

ESTUDOS ELECTRONO-MICROSCÓPICOS DE MÚSCULOS ESTRIADOS DE RÉPTEIS

POR

GEORGE A. EDWARDS*, PÉRSIO DE SOUZA SANTOS**, HELENA LOPES DE
SOUZA SANTOS***, ALPHONSE RICHARD HOGE**** PAULO SAWAYA E
ARISTIDES VALLEJO-FREIRE**.

INTRODUÇÃO

As alterações que ocorrem em várias fibras de músculo estriado durante a contração já foram largamente estudadas, tanto com auxílio do microscópio óptico, como com o electrónico, em cortes e em fibras e fibrilas isoladas, sem que até o presente momento nada de conclusivo se tivesse conseguido quanto à sua natureza. Na literatura sobre estudos com o microscópio óptico predomina a opinião de que, durante a contração, as regiões anisotrópica e isotrópica se revertem, isto é, no músculo relaxado a região A é a mais escura, enquanto que no músculo contraído a região I se torna mais escura (Kölliker, 1888; Jordan, 1933; Speidel, 1939). Supunha-se outrossim, que, durante a contração, o sarcômero diminuía de comprimento, formando faixas escuras na região I, denominadas faixas de contração (Engelmann, 1878; Jordan, 1933; Speidel, 1939). Entretanto, nem todos os autores subscreviam este ponto de vista. Alguns (Meigs, 1908; Schmidt, 1934) acreditavam em um movimento do material sarcoplasmático para dentro e para fora da fibrila durante a contração e o relaxamento.

Igualmente o microscópio electrónico ainda não resolveu esta questão. Hall, Jakus e Schmitt (1946) observaram que, a não ser em contrações extremamente violentas, as principais alterações durante a contração ocorrem na região I; a região A permanece praticamente inalterável em comprimento. Ba-

* Depto. de Fisiologia Geral e Animal, Universidade de São Paulo.

** Secção de Virus, Instituto Butantan, São Paulo.

*** Secção de Microscopia Electrônica, Universidade de São Paulo.

**** Secção de Ofiologia, Instituto Butantan, São Paulo.

Recebido, para publicação, em 26.X.1954.

seando-se em suas micrografias, afirmaram que, durante a contração, uma "substância A" migra desde as proximidades da região M até a região Z, reforçando assim a linha Z. Esta afirmação foi confirmada por Draper e Hodge (1949). Estes autores também observaram, em fibras isoladas, a "reversão de estrias" dos antigos histologistas. Bennett e Porter (1953), trabalhando com cortes ultra-finos, não conseguiram confirmar estas observações, e até concluíram, baseados em medidas desintométricas de seus cortes, que o material sarcoplasmático se movimenta para dentro e para fora da fibrila. Demonstraram que, nas fibras relaxadas, o retículo endoplasmático foi visto, principalmente nos espaços interfibrilares, ligando as linhas Z e M, enquanto nas fibras contraídas houve menos material interfibrilar, sugerindo um movimento do retículo para dentro da substância da fibrila durante a contração.

O presente trabalho visa estudar miofibrilas isoladas de répteis durante vários estágios de contração; fornece novos apóios para o ponto de vista mais antigo da "reversão de estrias".

Em outro trabalho, a ser publicado em breve, daremos do mesmo assunto evidência obtida com cortes ultra-finos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material empregado constou de vários músculos de três répteis: a serpente, *Constrictor constrictor amarali* Stull, 1932; o lagarto, *Tupinambis teguixin* (L., 1758) e o jacaré, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802). Todos os animais foram obtidos da coleção registrada do Instituto Butantan.

Para conseguir fases comparáveis dos músculos procedeu-se como segue: Os músculos foram isolados e amarrados em uma extremidade de pequeno suporte de madeira "in situ"; a barriga do músculo foi esticada e a outra extremidade amarrada ao outro extremo do suporte. O músculo foi então cortado alguns milímetros além das extremidades da prancha e colocado em fixador. Desta forma a barriga do músculo se encontrava esticada; as porções entre a barriga e a ligadura, em várias fases de contração parcial; e as extremidades soltas, completamente contraídas. Este processo foi controlado por medições "in vivo" dos comprimentos normais dos músculos em várias fases de contração.

Os músculos foram fixados em formol a 5% durante quatro ou mais horas, seguidas por Trituração com água destilada em gral comum, com subsequente dissociação em micro-liquidificador com água destilada a 20.000 r.p.m., durante 15 minutos e em períodos de 5 minutos. Após conveniente diluição, colocaram-se, sobre as grades cobertas com "parlodion", gotas da suspensão resultante sendo em seguida secadas e sombreadas com crômio em ângulo de 12°. As observações foram feitas com microscópios electrônicos RCA, tipo EMU, e Siemens, tipo UM 100th, com aumentos iniciais de 1300, 3300 e 6200 X.

a 40-60 KV. O aumento final de cada micrografia apresentada neste trabalho está indicado pelo tamanho da linha representando um "micron".

RESULTADOS

1. *Fibrilas relaxadas ou esticadas.*

As fibrilas dos diversos músculos estudados mostram características comuns, permitindo reconhecer facilmente que se encontram distendidas (Fig. 1, 2 e 3). Caracteristicamente, a região I foi equivalente a região A em comprimento, sendo frequentemente pouco mais longa. O músculo obliquo externo do jacaré, quando esticado, na região A media 1,46 e, na região I, 1,60 μ em média; de forma similar, no lagarto, em A, media 1,67 μ , e, na região I, 1,88 μ , em média. Outros músculos mostraram também, a mesma relação, p. ex. temporal da serpente: A = 1,69 μ e I = 1,38 μ ; no *hyoglossus* do jacaré: A = 1,49 μ e I = 1,62 μ ; e, no *platysma* do mesmo animal: A = 1,64 μ e I = 1,67 μ . A média de todos os músculos observados foi A = 1,63 μ e I = 1,63 μ .

A segunda característica mais notável das fibrilas esticadas foi a grande diferença em densidade entre as regiões A e I. A região A foi sempre extremamente densa, apresentando somente pouco menos densidade no disco longo de Hensen (faixa H). A região I foi sempre de densidade consideravelmente menor, bem menor do que a faixa H da região A.

Em todas as fibrilas o miofilamento parecia ser contínuo através das regiões A e I. Os filamentos apresentavam uma série característica de pequenas estruturas em forma de colar de contas, arranjadas periodicamente, muitas vezes em forma de finas linhas transversais, dando a toda a fibrila um aspecto de tecido grosso. O período das finas linhas transversais tinha em média 340 A com média de 80 linhas por sarcômero, sendo 40 na região I e 40 na região A. As linhas transversais eram mais visíveis na região I do que na A e este fato, junto à densidade de A, dá impressão de haver uma "substância A" superposta à estrutura fundamental de filamentos. Em alguns dos preparados em condição de esticamento, parecia haver leve agregação destas linhas transversais, dando início à formação das sub-linhas N e M. Em nenhum preparado, entretanto, se observaram linhas definitivas, que se pudessem denominar N ou sub-linhas M definitivas.

Em todas as fibrilas a linha Z era visivelmente acentuada e em alguns parecia exceder os limites da fibrila (Fig. 2). A linha M também se destacava consideravelmente do resto da região A, mas sempre limitada à fibrila. Tem-se deste modo a impressão de que a linha Z não faz parte do sarcômero, mas é um canal secundário restrito.

2. *Fibrila parcialmente contraída.*

Retirando fibrilas de regiões sucessivas do músculo ligado iniciando-se na bariga em direção à ligadura, conseguiram-se fibrilas em diversas fases de contração parcial (Figs. 4, 5 e 6). Todas as fibrilas assim examinadas apresentavam importantes alterações decorrentes das fibrilas esticadas. A alteração primordial, que ocorre na fibrila parcialmente contraída é o encurtamento da região I, com pequena ou nenhuma modificação no comprimento da região A. O comprimento médio da região I durante a contração parcial do músculo obliquo externo do lagarto foi de $1,04\mu$, enquanto o da região A foi de $1,58\mu$. Em outros músculos existe a mesma proporção, p. ex. obliquo externo do jacaré: A = $1,40\mu$, I = $0,87\mu$; *platysma* do jacaré: A = $1,61\mu$, I = $0,63\mu$, e *hyoglossus* do jacaré: A = $1,53\mu$ e I = $1,01\mu$. Levando em consideração todos os músculos observados, verifica-se que a região A apresentava encurtamento de 6,1% e a região I em média de 45%, dando um média de 25% de encurtamento do sarcômero total.

Juntamente com o encurtamento da fibrila ocorriam duas acentuadas alterações, a da densidade e a formação do estriamento secundário transversal. Parecia haver uma alteração gradual de densidade das duas regiões durante as fases sucessivas de contração. Nas fibrilas menos contraídas a região A ainda se encontrava consideravelmente mais densa do que I; porém, nas fibrilas mais contraídas, a região I tendia a igualar-se a A em densidade. No primeiro tipo de fibrila, a faixa H é ainda bastante visível, algo mais curta do que na fibrila esticada. Nas fibrilas em contração mais intensa, a faixa H é restrita às imediações da linha M ou desapareceu completamente, deixando uma região A uniforme apenas pouco mais densa de que I.

O fato mais notável durante este processo foi a formação das sub-linhas M e N. Nos diversos preparados observamos até três linhas menores em cada lado da linha M principal e até cinco linhas menores em cada lado da linha Z. Das várias micrografias se depreende que estas sub-linhas são formadas por agregações de pequenas linhas transversais, isto é, agregações das contas dos filamentos à medida que os filamentos encurtam, principalmente na região I. Parecia ocorrer dupla migração de substâncias. À medida que o disco de Hensen encurta, observa-se a formação de sub-linhas M e, quando eventualmente a faixa H desaparece, a linha M aparece como uma única linha aumentada. As sub-linhas M pareciam formar-se primeiramente na região I que fica perto da A e, à medida que a região I se torna mais curta, as linhas pareciam mover-se em direção a Z, formando eventualmente uma linha N única, saliente, reforçada de cada lado de Z.

O processo da formação das linhas M e N pode ser seguido pela contagem do número das linhas transversais. Verifica-se que, as sub-linhas, se

formam a partir das ondas das finas linhas transversais, correspondendo o número de ondas ao decréscimo do número de finas linhas transversais.

Notável também na fibrila parcialmente contraída é o fato de os miofilamentos serem mais facilmente identificáveis longitudinalmente, observando-se com menor facilidade o aspecto de tecido da fibrila.

3. Fibrila completamente contraída.

Na fibrila completamente contraída, as alterações do comprimento são ainda mais evidentes na região I (Figs. 7 e 8). Os dados médios para todos os músculos observados na contração total são: encurtamento total do sarcômero = 36,5%, encurtamento da região I = 62%; encurtamento da região A = 11%.

Apenas em contração extrema (supercontração ou estado delta) notou-se considerável encurtamento da região A. Alguns dados médios para a fase de contração de diversos músculos são: obliquio externo do jacaré: A = 1,53 μ , I = 0,53 μ ; obliquio externo do lagarto: A = 1,50 μ , I = 1,07 μ ; temporal de serpente: A = 1,49 μ , I = 0,59 μ ; *hyoglossus* do lagarto: A = 1,50 μ , I = 0,41 μ .

Nesta fase as regiões A e I são de densidade igual (Fig. 7; densidade esta que é menor do que a da região A em contração parcial e maior do que a da I em relaxamento ou contração parcial. Quando a região A se torna de densidade uniforme, não mais é visível a faixa H, e a linha M se destaca como única, grossa e densa. Na região I as duas linhas N estão tão justapostas à linha Z, que quase formam uma única linha grossa (faixa de contração de autores anteriores).

Os miofilamentos longitudinais eram mais claramente visíveis na fibrila completamente contraída e o aspecto de trama grosseiramente tecida era observado apenas em alguns dos preparados. Interessante é notar que o período axial do miofilamento não encurtou significativamente, sendo na média 320 Å. Entretanto, o número de períodos, i.e., o número de finas linhas transversais, diminuiu principalmente na região I com a formação e migração das linhas N.

DISCUSSÃO E RESUMO

Os resultados da investigação aqui descrita tendem a confirmar as afirmações dos antigos microscopistas, tais como os de Kölliker e dos mais recentes electronomicroscopistas que trabalham com fibrilas isoladas, p. ex. Hall, Jakus e Schmitt e Draper e Hodge, no quanto diz respeito à "reversão de estrias" e à formação de faixas de contração durante a contração da fibra muscular. Os

presentes resultados não podem confirmar ou negar as teorias de outros autores p. ex. Bennett e Porter, de que a contração envolve a migração de material sarcoplasmático para dentro e para fora da fibrila, pois que o seu trabalho foi feito com cortes da fibra total, em que as estruturas integrais são mais facilmente observáveis. Parece, porém, que nossos resultados são suficientes para restabelecer a teoria mais antiga nos seguintes termos:

Na fibrila relaxada, a região A é extremamente densa, enquanto a I o é menos, as linhas Z e M são proeminentes, porém não se encontram sub-linhas N ou M. A faixa H é longa e menos densa do que o resto da região A. O miofílamento é contínuo através de ambas as regiões. No decurso da contração, as ondas transversais se agregam para formar as sub-linhas M e N. Com a contração continuada, a faixa H desaparece, as sub-linhas M se incorporam à linha M e as sub-linhas N se incorporam às linhas N singulares, que então se aproximam da linha Z, formando assim a chamada faixa de contração. Depois de completada a formação das linhas N e M as duas regiões A e I apresentam densidade igual e uniforme. Durante a contração normalmente ocorre encurtamento da fibrila, principalmente na região I. O encurtamento parece consistir essencialmente da agregação das finas ondas transversais nas linhas M e N, principalmente nestas. Desta forma, as linhas M e N parecem fazer parte e ser formadas das substâncias da fibrila. A linha Z parece ser extra-sarcômero.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi em parte realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e da Rockefeller Foundation. Queremos expressar aqui também reconhecimento, pela assistência técnica, ao Sr. Adolpho Brunner Jr., e à Sra. Cecilia Doneux, bem como ao sr. Arnaldo Ruic que nos auxiliou com o material fotográfico.

BIBLIOGRAFIA

- Bennett, H. S., and Porter, K. R. — An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl, Amer. Jour. Anat., 93: 61-105, 1953.
Daudin, F., Histoire Naturelle Reptiles, 2: 417, 1802.
Draper, M. H., and Hodge, A. J. — Studies on muscle with the electron microscope. I. The ultrastructure of toad striated muscle. Australian Jour. Exper. Biol. Med. Sci., 27:465-503, 1949.
Engelmann, T. W., — Neue untersuchungen ueber die mikroskopischen Vorgänge bei der Muskelkontraktion, Pfluger's Arch. F. Physiol. 18: 1-25, 1878.
Hall, C. E., Jakus, M. A., and Schmitt — An investigation of cross striations and myosin filaments in muscle, Biol. Bull., 90:32-50, 1946.

- Jordan, H. E. — The structural changes in striped muscle during contraction, *Physiol. Revs.*, 13:301-324, 1933.
- Kölliker, A. — Zur Kenntnis der quergestreiften Muskelfaser, I., *Zeit. f. wiss. Zool.*, 47: 689-710, 1888.
- Linnaeus, C. — *Syst. Nat.*, I (ed. 10.^a): 208, 1758.
- Meigs, E. B. — The structure of the element of cross-striated muscle and the changes of form which it undergoes during contraction, *Zeit. f. allg. Physiol.* 8:81-120, 1908.
- Schmidt, W. J. — Über die Doppelbrechung der I-Glieder der quergestreiften Myofibrillen und das Wesen der Querstreifung überhaupt, *Zeit. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, 21: 224-242, 1934.
- Speidel, C. C. — Studies of living muscles. II. Histological changes in single fibers of striated muscle during contraction and clotting, *Amer Jour. Anat.* 65: 471-529, 1939.
- Stull, O. G. — Five new subspecies of the family Boidae, *O. P. Boston Soc. Nat. Hist.*, 8:27. 1932.

ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF REPTILIAN STRIATED MUSCLES.

BY

GEORGE A. EDWARDS*, PERSIO DE SOUZA SANTOS**, HELENA LOPES DE SOUZA SANTOS***, ALPHONSE RICHARD HOGE****, PAULO SAWAYA* AND ARISTIDES VALLEJO-FREIRE**.

INTRODUCTION

The changes which occur in various striated muscle fibers during contraction have been studied considerably with both light microscope and electron microscope, in both sections and isolated fibers and fibrils, yet to date agreement has not been reached as to their nature. In the literature on light microscope studies, the prevailing opinion has been that during contraction the anisotropic and isotropic regions are reversed, i. e. that in the relaxed muscle the A band is the darker, whereas in the contracted muscle the I band becomes the darker (Kölliker, 1888; Jordan, 1933; Speidel, 1939). Further, it was held that as the sarcomere shortened in length, dark bands were formed in the I region the so called contraction bands (Engelmann, 1878; Jordan, 1933; Speidel, 1939). Not all authors, however, adhered to this view. Some (Meigs, 1908; Schmidt, 1934) believed in a movement of sarcoplasmic material into and out of the fibril during contraction and relaxation.

Electron microscope studies have not resolved the question. Hall, Jakus and Schmitt (1946) found that, except in extremely strong contractions, the principal changes during contraction occur in the I region; the A region remaining practically unchanged in length. On the basis of their micrographs they postulated that during contraction an "A substance" migrates from around the M region to the Z region, thus enhancing the Z line. This view was corroborated

* Depto. de Fisiologia Geral e Animal, Universidade de São Paulo.

** Secção de Virus, Instituto Butantan, São Paulo.

*** Secção de Microscopia Electrônica, Universidade de São Paulo.

**** Secção de Ofiologia, Instituto Butantan, São Paulo.

by Draper and Hodge (1949). These authors also confirmed, in isolated fibrils, the "reversal of striation" of the older histologists. Working with ultra-thin sections, Bennett and Porter (1953) were unable to confirm these observations, and rather, on the basis of densitometric measurements of their sections, concluded that sarcoplasmic material moves into and out of the fibril. They were able to show that in the relaxed fibers the endoplasmic reticulum was seen principally in the interfibrillar spaces, connecting the Z and M lines; whereas in the contracted fibers there was less interfibrillar material, suggestive of a movement of the reticulum into the substance of the fibril during contraction.

The present paper reports studies on reptilian, isolated myofibrils in various stages of contraction; giving further support to the older view of the "reversal of striation". In a second paper, to be published shortly, evidence from ultra-thin sections will be presented on the same subject.

MATERIAL AND METHODS

The material used in the present study were various muscles from three reptiles: the snake, *Constrictor constrictor amarali*, Stull, 1932; the lizard, *Tupinambis teguixin* (L., 1758) and the caiman, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802). All animals were obtained from the registered collection at the Instituto Butantan.

Comparable states of the muscles were obtained as follows. The muscles were isolated and tied at one end to a wooden splint "in situ". The belly of the muscle was then stretched and the other end tied to the extremity of the splint. The muscle was then cut a few millimeters beyond either end of the splint and placed in the fixative. Thus the belly of the muscle was stretched, those portions from the belly to the ligature were in various stages of partial and the loose ends quite fully contracted. This practice was controlled by measuring, "in vivo", the normal lengths of the muscles in the various stages of contraction.

The muscles were fixed in 5% formalin for four or more hours, followed by trituration in distilled water in a common mortar, with subsequent blending in a micro-blendor in distilled water at 20,000 rpm. for 15 minutes in 5 minute periods. After suitable dilution, drops of the resulting suspension were placed on the parlodion covered grids, dried, shadowed with chromium at an angle of 12°. Observations were made with the RCA, type EMU, and the Siemens, type UM 100b, electron microscopes at initial magnifications of 1300, 3300, and 6200 X at 40-60 KV. The final magnification of each micrograph presented in the present paper is indicated by the size of the line representing one micron.

RESULTS

1. Relaxed or stretched fibrils.

The fibrils of the various muscles investigated showed common characteristics making them easily identifiable as being in the stretched condition (Fig. 1, 2 and 3). Characteristically the I region was equivalent to the A region in length, often being slightly longer. In the caiman external oblique muscle in the stretched condition the A measured 1.46μ on the average and the I region 1.60μ . Similarly in the lizard A averaged 1.67 and the I region 1.88μ . Other muscles showed also the same relationship; e. g. temporal of the snake, A = 1.69 and I = 1.38μ ; *hyoglossus* of the caiman, A = 1.49 and I = 1.62μ ; and in the platysma from the same animal, A = 1.64 and I = 1.67μ . The average for all muscles observed was A = 1.63 and I = 1.63 microns.

The second most striking characteristic of the stretched fibrils was the tremendous difference in density between the A and I regions. The A region was always extremely dense; showing only slightly less density in the long disc of Hensen (H band). The I region was always of considerable less density, much less so even than the H band of the A region.

In all fibrils the myofilaments appeared to be continuous throughout both the A and I regions. The filaments showed a characteristic series of small beadlike structures periodically arranged, often appearing as fine cross lines, giving to the whole fibril the appearance of a roughly woven cloth. The period of the fine cross lines averaged 340 \AA with an average of 80 lines per sarcomere 40 being in the I region and 40 in the A region. The cross lines were more visible in the I region than the A, and this, coupled with the density of A, gives the impression of an "A substance" superimposed upon the fundamental structure. In certain of the preparations in the stretched condition, there appeared to be slight aggregations of these cross lines, forming what appeared to be the beginnings of sub-N-lines and sub-M-lines. In no preparations, however, were there seen definite lines that could be called the N's, or definite sub-M-lines.

In all fibrils the Z line was quite salient, in some cases appearing to go beyond the confines of the fibril (Fig. 2). The M line also stood out considerably above the rest of the A region but was always confined to the fibril. One thus has the impression that the Z line is not part of the sarcomere, but is a secondary, restricting ring.

2. Partially contracted fibril.

By taking fibrils from successive regions of the ligated muscle from the belly toward the ligature we were able to obtain fibrils representative of various

stages of partial contraction (Fig. 4,5 and 6). All the fibrils thus examined showed important changes from the stretched fibrils.

The principal change occurring in the partially contracted fibril is the shortening of the I region, with little or no change in the length of the A region. The average length of the I region during partial contraction of the external oblique of the lizard was $1.04\text{ }\mu$, whereas the A region was $1.58\text{ }\mu$. In other muscles the same relationship obtained e. g. caiman external oblique, $A = 1.40\mu$, $I = 0.87\mu$; caiman *platysma*, $A = 1.61$, $I = 0.63$, and in the caiman *hyoglossus*, $A = 1.53$ and $I = 1.01\mu$. Taking into consideration all the muscles observed, one finds that the A region showed a shortening of 6.1%, and the I region an average of 45%, giving an overall average of 25.5% shortening of the total sarcomere.

Accompanying the shortening of the fibril were two prominent changes, that of density and the formation of secondary cross striations. There appeared to be a gradual change in density of the two regions during successive stages of contraction. In the less contracted fibrils the A region was still considerably more dense than the I, but in the more fully contracted fibrils the I region began to equal the A in density. In the first type of fibril the H band is still quite visible, being somewhat shorter than in the extended fibril. In the more fully contracted fibrils the H band is restricted to the immediate vicinity of the M line, or has disappeared altogether, leaving a uniform A region only slightly more dense than the I.

Most notable of all during this process was the formation of the sub-M-lines and the N lines. In various preparations we observed as many as three smaller lines on either side of the main M line, and as many as five smaller lines on either side of the Z line. From the various micrographs it appears that these sublines are formed by the aggregation of the small cross lines, i. e. aggregation of the beads of the filaments as the filaments shorten, principally in the I region. There appears to be a double migration of substance. As the disc of Hensen shortens, sub-M-lines are seen to form and eventually when the H band has disappeared the M line appears as a single, enlarged line. The sub-N-lines appear to form first in that region of the I near the A, and as the I region becomes shorter the lines appear to migrate toward the Z, forming eventually a single, salient, reinforced N line on either side of the Z. The process of the formation of the M and N lines can be followed by counting the number of cross lines. It was noted that the sub-lines were formed from waves of the fine cross lines, the number of waves corresponding to the decrease in number of fine cross lines.

Notable in the partially contracted fibril also is the fact that the myofilaments are more easily distinguishable longitudinally, and the clothlike appearance of the fibril less easily visualized.

3. Fully contracted fibril.

In the fully contracted fibril the changes in length are still those of the I region (Fig. 7 and 8). The average figures for all the muscles observed in the fully contracted condition are: total shortening of sarcomere = 36.5%, shortening of I region = 62%, shortening of A region = 11%. Only in extreme contraction (supercontraction, or delta state) was there noticed considerable shortening in the A region. Some average figures for the contracted state of several muscles are: caiman external oblique, A = 1.53 μ , I = 0.53 μ ; lizard external oblique, A 1.50 μ , I = 1.07 μ ; snake temporalis, A = 1.49 μ , I = 0.59 μ ; lizard *hyoglossus*, A = 1.50 μ I = 0.41 μ .

In this stage the A and the I regions are of equal density (Fig. 7); a density less than that of the A region in partial contraction and greater than that of the I in relaxation or partial contraction. As the A region becomes uniform in density the H band is no longer visible, and the M line stands out as a single, thick, dense line. In the I region the two N lines are closely apposed to the Z line, forming almost a single thick line (the contraction band of earlier authors).

The longitudinal myofilaments were more clearly visible in the fully contracted fibril, and the roughly woven cloth pattern was evident in only a few of the preparations. Interestingly enough, the axial period of the myofilament did not shorten significantly; being on the average 320 Å. However, the number of periods, i. e. number of fine cross lines diminished, principally in the I region, with the formation and migration of the N lines.

DISCUSSION AND SUMMARY

The results of the present investigation tend to confirm the postulates of the earlier microscopists, such as Kölliker, and the more recent electron microscopists working with isolated fibrils, e. g. Hall, Jakus and Schmitt and Draper and Hodge, as regards the "reversal of striation" and the formation of contraction bands during contraction of the muscle fiber. The present results can neither confirm nor deny the theories of other authors, e. g. Bennett and Porter, that contraction involves a migration of sarcoplasmic material into and out of the fibril, inasmuch as their work was with sections of the whole fiber wherein the processes "in totum" are more readily observed. We do feel, however, that our results are sufficient to restate the older theory in the following terms:

In the relaxed fibril the A region is extremely dense, and the I less so. The Z and M lines are prominent, but no N or sub-M-lines are present. The H band is long, and less dense than the rest of the A region. The myofilaments are continuous throughout both regions. The filaments have an axial period

of 340 Å which gives to the fibril the appearance of rough cloth, more noticeably in the I than in the A region. In the course of the contraction, the cross waves aggregate to form the sub-M-lines and sub-N-lines. With continued contraction the H band disappears, the sub-M-lines become incorporated into the M line and the sub-N-lines incorporated into the single N lines which then approximate the Z line, forming the so called contraction band. With complete formation of the N and M lines the two regions, A and I display equal and uniform density. Shortening of the fibril during contraction normally occurs principally in the I region. The shortening appears to consist essentially of the aggregation of the fine cross waves into the M and N lines, principally the latter. Thus the M and N lines appear to be part of, and to be formed from, the substance of the fibril. The Z line appears to be extra-sarcomere.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been aided in part by grants from the Conselho Nacional de Pesquisas and the Rockefeller Foundation. We would like to acknowledge the technical assistance of Mr. Adolpho Brunner Jr., and Miss Cecilia Doneux. Aid with the photographic material was given by Mr. Arnaldo Ruic.

BIBLIOGRAPHY

- Bennett, H. S., and Porter, K. R. — An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl. *Amer. Jour. Anat.*, 93: 61-105, 1953.
- Daudin, F., *Histoire Naturelle Reptiles*, 2: 417, 1802.
- Draper, M. H. and Hodge, A. J. — Studies on muscle with the electron microscope. I. The ultrastructure of toad striated muscle. *Australian Jour. Exper. Biol. Med. Sci.*, 27: 465-503, 1949.
- Engelmann, T. W. — Neue Untersuchungen ueber die mikroskopischen Vorgaenge bei der Muskelkontraktion, *Pfluger's Arch. f. Physiol.*, 18: 1-25, 1878.
- Hall, C. E., Jakus, M. A., and Schmitt — An investigation of cross striations and myosin filaments in muscle, *Biol. Bull.*, 90: 32-50, 1946.
- Jordan, H. E. — The structural changes in striped muscle during contraction, *Physiol. Revs.*, 13:301-324, 1933.
- Kölliker, A. — Zur Kenntnis der quergestreiften Muskelfaser, I., *Zeit. f. wiss. Zool.*, 47: 689-710, 1888.
- Linnacus, C. — *Syst. Nat.* I(ed. 10): 208, 1758.
- Meigs, E. B. — The structure of the element of cross-striated muscle and the changes of form which it undergoes during contraction, *Zeit. f. allg. Physiol.*, 8: 81-129, 1908.
- Schmidt, W. J. — Ueber die Doppelbrechung der I-Glieder der quergestreiften Myofibrillen und das Wesen der Querstreifung ueberhaupt, *Zeit. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, 21: 224-242, 1934.
- Speidel, C. C. — Studies of living muscles. II. Histological changes in single fibers of striated muscle during contraction and clotting, *Amer. Jour. Anat.*, 65: 471-529, 1939.
- Stull, O. G. — Five new subspecies of the family Boidae. *O. P. Boston Soc. Nat. Hist.*, 8: 27, 1932.

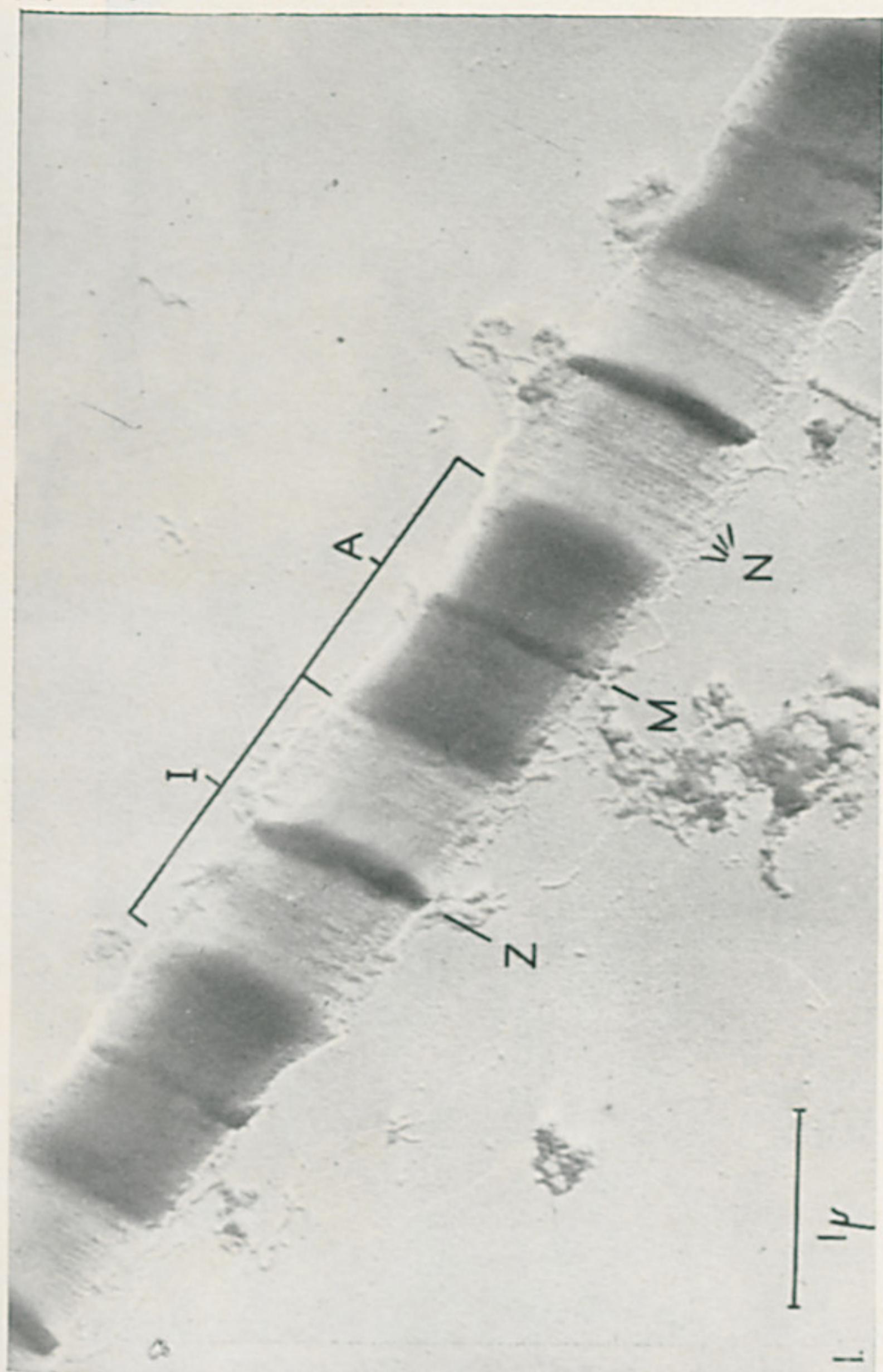


FIG. 1 — Electron micrograph of isolated fibril, in stretched state, from the external oblique muscle of the caiman.

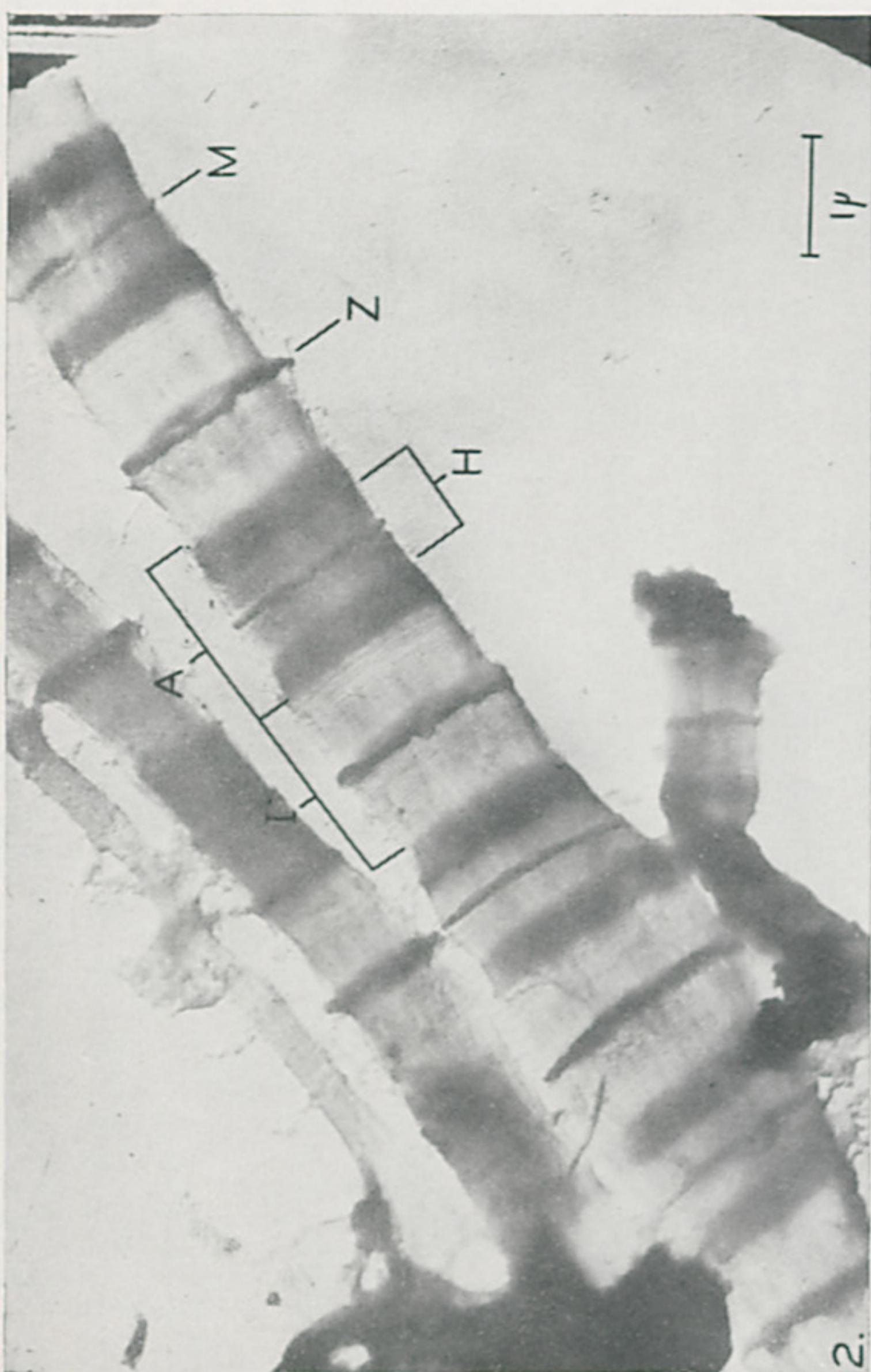


FIG. 2 — Electron micrograph of isolated fibril, in stretched state, from the external oblique muscle of the lizard.

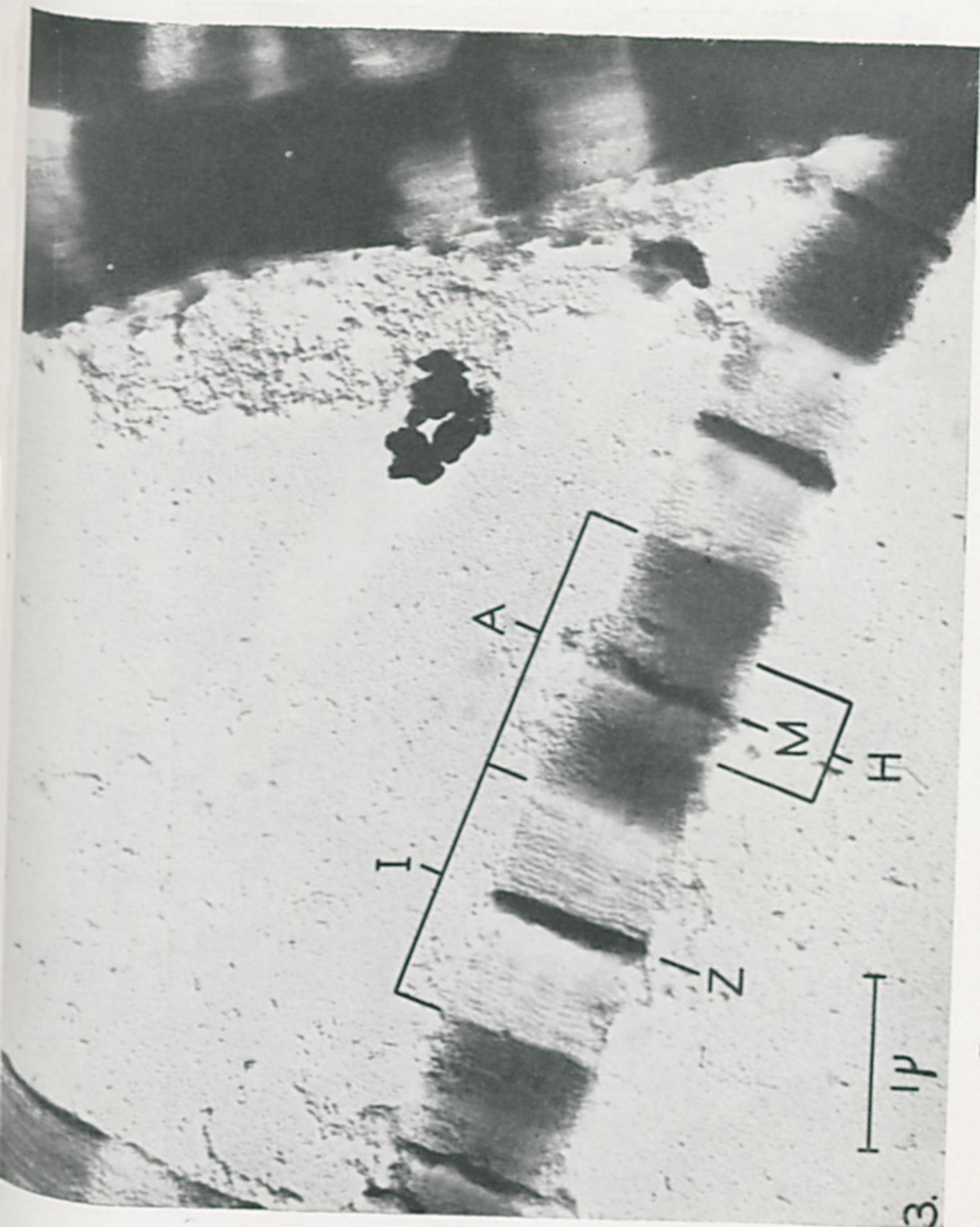


FIG. 3 — Electron micrograph of isolated fibril, in stretched state, from the external oblique muscle of the caiman.

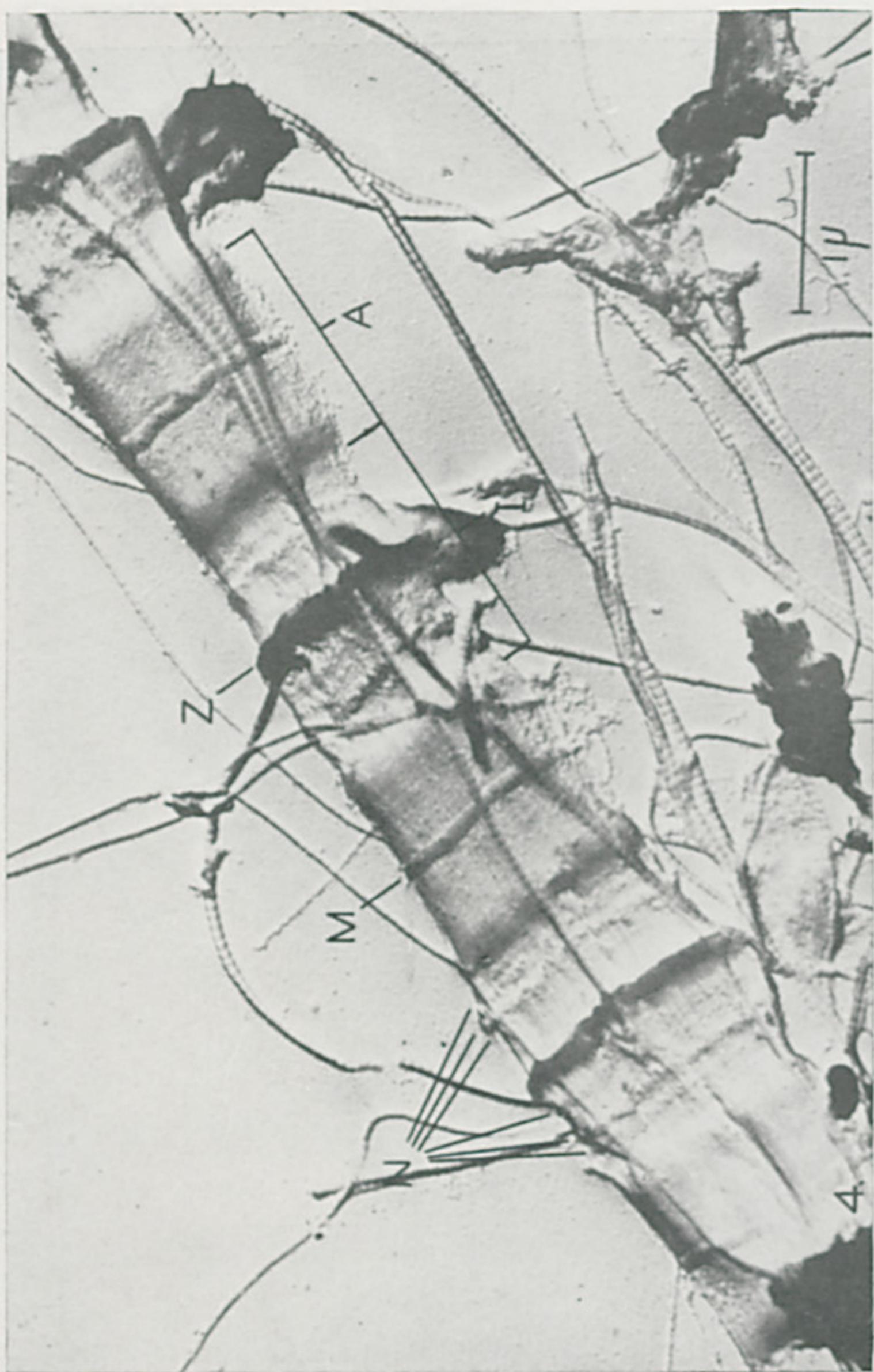


FIG. 4.—Electron micrograph of isolated fibril, in partial contraction, from hyoglossal muscle of the lizard.

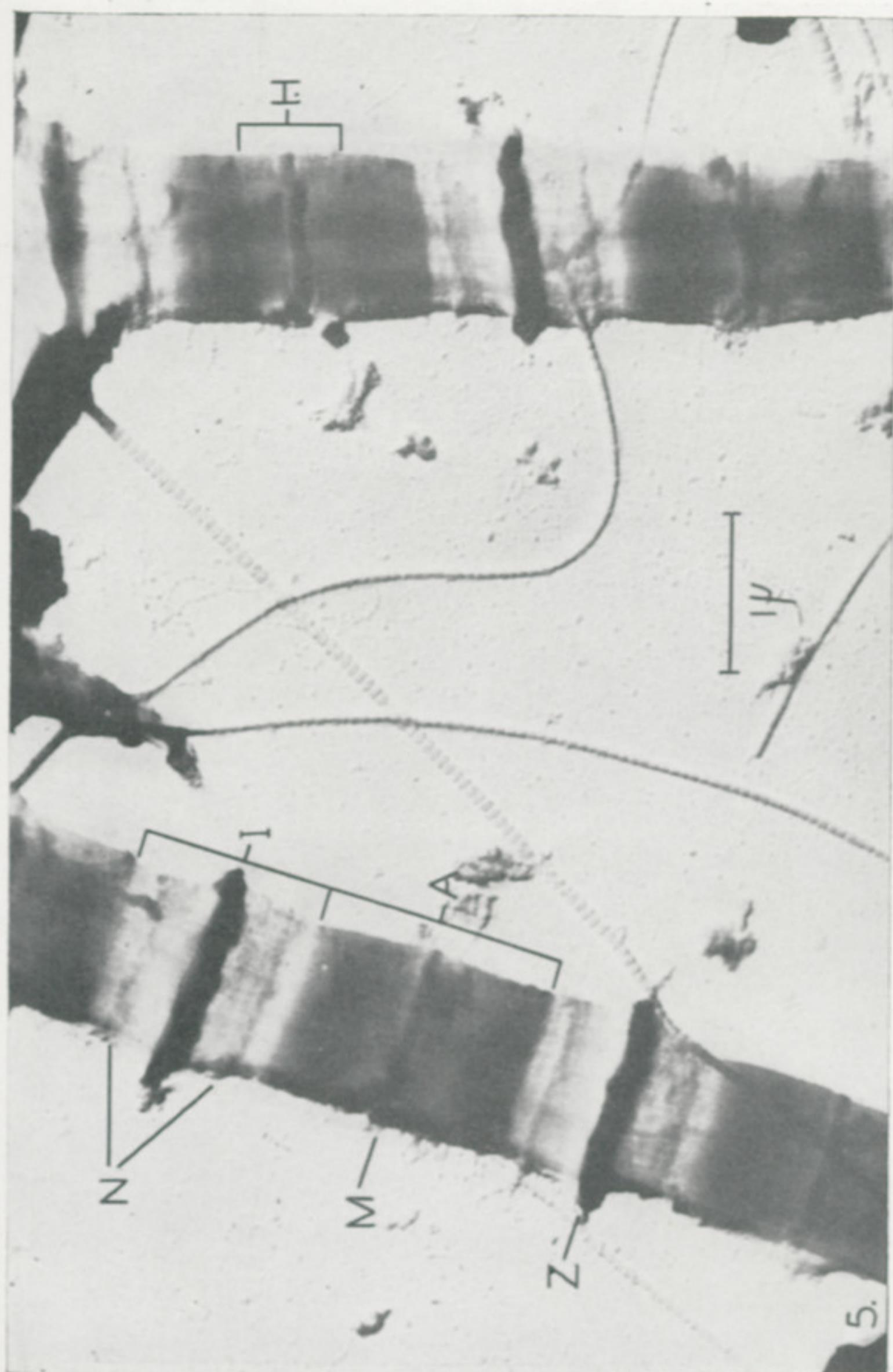


FIG. 5 — Electron micrograph of isolated fibril, in partial contraction, from hyoglossal muscle of the lizard.

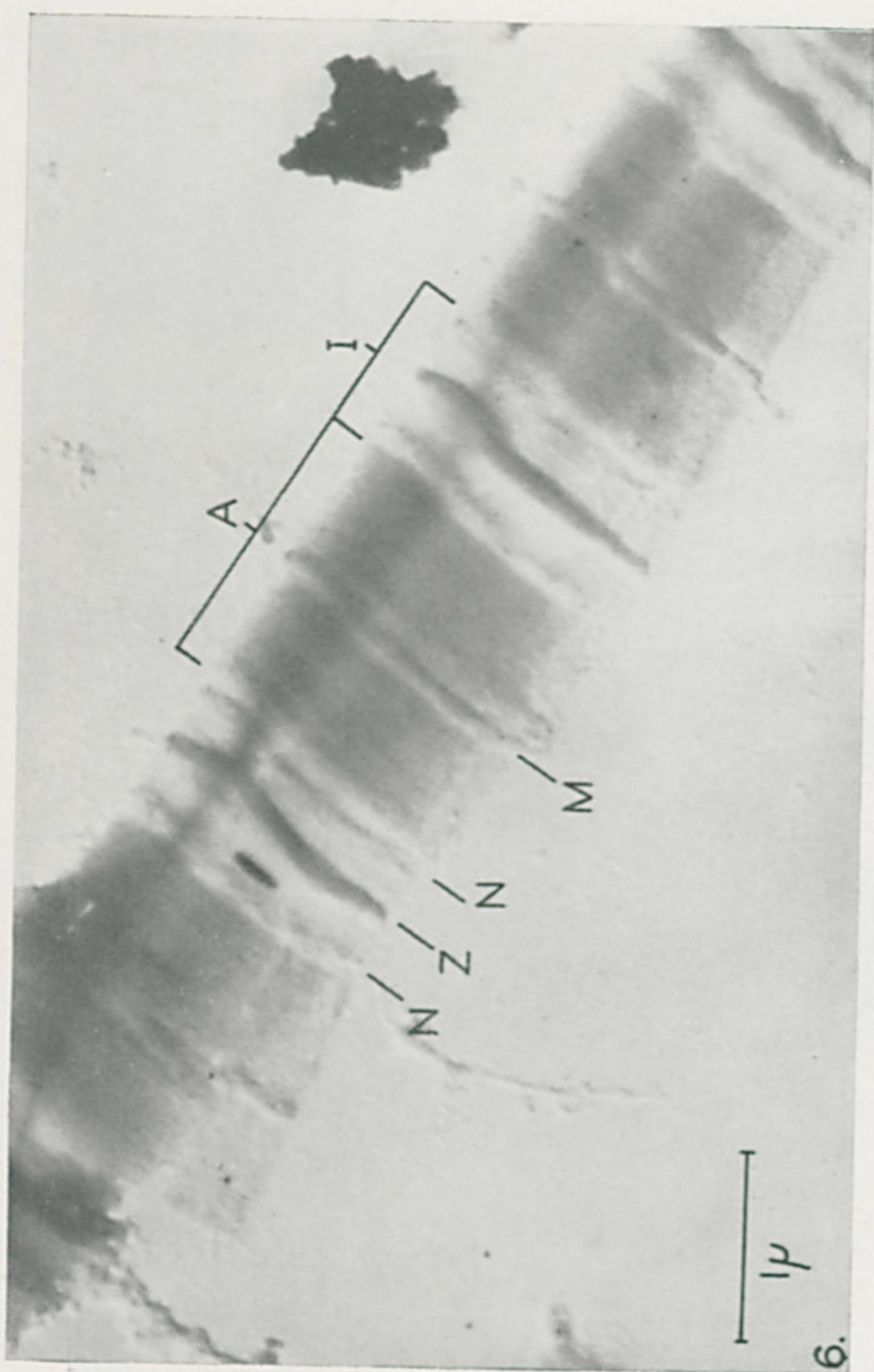


FIG. 6 — Electron micrograph of isolated fibril, near end of partial contraction, from external oblique muscle of caiman.

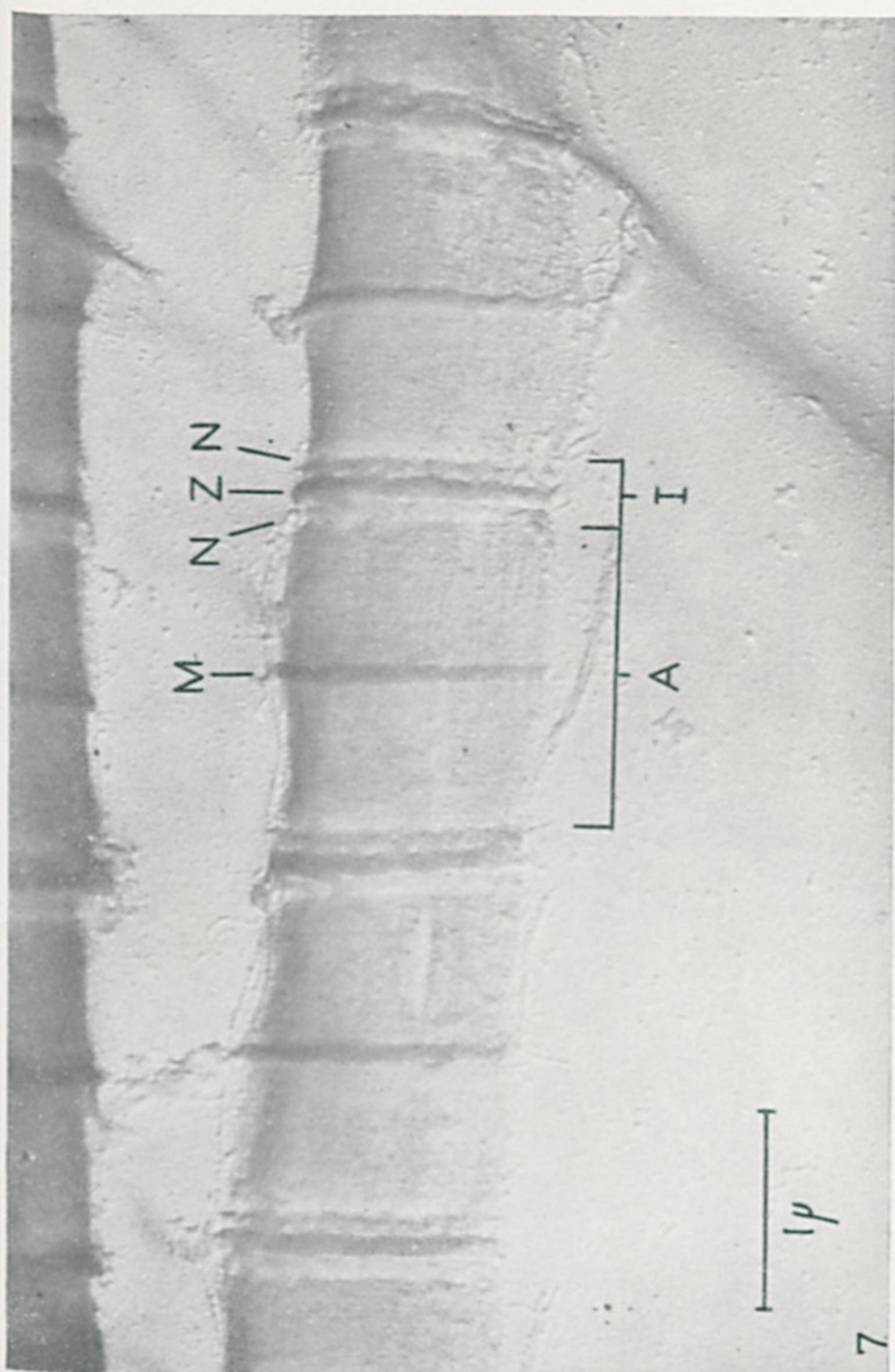


FIG. 7 — Electron micrograph of isolated fibril, in full contraction, from external oblique muscle of caiman.

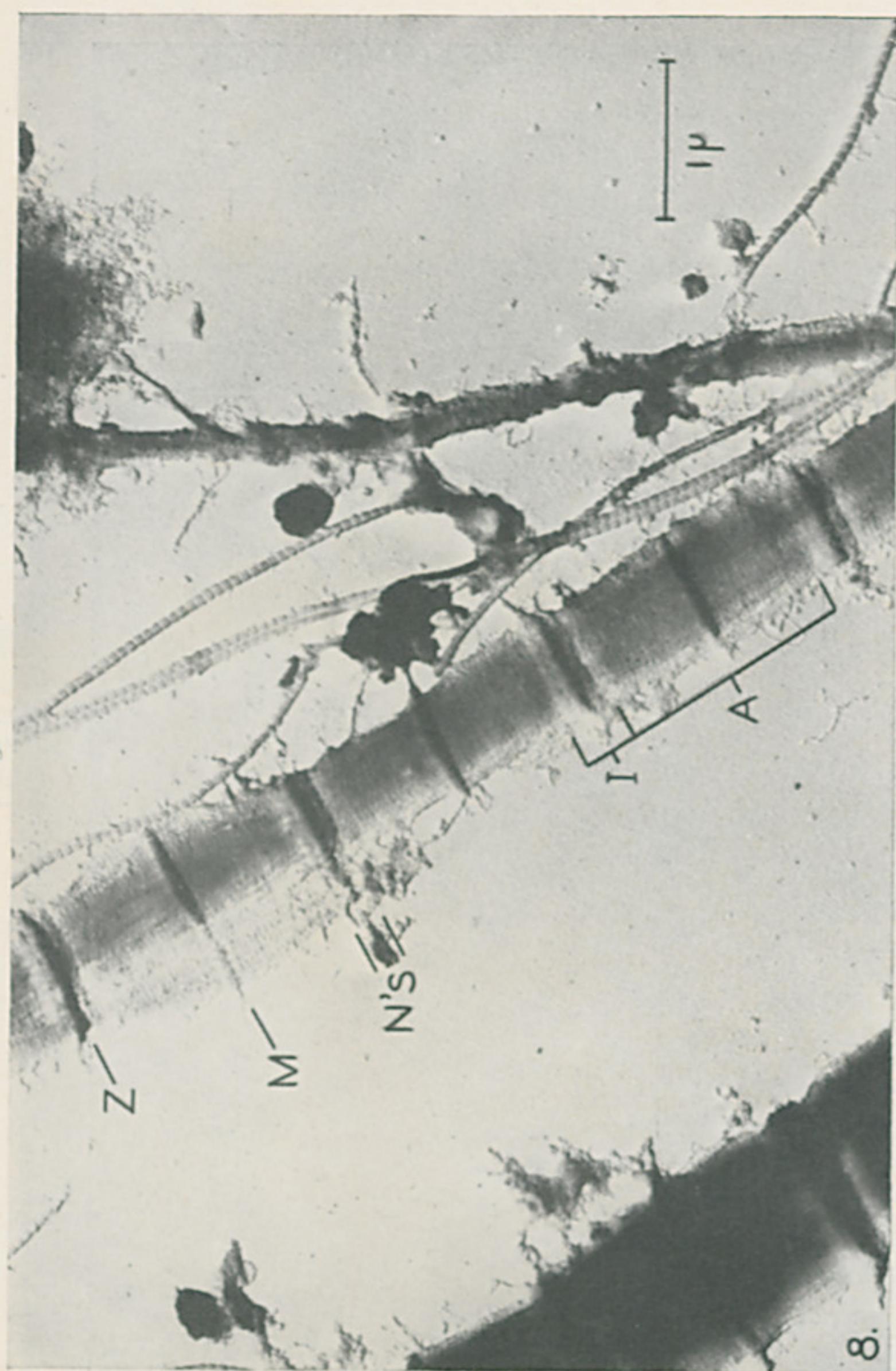


FIG. 8 — Electron micrograph of isolated fibril, in full contraction, from external oblique muscle of caiman.