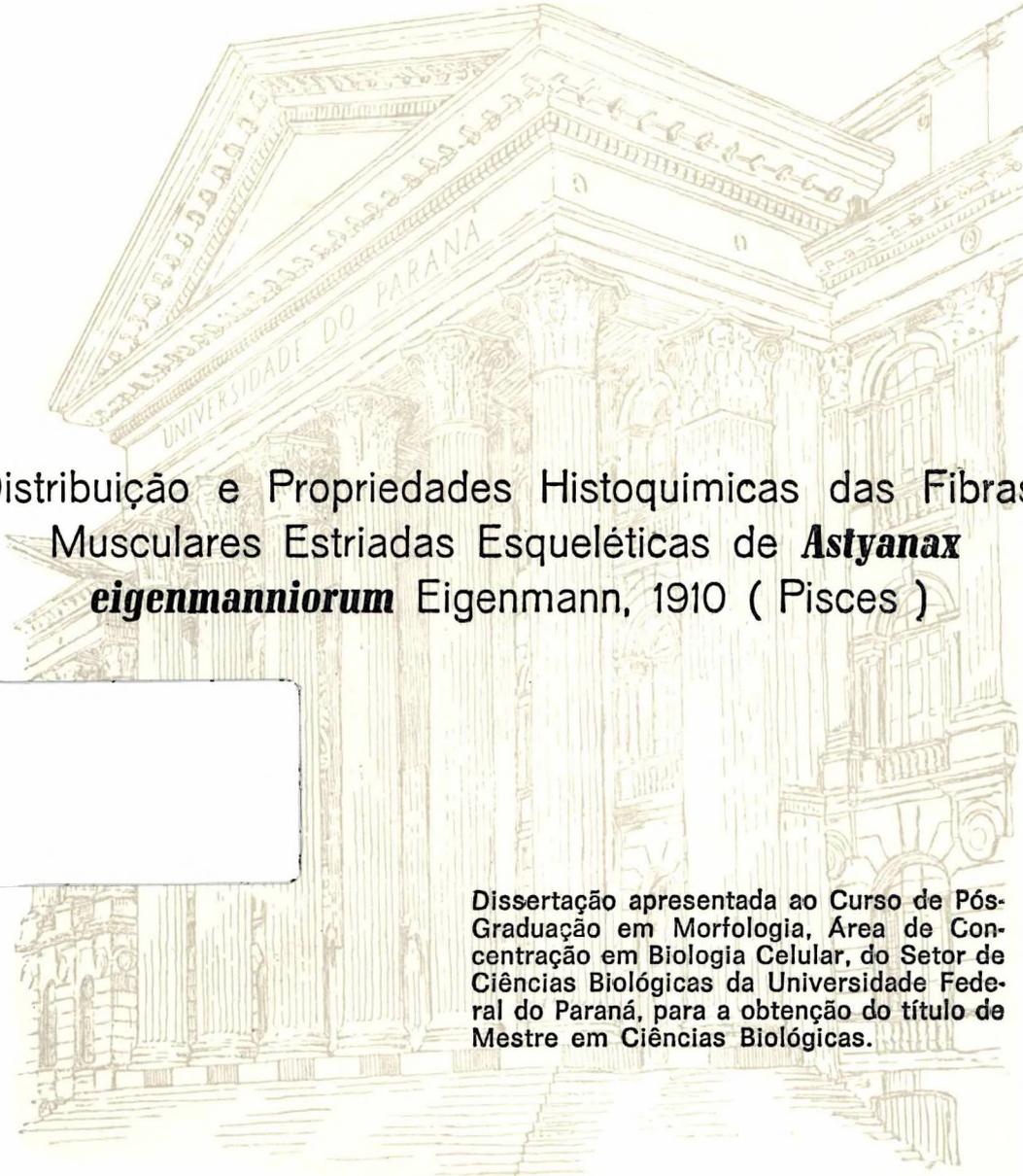


CLAUDIO DE PAULA SOARES GRECA



Distribuição e Propriedades Histoquímicas das Fibras Musculares Estriadas Esqueléticas de *Astyanax eigenmanniorum* Eigenmann, 1910 (Pisces)



Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA  
1991

CLÁUDIO DE PAULA SOARES GRECA

Distribuição e Propriedades Histoquímicas das Fibras  
Musculares Estriadas Esqueléticas de *Astyanax*  
*eigenmanniorum* Eigenmann, 1910 ( Pisces )

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA  
1991

**ORIENTADOR**

**Prof. Dr. Waldemiro Gremski**

Ao amigo Waldemiro Gremski, a quem  
devemos a iniciação no magistério  
superior, nosso apreço e gratidão.

Ana Cristina e Marianna  
esposa e filha queridas,  
razão da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, pela orientação, constante apoio e amizade, que contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha esposa amada, Ana Cristina, pelo constante apoio e incentivo, principalmente nas horas de desânimo e cansaço.

A minha amada filha, Marianna, motivo pela qual obtive forças, a ela dedico esta tese.

A Profa. Maria Célia Jamur, pelo auxílio acerca das dúvidas referentes aos procedimentos histoquímicos, contribuindo decisivamente para a realização desta dissertação.

A Profa. Loide de Souza Baena Bichara, pelos esclarecimentos e sugestões apresentadas.

A Universidade Federal do Paraná e aos colegas do Departamento de Biologia Celular, pela colaboração, compreensão e amizade.

A CAPES - Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pelo auxílio concedido, possibilitando a realização do mestrado.

Ao Sr. Pedro e a todas as pessoas que trabalham na Estação de Piscicultura do Parque Regional do Iguaçu, pela captura de todos os espécimes utilizados nesta pesquisa.

A Profa. Maria Eugênia Lopata, pelos desenhos ilustrativos.

Ao amigo e primo Luiz Russo, pelos serviços datilográficos.

Aos meus pais queridos, Eros e Berenice pelo incentivo e compreensão.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade.

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	viii
RESUMO .....	xi
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
III. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
IV. RESULTADOS .....	38
V. ILUSTRAÇÕES .....	51
VI. DISCUSSÃO .....	65
VII. CONCLUSÕES .....	86
SUMMARY .....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PÁGINA
1 A.	Vista externa lateral de <i>Astyanax eigenmanniorum</i> .....	52
1 B.	Vista superficial da musculatura lateral de <i>A. eigenmanniorum</i> após a retirada da pele. ....	52
1 C.	Disposição anatômica de alguns miômeros isolados. ....	52
2.	Representação do aspecto exibido pelos miômeros nos cortes transversais seriados. ....	53
3.	Fotografia de <i>A. eigenmanniorum</i> com alguns miômeros isolados. ....	54
4.	Corte transversal da região caudal. Mallory + Hematoxilina. ....	54

FIGURA	PÁGINA
5. Corte transversal da camada muscular vermelha da região caudal. Mallory + Hematoxilina. ....	55
6. Corte transversal da camada muscular branca da região caudal. Mallory + Hematoxilina. ....	56
7. Corte transversal do tecido muscular da região cefálica, abrangendo fibras musculares do tipo I e II, com os subtipos II A e II B. SDH. ....	57
8. Corte transversal das fibras musculares. SDH. ....	58
9. Corte transversal da região cefálica. NADH - TR. ....	59
10. Corte transversal da camada muscular constituída por fibras do tipo I. NADH - TR. ....	60
11. Corte transversal da região do tronco. NADH - TR. ....	61
12. Corte transversal da região da cauda, exibindo a camada muscular constituída por fibras do tipo II B. NADH - TR. ....	62

FIGURA		PÁGINA
13.	Corte transversal da região cefálica, exibindo as fibras do tipo I intensamente coradas. ATPase pH 4,6. ....	63
14.	Camada muscular constituída pelas fibras do tipo II. ATPase pH 4,6. ....	63
15.	Corte transversal da região cefálica, mostrando a transição da camada de fibras do tipo I para o tipo II. ATPase pH 4,6. ....	64

## RESUMO

Foi estudada a anatomia, histologia e histoquímica da musculatura estriada esquelética lateral do corpo do teleósteo *Astyanax eigenmanniorum* Eigenmann, 1910 ( Pisces ), com o objetivo de se conhecer os diferentes tipos de fibras musculares que ocorrem neste peixe, conhecidas como tipos I, II A e II B, bem como a sua distribuição no corpo do animal. Foram evidenciadas as unidades musculares do animal - os miômeros - entre os quais se interpõe um delgada camada de tecido conjuntivo, o miosepto. Tais estruturas, observando-se o peixe com a pele destacada, oferecem um aspecto em ziguezague; enquanto isso os cortes transversais revelam uma série de secções cônicas incompletas que se sobrepõem. Cada miômero, quando isolado, evidencia três prolongamentos voltados para a porção anterior e dois voltados para a porção posterior do corpo do animal, o que confere para a unidade muscular a forma de um W.

Utilizando-se técnicas histoquímicas, as fibras musculares reagiram de acordo com a sua localização e método adotado. Para as técnicas de detecção da SDH e NADH-TR, a camada muscular vermelha superficial respondeu positivamente, com o

mesmo ocorrendo para a técnica para a ATPase miofibrilar a pH 4,6. Tal comportamento levou à conclusão de que esta camada muscular está constituída exclusivamente por fibras do tipo I. Além disso, há as fibras de diâmetro reduzido ( F D R ) que situam-se próximas ao miosepto que delimita esta camada muscular da seguinte. Tais fibras reagiram às técnicas histoquímicas da mesma forma que as fibras do tipo I.

A situação se inverte para as fibras das camadas mais profundas, situadas abaixo da anterior. Nessa região a reação é fraca tanto para a SDH e NADH-TR como também para a ATPase. Por este motivo concluiu-se que tais células representam as fibras classificadas como do tipo II. Ao aplicar-se a reação para as enzimas oxidativas, notou-se uma heterogeneidade na resposta histoquímica das fibras, possibilitando tal método a subdivisão das fibras do tipo II nos subtipos II A e II B, fato que por vezes se repetiu na reação para a ATPase miofibrilar, onde as células do tipo II A e II B apresentaram-se respectivamente mais escuras e mais claras. As fibras do tipo II A ocupam uma região de transição entre as camadas de fibras do tipo I e tipo II B. Por apresentar reação histoquímica em nível intermediário, as fibras do tipo II A são também classificadas como intermediárias. As fibras do tipo II B, por sua vez, são conhecidas também como fibras brancas clássicas.

## I - INTRODUÇÃO

Os peixes representam um importante elo de ligação na escala evolutiva. Constituem-se nos primeiros vertebrados surgidos no decorrer da evolução, tornando-se etapa fundamental de estudo para se compreender filogeneticamente os diferentes aspectos histofisiológicos envolvidos nesse processo. Trata-se, além disso, de um modelo experimental simples e sistematizado, pois são dotados de um sistema nervoso e muscular pouco evoluído. Este fato os põe como um parâmetro privilegiado nas pesquisas comparativas, principalmente quando se trata de esclarecer dúvidas com relação à organização de sistemas mais aprimorados como no caso de vertebrados superiores.

A maioria absoluta dos trabalhos e estudos referentes à estrutura, histoquímica, fisiologia e bioquímica dos tecidos musculares estão voltados para a obtenção de informações relativas ao homem e a outros vertebrados, sendo poucos os autores que objetivam esclarecer as inúmeras dúvidas existentes em relação ao tecido muscular de vertebrados inferiores, especialmente os peixes.

Considerando-se a inegável importância que estes animais

detém no concerto da vida, seja pelo fato de terem sido os primeiros vertebrados a surgirem na escala evolucionária ou por representarem importante fonte de proteínas, o presente trabalho propõe-se, em âmbito geral, a fornecer informações, tanto em relação à variação anátomo-estrutural como histoquímica da musculatura estriada esquelética do tronco do teleósteo *Astyanax eigenmanniorum* Eigenmann, 1910 ( Pisces ).

## II - REVISÃO DA LITERATURA

LANGLER et al. ( 1962 ), estudando a musculatura estriada esquelética dos peixes, observaram que esta era formada por unidades em forma de *W*, os miômeros, que se repetem desde a região pós-cefálica até a região caudal do animal, o mesmo sendo descrito por outros estudiosos ( WALKER, 1975; PIRLOT, 1976; JAMUR, 1982 ). Determinaram também, os mesmos autores, que a musculatura está dividida em duas massas separadas por um septo esqueletogenoso horizontal que divide os miômeros em massa muscular epaxial ou dorsal, e massa hipaxial ou ventral, fato também corroborado por outros autores em diferentes espécies de peixes ( ALEXANDER, 1969; WALKER, 1975; JAMUR, 1982; BICHARA, 1983 ).

Já ALEXANDER ( 1969 ), através do estudo de miômeros em cortes transversais e longitudinais de *Gnastostomos*, determinou que cada unidade muscular, separada por um miosepto de natureza conjuntiva, seria formado por uma série de secções cônicas incompletas, dispostas uma sobre a outra, com seus ápices dirigindo-se alternadamente à região anterior e posterior do animal. Assim, cada miômero seria formado por cinco cones, sendo

três anteriores ( voltados para a cabeça ) e dois posteriores ( voltados para a cauda ) configurando um W ( ALEXANDER, 1969 ).

TERAVAINEN ( 1971 ) descreve a musculatura das lampréias, inferindo que cada miótomo consiste em geral de quatro camadas ( ocasionalmente três ou cinco ) de fibras musculares centrais separadas por uma camada de fibras parietais que as envolvem. Estas dispõem-se longitudinalmente e nos cortes transversais apresentam-se ovais ou retangulares ( HULBERT & MOON, 1978 ).

WALKER ( 1975 ) ao descrever a musculatura do tronco de peixes, confirma os mesmos resultados obtidos por LANGLER et al. ( 1962 ) e ALEXANDER ( 1969 ), salientando o fato de que os miômeros formam um complexo em ziguezague, sendo divididos por um septo horizontal esqueletogenoso que ocorre abaixo da linha lateral e que se estende da pele até a coluna vertebral do peixe.

NURSALL ( 1956 ) determinou três formatos de miômeros em diferentes espécies de peixes. Em Anfioxo, o miômero apresenta a forma de V; em *Ciclóstomos* a forma lembra um W com ângulo médio pouco profundo e arredondado, e nos demais peixes os miômeros tem também a forma de W, mas com ângulo médio mais profundo e geralmente agudo.

HULBERT & MOON ( 1978 ) ao observarem a organização dos músculos axiais de enguias, denominaram a unidade muscular de miótomo, referindo que estes possuem forma de W e são delimitados por um sistema perimisial.

JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ), ao estudarem

respectivamente as espécies *Rhamdia branneri* e *Flecostomus commersonii*, constataram que a primeira possui sua musculatura formada por miômeros em forma de *W* e a segunda em forma de *V*, sendo que sempre há o miosepto conjuntivo separando tais unidades.

Estes autores também indicam a presença de um septo esqueletogenoso axial horizontal ou lateral, que divide a massa muscular em duas grandes fases: a porção epaxial ou dorsal, situada acima do septo e a porção hipaxial ou ventral, situada abaixo do septo (LANGLER et al, 1962; ALEXANDER, 1969; WATERMAN, 1969; WALKER, 1975).

JAMUR ( 1982 ) analisou a morfologia de um miômero isolado, distinguindo três prolongamentos voltados para a porção cefálica do peixe. Dois destes cones estão direcionados mediano-lateralmente, sendo denominados de cones anteriores subsidiários, que se alternam com um prolongamento central e maior, denominado cone anterior principal (ALEXANDER, 1969). Este último apresenta uma porção ventral côncava que se encaixa com a porção dorsal convexa do cone anterior principal do miômero seguinte, enquanto que o ápice deste cone anterior insere-se na coluna vertebral. Há ainda dois cones posteriores que dispõem-se alternadamente com os anteriores (ALEXANDER, 1969).

Os mioseptos que envolvem os miômeros, quando vistos em conjunto, dão à musculatura axial subepidérmica o aspecto de ziguezague que se repete por todo o tronco do animal.

PIRLOT ( 1976 ) divide a musculatura dos peixes em parte axial ( tronco ) e parte apendicular.

A observação de que os músculos dos vertebrados eram formados por diferentes tipos de fibras musculares, levou muitos pesquisadores a tentar classificá-los baseando-se em estudos fisiológicos, bioquímicos, histológicos e histoquímicos.

RANVIER ( 1873, 1874, 1880 ) citado por JAMUR ( 1982 ), sugeriu diferenças fisiológicas entre as fibras musculares vermelhas e brancas, relacionando sua velocidade de contração como lentas e rápidas, respectivamente.

GRUTZNER ( 1884 ) concluiu que os músculos dos vertebrados eram constituídos por dois tipos de fibras musculares, uma delgada ( pequeno diâmetro ) e escura, e outra mais espessa ( grande diâmetro ) e mais clara. A cor escura, devia-se à presença de maior quantidade de protoplasma entre as miofibrilas ( KNOOL, 1891 ) e presença de grânulos intersticiais ( KOLLIKER, 1857 ), denominados de sarcossomos por RETZIUS ( 1890 ).

Já muito anteriormente LORENZINI ( 1678 ), citado por CIACCIO ( 1898 ), separava a musculatura de vários animais em vermelha e branca. BICHARA ( 1983 ) infere que na região do septo horizontal axial, inclusive nas porções mais internas da musculatura do tronco de *P. commersonii*, a musculatura apresenta-se com cor marrom-escura, formando uma faixa ântero-posterior que ocupa toda a região caudal.

LEE et al. ( 1916 ), citado por BULLARD ( 1919 ), percebeu diferenças químicas e fisiológicas na musculatura de gatos, sem contudo demonstrar qualquer variação histológica entre as fibras.

BULLARD ( 1919 ), empregando a técnica de coloração pelo SUDAM III conseguiu distinguir três tipos básicos de fibras, em diferentes músculos de gatos: as escuras, as intermediárias e as brancas, de acordo com o teor de gordura que as mesmas apresentavam, relacionando este aspecto com a capacidade de trabalho de cada tipo de fibra.

DENNY-BROWN ( 1929 ), confirma tais resultados nos mesmos mamíferos, porém sem demonstrar as relações quanto à velocidade de contração e as características histológicas das fibras.

Dando continuidade à tentativa de distinguir os tipos de fibras musculares, HODGEBOM et al. ( 1946 ) e PAUL & SPERLING ( 1952 ), correlacionaram a população de mitocôndrias com a atividade respiratória dos diferentes músculos de vertebrados, indicando que as fibras brancas possuem menor conteúdo de mitocôndrias e atividade respiratória reduzida, ocorrendo o contrário com as fibras vermelhas.

BRAEKKAN ( 1956 ) concluiu que o músculo vermelho de peixes possui maior conteúdo de gordura e glicogênio que o branco, sendo por este fato menos fatigável.

BONE ( 1966 ), descreve dois tipos principais de fibras musculares em miótomos de *Elasmobrânquios*, sendo que as fibras

rápidas possuem menor teor de glicogênio, gordura e mitocôndrias além de apresentarem padrão de inervação diferente do das fibras lentas, as quais apresentam maior quantidade de mitocôndrias, glicogênio e gordura. Conclui também que em movimentos vigorosos do corpo, há maior participação das fibras rápidas ou brancas do que de fibras vermelhas ou lentas, que atuam nos movimentos natatórios normais do animal.

GEREBTOZOFF ( 1956 ) e BUTTKUS ( 1963 ) já haviam determinado dois tipos diferentes de fibras, as vermelhas e as brancas, com papéis diferentes na locomoção dos peixes.

MELGREEN & MATHISEN ( 1966 ) concluem que em Hagfish as fibras vermelhas sejam as responsáveis pelos movimentos natatórios normais, enquanto que as fibras brancas somente atuam em períodos curtos de natação vigorosa.

HUDSON ( 1973 ), além de relacionar as fibras brancas com a velocidade de natação dos peixes, também distingue dois tipos básicos de fibras: as vermelhas e as brancas, sendo que as primeiras encontram-se logo abaixo da pele e as brancas constituem a maior parte do miótomo. Tais estudos confirmam os resultados obtidos por MAURER ( 1894 ) e COLE ( 1907 ) em *Myxine glutinosa*, e de WARTERMAN ( 1969 ), que estudou exemplares de Peixe-Zebra. Este último autor observou que a porção superficial da musculatura é composta por fibras pequenas e altamente vascularizadas, enquanto que na parte mais profunda há fibras de diâmetro maior e menos vascularizadas, sendo que BONE ( 1966 ) afirma que a quantidade das primeiras aumenta progressivamente na

direção caudal ( ântero-posterior ) do animal. Este fato foi também observado na musculatura de espécimes de *R. branneri* por JAMUR ( 1982 ).

FLOOD & MATHISEN ( 1962 ), estudando exemplares de *Myxine glutinosa*, denominaram os dois tipos de fibras musculares como tipos I e II, além de descrever um terceiro tipo situado abaixo da camada superficial da musculatura, contendo quantidades intermediárias de lipídeos e sarcoplasma, bem como diâmetro menor do que aquele das fibras de tipo II ou brancas, e arranjo miofibrilar distinto das demais. De acordo com os autores, as fibras do tipo I correspondem às fibras vermelhas.

JAMUR ( 1982 ) cita a presença de fibras vermelhas logo abaixo da pele de *R. branneri*, salientando que tais fibras dispõem-se sempre paralelas ao longo de todo o eixo do corpo, e apresentam-se mais delgadas em relação às fibras encontradas nas regiões mais profundas e distantes da superfície corporal e cujas características seriam possuírem um diâmetro maior, coloração branca e disposição oblíqua em relação às fibras musculares superficiais. Também confirma as observações de WATERMAN ( 1969 ) no que se refere à riqueza de vascularização nas fibras vermelhas a nível de perimísio e endomísio.

BICHARA ( 1983 ), observando cortes transversais da musculatura de *F. commersonii*, afirma que esta constitui-se de fibras musculares poligonais e de pequeno diâmetro situadas próximas à linha lateral, definidas pela autora como fibras do tipo I. Abaixo desta camada localiza-se uma região mais extensa,

formada por fibras do tipo II, com diâmetro médio maior e com menor quantidade de tecido perimisial conjuntivo que as do tipo I, sendo que as últimas apresentam-se ricas em granulação sarcoplasmática em contraposição com as fibras do tipo II que são pobres nesta granulação quando observadas em HE.

As técnicas histoquímicas possibilitaram localizar sistemas enzimáticos e outros constituintes intracelulares. As principais enzimas estudadas no músculo esquelético são aquelas ligadas à síntese e degradação do glicogênio ( fosforilases ), as desidrogenases ligadas ao ciclo de Krebs ( oxidoredutases ), e as hidrolases ( como a Adenosina Trifosfatase e algumas esterases ).

SEMENOFF ( 1935 ), citado por JAMUR ( 1982 ), notou uma variação na atividade enzimática nas fibras musculares de anfíbios utilizando a técnica clássica do Azul-de-Metileno para a Succinato Desidrogenase ( SDH ).

PADYKULA ( 1952 ), utilizando o método histoquímico para a demonstração da atividade da SDH em músculo de rato, conclui que as fibras de pequeno diâmetro contém maior quantidade desta enzima e de sarcoplasma do que as fibras de diâmetro maior.

PADYKULA & HERMAN ( 1955 ), ao estudarem a especificidade para o método histoquímico para a Adenosina Trifosfatase ( ATPase ) em vários tecidos de rato, observaram que as miofibrilas respondem com forte coloração, ao passo que o sarcoplasma praticamente não se cora pelo precipitado.

NACHMIAS & PADYKULA ( 1958 ), fazendo uso da técnica

para a SDH, começam a distinguir em ratos, as fibras musculares vermelhas, escuras e granulares das fibras brancas, claras e agranulares. Especulam que as fibras de pequeno tamanho (vermelhas), contém maior população de mitocôndrias por unidade de área do que as fibras maiores (brancas).

BÜNO & GERMINO ( 1958 ) encontram os mesmos resultados indicando que as fibras vermelhas (delgadas) de rato fornecem uma reação positiva intensa, enquanto que as fibras brancas (espessas) dão reação muito fraca ou negativa.

OGATA ( 1958 ) reconheceu três tipos de fibras em músculo de diversos vertebrados utilizando-se da técnica para a SDH. Encontra fibras de grande diâmetro, claras e com baixa atividade enzimática; fibras com diâmetro pequeno, vermelhas e com forte atividade; e um terceiro tipo com diâmetro e atividade enzimática intermediários. GEORGE & SCARIA ( 1958 ) mencionam que a alta atividade enzimática das fibras vermelhas deve-se ao conteúdo mitocondrial destas, confirmando assim os resultados de BÜNO & GERMINO ( 1958 ) e NACHIMIAS & PADYKULA ( 1958 ). WACHSTEIN & MEISEL ( 1955 ) observaram tais resultados em músculos humanos.

STEIN & PADYKULA ( 1962 ), combinando os resultados obtidos em fibras estudadas após procedimento histoquímico para SDH, ATPase, esterase e fosforilase, classificam as fibras musculares de ratos em tipos A, B, e C, destacando as do tipo A como brancas clássicas e as do tipo B e C como vermelhas.

DUBOWITZ & PEARSE ( 1960 ) sugerem que os músculos de

mamíferos podem apresentar dois tipos de fibras: as do tipo I com alta atividade oxidativa e baixa atividade glicolítica e as do tipo II com baixa atividade oxidativa e alta glicolítica. Há também as fibras intermediárias, que contudo não foram analisadas com maior profundidade pelo autor. ENGEL ( 1962 ), baseando-se na atividade da ATPase miofibrilar, também defende as conclusões e o sistema de classificação descritos por DUBOWITZ & PEARSE (1960), indicando que as fibras do tipo I exibem baixa atividade ATPásica e as do tipo II alta atividade. BROOKE & KAISER ( 1969 ) vão mais além, demonstrando que o método histoquímico para a ATPase de músculos humanos ( ATPase miosínica ou miofibrilar ) permite distinguir as fibras do tipo I por sua labilidade em pH alcalino, e as do tipo II pela labilidade em pH ácido ( JOHNSTON et al., 1975 ; BÁRÁNY, 1967 ).

BROOKE & KAISER ( 1970 ) propõem uma classificação mais apurada das fibras musculares humanas e de mamíferos, modificando a reação histoquímica de rotina para a ATPase ( em pH 9,4 ), pré-incubando os cortes em vários níveis de pH, conseguindo com isso demonstrar os subtipos do tipo II, denominados II A, II B e II C. Resultados semelhantes foram obtidos por DUBOWITZ & BROOKE ( 1973 ) em músculos humanos, e por TUNEL & HART ( 1977 ).

GUTH & SAMAHA ( 1970 ) e YELLIN & GUTH ( 1970 ) distinguem em mamíferos três tipos de fibras brancas e um ou dois tipos de fibras vermelhas, indiferentemente do tipo de reação histoquímica empregada. Designam os tipos A, B e C para as fibras

coradas para a SDH, tipos alfa, beta e alfa/beta para a reação com ATPase, modificando neste caso os níveis de pH ( entre ácido e básico ) salientando o fato de que os níveis 4,35 e 10,4 são críticos.

BARNARD et al. ( 1971 ), baseando-se na reação histoquímica para a NADH - TR ( Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida - Tetrazolium Reductase ), relacionam em vertebrados as fibras vermelhas, brancas e intermediárias com sua respectiva intensidade de reação, descritas como forte, fraca e intermediária.

DAVIES & GUNN ( 1972 ) associam em mamíferos as fibras musculares de contração lenta e as de contração rápida ao resultado que as mesmas exibem frente às reações histoquímicas para a ATPase miosínica, SDH e fosforilase, relacionando-as com o seu metabolismo aeróbico ou anaeróbico, sem contudo aplicar seus resultados ao sistema de classificação proposto por BROOKE & KAISER ( 1970 ).

ENGEL ( 1974 ) classifica as fibras musculares humanas como sendo do tipo I e II, quando se faz reação histoquímica para a ATPase em pH 9,4. Em pH 4,2 e 4,6 , subdivide as fibras do tipo II em II A, II B e II C. ( BROOKE & KAISER, 1969 e 1970 ; DUBOWITZ & BROOKE, 1973; TUNEL & HART, 1977; HINSTZ et al., 1984 ).

SASAKI ( 1974 ) e WATANABE ( 1978 ), ao estudarem os tipos de fibras musculares em cauda de anuros sob histoquímica e microscopia eletrônica, determinam dois tipos de fibras: aquelas

situadas logo abaixo da pele, com pequeno diâmetro e ricas em mitocôndrias (vermelhas) e aquelas mais profundas com diâmetro maior e poucas mitocôndrias (brancas). Ambas, respectivamente, dão reação forte e fraca para o método da SDH.

KHAN ( 1976 ) determina sete tipos de fibras em aves com o uso da técnica para SDH e ATPase, sendo que há dois subtipos do tipo I, denominadas " Tipo I A Vermelha " e " Tipo I B Vermelha"; dois subtipos do tipo II, denominadas " Tipo II A 1 Vermelho " e " Tipo II A 2 Vermelho " e ainda três subtipos do tipo II Branco, denominados Tipo II B 1, II B 2 e II B 3.

TUNNEL & HART ( 1977 ) classificam as fibras musculares de vários mamíferos em tipos I, II A e II B, segundo a reação para a M - ATPase ( ATPase miosínica ) em pH 7,25 e 9,4.

POOL et al. ( 1979 ) determinam três grupos de fibras musculares em camundongos frente à reação para a SDH, classificando-as como tipos A, B e C de acordo com o nível de atividade enzimática e intensidade de coloração.

BROOKE & KAISER ( 1970 ) consideram que a classificação de fibras em A, B e C pode criar confusão com a classificação das fibras nervosas mielínicas e amielínicas.

WATANABE et al. ( 1980 ) realizam estudo histoquímico e ultraestrutural na musculatura de girinos, conseguindo com isso conhecer a distribuição dos dois tipos principais de fibras musculares ( vermelhas/pequenas e brancas/grandes ) ao longo do corpo desses animais. As fibras vermelhas situam-se na camada mais superficial logo abaixo da pele, ao passo que as fibras

brancas ocorrem principalmente na porção central do corpo.

VITA et al. ( 1980 ) determinaram a existência de quatro tipos de fibras na região central de músculos de rato, classificadas como tipo 1, 2 a, 2 a' e 2 b , e quatro tipos de fibras na região periférica destes músculos, separadas como tipo 1, 2 a, 2 a'' e 2 c , sendo que os tipos 2 a' e 2 a'' foram identificados pela reação para a NADH - TR, enquanto que as demais foram determinadas pela reação para a ATPase.

ROUAUD & TOUTANT ( 1982 ) utilizam a reação para a ATPase e para a NADH - TR para distinguir em aves as fibras do tipo Beta ( de contração rápida ), tipo Alfa' ( de contração lenta ) e tipo Beta' ( fibras tônicas ).

HINSTZ et al. ( 1984 ) classificam as fibras musculares de rato e humanas quanto à reação histoquímica para a ATPase miosínica como tipos I e os subtipos do tipo II ( II A, II B e II C ), comparando estes resultados com uma análise quantitativa do conteúdo enzimático das fibras. Especulam que as fibras do tipo II C correspondem a um tipo intermediário entre as fibras I e II A. EDDINGER et al. ( 1985 ) e TEIXEIRA ( 1985 ) apresentam resultados semelhantes.

CARRY et al. ( 1986 ), utilizando a técnica para a NADH - TR e ATPase em pH 4,6 , separam as fibras musculares estriadas esqueléticas humanas como grosseiras, granulares e finas ( BARNARD et al., 1971 ).

McVEAN et al. ( 1987 ) adotam os resultados obtidos com imunohistoquímica para classificar as fibras musculares de pombos

de contração lenta como tipo ANTI - I ( correspondentes ao tipo I da classificação clássica para M - ATPase ) e tipo ANTI - II A correspondentes ao tipo II clássico. No presente trabalho adotou-se a classificação proposta por BROOKE & KAISER.

Os estudos histoquímicos realizados na musculatura esquelética de peixes, revelam a existência de três a quatro tipos principais de fibras musculares, definidas pela sua natureza metabólica, distribuição nos miômeros, atuação nos movimentos natatórios, velocidade de contração, nível de atividade de enzimas oxidativas, nível de atividade da ATPase miofibrilar ou miosínica em diferentes níveis de pH e temperatura, diâmetro e alguns outros aspectos diferenciais.

Muitos autores concordam com o fato de que a musculatura lateral do tronco de muitas espécies de peixes está dividida em pelo menos três regiões, desde aquela situada logo abaixo da pele, onde normalmente há fibras vermelhas de pequeno diâmetro, a região de transição para a musculatura branca onde se encontram as fibras intermediárias e a região mais profunda, ocupada por fibras brancas de grande diâmetro ( JOHNSTON et al., 1974; DATTA MUNSHI et al., 1975; PATTERSON et al., 1975; RAAMSDONK et al., 1978; KORNELIUSSEN et al., 1978; JOHNSTON & LUCKING, 1978; CARPENE et al., 1982; TATARCZUCH & KILARSKI, 1982; JAMUR, 1982; BICHARA, 1983; KRONNIE et al., 1983; SHASHI & TALESARA, 1984; ZAWADOWSKA & KILARSKI, 1984 ).

OGATA ( 1958 ) descreve três tipos de fibras musculares

em carpas, baseando-se na reação histoquímica para a SDH, sendo definidas como fibras vermelhas, brancas e intermediárias. MELLGREN & MATHISEN ( 1966 ) encontram resultados semelhantes em músculos do tronco de Hagfish. Segundo OGATA ( 1958 ) esta classificação é possível pois existem diferenças entre as fibras tanto na quantidade e na atividade respiratória das mitocôndrias, como na atividade da enzima succino desidrogenase. Estudando a musculatura de *Myxine glutinosa*, DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ) observam que as fibras brancas, vermelhas e intermediárias, podem ser relacionadas respectivamente como fibras de contração rápida, lenta e lenta/rápida e variam sua intensidade de coloração em diferentes níveis de pH para a ATPase miofibrilar ( M-ATPase ). NAG ( 1972 ) verifica que a actomiosina das fibras brancas é três vezes mais ativa do que a das fibras vermelhas, quando examinadas pelas reações para a ATPase em exemplares de *Salmo gairdneri*.

JOHNSTON et al. ( 1974 ) adaptaram o método histoquímico para a ATPase em músculos de mamíferos para músculo de peixes, variando o período de pré-incubação e a temperatura deste meio, conseguindo com isso distinguir quatro tipos de fibras pela coloração diferenciada que apresentaram. As fibras foram denominadas como tipos vermelho superficial, rosadas ( "*Pink Fibers*" ) de diâmetro grande e pequeno, brancas profundas de grande diâmetro e as chamadas Fibras de Diâmetro Reduzido ( FDR ), situadas nas proximidades do miosepto horizontal que divide o miômero em parte epiaxial e hipoaxial,

sob a pele e a camada de fibras vermelhas.

DATTA MUNSHI et al. ( 1975 ), ao estudarem a atividade da SDH em diferentes músculos respiratórios de *Bagarius bagarius*, encontraram os mesmos tipos de fibras musculares descritas por OGATA ( 1958 ) e por MELLGREN & MATHISEN ( 1966 ).

PATTERSON et al. ( 1975 ) descrevem em cinco espécies de teleósteos os quatro tipos de fibras musculares descritas por JOHNSTON et al. ( 1974 ), baseando-se na reação para a SDH, e relacionam-nas com a atividade natatória dos peixes. Salientam o fato de que as espécies de hábitos ativos, apresentam uma camada de fibras intermediárias bem desenvolvida. Os peixes de hábitos sedentários possuem poucas fibras intermediárias podendo as mesmas serem ausentes, o que pode ser compensado pela ocorrência de fibras vermelhas ( tipo I ) dispersas pela musculatura branca. As fibras de diâmetro muito reduzido, mencionadas por JOHNSTON et al. ( 1974 ), além de serem pouco oxidativas ( KILARSKI, 1967 ) e lábeis em pH alcalino para a M - ATPase ( KRONNIE et al., 1983 ), são freqüentemente encontradas em regiões de crescimento muscular, sendo consideradas células ou fibras satélites ( KILARSKI, 1967 ) que ainda não atingiram seu desenvolvimento máximo ( KRYVI, 1977 ), e que originarão fibras brancas ( CARLSON, 1973; CARPENE & VEGGETTI, 1981; CARPENE et al., 1982 ) Para TATARCZUCH & KILARSKI ( 1982 ) e KRONNIE et al. ( 1983 ) estas fibras ocorrem na musculatura superficial lateral ou entre as zonas vermelha e branca, adjacentes à camada de fibras intermediárias.

JOHNSTON et al. ( 1975 ) descrevem estes quatro tipos de fibras musculares em exemplares de *Salmo gairdneri*, baseando-se na reação histoquímica para a SDH e a M - ATPase. Há as fibras vermelhas ou tipo I ( MEYER, 1979 ), superficiais e de diâmetro pequeno, que reagem intensamente na reação para a SDH e que são alcalino - lábeis em pré-incubação a pH 10,4 para a ATPase miofibrilar, atuando nos movimentos natatórios lentos do animal ( HUDSON, 1973 ). As fibras intermediárias reagem moderadamente para a SDH e são alcalino - estáveis para a reação para a M - ATPase, formando uma camada abaixo daquela de fibras vermelhas, ambas originando uma figura que lembra um triângulo, com o vértice apontando para o centro do miômero ( KRONNIE et al., 1983 ). A região mais profunda e predominante no miômero acha-se constituída por fibras brancas de diâmetro avantajado que são SDH negativas e alcalino - estáveis para a M - ATPase, corando-se fortemente para esta reação. Entremeadas com as fibras brancas, há um subtipo de fibras vermelhas que fornecem à musculatura um aspecto em mosaico ( BODDEKE et al., 1959; CARPENÉ et al., 1982 ). Estas fibras vermelhas desempenham atividade em movimentos natatórios repentinos e de maior velocidade ( HUDSON, 1973 ).

Utilizando exemplares jovens e adultos de *Brachydanio rerio*, RAAMSDONK et al. ( 1978 ) confirmam os resultados encontrados por JOHNSTON et al. ( 1974 e 1975 ) e DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ), além de relacionarem os tipos de fibras com a velocidade de contração e a resistência das fibras à

fadiga.

KORNELIUSSEN et al. ( 1978 ) verificam que as fibras musculares brancas de teleósteos são ATPase - positivas após pré-incubação em meio alcalino, enquanto que as fibras superficiais vermelhas apresentam-se mais claras ( ATPase - negativas ) e as fibras adjacentes a estas adquirem uma coloração um pouco mais escura. Observam também que há um decréscimo na atividade da SDH desde a região superficial até as regiões mais profundas da musculatura ( KRONNIE et al., 1983; JAMUR, 1982 ).

As fibras vermelhas superficiais, de diâmetro pequeno, responsáveis pelos movimentos natatórios lentos, de contração lenta, resistentes à fadiga, oxidativas, ricas em mitocôndrias, gordura, mioglobina e metabolismo aeróbico, SDH positivas, alcalino - lábeis e ácido-estáveis para M - ATPase, são descritas por JOHNSTON & LUCKING ( 1978 ) em exemplares de *Carassius auratus*, sendo que estas correspondem as fibras do tipo I ( MEYER, 1979 ). Estes autores também descrevem as fibras brancas, profundas, de grande diâmetro, contração rápida, ativas em movimentos natatórios rápidos e vigorosos, facilmente fatigáveis, glicolíticas e metabolismo anaeróbico, SDH negativas, alcalino-estáveis e ácido-lábeis para a M - ATPase, como tipo II B ( MEYER, 1979 ), além das fibras intermediárias ( rosadas ou cor de cravo ), de contração rápida, oxidativas e reação moderada para a SDH e ATPase ( alcalino-estáveis ), classificadas como tipo II A por MEYER ( 1979 ) e BROOKE & KAISER

( 1970 ).

MEYER ( 1979 ) conclui que com pré-incubação a pH 4,35 para demonstração da M - ATPase, as fibras do tipo I de lampréias reagem intensamente adquirindo coloração escura. Estas fibras respondem fortemente para a reação com a SDH e NADH-TR. O contrário ocorre para as fibras dos tipos II A e II B, as quais contudo reagem com intensidade após pré-incubação em pH 10,4 para a M-ATPase. Resultados semelhantes foram descritos por DAHL & NYCOLAYSEN ( 1971 ) em *Myxine glutinosa* e por TERAUAINEN ( 1971 ).

MOSSE ( 1979 ), ao estudar a musculatura lateral de teleósteos pelágicos através de reações histoquímicas para a SDH e NADH-TR, encontra atividade destas enzimas nas mitocôndrias, nas regiões subsarcolemais e nas proximidades dos capilares sanguíneos. As fibras vermelhas reagiram intensamente. As fibras intermediárias, por ele denominadas fibras rosadas, formam uma camada de transição entre as musculaturas vermelha e branca. As fibras próximas à camada muscular vermelha reagem mais intensamente do que aquelas adjacentes à camada muscular branca.

RAAMSDONK et al. ( 1980 ) correlacionam os quatro tipos de fibras musculares encontrados no teleósteo *Brachydanio rerio* com a classificação histoquímica e imunohistoquímica vigente.

CARPENE et al. ( 1982 ) confirmam os resultados de vários autores ( JOHNSTON et al., 1975; PATTERSON et al., 1975; BODDEKE et al., 1979; HUDSON, 1973; RAAMSDONK et al.,

1978; JOHNSTON & LUCKING, 1978; MEYER, 1979; JAMUR, 1982; BICHARA, 1983 ), ao investigar histoquimicamente os diferentes tipos de fibras em peixes de água doce, salobra e salgada.

TATARCZUCH & KILARSKI ( 1982 ), KRONNIE et al. (1983), ZAWADOWSKA & KILARSKI ( 1984 ) e SHASHI & TALESARA ( 1984 ), além de distinguirem os quatro tipos principais de fibras tanto pela reação para a SDH como para a M - ATPase, mostram também a distribuição destas fibras nas diferentes regiões da musculatura do tronco e da cauda de diversas espécies de teleósteos, sendo que JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ), ao estudarem a musculatura esquelética de exemplares adultos de *R. branneri* e *F. commersonii*, sob reações histoquímicas para a SDH, NADH - TR e ATPase, bem como colorações histológicas de rotina como HE, Tricrômico de Mallory e Tricrômico de Gomori modificado, percebem que a camada de fibras vermelhas superficiais apresenta um aumento na sua espessura na medida em que se progride na direção da cauda, transição esta que se dá gradual e lentamente. Ao mesmo tempo, a camada de fibras brancas que predomina na região cefálica, diminui gradualmente na direção da cauda do peixe.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados 15 exemplares adultos, de ambos os sexos, da espécie *Astyanax eigenmanniorum* Eigenmann, 1910 ( Pisces ) ( FOWLER, 1948 ) comumente conhecidos como Lambari Rabo-Vermelho<sup>\*</sup>, cujo comprimento médio era de 8 centímetros ( Fig. 1 A ).

Todos os espécimes foram coletados na área do Parque Regional do Iguacú, distante 20 km do campus universitário da Universidade Federal do Paraná, sendo transportados em sacos plásticos apropriados, contendo água do próprio reservatório. No laboratório eram colocados em aquários com água em temperatura ambiente, sendo sacrificados por comoção cerebral. Os espécimes destinados ao estudo anatômico, foram fixados em solução aquosa de formol a 10% e depois colocados em frascos contendo álcool a 70%. Para o estudo histoquímico, fragmentos da musculatura do tronco do animal foram fixados por congelação em nitrogênio líquido, permanecendo neste meio até o início da microtomia.

\* A classificação dos espécimes foi realizada pelo Museu de História Natural da Prefeitura Municipal de Curitiba.

Para a obtenção de resultados sobre a organização anatômica da musculatura lateral dos espécimes em estudo, foram adotadas duas formas de procedimento:

A) Cortes Transversais - foram realizados em série ao longo do tronco do animal, iniciando-se da região cefálica até a região caudal, obtendo-se dessa forma seis tomos, cada um com aproximadamente 1 cm de espessura. Tal procedimento expôs as unidades constituintes dispostas longitudinalmente na musculatura, de forma a se tornar possível observá-las no sentido transversal, viabilizando assim uma análise criteriosa do curso dos mioseptos em relação à massa muscular. Em seguida, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, a imagem de cada segmento foi transferida para papel milimetrado com a finalidade de demonstrar as unidades musculares e a disposição dos mioseptos. A observação seqüencial das figuras assim obtidas, permitiu compreender a ordenação exata dos miômeros - como são denominadas as referidas unidades - ao longo do tronco do animal, bem como a imbricação entre os mesmos.

B) Isolamento do Miômero - a fim de complementar as observações sobre a estrutura organizacional macroscópica da musculatura, procedeu-se ao isolamento de suas unidades musculares. Isto tornou-se possível, pois, após a exposição da musculatura do tronco pelo afastamento cuidadoso da pele desde a região cefálica até a caudal, foi revelada a existência de linhas

em forma de *W* ou ziguezague, como resultado da disposição dos miômeros. Em seguida, com o auxílio de instrumental cirúrgico apropriado, procedeu-se ao isolamento de um miômero. Este era considerado perfeitamente isolado quando era retirada intacta a unidade situada sobre o miosepto.

Para facilitar a dissecação e a identificação dos miômeros, gotejou-se Azul-de-Metileno a 0,2% na musculatura dos animais logo após sacrificá-los, visto que o corante aumenta o contraste entre as unidades musculares e o miosepto, este último de natureza conjuntiva.

Para a obtenção dos resultados histológicos, foram coletadas seis peças ou fragmentos de aproximadamente 1 cm de espessura, correspondentes a cada tomo, partindo-se da região cefálica até a região da cauda. As peças foram então fixadas em formol a 10 % por um período de três horas, sendo em seguida lavadas em água corrente por doze horas a fim de se retirar o excesso de fixador. Na seqüência, as peças foram desidratadas em álcoois de concentração crescente ( de 70 % a 100 % ), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Na emblocagem as peças foram orientadas de maneira a se obter cortes transversais da musculatura. Os cortes obtidos em micrótomo tipo MINOT, com espessura de oito micrômetros, foram então submetidos à coloração pela Hematoxilina & Eosina e Tricrômico de Mallory + Hematoxilina. Pela HE, o citoplasma das células musculares cora-se em róseo-claro e os núcleos em azul-violáceo. Na técnica pelo Tricrômico de Mallory + Hematoxilina, o citoplasma cora-se em

vermelho e os núcleos em azul-violáceo. Os mioseptos conjuntivos coram-se em azul-claro.

A seguir apresentamos os roteiros das técnicas histológicas adotadas neste trabalho.

### 1) HEMATOXILINA & EOSINA:

#### A) Corantes e Soluções:

##### A.1) Hematoxilina de Harris;

Hematoxilina cristalizada .....	5 g
Álcool 95 % .....	100 ml
Sulfato de Alumínio e amônio ( alúmen amoniacal ou de potássio ) .....	20 g
Água Destilada .....	1000 ml
Ácido Acético .....	2-4 ml
óxido de Mercúrio ( vermelho ) ..	3 g

Dissolva a Hematoxilina no álcool. Dissolva o sulfato em água quente. Junte as duas soluções, ferva rapidamente e junte o óxido de Mercúrio, fervendo novamente a solução, até ela tornar-se de cor vermelho-escuro. Esfrie rapidamente e, adicione o Ácido Acético. O Ácido Acético aumenta a especificidade do corante em corar o núcleo. Este corante é estável. Filtre antes do uso.

A.2) Eosina Y - sol. aquosa 2,5% - 5% - 10%;

Eosina Y ..... 2,5 g ... 5 g ..... 10 g

Água Destilada ..... 100 ml

Triturar e ir adicionando água destilada até a completa dissolução.

**B) Método de Coloração:**

1. Desparafinizar;
2. Lavar em água de torneira por 5 minutos;
3. Corar pela Hematoxilina de Harris por 5 a 10 minutos;
4. Lavar em água de torneira por 5 minutos e limpar as lâminas;
5. Corar pela Eosina por 3 a 5 minutos;
6. Lavar em água destilada;
7. Desidratar;
8. Montar em meio sintético.

**C) Resultados:**

Azul-violáceo - núcleos;

Rosa - citoplasma;

Vermelho - hemácias.

**2) TRICÔMICO DE MALLORY + HEMATOXILINA:**

**A) Corantes e Soluções:**

A.1) Hematoxilina de Harris;

**A.2) Azul de Anilina - Orange G - Ácido****Fosfotúngstico;**

Azul de Anilina .....	0,5 g
Orange G .....	2 g
Ácido Fosfotúngstico .....	1 g
Água Destilada .....	100 ml

**B) Método de Coloração:**

- 1) Desparafinar;
- 2) Lavar em água de torneira por 5 minutos;
- 3) Corar pela Hematoxilina de Harris por 5 a 15 minutos;
- 4) Lavar em água de torneira por 5 minutos e limpar as lâminas;
- 5) Passar para o Azul de Anilina - Orange G - Ácido Fosfotúngstico por 20 a 30 minutos e sem lavar, passar para o álcool;
- 6) Desidratar;
- 7) Montar em meio sintético.

**C) Resultados:**

Laranja-amarelo - hemácias;

Vermelho - fibras musculares;

Azul - tecido conjuntivo, fibras  
colágenas;

Azul-violáceo - núcleos.

Para os estudos histoquímicos, pelos quais foi possível classificar as fibras musculares e acompanhar a sua distribuição ao longo do tronco do animal, foi utilizada metodologia específica ( WERNECK, 1981 ). Ao todo foram processados três animais fêmeas dos quais foram obtidos seis tomos ou secções de aproximadamente 1 cm de espessura.

De cada tomo obteve-se uma fatia correspondente à face esquerda da musculatura, junto à coluna vertebral. Este fragmento, com forma de meia-lua, era então incluído em suporte especial para microtomia com goma adraganth a 7 %, de maneira a se obter cortes transversais das peças musculares. Após a orientação da peça, a amostra era coberta com talco em pó ( para crioproteção ) e mergulhada em nitrogênio líquido a temperatura de  $-170^{\circ}\text{C}$ , sendo mantida neste até cessar o borbulhamento característico. Em seguida, as amostras eram transferidas ao criostato CTI, com temperatura interna de  $-20^{\circ}\text{C}$ , aguardando-se alguns minutos para que o tecido atingisse a temperatura interna do aparelho. Os cortes transversais foram obtidos com navalha de aço a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e espessura média de oito micrômetros. Graças ao dispositivo " anti-roller ", evitou-se a superposição e fragmentação dos cortes, que então eram colhidos em lamínulas 24 x 24 mm por contato direto. A aderência acontecia por tensão superficial e diferença de temperatura. As lamínulas com os cortes eram mantidas em temperatura ambiente pelo período mínimo de trinta minutos e máximo de quatro horas, conforme a reação a ser efetuada,

possibilitando-se assim uma perfeita adesão do tecido antes de o mesmo ser processado.

Os cortes foram retirados sequencialmente totalizando três lamínulas por tomo de cada animal. Para o primeiro animal, procedeu-se metodologia para a SDH ( Desidrogenase Succínica ), NADH-TR ( Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida - Tetrazolium Reductase ) e ATPase ( Adenosina Trifosfatase ) com pré-incubação em meio ácido ( pH 4,6 ), respectivamente para os três cortes de cada tomo. Para o segundo animal, adotou-se a seqüência com reações para NADH-TR, ATPase 4,6 e SDH. Para o terceiro animal, iniciou-se as reações com a ATPase 4,6 , seguindo-se com SDH e NADH-TR. Tal procedimento permitiu a observação da disposição das fibras musculares ao longo do corpo do animal, obtendo-se dados comparativos importantes, visto que, por exemplo, pode-se confrontar a classificação das mesmas fibras dos tomos cefálicos até os tomos caudais.

Para evitar possíveis erros na metodologia histoquímica, convencionou-se proceder as reações das seis lamínulas de cada animal relativas a cada tipo de reação histoquímica, aproveitando-se o mesmo meio de incubação. Isto possibilitou oferecer para todos os cortes musculares a mesma quantidade de substrato para as enzimas.

Como foi mencionado anteriormente, utilizou-se três métodos histoquímicos para a demonstração das enzimas musculares. A seguir estão descritas as técnicas histoquímicas utilizadas.

A) **NADH-TR** ( *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida - Tetrazolium Reductase* )

Esta enzima é encontrada nas regiões intermiofibrilares, nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático. Reflete a utilização de metabólitos do ciclo de Krebs. Transfere elétrons ( hidrogênio ) de um substrato para um receptor, sendo a seguir reduzida. O receptor é então oxidado por uma diaforase e o elétron de transferência é captado pelo NBT ( Nitro Blue Tetrazolium ), sal de coloração amarela que se reduz, fica insolúvel e precipita, originando um composto de coloração azul-violeta, a formazana.

A técnica utilizada foi uma modificação de WERNECK ( 1981 ).

Técnica para NADH-TR:

1. Soluções:

A. Tampão Tris - HCl, pH 7,4:

Tris ( hidroximetil ) aminometano ..	6,05	g
Ácido Clorídrico concentrado .....	3,34	ml
Água Destilada .....	1000	ml

2. Meio de Incubação:

Tampão Tris - HCl .....	10	ml
NBT ( Nitro Blue Tetrazolium ) .....	10	ml
Beta - NADH ( forma reduzida ) .....	10	mg

### 3. Procedimento:

- a) Ajustar o pH do meio de incubação para 7,4;
- b) Incubar os cortes a 37<sup>o</sup> C durante 30 minutos;
- c) Lavar em água destilada;
- d) Lavar em acetona a 30 %, 60 %, 90 %, 60 % e 30%;
- e) Lavar em água destilada;
- f) Montar em Geléia de Glicerina.

Observação: O uso da acetona objetiva remover os lipídios podendo contudo ocasionar um decréscimo de intensidade na coloração. Não é porém, essencial, podendo ser excluída.

### B) SDH ( *Desidrogenase Succínica* )

Enzima exclusivamente intra-mitochondrial. A base da reação é idêntica à da NADH-TR, não necessitando de coenzima, transferindo elétrons diretamente para o NBT utilizado, que se reduz e origina a formazana respectiva, a qual se precipita dando cor azul-violeta. As fibras são identificadas conforme a intensidade de cor que tomam, comportando-se da mesma maneira que a reação para a NADH-TR. Os grânulos de cor azul indicam os locais de ocorrência das mitocôndrias.

## Técnica para Desidrogenase Succínica ( SDH ):

### 1. Soluções:

#### A) Succinato de Sódio 0,2 M

Succinato de Sódio .....	3,24	g
Água Destilada .....	100	ml

#### B) Tampão Fosfato 0,2 M

Fosfato de Monossódico .....	2,28	g
Fosfato de dipotássio .....	540	mg
Água Destilada .....	100	ml

### 2. Meio de Incubação:

Succinato de sódio 0,2 M .....	5	g
Tampão Fosfato 0,2 M .....	5	ml
NBT ( Nitro Blue Tetrazolium ) .....	10	ml

### 3. Procedimento:

- Ajustar o pH do meio de incubação para 7,6;
- Incubar as lamínulas com os cortes durante 60 minutos à temperatura de 37 C;
- Lavar em água destilada durante 1 minuto;
- Montar em Geléia de Glicerina.

## C) A T P a s e s

( *Adenosina Trifosfatases* )

São encontradas ao nível das miofibrilas ( miosina, banda A ) e, com o auxílio de diversos artefatos de laboratório, variando-se o pH do meio de reação, é possível se demonstrar diferentes tipos de fibras, conforme a intensidade de reação. O processo histoquímico, para se obter tal classificação, depende de uma série de reações complexas, até se chegar a um produto final.

O corte do tecido é incubado em uma solução contendo ATP e cálcio a pH 9,4. A enzima retira o terminal fosfato do ATP e, devido à presença de cálcio na solução, tal fosfato combina-se imediatamente com o mesmo para formar fosfato de cálcio. A um pH alcalino o fosfato de cálcio é insolúvel, sendo depositado no local da atividade enzimática. O corte é então removido e colocado em uma solução de cloreto de cobalto. Ocorre então uma troca do cobalto pelo cálcio, formando-se o fosfato de cobalto nos locais onde anteriormente se encontrava o fosfato de cálcio. A seguir, o tecido é exposto ao sulfeto de amônia, resultando a formação de sulfeto de cobalto, negro e insolúvel. O local da atividade enzimática original é assim demonstrado. A pH 9,4 as fibras do tipo I apresentam cor marrom mais claro ( indicando reação menor ) do que as fibras do tipo II, que se apresentam com cor marrom-escura.

Para se demonstrar os subtipos do tipo II, ou seja, tipos II A e II B, realiza-se a reação histoquímica para a ATPase em níveis de pH diferentes ( WERNECK, 1981 ). No presente trabalho, procedeu-se apenas a reação para ATPase em pH 4,6 ( ATPase ácida ), o que exigiu a utilização de um meio de pré-incubação em tampão Barbital Acetato 0,2 M. Neste nível de pH, as fibras do tipo I ficam coradas em marrom ou bege-escuro, ao passo que as fibras do tipo II coram-se com menos intensidade. As fibras II A e II B, ficam respectivamente com cor bege e bege-claro. Tal resultado deve-se ao fato de que a pré-incubação em meio ácido inibe quase totalmente as ATPases das fibras II B, inibe parcialmente as fibras II A e não inibe as fibras do tipo I ( BROOKE & KAISER, 1970; WERNECK, 1981 ).

Técnica para ATPase ácida - pH 4,6:

#### 1. Soluções:

##### A) Tampão Barbital Acetato 0,2 M

Acetato de Sódio .....	1,94	g
Barbiturato de Sódio .....	2,94	g
Água Destilada .....	100	ml

##### B) Meio de Pré-incubação

Tampão Barbital Acetato 0,2 M ...	10	ml
-----------------------------------	----	----

## C) Solução de Barbiturato de Sódio

Barbiturato de Sódio .....	4,124	g
Cloreto de Cálcio .....	1,995	g
Água Destilada .....	1000	ml

## D) Solução de Cloreto de Cobalto

Cloreto de Cobalto .....	20	g
Água Destilada .....	1000	ml

## E) Solução de Sulfeto de Amônia

Sulfeto de Amônia .....	1	ml
Água Desmineralizada .....	9	ml

## 2. Meio de Incubação:

Solução de Barbiturato de Sódio	10	ml
Adenosina, 5 - Trifosfato ( ATP )	15	mg

## 3. Procedimento:

- a) Ajustar o pH do meio de pré-incubação para 4,6.
- b) Pré-incubar durante 5 minutos em temperatura ambiente ( 20 - 25 C );
- c) Lavar com a solução de Barbiturato de Sódio a pH 9,4 sem ATP, durante 30 segundos;

- d) Ajustar o pH do meio de incubação para 9,4 com Hidróxido de Sódio;
- e) Incubar os cortes à temperatura de 37<sup>o</sup> C durante 30 minutos;
- f) Transferir as lamínulas para a solução de Cloreto de Cobalto durante 3 minutos;
- g) Mergulhar em água destilada durante 3 minutos, trocando-a a cada minuto;
- h) Transferir para a solução de Sulfeto de Amônia durante 10 segundos;
- i) Lavar em água desmineralizada corrente por 20 minutos. Olhar ao Microscópio óptico se todo o precipitado foi removido;
- j) Desidratar em álcoois de graduação crescente;
- k) Montar em resina sintética ( ENTELAN ).

Observação: Na técnica para ATPase, os cortes em lamínulas foram incubados em cubas especialmente adaptadas para tal finalidade.

## IV - RESULTADOS

A musculatura esquelética do tronco de *Astyanax eigenmanniorum* é constituída por unidades musculares denominadas miômeros ou miótomos ( Fig 1 B e 1 C ). Cada miômero está delimitado por septos de tecido conjuntivo, os mioseptos, que aparecem nas figuras obtidas dos seis cortes anatômicos transversais seriados, realizados desde a região situada após os opérculos ( região cefálica ) até a região imediatamente anterior à nadadeira caudal ( região caudal ) ( Fig. 2 ).

Nestas figuras torna-se possível observar que estes mioseptos delimitam várias secções sobrepostas que constituem os prolongamentos dos miômeros. Cada miômero acha-se constituído por cinco prolongamentos ou cones, que conferem ao mesmo a figura de um *W*, sendo que na direção da porção cefálica do corpo voltam-se três prolongamentos ou cones anteriores. Há dois cones anteriores secundários que se dispõem alternadamente com um prolongamento central maior, o cone anterior principal que se insere na coluna vertebral do animal. Na direção posterior, voltados para a região caudal, há dois prolongamentos dispostos alternadamente aos cones anteriores, denominados cones posteriores ( Fig. 3 ).

O formato dos miômeros e a delimitação dos mesmos pelos mioseptos, conferem à musculatura um aspecto em ziguezague, o que pode ser facilmente observado retirando-se a pele sobre a musculatura superficial ( Fig. 1 B ).

Percebe-se também que os miômeros, ao se repetirem pelo corpo, apresentam tamanhos e ângulos diferentes, sendo que os miômeros situados anteriormente à nadadeira anal possuem ângulos mais abertos além de serem maiores quando comparados aos situados posteriormente a nadadeira ( Fig. 3 ).

Observando-se atentamente os cortes transversais seriados, percebe-se um septo conjuntivo horizontal que parte da coluna vertebral em direção às camadas musculares superficiais, e que separa a massa muscular em duas regiões: uma dorsal ou epaxial e uma ventral ou hipaxial ( Fig. 2 ).

Nota-se também uma faixa ou lâmina de musculatura de tonalidade escura situada superficialmente, que percorre toda a extensão do tronco na altura da linha lateral. À medida que se aproxima da região caudal, esta musculatura vermelha aumenta em espessura, sendo que o restante da massa muscular apresenta coloração branca ( Fig. 1 B e 2 ).

Para a obtenção dos resultados histológicos, foram obtidos seis fragmentos da musculatura lateral do corpo de um exemplar de *A. eigenmanniorum*. Os fragmentos foram obtidos na altura da linha lateral do peixe.

Obteve-se vários cortes histológicos - preferencialmente

transversais - de cada fragmento, que em seguida foram submetidos à coloração pela Hematoxilina & Eosina e pelo Tricrômico de Mallory + Hematoxilina.

Em todas as observações microscópicas percebeu-se a existência de ao menos duas camadas de fibras musculares distintas, sempre delimitadas por septos conjuntivos, os mioseptos. Chamou a atenção o fato de que a camada de fibras vermelhas aumentava gradualmente em espessura quando se afastava da região cefálica do corpo. As fibras brancas ocupavam a maior parte do corte.

Percebeu-se também, a partir do terceiro fragmento, um septo conjuntivo mais espesso, que se estende desde a coluna vertebral até a pele, dividindo as camadas musculares simetricamente. Um cordão nervoso longitudinal ao corpo também é visto na altura do miosepto que separa a camada de fibras vermelhas da subjacente, composta de fibras brancas.

Os fragmentos da região caudal mostram muitos mioseptos delimitantes dos cones anteriores e posteriores dos miômeros. Nota-se que, apesar do corte histológico seccionar os prolongamentos em alturas diferentes, não há variação na distribuição dos dois tipos de fibras musculares.

A disposição, algumas vezes oblíqua, das fibras brancas no miômero, mostra as mesmas em diferentes ângulos de corte, principalmente transversal e oblíquo.

Na coloração pela HE e pelo Tricrômico de Mallory + Hematoxilina, percebeu-se duas camadas de fibras, sendo uma mais

estreita logo abaixo da pele e outra mais profunda, separada da anterior por um miosepto conjuntivo. As fibras superficiais mostraram-se poligonais, com diâmetro pequeno e mais agrupadas entre si. Pode-se perceber a presença de numerosos núcleos de formato oval e disposição superficial. Em alguns núcleos era possível evidenciar um nucléolo central e pequena quantidade de heterocromatina. No tecido conjuntivo endomisial, algumas vezes alterado pelo processamento histológico, percebeu-se núcleos pavimentosos de células conjuntivas, os fibrócitos.

O miosepto que delimita as duas camadas de fibras musculares ramifica-se e dirige-se para a coluna vertebral. Concluiu-se que este é formado por tecido conjuntivo do tipo denso, povoado por muitas fibras colágenas, células conjuntivas e alguns vasos sanguíneos, principalmente capilares, alguns contendo eritrócitos nucleados.

O restante do miômero mostra fibras musculares maiores em diâmetro, poligonais, e mais espaçadas umas das outras. O endomísio, quando visível, ficou reduzido a delicados filamentos entremeando as fibras musculares ( Figs. 4, 5 e 6 ). Após a coloração com HE, nas fibras mais superficiais o sarcoplasma corou-se em róseo e os núcleos em azul-violáceo. No caso das fibras mais profundas e localizadas abaixo do miosepto, o sarcoplasma corou-se em róseo-claro e os escassos núcleos lenticulares, densos e superficiais apareceram em azul-violáceo.

A coloração pelo Tricrômico de Mallory + Hematoxilina evidenciou melhor os mioseptos conjuntivos que coraram-se em

azul-claro. Percebe-se em alguns locais células adiposas uniloculares nos mioseptos maiores. As fibras da camada mais superficial adquiriram coloração vermelha, devido a maior acidofilia, enquanto que as fibras das camadas mais profundas apareceram avermelhadas ou alaranjadas. Os núcleos coraram-se em azul-violáceo.

Da mesma forma como procedeu-se para a obtenção dos resultados histológicos, para os estudos histoquímicos sempre foram utilizados cortes transversais obtidos de seis tomos ou fragmentos da musculatura lateral do corpo, desde a região cefálica até a região caudal. De cada fragmento da musculatura obteve-se três cortes, cada qual processado para um método histoquímico diferente. Mesmo frente a diversas reações histoquímicas, foi sempre possível perceber uma camada de fibras musculares logo abaixo da pele onde a reação apresenta-se relativamente homogênea, e abaixo desta, dependendo do tipo de reação, uma ou duas camadas de fibras musculares maiores em diâmetro onde há alguma heterogeneidade às reações.

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos dos três procedimentos histoquímicos adotados neste trabalho.

#### **S D H ( *Desidrogenase Succínica* )**

A observação seqüencial dos cortes transversais ao longo

do corpo, processados para a reação com esta enzima de localização exclusivamente intra-mitochondrial, permitiu a diferenciação dos dois tipos básicos de fibras musculares: as do tipo I e II, sendo que as últimas apresentaram-se divididas em dois subgrupos, denominados pela literatura como tipos II A e II B ( Figs. 7 e 8 ).

As fibras do tipo I formam uma camada na superfície do corpo, subjacente à pele e se projetam em direção à coluna vertebral. A população de fibras nesta camada é menor na região cefálica e vai aumentando gradualmente no tronco e na cauda. Possuem diâmetro pequeno, formato poligonal e volume homogêneo. A reação histoquímica sempre manifestou-se positiva, sendo que os cortes obtidos das regiões anteriores do corpo, reagiram com intensidade menos acentuada do que aqueles das regiões posteriores. A intensidade da reação, desta forma, cresce progressivamente ao longo do corpo.

Os sais de formazana azuis são numerosos e grandes, distribuindo-se equitativamente pelas regiões intermiofibrilares no sarcoplasma. Percebe-se também uma intensa reação na região subsarcolemal ( Figs. 7 e 8 ).

Na altura do miosepto conjuntivo que segrega esta camada muscular da subjacente, encontramos as *Fibras de Diâmetro Reduzido*, que reagiram moderadamente, apresentando-se com tonalidade azul-clara, grânulos menores e escassos. A região subsarcolemal corou-se melhor ( Fig. 8 ).

De um modo geral, percebeu-se também que a reação

apresentada pelas fibras mais próximas da pele foi menos intensa do que a reação das fibras mais distantes ( Fig. 8 ).

Passando-se para a camada de fibras intermediárias ( tipo II A ), situada logo depois do miosepto conjuntivo, percebe-se uma brusca diminuição na intensidade de coloração. Tais fibras, quando comparadas com as do tipo I, apresentam-se com diâmetro maior, poligonais e com significativa redução do números de grânulos de formazana, além de coloração menos intensa na região subsarcolemal ( Figs. 7 e 8 ).

Ao se observar seqüencialmente os cortes, verificou-se que as fibras da região anterior e cefálica reagiram com menor intensidade do que aquelas da região posterior e caudal, que apresentaram-se moderadamente coradas. As fibras das regiões anteriores deram reação praticamente negativa, quase não se corando. Observa-se ainda fibras menores, com formato triangular, porém com a mesma intensidade de reação das fibras maiores, situadas na camada muscular intermediária. Estas fibras pequenas aparecem entremeadas com a fibras maiores. Nota-se ainda que as fibras situadas ao nível do miosepto delimitante da camada de fibras do tipo I, apresentam-se mais reativas do que as fibras mais profundas e distantes, sendo que esta redução somente se manifesta após as duas ou três primeiras camadas de células, e então gradualmente diminui até a reação se tornar praticamente imperceptível.

Constituindo o restante do miômero, encontramos as fibras musculares de grande diâmetro, poligonais e com reação

praticamente negativa para a SDH. Com exceção das regiões posteriores do tronco e da região caudal, onde a reação apresentou uma leve positividade, todo o restante das fibras reagiu negativamente ao processo histoquímico. As fibras musculares desta camada são conhecidas como sendo do tipo II B ( Figs. 7 e 8 ). As fibras que manifestaram alguma reação, apresentam grânulos escassos e pequenos de formazana nas regiões intermiofibrilares do sarcoplasma e uma leve marcação na região subsarcolemal.

Ao se proceder à observação seqüencial dos cortes, constatou-se que não há variação significativa na espessura da camada ao longo do corpo, como foi observado com as camadas anteriores. A quantidade de fibras parece diminuir na região caudal, onde o próprio formato do corpo afila-se para formar a nadadeira caudal. Tal como na camada de fibras intermediárias ou do tipo II A, existem fibras de menor diâmetro, triangulares, entremeadas com as fibras maiores, e que apresentaram basicamente a mesma intensidade de reação das últimas.

#### N A D H - T R

( *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida*  
- *Tetrazolium Reductase* )

Da mesma forma que ocorreu na reação para a SDH, a reação histoquímica para a NADH-TR permitiu a diferenciação de

dois tipos de fibras musculares: tipo I e tipo II, e os dois subgrupos do tipo II: II A e II B. A reação ocorre com intensidade maior nas regiões intermiofibrilares do sarcoplasma e nas regiões subsarcolemais, evidenciando a presença de mitocôndrias e de retículo sarcoplasmático ( Fig. 9 ). De um modo geral, as reações apresentaram-se indistintamente mais intensas do que as verificadas pelo processo histoquímico da SDH.

Ao se comparar os resultados destes dois procedimentos histoquímicos ( SDH e NADH-TR ), pode-se observar a repetição das mesmas camadas de fibras musculares já descritas anteriormente.

A camada de fibras do tipo I, subjacente à pele, apresenta-se com reação intensa em toda a extensão do corpo, não se percebendo contudo variação na intensidade de coloração como ocorreu com a SDH. As fibras do tipo I mostraram riqueza de grânulos de formazana tanto no sarcoplasma como na região subsarcolemal ( Figs. 9 e 10 ). Da mesma forma que na reação para a SDH, há um ligeiro decréscimo na coloração das fibras adjacentes à pele, sendo que a reação torna-se mais intensa quando afasta-se em direção ao miosepto delimitante. Tal fato, porém, não foi observado em alguns cortes, onde a reação ocorreu homogeneamente em toda a camada. Repetiu-se a constatação de que esta camada aumenta gradualmente em espessura quando se dirige para a região caudal do peixe. As Fibras de Diâmetro Reduzido apareceram ao nível do miosepto delimitante da camada seguinte e reagiram com intensidade menor do que as fibras maiores.

A camada seguinte, constituída por fibras do tipo II A, mostrou uma brusca diminuição na coloração, com as fibras apresentando pequenos e escassos grânulos de formazana distribuídos no sarcoplasma ( Fig. 12 ). As regiões subsarcolemas mostraram-se mais coradas. As células dispostas nas proximidades do miosepto delimitante da camada de fibras vermelhas ( tipo I ) apareceram com marcação mais intensa do que a das células mais profundas, onde a reação gradualmente diminuiu a ponto de se tornar praticamente negativa e imperceptível ( Figs. 9 e 11 ).

A espessura desta camada diminuiu progressivamente ao longo do corpo e o nível de reação parece não diminuir ou aumentar, mantendo-se constante desde a região cefálica até a caudal. Fibras de diâmetro menor, triangulares, porém com a mesma resposta histoquímica das fibras maiores, acham-se intercaladas com as últimas ( Fig. 11 ).

A camada seguinte, composta de fibras do tipo II B, apresentou-se em geral com as mesmas características encontradas na reação para a SDH, ou seja, a reação foi praticamente nula, com as fibras demonstrando número reduzido de grânulos de formazana em seu sarcoplasma ( Figs. 9 e 12 ). Em nenhum corte porém, observou-se reação totalmente negativa, fato verificado também na reação para a SDH. Além disso, da região cefálica até a mediana do tronco, a reação manifestou-se fraca, ao passo que da região posterior do tronco até a caudal, a reação aumenta apresentando-se moderada.

Fibras de menor diâmetro, triangulares, obedecendo à mesma resposta histoquímica das fibras maiores, aparecem intercaladas entre as últimas.

## A T P a s e

( *Adenosina Trifosfatase pH 4,6* )

Os cortes processados para a reação pela ATPase, foram pré-incubados em meio ácido - pH 4,6 - durante cinco minutos em temperatura ambiente.

Foi possível distinguir as fibras tipo I e tipo II, bem como os subtipos do tipo II: II A e II B. Esta subdivisão por vezes manifestou-se com pouca evidência.

Tal como ocorreu na observação das reações histoquímicas anteriores, nas quais evidenciou-se enzimas oxidativas, encontrou-se distribuição semelhante das fibras musculares, que dispõem-se em duas ou mesmo em três camadas. Da mesma forma, percebeu-se claramente um gradual aumento de espessura da camada de fibras do tipo I em direção à nadadeira caudal. Não foi possível, com base neste tipo de reação, perceber a gradual diminuição da espessura da camada de fibras tipo II A, fato observado nos cortes submetidos aos demais processamentos histoquímicos.

As fibras do tipo I, que formam uma camada logo abaixo da pele, reagiram moderadamente, apresentando uma coloração

predominantemente marrom-escuro, que algumas vezes variava para bege-escuro ( Fig. 13 ). Sob o ponto de vista morfológico, estas fibras apresentaram as mesmas características, como formato e diâmetro, já anteriormente descritas. Percebe-se porém, a total ausência do tecido conjuntivo intercelular - o endomísio - que desapareceu durante o processamento histoquímico.

Não houve variação significativa de intensidade da reação ao longo do corpo, nem mesmo na mesma camada muscular. Alguns segmentos porém, não reagiram ou reagiram muito fracamente. De um modo geral, a reação manteve-se homogênea. As Fibras de Diâmetro Reduzido, que foram observadas, deram reação de igual intensidade às fibras do tipo I.

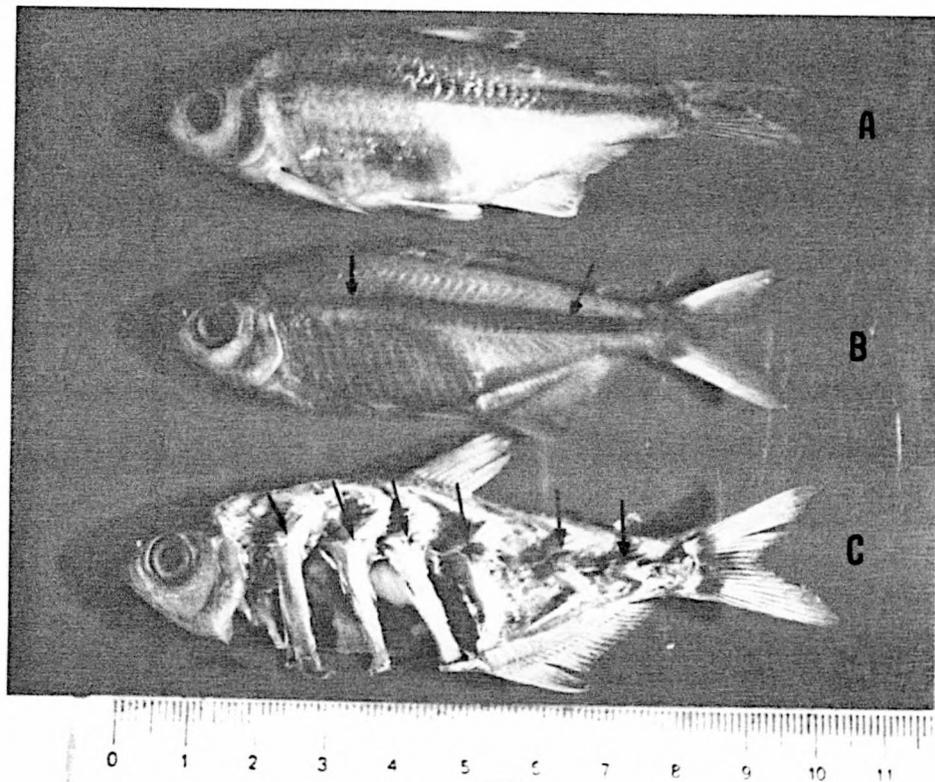
A passagem entre a camada de fibras do tipo I para a de tipo II, mostrou fibras de diferentes diâmetros, sendo possível, em alguns segmentos, percebê-las com formato triangular, fortemente reativas e intercaladas com as de maior diâmetro e poligonais que reagiram fracamente. Estas fibras exibiam características típicas de fibras brancas. Tal disposição dá a esta região do músculo um aspecto em mosaico, e parece constituir uma região de transição entre as camadas de fibras do tipo I e II ( Fig. 15 ).

A maior parte da musculatura do miômero está constituída por fibras musculares brancas de grande diâmetro, as fibras do tipo II B. Há também fibras menores e triangulares que contudo não reagiram da mesma forma que aquelas da camada anterior. Estas fibras foram inibidas quase que totalmente e coraram-se em

bege-claro, com o mesmo ocorrendo para as fibras poligonais maiores ( Fig. 14 ).

Ao contrário do que ocorreu nas reações para a SDH e NADH-TR, não observou-se variação no nível de reação, quando da observação seqüencial dos cortes ao longo do corpo.

V - ILUSTRAÇÕES



- Fig. 1
- A - Vista externa lateral de *Astyanax eigenmanniorum*.
- B - Vista superficial da musculatura lateral de *A. eigenmanniorum* após a retirada da pele. Observa-se a imbricação das unidades mioméricas, bem como o gradual aumento da musculatura vermelha ( setas ) na direção caudal.
- C - Disposição anatômica de alguns miômeros isolados ( setas ). Percebe-se a mudança no ângulo dos cones à medida que se avança da região cefálica para a caudal.

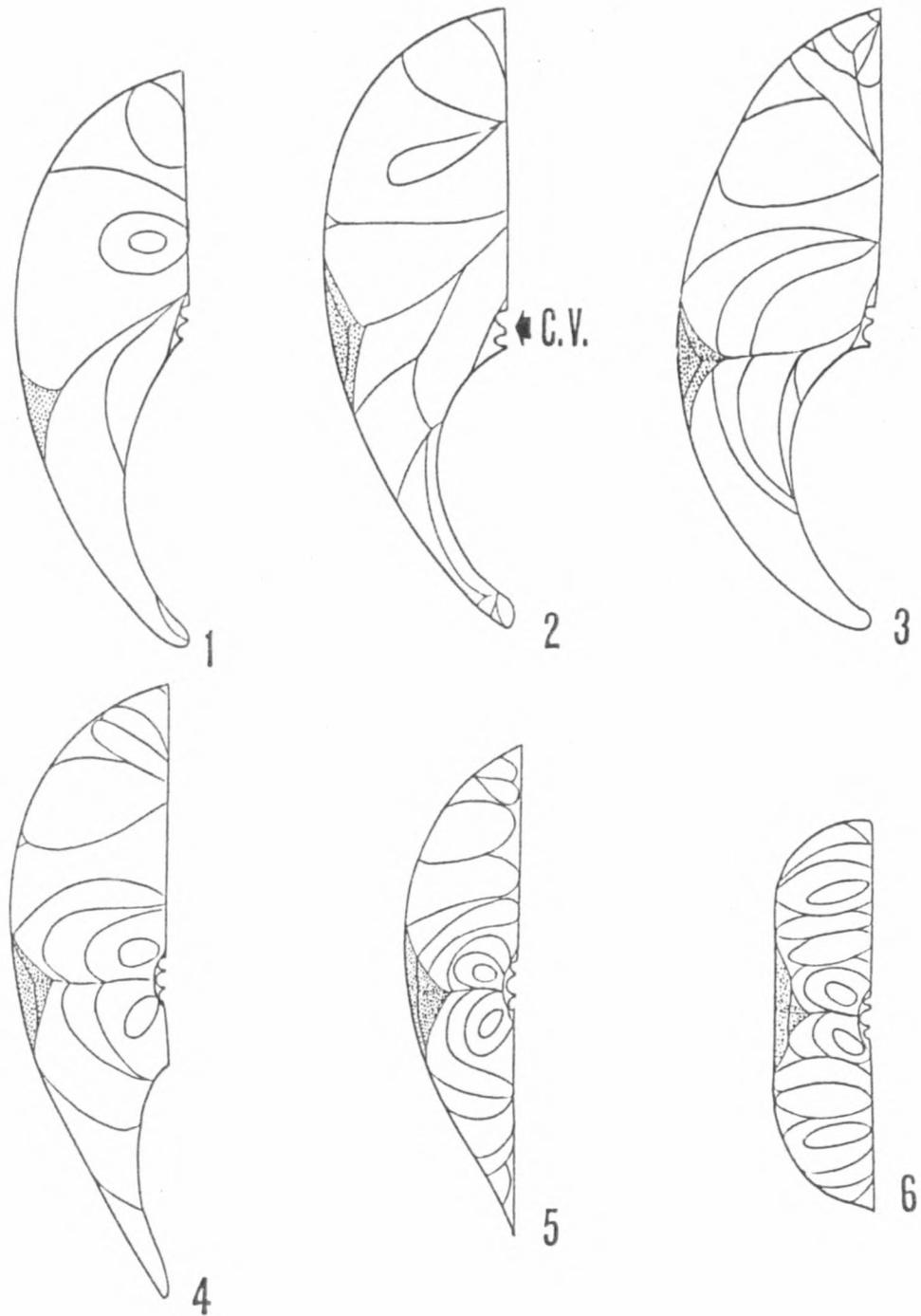


Fig. 2 - Representação do aspecto exibido pelos miômeros nos cortes transversais seriados, cada qual com espessura aproximada de 1 cm. O primeiro desenho representa a região mais anterior ( cefálica ), enquanto que o último representa a região posterior ( caudal ) do animal. Os esquemas abrangem apenas um dos lados do animal. As linhas escuras correspondem aos mioseptos. A musculatura vermelha aparece em pontilhado. O restante corresponde à musculatura branca. ( C.V. = Coluna Vertebral )

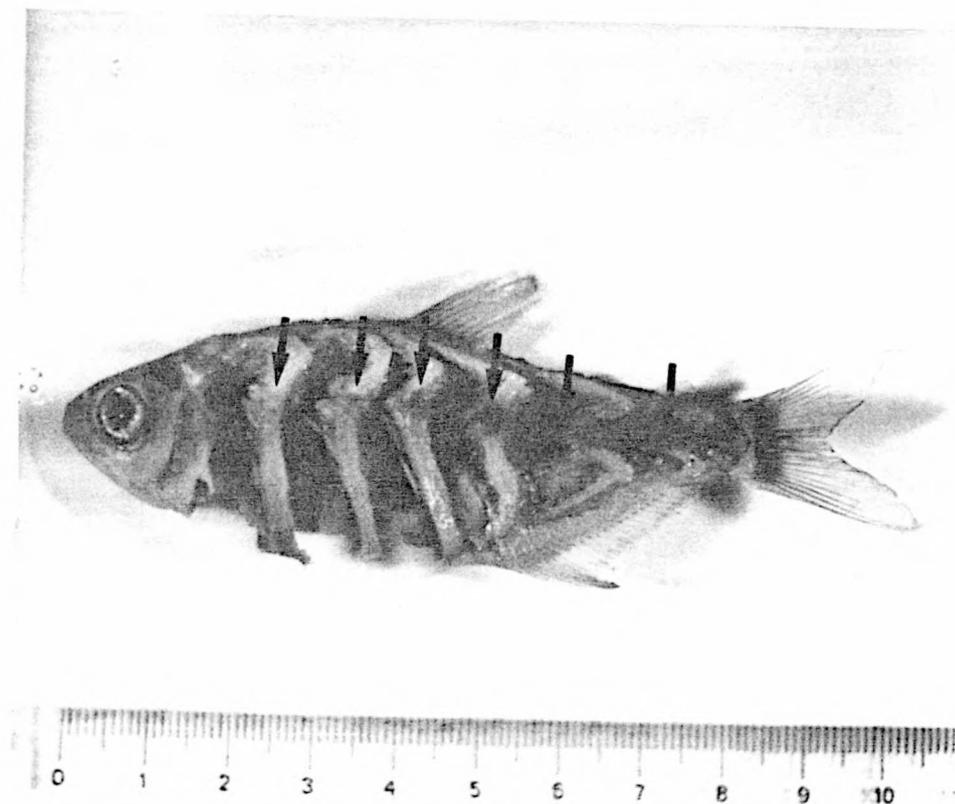


Fig. 3 - Imagem de *A. eigenmanniorum* com alguns miômeros isolados ( setas ). Cada miômero corresponde a um dos tomos utilizados para o estudo histológico e histoquímico.

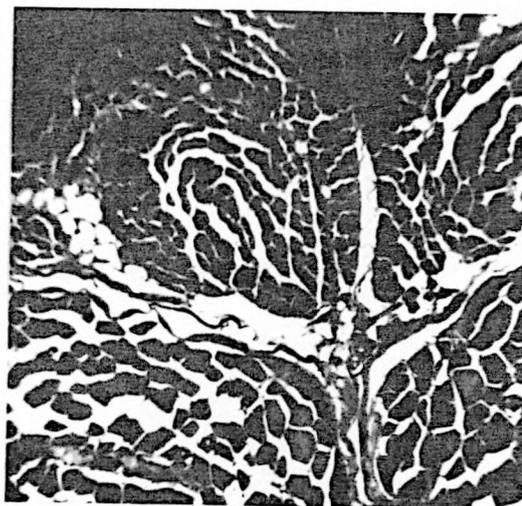


Fig. 4 - Corte transversal da região caudal. Nota-se a camada muscular vermelha, constituída por fibras menores em diâmetro, e a camada muscular branca onde as fibras são maiores. Tricrômico de Mallory + Hematoxilina. Aumento: 63 x.

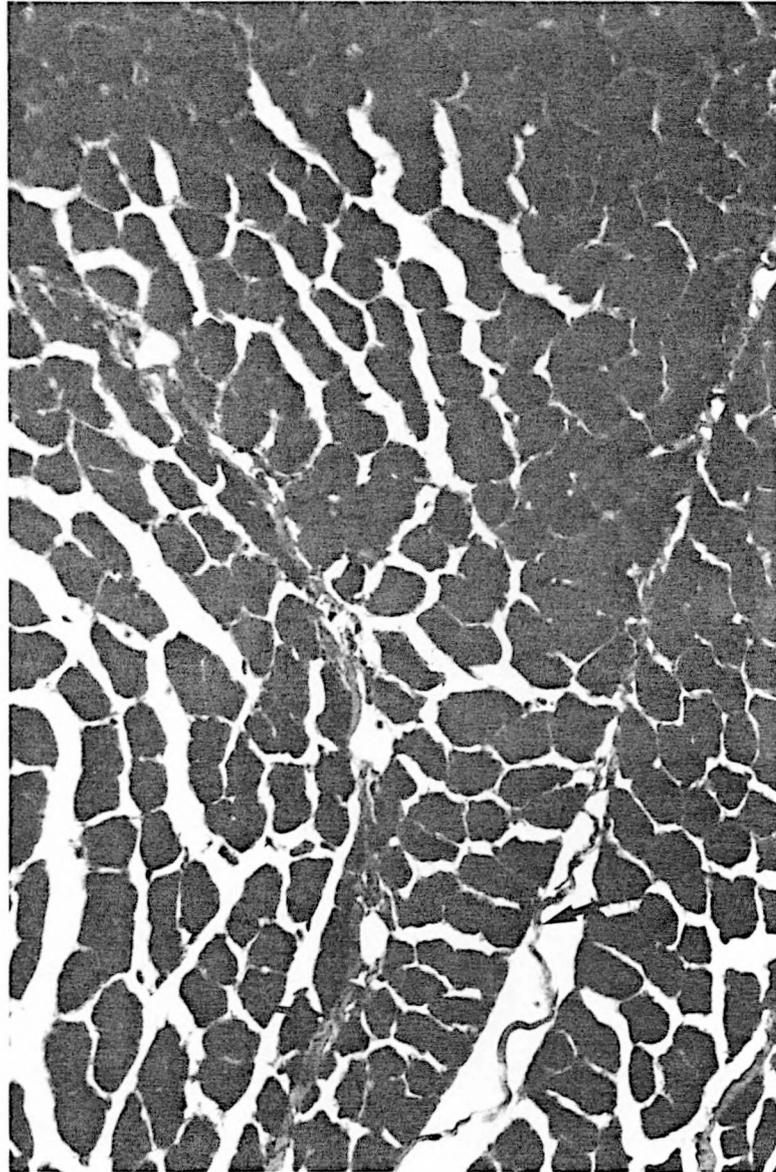


Fig. 5 - Corte transversal da camada muscular vermelha da região caudal. As fibras que constituem esta camada são as vermelhas e encontram-se mais agrupadas entre si. Notar a presença dos núcleos periféricos e dos mioseptos conjuntivos (setas). Tricrômico de Mallory + Hematoxilina. Aumento: 160 x.

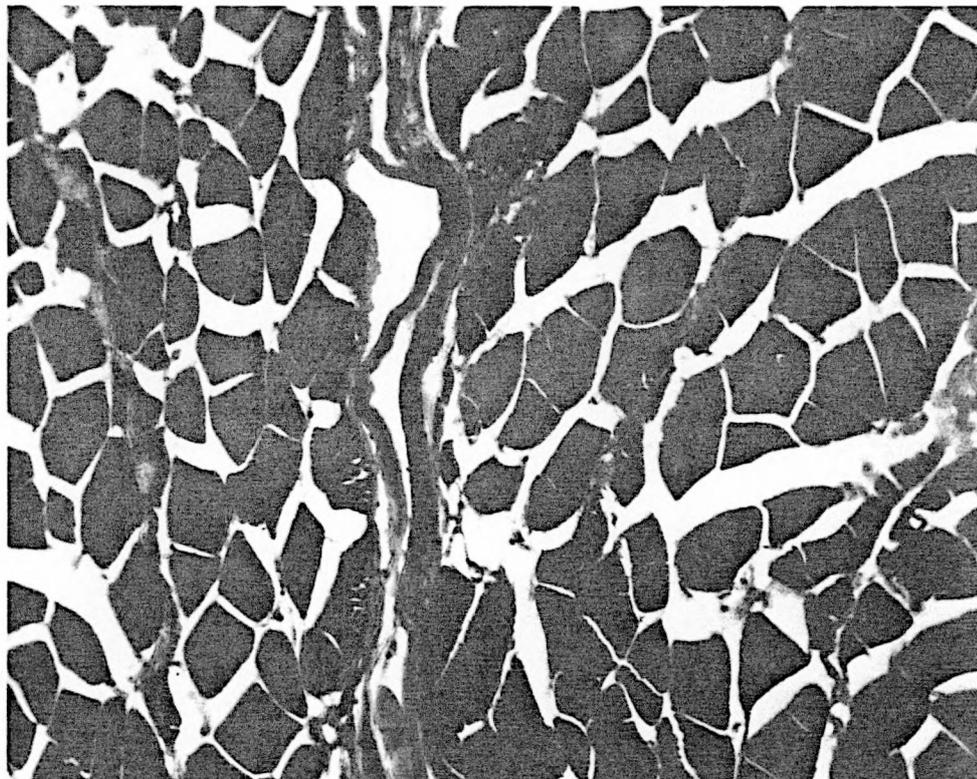


Fig. 6 -

Corte transversal da camada muscular branca da região caudal. Perceber que estas fibras musculares brancas são maiores em diâmetro, e encontram-se mais espaçadas umas das outras. Os mioseptos conjuntivos coraram-se em azul-claro. Tricrômico de Mallory + Hematoxilina. Aumento: 240 x.

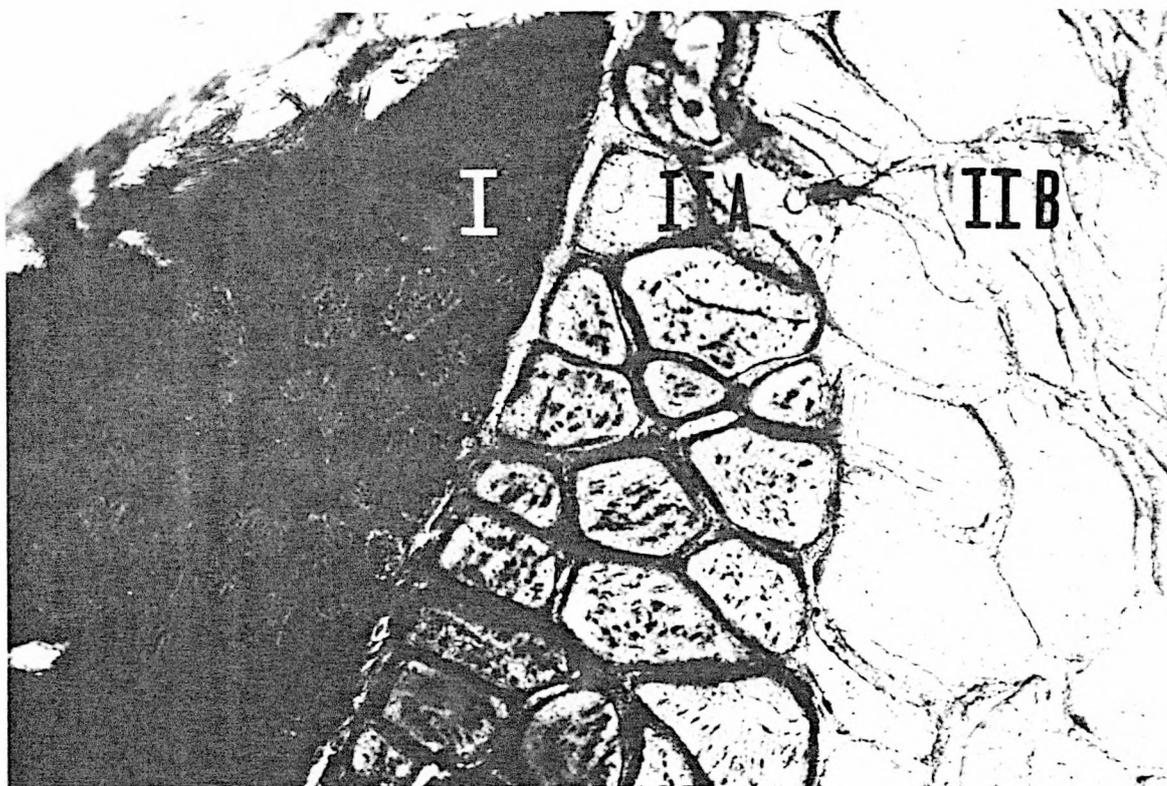


Fig. 7 - Corte transversal do tecido muscular da região cefálica, abrangendo fibras musculares do tipo I e II, com os subtipos II A e II B. Notar a variação morfológica entre os tipos I e II bem como a diferença na compactação entre as mesmas. SDH. Aumento: 180 x.

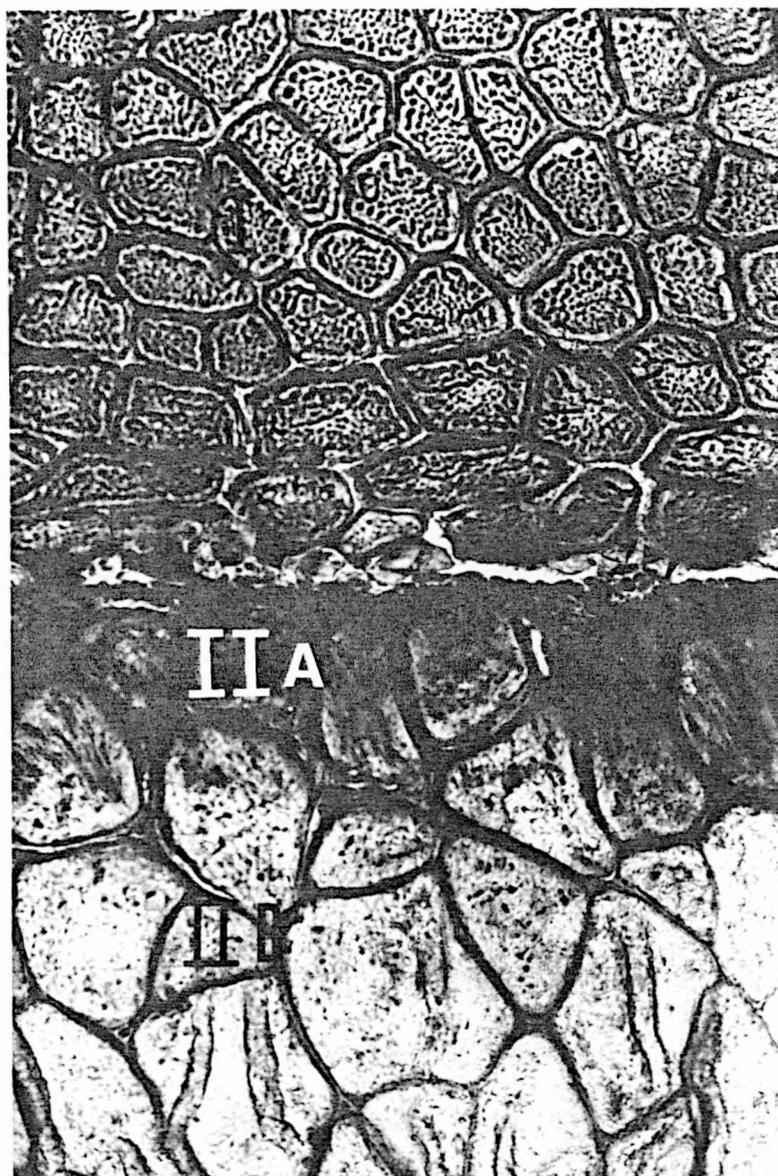


Fig. 8 - Corte transversal das fibras musculares. Observar a variação na intensidade de coloração nas fibras do tipo I, que aumenta em direção ao miosepto. Pode-se perceber também as fibras de diâmetro reduzido, moderadamente coradas (setas). Após o miosepto, há as fibras do tipo II A, seguidas pelas do tipo II B. SDH. Aumento: 240x.

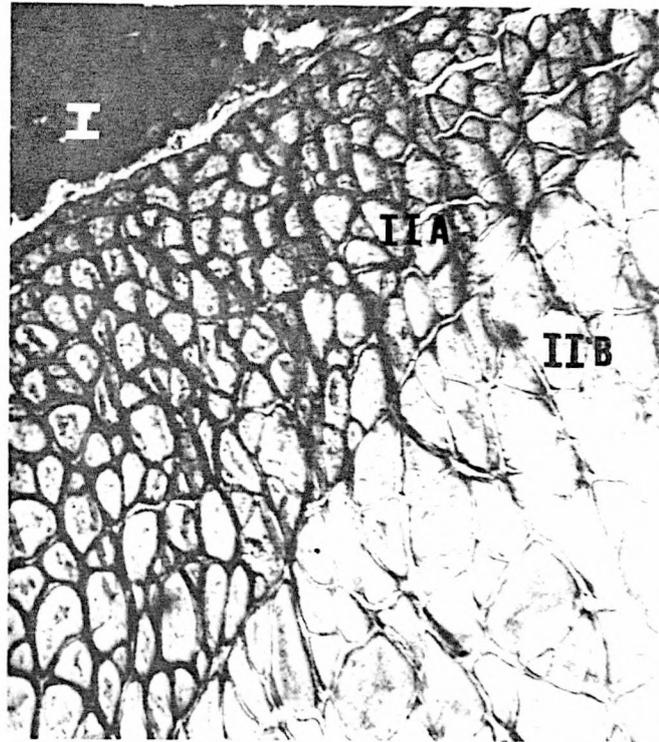


Fig. 9 - Corte transversal da região cefálica. Percebe-se a presença de fibras mais escuras, menores e mais compactadas, que correspondem ao tipo I. Abaixo do miosepto ocorre um repentino decréscimo na coloração, onde as fibras são maiores, menos compactadas e menos coradas (tipo II). Notar nesta camada os subtipos II A e II B. NADH - TR. Aumento: 63 x.

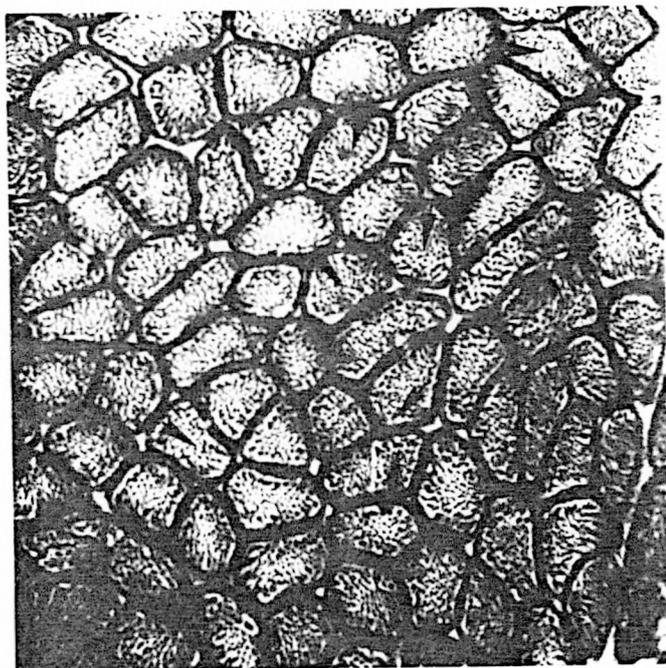


Fig. 10 - Corte transversal da camada muscular constituída por fibras do tipo I. Nota-se a riqueza de grânulos de formazana tanto no sarcoplasma ( setas ), como na região subsarcolemal. A intensidade da reação aumenta em direção ao miosepto ( região inferior da figura ). NADH - TR. Aumento: 95x.

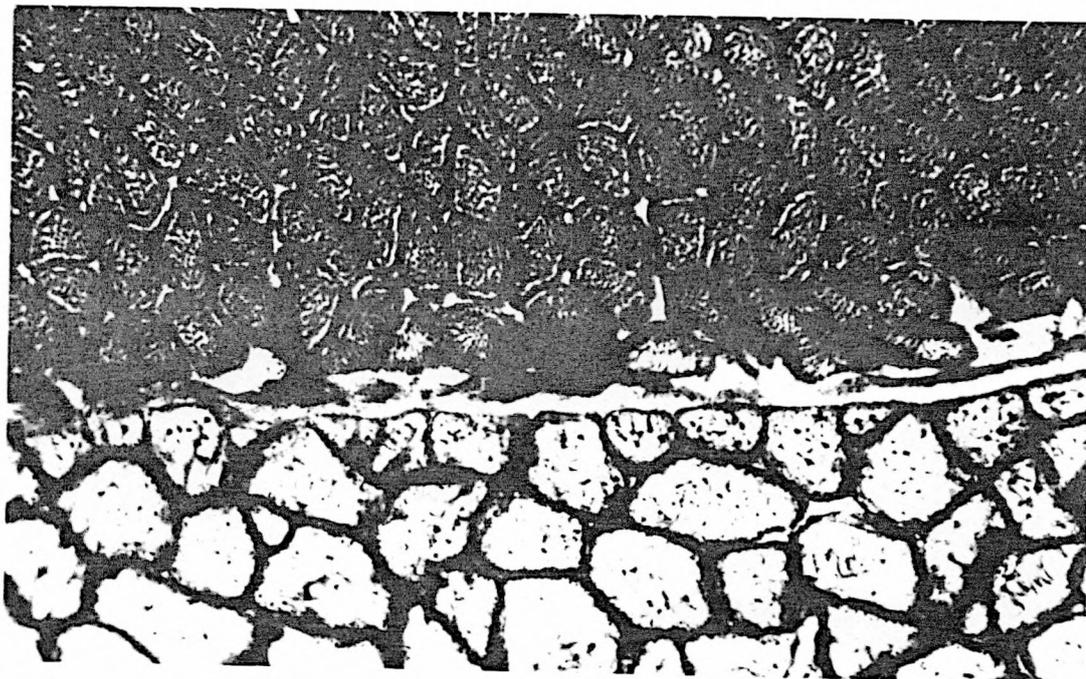


Fig. 11 - Corte transversal da região do tronco. Presença das fibras do tipo I (acima do miosepto) e do tipo II (abaixo do miosepto). NADH - TR. Aumento: 180 x.



**Fig. 12 -** Corte transversal da região da cauda, exibindo a camada muscular constituída por fibras do tipo II B. Notar a pequena quantidade de grânulos de formazana (setas) em comparação com as fibras do tipo I. Há uma fraca reação na região subsarcolemal. Perceber também as fibras menores e triangulares entremeadas com as maiores (ponteiras). NADH - TR. Aumento: 240 x.

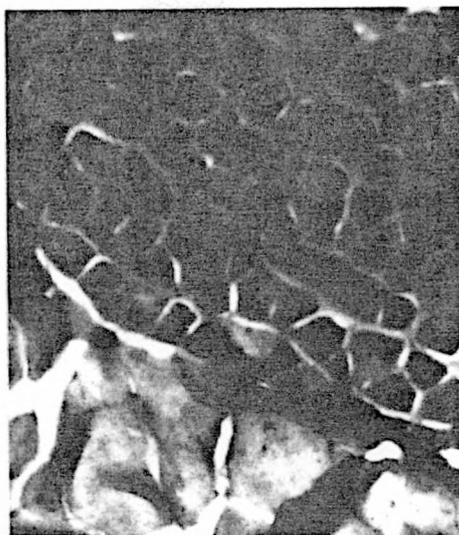


Fig. 13 - Corte transversal da região cefálica, exibindo as fibras do tipo I, que reagiram intensamente ao processo histoquímico. Na região inferior da figura nota-se algumas fibras do tipo II, que reagiram com pouca intensidade. ATPase pH 4,6. Aumento: 63 x.

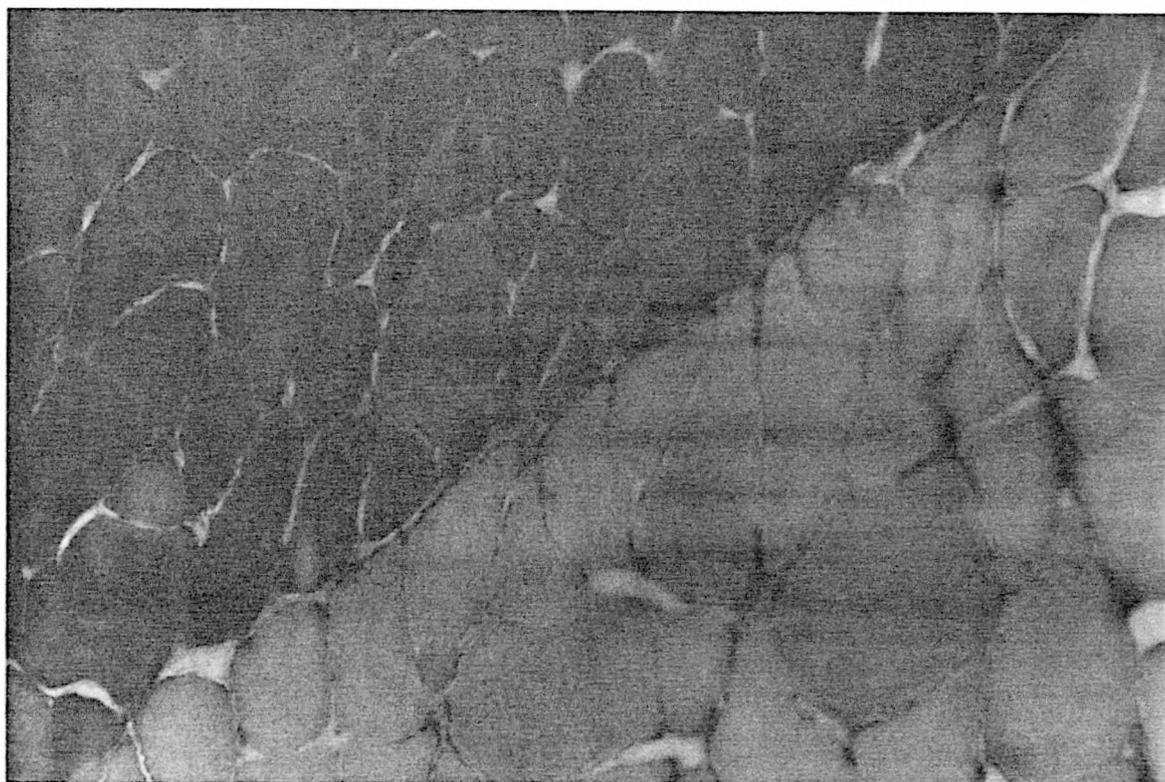


Fig. 14 - Camada muscular constituída pelas fibras do tipo II. As fibras mais coradas são do tipo II A, e as mais claras são do tipo II B. A reação histoquímica neste nível de pH provoca a inibição quase total da ATPase miofibrilar ou miosínica das fibras do tipo II, ao passo que as fibras do tipo I não sofrem inibição. ATPase pH 4,6. Aumento: 240 x.

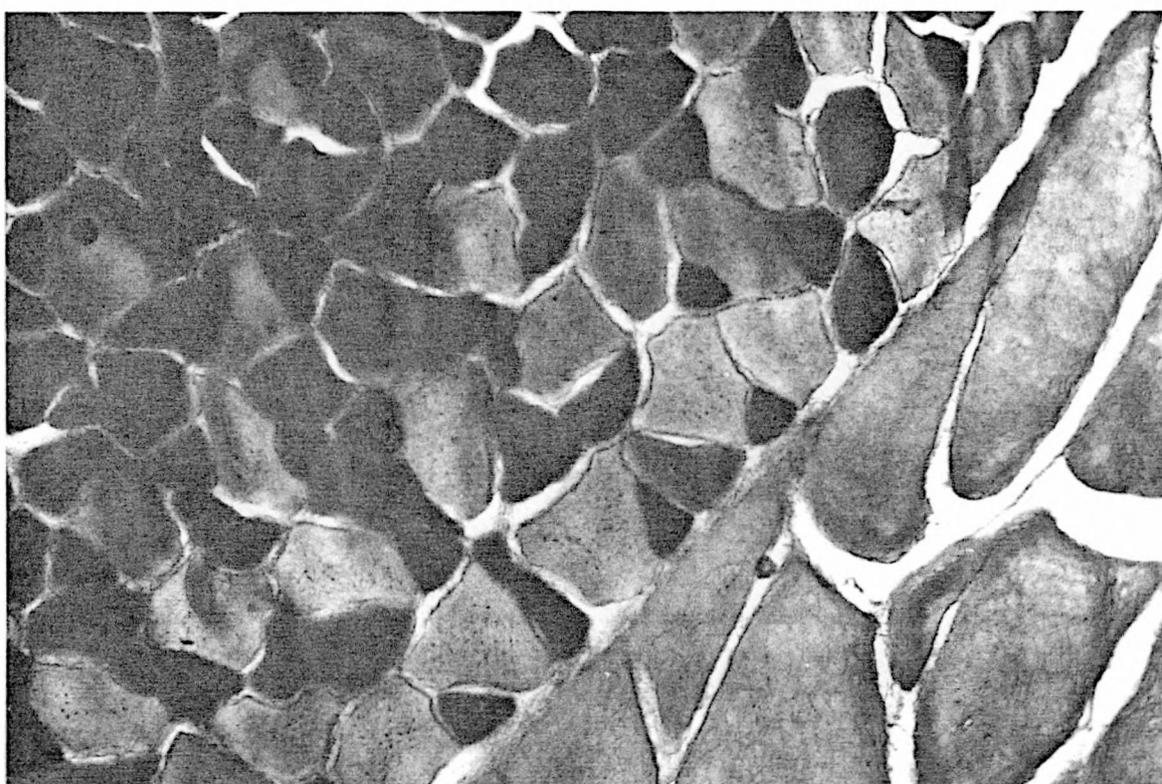


Fig. 15 - Corte transversal da região cefálica, mostrando a transição da camada de fibras do tipo I para o tipo II. Notar as fibras triangulares ( tipo I ) fortemente coradas, intercaladas com as fibras maiores ( tipo II ) que reagiram com fraca intensidade. O conjunto proporciona o aspecto em mosaico descrito pela literatura. ATPase pH 4,6. Aumento: 240 x.

## VI - DISCUSSÃO

Embora a literatura relacionada com a descrição da musculatura estriada esquelética de peixes mostre que os miômeros são unidades básicas constituintes deste tipo de tecido, deve-se considerar que sua organização não é a mesma para todas as espécies ( NURSALL, 1956; LANGLER et al., 1962; ALEXANDER, 1969; WALKER, 1975; PIRLOT, 1976; KORNELIUSSEN et al., 1978; JAMUR, 1982; BICHARA, 1983 ). Em *Astyanax eigenmanniorum* tais unidades apresentam a configuração de um *W*, fato que se repete em um grande número de espécies de teleósteos estudados pelos autores acima citados, além de HULBERT & MOON ( 1978 ). Como seria de se esperar, considerando a variabilidade morfo-funcional desses vertebrados, o formato dos miômeros em *W*, por vezes denominados miótomos ( TERAIVAINEN, 1971; HULBERT & MOON, 1978 ), não é uma constante entre os peixes. Em *Plecostomus commersonii* e em Anfioxo, por exemplo, os miômeros assumem a forma de um *V* ( BICHARA, 1983; NURSALL, 1956 ). Apesar de a maioria dos autores concordarem com as observações colocadas por LANGLER et al. ( 1962 ), no que se refere ao formato em *W* dos miômeros, o formato em *V* exibido pelos miômeros descritos em

*P. commersonii* por BICHARA ( 1983 ) pode se relacionar ao fato de que tal espécie de peixe apresenta características morfológicas típicas de um ser muito primitivo ( ALEXANDER, 1966 ). É possível que estes dados possam indicar uma variação em termos de complexidade dos miômeros na musculatura destes vertebrados. É válido salientar que os miômeros do animal em estudo parecem constituir um tipo predominante entre as diferentes espécies de peixes.

LANGLER et al. ( 1962 ) e PIRLOT ( 1976 ), ao descreverem miômeros de *Ciclóstomos*, mostram-nos também em forma de *W*, porém com ângulo médio menos profundo, tendendo para um formato arredondado, fato também presente em Lampréias ( TERAUAINEN, 1971 ). Observando-se a musculatura de *A. eigenmanniorum* percebe-se que ao longo do corpo, ocorre uma certa heterogeneidade quanto ao tamanho e ângulo dos miômeros. Pode-se mencionar, por exemplo, que aqueles situados anteriormente à nadadeira anal, apresentam ângulos mais abertos do que os situados posteriormente a esta. Observações semelhantes foram também realizadas por BICHARA ( 1983 ) em *P. commersonii*, em cujos miômeros o ângulo é mais amplo na região cefálica que na caudal. Deve-se ressaltar, porém, que neste caso o miômero apresenta formato em *V*. Por outro lado, em *Rhamdia branneri* o *W* miomérico exibe um ângulo médio profundo e normalmente agudo ( JAMUR, 1982 ).

O encaixe perfeito e harmonioso entre os miômeros e seus prolongamentos ou cones, originam a imagem em ziguezague vista

ao longo do corpo de *A. eigenmanniorum*, quando é procedida a retirada da pele para se expor a musculatura lateral. Tal observação foi também descrita por LANGLER et al. ( 1962 ), ALEXANDER ( 1969 ), WALKER ( 1975 ), HULBERT & MOON ( 1978 ) e JAMUR ( 1982 ). Esta disposição permite uma articulação harmoniosa da musculatura ( WALKER, 1975 ; HULBERT & MOON, 1978 ) e proporciona um deslizamento preciso e suave das massas musculares entre si o que facilita o deslocamento do peixe em seu habitat ( JAMUR, 1982 ).

Embora a literatura utilize os termos miômero e miótomo como sinônimos, visto que etimologicamente ambos definem a mesma estrutura, no presente trabalho preferiu-se denominar a unidade muscular que constitui o tecido muscular estriado esquelético do espécime em estudo como miômero, já que o mesmo é de maior consenso entre os estudiosos.

Em *A. eigenmanniorum*, os miômeros e seus prolongamentos encontram-se delimitados por mioseptos de tecido conjuntivo, fato já anteriormente descrito e observado em outras espécies de teleósteos ( LANGLER et al., 1962; ALEXANDER, 1969; WATERMAN, 1969; WALKER, 1975; HULBERT & MOON, 1978; JAMUR, 1982 ; BICHARA, 1983 ). Os prolongamentos mioméricos definidos em *A. eigenmanniorum* como cones anteriores secundários, cone anterior principal e cones posteriores, correspondem à estrutura dos miômeros de teleósteos descritos por ALEXANDER ( 1969 ) em exemplares de *Gnastostomos* e JAMUR ( 1982 ) em *R. branneri*, onde cada miosepto limita três cones anteriores e dois posteriores. No

caso de *P. commersonii*, onde o miômero possui apenas dois prolongamentos ligados entre si por um vértice voltado para a região cefálica do animal, o miosepto delimita dois cones posteriores e um anterior ( BICHARA, 1983 ). Os mioseptos, desta forma, compõem um sistema perimisial ( HULBERT & MOON, 1978 ).

A presença de um septo esqueletogenoso horizontal dividindo a musculatura em porção epaxial e hipaxial é descrita em teleósteos estudados por ALEXANDER ( 1969 ), WALKER ( 1975 ), KORNELIUSSEN et al. ( 1978 ), JAMUR ( 1982 ), BICHARA ( 1983 ). Em *A. eigenmanniorum*, porém, o septo horizontal que divide a musculatura é formado por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, o qual se ramifica em septos mais delgados e perpendiculares, que por sua vez segregam as diferentes camadas musculares.

Na espécie estudada, há uma lâmina ou faixa de musculatura de tonalidade escura, que percorre superficialmente toda a extensão do corpo do animal na altura da linha lateral. Tal camada muscular é constituída por fibras vermelhas que aumentam numericamente na região caudal do animal. Este fato é confirmado pelos estudos de JAMUR ( 1982 ) e LANGLER et al. ( 1962 ). Este último menciona a presença de uma camada muscular relativamente escura, à semelhança de uma cunha achatada, situada entre o septo esqueletogenoso horizontal e a cápsula de tecido conjuntivo abaixo da pele. JAMUR ( 1982 ), infere que, no caso de *R. branneri* esta massa muscular constitui a camada muscular vermelha. A mesma conclusão pode ser obtida em relação a *A.*

*eigenmanniorum*, após comparar os resultados do presente trabalho com aqueles dos autores acima citados. Diferenças de caráter histológico e histoquímico, porém, podem ser percebidos quando se faz um estudo comparativo com o restante da musculatura, a qual é constituída por fibras brancas. Desta forma os miômeros em *A. eigenmanniorum*, organizam-se em três camadas de fibras musculares: a vermelha e a branca, sendo que entre estas está a camada de fibras intermediária, embora TERAIVAINEN ( 1971 ) tenha encontrado de três a cinco camadas musculares em lampréias.

Os resultados histológicos mostram a musculatura de *A. eigenmanniorum* constituída por dois tipos de fibras musculares, as vermelhas e brancas. De acordo com GRUTZNER ( 1884 ), estes dois tipos de fibras correspondem aos tipos básicos encontrados na musculatura de outros vertebrados, inclusive o homem, sendo as fibras vermelhas consideradas pelo autor como delgadas, de pequeno diâmetro e escuras, e as fibras brancas correspondem ao tipo mais espesso, de maior diâmetro e cor mais clara. Já há um século KNOLL ( 1891 ) relacionava a cor escura das fibras à de maior quantidade de sarcoplasma e de grânulos intersticiais ( KÖLLIKER, 1857 ) denominados por RETZIUS ( 1890 ) de sarcossomos. Comparando-se as conclusões surgidas dos estudos de HOOGEBOOM et al. ( 1946 ) e de PAUL & SPERLING ( 1952 ), com aquelas obtidas em *A. eigenmanniorum*, pode-se deduzir que as fibras brancas possuem menor conteúdo de mitocôndrias e atividade respiratória reduzida, ocorrendo o contrário com as fibras vermelhas, sendo que estas, por apresentarem maior teor de

gordura e glicogênio do que as brancas, podem ser consideradas como menos fatigáveis ( BRAEKKAN, 1956; BONE, 1966 ). Também o padrão de inervação das fibras vermelhas ou lentas é diferente daquele apresentado pelas fibras brancas, sendo que, em movimentos natatórios normais as fibras lentas participam mais intensamente ( BONE, 1966; DENNY-BROWN, 1929 ). Nos movimentos natatórios vigorosos, a participação maior seria das fibras rápidas ou brancas, e permitiriam, por exemplo, fuga imediata de um predador ( GEREBTOZOFF, 1956; BUTTKUS, 1963; BONE, 1966; MELLGREN & MATHISEN, 1966; HUDSON, 1973 ). A população predominante de fibras lentas na região caudal de *A. eigenmanniorum*, além de corresponder às observações descritas pelos autores acima citados, permite ao animal realizar movimentos natatórios lentos e normais, sendo que em movimentos repentinos e vigorosos, toda a musculatura do tronco seria exigida.

Os resultados obtidos através da coloração pela HE na espécie em estudo, revelaram duas camadas de fibras musculares, cada qual com um tipo de fibra. A camada muscular vermelha encontra-se formada por fibras mais agrupadas, enquanto o restante da musculatura é constituída de fibras brancas, as quais dispõem-se mais espaçadas umas em relação às outras. Estas observações confirmam os estudos realizados por MAURER ( 1894 ), HUDSON ( 1973 ), COLE ( 1907 ) em exemplares de *Myxine glutinosa*, JAMUR ( 1982 ) em *A. branneri* e WATERMAN ( 1969 ) em Peixe-Zebra nos quais há intensa vascularização entre as fibras

vermelhas. Na região mais profunda do miômero, as fibras brancas apresentam diâmetro maior e são menos vascularizadas.

BONE ( 1966 ) afirma em suas conclusões que a quantidade de fibras vermelhas aumenta progressivamente na direção ântero-posterior do corpo, fato também observado em *A. eigenmanniorum*, bem como em *Rhamdia branneri* ( JAMUR, 1982 ). É lícito afirmar desta forma que as fibras vermelhas necessitem de maior suprimento sanguíneo, pois mantêm-se em constante processo de contração. Em *A. eigenmanniorum* percebeu-se a existência de capilares sanguíneos nos mioseptos, principalmente após a aplicação da técnica do Tricrômico de Mallory + Hematoxilina. WATERMAN ( 1969 ), JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ) encontram resultados similares em seus estudos com teleósteos.

Ao se caracterizar o tecido muscular que estrutura os miômeros de *A. eigenmanniorum* com o Tricrômico de Mallory + Hematoxilina e HE, pode-se verificar que as fibras superficiais, vermelhas e pequenas em diâmetro, coram o seu sarcoplasma em róseo pela HE e em vermelho pelo Mallory, e os núcleos, que são numerosos, superficiais e de formato oval, em azul-violáceo, características que podem corresponder às fibras do tipo I. As demais fibras, situadas mais profundamente, são brancas, maiores em diâmetro, com o seu sarcoplasma corando-se em róseo-claro pela técnica da HE e em vermelho-alaranjado pelo Mallory + Hematoxilina. Seus núcleos com cromatina altamente condensada são lenticulares, mais escassos e superficiais, corando-se em azul-violáceo, podendo tais fibras serem relacionadas com as fibras do

tipo II. O sistema perimisial das fibras do tipo I é bem mais desenvolvido do que aquele na camada de fibras do tipo II, conclusões que são também confirmadas por JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ). Além disso, JAMUR ( 1982 ) constatou uma granulação citoplasmática em ambos os tipos de fibras musculares, fato não observado em *A. eigenmanniorum*. Deve-se mencionar também que no espécime em estudo, pelas técnicas histológicas adotadas, não foi possível distinguir as fibras intermediárias, como descrevem FLOOD & MATHISEN ( 1962 ) nos seus estudos em *Myxine glutinosa*. Em *A. eigenmanniorum*, tais fibras foram observadas somente pelo uso de técnicas histoquímicas.

Embora pesquisadores como WATANABE et al. ( 1978 ) não manifestem acordo em aplicar para os peixes a classificação histoquímica utilizada para a musculatura de vertebrados superiores, um grande número de autores que tem nos peixes seu objeto de estudo, adota os sistemas de classificação propostos, já que os mesmos baseam-se em estudos fisiológicos e histoquímicos, que possibilitam a segregação das fibras musculares nesses animais em tipos similares aos descritos para animais que ocupam uma posição superior na escala zoológica, como é o caso dos mamíferos ( MEYER, 1979 ). Isto também mostra que o tecido muscular nos peixes, ressalvadas as devidas peculiaridades, segue um padrão fisiológico e bioquímico que corresponde aos vertebrados em geral. Dentre os procedimentos histoquímicos adotados, embora com algumas modificações para os peixes, destacam-se as reações para a SDH e para a ATPase

miofibrilar ou miosínica, que também são utilizados com sucesso em estudos com outros mamíferos, inclusive seres humanos. Dentre estes autores podem ser citados OGATA ( 1958 ), MELLGREN & MATHISEN ( 1966 ), DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ), NAG ( 1972 ), JOHNSTON et al. ( 1974 e 1975 ), DATTA MUNSHI et al. ( 1975 ), RAAMSDONK et al. ( 1978 ), KORNELIUSSEN et al. ( 1978 ), MEYER ( 1979 ), JAMUR ( 1982 ), CARPENÉ et al. ( 1982 ), TATARCZUCH & KILARSKI ( 1982 ), KRONNIE et al. ( 1983 ), BICHARA ( 1983 ), ZAWADOWSKA & KILARSKI ( 1984 ), SHASHI & TALESARA ( 1984 ).

Um outro tipo de técnica histoquímica que também permite classificar as fibras musculares, é a reação para a enzima oxidativa NADH-TR, utilizados por vários estudiosos ( MEYER, 1979; MOSSE, 1979; JAMUR, 1982 e BICHARA, 1983 ).

Para compreender a distribuição das fibras musculares estriadas esqueléticas em *A. eigenmanniorum*, foi utilizado o método para a detecção de SDH e NADH-TR e o método para a ATPase miofibrilar com pré-incubação em pH 4,6. Há autores, como DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ) e JOHNSTON et al. ( 1974 e 1975 ) que alertam para o fato de que as fibras musculares de peixes são extremamente suscetíveis à inativação em pH baixo ( 4,3 e 4,6 ). No presente caso, porém, houve resposta histoquímica para a reação, o que também ocorreu nos trabalhos realizados por BICHARA ( 1983 ) em *P. commersonii*.

A distribuição das fibras musculares nos miômeros da espécie estudada está de acordo com as observações realizadas pela maioria dos estudiosos. Assim, o fato de a musculatura

lateral, sob o ponto de vista histoquímico, ser dividida em pelo menos três regiões, onde os diferentes tipos de fibras musculares tendem a se agrupar para constituir camadas distintas, parece ser uma situação predominante na grande maioria de espécies de teleósteos estudados. É o que se pode observar, por exemplo, nas espécies estudadas por FLOOD & MATHISEN ( 1962 ), BONE ( 1966 ), JOHNSTON & TOTA ( 1974 ), HULBERT & MOON ( 1978 ), KORNELIUSSEN et al. ( 1978 ), RAAMSDONK et al. ( 1978 ), JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ), entre outros. Desta forma, na musculatura miométrica de *A. eigenmanniorum* encontra-se uma camada superficial de fibras musculares vermelhas, seguida por uma região de transição que constitui a camada de fibras intermediárias e uma região mais profunda povoada por fibras brancas. Tal padrão organizacional, contudo, torna-se cada vez menos evidente quando se avança na escala zoológica, sendo que apenas nos anfíbios ( SASAKI, 1974 ) pode-se ainda observar uma distribuição semelhante àquela encontrada por JAMUR ( 1982 ).

De acordo com a reação procedida para a enzima oxidativa succinato desidrogenase ( SDH ), na musculatura de *A. eigenmanniorum*, pode-se definir quatro tipos de fibras musculares. PATTERSON et al. ( 1975 ) citam também o mesmo número de tipos de fibras em diversas espécies de teleósteos por eles estudadas, e relacionam fisiologicamente tais tipos celulares com as observações histoquímicas realizadas. Desta forma, as fibras classificadas como vermelhas ou do tipo I, além de reagirem positivamente para a SDH, estão em constante processo

de contração. Os animais de hábitos sedentários apresentam fibras do tipo I com as mesmas características histoquímicas, porém distribuídas não somente numa região superficial, como também, algumas vezes, entremeadas com as fibras do tipo II A, conferindo à musculatura um aspecto em mosaico ( BODDEKE et al., 1959; JOHNSTON et al., 1975; CARPENE et al., 1982 ), fato observado em *A. eigenmanniorum*. Na espécie em estudo, especialmente nas reações para a ATPase miofibrilar, foram detectadas pequenas fibras triangulares entremeadas com as fibras maiores brancas, que reagiram intensamente ao método histoquímico, sem responderem positivamente, contudo, à reação para as enzimas oxidativas. Em outras palavras, na reação para a ATPase, tais fibras se comportaram como as vermelhas típicas, enquanto que para a SDH e a NADH-TR elas reagiram como fibras brancas. Especulou-se então que elas possam ser, ou fibras brancas em desenvolvimento, ou ainda um subtipo de fibras vermelhas que desempenhariam a função de manter a atividade postural do animal em seu meio. De acordo com HUDSON ( 1973 ), estas fibras, por ele definidas como vermelhas, desempenham atividade em movimentos natatórios repentinos e de maior velocidade, afirmação que desperta dúvidas. Por esta razão há ainda necessidade de maiores dados acerca deste detalhe.

Em *A. eigenmanniorum*, as fibras do tipo I formam uma estreita camada abaixo da pele e se dispõem paralelamente ao longo do corpo na altura da linha lateral, sendo exclusivas nesta região. Tais fibras exibem reação intensamente positiva, porém

não homogênea ao longo do corpo, já que, no sentido céfalo-caudal foi possível perceber um gradual aumento na intensidade da reação. Embora esta situação não tenha sido confirmada na literatura, deve-se mencionar um gradual aumento no número destas fibras na direção céfalo-caudal, fato também assinalado em outras espécies de teleosteos ( BONE, 1966; JAMUR, 1982 ). Constatou-se na literatura também, que há um acréscimo na atividade da SDH a partir da região subepidérmica em direção da região mais profunda da mesma camada, fato também observado por KORNELIUSSEN et al. ( 1978 ); JAMUR ( 1982 ) e KRONNIE et al. ( 1983 ), e o mesmo em *A. eigenmanniorum*. As fibras do tipo I apresentaram intensa granulação, o que confirma os resultados obtidos por PADYKULA ( 1952 ), para quem as fibras musculares de pequeno diâmetro, portanto do tipo I, apresentam maior quantidade de SDH do que as fibras de diâmetro maior, do tipo II. Também denominadas de granulares por NACHIMIAS & PADYKULA ( 1958 ), as fibras vermelhas contém maior população de mitocôndrias por unidade de área do que as fibras brancas, fato observado por outros autores ( GEORGE & SCARIA, 1958; BÜNO & GERMINO, 1958; SASAKI, 1974; WATANABE, 1978 ). Pelas conclusões de OGATA (1958), a intensa reação também deve-se à acentuada atividade da enzima neste tipo celular. As fibras do tipo I encontradas em seres humanos, apresentaram os mesmos resultados ( WACHESTEIN & MEISEL, 1955 ). GUTH & SAMAHA ( 1970 ), YELLIN & GUTH ( 1970 ) e POOL et al. ( 1979 ) classificaram as fibras do tipo I como tipo A e tipo ALFA, respectivamente, após as reações para a SDH

e ATPase miofibrilar. As características histoquímicas encontradas na musculatura respiratória de *Bagarius bagarius*, estudado por DATTA MUNSHI et al. ( 1975 ), são as mesmas observadas em *A. eigenmanniorum* e em carpas ( OGATA, 1958 e MELLGREN & MATHISEN, 1966 ).

Na reação para a enzima oxidativa NADH-TR, as fibras do tipo I da espécie estudada neste trabalho também reagiram positivamente, como era esperado. Baseados neste tipo de reação, VITA et al. ( 1980 ), em músculo de rato, classificaram suas fibras como do tipo I e ROUAUD & TOUTANT ( 1982 ) como tipo ALFA'. BARNARD et al. ( 1971 ) e CARRY et al. ( 1986 ) as denominam " grosseiras ", em alusão à riqueza de grânulos de formazana exibida pelas fibras. Os autores acima citados trabalharam utilizando metodologia histoquímica, com músculos de mamíferos, entre eles humanos, observando a mesma resposta histoquímica para a NADH-TR.

Os resultados encontrados por DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ) em *Myxine glutinosa*, MEYER ( 1979 ) em Lampréias e MOSSE ( 1979 ) que trabalhou com teleósteos pelágicos, são semelhantes aos obtidos em *A. eigenmanniorum*, não só em relação à reação para a NADH-TR, como também para a SDH. MOSSE ( 1979 ), na realidade, realizou estudos relativos à distribuição dos diferentes tipos de fibras, concluindo que, além de a mesma ser similar à encontrada em outros teleósteos, a reação decresce em intensidade desde a camada de fibras do tipo I até a camada de fibras do tipo II B. Tal observação encontra paralelo com aquela

verificada em *A. eigenmanniorum*, sendo também mencionada por outros autores ( MELLGREN & MATHISEN, 1966; DAHL & NICOLAYSEN, 1971; JOHNSTON et al., 1975; KORNELIUSSEN et al., 1978; JAMUR, 1982; KRONNIE et al., 1983; BICHARA, 1983 ). Desta forma, considerando-se tais afirmações, torna-se conclusivo que a situação acima descrita seja de ocorrência geral entre os teleósteos.

Subjacente à camada muscular vermelha superficial, encontra-se a camada constituída por fibras intermediárias que reagiram com menor intensidade, o que provavelmente reflete uma menor quantidade de mitocôndrias, e conseqüentemente de succinato desidrogenase. Tal fato, observado em *A. eigenmanniorum*, aparece também em *R. branneri* ( JAMUR, 1982 ), mas difere das observações realizadas por TERAIVAINEN ( 1971 ) em Lampréias, onde o arranjo das fibras musculares nos miômeros difere do padrão apresentado no presente espécime. Estas fibras apresentam um diâmetro maior, são poligonais e coram-se, para a reação com a SDH e NADH, com menor intensidade na região subsarcolemal e no sarcoplasma quando comparada com as do tipo I ( JAMUR, 1982 e BICHARA, 1983 ). OGATA ( 1958 ), MELLGREN & MATHISEN ( 1966 ), DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ), DATTA MUNSHI et al. (1975) e KRONNIE et al. ( 1983 ), classificaram tais fibras como tipo intermediário, enquanto que JOHNSTON et al. ( 1974 ) as denominaram de fibras rosadas ( " Pink Fibers " ), com diâmetro variando de grande para pequeno. De fato, em *A. eigenmanniorum* observa-se, entremeadas com as fibras de maior diâmetro, algumas células pequenas e

triangulares, embora com a mesma resposta histoquímica oxidativa apresentada pelas fibras maiores. Esta situação contudo não é mencionada pela literatura. JAMUR ( 1982 ) estudou em *A. branneri* a mesma camada de fibras intermediárias que exibiram basicamente os mesmos resultados histoquímicos para as fibras do tipo II A de *A. eigenmanniorum*. BICHARA ( 1983 ), cita SELIGMAN & RUTENBURG ( 1951 ) e WERNECK ( 1981 ), para quem a completa redução do sal *Nitro Blue Tetrazolium* ( N.B.T. ) a grânulos de formazana, corresponde a locais de alta atividade enzimática oxidativa, o que pode indicar níveis de trabalho muscular constante.

MOSSE ( 1979 ) dispõe as fibras intermediárias, por ele denominadas de fibras rosadas, formando uma camada de transição entre as massas musculares vermelha e branca. Afirma também, no seu estudo, que as fibras rosadas mais próximas à camada vermelha reagem com maior intensidade do que aquelas vizinhas à camada mais profunda de fibras, as do tipo II B. Estas observações vão de encontro as obtidas em *A. eigenmanniorum*, embora a literatura não mencione o fato de a espessura desta região muscular decrescer no sentido ântero-posterior do corpo do animal.

Há autores que relacionam a atividade das fibras brancas ou tipo II com a locomoção dos peixes, enquanto as fibras vermelhas desempenhariam uma função mais postural ( BONE, 1966; JAMUR, 1982 ).

JOHNSTON & LUCKING ( 1978 ) definem em peixes as fibras de contração rápida, oxidativas/glicolíticas e reação moderada para a SDH e ATPase, como fibras II A. A afirmação de que tais

fibras sejam utilizadas em contrações rápidas da musculatura, é sustentada por diversos pesquisadores ( BONE, 1966; MELLGREN & MATHISEN, 1966; TERAUAINEN, 1971; RAAMSDONK et al., 1978; MEYER, 1979 ). JAMUR ( 1982 ) também cita autores como GEREBTOZOFF ( 1956 ) e BUTTKUS ( 1963 ), para quem as fibras brancas são mais apropriadas para acelerações repentinas, enquanto que as vermelhas atuam em movimentos contínuos.

Embora em praticamente todos os trabalhos referentes a estudos histoquímicos em peixes e também em outros vertebrados procure-se definir adequadamente as fibras do tipo II A, ainda permanecem dúvidas a respeito do papel funcional destas células. Contudo as referências a respeito da sua morfologia, estrutura celular e características histoquímicas parecem já se constituir em dados absolutos e definitivos.

As fibras musculares que predominam nos miômeros são conhecidas como tipo II B. Sua resposta histoquímica para as enzimas oxidativas normalmente é nula ou muito fraca, o que indica claramente que tais células apresentam um baixo metabolismo aeróbico e oxidativo. Segundo BICHARA ( 1983 ), tais fibras contraem-se rapidamente, apresentam como fonte energética as vias glicolíticas, sendo portanto pouco resistentes à fadiga.

JOHNSTON & LUCKING ( 1978 ) assinalaram a presença deste tipo celular em exemplares de *Carassius auratus*, confirmando os resultados de BICHARA ( 1983 ) e de MEYER ( 1979 ), bem como os encontrados em *A. eigenmanniorum*. Todos estes autores caracterizaram as fibras do tipo II B como brancas,

profundas, de grande diâmetro, contração rápida, ativas em movimentos natatórios rápidos e vigorosos, facilmente fatigáveis, com metabolismo glicolítico e anaeróbico. As conclusões em relação ao fato de que este tipo celular apresenta reação histoquímica nula para as enzimas oxidativas, vão de encontro aos resultados obtidos em *A. eigenmanniorum*, onde a reação apresentou-se praticamente negativa, ocorrendo contudo uma discreta elevação na intensidade da reação no sentido céfalo-caudal do corpo.

A distribuição destas fibras musculares nos miômeros da espécie estudada faz paralelo com aquela encontrada por JAMUR ( 1982 ) e BICHARA ( 1983 ) em exemplares de *A. branneri* e *F. commersonii*, sendo que tais autores ainda assinalam que a camada de fibras brancas predomina na região cefálica e diminui na direção caudal dos animais. De fato, em *A. eigenmanniorum*, tais observações se repetiram, como também percebeu-se que o contrário ocorre com a camada de fibras vermelhas.

A existência das fibras denominadas pela literatura como *Fibras de Diâmetro Reduzido* é poucas vezes mencionada pela mesma. TATARCZUCH & KILARSKI (1982) e KRONNIE et al. ( 1983 ) descrevem a presença destas células na musculatura lateral superficial, bem como entre as camadas musculares vermelha e branca, adjacentes à camada de fibras do tipo II A. JOHNSTON et al. ( 1974 ) descrevem a ocorrência destas fibras tanto nas proximidades do miosepto horizontal, como também entre a pele e a camada de fibras vermelhas. Em *A. eigenmanniorum*, tais

células foram encontradas nas proximidades do miosepto conjuntivo que separa as camadas musculares vermelha e intermediária. Na reação para as enzimas oxidativas, as FDR reagiram moderadamente, o que está de acordo com os resultados obtidos por PATTERSON et al. ( 1975 ).

Parece existir contudo, alguma discussão a respeito destas fibras. KILARSKI ( 1967 ), CARLSON ( 1973 ), KRYVI ( 1977 ), CARPENE & VEGGETTI ( 1981 ), CARPENE et al. ( 1982 ) e KRONNIE et al. ( 1983 ) consideram que as FDR sejam pouco oxidativas e lábeis em meio alcalino para a reação com a ATPase miofibrilar. Na reação para esta enzima em meio ácido, procedida no animal em estudo, a reação apresentou-se com a mesma resposta histoquímica exibida pelas fibras vermelhas. Ainda segundo estes autores, as FDR são frequentemente encontradas em regiões de crescimento muscular, sendo por isso reconhecidas como células musculares satélites que originarão fibras do tipo II. A literatura contudo não especifica quais as fibras satélites que originarão as fibras do tipo I. Desta forma, parece estar implícito que, na espécie estudada, tendo em vista a proximidade deste tipo celular jovem das fibras do tipo I e a resposta histoquímica homóloga às mesmas, as FDR poderiam ser as células precursoras das fibras vermelhas. Mesmo assim há necessidade de estudos mais aprofundados para se afirmar com certeza tal observação.

Um grande número de autores que estudaram a musculatura e as fibras musculares em peixes, sob o ponto de vista

histoquímico, o fizeram utilizando os métodos para a detecção da ATPase miofibrilar, uma vez que tal técnica, quando convenientemente aplicada, permite classificar os tipos e os subtipos de fibras musculares. No presente trabalho utilizou-se o método para a ATPase com pré-incubação em solução de tampão Barbital Acetato a pH 4,6, seguindo a técnica clássica em meio de incubação tamponado a pH 9,4 contendo o substrato Adenosina 5 - Trifosfato ( WERNECK, 1981 ), o que permitiu diferenciar os tipos e por vezes os subtipos de fibras.

A utilização deste roteiro encontra justificativa por se tratar de procedimento mencionado pela literatura capaz de diferenciar os tipos de fibras musculares com sucesso ( BROOKE & KAISER, 1969 e 1970; DUBOWITZ & BROOKE, 1973; ENGEL, 1974; TUNEL & HART, 1977; HINSTZ et al., 1984; CARRY et al., 1986 ). Há porém outros meios de pré-incubação ( em pH 4,2 ; 4,3 ; 10,5 ) que também foram eleitos pelos pesquisadores como métodos seguros de se conseguir classificar até mesmo os subgrupos de fibras musculares. Desta forma, seriam até certo ponto repetitivas, mas não menos interessantes as conclusões e observações a serem levantadas, caso se adotasse a técnica para a ATPase com pré-incubação em outros níveis de pH, que não o 4,6.

Acerca deste aspecto, porém, há autores que não concordam com os resultados obtidos com essa metodologia em peixes. DAHL & NICOLAYSEN ( 1971 ) e JOHNSTON et al. ( 1974 e 1975 ), inferem que as fibras musculares dos peixes são extremamente suscetíveis à inativação em pH muito ácido, apesar

de o nível 4,6 estar contido na faixa considerada não crítica - entre 4,35 e 10,4 - disposta por GUTH & SAMAHA ( 1970 ) e YELLIN & GUTH ( 1970 ). Para PADYKULA & HERMAN ( 1955 ) e RAAMSDONK et al. ( 1978 ), a inativação da ATPase miofibrilar é explicada pela contaminação com outras fosfatases ácidas que competiriam com o sítio ativo da enzima ao substrato ATP. A deposição de fosfato de cálcio em maior quantidade no local de maior atividade enzimática quanto mais alto for o nível de pH, foi referida por JAMUR ( 1982 ) o que por sua vez explica que tal padrão de comportamento frente ao método histoquímico possa ser a causa da impossibilidade de se identificar em peixes os subtipos das fibras do tipo II. Esta observação talvez explique o fato de que as fibras do tipo I e as FDR reagirem moderadamente após o tratamento histoquímico. Sobre este aspecto, BICHARA (1983 ) cita SYVORY & GUTMAN ( 1971 ) que, ao avaliarem o teor de ATPase miosínica em mamíferos, percebem ser ela em torno de 25 % a 55 % mais alta nas fibras vermelhas do que nas brancas.

Também pode-se relacionar que o fato de praticamente não se conseguir demonstrar os subtipos do tipo II seja devido a tal aspecto acima mencionado. De fato, os estudos realizados com pré-incubação em pH 4,6 em músculos de outros vertebrados ( BROOKE & KAISER, 1969; GUTH & SAMAHA, 1970; WERNECK, 1981 ) mostram que as fibras do tipo II A aparecem mais claras enquanto que as do tipo II B tornam-se escuras. Tal aspecto se confronta com os resultados obtidos em *A. eigenmanniorum*, onde as fibras tipo II A reagiram fracamente, com exceção de fibras de menor diâmetro

entremeadas com as maiores, que reagiram fortemente. As fibras do tipo II B também deram reação fraca tornando-se difícil a distinção de ambas as células, que são ácido - lábeis para pré-incubação em meio ácido ( BROOKE & KAISER, 1970; JOHNSTON & LUCKING, 1978; MEYER, 1979 ). Tal dificuldade é relatada nos trabalhos de BICHARA ( 1983 ) ao concluir que as fibras inativadas em pH 4,6 seriam as do tipo II A, enquanto que as que reagiram mais intensamente seriam as do tipo I.

De acordo com MEYER ( 1979 ) e BICHARA ( 1983 ), as reações histoquímicas para as enzimas oxidativas em fibras musculares, e as reações para a ATPase miofibrilar, constituem atualmente a base para se classificar e compreender melhor a distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas desde os peixes até os mamíferos, incluindo-se também o homem.

## VII - CONCLUSÕES

1. Os miômeros, unidades musculares com forma de *M*, que se repetem ao longo do corpo, constituem a musculatura lateral estriada esquelética de *Astyanax eigenmanniorum* e acham-se separados por mioseptos de natureza conjuntiva.
2. As fibras do tipo I encontram-se na altura da linha lateral, superficialmente, sob a pele, constituindo a camada muscular vermelha.
3. As fibras do tipo II formam a camada muscular branca que predomina nos miômeros.
4. As fibras de diâmetro reduzido encontram-se próximas ao miosepto conjuntivo que delimita as camadas musculares vermelha e branca.
5. As reações histoquímicas para as enzimas oxidativas permitiram classificar as fibras musculares nos tipos I, II A e II B.

6. A reação histoquímica para a ATPase miofibrilar, com pré-incubação em pH 4,6, subdividiu as fibras musculares em tipos I e II e o tipo II em subtipos II A e II B.
7. As fibras do tipo I reagiram intensamente para o processamento histoquímico para as enzimas oxidativas e para a ATPase.
8. As fibras de diâmetro reduzido evidenciaram comportamento similar às do tipo I quando frente às reações para as enzimas oxidativas e ATPase.
9. As fibras do tipo II mostraram uma reação histoquímica fraca ou por vezes nula para todos os métodos histoquímicos adotados.
10. Na reação para a NADH-TR e ATPase miofibrilar, a intensidade da reação manteve-se praticamente homogênea em todas as camadas musculares, com exceção da camada de fibras do tipo II B, que na reação para a NADH-TR, mostrou aumento na intensidade ao longo do corpo.
11. A camada de fibras intermediárias ou tipo II A, diminui progressivamente sua espessura na direção ântero-posterior do corpo. O contrário ocorre com a camada de fibras do tipo I. A camada com fibras do tipo II B não apresentou variação em espessura.

## SUMMARY

An anatomical, histological and histochemical study has been carried out on the muscular tissue of the trunk of *Astyanax eigenmanniorum*. After to apply the various techniques it was possible to distinguish the different types of muscle fibers in the specimen studied, know as type I, II A and II B as well as its distribution through the body. The muscular unities of the animal - the myomeres - were identified, wich are isolated between themselves by a layer of connective tissue, the myoseptes. Such a unities, if the animal is studied with the skin removed, exhibit a zigzag-like aspect. Otherwise if they are observed in cross sections they form a lot of conical incomplete and overlapped sections. When isolated these unities show three projections pointing the anterior part and two the posterior part of the animal body. This kind of organization gives the  $\#$  form to the myomeres.

On basis of the histochemical techniques the muscle fibers reacted according the method used and its localization. With the use of the technique for demonstration of NADH - Tetrazolium Reductase ( NADH-TR ), succinic dehydrogenase (SDH) and myofibrillar adenosine triphosphatase ( ATPase ) activity,

the superficial strip of red muscle show a homogenously positive reaction. This fact indicates that this layer of muscular tissue is formed by fibers which correspond to the type I fiber. Lying beneath the superficial red fibers but just above the myosept, it can be seen a group of small diameter fibers. They reacted with the same intensity of the red fibers.

A different pattern of staining was obtained when the deeper layer of all white muscle was examined histochemically, which is separated from the above by an abundant connective tissue. The transition between the red and white muscle layers is quite abrupt. In this white-fibers region the reaction after the use of the SDH, NADH-TR and ATPase techniques was very weak. This could mean that this layer is formed by the type II fibers only.

With all the techniques, however, it was possible to distinguish in this type of muscle a heterogenous histochemically reaction in the white fiber region. In this conditions there is a group of fibers disposed near the myosept whose intensity of reaction is moderately higher when compared with those disposed deeply. Based upon these result, it can be strongly suggested that the type II fibers can be divided in two subtypes: II A ( darker ) and II B ( lighter ). The subtype II A fiber represent an intermediate zone between the red layer ( type I ) and the white II B subtype fibers. Because of the anatomical disposition and the moderate histochemical reaction, sometimes they are also classified as intermediate fibers. By the other hand, the II B subtype fibers are known as the classic white fibers.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, R. McN. The Orientation of muscle fibres in the myomeres of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, v. 49, p. 263 - 290, 1969.
2. BÁRÁNY, M. Relation between ATPase activity of myosin and speed of muscle contraction. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMISTRY, 7., Tokyo, 1967. Abstracts. Tokyo, 1967, v.2, p. 319.
3. BARNARD, J.; EDGERTON, V. R.; FURUKAVA, T.; PETER, J. B. Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.*, v. 220, p. 410 - 414, 1971.
4. BICHARA, L. S. B. Estudo morfo-histoquímico da musculatura estriada esquelética de *Plecostomus commersonii*, Cuvier e Valenciennes, 1840 (Pisces). Curitiba, 1983. 83 p. Tese (Mestrado, em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.
5. BODDEKE, R. et al. Histological characteristics of the body-musculature of fishes in connexion with their mode of life. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.*, v.62C, p. 576 - 588, 1959.
6. BONE, Q. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, v. 46, p. 321 - 349, 1966.
7. BRAEKKAN, O. R. Function of the red muscle in fish. *Nature (Lond.)*, v. 178, n. 4536, p. 747 - 748, 1956.

8. BROOKE, M. H. & KAISER, K. K. Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 17, p. 431 - 432, 1969.
9. \_\_\_\_\_. Muscle fibre types: How many and what kind ? *Arch. Neurol.* v. 23, p. 369 - 379, 1970.
10. BULLARD, H. H. Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscles of the cat. *Johns Hopkins Hosp. Rep.*, v. 18, p. 323, 1919.
11. BONO, W. & GERMINO, N. I. Distribution of succinic dehydrogenase in the organs of the adult albino rats. *Acta Anat.*, v. 33, p. 161, 1958.
12. BUTTKUS, H. Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis. *J. Fish Res. Board Can.*, v. 20, p. 45 - 58, 1963.
13. CARLSON, B. M. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am. J. Anat.*, v. 137, p. 119 - 150, 1973.
14. CARPENÉ, E. & VEGGETTI, A. Increase in muscle fibres in the lateral muscle ( white portion ) of Mugilidae ( Pisces, Teleostei ). *Experientia*, v. 37, p. 191 - 193. 1981.
15. CARPENÉ, E. et al. Histochemical fibre types in the lateral muscle of fishes in fresh, brackish and salt water. *J. Fish Biol.*, v. 20, p. 379 - 396. 1982.
16. CARRY, M. R. et al. Mitochondrial morphometrics of histochemically identified human extraocular muscle fibers. *Anat. Rec.*, v. 214, n. 1, p. 8 - 16. 1986.
17. CIACCIO, G. V. La découverte des muscles blancs et des muscles rouges, chez la lapin, revendiqué en faveur de S. Lorenzini. *Arch. Ital.*, v. 30, p. 287, 1898.
18. COLE, F. J. A monograph on the lateral morphology of the myxinoidefishes, based on a study of myxine. Part II. The anatomy of the muscles. *Trans. R. Soc. Edinb.*, v. 45, p. 683 - 757, 1907.

19. DAHL, H. A. & NICOLAYSEN, K. Actomyosin ATPase activity in atlantic hagfish muscles. *Histochemie*, v. 28, p. 205 - 210, 1971.
20. DATTA MUNSHI, J. S. et al. Succinic dehydrogenase activity of the respiratory muscles of a fresh-water teleost, *Bagarius bagarius* Ham. (Sisoridae, Pisces). *Acta Anat.*, v. 92, p. 543 - 559. 1975.
21. DAVIES, A. S. & GUNN, H. M. Histochemical fibre types in the mammalian diaphragm. *J. Anat.*, v. 112, n. 1, p. 41 - 60, 1972.
22. DENNY-BROWN, D. The histological features of striped muscle in relation to its functional activity. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 104, p. 371, 1929.
23. DUBOWITZ, V. & BROOKE, M. H. Histological and histochemical stains and reactions. In: \_\_\_\_\_. *Muscle biopsy: a modern approach*. London, Saunders, 1973. p. 20 - 33.
24. \_\_\_\_\_. Normal Muscle. In: \_\_\_\_\_. *Muscle biopsy: a modern approach*. London, Saunders, 1973. p. 34 - 73.
25. DUBOWITZ, V. & PEARSE, A. G. E. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature*. (Lond.), v. 185, p. 701, 1960.
26. EDDINGER, T. J. et al. Myosin-ATPase fibre typing of chemically skinned muscle fibres. *Histochem. J.*, v. 17, p. 1021 - 1026, 1985.
27. ENGEL, W. K. The essentiality of histo and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, v. 12, p. 778, 1972.
28. \_\_\_\_\_. Fiber - type nomenclature of human skeletal muscle for histochemical purposes. *Neurology*, v. 12, p. 344 - 348, 1974.
29. FLOOD, P. R. & MATHISEN, J. S. A third type of muscle fibre in the parietal muscle of the atlantic hagfish *Myxine glutinosa* (L.). *Z. Zellforsch.*, v. 58, p. 638 - 640, 1962.

30. FOWLER, H. W. Os Peixes de Água Doce do Brasil. Arq. Zool. do Estado de São Paulo. v. 6, p. 44. 1948.
31. GEORGE, J. C. & SCARIA, K. S. A histochemical study of dehydrogenase activity in the pectoralis major muscle of the pigeon and certain other vertebrate skeletal muscles. Q. J. Microsc. Sci., v. 99, p. 469, 1958.
32. GEREBTOZOFF, M. A. Contribution à la morphologie comparée des appareils cholinesterasiques myo-neural et musculotendineux des vertebretés. Ann. Histochem., v. 1, p. 145-150, 1956.
33. GRUTZNER, P. Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskeln. Recl. Zool. Suisse, v. 1, p. 665, 1884.
34. GUTH, L. & SAMAHA, F. J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp. Neurol., v. 28, p. 365 - 367, 1970.
35. HINSTZ, C. S. et al. Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assay and by myosin ATPase staining. J. Histochem. Cytochem., v. 32, n. 6, p. 655 - 660, 1984.
36. HOOGEBOOM, G. H.; CLAUDE, A.; HOTCHKISS, R. D. The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of the mammalian liver cell. J. Biol. Chem., v. 165, p. 615, 1946.
37. HUDSON, R. C. L. On the function of the white muscles in the teleosts at intermediate swimming speeds. Exp. Biol., v. 58, p. 509 - 522, 1973.
38. HULBERT, W. C. & MOON, T. W. General characteristics and morphology of eel (*Anguilla rostrata* L.) red and white muscle. Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol., v. 61, p. 377 - 382, 1978.
39. JAMUR, M. C. Características estruturais e histoquímicas da musculatura estriada esquelética de *Rhamdia branneri*, Hasemann, 1911 (Pisces). Curitiba, 1982. 71 p. Tese, (Mestrado, em Morfologia) Universidade Federal do Paraná.

40. JOHNSTON, I. A. & TOTA, B. Myofibrillar ATPase in the various red and white trunk muscles of the tunny (*Thunnus thynnus* L.) and the tub gurnard (*Trigla lucerna* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 49, p. 367 - 373, 1974.
41. JOHNSTON, I. A.; PATTERSON, S.; WARD, P.; GOLDSPINK, G. The histochemical demonstration of myofibrillar adenosine triphosphatase activity in fish muscle. *Can. J. Zool.*, v. 52, p. 871 - 877, 1974.
42. JOHNSTON, I. A.; WARD, P. S.; GOLDSPINK, G. Studies on the swimming musculature of the rainbow trout I. Fibre types. *J. Fish Biol.*, v. 7, p. 451 - 458, 1975.
43. JOHNSTON, I. A. & LUCKING, M. Temperature induced variation in the distribution of different types of muscle fibre in the Goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Physiol.*, v. 124, p. 111 - 116, 1978.
44. KHAN, M. A. Histochemical subtypes of three fibre-types of avian skeletal muscle. *Histochemie*, v. 50, p. 9 - 16, 1976.
45. KILARSKI, H. The fine structure of striated muscles in teleosts. *Z. Zellforsch.*, v. 79, p. 562 - 580, 1967.
46. KNOLL, P. Über Protoplasmaarme und Protoplasmareiche Muskulatur. *Denkerschr. Kaiserl. Akad. Wiss.*, v. 58, p. 633, 1891.
47. KÖLLIKER, A. Eenige Bemerkungen über die Endigungen der Hautnerven und den Bau der Muskeln. *Z. Wiss. Zool.*, v. 8, p. 311, 1857.
48. KORNELIUSSEN, H.; DAHL, H. A.; PAULSEN, J. E. Histochemical definition of muscle fibre types in the trunk musculature of a teleost fish (Cod, *Gadus morhua*, L.). *Histochemistry*, v. 55, p. 1 - 16, 1978.
49. KRONNIE te, G. et al. Muscle fiber types in the myotome of stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *J. Fish Biol.*, v. 22, p. 306 - 316, 1983.

50. KRYVI, H. & EIDE, A. Morphometric and autoradiographic studies on the red and white axial muscle fibers in the shark *Etmopterus spinax*. *Anat. Embryol.*, v. 151, p. 17 - 28, 1977.
51. LANGLER, K. F.; BARDACH, J. E.; MILLER, R. R. Basic fish anatomy. In: \_\_\_\_\_. *Ichthyology*, New York, Wiley, 1962, p. 72 - 81.
52. LEE, F. S.; GUENTHER, A. E.; MELENEY, H. E. Some of general physiological properties of diaphragm muscle as compared with other mammalian muscles. *Am. J. Physiol.*, v. 40, p. 512, 1916.
53. MAURER, F. Die Element der Rumpfmuskulatur bei Cyclostomen und höherer Wirbeltierern. Ein Beitrag zur Phylogenie der Quergestreiften Muskelfaser. *Morphol. Jb.*, v. 21, p. 473 - 619, 1894.
54. McVEAN, A. et al. Muscle fibre types in the external eye muscles of the pigeon, *Columbia livia*. *J. Anat.*, v. 154, p. 91 - 101, 1987.
55. MELLGREN, S. I. & MATHISEN, J. S. Oxidative enzymes, glycogen and lipid in striated muscle. A histochemical study in the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa* L.). *Z. Zellforsch.*, v. 71, p. 189 - 206, 1966.
56. MEYER, W. Oxidative enzymes and myosin-ATPase in the trunk musculature of the river lamprey (*Lampreta fluviatilis*). *Histochem. J.*, v. 11, p. 187 - 195, 1979.
57. MOSSE, P. R. L. Capillary distribution and metabolic histochemistry of the lateral propulsive musculature of teleost fish. *Cell Tissue Res.*, v. 203, p. 141 - 160, 1979.
58. NACHIMIAS, V. T. & PADYKULA, H. A. A histochemical study of normal and denervated red and white muscle of the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 4, p. 47, 1958.
59. NAG, A. C. Ultrastructure and adenosine triphosphatase activity of red and white muscle fibers of the caudal region of a fish, *Salmo gairdneri*. *J. Cell Biol.*, v. 55, p. 42 - 5, 1972.

60. NURSALL, J. R. The lateral musculature and the swimming of fish. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, v. 126, p. 127 - 143, 1956.
61. OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibre. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibres. *Acta Med. Okayama*, v. 12, p. 216, 1958.
62. PADYKULA, H. A. The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. *Am. J. Anat.*, v. 91, p. 107, 1952.
63. PADYKULA, H. A. & HERMAN, E. Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatase as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 3, p. 161 - 169, 1955.
64. \_\_\_\_\_. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 3, p. 170 - 195, 1955.
65. PATTERSON, S. et al. A histochemical study of the lateral muscles of five teleost species. *J. Fish Biol.*, v. 7, p. 159 - 166, 1975.
66. PAUL, M. H. & SPERLING, E. Cyclophorase system: correlation of cyclophorase activity and the mitochondrial density in striated muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 79, p. 352, 1952.
67. PIRLOT, P. Sistema Muscular. In: \_\_\_\_\_. *Morfologia Evolutiva de los Cordados*, Barcelona, Omega, 1976. p. 401 - 405.
68. POOL, Chr. W. et al. Quantitative succinate-dehydrogenase histochemistry. II. A comparison between visual and quantitative muscle fibre typing. *Histochem.*, v. 64, p. 263 - 272, 1979.
69. RAAMSDONK, W. van; POOL, C. W.; KRONNIE, G. te. Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat. Embryol.*, v. 153, p. 137 - 155, 1978.

70. RANVIER, L. Propriétés et structures différents des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapin et chez les raies. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci., v. 77, p. 1030, 1873.
71. \_\_\_\_\_. De quelques faits relatifs à l'histologie et à la physiologie des muscles striés. Arch. Physiol., v. 6, p. 1, 1874.
72. \_\_\_\_\_. Leçons d'Anatomie Générale sur les Systèmes Musculaires. Paris, De La Haye, 1880. 466 p.
73. RETZIUS, G. Muskelfibrille und Sarkoplasma. In: \_\_\_\_\_. Biologische Untersuchungen. Stockholm, Neue Folge, 1890. p. 81.
74. ROUAUD, T. & TOUTANT, J. Histochemical properties and innervation pattern of fast and slow-tonic fibre types of the anterior latissimus dorsi muscle of the chick. Histochem. J., v. 14, p. 415 - 428, 1982.
75. SASAKI, F. Histochemical and ultrastructural studies of tail muscles in the anuran tadpole. Acta Histochem. Cytochem., v. 7, p. 239 - 256, 1974.
76. SELIGMAN, A. M. & RUTENBURG, A. M. The histochemical demonstration of succinic deshydrogenase. Science, v. 113, p. 317 - 320, 1951.
77. SEMENOFF, W. E. Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der succinodehydrase in den Organen der *Rana temporaria*. Z. Zellforsch., v. 22, 305, 1935.
78. SHASHI, K. & TALESARA, C. L. Histochemical and biochemical study of the caudal muscles of two teleost fishes - *Heteropneustes fossilis* and *Channa punctata*. Cell Mol. Biol., v. 30, n. 4, p. 357 - 363, 1984.
79. STEIN, J. M. & PADYKULA, H. A. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres of the rat. Am. J. Anat., v. 110, p. 103, 1962.
80. SYVÖRI, I. & GUTMANN, E. ATPase activity of two rabbit laryngeal muscles. Experientia (Basel), v. 67, p. 248, 1971.

81. TATARCZUCH, L. & KILARSKI, W. Histochemical analysis of muscle fibers in myotome of teleost fishes, (*Carassius auratus*, Gibelio). *Folia Histochemica et Cytochemica*, v. 20, n. 3-4, p. 163 - 170, 1982.
82. TEIXEIRA, M. L. & DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: Histochemical characterization of parasitized skeletal muscle fibers. *J. Protozool.*, v. 32, n. 2, p. 339 - 341, 1985.
83. TERAIVAINEN, H. Anatomical and physiological studies on muscle of lamprey. *J. Neurophysiol.*, v. 34, p. 954 - 973, 1971.
84. TUNEL, G. L. & HART, M. N. Simultaneous determination of skeletal muscle fiber, types I, II A and II B by histochemistry. *Arch. Neurol.*, v. 34, p. 171 - 173, 1977.
85. VITA, G. F. et al. A histochemical study of fibre types in rat extraocular muscles. *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, v. 6, p. 449 - 463, 1980.
86. WACHESTIEN, M. & MEISEL, E. The distribution of demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscle. *Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 1, p. 438, 1955.
87. WALKER, W. F. The muscular system. In:\_\_\_\_. *Vertebrate dissection*. Philadelphia, Saunders, 1975. p. 116 - 124.
88. WATANABE, K.; SASAKI, M. A.; KHAN, M. A. Light and electron microscopy study of adenosine triphosphatase activity of anuran tadpole musculature. *Histochemistry*, v. 55, p. 393 - 405, 1978.
89. WATERMAN, R. E. Development of the lateral musculature in the teleost, *Brachydanio rerio*: A fine structural study. *J. Anat.*, v. 125, p. 457 - 494, 1969.
90. WERNECK, L. C. O valor da biópsia muscular em neurologia. *Rev. Bras. Clin. Terap.*, v. 10, p. 2 - 24, 1981.
91. YELLIN, H. & GUTH, L. The histochemical classification of muscle fibers. *Exp. Neurol.*, v. 26, p. 24 - 432, 1970.
92. ZAWADOWSKA, B. & KILARSKI, W. Histochemical characterization of the muscle fiber types of the teleost, (*Esox lucius* L.) *Acta Histochem.*, v. 75, p. 91 - 100, 1984.