{Na} no $\mathcal{E}_m$ desta preparação é apenas através sua permeabilidade passiva no repouso. A Fig. 9 mostra que sua contribuição consta menos que 10 mV (a distância entre as curvas A e B) e tambem é pouca influida pela baixa temperatura. A variação da R_m desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, tambem depende do ion K (Fig. 15). Quando a $[K]_o$ foi retirada, a R_m não diminuiu mais na retificação retardada, e diminuiu pouco na retificação anômala, durante a polarização. Ca pode substituir o K até algum gráu para restaurar a retificação retardada depois da retirada da $[K]_o$ (Fig. 16). Tem-se esse fato como devido ao mesmo mecanismo de hiperpolarização da membrana muscular das mariposas, Antherea polyphemus (Rheuben, 1972) e Pseudaletia sequax (Chang and Sales, 1977) e do aumento da R_m da mariposa, Antherea polyphemus (Rheuben, 1972) pelo Ca. O efeito de Ca nesta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, é despolarização (Fig. 12). Isto é porque o $\mathcal{E}_m$ e o $\mathcal{E}_K$ estão ligados em direções opostas nesta preparação e nas preparações das mariposas. Quando o $\mathcal{E}_m$ é alterado em direção de $\mathcal{E}_K$ pela polarização, a corrente na membrana desta preparação é em direção para dentro da célula mas a corrente na membrana muscular das mariposas citadas é em direção para fora da célula. Nêste sentido, o efeito do Ca para diminuir a i_K nesta preparação tambem deve ser oposto ao que ocorre nas preparações das mariposas. É notavel que a despolarização de Ca nesta preparação não é sòmente através de sua função de diminuir i_K como explicado. Após a retirada da $[K]_o$, a despolarização pelo Ca permanece mas em gráu reduzido (curva central, Fig. 12). O mecanismo representado

por esta curva ainda não foi verificado. Desde que ambos os Ca e Mg foram encontrados em alta concentrações na hemolinfa de vários espécies de mariposas (Huddart, 1966a, b, c), mas não foram encontrados na hemolinfa de Rhodnius prolixus (Ramsey, 1953), o Ca pode ser considerado como um ion estranho nesta prepração, a membrana muscular de Panstrogylus megistus. Isto deve ser semelhante com os ions alcalino-terrosos estranhos, como Ba e Sr, que despolarizam a membrana muscular do gafanhoto, Romalea microptera (Werman, McCann and Grundfest, 1961).

Secção 3

Excitabilidade

Como foi mencionado na Secção 2 de Capítulo 2, que os neurônios de alguns insetos tem a membrana da quarta categoria em que a membrana não, ou quase não, responde ao estímulo elétrico em laboratório (Pitman, Tweedle and Cohen, 1972; Orchard and Finlayson, 1976; Hengstenberg, 1977). Fora do inseto, esta categoria da membrana foi encontrada no primeiro grupo muscular da minhoca, Pheretima hawayana (Chang, 1975a). O presente trabalho é a primeira vêz que esta categoria da membrana é encontrada no músculo de um inseto. A diferença entre as estruturas desta categoria da membrana e as das outra categorias ainda não foi estudada. Hengstenberg (1977) propoem que a membrana neuronal da mosca, Calliphora erythrocephala, é em uma condição "refratâria", porque esta membrana pode responder ao estímulo elétrico depois que seu $\mathcal{E}_m$ foi alterado por 30 mV pela corrente de menos que 10 nA. Nêste nível, a R_m das membranas da barata, Periplanta americana (Pitman, Tweedle and Cohen, 1972), e do bicho-pau, Carausius morosus (Orchard and Finlayson, 1976) começam diminuir (retificar). É notavel que a R_m desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, não diminui até que seu $\mathcal{E}_m$ foi alterado por mais que 60 mV em ambas as direções. Isto é quase zero potencial na corrente despolarizante e 120 mV na corrente hiperpolarizante. Fenômeno semelhante pode ser encontrado na membrana da célula epidermal da larva de Tenebrio molitor (Popowich and Caveny, 1977), que não é uma membrana excítavel por definição. A Fig. 3 em Popowich and

Caveny (1977) mostra que a R_m desta membrana aumenta linearmente com o $\mathcal{E}_m$ a partir de -60 mV até 0 mV, mas não mostra se a retificação pode ocorrer além desta faixa. Portanto, a falta de excitabilidade desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, não é devida a mesma causa como os três casos dos neurônios dos insetos citados, mas é devida a alta limiar de retificação em seu resistor para ion K embora seu valor em repouso não mostra uma diferença com as outras.

Capítulo 6

Conclusão

Os valores dos três parâmetros de cabo em repouso desta preparação, a membrana muscular de Panstrogylus megistus, estão dentro da faixa dos valores de outras membranas excítaveis. Sòmente uma membrana em redor da célula foi verificada. O $\mathcal{E}_m$ é formado principalmente pelos $\mathcal{E}_K$ e $\mathcal{E}_{Cl}$. A g_{Na} tambem contribui em parte nêste $\mathcal{E}_m$ em repouso. A bomba metabólica contribui uma parte muito insignificante nêste $\mathcal{E}_m$. O Ca, como um ion estranho, despolariza esta membrana por um mecanismo inespecífico e aumenta sua excitabilidade através do seu efeito na g_K mas não até seu limiar de excitação. A R_m, embora tem um valor comparavel ao das outras membranas excítaveis, tem um limiar de retificação muito alto. Êste alto limiar de retificação é atribuido como sendo a causa da baixa excitabilidade desta membrana. A correlação entre a eletrogênese desta membrana e a posição taxonômica dêste animal não foi encontrada.

Capítulo 7

Sumário

1. Os valores dos três parâmetros de cabo da membrana celular do musculus dorsoventralis de Panstrogylus megistus são -55 mV para o $\mathcal{E}_m$, 2 Kohm-cm^2 para a R_m e 7 uF/cm^2 para a C_m.

2. O $\mathcal{E}_m$ foi registrado diretamente pelo microeletrodo convencional. A R_m e a C_m foram medidas pela ponte de Wheatstone pelo método de um único microeletrodo.

3. O valor de R_m diminui só quando o $\mathcal{E}_m$ foi alterado por mais do que 60 mV em ambas as direções.

4. Não há resposta regenerativa no $\mathcal{E}_m$ ao estímulo elétrico intra- ou extracelular, devido ao alto limiar da retificação em sua R_m.

5. O $\mathcal{E}_m$ desta membrana é principalmente formado pelo $\mathcal{E}_K$ e $\mathcal{E}_{Cl}$. O $\mathcal{E}_K$ é -80 mV, mais negativa que o $\mathcal{E}_m$.

6. O $\mathcal{E}_m$ diminui a partir de 10 mM da $[K]_o$ com uma inclinação de 40 mV/10 x $\log[K]_o$.

7. O $\mathcal{E}_m$ aumenta a partir de 20 mM da $[Cl]_o$ com uma inclinação de 35 mV/10 x $\log[Cl]_o$.

8. A g_{Na} de repouso contribui menos que 10 mV no $\mathcal{E}_m$.

9. A contribuição da bomba metabólica verificada pela experiência de CN é menos do que um porcento do que no $\mathcal{E}_m$ da barata.

10. As influências dos tampões e da baixa temperatura no $\mathcal{E}_m$ são desprezíveis.

11. O Ca despolariza a membrana através seu efeito de diminuição da g_K e mais um efeito inespecífico.

12. A retificação retardada desapareceu quando a $[K]_o$ foi retirada mas reapareceu quando 5 mM da $[Ca]_o$ foi adicionada.

13. O Mg não mostra nenhuma influência nos três parâmetros de cabo.

14. Sòmente uma membrana em redor da célula muscular foi verificada pela experiência com a colina.

Summary

1. The three cable parameters of the Panstrogylus megistus dorsoventralis muscle cell membrane have the values of -55 mV for the $\mathcal{E}_m$, 2 Kohm-cm^2 for the R_m and 7 uF/cm^2 for the C_m.

2. The $\mathcal{E}_m$ was directly recorded with conventional microelectrode. The R_m and C_m were measured by the single microelectrode method with a Wheatstone bridge.

3. The R_m value decreased only when the $\mathcal{E}_m$ was displaced for more than 60 mV in both directions.

4. There is no regenerative response in its $\mathcal{E}_m$ to either intra- or extra-

cellular electric stimulus, due to the high rectification threshold in its R_m.

5 The $\mathcal{E}_m$ of this membrane is mainly formed by $\mathcal{E}_K$ and $\mathcal{E}_{Cl}$. The $\mathcal{E}_K$ is -80 mV, more negative than the $\mathcal{E}_m$.

6. The $\mathcal{E}_m$ decreases at 10 mM of $[K]_o$ with a 40 mV/10 x $\log[K]_o$ slope.

7. The $\mathcal{E}_m$ increases at 20 mM of $[Cl]_o$ with a 35 mV/10 x $\log[Cl]_o$ slope.

8. The resting g_{Na} contributes less than 10 mV to the $\mathcal{E}_m$.

9. The contribution of the metabolic pump revealed by the CN experiment is less than one percent of that to the $\mathcal{E}_m$ of the cockroach.

10. The buffer and the low temperature influences on the $\mathcal{E}_m$ are neglegible.

11. The Ca depolarizes the membrane through its effect of decreasing the g_K and an unspecific effect.

12. The delayed rectification disappeared when the $[K]_o$ was withdrawn but reappeared when 5 mM of $[Ca]_o$ was added.

13. Mg does not show any influence on the three cable parameters.

14. Only one membrane surrounding the muscle cell was found by the choline experiment.

Capítulo 8

Referências Bibliograficas

ADRIAN, R. H. Rectification in muscle membrane. Prog. Biophys. Mol. Biol., 19:341-369, 1969.

ARAKI, T., and T. OTANI. Responses of single motoneurones to direct stimulation in toad's spinal cord. J. Neurophysiol., 18:472-486, 1955.

ARMSTRONG, C. M. Interactions of TEA ion derivatives with the potassium channels of giant axons. J. Gen. Physiol., 58:413-437, 1971.

ASHHURST, D. E. The connective tissues of insects. Ann. Rev. Entomol., 13:45-74, 1968.

BELTON, P. and H. GRUNDFEST. Potassium activation and K-spikes in muscle fibers of the mealworm larva(Tenebrio molitor). Am. J. Physiol., 203: 583-594, 1962.

BENNETT, R. R.; P. B. BUCHAN and J. E. TREHERNE. Sodium and lithium movements and axonal function in cockroach nerve cords. J. Exp. Biol., 62:231-241, 1975.

BERNSTEIN, J. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Arch. ges. Physiol., 92:521-562, 1902.

BROOKHART, J. M.; X. MACHNE and E. FADIGA. Patterns of motor neuron discharges in the frog. Arch. Ital. Biol., 97:53-67, 1959.

BULBRING, E. Electrical activity in intestinal smooth muscle. Physiol. Rev., 42:160-178, 1962.

BULBRING, E. and T. TOMITA. Effects of Ca removal on the smooth muscle of the guinea pig taenia coli. J. Physiol., 210:217-232, 1970.

CARNAY, L. D., and I. TASAKI. Ion exchange properties and excitability of the squid giant axon. In: Adelman (Ed.), Biophys. Excit. Memb., van Nostrand Rheinhold., 1971. Pp. 379-422.

CARPENTER, D. O. Ionic mechanisms and models of endogeneous discharge of Aplysia neurones. In: Proc. Neurobiol. Invert., Tihany., 1973, Pp. 35-58.

CARPENTER, D. O., and R. GUNN. The dependence of pacemaker discharge of Aplysia neurons upon Na and Ca. J. Cell. Physiol., 75:121-127, 1970.

CHAGAS, C. Nôva Tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfolojia e o cíclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, ajente etiolójico de nôva entidade morbida do humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 1:159-218, 1909.

CHANG, Y. C. Membrane potential of muscle cells from the earthworm, Pheretima hawayana. Am. J. Physiol., 216:1253-1265, 1969.

CHANG, Y. C. Nota técnica: Teoria e prática da experiência de fixação de voltagem. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 5:263-268, 1972.

CHANG, Y. C. Two groups of resting potential from the earthworm (Pheretima hawayana, R.) longitudinal muscle membrane. Comp. Biochem. Physiol., A51:231-235, 1975a.

CHANG, Y. C. The endplate and graded potentials from the neuromuscular system of the earthworm, Pheretima hawayana, R. Comp. Biochem. Physiol., A51:237-240, 1975b.

CHANG, Y. C. A preliminary investigation on the muscle membrane resting potential of a Hemiptera insect. Ciên. Cult., 29:641-641, 1977.

CHANG, Y. C.; A. O. CRUZ; H. V. CARVALHO and Z. ASSME. MEPP frequency

distribution in rat diaphragm under vitamin E deficiency. Am. J. Physiol., 227:1348-1351, 1974.

CHANG, Y. C., e J. B. SALES. Carácteres de cabo da membrana das células musculares da larva de Spodoptera frugiperda, J. E. Smith (Lepidoptera) medido com um único microeletrodo. Ciên. Cult., 27:346-346, 1975.

CHANG, Y. C., and J. B. SALES. Resting potential of the muscle of a moth larva: Distinct fibre populations. J. Ins. Physiol., 23:159-164, 1977.

COHEN, B.; M. V. L. BENNETT and H. GRUNDFEST. Electrically excitable responses in Raja erinacea eletroplaques. Fed. Proc., 20:339-339, 1961.

COLE, K. S. Impedance of single cells. Tab. Biol., 19:24-27, 1942.

COLE, K. S. Membranes, ions and impulses. Univ. Calif. Press., Berkeley. 1968.

CONNOR, J. A., and C. F. STEVENS. Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage calmp. J. Physiol., 213:1-19, 1971.

CURTIS, H. J., and K. S. COLE. Membrane resting and action potentials from the squid giant axon. J. Cell. Comp. Physiol., 19:135-144, 1942.

DEBELL, J. T.; J. DEL CASTILLO and V. SÁNCHEZ. Electrophysiology of the somatic muscle cells of Ascaris lumbricoides. J. Cell. Comp. Physiol., 62:159-178, 1963.

DEITMER, J. W. Electrical properties of skeletal muscle fibers of the flour moth larva, Ephestia kuehniella. J. Ins. Physiol., 23:33-38, 1977.

DEITMER, J. W., and W. RATHMAYER. Calcium action potentials in larval muscle fibers of moth, Ephestia kuehniella, Z. (Lepidoptera). J. Comp. Physiol., A, 112:123-132, 1976.

DEL CASTILLO, J.; W. C. DE MELLO and T. MORALES. Influence ofsome ions on the membrane potential of Ascaris muscle. J. Gen. Physiol., 48:129-140, 1964a.

DEL CASTILLO, J.; W. C. DE MELLO and T. MORALES. Hyperpolarizing action potentials recorded from the esophagus of Ascaris lumbricoides. Nature, 203:530-530, 1964b.

DODGE, F. A. Ionic permeability changes underlying nerve excitation. In: SHANES (Ed.), Biophys. of Physiol. and Pharm. Actions, AAAS Publ. No. 69, Washington, D. C., 1961. Pp. 119-143.

DUNCAN, C. J.; A. C. WAREHAM and K. BOWLER. The resting potential of the insect muscle membrane. Persp. Exp. Biol., 1:191-198, 1976.

DRAPER, M. H., and S. WEIDMAN. Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. J. Physiol., 116:74-94, 1951.

DUCHATEAU, G.; M. FLORKIN et J. LECLERCQ. Concentrations des bases fixes et types de composition de la base totale de l'haemolymph des insectes. Arch. Intern. Physiol., 61:518-549, 1953.

ECKERT, R., and H. D. LUX. A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neuronal somata of Helix. J. Physiol., 254:129-152, 1976.

ERLANGER, J., and H. S. GASSER. Electrical signs of nerve activity. The Johns Hopkins Press. 1937.

FATT, P., and B. KATZ. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. Physiol., 115:320-370, 1951.

FATT, P., and B. L. GINSBORG. The ionic requirement for the production of action potentials in crustacean muscle fibers. J. Physicl., 142:516-545, 1958.

FREYGANG, W. H., and R. H. ADRIAN. Potassium movement in muscle membrane - Anomalous rectification. In: SHANES (Ed.), Biophys. Physiol. Pharm. Actions. AAAS Publ. No. 69, Washington, D. C., Pp. 245-257, 1961.

FUKUDA, J. Chloride spike: A third type of action potential in tissue-cultured skeletal muscle cells from the chick. Science, 135:76-78, 1974.

GALLIN, E. K., and M. L. WIEDERHOLD. Response of Aplysia statocyst receptor cells to physiologic stimulation. J. Physiol., 266:123-137, 1977.

GEDULDIG, D., and D. JUNGE. Sodium and calcium components of action potentials in the Aplysia giant neurone. J. Physiol., 199:347-365, 1968.

GOLDMAN, D. E. Potential, impedance and rectification in membranes. J. Gen. Physiol., 27:37-60, 1943.

GORMAN, A. L. F., and M. F. MARMOR. Contributions of the sodium pump and ionic gradients to the membrane potential of a molluscan neurone. J. Physiol., 210:897-917, 1970.

GORMAN, A. L. F., and M. F. MARMOR. Long-term effect of ouabain and sodium pump inhibition on a neuronal membrane. J. Physiol., 242:49-60, 1974.

GRUNDFEST, H. Comparative electrobiology of excitable membrane. Adv. Comp. Physiol. Biochem., 2:1-116, 1966.

GRUNDFEST, H. The anomalous spikes of Ascaris esophageal cells. J. Gen. Physiol., 50:1955-1959, 1967.

GRUNDFEST, H. The varieties of excitable membranes. In: Adelman (Ed.), Biophysics and Physiology of Excitable Membranes. V. N. Rheinhold, 1971, Pp. 477-504.

GRUNDFEST, H. Physiology of electrogenic excitable membranes. Nerve system, 1:153-164, 1975.

HAGIWARA, S. Calcium spike. Adv. Biophys., 4:71-102, 1973.

HAGIWARA, S., and K. NAKA. The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular calcium. J. Gen. Physiol., 48:141-162, 1964.

HAGIWARA, S., and S. NAKAJIMA. Difference in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine and Mn. J. Gen. Physiol., 49: 793-806, 1966a.

HAGIWARA, S., and S. NAKAJIMA. Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of the barnacle. J. Gen. Physiol., 49:807-818, 1966b.

HAGIWARA, S., and K. TAKAHASHI. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. J. Gen. Physiol., 50:583-601, 1967.

HAGIWARA, S., and A. WATANABE. Action potential of insect muscle examined with intracellular electrode. Jap. J. Physiol., 4:65-78, 1954.

HIDAKA, T.; Y. ITO; H. KURUYAMA and N. TASHIRO. Effects of various c ions on the resting and active membrane of the somatic muscle of earthworm. J. Exp. Biol., 50:405-415, 1969a.

HIDAKA, T.; Y. ITO; H. KURIYAMA and N. TASHIRO. Neuromuscular transmission in the longitudinal layer of somatic muscle in the earthworm. J. Exp. Biol., 50:417-430, 1969b.

HODGKIN, A. L. The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Rev., 26:339-409, 1951.

HODGKIN, A. L., and A. F. HUXLEY. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol., 117:500-544, 1952.

HODGKIN, A. L; A. F. HUXLEY and B. KATZ. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch. Sci. Physiol., 3:129-150, 1949.

HODGKIN, A. L., and B. KATZ. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol., 108:37-77, 1949.

HODGKIN, A. L., and S. NAKAJIMA. Analysis of the membrane capacity in frog muscle. J. Physiol., 221:121-136, 1972.

HOFFMAN, B. F., and P. F. CRANEFIELD. Electrophysiology of the heart. McGraw-Hill, N. Y., 1960.

HUDDART, H. The effect of potassium ion on resting and action potentials in Lepidopteran muscle. Comp. Biochem. Physiol., 18:131-140, 1966a.

HUDDART, H. The effect of sodium ions on resting and action potentials in skeletal muscle fibres of Bombyx mori (L.). Arch. Intern. Physiol.Biochem., 74:592-602, 1966b.

HUDDART, H. Ionic composition of haemolymph and myoplasm in Lepidoptera in relation to their membrane potentials. Arch. Intern. Physiol. Biochem., 74:603-613, 1966c.

HUDDART, H. The effect of chloride ions on moth skeletal muscle fibres. Comp. Biochem. Physiol., 20:355-359, 1967.

HUDDART, H. Contraction of insect muscle. Exp. Physiol. Biochem., 4:219-288, 1971.

HUDDART, H. Comparative structure and function of muscle. Pergamon Press, London, 1975.

HUDDART, H., and D. W. WOOD. The effect of DNP on the resting potential and ionic content of some insect skeletal muscle fibers. Comp. Biochem. Physiol.,18:681-688, 1966.

HUTTER, C. F., and W. TRAUTWEIN. Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. J. Gen. Physiol., 39:715-733, 1956.

HUXLEY, A. F: Ion movements during nerve activity. Ann. N. Y. Acad. Sci., 81:221-246, 1959.

ITO, Y.; H. KURIYAMA and Y SAKAMOTO. Effects of TEA on the membrane activity of guinea-pig stomach smooth muscle. J. Physiol., 211:445-460, 1970.

ITO, Y.; H. KURIYAMA and N. TASHIRO. Effects of divalent cations on spike generation in the longitudinal somatic muscle of the earthworm. J. Exp. Biol., 52:79-94, 1970.

JAN, L. Y., and Y. N. JAN. Properties of the larval neuromuscular junction in Drosophila melanogaster. J. Physiol., 282:189-214, 1976.

JAMIESON, B. and K. E. LEE. Stephenson's The Oligochaeta. 2nd Edition. Oxford Press. 1976.

KANDEL, E. R., and L. TAUC. Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequence of synaptic transmission. J. Physiol., 183:287-304, 1966.

KEYNES, R. D. The ionic movements during nerve activity. J. Physiol., 114:119-150, 1951.

KOBAYASHI, M. Effects of calcium on electrical activity in smooth muscle cells of cat ureter. Am. J. Physiol., 216:1279-1285, 1969.

KOKETSU, K.; S. NISHI and H. SOEDA. Effects of calcium ions on prolonged action potentials and hyperpolarizing responses. Nature, 200:786-788, 1963.

KUFFLER, S. W. The two skeletal nerve-muscle system in frog. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 220:116-135, 1953.

KURIYAMA, H. The influence of K, Na and Cl on the membrane potential of the smooth muscle of taenia coli. J. Physiol., 166:15-28, 1963.

KURIYAMA, H., and T. TOMITA. The responses of single smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli to intracellularly applied currents. J. Physiol., 178:270-289, 1965.

LARSEN, O. Das thorakale Skelettmuskelsystem der Heteropteren. Lunds Univ. Årsskr., N. F. Avd., 2, 41:1-83, 1945.

LING, G. N., and R. W. GERARD. The normal membrane potential of frog sartorius fibers. J. Cell. Comp. Physiol., 34:382-396, 1949.

LLOYD, D. P. C. Reflex action in relation to pattern and peripheral source of afferent stimulation. J. Neurophysiol. 6:111-120, 1943.

LORENTE DE NÓ, R. A study of nerve physiology. Rockfel. Inst. Med. Res., 131:1-496, 1947. 132:1-548, 1947.

LORKOVIĆ, H. Effect of sodium on voltage-current relationships in rat muscle. Arch. Intern. Physiol. Biochem., 84:939-954, 1976.

LUCO, J. V. Plasticity of neural function in learning and retention. In: Brazier(Ed.), Brain Function. UCLA Press. 1964. Vol. 2, Pp. 135-159.

MCALLISTER, R. E. Computed membrane currents in cardiac Purkinje fibers during voltage clamps. Biophys. J., 9:571-583, 1969.

MCCANN, F. V. Electrophysiology of an insect heart. J. Gen. Physiol., 46:803-821, 1963.

MCCANN, F. V. Unique properties of the moth myocardium. Ann. N. Y. Acad. Sci., 127:84-99, 1965.

MCCANN, F. V. The effects of metabolic inhibitors on the moth heart. Comp. Biochem. Physiol., 20:399-409, 1967.

MCCANN, F. V. Physiology of insect hearts. Ann. Rev. Entomol., 15:173-200, 1970.

MCCANN, F. V., and R. W. REECE. Neuromuscular transmission in insects: The effect of injected chemical agents. Comp. Biochem. Physiol., 22:611-615, 1967.

MALPUS, C. M. Electrical response of muscle fibers of dragonfly larvae in relation to these other insects and crustaceans. J. Ins. Physiol., 14:1285-1301, 1968.

NAGAI, T., and B. E. BROWN. Insect visceral muscle. Electrical potentials and contraction in fibers of the cockroach proctodeum. J. Ins. Physiol., 15:2151-2167, 1969.

NARAHASHI, T. Effects of barium ions on membrane potentials of cockroach giant axons. J. Physiol., 156:389-414, 1961.

NARAHASHI, T. The properties of insect axons. Adv. Insect Physiol., 1:175-256, 1963.

NARAHASHI, T. Dependence of excitability of cockroach giant axons on external divalent cations. Comp. Biochem. Physiol., 19:759-774, 1966.

NARAHASHI, T., and T. YAMASAKI. Mechanism of increase in negative after-potential by decophanum(DDT) in the giant axons of the cockroach. J. Physiol., 152:122-140, 1969.

NOBLE, D. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going(anomalous) rectification. J. Cell. Comp. Physiol., 66:Suppl 2:127-136, 1965.

NOBLE, D. Application of Hodgkin-Huxley equations to excitable tissues. Physiol. Rev., 46:1-50, 1966.

OKAMOTO, H.; K. TAKAHASHI and M. YOSHII. Two components of the calcium currents in the egg cell membrane of the tunicate. J. Physiol., 255:527-561, 1976.

ORCHARD, I. Calcium dependent action potentials in a peripheral neurosecretory cell of the stick insect. J. Comp. Physiol., 112:95-102, 1976.

ORCHARD, I., and L. H. FINLAYSON. Electrically excitable neurosecretory cell bodies in the periphery of the stick insect, Carausius morosus. Experientia, 33:226-228, 1977.

ORCHARD, I., and M. P. OSBORNE. Effects of cations upon action potentials recorded from neurohaemal tissue of stick insect. J. Comp. Physiol., 118: 1-12, 1977.

OSTERHOUT, W. J. V. Injury, recovery and death in relation to conductivity and permeability. Lippincott, Philadelphia. 1922.

PATLAK, J. B. Ionic basis for action potential in flight muscle of fly. J. Comp. Physiol., 107:1-12, 1976.

PIEK, T. Ionic and electrical properties. In: Usherwood(Ed.), Insect muscle. Acad. Press, N. Y. 1975. Pp. 281-336.

PINTO, C. Valor do rostro e antenas na caracterização dos gêneros de Triatomideos, Hemiptera, Reduvidioides. Bol. Biol., 19:45-136, 1931.

PITMAN, R. M. The ionic dependence of action potentials induced by colchicine in an insect motoneuron cell body. J. Physiol., 247:511-520, 1975.

PITMAN, R. M.; C. D. TWEEDLE and M. J. COHEN. Electrical response of insect central neurons: Augmentation by nerve section or colchicine. Science, 178:507-509, 1972.

POPOWICH, J. W., and S. CAVENY. An electrophysiological study of the non-junctional membrane of epidermal cells in Tenebrio molitor. J. Ins. Physiol., 23:253-257, 1977.

PROSSER, C. L. Problems in the comparative physiology of non-striated muscles. In: Wiersma(Ed.). Invertebrate nervous System. Univ. Chicago Press. 1967. Pp. 133-149.

PROSSER, C. L. Smooth muscle. Ann. Rev. Physiol., 36:503-537, 1974.

RAMSEY, J. A. Active transport of potassium by the Malpighian tubules of insects. J. Exp. Biol., 30:358-369, 1953.

REUTER, H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Prog. Biophys. Mol. Biol., 26:3-43, 1973.

RHEUBEN, M. B. The resting potential of moth muscle fibre. J. Physiol., 225:529-554, 1972.

SALES, J. B., and Y. C. CHANG. The membrane resistance and capacitance changes in the Lepidoptera, Pseudaletia sequax, S., larva muscle. Ciên. Cult., 28:392-392, 1976.

SATTELLE, D. B. Electrophysiology of the giant nerve cell bodies of Limnaea stagnalis (L.) (Gastropoda, Pulmonata). J. Exp. Biol., 60:653-671, 1974.

SCHMIDT, P., and W. E. CRILL. A persistent negative resistance in cat lumbar motoneurons. Brain Res., 120:173-178, 1977.

SOMJEN, G. G. Electrophysiology of neuroglia. Ann. Rev. Physiol., 37: 163-190, 1975.

TASAKI, I., and S. HAGIWARA. Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. J. Gen. Physiol., 40:859-885, 1956.

THOMAS, M. V., and A. L. F. GORMAN. Internal calcium changes in a bursting pacemaker neuron measured with arsenazo III. Science, 196:531-533, 1977.

THOMAS, M. V., and J. E. TREHERNE. An eletrophysiological analysis of extra-axonal sodium and potassium concentrations in the central nervous system of the cockroach (Periplanta americana, D.). J. Exp. Biol., 63: 801-811, 1975.

TOIDE, N.; H. KURIYAMA; N. TASHIRO and Y. ITO. Obliquely striated muscle. Physiol. Rev., 55:700-756, 1975.

TRAUTWEIN, W., and D. G. KASSEBAUM. On the mechanism of spontaneous impulse generation in the pacemaker of the heart. J. Gen. Physiol., 45:317-330, 1961.

TREHERNE, J. E., and J. W. L. BEAMONT. The Physiology of the Insect Central nervous System. Academic Press, N. Y., 1965.

TREHERNE, J. E., and Y. PICHON. The insect blood brain barrier. Adv. Ins. Physiol., 9:257-313, 1972.

ТРОШИН, А.С. Проблема Клетоцной Проницаемости. Изд. Ан. СССР. МОСКВА. 1956.

USHERWOOD, P. N. R. Electrochemistry of insect muscle. Adv. Ins. Physiol., 6:205-273, 1969.

WAREHAM, A. C.; C. J. DUNCAN and K. BOWLER. The resting potential of cockroach muscle membrane. Comp. Biochem. Physiol., 48A:765-797, 1974.

WEEVERS, R. G. A Lepidoptera saline: effects of inorganic cation concentrations on sensory, reflex and motor responses in a herbivorous insect. J. Exp. Biol., 44:163-175, 1966.

WERMAN, R.; F. V. MCCANN and H. GRUNDFEST. Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. I. The effects of alkali-earth cations on the neuromuscular system of Romalea microptera. J. Gen. Physiol., 44:979-995, 1961.

WIEDERHOLD, M. L. Rectification in Aplysia statocyst receptor cells. J. Physiol., 266:139-156, 1977.

WILSON, W. A., and H. WACHTEL. Negative resistance characteristic eseential for the maintenance of slow oscillations in bursting neurons. Science, 186:932-934, 1974.

WOOD, D. W. The effects of ions upon neuromuscular transmission in a herbivorous insect. J. Physiol., 128:119-139, 1957.

WOOD, D. W. The sodium and potassium composition of some insect skeletal muscle fibers in relation to their membrane potentials. Comp. Biochem. Physiol., 9:151-159, 1963.

WOOD, D. W. The relationship between chloride ion and the resting potential in the skeletal muscle fibers of the loucust and cockroach. Comp. Biochem. Physiol., 15:303-312, 1965.

WOODBURY, J. W. Biophysics of the cell membrane. In: Ruch and Patton (Eds.), Physiology and Biophysics. 19th Edition. Saunders, Philadelphia. 1965, Pp. 1-72.

YAMAGUCHI, H.; R. A. LOCKSHIN and D. J. WOOWARD. The intersegmental muscles of silkmoths. Ionic components of activity. J. Ins. Physiol., 18:243-258, 1972.

YAMASAKI, R., and T. NARAHASHI. The effects of potassium and sodium ions on the resting and action potentials of the cockroach giant axon. J. Ins. Physiol., 3:146-158, 1959a.

YAMASAKI, T., and T. NARAHASHI. Electrical properties of the cockroach giant axon. J. Ins. Physiol., 3:230-242, 1959b.

ZOLOVICK, A. J.; R. L. NORMAN and M. R. FEDDE. Membrane constants of muscle fibers of rat diaphragm. Am. J. Physiol., 219:654-657, 1970.