

# SÔBRE O METABOLISMO E O EQUIPAMENTO ENZIMÁTICO DO MÚSCULO LONGITUDINAL DE HOLOTHURIA

por Erasmo Garcia Mendes

## PREFÁCIO

*Escolhendo como tema dêste trabalho alguns aspectos do metabolismo e do equipamento enzimático do músculo longitudinal de Holotúria, foi minha intenção abordar, em consonância com a denominação da cadeira a que esta tese é apresentada, um problema de interesse geral (fisiologia da contração do músculo liso) e comparativo. Por outro lado, quiz ater-me a uma das linhas atuais de pesquisa do laboratório a que pertenco, qual seja o estudo do músculo sob os seus múltiplos aspectos. De fato, há cêrca de dois anos, acha-se o pessoal do Departamento de Fisiologia Geral e Animal empenhado na elucidação de uma série de questões relativas ao músculo a qual abrange desde o metabolismo e a farmacologia até a infra-estrutura, estudada ao microscópio eletrônico. Sob êste último ângulo o músculo vem sendo estudado por G. A. Edwards e P. Sawaya, em colaboração com o pessoal da Secção de Virus do Instituto Butantã e do Departamento de Física da Escola Politécnica. Os aspectos metabólicos do músculo dos insetos estão sendo pesquisados por G. A. Edwards e M. D. Pérez González. A farmacologia do músculo longitudinal de holotúria é objeto de investigação de P. Sawaya, que também se ocupa da eletrofisiologia do mesmo. Por razões que serão expostas mais em detalhes na introdução, julguei, pois, oportuno o estudo do metabolismo e do equipamento enzimático dêste músculo, cujos resultados iniciais são aqui relatados.*

*A realização de presente trabalho só se tornou possível graças à cooperação e à boa vontade de apreciável número de pessoas e instituições. Agradecimento especial devo ao Prof. P. Sawaya, diretor do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, que me iniciou na fisiologia e me tem sempre propiciado todo apóio em benefício da minha formação científica. Ao Prof. G. A. Edwards sou também grato pelas fecundas discussões travadas em tórno do problema abordado nesta tese e pelo auxílio prestado na parte histológica. Agradecimentos são necessariamente devidos aos meus colegas de laboratório que sempre se mostraram aten-*

tos às minhas solicitações e, muito particularmente, aos seguintes: ao Dr. Rubens Salomé Pereira e à lic. Dorothy De Felice, sem cuja colaboração dificilmente se teriam levado ao cabo as determinações fotométricas; à Dra. Maria Dolores Pérez-González por eventuais auxílios durante as experiências e aos srs. Dr. Domingos Valente e lic. Chaim N. Grynkrout, por auxílios vários. O técnico do Departamento, sr. Conrado Bizarro, na confecção de material para manutenção dos animais nos aquários e de instrumentos indispensáveis às experiências ou nas excursões visando coletas, foi de exemplar dedicação. Nas referidas excursões fui ainda particularmente ajudado por um entusiasta grupo de alunos do curso de especialização e do fundamental que, não raro, enfrentaram mar hostil, a fim de retirar de entre as rochas as holotúrias. Destaco muito especialmente os nomes dos srs. L. R. Tommasi, G. Gaudie Ley, L. D. Vizzoto, R. A. Antunes e C. A. Mourão. O primeiro contribuiu ainda grandemente na determinação da espécie coletada e a segunda foi valiosa auxiliar no decurso das experiências. Ainda outras pessoas e instituições se tornaram credoras do meu agradecimento. A Fundação Rockefeller e o Laboratório de Biologia Marinha de S. Sebastião, na pessoa do Prof. P. Sawaya, pelo empréstimo da caminhonete utilizada nas excursões. O Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da U.S.P., nas pessoas do Prof. L.C.U. Junqueira (diretor), Dr. J. Ferreira Fernandes (assistente) e lic. B. Beiguelman (estagiário) pela cessão de drogas indispensáveis. O Dr. Isaias Raw, do Departamento de Química Fisiológica da mesma Faculdade, igualmente pelo fornecimento de drogas. O Aquário Municipal de Santos, na pessoa do seu diretor, sr. Calimério de Carvalho, pela hospitalidade dispensada em tôdas as ocasiões. O pessoal do Posto de Salvamento em frente à Ilha Urubuqueçaba (Santos) pela atitude compreensiva e colaboradora. A srta. Marina Hirth, pela cuidadosa datilografia dos originais. E, "last but not least", a minha espôsa, dona Maria Aparecida Petrechen Mendes, pelo constante incentivo e pelo clima de que me soube cercar durante a realização dêste trabalho.

## ÍNDICE

Prefácio .....	123
Introdução .....	127
O material e os métodos .....	141
a. A espécie, sua coleta e manutenção no laboratório .....	141
b. Histologia do músculo longitudinal .....	144
c. Os métodos utilizados .....	145
Parte Experimental .....	148
A. Sôbre o metabolismo do músculo longitudinal .....	148
a. Consumo de oxigênio e influência da composição iônica e do pH do meio, da tensão de oxigênio e outros fatores .....	148
b. Efeito da adição de substrato: influência da glicose e do piruvato sôbre o consumo de oxigênio .....	156
c. Ação de inibidor (NaF) sôbre o consumo de oxigênio .....	160
d. Glicóse anaeróbica normal e sob a influência de inibidores .....	161
e. O quociente respiratório do músculo longitudinal .....	165
B. Sôbre o equipamento enzimático do músculo longitudinal .....	167
a. A atividade citrocromoxidásica .....	167
b. A atividade deshidrogenásica .....	171
c. A atividade adenosintrifosfatásica .....	176
Discussão .....	178
Sumário .....	186
Summary .....	187
Bibliografia .....	188



## INTRODUÇÃO

A capacidade de efetuar movimento, tal como a de conduzir um particular estado de excitação, é, provavelmente, inerente a toda célula viva. No movimento e na condutividade reside a própria essência dos fenômenos vitais (SZENT GYOERGI 1947, p. 2; LOVATT EVANS 1952, p. 105). O movimento de partes do corpo ou a locomoção (Ortsbewegung) podem ser vistos até nos animais considerados como inferiores, sendo notório que a ameba efetua ambos. O movimento é uma das condições para a sobrevivência. A habilidade de arranjar alimento e de escapar dos predadores é, sabidamente, limitada pelo tempo de reação dos efetadores do movimento. Igualmente dependentes, ou conseqüentes, da capacidade de realizar movimentos são, em muitos animais, as funções de digestão, respiração, circulação, excreção e reprodução.

É comum afirmar-se que, nos animais ditos superiores, existe um tecido especialmente diferenciado, em que o poder de movimento é particularmente desenvolvido (LOVATT EVANS 1952, p. 105, p. ex.) Esse tecido é o muscular que, nos mencionados animais, pode ocorrer sob as 3 conhecidas formas: estriado, liso e cardíaco. Os efetadores do movimento rápido, os músculos estriados, respondem às excitações recebidas *via nervo*, de um modo geral, portanto, estão submetidos à vontade e se denominam, por isso, voluntários. Tecido muscular liso, nos animais tidos como superiores, participa, em geral, da constituição das paredes das vísceras, vasos sanguíneos, etc. e, pela sua lenta atividade, serve para manter regular o fluxo do conteúdo desses órgãos. O cardíaco, pelas propriedades e pela estrutura, é intermediário entre os dois primeiros. Músculos lisos e cardíaco podem, e normalmente o fazem, entrar em atividade independentemente de nervos, embora estes últimos possam alterar-lhes o ritmo. São, pois, neuro-regulados apenas, em oposição ao músculo estriado, cuja ativação é, na taxa e na potência, subordinada ao sistema nervoso. É possível, todavia, induzir atividade espontânea em músculo estriado, sob certas condições, como seja a imersão em solução de NaCl ou de agentes precipitantes do cálcio, tais como o citrato. O estudo da ação de ions e de drogas sobre os vários tipos de músculos nos vários *phyla*, bem como das propriedades fisiológicas dos elementos musculares no decurso do desenvolvimento, permite concluir que os músculos, em geral, possuem espontaneidade inerente de movimento, a qual, no adulto, raramente se manifesta, de vez que

usualmente os "pace-makers" nervosos assumem gradualmente o controle (PROSSER 1952, pp. 605-607).

Nas três variedades de tecido muscular, os movimentos se efetuam como resultado de *contração* das unidades celulares fundamentais, as fibras musculares, geralmente de forma alongada. O mecanismo celular da contração, e subsequente *relaxamento*, reside em certas proteínas fibrosas (FENN 1945; ASTBURY 1947; SZENT GYOERGYI 1947) dispostas ao longo de particulares formações citoplasmáticas das fibras musculares, as miofibrilas. Estas, nos músculos estriados, exibem características estriações transversais. Ainda se mantém acesa a controvérsia em torno da questão de se atribuir ou não às estriações transversais o mérito da maior rapidez de contração dos músculos estriados. Militam em favor da hipótese inúmeros casos, entre os quais se destaca o dos insetos, onde se pode estabelecer nítida correlação entre velocidade de contração e densidade das estrias. Opõem-se a ela a disposição das proteínas contrateis em muitos animais ao longo de toda a miofibrila e o fato de ficarem intatas as estriações após a extração da miosina, a principal proteína contrátil (SZENT GYOERGYI 1947). Hipótese conciliadora é a que confere ao material das estriações papel importante no metabolismo das proteínas contrateis (PROSSER 1952, p. 578).

Do ponto de vista filogenético, é difícil afirmar que o tecido muscular estriado, tal como se apresenta nos músculos rápidos dos vertebrados, constitua grão superior no processo evolutivo. Ou, mesmo, que o tecido muscular, de um modo geral, seja uma peculiaridade dos organismos superiores. Fibras contrateis existem nos Protozoários, como p. exemplo nos mionemas de *Vorticela* e *Stentor*. Nos Espongiários, faltam células especializadas para a contração, ocluindo-se os oscula por obra da atividade de células epidérmicas contrateis. Em todos os demais *phyla* dos metazoários, porém, existe o tecido especialmente diferenciado para a execução de movimento, cujos componentes se apresentam em arranjos variados e, por vezes, bizarros, de tal modo a possibilitar a conclusão de que o padrão celular do músculo, mesmo o do estriado dos vertebrados, teria surgido muito cedo no decurso da evolução. Assim nos Celenterados, nas próprias células mioepiteliais, o componente muscular pode apresentar-se com as características da fibra muscular lisa nas actíneas e as da fibra muscular estriada nas medusas, numa curiosa correlação com o grau de atividade ambos os animais (HERTWIG 1931, p. 82). Fibras musculares uninucleadas afibriladas encontram-se entre os platemintes e as holotúrias (PLATE 1922, p. 115; OLSON 1938). Em anelídeos, moluscos, tunicados e outros invertebrados existem músculos não estriados e estriados e, até frequentemente, músculos de caráter misto em que fibras de cada tipo podem ocorrer lado a lado ou o músculo é predominantemente estriado ou liso. O caso mais notável desses músculos mistos é o do coração de *Ciona*, estudado por BOZLER (1928).

A musculatura lisa dos invertebrados, via de regra, distingue-se pela maior rapidez de contração relativamente à dos vertebrados, além de diferir fundamentalmente desta última do ponto de vista histológico; possui fibras longas geralmente afibriladas em oposição às curtas e fibriladas dos vertebrados. Finalmente, quanto à riqueza e à complicação de estriação transversal, as fibras dos músculos estriados dos vertebrados colocar-se-iam em plano inferior às dos artropodes, em especial crustáceos e insetos. Essa concepção, todavia, com a microscopia eletrônica, tem sido essencialmente modificada. (Vide EDWARDS, SANTOS, SANTOS e SAWAYA 1954).

O mecanismo celular da contração muscular, foi dito, reside em certas proteínas fibrosas, alinhadas ao longo das miofibrilas, capazes de dobramento reversível. A hipótese, confirmada experimentalmente no caso do músculo, segundo a qual o mecanismo de ação de elementos contráteis em geral se funda no encurtamento reversível de protinas fibrosas, está em grande voga em fisiologia e tem contribuído bastante à elucidação de outras manifestações de movimento dos seres vivos. Assim, no movimento ameboide, a contratilidade do gel provavelmente se deve a proteínas filiformes ou cadeias polipeptídicas, que se encurtam segundo o grau de hidratação. Esses elementos contráteis do plasmagel assemelhar-se-iam às proteínas fibrosas dos músculos, com a diferença apenas de que seriam menos regularmente organizados, disso resultando não apresentarem de ordinário birefrangência. Todavia, os axópodos dos Heliozoários e Radiolários, que são muito contráteis, exibem-n'a (SCHMIDT 1937) e bem poderiam representar o estado intermediário de organização entre o gel fracamente contrátil dos Rizopodes e Mixomicetos e o músculo verdadeiro. O movimento ciliar, igualmente, pode ser interpretado em termos de moléculas filiformes protéicas reversivelmente encurtáveis. Métodos tais como a transmissão de luz polarizada, difração de raios X e micrografia eletrônica indicam ser a organização molecular de um cílio surpreendentemente semelhante à das fibrilas musculares. Em nenhum desses casos, porém, se conseguiu, até agora, dar à hipótese da proteína fibrosa o forte apóio experimental que ela já obteve no caso do músculo, embora, grande progresso tenha sido conseguido nêstes últimos anos (SEIFRIZ 1952). Isso, evidentemente, se deve às dificuldades inegavelmente maiores de ataque experimental. De fato, as atividades ameboide e ciliar manifestam-se em organismos unicelulares ou em epitélios dos quais só a duras penas se conseguirá extrair em quantidade suficiente o material contrátil. No caso do músculo, pelo contrário, de há muito pôde êle ser extraído. Por outro lado, é o movimento decorrente da atividade muscular aquele que, por suas proporções e consequências, mais cedo despertou a atenção dos estudiosos. Todos esses fatores fizeram com que se adiantassem extraordinária-

riamente, sobretudo nas duas últimas décadas, os nossos conhecimentos sôbre a natureza íntima da contração muscular.

A fibrila muscular contrátil, diz SZENT GYOERGYI (1947, p. 1) na introdução de seu já famoso livro, em que compara o bioquímico à criança, porque quando encontra um brinquedo o desmonta e raramente cumpre a promessa de monta-lo de novo, é "the loveliest toy ever provided by nature for the biochemist". Não admira, pois, continua, que famosos cientistas do século passado já tivessem tentado decompô-la. Nessa tarefa, DANILEWSKI (1881 Apud Szent Györgyi 1947), HALLIBURTON (1887 Apud Szent Györgyi 1947) e v. FÜRTH (1895 Apud Szent Györgyi 1947) foram relativamente bem sucedidos: parte considerável da fibrila pôde ser dissolvida em soluções salinas concentradas e uma proteína globulinoide, rapidamente precipitável à diluição, foi obtida, a que se denominou "miosina" para distinguí-la do "miogênio", soluvel n'água. O assunto foi retomado em bases modernas de estudo, na terceira década dêste século, por V. MURALT & EDSALL (1930) e WEBER (1934). Em 1939, ENGELHARDT & LJUBIMOWA evidenciaram as relações entre a miosina e o importantíssimo trifosfato de adenosina (ATP, do inglês: adenosine triphosphate). A partir de 1940, SZENT GYOERGYI e seu grupo, primeiramente em Szeged (Hungria) e posteriormente no "Institute for Muscle Research" no Marine Biological Laboratory de Woods Hole (Estados Unidos) se entregaram à notável série de trabalhos sôbre a bioquímica da miofibrila, de que resultaram os grandes progressos obtidos nos últimos tempos no conhecimento da natureza íntima da contração muscular. Como resultado de suas investigações, demonstrou-se ser a "miosina" uma mistura indefinida de 2 proteínas que se unem para formar um composto. As propriedades dos componentes puros são bem diferentes das da própria "miosina", sendo, por exemplo, solúveis n'água, em oposição à "miosina" caracteristicamente nela insolúvel. Miosina ficou denominação dada a um dos componentes da velha "miosina", ao passo que ao outro, isolado por STRAUB (1942 Apud SZENT GYOERGYI 1947), se chamou actina. Nenhuma dessas duas proteínas é, isoladamente, contrátil; adquirem, todavia, essa notável propriedade quando juntadas em relações apropriadas para formar o complexo "actomiosina". A adição de ATP e os constituintes iônicos da fibra muscular à actomiosina opera, *in vitro*, a sua contração. Provocar essa contração, confessa SZENT GYOERGYI foi um dos maiores acontecimentos de sua carreira científica. Movimento, um dos mais básicos fenômenos biológicos, sempre considerado como um índice da vida, pôde finalmente ser produzido *in vitro* com constituintes da célula. A experiência deixava bem claro o papel importantíssimo do APT no encurtamento do complexo actomiosínico. Isoladamente, nem actina, nem miosina e nem o próprio complexo mostram sinais de contratilidade. O

que faz este último funcionar é o ATP, considerado por SZENT GYOERGYI (1949) como a substância-mestra do músculo.

É o ATP um nucleótido, solúvel em água, de peso molecular relativamente pequeno. Em 1927, EMBDEN e ZIMMERMANN descreveram o adenosinfosfato (AMP), composto formado da condensação de adenina mais ribose mais ácido fosfórico. Em 1932, MEYERHOF & LOHMANN descobriram que, no músculo, a adenosina não se liga a um, mas a 3 grupos fosfóricos, ou seja, apresenta-se como ATP. A maneira pela qual esses 2 radicais fosfóricos extras se ligam ao adenosinfosfato, ou seja, em ligação pirofosfórica (radical fosfórico ligado a átomo de fósforo) é extremamente importante, pois sua energia livre de hidrólise é estimada em 10.000 a 11.000 calorías (KALCKAR 1941, LIPMANN 1941), as quais, como indicaram MEYERHOF & LOHMANN (1932), constituem a única fonte imediata de energia da contração muscular. Segundo KALCKAR (1. c.) e LIPMANN (1. c.), provavelmente toda a energia libertada nas oxidações biológicas armazena-se em compostos fosforilados e passa de composto a composto, nos vários ciclos catabólicos, com a transferência do radical. Além de ser usada na contração muscular, essa energia pode igualmente ser consumida em outras atividades celulares, tais como ciclose, sínteses, secreção, acumulação de ions, transmissão de estados excitatórios, etc. Além de ATP dispõe a célula ainda de outros compostos com ligações fosfóricas ricas em energia, por exemplo, o difosfato de adenosina (ADP, de: "adenosine diphosphate") e os importantes "fosfágenos" descobertos em 1927 por FISKE & SUBBAROW e EGGLETON & EGGLETON, independentemente. São estes últimos derivados fosforilados da creatina (vertebrados) ou da arginina (invertebrados) em que o radical fosfórico se liga a um átomo de N, o que confere à ligação uma energia livre de hidrólise igual à da ligação pirofosfórica do ATP ou do ADP. Não se poderia ainda deixar de mencionar uma terceira possibilidade de ligação de radical fosfórico a compostos orgânicos na célula, igualmente com uma energia livre de hidrólise avaliada em 10.000 calorías: trata-se da ligação a grupos carboxílicos, tal como se observa em vários compostos que surgem no ciclo degradativo dos açúcares ou no chamado ciclo de Krebs. \*

A maneira pela qual o ATP faz funcionar a actomiosina constitui o problema magno da contração muscular. Este, em última análise, envolve um problema fundamental de biologia, qual seja o do modo pelo qual a célula faz uso da energia produzida nas oxidações nas suas múltiplas atividades. Apesar dos inúmeros progressos realizados, sobretudo no setor da atividade muscular, essa conjugação energética (energetic coupling) continua, em todos os casos, um mistério. Seria

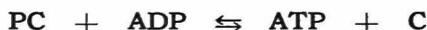
\* Há, na verdade, uma 4a. possibilidade, na ligação  $S-OPO_3H$  do acetilcoenzima A pirofosfato (Lipmann 1946).

ultrapassar de muito os limites desta introdução, que visa tão somente a situação geral de um problema abordado, numa de suas facetas, neste trabalho, expôr na mesma com minúcias o relato do estado atual dos conhecimentos sobre a conversão de energia química em energia mecânica no músculo. Ele poderá ser encontrado nas sucessivas publicações de SZENT GYOERGYI (1947, 1949 e 1952) e em português, na recente revisão do assunto feita por EDWARDS (1954). Todavia, é necessário focalizar alguns pontos indispensáveis à manutenção da continuidade do encadeamento de fatos que levará finalmente à discussão dos aspectos puramente metabólicos e enzimáticos da contração muscular. Parece não haver mais dúvidas quanto ao rompimento de uma ligação fosfórica do ATP durante o ciclo completo de contração e relaxamento da fibra muscular. Não há certeza, apenas, quanto a em que fase do ciclo isso se dá. De qualquer modo, o processo se efetua mediante o gasto da energia obtida da degradação do ATP em ADP. A se dar crédito às pesquisas de ENGELHARDT & LJUBIMOWA (1. c.), confirmadas por SZENT GYOERGYI & BANGA (1941, apud SZENT GYOERGYI 1947), seria a própria miosina (ou, para empregar uma linguagem mais atual, a actomiosina) que se encarregaria da hidrólise da ligação fosfórica do ATP, comportando-se, assim, como uma verdadeira enzima. Estariamos, pois, segundo a imagem de ENGELHARDT, diante de uma máquina ideal, cujo cujo pistão (a miosina) possui os próprios poderes de ignição. Parece também estabelecido com alguma segurança que a integridade do ATP é necessária à estabilização da actina na forma fibrosa (F-actina), em que se torna possível a sua união com a miosina para formar o complexo. A actomiosina resultante, foi visto, reage *in vitro* à adição de ATP com a contração e essa reatividade é altamente dependente da concentração salina, principalmente de KCl. A verificação deste último fato é importantíssima e poderá fornecer a chave para a compreensão de dois fenômenos cujo estudo, de um modo geral, se faz isoladamente, mas que são um necessariamente a consequência do outro, ou seja, a excitação da fibra muscular e a sua consequente contração. Encontra-se em SZENT- GYOERGYI (1949) interessante tentativa de interpretação dos dois fenômenos, coligando-os: Na fibra em repouso, a concentração iônica seria tal que a actomiosina e o ATP formam um complexo estável, embora, por assim dizer, "no fio da navalha" (on the razor's edge). Qualquer alteração de meio interno (p. ex. mudança de pH) poderá criar condições para que o complexo se desfaça (contração), passando a actina à forma globular (G-actina) e enrugando-se o fio de miosina. A reconstrução (relaxamento) da miosina far-se-ia então à custa do ATP. No organismo, essa mudança de condições internas poderia ser causada pela chegada da onda de excitação que, sabidamente, altera a permeabilidade da membrana, dando origem a alterações iônicas e de pH. Essa hipótese de SZENT GYOERGYI, admite, é óbvio, que o gasto da energia libe-

rada pela hidrólise do ATP é empregado no relaxamento, e se opõe à concepção de HILL (1938, 1950) que considera desdobrar-se o ATP na fase de contração. De qualquer maneira, como resultado na atividade muscular, ATP fica reduzido a ADP. Normalmente, como se verá, o organismo dispõe de meios para ressintetizar o ATP, ligando novo radical fosfórico ao ADP. Pode, porém, acontecer que êsse mecanismo de ressíntese não encontre condições para se realizar, caso em que o organismo lança mão de duas moléculas de ADP para a ressíntese do ATP, reduzindo-se, então, uma delas necessariamente a AMP. Êsse mecanismo, todavia, não é tolerado por muito tempo, pois que, além de ser limitado o estoque de ADP, o AMP que se forma se converte em ácido inosínico, que é tóxico. Enquanto fôr possível, porém, a ressíntese do ATP, a fibra poderá contrair-se novamente, pois que na ligação pirofosfórica do ATP reside a única fonte imediata de energia da contração muscular. Músculo sem ATP, não só é inativo, mas rijo e inelástico; músculo em *rigor mortis* é, na verdade, músculo sem ATP (SZENT GYÖERGYI 1949).

O modo pelo qual, normalmente, se processa a ressíntese do ATP constitui um dos capítulos mais intrincados da fisiologia, o qual envolve necessariamente a discussão do catabolismo dos carboidratos. A correlação entre contração muscular e queima de açúcares é um fato de há muito estabelecido. Primeiramente, acreditou-se que a contração muscular se produzisse à custa de energia libertada de uma hipotética substância, o "inogênio", de cuja rápida decomposição resultariam  $\text{CO}_2$  e ácido láctico. Posteriormente, demonstrou-se que, na contração, sobretudo na ausência de oxigênio, se forma ácido láctico, que à adição de oxigênio, desaparece com formação de  $\text{CO}_2$  (FLETCHER & HOPKINS 1907, apud L. EVANS 1952). Coube a MEYERHOF (1930) evidenciar que a formação de ácido láctico se dá a partir de glicogênio ou glicose. Na base desses resultados chegou-se a pensar que a reação inicial na contração muscular fosse a conversão de glicogênio em ácido láctico (glicólise), com o corolário de que a presença de ácido láctico no músculo, de algum modo, causava a sua contração e, em quantidade suficiente, levava-o ao rigor. LUNDSGAARD (1930), todavia, pelo engenhoso emprêgo de um inibidor da glicólise (ácido monoiodoacético), demonstrou que o músculo se contrai mesmo sem formação de ácido láctico. A fadiga, porém, sobrevem mais rapidamente, sendo impossível o recôbro durante o descanso em oxigênio, como acontece com os músculos normais fatigados, e o músculo logo passa ao rigor. A análise do teor de ácido láctico, então, revela que não houve aumento sobre o valor das condições iniciais, embora o glicogênio tenha desaparecido, como nos músculos não envenenados com ácido monoiodoacético. Revela ainda a análise que a fosfocreatina, no músculo envenenado levado à fadiga, decompõe-se, tal como acontece normalmente, mas, ao contrário do que sucede no músculo não envenenado, não se ressintetiza. Constitui, mesmo, a fosfocreatina o fator limi-

tante do tempo em que o músculo envenenado se mantém respondendo à excitação, até chegar à fadiga. Finalmente, o músculo envenenado apresenta-se, ao cabo de uma série de estimulações, rico em hexoses mono e difosfatadas. Os resultados de LUNDSGAARD foram, naturalmente, de enorme importância na modificação do ponto de vista primitivo sobre a causa da contração muscular. Os fosfágenos tinham sido descobertos em 1927. Em 1932, MEYERHOF e LOHMANN demonstraram a presença de ATP no músculo. Paralelamente, desvendaram-se os vários passos da glicolise, ou seja, do catabolismo do glicogênio até ácido láctico. A glicolise anaeróbica se revelou um sistema complexo de reações em que se formam ésteres fosforilados sob controle enzimático com deslocamentos de energia de níveis relativamente altos por meio de ligações fosfóricas de alta energia, e onde em vários estágios ADP figurava como *acceptor* de radical fosfórico. KEILIN (1925) descobrira o citocromo. LOHMANN (1934) demonstrara que a fosfocreatina (PC), no músculo, está em equilíbrio com o ATP através da reação reversível:



Tornou-se, assim, possível correlacionar os vários dados experimentais, tendo-se em vista uma explicação do mecanismo de ressíntese do ATP, bem como interpretar claramente a experiência de LUNDSGAARD. Com relação a esta última ficou patente que o envenenamento com ácido monoiodoacético permitia ainda uma incipiente glicólise, como provavam o gasto de glicogênio e o acúmulo de hexoses mono e difosfatadas, exatamente os primeiros produtos do catabolismo glicogênico. Não eram atingidos, todavia, aqueles estágios de deslocamento de energia, em que normalmente se torna possível a recuperação, por parte do músculo, sob a forma de ressíntese de ATP, da energia gasta na contração. A reconstrução do ATP, portanto, passava a ser feita à custa do deslocamento do equilíbrio da reação de LOHMANN no sentido apropriado, ou seja, à custa de PC, com a conseqüente perda irreparável desta. Reciprocamente, reforçou-se a conclusão de que, em condições normais, no músculo que se contrai, ATP é reduzido a ADP e reconduzido à forma original à custa do processo glicolítico e se impôs a de que a fosfocreatina, normalmente, tem um papel puramente de reserva. No músculo, cujo estoque de glicogênio se tenha exgotado, porém, essa reserva pode ser atacada, tal como no caso do músculo envenenado. Basta todavia, que se propicie ao músculo novo suprimento de glicogênio, para que a glicólise se reinicie, ATP passe a ser ressintetizado e acumulado e o equilíbrio de LOHMANN se desloque no sentido da fosfocreatina, cujo nível quantitativo, então, se restabelece.

Elucidado, assim, o mecanismo de ressíntese do ATP e afastada definitivamente a hipótese de que o ácido láctico é um concomitante essen-

cial da contração, faltava ainda, para completar o quadro, a explicação de como a hidrólise do ATP na contração pode desencadear o processo glicolítico necessário à sua reconstrução. Essa explicação foi satisfatoriamente obtida com a verificação de que importante passagem da glicólise, precisamente aquela em que a última das hexoses monofosfatadas resultantes da fosforólise inicial do glicogênio se converte em hexose difosfatada, se aproveita do radical fosfórico oriundo da hidrólise do ATP. Essa reação constitui um verdadeiro escorvamento ("priming reaction") da glicólise, se se tiver em mira que será precisamente a síntese do ATP a beneficiada nos passos futuros do processo glicolítico. De fato, somente durante a glicose anaeróbica há possibilidade de um ganho líquido de três ligações pirofosfóricas, para não se falar das fases ulteriores (aeróbicas) do catabolismo glicogênico, quando surgem condições para o restabelecimento de cerca 36 ligações do mesmo tipo.

São, pois, como se viu, realmente muito estreitas as relações entre a atividade muscular e o catabolismo do glicogênio, não tendo sido, mesmo, por outras razões que a degradação geral dos açúcares foi em boa parte estudada e elucidada à custa de material muscular. No músculo, o catabolismo do glicogênio se inicia, como já mencionado, por uma fosforólise desse polisacarídeo de que resultam sucessivamente três hexoses monofosfatadas e, a seguir, uma hexose difosfatada. Esta última cinde-se em dois compostos de três carbonos que dão origem a uma série de trioses fosfatadas, de que resulta, finalmente, o ácido pirúvico. Todas essas passagens são possíveis em condições estritamente anaeróbicas e cada uma delas é reversível e controlada por uma enzima específica. Em condições ideais de oxigenação, a degradação ulterior do glicogênio prossegue a partir do ácido pirúvico, sem formação de ácido láctico. As condições ideais, todavia, não existem e, assim, devido à deficiência de suprimento de oxigênio, sempre se forma algum ácido láctico a partir de ácido pirúvico, o que deu margem à crença de que o ácido láctico era o ponto final da fase anaeróbica da degradação do glicogênio. Esse ácido láctico, na presença de suficiente suprimento de oxigênio, se oxida em parte (1/5) e em parte se reconverteria em glicogênio (4/5). Considera-se, porém, atualmente, que o ácido pirúvico, e não o láctico, é a encruzilhada do metabolismo dos carboidratos. Na ausência de oxigênio, viu-se, ácido pirúvico é reduzido a láctico, que, segundo CORI & CORI (apud BALDWIN 1952, p. 407) se difunde e é levado pela corrente sanguínea ao fígado, onde é oxidado de novo a pirúvico e, daí, por uma glicólise às avessas, reconvertido em glicogênio. Na presença de oxigênio, ácido pirúvico é completamente oxidado a  $\text{CO}_2$  e água, através de uma interessante série de reações reversíveis intermediárias (ciclo de SZENT GYOERGYI — KREBS) controlada cada uma por uma enzima específica. Esta, em cinco passagens, é uma desidrogenase que entrega os 2 H subtraídos ao substrato, por meio do sistema citocromo-citocro-

xidase, ao oxigênio. Condição prévia para a entrada do ácido pirúvico no ciclo de SZENT GYOERGYI — KREBS é a sua descarboxilação oxidativa e conversão naquilo que se designa por “acetato ativo”, hoje, o acetil-coenzima A (LIPMANN 1946). Há razão para crer que a degradação dos ácidos gordurosos também culmina na produção de ácido acético em alguma forma altamente reativa, que então, entraria no ciclo de SZENT GYORGYI - KREBS. Assim se explicariam a conversão recíproca de gorduras e carboidratos no organismo e a completa oxidação das primeiras e seus metabolitos intermediários. Esse notável ciclo também propicia um elo entre o metabolismo dos carboidratos e o das proteínas. Por exemplo, os componentes do ciclo tais como ácidos pirúvico, oxalacético e alfacetoglutárico, por simples aminação ou transaminação, se converteriam reversivelmente em alanina, ácido aspartico e ácido glutâmico.

\*

Finda aquí o esboço, que julguei conveniente para preâmbulo do presente trabalho, do estado mais ou menos atual do problema da contração muscular em seus múltiplos aspectos. O que se resumiu, todavia, infelizmente, diz respeito quase que exclusivamente ao músculo estriado dos vertebrados, que é o que tem sido mais exaustivamente pesquisado. Naturalmente, porém, os fisiólogos e os bioquímicos, embora não em tão larga escala, têm também procurado saber se aplicam aos demais músculos as informações obtidas com o músculo estriado dos vertebrados. O que segue é um relato sucinto dessas pesquisas.

\*

Os estudos sobre a fisiologia, encarada bioquimicamente, do músculo estriado entre os invertebrados, dizem respeito sobretudo aos insetos. É verdade que se encontram referências na literatura acerca das eventos bioquímicos nos crustáceos, como, por exemplo, nos trabalhos de BOYLAND (1929) e BALL & MEYERHOF (1940). O músculo estriado do inseto, todavia, é o que tem sido mais detalhada e frequentemente estudado. Encontra-se em GILMOUR (1953) boa e recente revisão do assunto. O músculo estriado do inseto, que pela estrutura, foi visto, mostra-se comparável senão superior ao estriado dos vertebrados, não lhe fica, parece, a dever nada quanto à bioquímica. Foi no inseto que KEILIN (1925) descobriu o citocromo tendo então assinalado, após esmerado estudo estudo por todo o reino animal, que o músculo torácico do inseto que voador é o mais rico de todos os músculos estriados quanto ao teor do pigmento em questão. A atividade metabólica de todos os músculos dos insetos parece ser mais alta do que a dos vertebrados.

BARRON & TAHMISIAN (1948) estudaram exaustivamente êsse metabolismo, na barata. Os resultados indicaram que os eventos químicos no músculo da coxa não diferem essencialmente dos que já sumariados nesta introdução para o estriado dos vertebrados. WATANABE & WILLIAMS (1953/1954) ocuparam-se das oxidases, desidrogenases e do citocromo, do ponto de vista da sua localização dentro da fibrila e da composição química. SACKTOR (1953) demonstrou que os músculos mais coloridos devido à maior concentração de mitocôndrias, possuem maior atividade citocromo-citocromoxidásica e que as mitocôndrias dos músculos do vôo da mosca contém uma ATPase específica, ativada por Mg e Mn, capaz de fender o fosfato terminal de ATP, enquanto que a da fibrila é ativada por Ca e pode utilizar outros fosfatos; são também as mitocôndrias capazes de sintetizar ligações fosfóricas de alta energia; *azida* e benzoato inibem a atividade ATPásica. PEREZ GONZÁLEZ & EDWARDS (no prelo) estudaram e estão estudando a atividade metabólica em vários insetos do nosso país, visando mormente as diferenças entre os diversos músculos especializados, tais como os músculos da perna e do vôo em insetos tidos como primitivos, terrestres bons voadores, aquáticos e aquáticos bons voadores.

\*

Em confronto com os músculos estriados dos vertebrados e invertebrados, o músculo liso de um modo geral, encontra-se numa fase de estudo incomparavelmente inferior. Êsse atraso não diz respeito somente à bioquímica da contração, mas a muitos outros aspectos fisiológicos, como ressalta da revisão de FISCHER (1944). Êsse autor, analisando as causas da inferioridade do conhecimento fisiológico do músculo liso, faz ver, de início, que, decorridos 18 anos após a revisão de LOVATT EVANS (1926), no mesmo *Physiological Reviews*, poucos esclarecimentos mais tinha a oferecer. Atendo-se, de preferência, ao músculo liso dos vertebrados, acrescenta que desde o tempo da revisão de L. EVANS, o progresso mais notável surgido tinha sido o reconhecimento de que é absolutamente falha, nesses animais a concepção de que o músculo liso é uma unidade biológica. De fato, enquanto que os músculos estriados pouco diferem num mesmo indivíduo ou até em indivíduos de classe diferentes quanto às propriedades histológicas, fisiológicas e farmacológicas, os músculos lisos mostram diferenças até dentro de um mesmo indivíduo. Via de regra, os lisos, ao contrário dos estriados que são praticamente o órgão (exceções: no esôfago dos mamíferos e iris dos saurópsídeos), são partes de um órgão e dele se isolam imperfeita e dificilmente, tornando precários os estudos fisiológicos. A despeito porém, dessas dificuldades, algo se sabe já com referência à bioquímica da contração do músculo liso dos vertebrados que sugere a conclusão de

que ela é muito semelhante à do músculo estriado. LOVATT EVANS (1925, apud GLAISTER & KERLY 1936) demonstrou que o teor de ácido láctico aumenta durante a anarobiose e após a estimulação. MEYERHOF & LOHMAN (1926), ROSENTHAL & LASNITSKI (1928), HAARMANN (1932) e PRASAD (1935) indicaram que o músculo intestinal pode formar mais rapidamente ácido láctico a partir de glicose do que seus próprios estoques de carboidratos ou de glicogênio adicionado. Mediram também o consumo de oxigênio. MEYERHOF & LOHMANN (1.c.) acharam um  $QO_2$  de 0,28 a 20°C para o caso do músculo da rã e ROSENTHAL & LASNITSKI (1.c.) um de 2,64 para o colon do coelho. Os valores encontrados para a glicolise aeróbica ( $QO_2$ ) e para a glicólise anaeróbica

( $QN_2$ ) pelos referidos autores, para o intestino de rã e o colon do coelho

foram respectivamente 0,14 & 0,38 e 0,036 (15°) — 0,067 (25°) & 0,11 (sem glicose) — 0,50 (com glicose, 20°). EGGLETON & EGGLETON (1929) demonstraram a existência de fosfocreatina no estômago do coelho e da rã e no útero do coelho e da cobaia. ZANGHI (1930) encontrou o mesmo fosfágeno no estômago das aves. ROZSA (apud SZENT GYÖRGI 1947, p. 85) preparou actina e miosina a partir do músculo liso do vertebrado, estudando as propriedades e as reações dos componentes, bem como do complexo actimiosínico, combinando miosina de músculo liso com actina de estriado e vice-versa e finalmente observando a contratilidade e as reações com ions e ATP. Tendo feito o mesmo com o músculo cardíaco, concluiu que não há diferença essencial entre os 3 tipos de músculos quanto ao mecanismo contrátil, a diferença quanto ao funcionamento diz somente respeito à organização e à regulação.

\*

Em vista das dificuldades experimentadas com o músculo liso dos vertebrados, os pesquisadores frequentemente voltaram suas vistas para os invertebrados, visando a ampliação dos conhecimentos relativos à fisiologia do músculo liso em geral. A vantagem oferecida pelo músculo liso dos invertebrados está precisamente em que é muito comum nesses animais a sua ocorrência como músculo anatômico (FISCHER 1.c.), ou seja, como unidade biológica equivalente ao músculo estriado dos vertebrados. Esse pormenor facilita sobremaneira a obtenção de material apropriado para o estudo. PROSSER (1.c.) classifica os músculos não estriados dos invertebrados segundo a facilidade com que neles são discerníveis as fibrilas. Essas são facilmente demonstráveis, por exemplo, nos retratores de *Phascolosoma*, um sipunculoídeo, e nas fibras musculares dos cromatóforos dos cefalópodos, que se contraem tão rapidamente quanto as fibras estriadas (BOZLER 1. c.). Dificilmente

se evidenciam, por outro lado, na porção lisa do adutor dos moluscos e nos retratores do holoturóideo *Thyone*, onde as fibras são até consideradas por alguns (p. ex., OLSON l. c.) como afibriladas.

As estruturas musculares lisas mais bem estudadas entre os invertebrados são seguramente as dos moluscos, em particular, a dos lamelibrânquios. Nestes últimos, prestam-se admiravelmente bem ao estudo os seguintes músculos: o adutor das valvas, o retrator do pé e o retrator anterior do bisso. Esses músculos têm despertado o interesse, sobretudo, por servirem extraordinariamente bem ao estudo do tonus (TWAROG 1949). Pesquisas de difração dos raios X (SCHMITT, BEAR, HALL & JAKUS 1947) e de microscopia eletrônica (JAKUS, HALL & SCHMITT 1944; SCHMITT, BEAR & HALL 1947) puzeram em relêvo no adutor de *Mytilus*, *Venus*, *Anodonta*, *Mya* e *Pecten*, um elemento fibroso (provavelmente miosina), a paramiosina e colagênio. O estudo bioquímico da musculatura lisa dos moluscos remonta a 1904, quando HENZE demonstrou a presença de glicogênio e ácido láctico no polvo. Em 1912, STARKENTEIN & HENZE descobrem o glicogênio no músculo de *Aplysia*. Esse mesmo polisacarídeo é revelado em 1920 por ALBRECHT no lamelibrânquio *Pismo*. BOYLAND (1928) evidenciou a presença de glicogênio e ácido láctico numa variedade de moluscos e também que nos músculos dos mesmos o glicogênio se converte em ácido láctico durante a atividade, formando-se mais ácido na porção lisa. Surpreendentemente, os lamelibrânquios e gastrópodos possuem muito maior quantidade de glicogênio que os cefalópodos. Salientou também que, embora nos músculos estudados o ácido láctico surgisse como resultado da atividade, a sua pouca produção estava a indicar baixo metabolismo carboidrático. É de GLAISTER & KERLY (1936) porém o mais pormenorizado estudo sobre o metabolismo do músculo liso em moluscos. Afora o fato de que essas duas autoras parecem ter usado o músculo retrator do bisso e não o retrator do pé como pretendem (FLETCHER 1937, TWAROG l. c.), o trabalho por elas realizado em *Mytilus* é importante, de vez que aí são estudados, numa feliz combinação de estudos de excitação com bioquímica, o consumo de oxigênio em função de vários fatores, a natureza dos carboidratos presentes no músculo, a glicólise anaeróbica e os efeitos de adição de substrato e de conhecidos inibidores sobre o metabolismo. Em 1940, BALL & MEYERHOF (l. c.) ocuparam-se da desidrogenase succínica no adutor de *Venus*, ventilando a questão da ocorrência de compostos hêmicos em animais que usam a hemocianina como pigmento respiratório. O assunto foi retomado em 1947 por HUMPHREY que, em *Saxostrea*, pela técnica do homogenizado, estudou a utilização de succinato, as atividades succinodesidrogenásica e succinoxidásica, a ação dos inibidores e a questão da existência no músculo desse lamelibrânquio do sistema citocromo-citocromoxidase. O estudo dos fosfágenos nos moluscos parece ter sido iniciado por MEYERHOF (1928) que demonstrou a

presença de fosfoarginina em *Pecten*. BALDWIN (1933), todavia sugeriu, na base de diferenças na taxa de hidrólise, que nos cefalópodos o fosfagênio não é a arginina fosfatada. EGGLETON (1934), que segundo FLETCHER (l.c.) e TWAROG (l.c.) parece ter repetido o erro de GLAISTER & KERLY (l.c.) ao considerar em *Mytilus* o retrator anterior do bisso como retrator do pé, informou que no musculo por êle estudado o fosfagênio mais importante é a fosfoarginina.

Outras estruturas musculares lisas de invertebrados que já foram estudadas sob vários aspectos, embora em grau nitidamente inferior ao das precedentes, são o retrator dos sipunculoídeos e o retrator e o músculo longitudinal da holotúria. O grupo do M.I.T. dirigido por JAKUS (l.c.) encontrou no retrator de *Phascolosoma* e no de *Thyone* aquele mesmo elemento fibroso, que é provávelmente a miosina, e igualmente a paramiosina e o colágeno. BOYLAND (l.c.) demonstrou em *Holothuria* a conversão do glicogênio em ácido láctico, com as mesmas características lentas com que ela ocorre nos moluscos. MEYERHOF (1928) informou que o fosfagênio de *Holothuria* é a fosfoarginina. HARTING (1947) estudou a glicólise anaeróbica dos retratores de *Thyone* sob a influência de inibidores. HILL (1926) pesquisou as propriedades visco-elásticas do músculo longitudinal de *Holothuria*. Do ponto de vista farmacológico, êste último músculo tem sido também abordado por BACQ (1935, 1939 a e b), DUBUY (1936), BACQ & NACHMANN SOHN (1937), MOUSSATCHE & ARONSON (1951), SAWAYA (1952), AMBACHE & SAWAYA (1953) e SAWAYA & MENDES (1953).

O que se elucidou, porém, a respeito dessas estruturas musculares lisas dos sipunculoídeos e dos holoturoídeos, evidentemente é pouco, restando ainda muito por desbravar. Eis porque julguei oportuno qualquer esforço no sentido de se ampliarem os conhecimentos sobre êsses efetadores. Mesmo porque, mais do que talvez os músculos mencionados dos lamelibrânquios, constituem o retrator dos sipunculoídeos e o retrator e o longitudinal das Holotúrias unidades perfeitamente delimitadas, de fácil dissecação e, portanto apropriadas para o trabalho experimental.

A idéia de trabalhar com sipunculoídeos, porém, foi de início afastada, em virtude da dificuldade de captura de tais invertebrados que, ao que parece, não ocorrem em biótopos acessíveis nas nossas costas. As holotúrias, pelo contrário, são abundantíssimas entre as rochas semi-enterradas na areia das nossas praias. Não raro, na maré baixa, ficam até expostas ao ar, podendo ser facilmente coletadas. Foram, pois, as holotúrias escolhidas como material para um estudo intensivo da fisiologia dos músculos longitudinais. Os primeiros resultados obtidos nesse estudo são aqui relatados.

## O MATERIAL E OS MÉTODOS

### a. O material, sua coleta e manutenção no laboratório.

A espécie de holotúria utilizada no presente trabalho foi determinada como sendo a *Holothuria grisea* SELENKA (1867). A determinação se faz na base da diagnose original de SELENKA (l.c.) e também na de THEEL (1886, p. 214), que estudou o material colhido pela Expedição Challenger, precisamente no Brasil. Material do mesmo local foi remetido em 1947 ao Dr. MORTENSEN em Copenhague, que o classificou como *Holothuria grisea*. A ocorrência de *Holothuria grisea* no Brasil já tinha sido assinalada por SEMPER (ap. THEEL) no Rio de Janeiro e LUDWIG (1881), entre outros. Trata-se, na verdade, de um animal comuníssimo nas praias rochosas do sul do Brasil. Recentemente, foi a sua presença no nosso país, de novo, assinalada na literatura, com o trabalho de OLIVEIRA (1950, p. 336). Desde então vem sendo objeto de trabalhos fisiológicos e bioquímicos, entre os quais se citam os já mencionados de SAWAYA (1. c.) e de MOUSSATCHE e ARONSON (1.c) que se ocuparam da farmacologia da musculatura longitudinal; de VILLELA (1951) que tratou da presença, em *H. grisea*, de um pigmento fluorescente e, finalmente, de PANTIN & SAWAYA (1953) sobre a atividade muscular. São as holotúrias animais de corpo provido de forte musculatura em cuja face interna se prendem cinco poderosos músculos longitudinais dispostos radialmente. Dentro da parede do corpo, existe um grande espaço celômico, cheio de fluido, contendo o intestino e outras vísceras. No extremo posterior do intestino, está a poderosa cloaca muscular, na qual se abrem os grandes divertículos ramificados conhecidos por "arvore respiratória", os quais jazem livremente na cavidade celômica. PANTIN & SAWAYA (1.c.) ocuparam-se pormenorizadamente das mudanças da forma do corpo e dos movimentos desses animais, pondo em evidência o papel das musculaturas circular e longitudinal. A forma do corpo e seus movimentos dependem das contrações dessa musculatura, atuando contra o volume de fluido dentro da cavidade do corpo. Esse sistema de ação é característico dos animais com "esqueleto hidrostático", os "Hohlorganartige Tiere" de JORDAN (1914, 1916). O fluido contra o qual premem os músculos é o celômico, mas também a água do mar, que é bombada pela cloaca para dentro da "arvore respiratória". PANTIN & SAWAYA estudaram sobretudo esse bombamento d'água, do ponto de vista quantitativo, ressaltando que os movimentos rítmicos de abertura da cloaca, que o propiciam, parecem devidos à

contração da musculatura longitudinal, cujos elementos se prendem à cloaca na extremidade posterior do corpo. Essa contração opera o estreitamento dessa extremidade que se torna pontuda à medida que a cloaca se abre e se enche de água. Cheia a cloaca, ela fecha-se e, por forte contração da musculatura circular, a água é injetada na "árvore respiratória". Reinicia-se, então, o ciclo. A cada 10.<sup>a</sup> contração da cloaca, considerável volume d'água é esguichado para fora do corpo.

A captura das holotúrias, como já referido, faz-se facilmente nas ocasiões de maré baixa, por exemplo, nas vasantes de lua cheia. Em outras ocasiões, todavia, pode tornar-se árdua a sua coleta, de vez que o seu biótopo constitui zona de difícil acesso em maré alta e difícil mesmo quando a essa circunstância se alia o mar grosso, porque, então, o biótopo é a zona de rebentação das ondas. As holotúrias, pelas ventosinhas dos pés ambulacrários, ficam grudadas às rochas ao nível em que estas afloram na areia e não dispensam a proximidade desta última, porque o alimento é tirado do material orgânico contido na areia que atravessa o intestino do animal. Em algumas regiões, como no denominado "cantão" da praia da Enseada, em Guarujá, é comum, na véspera, encontrarem-se as holotúrias semi-enterradas na areia. Essa observação parece-me importante, porquanto *H. grisea* é tida como espécie que vive entre as fendas e desvãos das rochas (p. ex. PANTIN & SAWAYA l.c. 56), em oposição às espécies tipicamente cavadoras. tais como *Caudina chilensis* (YAZAKI 1930). Relativamente ao tamanho dos exemplares coletados, cumpre ressaltar que os maiores foram sempre encontrados nas rochas dos costões das montanhas nas proximidades do mar raso e, via de regra, diminuíam de tamanho ao longo das encostas no sentido do mar mais profundo.

As coletas processaram-se de preferência nas rochas semisubmersas da Ilha de Urubuqueçaba, entre Santos e São Vicente, à esquerda do lado voltado para a praia. Em ocasiões mais raras, colheu-se material no já mencionado "cantão" da Praia da Enseada em Guarujá e, também, na Praia do Cabelo Gordo, na região de São Sebastião. A Ilha de Urubuqueçaba, todavia, foi escolhida como local padrão de captura, porquanto aí os exemplares coletados foram os que melhor se prestaram ulteriormente às experiências, pelo tamanho e pela maior rapidez com que eram transportados a São Paulo.

Os animais capturados eram colocados em recipientes de alumínio contendo água do mar, que durante todo o tempo da captura era renovada periódicamente a fim de se propiciar bom arejamento. Um bom estoque de água do mar era também colhido na ocasião para o ulterior suprimento dos aquários em São Paulo. Animais e estoque de água do mar eram, tão rapidamente quanto possível, transportados para o laboratório da Faculdade, em caminhonete. Durante o percurso de Santos a São Paulo, a água dos recipientes de alumínio era, de quando em quando,

renovada e, sobretudo, controlavam-se as frequentes evicerações, comuns nas holotúrias como consequência do distúrbio a elas causados pela manipulação e sacolejamento do carro, uma vez que o material eviscerado se revelou perturbador das boas condições da água do mar.

No laboratório, em São Paulo, de ante-mão preparados encontravam-se os aquários para a recepção dos animais. Tratava-se de recipientes inteiramente de vidro, de forma globóide. Aí eram colocadas as holotúrias em água do mar, frequentemente renovada. Assegurou-se a ulterior manutenção dos animais nesses aquários pela circulação contínua da água do mar, segundo um dispositivo especial que nos foi aconselhado pelo Prof. BESNARD do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e que consistia do seguinte: a água do aquário era sifonada para um recipiente de vidro, colocado externamente, de secção retangular. Esse recipiente continha, de baixo para cima pedregulho, carvão ativado, areia de cachoeira e algodão de vidro. No centro do mesmo, perfurando essas várias camadas até tomar contacto com o fundo, intercalava-se um tubo de vidro de ca. de 2 cms. de diâmetro. A água sifonada filtrava-se, assim, pelas várias camadas retentoras de sua impureza e penetrando, purificada, pelo tubo intercalado medianamente, vinha aflorar no tópo deste último. Daí, finalmente, era ela bombada de novo para o aquário, por engenhoso dispositivo de injeção de ar oriundo de um compressor elétrico de baixa rotação. Esse sistema de circulação de água demonstrou-se extremamente eficiente. Casos houve em que, colocada no aquário água turva, mesmo após a precipitação no fundo do material insolúvel, tornou-se ela, por esse sistema de circulação e purificação, absolutamente límpida em menos de 24 horas. As holotúrias, mantidas em tal meio, puderam viver perfeitamente bem durante o tempo necessário para a realização das experiências. Era comum, todavia, no segundo dia de permanência no aquário, que todas já tivessem esvasiado a areia total contida nos intestinos e boa parte tivesse eviscerado. Em tais circunstâncias, foi considerada medida acauteladora, não somente a remoção das vísceras expelidas, mas uma limpeza total dos aquários. Daí por diante, os animais, em nova água circulante, mantinham-se perfeitamente bem, sendo difícil diferenciar entre os que tinham eviscerado ou não. Via de regra, porém, os animais coletados numa excursão eram utilizados numa semana, de modo que não houve preocupação de se verificar quanto tempo poderiam suportar a vida, sem alimento, nos aquários.

Duas observações que me parecem importantes como subsídios para biologia das holotúrias foram feitas no decurso dessas coletas e manutenção dos animais nos aquários. Primeiramente, observou-se, que os animais eviscerados, nem por isso cessavam de executar aquêle mecanismo de bombamento cloacal estudado por PANTIN & SAWAYA. Tornavam-se, em consequência, enormes, visto que agora a água era bombada dire-

diretamente para a cavidade do corpo. Exemplares medindo normalmente 15 cms. de comprimento, chegaram, ao cabo dessa exagerada absorção de água, a atingir 30-40 cms. A outra observação que me parece digna de registro é a de que os animais capturados a partir de março, mais ou menos, até o fim das coletas em junho, exibiram gônadas aparentemente maduras. Com relação aos testículos, há mesmo certeza de se acharem maduros pela comprovação feita em esfregaços examinados ao microscópio. As infrutíferas tentativas de realização de fecundação artificial sugeriram, no entretanto, que os óvulos ainda não se achassem suficientemente maduros.

b. *Histologia dos músculos longitudinais.*

Os músculos longitudinais encontram-se somente nas zonas ambulacrárias. Seus feixes, em número de 5, são formados de duas faixas acoladas, que se dispõem por todo o comprimento do corpo, a partir da cloaca e vão terminar anteriormente no anel calcário, da maneira seguinte: na altura do terço superior do corpo, cada faixa radial divide-se em dois ramos: um, externo, que prossegue o trajeto primitivo, acolado à derme, atinge a região tentacular e aí se recurva, descendo até a membrana perifaríngea para terminar na borda superior da peça radial correspondente; o outro interno, destaca-se da parede do corpo, atravessa o celôma, livre de qualquer aderência, e vai inserir-se também na peça calcária radial, mais abaixo porém do que o outro ramo, na face interna da placa. Esse último ramo denomina-se *músculo retrator da faringe*. Mantém os músculos longitudinais estreitas ligações com os nervos e os canais ambulacrários contidos no mesmo raio do corpo, os quais, na verdade, se dispõem entre músculo e pele. Os feixes musculares fixam-se na sua porção mediana à parede do corpo por uma espécie de mesentério, no qual se alojam os nervos oriundos do sistema radial que penetram nos músculos.

As fibras dos músculos longitudinais, de acordo com os primeiros autores (VOGT & YUNG 1888, p. 665; JORDAN 1914, p. 378), são células fusiformes, longas, pontudas em ambos os extremos, medindo de 4-5 micra de diâmetro e dispostas no sentido do comprimento do músculo. Há muita controversia, porém, quanto à estrutura do citoplasma dessas fibras. HALL (1927, ap. OLSON l.c., p. 346) opina que, em *Cucumaria*, a porção do músculo longitudinal conhecida como músculo retrator da faringe (que é a que tem sido mais bem estudada do ponto de vista histológico) consiste de grandes fibras contendo poucas fibrilas gigantes. Estudando músculo correspondente em *Thyone*, OLSON (l.c.) contesta essa observação de HALL. O quadro histológico mostrado pelas figuras deste último é quase idêntico ao observado por OLSON em *Thyone*. Ora, nos músculos deste animal, a condição nucleada das assim chamadas

“fibrilas” por HALL, é bem evidente. Os núcleos, embora frequentemente periféricos e ligados às fibras pelas conexões tênues, existem e, em alguns casos, podem ser vistos dentro das mesmas. Essa condição nucleada teria passado despercebida a HALL. Este também teria interpretado erroneamente os núcleos livres entre os feixes, que são constituintes do tecido conjuntivo, como núcleos musculares. Decorre, pois, do quadro de OLSON a inexistência de elementos fibrilares no citoplasma das fibras, o qual seria homogêneo. Aliás, parece não ter sido OLSON o primeiro a assinalar tal cousa, porquanto já no livro de PLATTE (l. c., pp. 113 e 115) se faz referência ao fato da existência em Platelminthes e Holotúrias de células musculares afibriladas. Os estudos feitos com microscopia eletrônica, porém, vieram, ultimamente, modificar um tanto esse conceito de homogeneidade das fibras dos músculos longitudinais da holotúria. De fato, EDWARDS, SAWAYA, SANTOS & SANTOS (1953) conseguiram demonstrar que existem fibrilas no citoplasma dessas fibras. Essas fibrilas, por técnica apropriada de micro-fragmentação das fibras, foram isoladas e mostraram até periodismo, sob a forma de uma série de pontos diminutos ou contas dispostas em diagonal, em todos os estágios de contração. Os resultados colhidos foram semelhantes aos de HALL, JAKUS & SCHMITT (1945) com o adutor do molusco *Venus*. Aqui também a microscopia eletrônica revelou a presença de fibrilas estriadas. Deve-se assinalar, todavia, que essa estriação difere da normalmente encontrada no músculo esquelético. O período é curto, pouco visível abaixo de aumentos de 10.000 vêzes. Os autores americanos não estabeleceram correlação entre a estrutura das fibrilas e as características funcionais. No caso da holotúria, o período das estriações é levemente maior do que o do colágeno e um pouco menor do que o das fibrilas do adutor de *Venus*. No estado de contração, as fibrilas mostram séries de regiões espessadas em intervalos vários e têm o aspecto de uma fita elástica encurtada. EDWARDS (comunicação pessoal) acredita que tais regiões espessadas representem focos de contrações locais. Sugere, além disso, que as propriedades fásicas do músculo longitudinal se devam ao arranjo e ao movimento das fibras num deslissamento de umas sobre as outras.

### c. Os métodos utilizados.

No preparo do material para as experiências, a holotúria era fixada de dorso para baixo numa cuba de dissecação. Em se tratando de um animal cuja parede do corpo é ricamente provida de musculatura do tipo tônico, essa fixação deve ser feita com certa precaução a fim de que, incisado o animal, as paredes do corpo não se enrolem sobre si próprias, o que dificulta sobremodo a excisão dos músculos longitudinais. Assim, a fixação da holotúria se fazia primeiramente por dois fortes estiletos

espetados respectivamente nas regiões oral e cloacal. Seguia-se uma incisão ao longo da linha mediana ventral, entre dois raios do corpo, da cloaca à boca. As paredes do corpo eram então rebatidas para os lados e fixadas à prancheta por meio de preguinhos, de vez que os alfinetes comuns não são suficientemente fortes para contê-las nessa posição forçada. As vísceras e aderências eram a seguir removidas, ficando livre o acesso aos músculos longitudinais. Estes eram dissecados com bisturís de vidro ao longo de toda a sua extensão e, seccionadas as suas ligações anterior e posterior com as regiões de inserção, libertavam-se finalmente. Eram considerados músculos bons para as experiências os que, libertos, mostravam rápida reação, contraíndo-se. Transpunha-se o material dissecado para uma capsula contendo o meio líquido apropriado, colocado lateralmente à cuba sobre cubinhos de gelo. O destino ulterior era condicionado ao tipo de experiência que se tinha em vista no momento. Nos estudos metabólicos, os músculos eram, via de regra, utilizados dentro do espaço máximo de uma hora. Em casos mais raros, iam os músculos para a geladeira para um repouso prévio de 6 horas a 6-8°C. Nas experiências que visavam o estudo da atividade enzimática, eram utilizados imediatamente os músculos na preparação de extratos e homogenizados ou colocados no congelador da geladeira a -5°C, e aí ficavam até o momento oportuno.

Nos referidos estudos, os músculos dissecados eram, antes do uso, limpos e enxutos em papel de filtro para remoção do muco de que se revestem logo após a excisão e, então, colocados em novo meio fisiológico. De um modo geral, êsses estudos se processaram com músculos inteiros. Em alguns casos, porém, usou-se músculo finamente retalhado com tesoura.

As determinações do consumo de oxigênio fizeram-se num aparelho de BARCROFT — WARBURG. Os músculos eram colocados num pequeno cilindro graduado e aí recebiam meio de suspensão até que se completasse um volume conhecido. Músculos e meio eram, então, despejados no interior de frascos de WARBURG do tipo padrão, com um bulbo lateral e uma capacidade média de 18 ml. A seguir adicionava-se ao poço central de cada frasco 0,3 ml. de KOH a 12% juntamente com um rolinho de papel de filtro e ajustava-se convenientemente à saída de cada bulbo lateral, o pino canaliculado em posição para a ulterior perfusão gasosa dos frascos. Os frascos, assim preparados, eram, então, conetados aos respectivos manômetros e os conjuntos colocados no banho a 25°C. Sempre que se trabalhou em atmosfera de oxigênio, procedia-se nessa ocasião à perfusão dos frascos com êsse gás, durante 10 minutos, à taxa de agitação escolhida para as medidas, ou seja, 120 oscilações completas por minuto. Cessada a perfusão, giravam-se os pinos dos bulbos para a posição de oclusão, os níveis nos dois ramos do manômetro eram ajustados a 150 e, com a torneira dêste último fechada, esperava-se 10.

minutos antes de tomar as leituras iniciais, a fim de se obter o ajuste à temperatura de banho. Eram, então, rapidamente abertas as torneiras, reajustados os níveis nos manômetros e tomadas as primeiras leituras. As leituras subsequentes fizeram-se em intervalos de 15, mais raramente, 10 minutos. Ao cabo da experiência, era retirado o material dos frascos, lavado em água comum e pôsto na estufa a 115°C para a determinação do peso seco.

Em alguns casos em que se fez uso de inibidor da respiração, foi êle colocado no bulbo lateral, sendo as demais precauções idênticas às já descritas.

Na determinação da glicólise anaeróbica, igualmente, o procedimento experimental foi semelhante. Apenas a perfusão se fez, naturalmente, com mistura de nitrogênio e anidrido carbônico. Essa mistura fazia-se em gasômetro, purificando-se o nitrogênio com sucessivas lavagens em pirogalol alcalino de preparação recente.

Determinou-se o quociente respiratório à custa dos frascos de WARBURG para o chamado "segundo método" de DICKENS & SIMER (1931, I, 1933), que são dotados de dois bulbos laterais, um deles em comunicação com o poço central. Os detalhes do procedimento seguido serão fornecidos na parte experimental.

Os estudos sôbre o equipamento enzimático processaram-se na base de extratos ou homogenizados (homogenate) de músculo. Em ambos os casos, os músculos eram secados em papel de filtro, pesados, retalhados com tesoura e finalmente triturados num almofariz. Essa trituração não dispensou a adição de um pouco de quartzo moído, de vez que a natureza dos músculos era tal que homogenizadores, mesmo os do tipo Blendor, ou a trituração sem a ajuda mencionada de quartzo não inspiraram confiança quanto a se ter alcançado o gráu desejado de ruptura da organização celular. Na preparação de extratos, o material triturado era adicionado de quantidade apropriada de meio fisiológico, bem agitado neste último e, finalmente, a suspensão resultante era centrifugada, com desprezo da parte depositada. O extrato, quando não usado imediatamente, era conservado a 5°C. A suspensão mencionada, não centrifugada, considerou-se como "homogenizado".

Estudou-se a atividade enzimática do músculo longitudinal pela combinação de técnicas de reação de côr, fotométrica, de THUNBERG e manométrica. Nas secções respectivas da parte experimental serão dados pormenores de cada uma delas.

Como meio de suspensão em quase tôdas as experiências dêste trabalho escolheu-se a água do mar artificial segundo PANTIN (1934), bicarbonatada ou fosfatada, ou simplesmente a água do mar natural. Mesmo nas experiências de determinação de atividade enzimática, evitou-se quase sempre o emprêgo da água destilada na preparação de extratos ou homogenizados, visto como tais preparações revelaram pouca

ou nenhuma atividade. A água do mar de PANTIN também constituiu solvente de tôdas as soluções de drogas preparadas. A composição dessa água do mar artificial é a seguinte:

NaCl	0.6 M	1000 cm <sup>3</sup>
KCl	0.6 M	25
CaCl <sub>2</sub>	0.4 M	35
MgCl <sub>2</sub>	0.4 M	35
NaHCO <sub>3</sub>	0.5 M	30

Quando se empregou fosfato como tampão, em vez de bicarbonato, substituiu-se êste último na confecção da água por solução de fosfato di-sódico a M/50, adicionado até o pH desejado, e completou-se o volume com a água destilada, como no caso da solução bicarbonatada.

## PARTE EXPERIMENTAL

### A) Sôbre o metabolismo do músculo longitudinal

Dados numéricos relativos aos vários aspectos do metabolismo muscular são escassos no que se refere aos mm. longitudinais da holotúria, como foi visto na introdução. O campo estava, por assim dizer, por desbravar. Impôz-se, portanto, como tarefa preliminar fazer para os mm. longitudinais dêsse equinoderma aquilo que GLAISTER & KERLY (1. c.) tinham feito para o m. retrator do pé (ou, melhor, do bisso, segundo a correção indicada) de *Mytilus*. Ou seja, estabelecer quais as condições experimentais adequadas para a boa medida da troca de gases, o elemento de que me servi para a avaliação de alguns aspectos do metabolismo dos mm. longitudinais da holotúria. Essa tarefa preliminar consistiu de séries de medidas do consumo de oxigênio dos referidos músculos, em função de vários fatores ambientais, como se verá a seguir.

a) *O consumo de oxigênio e as influências da composição iônica e do pH do meio líquido, da tensão de oxigênio e de outros fatores.*

Primeiramente, houve intenção de se medir o consumo de oxigênio dos mm. longitudinais nas condições padrões em que se faz essa medida no caso, p. ex., do fígado ou do rim dos mamíferos, ou seja, em tênues fatias em atmosfera de oxigênio. Razões que serão ventiladas na discussão, todavia, levaram-me a deixar de lado essa prática e a primeira série de medidas efetuou-se com material recém-dissecado finalmente retalhado ("chopped muscle") suspenso em água do mar de PANTIN em atmosfera de oxigênio. Os resultados constam da Tab. 1. Obteve-se um QO<sub>2</sub> médio de 0,218.

Fez-se a segunda série de determinações com músculos intactos, igualmente recém-dissecados, suspensos em água do mar de PANTIN e em atmosfera de oxigênio, figurando os seus resultados na Tab. 2. O  $QO_2$  médio foi de 0,215. Na 3ª. série, a variação relativamente à precedente consistiu na substituição do tampão de bicarbonato por outro de fosfato (Tab. 3), obtendo-se um  $QO_2$  médio de 0,121. Na 4ª. série (Tab. 4) eliminou-se o tampão da água do mar de PANTIN, resultando disso um  $QO_2$  médio de 0,163. Finalmente (Tab. 5), nesse conjunto de séries em que se mediu o consumo de oxigênio em músculos intactos recém-dissecados em atmosfera de oxigênio, usou-se água do mar natural filtrada como meio de suspensão. O  $QO_2$  médio foi de 0,185.

TABELA I

*O consumo de oxigênio do músculo longitudinal da Holothuria.*

Músculos picados suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN. (pH: 7,0), em equilíbrio com uma atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C.  $QO_2$  em mm<sup>3</sup> de oxigênio / mgr. pêso sêco / hora.

Permanência no aquário	Pêso sêco (mgr.)	$QO_2$	Média
3.º dia	228	0,261	
	275	0,206	
	292	0,186	
	273	0,212	
	322	0,185	
	216	0,257	0,218±0,033

As 3 séries seguintes tiveram por escôpo a medida do consumo de oxigênio, estando as suspensões de músculos intactos e recém-dissecados, não mais em equilíbrio com oxigênio mas com ar comum. As Tabelas 6, 7 & 8 referem-se a medidas que se efetuaram em água do mar de

TABELA 2

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN, bicarbonatada, pH 7,0, em equilíbrio com uma atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. Valores para QO<sub>2</sub> expressos em mm<sup>3</sup> de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	QO <sub>2</sub>	Média
1.º dia	247	0,203	
	375	0,259	
	387	0,258	
	387	0,241	
	245	0,268	
	310	0,253	0,247
2.º dia	266	0,166	
	322	0,206	
	280	0,173	
	264	0,179	0,181
3.º dia	274	0,220	
	221	0,250	0,235
			0,223 ± 0,036

TABELA 3

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN, com tampão de fosfato a pH 7,3, em equilíbrio com 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. QO<sub>2</sub> expresso em mm<sup>3</sup> de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	QO <sub>2</sub>	Média
3.º dia	202	0,125	
	264	0,150	
	205	0,103	
	234	0,102	
	268	0,123	
	293	0,125	0,121 ± 0,017

TABELA 4

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN, sem bicarbonato, pH 6, 8, em equilíbrio com uma atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. Valores para  $QO_2$  expressos em mm<sup>3</sup> de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	314	0,147	0,172
	300	0,180	
	377	0,179	
	413	0,156	
	233	0,169	
	241	0,205	
2.º dia	345	0,160	0,148
	348	0,148	
	196	0,142	
	207	0,144	
			0,163 ± 0,017

TABELA 5

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar natural, pH 8,0, em equilíbrio com uma atmosfera de 100% oxigênio. Temperatura 25°C. Valores para  $QO_2$  expressos em mm<sup>3</sup> de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	175	0,259	0,175
	224	0,175	
	302	0,187	
	272	0,134	
	381	0,145	
	265	0,161	
	242	0,169	
2.º dia	360	0,121	0,176
	332	0,163	
	241	0,203	
	130	0,217	
			0.175 ± 0,038

TABELA 6

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN, em equilíbrio com ar comum. Temperatura 25°C. Valores expressos em mm<sup>3</sup> de oxigênio consumidos por miligrama de peso em uma hora. pH 7,0

Permanência no aquário	Pêso sêco (mgr.)	QO <sub>2</sub>	Média
1.º dia	296	0,110	0,146
	333	0,183	
2.º dia	349	0,151	0,164
	311	0,178	
3.º dia	247	0,176	0,199
	204	0,201	
	245	0,208	
	297	0,192	
	265	0,232	
	271	0,190	
			0,182±0,035

PANTIN com ou sem bicarbonato e em água do mar natural, com a obtenção de QO<sub>2</sub> médios respectivamente iguais a 0,181, 0,185, e 0,148.

A última dessas séries preliminares teve em mira a determinação do QO<sub>2</sub> de músculos intactos suspensos em água do mar de PANTIN ou natural, equilibrada com 100% de oxigênio, 6 horas após a dissecação e permanência na geladeira à baixa temperatura. Os valores médios obtidos foram respectivamente 0,209 e 0,170 (Tab. 9).

TABELA 7

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar artificial segundo PANTIN, sem bicarbonato, em equilíbrio com ar comum. Temperatura 25°C. Valores para  $QO_2$  expressos em  $mm^3$  de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora. pH 6,8.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	235	0,205	
	245	0,177	
	341	0,206	
	278	0,198	
	267	0,186	
	234	0,186	
	331	0,164	
	242	0,187	0,188
2.º dia	279	0,188	
	346	0,153	0,170
			0,185±0,016

TABELA 8

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos suspensos em água do mar natural, pH 8,0, em equilíbrio com ar comum. Temperatura 25°C. Valores para  $QO_2$  expressos em  $mm^3$  de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora.

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	262	0,155	
	241	0,163	0,159
2.º dia	245	0,171	
	227	0,187	
	238	0,117	
	274	0,142	
	295	0,141	
	284	0,133	
	213	0,128	
231	0,144	0,145	
			0,148±0,021

TABELA 9

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Medidas do  $QO_2$  (expresso em  $mm^3$  de oxigênio consumidos por miligrama de peso seco em uma hora) feitas a  $25^\circ C$ , em atmosfera de 100% de oxigênio, 6 horas após dissecação e permanência na geladeira a ca.  $8^\circ C$ .

Permanência no Aquário	Meio de Suspensão	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	ag. mar nat.	208	0,168	
2.º dia	"	148	0,246	
	"	160	0,215	
3.º dia	"	105	0,224	
	"	65	0,194	$0,209 \pm 0,029$
1.º dia ag. mar PANTIN		315	0,170	
		240	0,196	
		320	0,156	
		220	0,179	
		339	0,149	
		345	0,173	$0,170 \pm 0,016$

Um quadro esquemático dessas várias séries mostra o seguinte:

Tempo decorr. após dissec.	Grao de integr. do músculo	Meio de suspensão	Atmosfera de equil.	$QO_2$ medio
menos de 1 h.	picado	ag. mar PANTIN	Oxig.	0,218
"	intato	ag. mar PANTIN	"	0,223
"	"	PANTIN fosfat.	"	0,121
"	"	PANTIN s/bicarb.	"	0,163
"	"	ag. mar natural	"	0,175
"	"	ag. mar PANTIN	Ar	0,182
"	"	PANTIN s/bicarb.	"	0,185
"	"	ag. mar natural	"	0,148
mais de 6 h.	"	ag. mar PANTIN	Oxig.	0,170
"	"	ag. mar natural	"	0,209

A análise desse quadro, bem como dos dados das tabelas em geral, indica vantagem das condições "músculos recém-dissecados suspensos

em água do mar de PANTIN, em equilíbrio com atmosfera de oxigênio<sup>o</sup> sobre as demais. Nas referidas condições, o músculo intacto teria respirado levemente mais do que o picado. Além disso, o confronto dos dados obtidos para o músculo picado (Tab. 1), retirado de animais no seu 3.<sup>o</sup> dia no laboratório, com os referentes ao músculo intacto (Tab. 2), obtida de animais com idêntica permanência no aquário, acentua essa diferença em benefício do músculo íntegro. O fato conduz à questão das consequências da permanência no aquário. A análise das tabelas sugere que há de certo modo, uma correlação entre o tempo decorrido no aquário e a taxa respiratória. Por exemplo, os músculos dissecados no 2.<sup>o</sup> dia de aquário, via de regra, mostraram taxa inferior às do anterior e subsequente. A tentativa de explicação do fenômeno será oportunamente abordada na discussão.

TABELA 10

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria em presença de Glicose a 0,02 M.*

Músculos suspensos em sol. de glicose a 0,02M em água do mar artificial segundo PANTIN, em equilíbrio com atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. QO<sub>2</sub> expresso em mm<sup>3</sup> de oxigênio por mgr. pêso sêco em 1 hora. pH 7,0.

Permanência no aquário	Pêso sêco (mgr.)	QO <sub>2</sub>	Média
1. <sup>o</sup> dia	288	0,278	
	340	0,202	
	358	0,234	
	309	0,238	
	299	0,244	
	317	0,234	0,238
2. <sup>o</sup> dia	331	0,189	
	337	0,202	
	316	0,210	
	364	0,198	
	283	0,187	
	327	0,191	0,196
3. <sup>o</sup> dia	218	0,263	
	314	0,246	0,254
			0,223±0,029

Na base da análise dos resultados obtidos nas várias séries, foram pois, escolhidas como condições padrões de trabalho a suspensão de músculos intactos em água do mar de PANTIN em atmosfera de oxigênio. Reserva igualmente para a discussão os motivos mais pormenorizados dessa preferência, em detrimento do "músculo picado".

2) *Efeito da adição de substrato sobre o consumo de oxigênio.*

*Influência de Glicose.* Quando a adição de glicose ao meio de suspensão de um tecido redonda num aumento da taxa respiratória deste último, isso necessariamente significa que o tecido utilizou o monossacarídeo, metabolizando-o. Se, porém, a taxa respiratória se mantiver inalterada, nem por isso se poderá afirmar que o tecido em questão não faz uso da glicose, como se verá. De qualquer maneira, constitui o *test*

TABELA 11

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria em presença de Glicose a 0,01 M*

Músculo suspenso em sol. de glicose a 0,01M em água do mar artificial segundo PANTIN, em equilíbrio com atmosfera de 100% oxigênio. Temperatura 25°C.  $QO_2$  expresso em mm<sup>3</sup> de oxigênio por mgr. peso seco em uma hora. pH 7,0

Permanência no aquário	Pêso seco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	303	0,186	0,235
	304	0,237	
	281	0,252	
	246	0,268	
	335	0,215	
	265	0,251	
2.º dia	301	0,252	0,224
	258	0,219	
	250	0,221	
	293	0,206	
	272	0,224	
	348	0,223	
3.º dia	286	0,235	0,245
	260	0,256	
			0,232 ± 0,017

da glicose um dos métodos rotineiros de determinação da utilização dos carboidratos como fonte de energia. No caso do músculo longitudinal êsse *test* se fez segundo a mesma técnica empregada na determinação do  $QO_2$  normal. Apenas, desde o tempo da dissecação os músculos já ficaram em solução de glicose em água do mar de PANTIN. O açúcar foi usado em duas concentrações: 0,01M e 0,02M. A Tab. 10 mostra os resultados colhidos com 0,02M de que resultou um  $QO_2$  médio de 0,223. Na Tabela 11 figuram os dados obtidos com 0,01M, com  $QO_2$  médio de 0,232, como se vê, taxa levemente, mas não significativamente ( $t=0,815$ ) superior á obtida nas condições consideradas padrões (Tab. 2; 0,223). Comparados os dois valores entre sí, é maior o obtido com 0,01M. Nota-se aqui o mesmo decréscimo na taxa respiratória nos músculos retirados de animais no segundo dia no aquário, o qual, todavia, é muito menos acentuado no caso de 0,01M.

A fim de se afastar a possibilidade da pouca utilização de glicose ter sido devida ao emprêgo de um tampão pouco apropriado, fez-se uma experiência em que se comparou a influência da glicose sôbre a taxa res-

TABELA 12

*Influência do meio de suspensão sôbre o consumo de oxigênio de músculos longitudinais de Holothuria em presença de glicose a 0,01M.*

Músculos dissecados no mesmo dia e à mesma hora (6.º dia). Meio de suspensão em equilíbrio com 100% de oxigênio. Temperatura 25°C.  $QO_2$  expresso em mm3 de oxigênio por mgr. pêso sêco em uma hora.

Meio de suspensão	pêso sêco (mgr)	$QO_2$	Média
Ag. mar PANTIN bicarb. pH 7,0	201	0,301	
Ag. mar PANTIN Fosfat. pH 7,3	211	0,215	
Glicose em PANTIN bicarb.	229 219	0,279 0,293	0,286
Glicose em PANTIN Fosfat.	270 270	0,201 0,211	0,206

piratória de músculos dissecados na mesma hora, de animais com mesmo tempo de permanência no aquário, em meio de suspensão tamponado com bicarbonato num caso e com fosfato n'outro. Os resultados constam da tabela 12 e indicam que o meio bicarbonatado é o em que se conseguiram maiores  $QO_2$ , embora nada se possa também aqui dizer acêrca de modificação essencial introduzida no consumo de oxigênio pela adição de glicose. Pormenor interessante revelado pela Tabela 12 é o alto  $QO_2$  obtido em confronto com os dados das tabelas anteriores;principalmente as de n.º 1, 2, 3, 10 e 11. Esse alto  $QO_2$  possivelmente se relacione com

TABELA 13

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria em presença de Piruvato a 0,02 M.*

Músculos suspensos em sol. de piruvato a 0,02 M em água do mar artificial segundo PANTIN, em equilíbrio com atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C.  $QO_2$  expresso em mm3 de oxigênio por mgr pêsco sêco em 1 hora. pH 7,0

Permanência no aquário	Pêsco sêco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	246	0,228	
	316	0,235	
	258	0,195	
	203	0,248	
	181	0,237	
	211	0,276	0,236
2.º dia	315	0,199	
	303	0,203	
	280	0,189	
	301	0,176	
	257	0,173	
	221	0,186	0,188
3.º dia	281	0,242	
	279	0,215	
	282	0,236	
	247	0,203	
	293	0,194	
	289	0,206	0,216
			0,213±0,027

o fato de terem sido doadores de músculos animais que se achavam já no seu 6.º dia de aquário.

*Influência de Piruvato.* O aumento da taxa respiratória decorrente da adição de piruvato reveste-se praticamente do mesmo significado que o da adição de glicose e da mesma ressalva. No presente trabalho, o piruvato (Piruvato de sódio ROCHE), dissolvido em água do mar de PANTIN, foi utilizado nas concentrações do 0,02 e 0,01 M, como no caso da glicose. As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados. Também aqui não

TABELA 14

*Consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria em presença de Piruvato a 0,01 M.*

Músculos suspensos em sol. de piruvato a 0,01 M em água do mar artificial segundo PANTIN, em equilíbrio com atmosfera de 100% de oxigênio. Temperatura 25°C.  $QO_2$  expresso em mm3 de oxigênio por mgr peso sêco em uma hora. pH 7,0

Permanência no aquário	Pêso sêco (mgr.)	$QO_2$	Média
1.º dia	270	0,271	0,263
	222	0,225	
	220	0,279	
	283	0,243	
	215	0,270	
	263	0,291	
2.º dia	292	0,246	0,200
	305	0,208	
	332	0,172	
	234	0,216	
	237	0,185	
	279	0,173	
3.º dia	240	0,245	0,225
	202	0,245	
	248	0,206	
	234	0,174	
	284	0,219	
	221	0,262	
			0,229±0,036

se pode dizer que o piruvato introduziu modificação essencial na taxa respiratória, pois o resultado obtido com 0,01M não é significativamente superior aos das condições padrões ( $t=0,439$ ).

c) *Ação de inibidor (NaF) sobre o consumo de oxigênio.*

A glicólise, foi visto na introdução, pode ser inibida mediante o emprêgo de substâncias bloqueadoras, das quais o monoiodoacetato é clássico por ter sido usado pelo pioneiro nêsse estudo, o dinamarquês LUNDSGAARD (l.c.). O monoiodoacetato agiria por alquilação dos grupos -SH de enzimas indispensáveis à glicólise normal. Outro inibidor muito empregado é o fluoreto de sódio, o qual segundo BOREI (1945) competiria com a ovidase pelo citrocromo, formando com êste último um complexo fluorfosfoprotéinico. Assim, quando a adição de fluoreto ao meio de suspensão em que está respirando um tecido redonda numa significativa diminuição da taxa, constitui o fato indício relativamente seguro de que o tecido em questão possui glicólise anaeróbica. No caso do músculo longitudinal da holotúria, o material dissecado era colocado em água do mar de PANTIN glicosada (0,01M) dentro dos frascos de WARBURG e somente ao cabo de algumas leituras era-lhes adicionada solu-

TABELA 15

*Influência de fluoreto de sódio sobre o consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria*

Músculos picados suspensos em sol. a 0,01 M de Glicose em água do mar artificial segundo PANTIN, ulteriormente adicionada de sol. de NaF para dar uma contração final de 10-3 M, em equilíbrio com 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. Consumo em mm<sup>3</sup> de oxigênio mgr/pêso sêco/15 minutos. pH final: 7,0

Tempo	Experim. 1	Experim. 2	Experim. 3
15'	0,081	0,093	0,068
30	0,085	0,097	0,084
45	0,082	0,093	0,080
60	0,057*	0,052*	0,051*
75	0,053	0,063	0,055
90	0,053	0,067	0,051
105	0,046	0,045	0,039
120	0,053	0,067	0,032
135	0,053	0,067	0,035
150	0,050	0,041	0,045

\* Primeira medida após adição de NaF.

ção de NaF, de modo a se obter uma concentração final dêste último de  $10^{-3}$  M. As tabelas 15 e 16 e o gráfico da fig. 1 mostram os resultados e o curso da ação do NaF sobre a taxa respiratória do músculo longitudinal. Este último foi usado picado na metade dos casos e intato na outra metade. O resultado, não obstante, foi semelhante nos dois. A adição de NaF decresceu imediatamente o consumo, podendo-se falar em seguramente 25% de inibição. A adição retardada de NaF num dos casos (Tab. 16, exp. 3; gráfico da figura 1, C) indica que êsse decrescimento não foi um acontecimento natural de ajuste às condições reinantes dentro do frasco ou de esmorecimento progressivo do metabolismo por causas intrínsecas.

TABELA 16

*Influência de fluoreto de sódio sobre o consumo de oxigênio de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos inteiros suspensos em sol. a 0,01 M de Glicose em água do mar artificial segundo PANTIN posteriormente adicionada de sol. de NaF para dar concentração final de  $10^{-3}$  M, em equilíbrio com 100% de oxigênio. Temperatura 25°C. Consumo em mm3 de oxigênio /mgr. pêso seco/ 15 minutos. pH final: 7,0

Tempo	Experim. 1	Experim. 2	Experim. 3
15'	0,080	0,073	0,087
30	0,083	0,080	0,084
45	0,073	0,080	0,084
60	0,060*	0,065*	0,084
75	0,065	0,065	0,080
90	0,060	0,062	0,062*
105	0,043	0,047	0,055
120	0,053	0,044	0,062
135	0,060	0,047	0,062
150	0,046	0,047	0,055

\* Primeiro medida após adição de NaF.

O emprêgo de monoiodacetato na concentração de  $10^{-4}$  foi, pelo contrário inoperante. Dêsse inibidor, todavia, se tratará logo a seguir.

d) *Glicose anaeróbica normal e sob a influência de inibidores.*

A medida da glicólise anaeróbica faz-se habitualmente por dois processos. Um consiste na medida da produção de dióxido de carbono pelo material suspenso em meio bicarbonato equilibrado com mistura

de  $N_2$  e  $CO_2$ . A produção de  $CO_2$ , no caso, é teoricamente, proporcional à quantidade de ácido láctico formado que reage com o bicarbonato de meio. O outro processo consiste na determinação direta da quantidade de ácido láctico formada em condições rigorosamente anaeróbicas. Ambos os processos têm suas sérias limitações, como se sabe. No presente trabalho, escolheu-se como técnica de medida da glicólise anaeróbica o primeiro deles, ou seja, o método manométrico. O procedimento adotado foi o seguinte. Os músculos dissecados eram finamente retalhados com tesoura, secados em papel de filtro e, em quantidade apropriada de meio, colocados nos frascos de WARBURG. Como esta série de experiên-

TABELA 17

*Glicose anaeróbica do músculo longitudinal de Holothuria*

Músculos picados suspensos em sol. a 0,01 M de glicose em água do mar artificial segundo PANTIN (bicarbonatada, pH = 7,0). Fase gasosa  $N_2/CO_2:95/5$ . Temperatura 25°C. Resultados (QN2) em mm3  $CO_2$

$CO_2$ /mgr. peso seco/hora. Resultados parciais em mm3  $CO_2$  /mgr. peso seco.

Tempo	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
15'	-0,142	-0,119	-0,080	-0,124
30	-0,071	-0,072	-0,014	-0,046
45	-0,022	0,000	0,007	0,000
60	0,000	0,010	0,008	0,010
75	0,013	0,021	0,014	0,020
90	0,022	0,015	0,015	0,021
105	0,018	0,016	0,014	0,026
120	0,022	0,015	0,015	0,026
135	0,044	0,036	-	-
150	0,035	0,031	-	-
QN2 x):	0,075	0,067	0,058	0,093
CO2				
Média 0,076±0,018				

x) na base do período compreendido entre 60 e 120 minutos.

cias tinha também o escôpo de estudar a ação de conhecidos inibidores da glicose sobre o músculo longitudinal, o meio de suspensão usado foi de 3 tipos: (a) água do mar de PANTIN glicosada (0,01 M); (b) sol. a M/600 de iodosobenzoato em água do mar de PANTIN glicosada; (c) sol. a  $10^{-3}$  de monoiodoacetato de sódio em água do mar de PANTIN glicosada.

TABELA 18

*Influência de iodobenzoato sobre a glicose anaeróbica de músculo longitudinal de Holothuria*

Músculos picados suspensos em sol. a M/600 de iodobenzoato em água do mar artificial segundo PANTIN (glicosada, 0,01M, bicarbonatada pH: 7,0). Fase gasosa N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: 95/5. Resultados expressos em mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub>/mgr. pêso sêco/hora. Resultados parciais em mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub>/mgr. pêso sêco. Temp. 25°C.

Tempo	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
15'	-0,256	-0,290	-0,255	-0,279
30	-0,119	-0,128	-0,149	-0,110
45	-0,010	-0,017	-0,048	-0,025
60	-0,020	-0,060	-0,005	-0,000
75	0,020	0,012	0,008	0,010
90	0,015	0,017	0,014	0,010
105	0,020	0,012	0,019	0,020
120	0,025	0,024	0,038	0,020
135	0,030	0,024	-	-
150	0,030	0,024	-	-
QN2 x)	0,080	0,065	0,079	0,060
CO <sub>2</sub>				
Média 0,071±0,010				

x) na base do período entre 60 e 120 minutos.

Conetados os frascos aos manômetros, eram os conjuntos levados ao banho e perfundidos durante 10 minutos com a mistura N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 95/5. Conseguida a estabilização, tomavam-se as leituras iniciais. As leituras subsequentes, todavia, deixaram bem claro que, a despeito de estarem os músculos em ambiente desprovido de oxigênio e da absoluta ausência de qualquer absorvedor químico de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos, êsse gás estava sendo fortemente absorvido, ao contrário de ser produzido, como se esperava. O fato pode ser deduzido das tabelas 17, 18 e 19. Sômente ao cabo de ca. de uma hora, é que CO<sub>2</sub> deixou de ser absorvido e a excursão manométrica passou a indicar que gás estava sendo produzido no interior dos frascos. Essa absorção de CO<sub>2</sub>, porém, não constituiu grande surpresa para mim, pois já a observara em circunstâncias idênticas quando, com SAWAYA (SAWAYA & MENDES 1953) determinara a atividade colinesterásica dos músculos longitudinais. Também, então, fôra enorme o poder de retenção de CO<sub>2</sub>. Tudo indica que o tecido, em presença de concentração anormalmente altas de CO<sub>2</sub> entra a absorvê-lo

até ficar em equilíbrio com o meio. Para provar essa asserção fiz uma experiência em sentido inverso, ou seja, procurei antes saturar o tecido com  $\text{CO}_2$  expondo-o 10 minutos a uma atmosfera de 100% desse gás. De acôrdo com as previsões, nesse caso, subsequentemente expôto a 5% de  $\text{CO}_2$ , o tecido deveria ceder gás ao ambiente. Foi exatamente o que aconteceu e se pode depreender da Fig. 2. Nessa Figura A representa a excursão manométrica quando o tecido, da concen-

TABELA 19

*Influência de monoiodoacetato sôbre a glicólise anaeróbica de músculo longitudinal de Holothuria.*

Músculos picados suspensos em sol. a  $10^{-3}$  de monoiodoacetato de sódio em água do mar artificial segundo PANTIN (glicosada, 0,01 M, bicarbonatada, pH: 7,0) Fase gasosa  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ :95/5. Resultados (QN2 ) em  $\text{CO}_2$  mm3  $\text{CO}_2$ /mgr. pêso sêco/hora. Resultados parciais em mm3  $\text{CO}_2$ /mgr. pêso sêco. Temp. 25°C.

Tempo	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
15'	-0,270	-0,273	-0,280	-0,215
30	-0,105	-0,113	-0,091	-0,093
45	-0,018	-0,026	-0,018	-0,030
60	-0,012	-0,015	0,000	0,000
75	0,000	0,000	0,000	0,008
90	0,006	0,005	0,006	0,009
105	0,006	0,005	0,018	0,017
120	0,006	0,015	0,018	0,021
135	0,012	0,026	-	-
150	0,012	0,021	-	-
QN <sub>2</sub> x)	0,018	0,025	0,042	0,047
CO <sub>2</sub>				

Média  $0,033 \pm 0,013$

x) na base do período compreendido entre 60 e 120 minutos.

tração atmosférica de  $\text{CO}_2$ , passou a ser expôto a 5% desse gás no interior dos frascos; B mostra a excursão quando o tecido muscular, no interior dos frascos, foi previamente saturado com 100%  $\text{CO}_2$  antes de ser expôto a 5%. Essa capacidade de reter ou ceder  $\text{CO}_2$  ao meio em concordância com o teor de gás no mesmo constitui grande estôrvo na medida manométrica da glicólise anaeróbica e pode ter sido a causa de muita discrepância de dados na literatura, como por exemplo, no caso do músculo da barata estudado por BARRON & TAHMISIAN (l.c.).

Tomando na devida conta essa necessidade de se esperar que o tecido primeiramente entrasse em equilíbrio com o meio, antes de come-

çar pròpriamente a medida da glicólise anaeróbica, a aferição desta última no músculo de *Holotúria* somente teve início quando, cesada completamente a absorção,  $\text{CO}_2$  começou a ser definitivamente produzido. Isso, porém, não evitou que se tornassem um tanto relativos os valores que aqui vão expostos para a glicólise anaeróbica do músculo longitudinal dêsse equinoderma. Assim os valores expressos nas tabelas 17, 18 e 19 talvez fôssem um pouco diferentes se fôsse escolhido um período de tempo posterior ao selecionado. De qualquer maneira, os resultados deixam bem claro a existência, no músculo longitudinal, de glicólise anaeróbica (o que, aliás, já tinham indicado os resultados obtidos com NaF) e permitem aquilatar das influências do iodosobenzoato e do monoiodoacetato sôbre a mesma. O iodosobenzoato (Tab. 18 & Fig. 3, B), na concentração usada, não parece ter afetado a glicólise anaeróbica significativamente. O monoiodoacetato, porém, a  $10^{-3}$ , inibiu-a parcialmente, reduzindo a menos de 50% a produção de  $\text{CO}_2$  (Tab. 19 & Fig. 3, C).

e) *O quociente respiratório do músculo longitudinal*

O quociente respiratório é um precioso indicador do tipo de substância que está sendo utilizada como fonte de energia nas atividades celulares e a sua determinação faz-se imprescindível em qualquer estudo metabólico. No caso do músculo longitudinal, como já foi informado, no método para essa determinação valeu-se do emprêgo dos frascos para o "segundo método" de DICKENS & SIMER (l.c.) e o procedimento adotado foi o mesmo por mim (MENDES 1953, p. 63) usado na determinação de quocientes respiratórios de estágios embrionários de *Rana pipiens*. Cada frasco recebeu exatamente 1 gr de tecido de músculo longitudinal, colocado no compartimento central em água do mar natural ou em água do mar fosfatada de PANTIN. Aos bulbos laterais foram adicionados 0,3 ml. de sol. 2N HCl. No compartimento externo dos frascos, finalmente, depositaram-se 0,3 ml de solução saturada de hidróxido de bário contida numa microbureta, cuidadosamente protegida contra contaminação por  $\text{CO}_2$ . Conetados rapidamente aos manômetros, eram os frascos imersos no banho ( $25^\circ\text{C}$ ) e perfundidos durante 10 minutos com oxigênio antes da estabilização e tomada das leituras iniciais. Em cada experiência, empregaram-se 3 frascos. Após as leituras iniciais, vertia-se ácido de ambos os bulbos laterais de um deles dentro dos compartimentos externo e interno, a fim de se determinar o " $\text{CO}_2$  inicial", ou seja como carbonato no  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  e de retenção (" $\text{bound CO}_2$ ") no tecido. O registro da libertação de  $\text{CO}_2$  nêsse frasco fazia-se posteriormente durante 20 minutos, com leitura a cada 5. Leituras do consumo de oxigênio faziam-se nos outros dois frascos cada 15 minutos, durante geralmente 1 hora. Ao final, despejava-se ácido nos compartimentos externo e interno dêsses dois últimos frascos e, assim, obtinha-se o " $\text{CO}_2$  final", cuja libertação se seguia durante 30 minutos, com leitura a cada 5. A

produção ou eliminação de  $\text{CO}_2$  calculava-se da subtração do "CO<sub>2</sub> inicial" ao "CO<sub>2</sub> final". O método, como se vê, foi uma combinação dos primeiro e segundo métodos de DICKENS & SIMER, nisso que, embora se utilizassem os frascos para o segundo, se usou  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  como absorvente de  $\text{CO}_2$ , como se faz no primeiro (no segundo método, coloca-se no compartimento externo permanganato acidificado que se converte em solução alcalina pela adição de  $\text{NaI}$  acidificado, oriundo de um dos bulbos laterais). O procedimento oferece as seguintes vantagens: (a) sobre o primeiro método: provê dois depósitos de ácido, um para a libertação de  $\text{CO}_2$

TABELA 20

*Quociente Respiratório de músculo longitudinal de Holothuria.*

Temperatura 25°C. Dados numéricos em mm<sup>3</sup> de gás absorvido ou eliminado por 1 grama de pêso úmido.  $\text{CO}_2$  inicial calculado na base de quantidade de gás despreendido pelo tratamento com ácido de 1 grama de tecido fresco.

Meio de Suspensão	Duração (mins.)	CO <sub>2</sub> inicial	CO <sub>2</sub> final	CO <sub>2</sub> elim.	O <sub>2</sub> consum.	QR
Água do mar natural	60	59,7	109,4	49,7	43,7	1,14
	60	64,8	111,2	46,4	35,1	1,32
	60	64,8	101,2	36,4	34,7	1,05
	60*)	59,7	63,7	4,0	3,0	1,00
	60	52,9	73,9	21,0	21,8	0,96
	60	52,9	104,6	43,5	46,3	0,94
	60	43,4	77,5	34,1	34,4	0,99
	60	43,4	74,6	31,2	31,7	0,98
	60	54,7	81,9	27,2	24,2	1,12
	60	54,7	83,0	28,3	31,0	0,91
						1,07
Água do mar de PANTIN fosf.	75	38,3	53,3	15,0	14,1	1,06
	75	38,3	58,7	20,4	15,3	1,31
	60	24,0	54,7	30,7	25,4	1,21
	60	24,0	52,7	28,7	23,0	1,25
						1,21

\*) Possivelmente deve ter caído ácido sobre o músculo, de que resultou parada de sua atividade.

do meio e do tecido e outro para a decomposição de  $BA(OH)_2$ ; (b) sobre o segundo: provê a possibilidade de uma medida direta e fracionada do consumo de oxigênio durante a experiência e evita qualquer acúmulo de  $CO_2$ .

Os resultados das determinações constam da Tabela 20. Os valores médios obtidos tanto em água do mar natural como em água do mar fosfatada de PANTIN sugerem um metabolismo do tipo carboidrático.

## B) Sobre o equipamento enzimático do músculo longitudinal

Nada consta, ao que parece, na literatura relativa aos músculos da holotúria, sobre as enzimas que, no músculo estriado dos vertebrados, p.e. catalizam as várias passagens da glicólise e do ciclo de SZENT GYOERGYI - KREBS. Igualmente, não pude encontrar informação sobre a atividade citocromo-citocromoxidásica e a atividade ATPásica possivelmente existentes no músculo do equinoderma em questão. Julguei, assim, de interêsse a pesquisa no referido músculo dessas duas últimas atividades, bem como da atividade deshidrogenásica.

### a) A atividade citocromo-citocromoxidásica.

Já no trabalho de JORDAN (1914, p. 377) encontra-se a referência de que nos músculos longitudinais das holotúrias a cor pode variar de branco a avermelhado. No caso de *H. grisea*, os músculos são geralmente brancos, embora, em casos mais raros, possam apresentar tons avermelhados. Isso, todavia, condiz com uma tonalidade rósea geral apresentada pela face interna da parede do corpo em certos animais, não me sendo possível ainda precisar se tal se deve a um particular estado fisiológico desses animais ou a uma irritação causada pelas condições artificiais de manutenção, razão pela qual tais animais nunca foram usados. Alguns músculos brancos dissecados, quando postos na geladeira a  $-5^{\circ}C$ , adquiriram, sem que fosse de antemão possível estabelecer qualquer previsão, uma coloração nitidamente amarelada. Não consegui também descobrir se essa manifestação de cor se correlaciona com um particular estado fisiológico, por exemplo, o sexo ou a fase de maturação das gônadas. De qualquer maneira, os músculos longitudinais podem exibir coloração e isso levou-me a pesquisar se, como no caso de outros tipos de músculos, esse fato tinha alguma ligação com a presença de pigmentos respiratórios do tipo do citocromo e, conseqüentemente, com a existência de atividade citocromoxidásica no material estudado.

A tentativa de extração de citocromo fez-se pela modificação de POTTER (1946, p. 188) ao método de KEILIN & HARTREE (1937). Submeti o músculo finamente triturado ao seguinte processo: tratamen-

to durante duas horas com ácido tricloracético (0,15 N); filtração em gase de malhas estreitas; neutralização do filtrado com NaOH e centrifugação por 10 minutos. O fluido claro sobrenadante, examinado ao espectroscópio manual do tipo ZEISS, não mostrou, como acontece com o músculo do vertebrado (p. ex. o coração do boi) nessa fase da preparação, as faixas de absorção características do citocromo C reduzido. Não obstante, continuou-se com a extração: sucessivo tratamento com sulfato de amônio e pernoite na geladeira a  $-5^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte: filtração e tratamento com ácido tricloracético. Centrifugação subsequente não produziu depósito de material (no caso do coração de boi, surge aqui um depósito vermelho apreciável). À vista desse resultado, não se prosseguiu com a extração. O fluido obtido, examinado ao fotômetro de BECKMANN, nem assim mostrou absorção nas zonas características do citocromo. Nessa tentativa de extração foram usados músculos brancos e os que ficavam amarelos com a permanência na geladeira.

O fato, todavia, de não ter sido possível extrair citocromo pelo método empregado não excluiu a possibilidade desse pigmento ocorrer em diminutas quantidades, não analisáveis com a técnica de POTTER, que se destina aos casos de músculos de teor reconhecidamente alto em citocromo. Como a coloração de alguns músculos estava a sugerir a presença de algum cromógeno, possivelmente um composto do tipo heme, aplicou-se aos dois tipos de músculos da holotúria o *test da Benzidina*. Esse teste foi aplicado segundo as prescrições de HAWK, OSER & SUMMERSON (1947, p. 437). A benzidina foi preparada a partir de cloridrato de benzidina, a que se adicionou acetato de sódio. O produto da reação foi filtrado em funil de Buchner e lavada a benzidina em ácido acético glacial durante a filtração. O *test* foi aplicado primeiramente no músculo "branco": triturou-se o músculo em quartzo e água destilada. 2ml da suspensão receberam 3 ml de sol. de benzidina em ácido acético glacial e 3 gotas de água oxigenada (10 vols.). Houve um desenvolvimento lento de côr levemente rósea. O *test* foi, a seguir, aplicado ao músculo "amarelo": houve o desenvolvimento lento, mas definido, de côr azul-violeta. Finalmente, aplicou-se o *test* ao líquido em que jaziam, na geladeira, músculos amarelos e brancos: houve aqui também desenvolvimento de côr azul-violeta. À guisa de contrôle, o *test* foi aplicado ao sangue humano e aos músculos indiretos do vôo (vermelhos) e elevadores da coxa do bezouro d'água (*Hydrophilus*, pesquisa, em curso no laboratório, de EDWARDS & PEREZ GONZALEZ) com resultados amplamente positivos. Os resultados obtidos com os músculos "brancos" e "amarelos", assim, sugerem a presença de um composto do tipo heme, de que seriam mais ricos os últimos músculos.

Esse composto, todavia, não pode evidentemente ser identificado pelo *test*, mas bem poderia ser o citocromo ou a citocromoxidase. A possibilidade de ser esta última levou-me à investigação da *atividade de cito-*

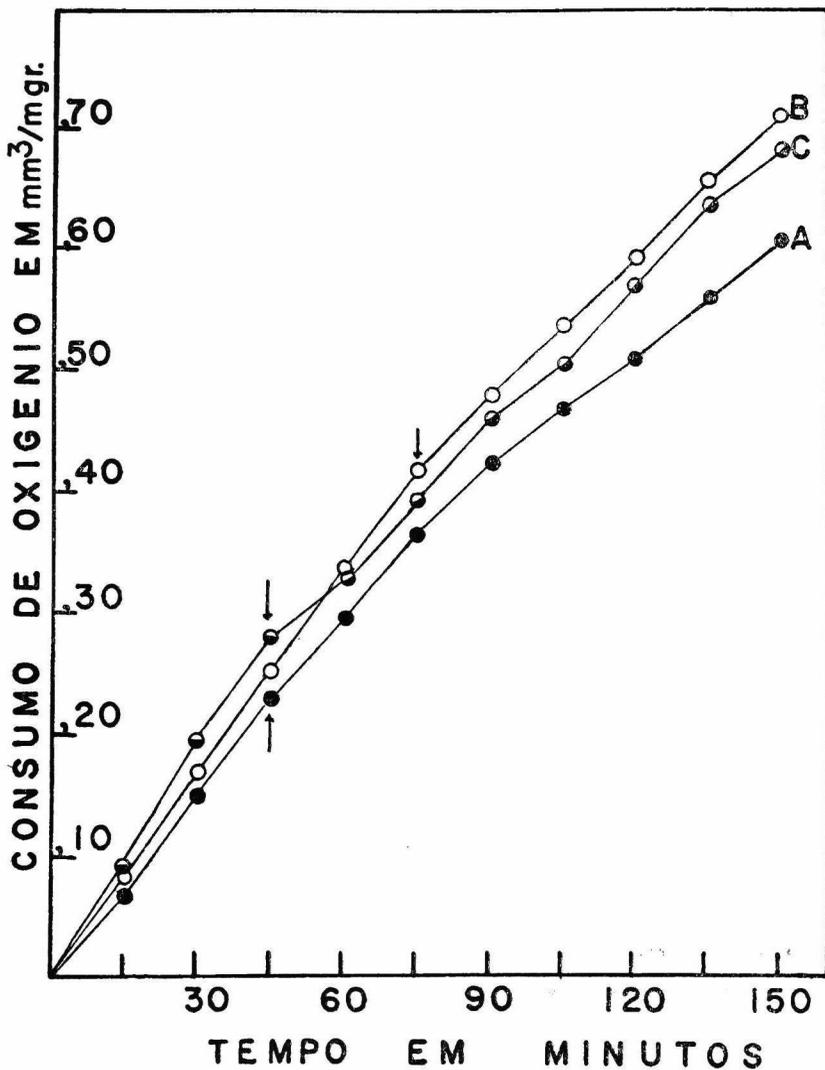


Fig. 1 Ação de NaF, a 10-3 M, sôbre o consumo de oxigênio de m. longitudinal de *H. grisea*. Setas indicam momento de adição do inibidor.

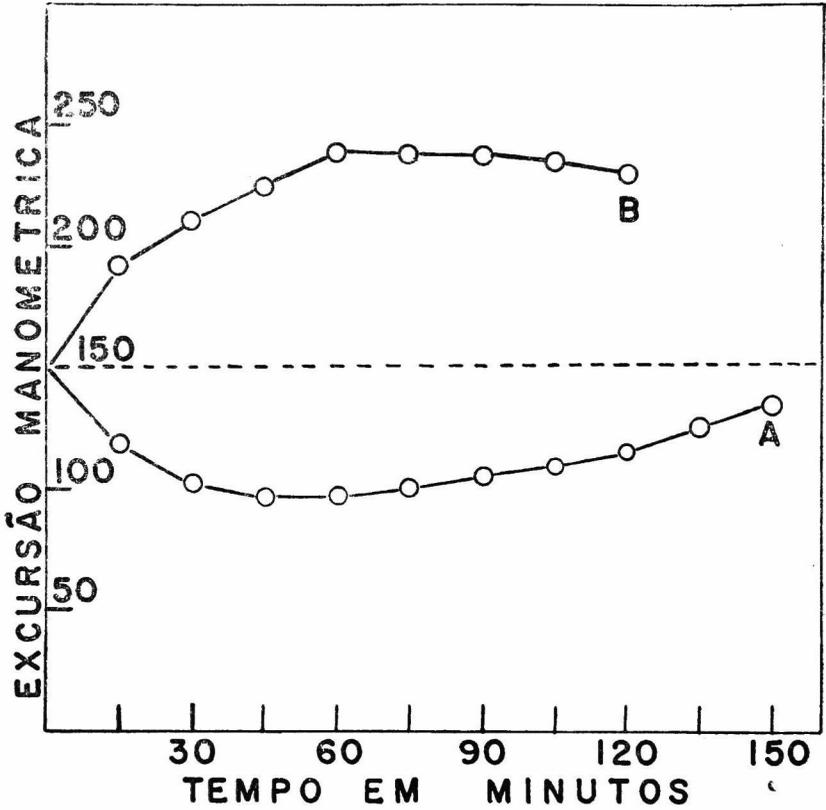


Fig. 2 Comportamento de m.longitudinal, picado, de *H. grisea* em face de 5% de CO em N . A: fase gasosa prévia, ar comum. B: fase gasosa prévia, 100% CO .

*citocromoxidásica do músculo longitudinal.* A técnica empregada foi a descrita por SCHENEIDER & POTTER (1943) que permite a determinação da oxidase citocrômica concomitantemente com a da desidrogenase succínica. Serão descritos nesta secção, porém, apenas os resultados referentes à atividade citocromoxidásica. A técnica é manométrica e se vale da redução quimicamente operada do citocrômo e da sua reoxidação por obra dos extratos ou homogenizados de tecido. Nêsse caso, o fator limitante é a enzima (ou enzimas) que realizam a reação entre o citocrômo reduzido e o oxigênio, ou seja, a oxidase citocrômica. Nas experiências usou-se ascorbato de Sódio (VIT. C. TORRES) como redutor. Citocrômo e ascorbato dissolveram-se em água do mar de PANTIN. Extratos e homogenizados foram usados na base de 1 gr de músculo mais 10 ml de água do mar de PANTIN. As tabelas 21 e 22 informam sôbre os resultados típicos colhidos com extratos e homogenizados.

TABELA 21

*Reagentes e resultados do ensaio da atividade citocromoxidásica de músculos longitudinais de Holothuria*

Poco central com 0,3 ml de 12%KOH, perfusão prévia com oxigênio, 10 minutos para aquilibração, 25°C.

N.º dos frascos	1	2	3
	ml.	ml.	ml.
Água da mar de PANTIN	1,2	0,7	0,2
Citocrômo a 10-4	1,0	1,0	1,0
Ascorbato de sódio 0,114M	0,3	0,3	0,3
EXTRATO total de músculo	0,5	1,0	1,5
Consumo de oxigênio em mm3	19,0	21,4	20,4
(Média de 4 períodos de 10 minutos)			

No gráfico da Fig. 4 estão indicados os cursos da absorção de oxigênio no caso de extrato (B) e homogenizado (A) de músculo longitudinal. Tanto as tabelas como o gráfico indicam que êsse músculo tem uma pronunciada atividade citocromoxidásica, que é maior no caso do homogenizado, embora fortemente presente também nos extratos. No caso do homogenizado, o ensaio, feito em dois níveis de concentração de tecido, constitui prova de que o consumo é proporcional a esta última.

b) *A atividade deshidrogenásica.*

No caso bem estudado dos músculos esqueléticos dos vertebrados e em muitos outros, sabe-se que o ácido pirúvico em presença de oxí-

TABELA 22

*Reagentes e resultados do ensaio da atividade citocromoxidásica de músculos longitudinais de Holothuria*

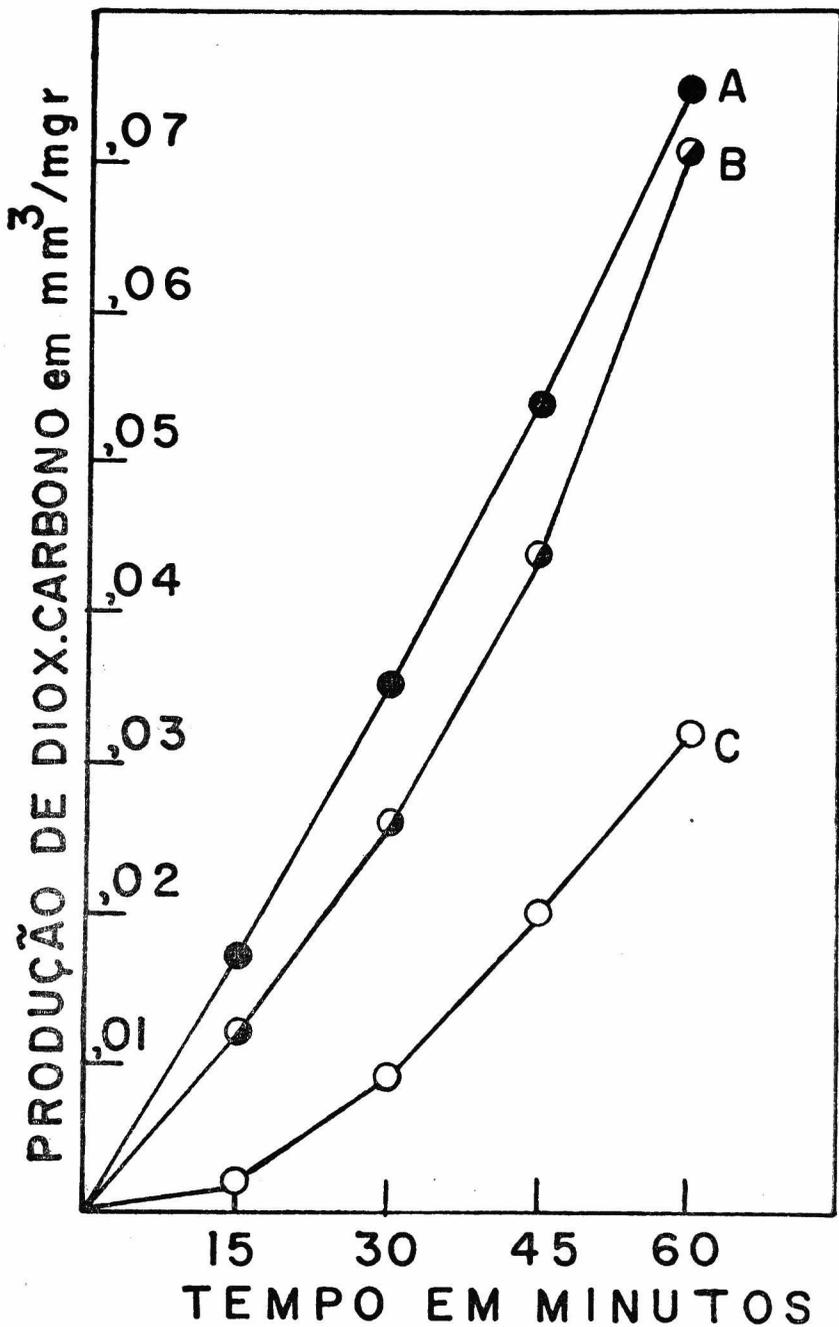
Poço central com 0,3 ml de 12% KOH, perfusão prévia com oxigênio, 10 minutos para equilíbrio, 25°C.

Número dos frascos	1	2	3
	ml	ml	ml
Água do mar de PANTIN	1,6	1,65	1,65
Citrocromo 10 <sup>-4</sup>	1,0	1,0	1,0
Ascorbato de sódio 0,114M	0,3	0,3	0,3
HOMOGENIZADO total de músculo	0,1	0,05	0,05
Consumo de oxigênio em mm <sup>3</sup>	42,2	29,5	29,4
(média de 4 períodos de 10 minutos)			

gênio é completamente oxidado a CO<sub>2</sub> e água através do ciclo de SZENT GYOERGYI - KREBS. E ainda mais, que 5 passagens desse ciclo são controlados por enzimas que entregam 2 H subtraídos do substrato ao oxigênio por meio do sistema citocromo-citocromoxidase. Dessas deshidrogenases, as mais bem estudadas são a succínica e a málica. A determinação de atividade succino-deshidrogenásica ou malicodeshidrogenásica, portanto, implica mais ou menos na admissão da existência do ciclo de SZENT GYOERGYI - KREBS no tecido em que tal se dá. O fato de experiências anteriores terem indicado claramente que o músculo longitudinal da holotúria é sede de glicólise anaeróbica e possui atividade citocromoxidásica, induziu-me à investigação das atividades deshidrogenásicas desse material.

A possível existência de *deshidrogenase succínica* no músculo longitudinal foi pesquisada de duas maneiras: pela técnica de THUNBERG e pela já mencionada técnica de SCHNEIDER & POTTER (1.c.).

No primeiro caso, 1 ml de homogenizado ou extrato era colocado no bulbo da tampa e no interior do tubo depositavam-se 2 ml. de água do mar de PANTIN, 1 ml de azul de metileno (AM) a 4x10<sup>-4</sup> e 2 ml de 0,5 M succinato de sódio. O interior dos tubos era a seguir "lavado" por uma corrente de nitrogênio purificado em pirogalol alcalino e, depois de tampados os tubos, procedia-se à evacuação dos mesmos durante 5 minutos. Eram, então, colocados no banho a 25°C e, ao cabo de 10 minutos, misturavam-se os conteúdos de tubo e tampa. Nas experiências em que se usou extrato, a descoloração do AM sobreveio tardiamente, nunca antes de terem decorrido 12 horas. Nas experiências com homogenizados os resultados foram ainda piores, porquanto nem



**Fig. 3** A medida manométrica da glicólise anaeróbica de m. longitudinal de *H. grisea*.  
 A, normal. B, em presença de iodosobenzoato a M/600. C, em presença de moniodoacetato a 10-3.

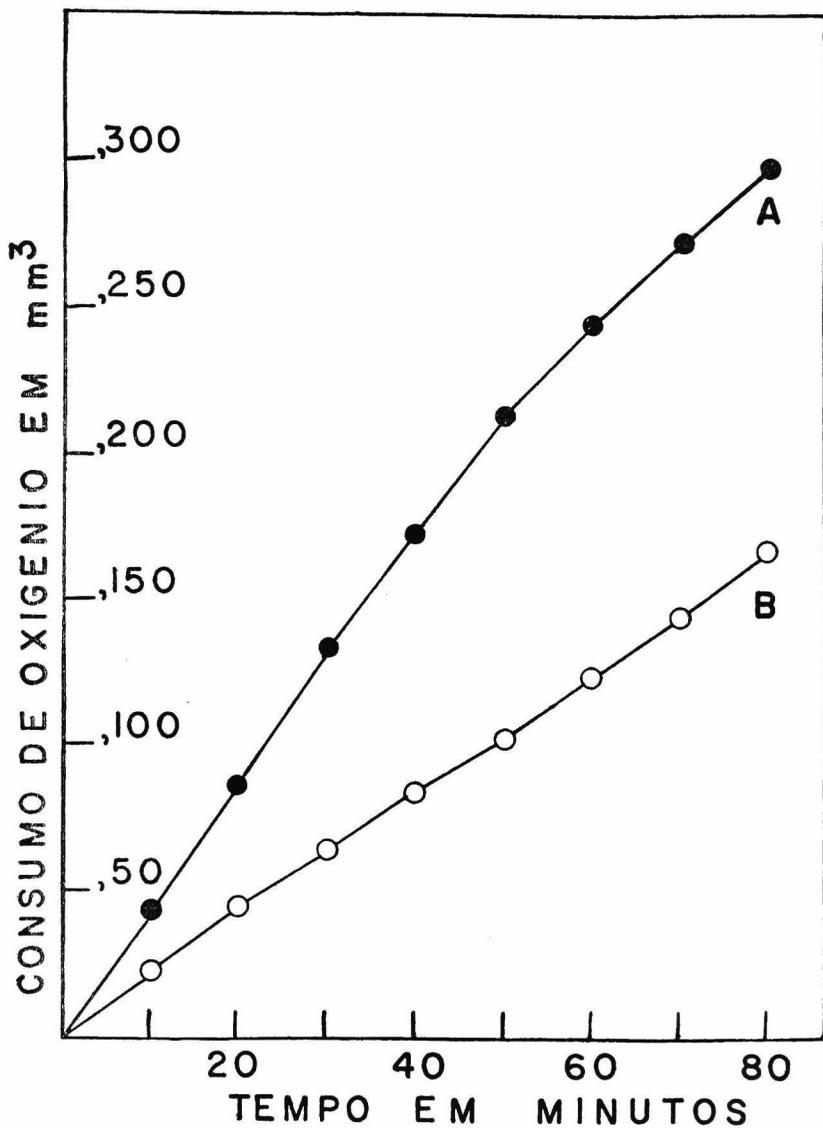


Fig. 4 Determinação manométrica da atividade citocromoxidásica de *m. longitudinal* de *H. grisea*. A, ação de homogenizado. B, ação de extrato.

com a adição de cloreto de alumínio, foi conseguida descoloração do AM.

A despeito desses resultados negativos, fez-se o ensaio de SCHNEIDER & POTTER (l.c.) cujos arranjo e resultados constam da tabela 22. O princípio desse ensaio consiste em que, quando o succinato é o substrato, o fator limitante, em presença de citocromo e co-fatores, é a enzima (ou as enzimas) que oxidam o succinato e reduzem o citocromo, ou seja, a desidrogenase succínica do tecido.

TABELA 22

*Reagentes e resultado do ensaio da atividade succinodeshidrogenásica do músculo longitudinal de Holothuria*

Poço central com 0,3 ml. de KOH 12%, perfusão prévia com O<sub>2</sub>, 10 minutos para equilíbrio, 25°C.

Número dos frascos	1	2	3
	ml	ml	ml
Água do mar de PANTIN	1,9	1,8	2,1
Succinato de sódio 0,5M	0,3	0,3	0,3
Citocromo 10-4	0,4	0,4	0,4
AlCl <sub>3</sub> 4 x 10-3M	0,3	0,3	0,3
EXTRATO ou HOMOGENIZADO	0,1	0,2	0,3

Não se registrou consumo de oxigênio.

Os resultados obtidos concordaram inteiramente com os da série anterior e sugerem que a atividade succinodeshidrogenásica do músculo longitudinal da holotúria é nula ou mínima.

O estudo da *deshidrogenase málica* fez-se igualmente pela técnica de THUNBERG e pela técnica manométrica. No primeiro caso, o procedimento foi semelhante ao do emprêgo da mesma técnica para a verificação de desidrogenase succínica. Apenas, o succinato foi substituído por malato de sódio a 0,5 M e, na metade das experiências, usou-se 1 ml. de Co I (di-fosfo-piridin-nucleótido) que, no caso do músculo esquelético dos vertebrados, é o elo funcional entre a desidrogenase málica e o citocromo. Na ausência de Co I, a descoloração do AM sobreveio tão tardiamente como quando succinato foi usado como substrato. Na presença do Co I, todavia, notou-se uma descoloração muito mais precoce, embora também algo tardia, pois nunca se completou antes do decurso de 5 horas.

O ensaio monométrico fez-se segundo as recomendações de POTTER (l.c., p. 97). O arranjo e o resultado típicos de um desses ensaios consta da tabela 23. A falta de consumo de oxigênio observada

em todos os casos, em concordância com os resultados obtidos pela técnica de THUNBERG, está a sugerir igualmente que no músculo longitudinal da holotúria é mínima a atividade malicodeshidrogenásica, embora, talvez, mais acentuada do que a atividade succinodeshidrogenásica.

TABELA 23

*Reagentes e resultado do ensaio da atividade malicodeshidrogenásica do músculo longitudinal de Holothuria*

Poço central com 0,3 ml. de 12% KOH, perfusão prévia com oxigênio, 10 minutos para equilibração, 25°C.

Números dos frascos	1	2	3	4
	ml	ml	ml	ml
Água do mar de PANTIN	1,5	1,4	0,9	0,8
Nicotinamida 0,1 M	0,3	0,3	0,3	0,3
Glutamato de sódio 0,5M	0,3	0,3	0,3	0,3
Citocrômio 4x10-4	0,3	0,3	0,3	0,3
Malato de sódio 0,5M	0,3	0,3	0,3	0,3
Extrato ou Homogenizado	0,1	0,2	0,1	0,2
Co I (no bulbo, adicion. após equil.)	0,2	0,2	0,2	0,2
Extrato de MEYERHOF	-	-	0,6	0,6

Não foi registrado consumo de oxigênio, a não ser em presença de Extrato de MEYERHOF.

Com relação à Tabela 23, à guisa de informação, poderia acrescentar que o arranjo de POTTER permite a determinação concomitante de atividades malicodeshidrogenásica e "CoI-Citocrômio"-redutásica. Dessa última encarregam-se os frascos 3 e 4, que por isso recebem Extrato de MEYERHOF, preparado de músculo de mamífero (rata) e rico em desidrogenase málica. Nicotinamida é usada para impedir a decomposição do CoI que frequentemente ocorre em homogenizados. Glutamato, à custa da transaminase que o tecido normalmente deve ter, cede ao oxalacético resultante da desidrogenização do málico, o seu -NH<sub>2</sub> e, assim, elimina-se do sistema o oxalacético, que é inibidor da atividade málicodeshidrogenásica.

### c) Atividade adenosintrifosfatásica.

O fato de MEYERHOF (1928) ter determinado que em *Holothuria* o fosfágeno é a fosfoarginina, que se romperia durante o trabalho muscular, sugeriu a necessidade de se investigar a atividade adenosintrifosfatásica

do músculo longitudinal. Essa investigação processou-se de duas maneiras. Primeiramente, projetou-se um método manométrico da medida da atividade ATPásica, que teve por fundamento o seguinte: o ácido fosfórico libertado do ATP pela ação enzimática entraria em reação com o bicarbonato da água do mar de PANTIN, disso resultando a produção de CO<sub>2</sub>. O arranjo típico das experiências consta da tabela 24.

TABELA 24

*Reagentes e resultados do ensaio da atividade ATPásica do músculo longitudinal da Holothuria*

Perfusão prévia com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>=95/5, 10 minutos para equilibração, ATP adicionado 10 minutos após equilibração. Temper. 25°C.

Números dos frascos	1	2	3	4	5	6
	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.
Água do mar de PANTIN (bulbo)	-	0,2	-	-	-	-
Água do mar de PANTIN (câmara)	2,0	-	-	-	-	-
ATP a 0,013 M (bulbo)	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,2
HOMOGENIZADO (câmara)	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Produção de CO <sub>2</sub> (mm <sup>3</sup> /h.)	64,4	4,1	64,1	65,1	64,8	60,8

Nesta série de experiência, considerou-se como "homogenizado" o líquido colhido após sedimentação do material sólido nas suspensões resultantes da adição da água do mar de PANTIN ao músculo triturado. Assim se procedeu a fim de evitar a forte absorção de CO<sub>2</sub> por parte de fragmentos de tecido, a que já se fez referência. Os resultados indicam que, após ca. de uma hora de contacto com tais "homogenizados", não houve cisão analisável do ATP, pois no frasco n.º 1, onde não havia homogenizado, houve produção idêntica de CO<sub>2</sub>. Esse CO<sub>2</sub> deve ter-se

TABELA 25

*Reagentes para o ensaio ATPásico (25°C)*

Número dos tubos de ensaio	1	2	3	4	5
	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.
Água destilada	0,20	0,10	0,45	0,25	0,30
Dietilbarbiturato 0,5M	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
CaCl <sub>2</sub> 0,04M	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
ATP 0,013 M	0,15	0,15	-	-	0,15
HOMOGENIZADO	0,10	0,20	-	0,20	-
Gamas de P do ATP hidrolizado	69,3	72,15	-	0,00	661
	68,2	72,05	-	0,00	66,1

originado do ataque ao bicarbonato por ácido fosfórico resultante de hidrólise natural, não enzimática, do ATP, depois da sua preparação a partir de sais de Bário.

O segundo método de aferição da atividade ATPásica foi o descrito por POTTER & DUBOIS (1943), que consiste na medida do fosfato inorgânico libertado quando se satura a enzima com ions de Ca (co-fator indispensável) e ATP, em condições tais que essa libertação seja proporcional ao tempo e à concentração do tecido. A tabela 25 dá uma idéia do arranjo de uma de tais determinações.

Os tubos eram colocados no banho a 25°C e, após 5 minutos, era adicionado o extrato ou homogenizado. Decorridos 15 minutos, juntava-se a cada tubo 0,1 ml de ácido triclorácetico a 50%. Em seguida a essa desproteinização, tomava-se de cada tubo um alíquota, que era imediatamente alcalinizada com amoníaco em presença de paranitrofenol e o fósforo inorgânico era separado sob a forma de fosfato de cálcio. O precipitado desse composto, depois de lavado, era dissolvido em ácido sulfúrico e o fósforo era determinado segundo o método de SALOMÉ PEREIRA (1939).

Os resultados obtidos com esse segundo método também não falam em favor de uma cisão enzimática do ATP. Aliás, há alguma concordância entre os resultados obtidos para o ácido fosfórico oriundo de hidrólise não enzimática com os dois métodos. Apropriadamente convertido em gamas de P, o valor médio para a produção de CO<sub>2</sub> equivale a ca. 83. Mais ATP, porém, foi usado no processo manométrico.

O método manométrico aqui descrito não me consta tenha sido anteriormente empregado para o fim precípuo da determinação da atividade ATPásica. Ele, porém, tem sido usado no estudo da interferência dessa atividade em determinações de glicólise anaeróbica pelo método manométrico (cf. BARRON & TAHMISIAN l.c., p. 68).

## DISCUSSÃO

A interpretação dos resultados obtidos com o músculo longitudinal da holotúria é difícil em virtude dos grandes claros ainda existentes no quadro geral dos fenômenos físico-químicos que acompanham ou são correlatos com a sua atividade. Realmente, como já foi dito no final da introdução, muitos dos aspectos da fisiologia do músculo longitudinal aqui pesquisados, o foram pela primeira vez neste trabalho e, assim, resta-me nesta discussão, apenas abordar e comentar os pormenores das técnicas empregadas e procurar analisar os resultados colhidos em função do que se sabe a respeito do funcionamento do músculo liso em geral e do músculo liso do invertebrado em particular.

a. As medidas do consumo de oxigênio fizeram-se pela técnica de WARBURG com músculos picados (chopped) ou inteiros. A justificativa

dêsse procedimento pode ser encontrada em COHEN (1946,p.79) ou FIELD (1948, pp. 296-297), ambos concordes em que a técnica do seccionamento em fatias não dá resultados satisfatórios, mesmo no caso do músculo estriado. Este é composto de fibras alongadas e o seccionamento em fatias delgadas sempre redundam em extensivo dano celular, que impossibilitam ulteriores estádios metabólicos estáveis necessários à experimentação. No caso do músculo esquelético recorre-se frequentemente à "técnica da tira muscular" (muscle strip technique), em que o material é cuidadosamente dissociado em finas tiras musculares compostas por feixes íntegros de fibras. Essa técnica foi, um tanto modificada, a de BARRON & TAHMISIAN (1.c.) no caso do músculo da coxa da barata. No músculo liso a questão complica-se mais ainda. Em primeiro lugar, êle é rico em elementos intersticiais de natureza conjuntiva que tornam impossível o uso da "muscle strip technique". Essa última dificuldade é diminuída no caso dos invertebrados, onde o tecido muscular liso se apresenta mais frequentemente organizado em músculo anatómico. Mas, nem por isso, deixa de estar presente. Eis porque foi de início afastada a hipótese de se seccionar em fatias o músculo longitudinal. Recorreu-se então à técnica do "chopped muscle", a qual embora podendo produzir lesões nas fibras, o faz em dose incomparavelmente menor que no caso do seccionamento em tênues fatias. Essa técnica teria sido empregada com benefícios. Todavia, durante a experiência, os pequenos fragmentos do músculo no interior dos frascos, na agitação a que estes eram submetidos, entraram a elaborar uma excessiva quantidade de muco, o qual poderia se constituir em fonte de absorção de oxigênio. Apelei, assim, finalmente, para o uso do músculo intacto, a despeito do reconhecido inconveniente representado pela menor difusibilidade dos gases respiratórios em tais condições. Não fui o primeiro a encontrar tal dificuldade técnica. GLAISTER & KERLY (1.c.) também usaram músculo intacto de *Mytilus* e consideraram isso possível, dada a lenta taxa de consumo de oxigênio. Essas duas autoras, além disso, não notaram diferenças de consumo entre grandes e pequenos músculos.

As condições mais favoráveis de trabalho incluíram, também, como fase gasosa no interior dos frascos, o oxigênio puro e, como meio de suspensão, a água do mar bicarbonatada de PANTIN, de pH ca. 7,0, após rápida gazeificação com CO<sub>2</sub>. No caso do músculo de *Mytilus* estudado por GLAISTER & KERLY (1.c.), as taxas respiratórias mais altas foram registradas a pH 8,4 (água do mar natural) e 7,2 (água do mar tampoadada com fosfato). Água do mar fosfatada de PANTIN, porém, no caso da holotúria, foi o meio de suspensão em que se registrou o consumo de oxigênio menor. Não tive a preocupação, como GLAISTER & KERLY, de registrar o consumo em função da temperatura, porquanto a nossa holotúria, ao contrário do que sucede com o *Mytilus* na Europa, não está naturalmente sujeita a grandes variações de temperatura.

O consumo de oxigênio registrado, todavia, pareceu depender do tempo que os animais doadores tinham permanecido no aquário. A análise das tabelas de 1 a 14 mostram que, via de regra, os músculos dissecados no segundo dia consomem menos oxigênio. Numa ocasião em que foram usados músculos dissecados no 6.º dia, o consumo, pelo contrário, foi notavelmente alto. É difícil encontrar uma explicação para o caso. Poder-se-ia pensar em que essas flutuações fossem correlacionadas com o fenômeno da evisceração. De fato, os animais, via de regra, entre o primeiro e o segundo dia de aquário, evisceravam. Os distúrbios que acompanham tal processo poderiam ter refletido no metabolismo dos músculos longitundinais.

O valor médio para o consumo de oxigênio nas condições consideradas padrões, ou seja, um  $QO_2$  de 0,223 a 25°C, é aproximadamente igual ao que GLAISTER & KERLY (1.c.) acharam para o retrator do pé (bisso) de *Mytilus* (0,220 a 15° e 0,240 a 25°) e que MEYERHOF & LOHMANN (1926) encontraram para o intestino da rã (0,280 a 20°). É, por outro lado, bastante inferior ao valor relatado por ROSENTHAL & LASNITSKI (1.c.) para o músculo liso do mamífero (p. ex., o colon do coelho, com 2,64).

b. Nas experiências em que se fez uso da glicose e de piruvato como substratos a serem possivelmente metabolizados pelo músculo longitudinal, não se observou significativo aumento no consumo de oxigênio. Os valores médios obtidos foram, na verdade, apenas levemente superiores ao das condições normais. Já foi dito, porém, que o fato de um tecido não se utilizar da adição da glicose ou dos produtos intermediários do seu catabolismo não significa que, normalmente, não faça uso de seus próprios estoques dêsse açúcar ou de glicogênio. Assim, no caso do músculo da coxa da barata, BARRON & TAHMISSAN (1.c.) observaram que a adição de glicose não causou aumento na taxa respiratória do músculo do macho, mas o fez no caso do músculo da fêmea. Em concordância com esses resultados, determinaram que o teor de glicogênio no macho era muitíssimo mais alto do que na fêmea, estando esta última, pois, (por razões hormonais, descobriu-se depois) com deficiência no suprimento dessa reserva. Possivelmente o músculo longitudinal se comporta em face da adição de glicose ou piruvato, como o músculo do macho da barata.

Também GLAISTER & KERLY (1.c.) não observaram aumento no consumo de oxigênio quando ao meio de suspensão do retrator de *Mytilus* foi adicionada a glicose ou lactato de lítio. Em alguns casos, pelo contrário, decréscimo no consumo foi registrado.

c. A tentativa de inibir o consumo de oxigênio com solução a 10-4 de monoiodoacetato de sódio falhou, possivelmente por não ter sido a droga usada em concentração suficiente. Todavia, pelo emprêgo de

solução a  $10^{-3}$ M de fluoreto de sódio, em presença de 0,01 M glicose, o consumo de oxigênio do músculo longitudinal, picado ou intacto, foi significativamente diminuído. Essa diminuição surgiu imediatamente à adição da droga. Já se disse, anteriormente, do modo pelo qual o fluoreto afetaria a glicólise. Acrescenta-se aqui que o *situs* dessa ação se encontra na passagem da glicólise anaeróbica em que o ácido fosfoglicérico se converte em ácido fosfopirúvico (Segundo BONNER e THIEMANN (1950), porém, NaF agiria no ciclo de KREBS). A diminuição do consumo de oxigênio pelo NaF seria um indício de que no músculo longitudinal o catabolismo do glicogênio passaria por pelo menos alguns dos produtos intermediários da glicólise dos músculos esqueléticos dos vertebrados. GLAISTER & KERLY (l.c.) também obtiveram diminuição do consumo de oxigênio do retrator de *Mytilus* à custa de inibidor, que foi precisamente o moniodoacetato na concentração de 10-4. O *situs* de ação deste último inibidor é também passagem da glicólise anterior à formação de ácido pirúvico ou ácido láctico, de modo que é possível, pela adição de piruvato ou lactato, ao músculo envenenado com moniodoacetato, fazer com que o consumo de oxigênio aumente de novo (KREBS 1941). De fato, isso aconteceu no caso do retrator de *Mytilus*. Infelizmente, ainda não me foi possível tentar essa atenuação dos efeitos de inibidor da glicólise, no caso do músculo longitudinal da holotúria.

d. A medida da glicólise anaeróbica do músculo longitudinal encontrou sério obstáculo na grande tendência do tecido em questão de absorver  $\text{CO}_2$  quando em presença de atmosfera rica desse gás. Foi lembrado que possivelmente muitos dados discrepantes da literatura a respeito da medida em questão podem ter-se originado de falta de correção nas determinações quanto ao  $\text{CO}_2$  retido, uma vez que tais experiências sempre se realizam com quantidades relativamente grandes de tecido em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em nitrogênio. No caso do músculo do músculo da barata estudado por BARRON & TAHMISIAN (l.c.), a que se fez aceno, esses autores relataram que a medida da glicólise anaeróbica feita em circunstâncias análogas às deste trabalho levava a resultado bem diverso, e maior, do que quando se aferia esse mesmo processo com base na dosagem fotométrica do ácido láctico formado. BARRON & TAMISIAN atribuíram a discordância ao fato de que possivelmente, no cálculo do ácido láctico formado baseado no  $\text{CO}_2$  produzido, deve ter sido levado em conta muito  $\text{CO}_2$  que se formou à custa de reação entre ácido fosfórico oriundo da decomposição de ATP e o bicarbonato do meio. Bastaria, porém, ter BARRON & TAMISIAN saturado previamente o meio de suspensão com  $\text{CO}_2$ , e poderia suceder que o excessivo  $\text{CO}_2$  médio fosse devido mais a um ajuste inicial entre o tecido e o meio gasoso no interior dos frascos, à semelhança do caso constante da Fig. 2, B, deste trabalho.

O valor médio achado na série normal para a produção horária de  $\text{CO}_2$  por mgr de pêso sêco, foi de 0,076, o que equivale a ca. de 0,050 mgr de ácido láctico por gr de pêso fresco. (O cálculo dessa equivalência consistiu em considerar o pêso sêco em cada experimento da tabela 17 como 16,5% do pêso fresco e cada microlitro de  $\text{CO}_2$  como equivalendo a 4 gamas de ácido láctico). Essa produção de ácido láctico é inferior à achada por GLAISTER & KERLY (l.c.) no retrator do bisso (0,067 a  $25^\circ\text{C}$ ). O valor encontrado por MEYERHOF & LOHMANN (1926) no caso do intestino da rã foi de 0,50, em meio glicosado, a  $20^\circ\text{C}$ .

As experiências indicaram pois, a existência de glicólise anaeróbica no músculo em questão. Aliás, não esta a primeira vez que alguém se ocupou do problema na holotúria. Em 1947, HARTING, numa curta nota, deu conta da ação de inibidores de grupos sulfidrilicos sôbre, a glicólise anaeróbica do músculo (presumivelmente o retrator) de *Thyone*. A autora, todavia, não forneceu dados numéricos sôbre o processo, apenas se limitou a informar muito sucintamente que o monoiodoacetato de sódio a 0,001 M inibiu a glicólise anaeróbica, quer fosse adicionado antes ou durante a medida desta última. Não ficou claro da sua nota se usou ou não iodosobenzoato no músculo de *Thyone*. Na porção estriada do adutor do lamelibrânquio *Pecten*, porém, HARTING (l.c.) observou que êsse agente produzia um imediato aumento da glicólise. A ação do monoiodoacetato foi patente apenas nos casos em que adicionou a droga 20 minutos antes do início das leituras manométricas. Também no músculo longitudinal da holotúria aqui estudado o iodosobenzoato não causou inibição da glicólise. Pelo contrário, o ápice da curva B da Fig. 3, indica que sob a ação dessa droga, a produção de  $\text{CO}_2$  talvez tenha sido de início retardada, mas depois esboçou-se uma nítida aceleração dessa produção. HARTING (l.c.) também obteve com outros supostos inibidores (p. ex., ácido paracloromercuribenzoico) o inverso do que esperava. O mesmo foi observado com essa substância no músculo da barata por BARRON & TAHAMISIAN (l.c.) Êsse dois autores, porém, com monoiodoacetato conseguiram inibição parcial da glicólise anaeróbica. Comentando os seus resultados e os de HARTING (l.c.), BARRON & TAHMISIAN (l.c.) inclinam-se à conclusão de que no músculo do invertebrado seria geral essa falta de inibição de agentes tais como o paracloromercuribenzoico e o iodosobenzoato.

e. Em músculos inteiros colocados no respirômetro em atmosfera de oxigênio, o quociente respiratório médio obtido ao redor da unidade. O método empregado na determinação do QR contornou o quanto possível a dificuldade da medida do  $\text{CO}_2$  oriundo dos processos metabólicos. Não existe, mesmo, na atualidade, outro método que lhe seja superior. Assim, o valor medido para o QR do músculo longitudinal indicaria, com alguma certeza, que, nas condições da experiência, o material em questão estaria fazendo uso de carboidratos do seu próprio

estoque. O resultado obtido está, por outro lado, em concordância com a verificação de BOYLAND (l.c.) segundo a qual na holotúria, durante a atividade, o glicogênio, embora com alguma lentidão, se converte em ácido láctico. Nas condições em que se fizeram as determinações do QR, os músculos acabavam de ser dissecados. Nessa circunstancia, logo após o seccionamento dos dois pontos de inserção, o músculo se contrai até um estado que se poderia chamar de contração submáxima, pois, se estimulado ulteriormente por meios apropriados, pode encurtar-se mais ainda. Neste estado de contração submáxima, permanece o músculo indefinidamente, podendo distender-se se submetido à tracção. JORDAN (1916) demonstrou que a resistência à distensão diminui muito após a secção do nervo radial. Do exposto, deduz-se, pois, que os músculos usados na experiência, por assim dizer, acabavam de passar de uma fase "metaestavel" (posição no corpo do animal) a uma fase "mais estável" (dissecada). É difícil dizer se no encurtamento subsequente ao corte das inserções, há gasto anormal de reservas ou se, para manutenção do músculo nesse estado perene de contração submáxima, tal também se dá. Não há estudos a respeito. Algo se sabe apenas com referência ao estado de contração tônica e, assim mesmo, no caso do adutor do lamalibrânquio. Aqui, segundo os antigos autores (MARCEAU 1909; BETHE 1911, etc.), o metabolismo dos carboidratos durante o tonus não seria significativamente maior do que o das condições de repouso. PARNAS (1910) informou que o adutor pode sustentar grandes pesos sem aumento mensurável do consumo de oxigênio. RITCHIE (1928), todavia, calculou que os métodos usados não poderiam mesmo ter registrado aumento na respiração desse músculo. Há indícios de que o ácido se acumula durante 27-84 horas de contração contínua. Como se vê, o assunto é complexo e ainda está por ser bem estudado. No caso do músculo longitudinal da holotúria somente a dosagem, em condições apropriadas, do teor de glicogênio e ácido láctico nas várias horas subsequentes à dissecação poderá informar se o estado de contração submaxima em que fica o efetuador em questão se dá em condições de metabolismo de base ou não.

f. Apesar de, sob certas condições, os músculos longitudinais da holotúria se apresentarem coloridos de amarelo, não me foi possível extrair desse material citocromô em quantidade analisável, nem mesmo quando se empregou para esse fim o espectrofotômetro de BECKMANN. O test da benzidina, por outro lado, revelou que tanto no músculo "branco" como no "amarelo", neste muito mais do que naquele, existe um composto do tipo "heme" que tanto poderia ser o citocromô, em pequeníssimas quantidades, como a citocromoxidase. O ensaio manométrico desta última pôs em evidência que o músculo longitudinal da holotúria possui apreciável atividade citocromoxidásica.

Nada existe, na literatura sôbre o músculo longitudinal, que se refira ao assunto aqui pesquisado. Aliás, muito pouco tem êle sido estudado no músculo liso em geral. Com relação aos invertebrados, ainda é o músculo do lamelibrânquio o mais bem trabalhado sob êsse aspecto. Apenas não está muito claro nos trabalhos qual o músculo escolhido e, no caso do adutor, qual a porção utilizada (a estriada, a lisa, ou ambas). O sistema citocrômocitocromoxidase tem sido estudado geralmente em conexão com a atividade deshidrogenásica e uma frutífera via dêsse estudo vem a ser o emprêgo de inibidores dos compostos hêmicos, tais como cianêto e azida. LOEW (1881, ap. HUMPHREY l.c., p. 357) observou que azida é tóxica a muitos invertebrados, moluscos inclusive. Da observação de KEILIN (1936) e KEILIN & HARTREE (1940) de que a azida é tão tóxica como cianêto em impedir que o citocrômocitocromoxidase, surgiu a crença de que êsses dois inibidores têm mais ou menos a mesma ação sôbre os tecidos. STANNARD (1939) e SPIEGELMAN & MOOG (1945), entre outros, demonstraram, porém, que entre os invertebrados há tôdas as combinações possíveis de sistemas respiratórios sensíveis e insensíveis ao cianêto e à azida, CHAPHEAU (1932, ap. HUMPHREY l.c., p. 357) obteve marcada inibição do músculo picado de *Ostrea* com cianêto. Êsse resultado concorda com o de HUMPHREY (l.c.) obtido com homogenizados de músculo de *Saxostrea*. Azida, para produzir o mesmo efeito neste último músculo, teve que ser usada em concentração 5 vezes maior. O trabalho de HUMPHREY (l.c.) parece-me o mais importante como termo de confronto com os resultados obtidos na holotúria. Também êse autor não conseguiu extrair citocrômocitocromoxidase do músculo de *Saxostrea* e, não obstante, foi aí positivo o teste da benzidina. As medidas do consumo de oxigênio de homogenizados em presença de ácido ascórbico e citocrômocitocromoxidase, em presença de ácido ascórbico e citocrômocitocromoxidase, indicaram a presença de citocromoxidase. Como se vê, falta apenas o estudo da ação dêstes dois últimos inibidores sôbre a respiração do músculo da holotúria para que, eventualmente, os resultados colhidos com o referido músculo venham a ser 100% semelhantes aos obtidos por HUMPHREY (l.c.) com o músculo de *Saxostrea*.

Ainda a propósito da presença de citocromoxidase nesse lamelibrânquio, HUMPHREY (l.c.) recorda o enigma que para BALL & MEYERHOF (l.c.) representa o fato de um animal empregar a hemocianina, que não é um composto hêmico, como pigmento respiratório e, não obstante, possuir músculos ricos em mioglobina, como é o caso de *Venus mercenaria*. Tal, porém, não se dá com as ostras, onde, parece, não existe hemocianina. Comparando a atividade citocromoxidásica relativamente grande do músculo de *Saxostrea* com a provavelmente pequeníssima quantidade de citocrômocitocromoxidase que aí deve existir HUMPHREY sugere que o metabolismo dêsse músculo deve ser semelhante ao de ovo de *Arbacia*, onde KRAHL, KELTCH, NEUBECK & CLOWES (1941)

admitem que o citocromo C não se ocupa de importante fração do consumo de oxigênio. O *test* positivo da benzidina sugeriria a presença do hemocromógeno precursor de KEILIN (1929). Assim, *Saxostrea* poderia ser classificada como animal sem pigmento respiratório e com concentração muito pequena de citocromo ou de seu precursor. Na base dos estudos feitos com o músculo longitudinal, quase que as mesmas palavras poderiam ser aplicadas à holotúria.

g. Os resultados obtidos com as técnicas de THUNBERG e manométrica não falam pela existência no músculo longitudinal de atividade succinodeshidrogenásica. Com relação à possível atividade malicodeshidrogenásica, o *test* de THUNBERG, pelo menos, indicou algo dessa atividade. Esses resultados não deixam de ser surpreendentes, pois que era de se esperar que um tecido, que parece possuir glicólise nos moldes dos músculos estriados e, também, apreciável atividade citocromoxidásica, possuísse uma fase aeróbica do catabolismo carboidrático do tipo do ciclo de SZENT GYOERGYI - KREBS. Antes, porém, de comentar os resultados obtidos em função de outros existentes para músculos lisos de invertebrados, seria bom assinalar que os ensaios feitos sobre a atividade deshidrogenásica do músculo longitudinal foram feitos segundo receitas formuladas para músculos de vertebrados, particularmente, mamíferos, onde essa atividade é bem acentuada. É bem provável, assim, que, com um melhor ajuste de concentrações de substrato, enzima e cofatores, se pudesse medir alguma atividade. Por outro lado, antes de afirmar a inexistência do ciclo de SZENT GYOERGYI - KREBS no músculo longitudinal, seria necessário aplicar ao mesmo o *test* da inibição do consumo de oxigênio em presença da glicose, por meio do malonato e a supressão da mesma por subsequente adição de fumarato. A serem verdadeiros, todavia, os resultados obtidos na holotúria, estariam eles em completo desacôrdo com os de HUMPHREY (l.c.) relativos ao músculo de *Saxostrea*. Aqui, os homogenizados de músculo exibiram maior consumo de oxigênio em presença de 0,05 M de succinato e maior ainda na presença concomitante de citocromo. Curiosamente, porém, a tabela 3 de HUMPHREY assinala que os homogenizados respiram também na ausência de succinato e citocromo, o que leva a pensar que na preparação dos homogenizados não se tenha abolido completamente o consumo de oxigênio endógeno, como seria aconselhável (POTTER l.c., p. 92). Esse resultado de HUMPHREY, por sua vez, discorda do anteriormente obtido por BALL & MEYERHOF (l.c.) em *Venus mercenaria*, onde a atividade succinodeshidrogenásica dos músculos brancos e do adutor foi débil ou duvidosa.

h. A investigação de uma possível atividade adenosintrifosfática dos músculos longitudinais fez-se, como se disse, em virtude da presença

de fosfoarginina neles verificada por MEYERHOF (1928). Além disso, os trabalhos da escola de JAKUS (l.c.) tinham assinalado no retrator de *Thyone* um elemento que provavelmente é a miosina, a que se atribui atividade ATPásica. Os resultados, todavia, não indicaram a presença dessa atividade nos homogenizados ou extratos do músculo longitudinal. Isso, porém, não exclui a possibilidade da sua existência. É preciso não esquecer as peculiaridades do funcionamento dos músculos lisos, mesmo daqueles que, como os dos invertebrados, se organizam em músculos anatômicos. Como bem assinalou FISCHER (l.c.), com ampla corroboração ulterior de SZENT GYOERGYI, o músculo liso, a despeito das grandes diferenças que o separam do músculo estriado do ponto de vista fisiológico, possuiria em comum com este o mecanismo contrátil e as manifestações bioquímicas associadas; o fator tempo, apenas, é diferente nos dois tipos de músculos. Essa importância do fator tempo também se depreende do trabalho de BOYLAND (l.c.) ao assinalar a lendidão com que, em comparação com o caso dos vertebrados, o glicogênio se converte em ácido láctico nos lamelibrânquios e nas holotúrias. Salientou também BOYLAND a dificuldade da pesquisa nesses animais, em virtude do baixo metabolismo. É bem possível, assim, que a infrutífera tentativa de observar atividade ATPásica no músculo longitudinal seja devida mais à aplicação de uma técnica de estudo que costuma produzir efeitos imediatos no caso dos músculos dos vertebrados. O mesmo, talvez, se poderia dizer dos insucessos na determinação da atividade deshidrogenásica.

## SUMÁRIO

1. Foram estudados alguns aspectos do metabolismo e do equipamento enzimático do músculo longitudinal de *Holothuria grisea* SELENKA.

2. As condições mais propícias para a medida do consumo de oxigênio do músculo longitudinal foram a suspensão de músculos inteiros em água do mar artificial segundo PANTIN (1934), de pH igual a 7,0, em equilíbrio com uma atmosfera de 100% de oxigênio.

3. As medidas do consumo de oxigênio fizeram-se num aparelho de BARCROFT- WARBURG, em frascos de capacidade média de 18 ml, a uma taxa de agitação de 120 oscilações por minuto, a uma temperatura de 25°C.

4. Nessas condições, o consumo médio de oxigênio do músculo longitudinal de *H. grisea* foi de 0,223 milímetros cúbicos de oxigênio por miligrama de peso seco, em uma hora.

5. Em presença de glicose ou de piruvato de sódio, usados nas concentrações de 0,01 M e 0,02 M, o consumo de oxigênio do músculo longitudinal de *H. grisea* não foi significativamente aumentado.

6. O fluoreto de sódio, na concentração de  $10^{-3}$  M, inibiu parcialmente o consumo de oxigênio do músculo longitudinal, reduzindo-a a ca. 25% do normal. O monoiodoacetato de sódio, a  $10^{-4}$  não afetou a respiração do músculo longitudinal.

7. O valor obtido para a glicólise anaeróbica normal, a  $25^{\circ}\text{C}$ , do músculo longitudinal, em termos de produção de  $\text{CO}_2$  (QN2), foi de  $\frac{\text{CO}_2}{\text{G}}$  0,076, o que equivale, em termos de ácido láctico formado (QN), a 0,050. Em presença de iodobenzoato, a M/600, o QN2 médio foi  $\frac{\text{CO}_2}{\text{G}}$  de 0,071. Em presença de monoiodoacetato de sódio a  $10^{-3}$ , o QN2 médio reduziu-se, porém, a 0,033.

8. O quociente respiratório médio do músculo longitudinal, medido a  $25^{\circ}\text{C}$  por uma combinação dos primeiro e segundo métodos de DICKENS & SIMER, foi de 1,07 em água do mar natural e 1,21 em água do mar segundo PANTIN fosfatada.

9. Com a técnica de THUNBERG não foi possível demonstrar atividade succinodeshidrogenásica no músculo longitudinal. Com a mesma técnica, em presença de Co I, alguma atividade malicodeshidrogenásica foi evidenciada. Nenhum consumo de oxigênio foi observado quando se adicionou extrato ou homogenizado de músculo longitudinal a succinato ou malato, nas condições prescritas por SCHENEIDER & POTTER (1943) e POTTER (1946).

10. Extratos ou homogenizados de músculo longitudinal não revelaram atividade adenosintrifosfática em presença de ATP, quer em ensaios manométricos, quer no ensaio preconizado por POTTER & DUBOIS (1943).

11. O *test* da benzidina revelou a presença no músculo longitudinal, particularmente nos amarelados, de um composto hêmico. Não se conseguiu, todavia, extrair citocromo do músculo longitudinal pela modificação de POTTER ao método de KEILIN & HARTREE (1937). O ensaio manométrico de SCHENEIDER & POTTER (1943), no entanto, mostrou que o músculo longitudinal possui apreciável atividade citocromoxidásica.

## SUMMARY

1. A few aspects of the metabolism and of the enzymatic equipment of the longitudinal muscle of *Holothuria grisea* SELENKA were studied.

2. The most adequate conditions for the measurement of the oxygen uptake of the longitudinal muscle proved to be the suspension

of whole intact freshly dissected muscles in PANTIN'S sea water (1934), pH= 7.0, in equilibrium with 100% oxygen.

3. The measurements of the oxygen consumption were made in a BARCROFTWARBURG apparatus, at 25°C and 120 complete oscillations per minute.

4. Under such conditions the mean oxygen consumption of the longitudinal muscle of *H. grisea* was 0.223 cubic millimeters of oxygen per milligram of dry weight and hour.

5. In the presence of glucose or pyruvate, used as 0.01 and 0.02M solutions in PANTIN'S sea water, the oxy uptake of the longitudinal muscle was not significantly increased.

6.  $10^{-3}$ M sodium fluoride partially inhibited the oxygen consumption of the longitudinal muscle, to about one fourth of the normal.  $10^{-4}$  iodoacetate did not affect the respiration of the longitudinal muscle.

7. The mean value obtained for the anaerobic glycolysis of the longitudinal muscle, at 25°C, was, in terms of CO<sub>2</sub> production, 0.076 cu. mm. per mg dry weight and hour, that is, equivalent to 0.050 micrograms of lactic acid. M/600 iodosobenzoate did not significantly affect the anaerobic glycolysis of the longitudinal muscles (CO<sub>2</sub> production rate: 0.071), but  $10^{-3}$  iodoacetate did affect it, reducing the CO<sub>2</sub> production rate to 0.033.

8. No succinic dehydrogenase activity could be detected from extracts or homogenates of longitudinal muscles in PANTIN'S sea water, using the THUNBERG technique. When malate was used as substrate, only when Co I was also added to the THUNBERG'S flasks some malic dehydrogenase activity was observed. No oxygen consumption was measured when extracts or homogenates of longitudinal muscles were added to succinate or malate, according to SCHNEIDER & POTTER (1943) and POTTER (1946).

9. Extracts or homogenates of longitudinal muscles did not exhibit any ATPase activity either in manometric assays or in the test described by POTTER & DUBOIS (1943).

10. The benzidine test revealed the presence in the longitudinal muscles, particularly in the yellowish ones, of a haem compound. No cytochrome, however, could be extracted from the longitudinal muscles. The manometric assay described by SCHEIDER & POTTER (1943) showed that the longitudinal muscles possess a good cytochromoxidase activity.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBRECHT, P.G. 1920 Chemical study of several marine mollusks of the Pacific Coast. J. Biol. Chem., v. 45, pp. 395-405. AMBACHE, N. & P. SAWAYA. 1953. Use of *Holothuria grisea* for acetylcholine essays of electric organ extracts from *Narcine brasiliensis* (Oelfers). Physiol.

- Compar. et Oecol., v. 3, pp. 53-56. ASTBURY, W. T. 1947. On the structure of biological fibers and the problem of muscle. Proc. Roy. Soc. London, B, v. 134, pp. 303-327. BACQ, Z. M. 1935. Recherches sur la physiologie et la pharmacologie du système nerveux autonome. XVII. Les esters de la choline dans les extraits des tissus des Invertébrés Arch. Intern. Physiol., v. 42, pp. 24-42. - 1939a. Un test marin pour l'acétylcholine. Arch. Intern. Physiol., v. 49, p. 20-24. — 1939b. Action de l'esérine chez les Holothuries et chez les Ascidies. Présence de nerfs cholinergiques chez les Holothuries. Arch. Intern. Physiol., v. 49, pp. 25-32. BACQ, Z. M. & D. NACHMANNSSOHN. 1937. Cholinesterase in Invertebrate muscles. J. Physiol., v. 89, pp. 368-371. BALDWIN, E. 1933. On the cephalopod phosphagen. J. Exp. Biol., v. 10, pp. 222-229. - 1952. Dynamic aspects of Biochemistry XX + 544 pp. Cambridge Univ. Press. BALL, E.G. & B. MEYERHOF 1939. On the occurrence of iron-porphyrin compounds and succinic dehydrogenase in marine organisms possessing the copper blood pigment hemocyanin. J. Biol. Chem., v. 134, pp. 483-493. BARRON, E.S.G. & T. N. TAHMISIAN. 1948. The metabolism of cockroach muscle (*Periplaneta americana*). J. Cell and Comp. Physiol., v. 32, pp. 57-76. BETHE, A. 1911. Die Dauerverkürzung der Muskeln. Pflüger's Arch. Ges. Physiol., v. 142, pp. 291-336. BONNER, W.D. & K.V. THIE-MANN. 1950. Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. III. The action of some inhibitors concerned with pyruvate metabolism. Amer. Jour. Bot., v. 37, pp. 66-75. BOREI, H. 1945. Inhibition of cellular oxidation by fluoride. Ark. Kemi. Min. Geol., v. 20A, n. 8 pp. 1-215. BOYLAND, E. 1928. Chemical changes in muscle. II. Invertebrate muscle. Bioch. J., v. 22, p. 362-380. BOZLER, E. 1928. Weitere Untersuchungen zur Frage des Tonussubstrates. Zeitsch. vergl. Physiol., v. 8, p. 371-390. COHEN, P.P. 1945. Methods of preparation and study of tissues. In Umbreit, Burris & Stauffer's Manometric Techniques and related methods for the study of tissue metabolism (pp. 73-99). 203 pp. Burgess. Minneapolis. DICKENS, F. & F. SIMER. 1931. The metabolism of normal and tumor tissue. III. A method for the measurement of the respiratory quotient in serum. Bioch. J., v. 25 pp. 973-984. - 1933. In Abderhalden's Handbuch, p. 4, t. 13, pp. 435- . DUBOIS, K. P. & V.R. POTTER, 1943. The essay of animal tissues for respiratory enzymes. III. Adenosintriphosphatase. J. Biol. Chem., v. 150, pp. 185-195. DUBUY, H. 1936. The physiology of an invertebrate smooth muscle (retractor of *Thyone briareus*). Amer. J. Physiol. v. 116 pp. 22-23. EDWARDS, G. A. 1954. A mecano-química do músculo estriado. Seleta Química (no prelo). EDWARDS, G.A., P.S. SANTOS, H.S. SANTOS & P. SAWAYA. 1954. Electronmicroscope studies of Insect muscle. III Variation in ultrastructure. Bol. Fac. Fil. Cien. & Letr. Univ. S. Paulo, Zool.,

- n. 19 (no prelo). EDWARDS, G. A., P. SAWAYA, P.S. SANTOS & H. S. SANTOS. 1953. A ultra estrutura de músculo estriado de invertebrados. *Ciencia & Cultura*, v. 5, pp. 207-208. EGGLETON, M. G. 1934 A physiological study of phosphagen in plain muscle. *J. Physiol.* v. 82, pp. 79-87. EGGLETON, P. & G.P. EGGLETON. 1927. The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. *Bioch. J.*, v. 21, pp. 190-195. EGGLETON, G.P. & EGGLETON, P. 1929. A method of estimating phosphagen and some other phosphorus compounds in muscle tissue. *J. Physiol.*, v. 68, pp. 193-211. EMBDEN, G. & M. ZIMMERMANN. 1927. Ueber die Bedeutung der Adenylsäure für die Muskelfunktion. I. Mitteil. Das Vorkommen von Adenylsäure in der Skelettmuskulatur. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* v. 167, pp. 137-140. ENGELHARDT, W. A. & M. N. LJUBIMOWA, 1939. Myosin and Adenosinetriphosphatase. *Nature*, v. 144, pp. 68-69. EVANS, C. L. 1926. The physiology of plain muscle. *Physiol. Rev.*, v. 6, pp. 358-398. - 1952. *Principles of Human Physiology*. XII + 1210 pp. Churchill. London FENN, W.O. 1945. Contractility. In Höber's *Physical Chemistry of Cell and Tissues*. XIII + 676 pp. Blackiston. Philadelphia & Toronto. FIELD, J. 1948. Respiration of tissue slices. In *Methods in Medical Research* v. 1 XIII + 372 pp. The Year Book Publishers. Chicago. FISCHER, E. 1944. Vertebrate smooth muscle. *Physiol. Rev.*, v 24, pp. 467-490. FISKE, C. H. & Y. SUBBAROW 1928. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science*, v. 65, pp. 401-403. FLETCHER, C. M. 1937. Action potentials from unstriated muscle of simple structure. *J. Physiol.* v. 90, pp. 233-253. GILMOUR, D. 1953. The biochemistry of muscle. In *Roeder's Insect Physiology*. XIV + 1100 pp. Wiley and Sons. N. York. GLAISTER, D. & M. KERLY 1936. The oxygen consumption and carbohydrate metabolism of the retractor muscle of the foot of *Mytilus edulis*. *J. Physiol.* v. 87, pp. 56-66. HAARMANN, W. 1932. Ueber das Milchsäurebildung der Gewebe. *Biochem. Z.*, v. 255, pp. 103-124. HALL, C. E., M. A. JAKUS & F. O. SCHMITT. 1945 The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. *J. Applied Physics*. v. 16, pp. 459-465. HARTING, J. 1947. The effect of sulphydryl inhibitors on the anaerobic glycolysis of scallop and thyone muscle. *Biol. Bull.*, v. 93, pp. 194-195. HAWK, P. B., L. OSER & W. SUMMERSON. 1947. *Practical Physiological Chemistry* XIV + 1323 pp. Churchill. London. HERTWIG, R. 1931. *Lehrbuch der Zoologie*. XII + 656 pp. G. Fischer. Jena. HILL, A. V. 1926. The viscous elastic properties of smooth muscle. *Proc. Roy. Soc. London, B.*, v. 100, pp. 108-115. - 1938, The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. Roy Soc. London, B.*, v. 126, pp. 136-195. - 1950. A discussion on muscular contraction and relaxation: their physical and chemical bases. *Proc.*

- Roy. Soc. London, B. v. 137, pp. 40-87. HUMPHREY, G. F. 1947. The succinoxidase system in oyster muscle. J. Exp. Biol., v. 24, pp. 352-360. JAKUS, M. A., C. E. HALL & F. O. SCHMITT. 1944. Electron microscope observations of clam muscle fibrils. J. Amer. Chem. Soc., v. 66, pp. 313-314. JORDAN, H. 1944. Ueber "reflexarme" Tiere. IV Die Holothurien. Erste Mitt. Die Holothurien als hohlorganartige Tiere und die Tonusfunktion ihrer Muskulatur. Zool. Jahrb. Allg. Zool u. Physiol., v. 34, pp. 365-436. — 1916. Ueber "reflexarme" Tiere. IV. Die Holothurien. Zweite Mittl. Die Reizbarkeit und der Einfluss des zentralen Nervensystems auf die Muskulatur und die muskelähnlichen Fasern der Haut (auf Erregbarkeit und Tonusfunktion). Zool. Jahrb., Allg. Zool. u. Physiol., v. 36, pp., 109-156. KALCKAR, H. M. 1941. The nature of energetic coupling in biological synthesis. Chemical Rev., v. 28, p. 71-178. KEILIN, D. 1925. On cytochrome, a respiratory pigment common to animals, yeast and higher plants. Proc. Roy. Soc. London, B. v. 98. pp. 312-3394 —. 1929 Cytochrome and respiratory enzymes. Proc. Roy. Soc. London, B., v. 104, pp. 206-252. —. 1936. The action of sodium azide on cellular respiration and some catalytic oxidation reactions. Proc. Roy. Soc. London, B., v. 121, pp. 165-173. KEILIN, D. & E. F. HARTREE. 1937. Preparation of pure cytochrome from heart muscle, and some of its properties. Proc. Roy. Soc. London, B., v. 122, pp. 298-308. —. 1940. Succinicdehydrogenase-cytochrome system of cells. Intracellular respiratory system catalyzing aerobic oxidation of succinic acid. Proc. Roy. London, B., v. 129 pp. 277-306. KRAHL, M. E., A. K. KELTCH, C. E. NEUBECK & C. H. A. CLOWES. 1941. Studies on cell metabolism and cell division. V. Cytochrome oxidase activity in the eggs of *Arbacia punctulata*. J. Gen. Physiol., v. 24. pp. 597-617. KREBS, H. A. 1931. Ueber die Wirkung der Monojodessigsäure auf den Zellstoffwechsel. Biochem. Z. v. 234, pp. 278-282. LIPMANN, F. 1941. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. Adv. Enzymol., v. 6, pp. 99-162. LOHMANN, K. 1934. Ueber die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure, zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. Biochem. Z., v. 271, pp. 264-277. LUDWIG, H. 1881. Ueber eine lebendig gebaernde Synaptide und zwei andere neue Holothurinarten der brasilianischen Küste. Arch. Biol. v. ii, pp. 41-58. LUNDSGAARD, G. 1930. Untersuchungen über Muskelkontraktion ohne Milchsäurebildung. Bioch. Z., v. 217, pp. 162-177. MARCEAU, F. 1909. Recherches sur la morphologie, l'histologie et la physiologie comparées des muscles adducteurs des Mollusques acephales. Arch. Zool. Exper. Gener., v. 5, pp. 295-469. MENDES, E. G. 1953. Respiratory quotients during embryogenesis of *Rana pipiens*. Bol. Fac. Cien-Letr. Univ. S. Paulo, Zool. n. 18, pp. 61-75. MEYERHOF, O. 1928.

Ueber die Verbreitung der Argininphosphorsäure in der Muskulatur der Wirbellosen. Arch. Scien. Biol., v. 12, pp. 536-548. - 1930. Die chemische Vorgänge im Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeitsleistung und Warmbildung. XIV + 350 pp. Springer. Berlin. MEYERHOF, O. & K LOHMANN 1926 Ueber Atmung und Kohlenhydratumsatz tierischer Gewebe. I. Mitt. Milchsäurebildung und Milchsäureschwund in tierischen Geweben. Biochem. Z., v. 171, pp. 381-402. - 1932. Ueber energestische Wechselbeziehungen zwischen dem Umsatz der Phosphorsäurester in Muskelextrakt. Biochem. Z., v. 253, pp. 431-461. MOUSSATCHE, H. & M. ARONSON, 1951. Sur l'emploi des Holothuries comme méthode d'essay biologique et de dosage de l'acetylcholine. Rev. Bras. Biol., v. 11, pp. 219-221. v. MURALT, A. & J. T. EDSALL 1930. Studies in the physical chemistry of muscle globin. III. The anisotropy of myosin and the angle of isocline. IV. The anisotropy of myosin and the double refraction of flow. J. Biol. Chem., v. 89, pp. 315-386. OLIVEIRA, L 1950. Levantamento biogeográfico da Baía de Guanabara. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 48, p. 361-391. OLSON, M. 1938. The histology of the retractor muscles of *Thyone briareus* Lesueur. Biol. Bull., v. 74, pp. 342-347. PANTIN, C. A. F. 1934. On the excitation of crustacean muscle. I. J. Exp. Biol. v. 11, pp. 11-27. PANTIN, C.A.F. & P.SAWAYA 1953. Muscular action in *Holothuria grisea*. Bol. Fac. Fil. Cien. & Letr. Univ. S. Paulo, Zool. n. 18, pp. 51-59. PARNAS, J. 1910. Energetik glatter Muskeln. Pflüger's Arch. Ges. Physiol., v. 13, pp. 441-495. PÉREZ GONZÁLEZ, M. D. & G. A. EDWARDS. 1954. Metabolic differences among specialized insect músculos. Bol. Fac. Cien. & Ltr. Univ. S. Paulo, Zool. n. 19, no prelo. PLATE, L. 1922 Allgemeine Zoologie und Abstammungslehre. Erster Teil. VI + 629 pp. Fischer, Jena. POTTER, V. R. 1946. Preparation and standardization of cytochrome C. In Umbreit, Burris & Stauffer's Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism, pp. 188-189. 203 pp. Minneapolis, PRASAD, B. N. 1935. The carbohydrate metabolism of gut muscle. J. Physiol., v. 85, pp. 239-248. PROSSER, C. L. 1950. Comparative Animal Physiology. IX + 888 pp. Saunders. Philadelphia. RITCHIE, A. D. The comparative physiology of muscular tissue. XI + 111 pp. MacMillan, N. York & Univers. Press, Cambridge. ROSENTHAL, O. & A. LASNITSKI, 1928. Ueber den Stoffwechsel stationärer und wachsender Gewebe. Biochem. Z., v. 196, pp. 340-425. SACKTOR, B. 1953. Investigations on the mitochondria of the house fly. I. Adenosinetriphosphatases. J. Gen. Physiol., v. 36, pp. 371-387. SALOMÉ PEREIRA, R. 1939. Sur la détermination spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction céruleo - molybdique... de Deniguès. Bull. Soc. Chim. Biol., v. 21, pp. 827-835. SAWAYA, P. 1952. Reação do músculo radial da *Holothuria* às drogas colinérgicas.

- Ciência e Cultura, v. 4, pp. 129. SAWAYA, P. & E. G. MENDES. 1953. Studies on the action of acetylcholine in Insects and Echinoderms. Abstr. Communs. XIX Internat. Physiol. Congress (p. 730) 976 pp. Montreal. SCHMIDT W. J. 1937. Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. XI + 338 pp. Borntraeger, Berlin.
- SCHMITT, F. O., R. S. BEAR, C. E. HALL & M. A. JAKUS 1947. Electron Microscope and X-ray diffraction studies of muscle structure. Ann. N. York Acad. Sci., v. 47, pp. 799-808. SCHNEIDER, W. C. & V. R. POTTER. 1943. The assay of animal tissue for respiratory enzymes. II. Succinic dehydrogenase and cytochrome oxydase. J. Biol. Chem., v. 149, pp. 217-277. SEIFRIZ W. 1952. The rheological properties of protoplasma. In Deformation and Flow in biological system, ed. p. A. Frey-Wyssling. XII + 552 pp. North Holland. Amsterdam. SELENKA, E. 1867. Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien. Zeits. f. wiss. Zool., v. 17, pp. 291-374. SPIEGELMANN, S. & F. MOOG, 1945. A comparison of the effects of cyanide and azide on the development of frog's eggs. Biol. Bull., v. 89, pp. 122-130. STANNARD, J. N. 1939. Separation of the resting and activity oxygen consumption of frog muscle by means of sodium azide. Amer. J. Physiol., v. 126, pp. 196-213. SZENT GYOERGI, A. 1947. Chemistry of Muscular Contraction. VI + 150 pp. Academic Press. N. York. - . 1949 Attacks on muscle. Science, v. 110, pp. 411-413. — 1953. Chemical Physiology of contraction in body and heart muscle. XVIII + 135 pp. Academic Press, N. York. THÉEL H. 1886. Report on the Holothuria dredged by H. M. S. Challenger during the years 1873-1876. In Report of the Scientif. Results of the Voyage of H. M. S. Challenger during the years 1873-1876. Zoology, v. XIV, part XXXIX, 290 pp. TWAROG, B. M. 1949. Tonic shortening in Invertebrate smooth muscle, withe special reference to the anterior retractor of the byssus of *Mytilus edulis* L. Tese p. obt. do grau de "master of science" no Tufts College, Estados Unidos da América do Norte, 74 pp. VILLELA, G. G. 1951. On the fluorescent pigment of "*Holoturia grisea*". Rev. Bras. Biol., v. 11. pp. 33-36. VOGT, C. & E. YUNG 1888 Lehrbuch der praktischen vergleichenden Anatomie. VIII + 906 pp. Vieweg u. Sohn, Braunschweig. WATANABE, M. I. & C. M. WILLIAMS 1951 Mitochondria in the Flight muscle of insects. I. Chemical composition and enzymatic content. J. Gen. Physiol., v. 34, p. 675-689 — 1953 Mitochondria in the flight muscle of insects. II. Effects of the medium on the size, form and organization of isolated sarcosomes. J. Gen. Physiol., v. 37, pp. 71-90. WEBER, H. 1934. Der Feinbau und die mechanischen Eigenschaften des myosinfadens. Pflüger's Arch. ges. Physiol. v. 235, pp. 205-233. YAZAKI, M. 1930. On the circulation of the perivisceral fluid in *Caudina chilensis* (J. Müller). Sci. Rep. Tohoku Imper. Univ., s. 4, v. 5, n. 2, pp. 403-414. ZANGHI G. 1930. Sul fosfageno nella muscatura liscia. Arch. Fisiol., v. 28, pp. 372-293.

