

# SÔBRE A FISILOGIA DOS MÚSCULOS LONGITUDINAIS DE HOLOTHURIA GRISEA \*

**P. Sawaya e A. A. Ancona Lopez**

(Dept. Fisiologia Geral e Animal - Universidade de S. Paulo, Caixa Postal 2926. S. Paulo)

(10 Figuras)

## I

### INTRODUÇÃO

Muito variada é a distribuição da musculatura estriada e lisa nos Invertebrados e Vertebrados. Deixando de parte os últimos — os melhores conhecidos — em que a musculatura somática é estriada e a lisa é a visceral, excetuada a musculatura cardíaca, nos Invertebrados, um tal tipo de distribuição é praticamente ausente.

Assim, animais há dotados somente de musculatura estriada, como p. ex., os Insetos e outros, que constituem a maioria dos Invertebrados, e os em que faltam os músculos estriados, como acontece, p. ex., com os Equinodermes.

As modernas técnicas utilizadas em farmacologia, muito contribuíram para o melhor conhecimento das reações de ambos os tipos de músculos (mm.) e, conseqüentemente, de suas particularidades tanto nos Vertebrados como nos Invertebrados. Como é sabido, a existência de uma placa motora na junção neuromuscular, nos músculos estriados, concorreu enormemente para o conhecimento da fisiologia desses músculos. A ausência dessa placa nos mm. lisos e a diversa reação deles em face das mesmas drogas, está a exigir acurado estudo especialmente sobre a fisiologia da fibra muscular lisa. Nos Vertebrados esta musculatura vem sendo intensamente estu-

---

(\*) Trabalho efetuado com o auxílio da Fundação Rockefeller e do Conselho Nacional das Pesquisas.

dada, mas nos Invertebrados muitos pontos, principalmente de sua fisiologia, não foram ainda abordados.

O fato de existirem animais em que tôda a musculatura é do tipo liso, oferece campo para tais estudos que poderão ser de valia para a elucidação de vários fenômenos que ocorrem no comportamento da fibra muscular lisa.

Trabalhando já há algum tempo com os músculos de Equinodermes, especialmente de Holotúrias, procuramos verificar as reações dos músculos longitudinais sob diversas condições experimentais.

São êsses mm. de contração relativamente rápida, e constituem o principal elemento determinante das freqüentes modificações de forma do corpo dêsses animais. Assim, ao estabelecerem o volume do corpo de **Holothuria grisea**, Pantin & Sawaya (1953, p. 60) puderam verificar a influência intensa da musculatura longitudinal e a da anelar, que nas suas contrações provocam acentuadas diferenças da forma do corpo. Tal musculatura longitudinal, tôda constituída de mm. lisos, apresenta aspectos interessantes que serão relatados no decorrer do presente trabalho.

Utilizando êsses músculos, visamos primeiramente analisar o seu comportamento em face de drogas de conhecido efeito sôbre a musculatura lisa dos Vertebrados. A seguir, apresentaremos alguns aspectos da estrutura dos mm. longitudinais e, finalmente, tentaremos correlacionar os resultados obtidos.

De há tempos os músculos longitudinais de Holotúrias constituiram objeto de estudos farmacológicos. Assim, em 1937 Bacq (p. 175) verificou serem tais músculos de **Stichopus regalis** e de **Holothuria nigra**, sensíveis à acetilcolina, e Moussatché (1949, p. 525) assinalou a sensibilidade de tais músculos ao mesmo éster, na concentração de  $10^{-8}$ , e a potencialização do éster pela eserina a  $5 \times 10^{-7}$ . Êstes autores agora citados informam que a motilidade espontânea apresentada pelos referidos músculos não permitiria utilizá-los como método de ensaio rotineiro. Em 1951 Sawaya (p. 41) ao descrever o chamado "efeito de acetilcolina" apresentado pelo músculo longitudinal de **H. grisea**, em oposição àqueles autores, recomendou êsse músculo

como específico para a dosagem do éster nos extratos de tecidos. Por sua vez, Ambache & Sawaya (1953, p. 53) também verificaram poder êsse músculo servir perfeitamente para a determinação do teor de acetilcolina em extratos de tecidos, do mesmo modo que as preparações habitualmente empregadas, a saber o m. reto abdominal da rã ou o m. do dorso da sanguessuga. A verificação de Sawaya supra citada foi confirmada por Moussatché e Aronson (1951, p. 220) que indicam a sensibilidade do músculo ao aludido éster, na concentração de  $1 \times 10^{-8}$  até  $1 \times 10^{-9}$ , e que depois da potencialização pela eserina a reação poderá dar-se até a concentração de  $1 \times 10^{-11}$  do éster. Já nesse trabalho os autores mostraram (p. 221) que o músculo longitudinal dessa holotúria reagiu em presença de pequena quantidade de Ach e respondeu quantitativa e regularmente, permitindo a dosagem do éster no extrato.

Durante alguns anos (1951-1958) trabalhamos continuamente com os mm. longitudinais de **Holothuria grisea**, tendo os resultados parciais sido objeto de comunicação às Reuniões Anuais da S. B. P. C.\* (1951, 1954), à Academia Brasileira de Ciências (1953) e a Sociedade de Biologia de São Paulo (1955). No corrente ano pudemos rever êsses resultados, e a sua exposição constituiu a primeira parte do presente trabalho.

## II

### MATERIAL E MÉTODOS

As Holotúrias (**Holothuria grisea** Selenka 1867) provieram tôdas da baía de Santos e do Laboratório de Biologia Marinha de São Sebastião (L. B. M.). Tratando-se de pecilotermos, a perfusão do músculo fêz-se simplesmente imergindo-se no banho perfusor, constituído de água do mar filtrada, na qual se colocava a droga. Uma corrente de ar era injetada continuamente no banho de acôrdo a prover de oxigênio a preparação e misturar a droga. Utilizaram-se alavancas isotônicas tipo gimbal ou Shild modificada, e alavancas semi-isométricas. Fizeram-se as experiências à temperatura ambiente, a qual perma-

(\*) — Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

neceu, em geral, entre 20 e 25°C, quer em São Paulo quer no litoral.

Quase sempre se utilizaram holotúrias recentemente capturadas. Nas séries de experiências no Aquário Municipal de Santos ou no L. B. M., os animais colhidos na zona entre as marés eram transportados para os aquários e logo operados. Nas experiências do Departamento de Fisiologia Geral e Animal em São Paulo, colocaram-se êstes Equinodermes em aquários apropriados, com água do mar constantemente filtrada e purificada por meio de dispositivo filtrador especial.

Empregamos cloridrato de acetilcolina Roche, empoles de 0.1 grs., sulfato de atropina Roche e Merck; cloreto de d-tubocurarina dos Bios Laboratories Inc.; di-hidrocloreto de histamina do Pfanstiehl Chemical Co. e nicotina da Eastman Organic Chemicals. A d-tubo-curarina, a histamina e a nicotina foram obtidas graças ao auxílio da Fundação Rockefeller, à qual apresentamos nossos agradecimentos.

### III

#### INFLUÊNCIA DA ACETILCOLINA

As holotúrias em repouso, completamente relaxadas, chegam a medir 40 cms de comprimento. Isto quer dizer que no animal intacto, em repouso, os músculos longitudinais podem atingir em *H. grisea*, aproximadamente, essa extensão. Ao serem retiradas do aquário, as holotúrias reduzem de mais de 50% o seu comprimento, devido, principalmente, à irritação produzida pelo contacto das mãos. Quando essa irritação é mais forte, o animal pode chegar até a expelir as vísceras. A redução em mais de 50% do seu comprimento deve-se em grande parte à intensa contração dos músculos longitudinais e dos transversais. A diminuição do comprimento é acompanhada de extraordinário aumento do turgor, o que se compreende em animal do grupos dos chamados "animais ocos" ("Hohlorganartige Tiere" de Jordan 1914, p. 365).

Essa capacidade de contração em tão grande amplitude nota-se perfeitamente quando se extraem os músculos longitudinais do animal.

Segundo a técnica utilizada, os animais retirados do aquário são imediatamente abertos expondo-se a cavidade do corpo, isolando-se tão rapidamente quanto possível os músculos longitudinais ligados por fios nas duas extremidades. Em tais condições, o comprimento do animal, devido à excitação durante a operação, era em geral de 20 cms. Acontece que os músculos desligados da parede do corpo se contraem tão fortemente que o seu comprimento se reduz a 2 ou 3 cms. Em tais condições os mm. eram colocados numa placa de Petri contendo água do mar filtrada e, a seguir, utilizados imediatamente ou após 3 a 24 horas de repouso. Nos casos em que os músculos deviam ser empregados além de 2 horas após a retirada do corpo do animal, eram eles transferidos para a geladeira e aí mantidos à temperatura de cerca de 2°C. Obtiveram-se melhores resultados com preparações frescas. Os mm. usados além de 12 horas, mesmo mantidos na geladeira, apresentavam particularidades diversas que serão assinaladas adiante. Os resultados que relataremos a seguir referem-se aos de preparações frescas ou no máximo usadas 2 horas após a dissecação.

Iniciamos as perfusões empregando primeiramente alavancas isotônicas. Verificamos que êsses músculos são sensíveis à Acetilcolina na concentração de até  $1 \times 10^{-12}$ , isto é, correspondente a um teor de  $0.001 \mu\gamma$  por ml (Fig. 1). Também foi possível determinar a proporção entre a intensidade da contração e a quantidade de droga adicionada. Os gráficos da Fig. 1 e 2 indicam as variações das contrações quando a Ach é empregada nas concentrações de  $0.001 \mu\gamma$  a  $1 \gamma$  ( $1 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ). Nota-se ainda que à medida que aumenta a concentração do éster maior é a contração. O exame do gráfico referido indica haver uma relação entre a intensidade da contração e a concentração da Ach empregada. Graças à extrema sensibilidade do músculo, prescindiu-se da eserina para obtenção da resposta muscular.

Com o uso de alavancas semi-isométricas, avaliou-se aproximadamente o grau de tensão de tais músculos.

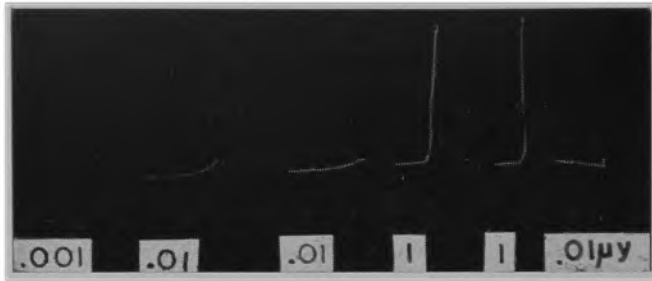


Fig. 1 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. Grisea*. Concentração éster de .001  $\mu\gamma$  a .01  $\mu\gamma$ .

Como sói acontecer em preparações biológicas, a contração dos músculos sob a influência da Ach não se repete exatamente quando se submete a preparação de novo à influência da mesma droga na mesma concentração. É o que se pode ver ainda na Fig. 2, quando se comparam as curvas de contração provocadas por 1  $\gamma$  de Ach ( $1 \times 10^{-6}$ ). O que se poderia dizer é que sob a influência de uma determinada concentração de

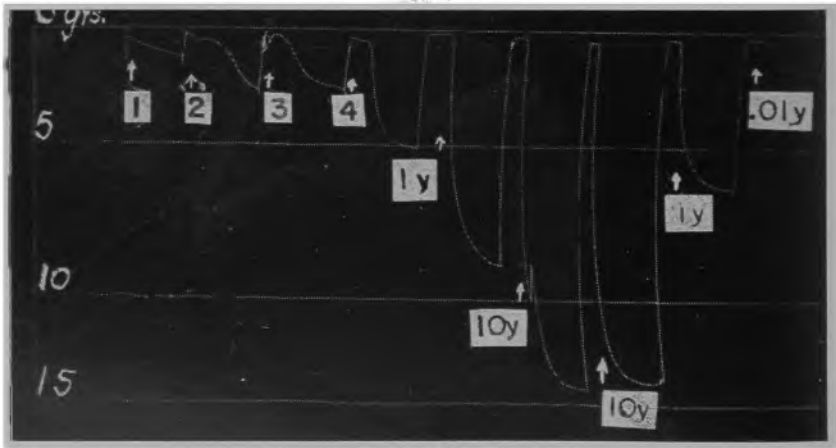


Fig. 2 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. Grisea*. Contração semi-isométrica. 1, 2, 3 e 4 = .01  $\mu\mu\gamma$ , 1  $\mu\mu\gamma$ , 1  $\mu\gamma$  e .01  $\gamma$  de Ach. As outras indicações correspondem às concentrações da Ach.

Ach se obtém uma curva, e quando a concentração é menor, a curva de contração também é menor e vice-versa.

No músculo sob a ação da Ach a partir da concentração de  $0.01 \mu\mu\gamma$  ( $1 \times 10^{-14}$ ) as tensões vão aumentando, a partir de 0.33 grs até cerca de 12 grs, quando se usa o éster na concentração de  $10 \gamma$  (Fig. n. 2). Nesse mesmo gráfico ainda se nota mais que ao reduzir-se a concentração de Ach a tensão também diminui.

Calculando-se o comprimento médio das curvas e comparando-se com as concentrações utilizadas obter-se-á o seguinte gráfico:

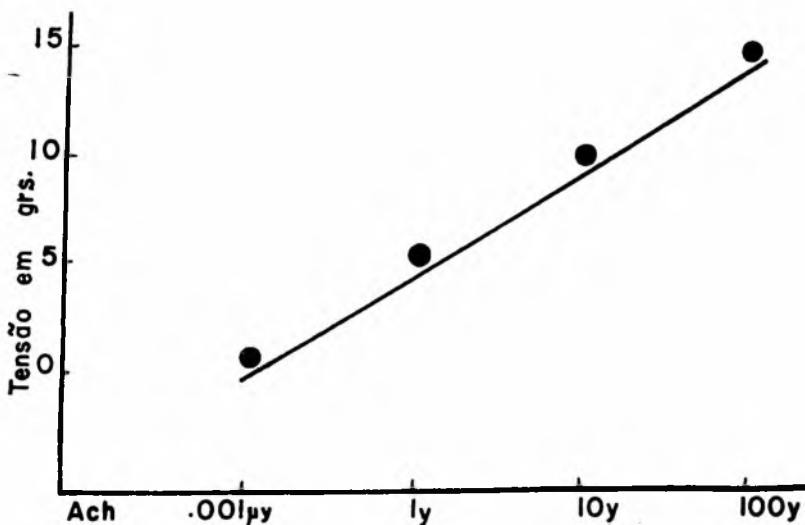


Fig. 3 — Reação do músculo longitudinal de *H. grisea* a diferentes concentrações de Ach.

Tais resultados podem justificar o emprêgo do músculo longitudinal de holotúria na determinação do teor do éster acetilcolínico em extratos de vários tecidos. Nem sempre se obtém curvas semi-isométricas correspondentes, com músculos de animais diferentes, mas, mesmo assim, verifica-se uma certa relação entre o teor da droga e a tensão do músculo. Como se pode notar no gráfico da Fig. 4, em que se empregaram concentrações cada vez maiores de acetilcolina de  $2 \mu\gamma$  até  $25 \mu\gamma$  as curvas foram cada vez mais longas.

Por outro lado, a tensão dos músculos é sensível a doses mínimas de Ach. Assim, no gráfico da Fig. 5, a variação das curvas se pode notar mesmo com diferenças de  $0,5 \mu\gamma$  na concentração dêste éster.

Com as curvas semi-isométricas verificou-se também fenômeno interessante, que se poderia comparar talvez com o da facilitação. Assim, como se vê na Fig. 6, o músculo sob a influência de  $1 \gamma$  de Ach mostrou-se sensível, apresentando uma tensão de 12 grs aproximadamente. Lavada a preparação e submetido o músculo à influência da Ach na concentração de  $1 \mu\gamma$ , praticamente não houve resposta, mas na terceira vez, o músculo reagiu a essa mesma concentração com uma tensão de 13 grs. Repetida a operação, obteve-se uma curva aproximadamente igual; reduzida a concentração do éster a  $0.01 \mu\gamma$  obtiveram-se curvas de tensões cada vez menores.

Os gráficos da Fig. 7 mostram as variações das tensões do músculo quando submetido a doses mínimas de acetilcolina desde  $0.5 \mu\gamma$  até  $5 \mu\gamma$ . Como se vê, persiste uma proporção entre o grau de tensão e a concentração de éster; variando-se a concentração de  $0.5 \mu\gamma$  até  $5 \gamma$ , as tensões passaram de 2,5 gr até 11 grs.

O gráfico da Fig. 8 mostra as variações das tensões desde a dosagem diminuta de  $0.0005 \mu\gamma$  até  $0.1 \mu\gamma$ , indo de 1 gr até 18 grs respectivamente as tensões do músculo.

#### IV

### INFLUÊNCIA DA ATROPINA, DO CURARE E DA HISTAMINA

O músculo longitudinal de *H. grisea* não apresenta reação alguma quando se utilizam essas substâncias, isto é, atropina, curare ou histamina em determinadas concentrações.

E' interessante, também, o fato de não se notar aqui a conhecida influência antagônica da atropina à Ach como ocorre nos músculos lisos de Vertebrados. O gráfico da Fig. 8 mostra falta de reação do músculo quando submetido à Atropina a





Fig. 4 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. grisea*. Contrações semi-isométricas.



Fig. 5 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. grisea*. Contrações semi-isométricas.

0.02 $\gamma\mu$  e reação sensível do músculo logo após a ação da acetilcolina a 0.1  $\mu\gamma$ .

Como se vê ainda na Fig. 8 submetido o músculo ao Curare (100 mg de d-tubo-curarina) não se observa reação; introduzida a seguir, a Ach (0.1  $\mu\gamma$ ) no banho, o músculo contrai-se.

Em outras experiências pudemos verificar que qualquer que seja a concentração de atropina empregada nunca se verifica antagonismo ao éster.

Também o efeito da histamina sobre o m. longitudinal é negativo, em qualquer concentração. Submetido o mm. a esta substância não se observa reação alguma. Lavada ou não a preparação, e fazendo-se agir a Ach (1  $\mu\gamma$ ) imediatamente êle se contrai.

## V

### INFLUÊNCIA DA NICOTINA

Se os mm. longitudinais de **H. grisea** se mostram insensíveis à Atropina, ao Curare e à Histamina, o mesmo não acontece quando em presença de nicotina.

A diferença com a contração determinada pela Ach está no fato de, sob a influência da Nicotina, o músculo entrar praticamente em contratura. Como foi visto, uma das particularidades importantes deste músculo é o seu rápido e imediato relaxamento após a lavagem da preparação em Ach. Neste particular está a principal diferença entre a influência da Ach e da Nicotina. A contração provocada pelo alcalóide permanece por 10 a 30 minutos ou mais não obstante as lavagens sucessivas da preparação.

## VI

### COMENTARIOS

Como se vê pelos resultados obtidos, é inegável a extrema sensibilidade dos músculos longitudinais de **H. grisea** à Ach. O

Fig. 6 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. grisea*. Contrações semi-isométricas.

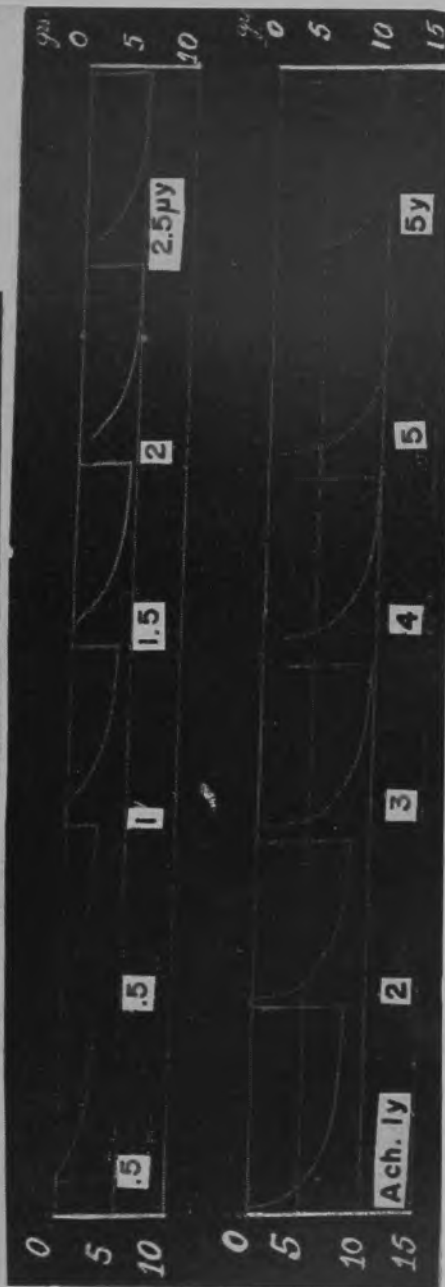
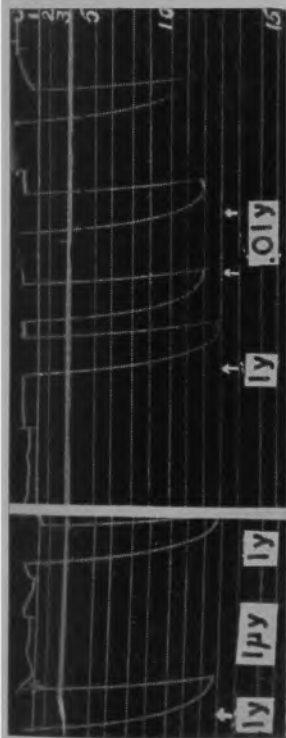


Fig. 7 — Ação da Ach sobre o músculo longitudinal de *H. grisea*. Contrações semi-isométricas.

músculo reage intensamente ao éster, em doses ínfimas, ou seja até  $0.01 \mu\mu\gamma$  ( $1 \times 10^{-14}$ ). Conseguimos, assim, em nossas experiências registrar maior sensibilidade do referido músculo à Ach que as indicadas por outros autores (Bacq, 1937, p. 176; Moussatché, 1949, p. 525; Sawaya, 1951, p. 41; Moussatché & Aronson, 1951, p. 220; Ambache & Sawaya, 1953, p. 53; e Sawaya, 1954, p. 193).

Outro fato digno de especial menção vem a ser a ineficácia da Atropina, reconhecidamente antagonista da Ach e a ausência de reação do músculo à Histamina e ao Curare.

Parece da mais alta importância esta pronta reação do músculo à Ach e o seu rápido e imediato relaxamento. Esta reação é, como vimos, imediata, não obstante a atividade colinesterásica existente no músculo (Bacq & Nachmannson, 1937, p. 369; Sawaya & Mendes, 1953, p. 730). A relação entre a sensibilidade à Ach e a atividade colinesterásica é ponto ainda a ser elucidado. E' de se lembrar, porém, que o referido músculo possui quantidades apreciáveis de acetilcolina (Bacq, 1939, p. 29; 1947, p. 77) as quais agiriam talvez como elemento adjuvante durante a contração. Como se sabe, é um músculo de baixo consumo de oxigênio ( $0.215 \text{ mm}^3$  por miligrama de peso seco por hora, cf. Mendes, 1954, p. 178; 1954, p. 180) se comparado com músculos lisos de homeotermos.

Ainda no que se refere à Ach, é digno de nota o comportamento singular do músculo longitudinal, se cotejarmos com o que ocorre nos músculos estriados dos Vertebrados, não se verificando o efeito antagônico da atropina conhecido nestes últimos músculos.

Por outro lado, as únicas substâncias a que o músculo reage vêm a ser a Ach e a Nicotina, sendo bem distintas as diferenças do comportamento do mesmo em relação a ambas estas substâncias durante a fase de relaxamento. Como se viu, lavada a preparação após a contração sob a influência da Ach, o músculo volta rápida e imediatamente à posição primitiva, mas, no caso da Nicotina, a contração é mais duradoura dando-se o relaxamento somente em ca. de 10-30 minutos após a lavagem.

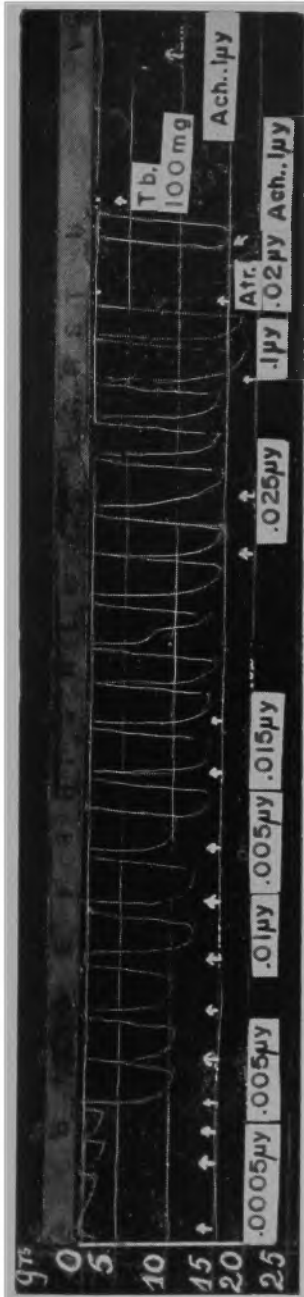


Fig. 8 — Ação da Atropina (Atr.) e da d-tubocurarina (Tb.) sobre o músculo longitudinal de *H. grisea*. Contrações semi-isométricas.

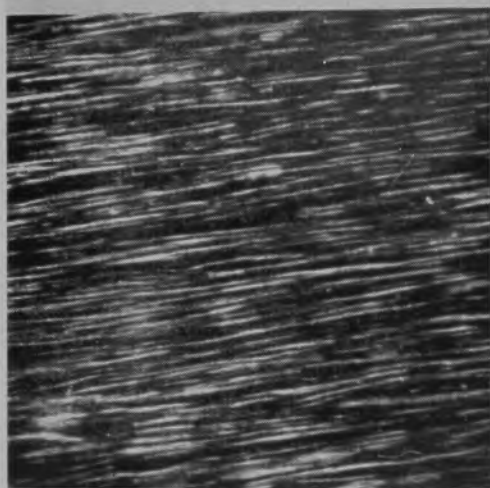


Fig. 9 — Secção longitudinal do músculo longitudinal de *H. grisea* em distensão. Fix. Bouin, Col. Hem. Eosina, x 10 vèzes.

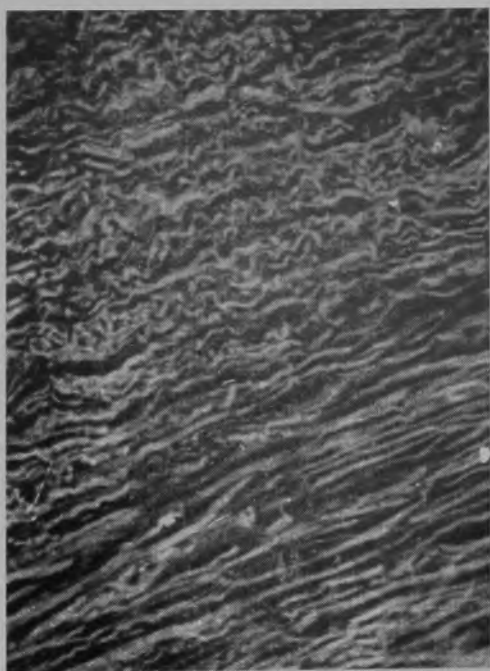


Fig. 10 — Secção longitudinal do músculo longitudinal de *H. grisea*, parte semi-distendida (à esquerda) e parte contraída (à direita). Fix. Bouin, Col. Hem. Eosina, x 10 vèzes.

Cumprê lembrar, neste particular, que os resultados obtidos com o músculo longitudinal de *H. grisea* só em parte confirmam os de Bacq (1937, p. 175) com os de *H. stellata*. Realmente, em ambas, os músculos longitudinais são extremamente sensíveis à Ach, mas, enquanto que nos de *H. grisea* não oferecem reação à histamina, o contrário se dá com os de *H. stellata*. Devido a êste fato, Bacq (l. c.) diz que os mm. longitudinais desta holotúria são inadequados para identificação ou dosagem da acetilcolina em um perfusado de água do mar.

Talvez êsse comportamento diferente dos músculos longitudinais de *H. grisea* e de *H. stellata* corra por conta da diferença de espécie ou de qualquer modalidade técnica.

Outro fato interessante vem a ser a extrema redução do comprimento do músculo logo após separado do corpo do animal. Como foi dito, esta redução pôde ser até da ordem de 80%. Além disso, músculos assim fortemente contraídos podem ser mecânicamente distendidos. Cessada a distensão, voltam depois ao grau de extrema contração, comportando-se como uma fita elástica.

As preparações histológicas de músculos completamente distendidos mostram as fibras musculares delgadíssimas, dispostas umas ao lado das outras, paralelamente (Fig. 9). Já nas preparações em que os músculos foram fixados em estado de máxima contração, tais fibras têm aspecto sinusoide, bem característico.

A Fig. 10 apresenta uma preparação em que em parte o músculo se mostra contraído e em parte distendido. Nesta preparação vêem-se perfeitamente os aspectos supra mencionados. Esta grande capacidade de contração do músculo pode ser explicada pelo fato de, na extensão máxima, as fibras musculares que se achavam contraídas e, portanto, em disposição sinusoide, distenderem-se e deslizarem-se umas sôbre as outras de modo a dar ao músculo o aspecto típico de fibras musculares paralelas.

Outro fenômeno para o qual pensamos se deva chamar a atenção vem a ser a progressiva distensão do músculo que se obtém principalmente em preparações que permaneceram vá-

rias horas na geladeira ou mesmo em preparações frescas usadas durante longo tempo no aparelho de perfusão.

É muito comum, quando se toma um músculo já em contração, com cerca de 3 cms de comprimento e se o submete à ação da Ach a várias concentrações, não retornar êle exatamente ao estado primitivo, mas apresentar em relação a êste, um certo grau de distensão, o qual vai aumentando pouco a pouco até um limite que ocorre quando o músculo se torna praticamente insensível a doses mesmo altas de acetilcolina.

Como causa desse fenômeno foi lembrada a própria Ach que, além do efeito de determinar a contração rápida do músculo, também teria uma ação sobre a miofibrila de tal modo a provocar o seu relaxamento gradativo com perda da elasticidade, ou induziria talvez uma certa disposição do sarcoplasma, fazendo-o perder o seu poder contrátil. A êste fenômeno deu-se o nome de "efeito de acetilcolina" (Sawaya, 1951, p. 41). Não obstante o grau de conhecimento que se tem da estrutura dos mm. longitudinais (Antunes 1954, p. 167; Mendes 1954, p. 145) e mesmo de sua ultraestrutura (G. A. Edwards & P. S. Santos, comunicação pessoal) ainda não se encontrou explicação para o chamado "efeito da acetilcolina".

Cumprê ainda chamar a atenção para o fato de tal efeito ocorrer apenas com a Ach, pois a nicotina não o determina.

Além destas observações deduzidas das experiências realizadas, vale a pena lembrar alguns fatos relacionados com o comportamento do animal vivo e o alto poder de contração dos músculos longitudinais.

Quando Pantin & Sawaya (1953, p. 51) efetuaram várias experiências para medir a variação do corpo do animal em diferentes condições, puderam correlacionar o alto poder de contração dos músculos longitudinais com aquela variação. Assim, uma holotúria depositada num aquário com água, periodicamente suga o fluido pela cloaca, expulsando-o depois de algum tempo. Com isso faz variar o volume do corpo de 10%. Evidentemente, conforme verificaram aquêles autores, esta variação decorre principalmente da contração conjugada dos músculos longitudinais e circulares do animal.

## VII

## RESUMO

Demonstrou-se a grande sensibilidade do m. longitudinal de **H. grisea** à Ach. Os ensaios fazem-se com grande rapidez, se comparados com os outros métodos usualmente preconizados na determinação do teor da Ach em extratos de tecidos.

Confirmou-se a sensibilidade do m. longitudinal de **H. grisea** à acetilcolina na dose de  $1 \times 10^{-14}$  ou sejam  $0.01 \mu\mu\gamma$  por ml. Verificou-se ainda mais a estreita relação entre a concentração do éster e a intensidade de contração. Isto pôde ser bem avaliado com o uso de alavancas semi-isométricas, com as quais se obtiveram os registros gráficos que possibilitaram a avaliação da tensão dos músculos. Tomando-se os valores médios das tensões e comparando-os com as concentrações de Acetilcolina obteve-se um gráfico bastante significativo (Fig. n. 3).

Demonstrou-se ainda mais que o m. longitudinal de **H. grisea** não reage à atropina e nem à histamina. E', porém, sensível à nicotina. As diferenças das contrações decorrentes da ação da Ach e da nicotina, estão no fato de ser o referido m. muito mais sensível à primeira que à segunda substância. Além disso, o período de contração é muito mais longo quando o mesmo se acha sob a influência alcaloide que do éster colínico.

Visto ser muito rápida a volta do músculo ao estado normal, após a lavagem do mesmo quando se encontra sob a influência da acetilcolina é o mesmo recomendado nos métodos rápidos de ensaios do teor do éster nos extratos de tecidos.

Não se observaram em tôdas as experiências os movimentos espontâneos, assinalados por outros autores, em mm. longitudinais de holotúrias (Bacq 1926, p. 172 em **H. tubulosa** e **Stichopus badionotus**; Moussatché, 1941, em **H. grisea**) o que recomenda o uso desse músculo para as dosagens de Ach.

Atribuiu-se a ocorrência de movimentos espontâneos a precárias condições dos animais mantidos nos aquários. Chama-se a atenção neste particular, para o fato de, quando tais condições forem realmente precárias, a holotúria poder chegar a expulsar as vísceras.



Alude-se ainda ao fenômeno denominado por Sawaya (1951, p. 41) "efeito de acetilcolina" que consiste na ação extensora que o éster, ao fim de algum tempo, provoca no músculo. Êste fenômeno foi várias vêzes verificado nas experiências aqui realizadas.

Finalmente, nos comentários lembram-se vários dados da bibliografia recente em especial a relação entre o forte poder de contração dos mm. longitudinais e as variações de volume do corpo de **H. grisea** como Pantin & Sawaya tiveram oportunidade de determinar em 1953, aspectos que se podem também relacionar com a estrutura especial dêste mms, assunto êste também aqui, objeto de estudo.

Em conclusão:

1. O músculo longitudinal de **H. grisea** é extremamente sensível à influência da acetilcolina, contraindo-se quando sob a influência dêste éster na concentração de  $0.01 \mu\mu\gamma$  ( $1 \times 10^{-14}$ ). Lavada a preparação, o relaxamento do músculo é imediato.
2. O músculo longitudinal de **H. grisea** não reage em presença da atropina, da histamina e do curare.
3. A atropina não impede a ação da Ach.
4. Dada a grande sensibilidade do m. longitudinal de **H. grisea** à Ach e a relação aproximadamente constante entre a intensidade da contração e a concentração da droga, e ainda mais, à vista do imediato relaxamento do referido músculo quando subtraído à ação, pode ser recomendado como material excelente para a determinação do teor de acetilcolina nos extratos de tecidos.
5. O m. longitudinal de **H. grisea**, quando perfundido com água do mar filtrada, não apresenta contrações espontâneas.
6. Discutiram-se as relações entre o comportamento de **H. grisea**, as propriedades dos mm. longitudinais e a estrutura dos mesmos.
7. O músculo longitudinal de **H. grisea** reage também à nicotina. Lavada a preparação o relaxamento do músculo dá-se sòmente após 20-30 minutos.

## VIII

## SUMMARY

ON THE PHYSIOLOGY OF THE LONGITUDINAL  
MUSCLES OF **HOLOTHURIA GRISEA**.

Distribution of the striated and smooth muscles in Invertebrates and Vertebrates presents a great deal of variation. In the later the somatic muscles are always striated and the visceral ones are smooth, except the cardiac muscle. But in Invertebrates, there are some classes as, for exemple, the Insects, in which the musculature is exclusively striated, and in others, as the Echinoderms, all the muscles are smooth.

The physiology of such muscles of Invertebrates has developed in several directions by the use of modern techniques of research, chiefly those introduced in pharmacology.

This paper deals with some interesting aspects presented by the longitudinal muscles of one of the most common Holothurians found at the Brazilian coast — the **Holothuria grisea**, Selenka 1867.

The longitudinal muscles of several species of holothurians has been investigated before by different authors. Bacq (1937, p. 174), Moussatché (1949, p. 521), Sawaya (1951, p. 41), Ambache & Sawaya (1953, p. 53) and others have demonstrated the great sensitivity of those holothurian muscles to Acetylcholine, which was mentioned by Sawaya (l. c.) as to about  $1 \times 10^{-14}$ , that is  $.01 \mu\mu\gamma$  per ml of sea water.

In order to confirm the different results referred to in current litterature, and as an attempt to introduce a simple and inexpensive method for biological assay of Ach, several experiments were performed by using the longitudinal muscles of **Holothuria grisea**, captured at the Marine Biological Laboratory of São Sebastião (L. B. M.) and maintained in the laboratory of the Department of General and Animal Physiology, in São Paulo, where several animals were transferred to

in good conditions. These Echinoderms were kept alive for a long time at the laboratory in running filtered sea-water.

Resting holothurians frequently measure ca. 40 cm in length, but this figure falls to about 20 or 15 cm when the animals are irritated. If the stimulus is strong enough the holothurians expulse the intestines, as it is well known.

When the longitudinal muscles are taken off from the body the original length of 40 cm of resting animals can be reduced to about 2 cm. Some peculiarities of the structure of those muscles are responsible for this remarkable shortening as will be seen later.

For perfusing fluid filtered sea water was employed in the common perfusing bath. A piece of 2 to 3 cm of the longitudinal muscle of recently captured holothurians was immersed in a filtered sea water bath of about 10 ml capacity and a rather strong stream of air is passed through the suspending fluid for securing prompt mixing and supplying of oxygen.

The muscle was attached to a gimbal or shield modified level and after resting for some time known doses of Ach (Acetylcholine Roche) either Atropine sulfate (Roche or Merck), Histamine (hi-hydrochloride of histamin from Pfanstiehl Chemical Co.), d-tubo-curarine (bios Laboratories) or Nicotine (Eastman Organic Chemicals) were added to the perfusing bath, and the contractions recorded according to the common pharmacological techniques.

The results are shown on the several recordings. Fig. n. 1 records the muscular contraction after addition of .001 to .01  $\mu\gamma$  of Ach. It is noted that after each dose of Ach the muscle contracts very quickly and after washing relaxation follows promptly (less than 3 minutes on average), so that within limited time many experiments can be done.

Other experiments were used with semi-isometric levels, in order to see the relationship between the doses of the drug and the muscular tension. Fig. n. 2, indicates several results by which a relation between the tension of the muscle and the concentration of Ach can be detected. Fig. n. 3 shows the mean

values obtained in several experiments by the use of different doses of Ach. These results permit us to recommend the use of the longitudinal muscles of **H. grisea** for biological assays. In Fig. n. 4 the intensity of the contraction of the muscles determined by  $2 \mu\gamma$  to 20 mg of Ach can be seen, and in Fig. n. 5 the effect of minimal doses of the ester (5 mcg) is clearly seen. By using a very small doses of Ach ( $.01 \mu\gamma$ ) very often no reaction of the muscle is recorded, but by repetition of the experiment after a little later the muscle starts to react. This phenomenon is compared to that of facilitation.

Correlation between concentration of Ach and tension of the muscle are indicated in Fig. 7, when small doses of Ach (5 to  $5 \mu\gamma$ ) are employed and the tensions vary intensively (from 2.5 gr to 11 gr.). If less concentrated solution of Ach is used in the bath ( $.0005 \mu\gamma$  to  $.1 \gamma$ ) the tensions vary from 1 gr to 18 gr.

No influence was observed when either atropine, histamine or d-tubo curarine were added to the bath. Also, the well known anatagonism between atropine and Ach is not noticed in the longitudinal muscle of **H. grisea**.

Besides Ach only Nicotine has a strong effect on that muscle. The difference between the two effects, those of Ach and those of Nicotine, is that the alcaloid provokes stronger and more stable contraction of the muscle. Another difference is that when the preparations is washed out, after Ach, the muscle relaxes immediately (3 minutes on the average) and after the action of Nicotine the relaxation does not occur in less than 20 to 30 minutes. Very often under Nicotine influence the muscle remains in contracture of a long time, in spite of several renewing of the filtered sea water of the bath. By toxic dose of Nicotine ( $1 \times 10^{-2}$ ) the muscle does not recover at all.

Ach acts not only by promoting the contraction of the longitudinal muscle of **H. grisea** but also after the addition of the drug to the bath the muscle presents, after washing, a continuous extension in the length. If the muscle stays for a long time in experiments, about 5 or 8 hours, or if the muscle used has been kept long enough in the ice-box, the extension after relaxation is progressively more and more intense. It

seems that either the Ach has some effect on the myofibers, or acts on the sarcoplasma in order to determine a lose of contractility, because under these conditions the preparation became less sensitive to Ach. This peculiarity of the longitudinal muscle is called "acetylcholine effect". Up to now no other explanation has been found for this "acetylcholine effect" of the longitudinal muscle of **H. grisea**.

The structure of these muscles was also studied. Out of the body the muscle presents very strong contraction, has been said, the length pass from 40 cm to 2 or 3 cm, but if an extension is made by pulling at both ends the primitive length can be reached. As a matter of fact this behaviour of the muscle is in relation to the disposition of its myofibers as can be seen in Fig. n. 9 and 10. In the extended muscle (Fig. 9) the myofibers have parallel disposition, but in contracted muscle (Fig. 10) they appear in sinusoidal form. The abundance of collagen also may take part in the strong elasticity of that muscle.

Finally, according to Pantin & Sawaya (1953, p. 51) the longitudinal muscles of **H. grisea** and the circular ones are responsible for the continuous changes of the body volume. The animals, as have been shown, alters the body volume from about 10% by expelling sea water through the cloaca.

### CONCLUSIONS

1. The longitudinal muscles of **Holothuria grisea** are extremely sensitive to Ach. They contract immediately after adding  $.01 \mu\mu\gamma$  ( $1 \times 10^{-14}$ ) of Ach to the perfusion bath. After washing, relaxation follows immediately.
2. The longitudinal muscles of **H. grisea** are insensitive to atropine, histamine or d-tubo-curarine.
3. Atropine sulfate does not block the effect of Ach.
4. In view of the great sensitivity of those muscles to Ach and to the close relation between the intensity of contraction and the concentration of the drug, those muscles are recommended for biological assays in order to determine the amount of Ach in tissues extracts.

5. The longitudinal muscles of *H. grisea* normally do not present spontaneous contractions.
6. The behaviour of those muscles is discussed according its microscopical structure.
7. The longitudinal muscles of *H. grisea* are also sensitive do nicotine. After washing they do not relax immediately, but only after 20-30 minutes.

## IX

## BIBLIOGRAFIA

- AMBACHE, N. & SAWAYA, P. — 1953 — Use of *Holothuria grisea* for Acetylcholine assays of electric organ extracts from *Narcine brasiliensis* (Ölfers). *Physiol. Comparata et Oecologia*, v. 3, n. 1, pp. 53-56, Den Haag.
- ANCONA LOPEZ, A. A. & SAWAYA, P. — 1955 — Holotúrias de Recife. *Ciência e Cultura*, v. 7, n. 3, p. 166, São Paulo.
- ANTUNES, R. A. — 1954 — Histologia do Músculo longitudinal de *Holothuria*. *Ciência e Cultura*, v. 6, n. 4, p. 167, São Paulo.
- BACQ, Z. M. — 1937 — Nouvelles Observations sur l'Acetylcholine et la cholinesterase chez les invertébrés. *Archiv Int. Physiol.* v. 44, pp. 174-188, Liège.
- 1935 — Recherches sur la physiologie et la pharmacologie du système nerveux autonome. XVII. Les esters de la choline dans le extraits des tissues des Invertébrés, *Arch, Intern. Physiol.* v. 42, pp. 24-42, Liège.
- 1939 — Un test marin pour l'acetylcholine. *Ibid.* vol. 49, pp. 20-24, Liège.
- 1947 — L'Acetylcholine et l'adrénaline chez les Invertébrés. *Biol. Rev.*, v. 22, n. 1, pp. 73-91, Cambridge.
- BACQ, Z. M. & NACHMANSON, D. — 1937 — Cholinesterase in Invertebrate muscles. *J. Physiol.* v. 89, pp. 368-371, London.
- JORDAN, H. — 1914 — Die Holothurien als hohlorganatige Tiere und die Tonusfunktion ihres Muskulatur. *Zool. Jahrb., Abt. Allg. Phys.*, 34, f. 3, pp. 365-436, Jena.
- MENDES, E. G. — 1954 — Sôbre o metabolismo do músculo longitudinal de "*Holothuria*". *Ciência e Cultura*, v. 6, n. 4, p. 178, S. Paulo.
- 1954a. — Sôbre o metabolismo e o Equipamento enzimático do músculo longitudinal de *Holotúria*. *Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zool.* n. 19, pp. 123-193, S. Paulo.
- MOUSSATCHE', H. — 1949 — O músculo das *Holotúrias* ("*Holothuria grisea*"), como método de ensaio biológico, para verificar

- a presença de acetilcolina. Rev. Bras. Biol., v. 9, n. 4, p. 525, Rio de Janeiro.
- MOUSSATCHE', H. & ARONSON, M. — 1951 — Sur l'emploi des holothuries comme méthode d'essai biologique et de dosage de l'acetylcholine. Rev. Bras. Biol., v. 11, n. 2, pp. 219-221, Rio de Janeiro
- PANTIN, C. F. A. & SAWAYA, P. — 1953 — Muscular action in *Holothuria grisea*. Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zoologia n. 18, pp. 51-61, São Paulo.
- SAWAYA, P. — 1951 — Sensibilidade do músculo longitudinal Radial de *Holotúria* à Acetilcolina (efeito da acetilcolina). Ciência e Cultura v. 3, n. 1, pp. 41-42, São Paulo.
- 1954 — Sôbre a contração do músculo longitudinal de "*Holothuria grisea*". Ciência e Cultura, v. 6, n. 4, p. 193, S. Paulo.
- SAWAYA, P. & MENDES, E. G. — 1953 — Studies on the Action of Acetylcholine in Insects and Echinoderms XIX Int. Physiol. Congress, Montreal, pp. 130, Montreal, Canadá.

