

17. PESQUISAS DE CITOLOGIA QUANTITATIVA. XIX — DNA E VOLUME NUCLEAR NOS TECIDOS SOMÁTICOS DOS VERTEBRADOS

GIORGIO SCHREIBER *et al.*

*Instituto de Biologia Geral, Faculdade de Filosofia da U.F.M.G.,
Belo Horizonte, Brasil*

INTRODUÇÃO

O presente trabalho visa o estudo das relações quantitativas entre o conteúdo em DNA e o volume nuclear. O trabalho pioneiro de Walter Jacoby veio introduzir na citologia o conceito de “quantum”. As velhas pesquisas sobre a assim chamada “relação núcleo plasmática”, tateavam sem uma diretriz teórica esclarecedora de um mecanismo determinante desta relação. A cariometria de Jacoby teve o valor de esclarecer que o crescimento da matéria viva se dá por valores descontínuos e com a regra de duplicação. As pesquisas de Jacoby, retomadas à luz da citogenética, que vinha se desenvolvendo então, levaram imediatamente a esclarecer que o “quantum” de reduplicação da matéria viva é o genoma. As variações do volume nuclear deveriam, portanto, ser paralelas às do DNA. Successivamente, porém, apareceram vários casos nos quais a relação entre genoma e volume nuclear não se mantém e núcleos com o mesmo DNA podem ter volumes diferentes. O primeiro caso de discrepância entre o teor em DNA e o volume nuclear foi descoberto por Schrader e Leuchtenberger (1956) na série espermato-genética de um hemíptero (*Arvelius*), onde os vários túbulos testiculares apresentam todos o mesmo valor de DNA nas fases correspondentes da meiose, porém, o volume nuclear é, em alguns túbulos, respectivamente, 2 ou 4 vezes maior que os volumes dos correspondentes estádios dos túbulos normais. O teor de proteínas segue de perto as variações do volume nuclear independente do teor em DNA.

Variações da relação entre DNA e o volume nuclear, em condições fisiológicas normais ou experimentais, foram observadas por Bern, Alfert e colaboradores no estudo da ativação de determinados órgãos por hormônios específicos. Alfert e Bern (1951) verificaram que uma variação do volume nuclear (com módulo 2 ou às vezes 1,5) se dá na tireóide ativada pelo hormônio hipofisário e nas células da parede uterina ativada pelos hormônios estrogênicos, sem que haja variação do conteúdo de DNA. Foram, prevalentemente, estes fatos que levaram Bloch a considerar a existência dos dois tipos de interfase dos quais fala-

Este trabalho é apresentado em colaboração com Norma M. B. Melucci, Sílvia E. Gerken, Yeda X. Sant'Ana, Luís Alexandre Fallieri e Flávia de O. Amorim. O trabalho é dedicado à memória da co-autora Norma M. B. Melucci, falecida em 1963. As pesquisas foram realizadas com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, CAPES e Fundação Rockefeller.

remos adiante. Outro caso de desvio das relações entre DNA e volume nuclear é aquele descrito por Fautrez (1957-8) e chamado de “décalage”, no qual o núcleo da classe diplóide do pâncreas nos roedores tem um volume igual à metade do correspondente volume do núcleo diplóide do fígado.

Na Escola de Lison (Valeri — 1962), foram evidenciados outros casos de independência do volume nuclear em relação ao conteúdo em DNA, nos tecidos patológicos. No estudo dos tumores do colo do útero, Valeri verificou que os núcleos podem ter volume maior ou menor em relação ao teor em DNA, e, pela primeira vez, foi empregado o termo “megetismo” para indicar o excesso (hipermegetismo) ou deficiência (hipomegetismo) do volume nuclear em relação ao tecido normal.

No estudo da ploidia somática das glândulas dos Moluscos, Schreiber e colaboradores (1964-1965) verificaram mais um caso de exceção à constância das relações entre DNA e volume nuclear. Os tecidos glandulares, especialmente o hepatopâncreas, e a glândula salivar, nos Gasterópodos, apresentam intensos fenômenos de endopoliploidismo (ou politenia), verificáveis por classes superiores (múltiplas de 2) no conteúdo em DNA (Schreiber e colaboradores — 1964-1965). Estas glândulas, portanto, representam um mosaico de células de valores múltiplos de ploidia. Schreiber e colaboradores demonstraram um fato novo neste tipo de fenômenos: a relação entre DNA e volume, na série dos meiocitos, é, respectivamente, 1:1, 2:2 e 4:4, ao passo que, nas células glandulares poliplóides destes tecidos, a relação DNA/volume é respectivamente 1/2, 2/4, 4/8, 8/16, etc. Isto quer dizer que as células dos tecidos especializados têm um conteúdo em proteínas não histônicas duas ou quatro vezes maior do que as células germinais.

O estudo de todos estes casos, nos quais a relação entre conteúdo em DNA e volume nuclear não fica constante, foi considerado por nós (Schreiber e colaboradores — 1965) de forma sintética, introduzindo o conceito de “relação plóidomegética”. Estas considerações nos permitiram reconsiderar, sob novo aspecto, o trabalho dos antigos autores de cariometria.

A base bioquímica destas variações foi elaborada por Bloch (1958), que chegou à conclusão de que o núcleo pode seguir duas formas de crescimento interfásico. A primeira é a “autossintética”, na qual duplicam todos os componentes bioquímicos e morfológicos do núcleo. Assim, duplicam o DNA, as proteínas histônicas que o acompanham em quantidade sempre constante, e as proteínas não histônicas, que constituem parte dos cromosomas e o suco nuclear. Este tipo de interfase se verifica antes da divisão mitótica ou da endomitose. O segundo tipo de interfase, “heterossintética”, verifica-se quando o DNA não duplica, mas trabalha na função de produzir o RNA e sucessivamente as proteínas citoplasmáticas específicas da função celular. Neste tipo de interfase, porém, duplicam as proteínas não histônicas e o volume nuclear segue este ritmo de aumento. As proteínas não histônicas, que constituem o suco nuclear, determinam pela sua constituição físico-química o volume nuclear, que adquire geralmente valores múltiplos de duplicação (Schreiber — 1964). O volume do núcleo representa, portanto, uma “constante” celular que é característica de cada tipo de células. As variações do volume nuclear refletem fundamentalmente a função do núcleo, e, no presente trabalho, em falta de uso de métodos específicos para determinar as proteínas não histônicas, consideramos o volume nuclear como expressão morfológica embora grosseira do conteúdo destas proteínas. Deixamos aqui de considerar o problema das variações do conteúdo em RNA, que é um componente mais “móvel” e provavelmente em estado de equilíbrio durante o

ciclo fisiológico (“steady state”) e ligado às variações quantitativas do nucléolo. Do ponto de vista morfoquantitativo, a participação do DNA, histona e RNA, para a constituição do volume do núcleo, deve ser relativamente menos considerável do que a das proteínas não histônicas. Talvez os fenômenos de estado físico-químico (embebição, etc.) destas proteínas sejam os responsáveis pela determinação de um volume específico e constante nas diferentes fases da vida celular. O esquema apresentado por Alfert (1958, Fig. 3) esclarece a participação dos vários componentes na determinação do volume nuclear e as suas variações nas duas interfases, respectivamente, reprodutiva e funcional da célula. Pouco ou nada se conhece acerca da origem destas proteínas, se endonuclear ou citoplasmática; o fato é que elas se encontram em quantidade e estado físico-químico constante após uma divisão e duplicam antes da divisão sucessiva (interfase autossintética), ou durante o ciclo funcional da interfase heterossintética. A quantidade destas proteínas não histônicas está de certa forma ligada ao genoma, mas elas podem variar independentemente dele e a sua variação se dá, conforme a feliz expressão de Pollister, sob forma de “multiple sets of proteins”. Neste fato está a base de todo o sistema de pesquisa cariométrica e do fenômeno fundamental que foi verificado por Jacoby sob a forma de “Verdoppelungsgesetz”) do núcleo.

A função das proteínas não histônicas (proteínas ácidas, fosfoproteínas, etc.) parece ter uma importância fundamental, pois a estas proteínas parece estar conferida a função de desligar a união do DNA com as histonas. Esta ligação que parece ser a base de repressão da atividade do gen seria rompida pela nova ligação com as proteínas ácidas que agiriam como “depressors” do locus gênico, permitindo a sua atividade específica. Por esta razão nos parece interessante estudar quantitativamente a relação entre estas proteínas (provisoriamente expressas pelo volume nuclear) e o conteúdo em DNA nos diferentes tecidos especializados na série dos Vertebrados.

Uma comparação das variações de DNA e do volume nuclear entre vários grupos de tecidos e em vários grupos de animais nos levou a fazer uma classificação destas variações conforme a concepção de Bloch. O esquema aqui apresentado compara a relação entre DNA e volume nos tecidos de alguns Artrópodos, nos quais as variações entre tecidos se dão por politenia ou poliploidia e, portanto, as variações do DNA são paralelas às do volume nuclear (autossíntese), com a dos Vertebrados e Moluscos, nos quais o DNA é sempre diplóide na classe básica dos núcleos, mas o volume pode ter valores múltiplos nos diferentes tecidos (heterossíntese). A este fenômeno se sobrepõe, em certos tecidos, como por exemplo o fígado, o poliploidismo somático que forma classes múltiplas nucleares do valor de DNA e do volume. O que varia entre os tecidos é, portanto, o valor da relação plóido-megética que será constante nas diferentes classes de endopoliploidismo de cada tecido. Pode-se dizer que nos Artrópodos se dá um mosaico de ploidias entre os tecidos com relação plóido-megética 1:1, ao passo que nos Vertebrados se dá um mosaico de núcleos com relação plóido-megética diferente, em cada qual pode-se dar também endopoliploidismo (Fig. 1).

Podemos concluir, portanto, que do ponto de vista das relações entre DNA e volume nuclear (megetismo), os tecidos podem apresentar séries de volumes nucleares que classificamos como se segue:

I. *A série “eumegética”*, na qual o DNA e o volume variam paralelamente, devido ao mecanismo de interfase “autossintética”. Esta série se verifica nos meiócitos ($ide = 1$, gônios e citos segundos $= 2$ e citos primeiros $= 4$), nos te-

cidos que apresentam poliploidia somática (polissomatismo), como em algumas glândulas nos Vertebrados e nos Moluscos, ou entre tecidos com ploidia característica como nos Artrópodos.

II. *A série “hipermegética” somática*, como se verifica na comparação de núcleos com igual grau de ploidia de órgãos diversos nos Vertebrados e Moluscos. Nestes, cada tecido tem um volume característico da classe diplóide e os volumes básicos dos vários tecidos formam uma série de duplicação (série “polimegética”, “Verdoppellungs-gesetz” de Jacobj — 1925). Às vezes, porém, podem ter valores múltiplos de 1,5 (“sesquifase” de Schreiber — 1960).

III. *A série “hipomegética”*, representada pelos linfócitos e núcleos de eritrócitos (Jacobj — 1925) que, embora tenham teor diplóide de DNA, podem apresentar volumes $1/2$, $1/4$ ou até $1/8$ do volume básico do gônio.

MATERIAIS E TÉCNICAS

O material foi sempre fixado, parte em Bouin e corado com hematoxilina-eosina para cariometria, e parte em formol neutro a 10% e corado com Feulgen sem contraste para citofotometria. Os cortes foram feitos com espessuras muito variáveis conforme o material (de 2 micra para os peixes até 20 micra para o *Siphonops*). Foram tomados como base os seguintes tecidos: testículo, fígado, pâncreas e baço. Nos Peixes foram feitas medições orientadoras no tecido nervoso e, quando possível, foi medida a série espermatogenética completa (gônios, citos I, citos II e espermatídes), mas às vezes foi difícil encontrar todos os estádios. Contudo foi fácil encontrar citos I e ídes, com os quais foi feita a regressão DNA/volume. No baço foram medidos os linfócitos, e em Rato foram medidos os timócitos e linfócitos grandes. Do pâncreas, nesta pesquisa, foi considerado somente o tecido exócrino. Nos anamniotas foram medidos os eritrócitos nos vasos capilares, escolhendo os núcleos bem orientados para a medida. As medidas cariométricas foram feitas seja com o micrômetro filar do citofotômetro, seja com desenho à câmara.

As medidas de DNA foram feitas com citofotômetro, montado com Microscópio Ortholux Leitz, com objetiva 124 Nachet, imersão e ocular 10, montado num suporte Aristophot Leitz. Na cabeça binocular, uma das oculares é usada para a escolha do campo e a outra, substituída por um micrômetro filar de Zeiss com ocular K16, para a medição dos dois diâmetros, máximo e mínimo, do núcleo, e a centração do núcleo a ser fotometrado. No Aristophot foi adaptada a caixa do fototubo (RCA 931A) com um disco de 4 diafragmas de superfície variável. No foco do visor lateral foi introduzida uma chapa diapositiva com as imagens concêntricas dos diafragmas para o “plug”. O fole de Aristophot foi ajustado para obter uma imagem do núcleo a ser medido ampliado a 1.500 diâmetros. Utiliza-se uma área do “plug” com cerca de 20% da área do núcleo. Foi feita uma medida de absorção de cada núcleo; para cada medição foi determinada a luz padrão em zona fora do núcleo e ajustado o valor do galvanômetro a 100 com pequenos movimentos do diafragma do condensador do microscópio. Com este método cada leitura de absorção é dada em percentagem da intensidade da luz padrão usada. A iluminação foi dada por um monocromador Bausch & Lomb, a retículo, com lente frontal supletiva usando uma luz monocromática de 540 angstrons ou com filtro Wratten nº 58. Foi usado um micro-amperímetro “Norma”, modelo 251, de sensibilidade $2,10^{-7}$. Com as medidas de absorção de cada núcleo, e o diâmetro médio dois dois diâmetros cruzados, foi calculada a quantidade de DNA para cada núcleo, de acordo com a fórmula $DNA = D^2 (2 - \log In)$, sendo D^2 a superfície óptica do núcleo, In a medida de absorção e 2 o $\log 100$. Dos dados de DNA assim obtidos foram calculados a média, desvio-padrão e erro-padrão da média. Na elaboração estatística dos dados foi indicado sempre o valor da média e de $\pm S$ para o DNA. Nas medidas cariométricas geralmente foi indicada a moda, pois é a medida mais adequada nos casos de histogramas bimodais ou com modas encobertas.

Quando as medidas eram excessivamente dispersas, como em certos casos de volumes medidos ao micrômetro durante a citofotometria, foi indicado o valor mediano como o mais apto a dar uma indicação utilizável.

Nos diagramas de cascavel e parelheira aqui publicados utilizamos um novo tipo de gráfico, ou seja, as "áreas plóido-megéticas". Estas áreas (Figs. 4 e 8) resultam de quadriláteros, cujos lados correspondem ao valor total de dispersão dos dados respectivamente de DNA e volume. Embora se esteja ainda iniciando o estudo deste tipo de representação, os diagramas exprimem com grande clareza a situação dos núcleos dos diferentes tecidos em relação ao DNA e ao volume, e a sua comparação entre os diferentes tecidos nos parece de grande utilidade.

DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Nas pesquisas precedentes desta série foram estudados vários tecidos de Vertebrados, determinando o volume nuclear e o DNA. Estes trabalhos foram executados no decorrer de vários anos, cada um com banhos de Feulgen diferentes. Os resultados não podem ser confrontados quantitativamente entre as espécies, mas podem-se verificar as relações quantitativas entre estas duas variantes celulares somente entre os tecidos de cada espécie.

Os materiais estudados nas pesquisas anteriores foram os seguintes: *Peixes* (*Tilapia melanopleura*), por Yeda X. Sant'Ana (1965). Foram estudados o fígado, pâncreas, rim, eritrócitos e neurônios. O estudo foi feito não somente em adultos, mas também em fases de larvas recém-eclodidas e alevinos. Os dados desta pesquisa estão ainda em elaboração. Somente foi publicado o estudo da variação do tamanho do núcleo e seu conteúdo em DNA durante o desenvolvimento pós-embrionário. *Anfíbios*: (*Siphonops annulatus*), por N. Melucci (1962), no qual foram estudados o fígado, pâncreas, rim e espermatozônios. *Répteis*: (*Tupinambas* sp.), Melucci (não publicado), no qual foi estudado o fígado, rim e pâncreas. *Mamíferos*: (*Cricetus auratus* e *Mus rattus*). Em *Cricetus*, Gerken (1962) estudou o fígado, pâncreas, rim e glândulas salivares. Em *Rattus*, Yeda X. Sant'Ana estudou o fígado, pâncreas e os elementos do timus, relacionando estas medidas aos gônios (1964).

Ofídios: 1. *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) — Apresentamos na Fig. 2 os diagramas de regressão DNA/volume nuclear da série espermatogênica e na Fig. 3 os histogramas, respectivamente, do DNA e do volume nuclear com a tabela dos valores numéricos relativos. A Fig. 4 representa a regressão entre DNA e volume da linha germinal (linha contínua) e dos tecidos somáticos. Representamos de uma forma sintética os vários tecidos por meio da área ocupada pelos dados de cada tecido. Os retângulos abrangem a totalidade dos pontos do diagrama de regressão de cada tecido indicando assim a área de variabilidade. Chamamos este diagrama de "áreas plóido-megéticas" por dar uma expressão geométrica da dispersão dos dados nos tecidos e indicar com grande evidência a situação de hiper e hipo megetismo em cada tecido. Dêstes diagramas aparece bem claro que os tecidos somáticos têm um teor em DNA geralmente na faixa diplóide. As variações dentro desta faixa provavelmente são determinadas seja pela variação interfásica de uma certa percentagem de células em movimento mitótico ou endomitótico, seja por variações devidas ao estado fisiológico, como foi amplamente indicado na série de trabalhos da Escola de Fautrez (Roels-De Schrijver — 1961, Roels — 1954, Anteunis & Liu — 1960, Verwoerd-Verhoef & Verwoerd — 1962).

Se observarmos, agora, as variações do volume nuclear, resulta com grande evidência que os vários tecidos têm uma variação específica, dentro de determinados limites, e diferente em cada tecido. Êste é o fenômeno chamado de “décalage” por Fautrez na comparação dos volumes nucleares das classes diplóides do fígado e do pâncreas.

O pâncreas tem um volume mais ou menos duplo do espermatogônio e o fígado quatro vezes maior. Às vezes êstes volumes encontram-se na relação de 1:1,5. Mandamos os trabalhos anteriores desta série para o estudo dêste problema, que chamamos de “sesquifase” (Schreiber — 1960).

Nos Répteis, em geral, não se dá, como nos Mamíferos, a existência de classes múltiplas de endopoliploidia no fígado e às vezes no pâncreas; por isto, a variabilidade dos núcleos é estritamente limitada à faixa diplóide.

2. *Philodryas schottii* (Schlegel) — A Fig. 5 representa a regressão DNA/volume na série meiocítica e as Figs. 6 e 7 representam os histogramas de DNA e do volume nos seguintes tecidos: fígado, pâncreas, supra-renal, tireóide, linfócitos e monócitos. A Fig. 8 representa a regressão entre DNA e volume nos tecidos somáticos com a representação da “área plóido-megética”, como no caso precedente do *Crotalus*. A regressão entre DNA e volume dos valores nos meiócitos é perfeitamente regular. O DNA, como na cascavel, está na faixa diplóide para todos os tecidos, com exceção dos monócitos, nos quais tanto o DNA como o volume estão distribuídos na faixa 4c-6c, indicando um valor tetraplóide dos seus núcleos. Os volumes dos tecidos, como na cascavel, se encontram decididamente deslocados para uma situação de hipermegetismo, com exceção dos linfócitos, que se encontram com um valor 2c e 2, portanto exatamente como os espermatogônios. Os demais tecidos têm volumes nucleares altamente superiores ao volume da célula diplóide típica. Os dados numéricos dêstes volumes estão indicados na tabela II.

Muitas vezes, devido à grande dispersão dos dados, os valores do volume não refletem o valor teórico da série de duplicação. As exceções a esta série, como já dissemos, se devem fundamentalmente a estados de “movimento” da população de núcleos, seja em atividade mitótica, seja em atividade fisiológica.

Na *Philodryas*, os valores da tireóide são um pouco discordantes do valor teórico, provavelmente por serem os núcleos dos folículos tireoidianos deformados, dando um erro na valuação do volume.

ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS

Pelos dados das pesquisas precedentes e da nova série sobre Ofídios, podemos verificar alguns fatos gerais que resumimos como segue:

a) o estudo comparativo do teor em DNA e do volume nuclear nos tecidos somáticos e na espermatogênese dos Vertebrados revelou o fato já constatado em trabalhos precedentes nos Moluscos que a relação plóido-megética é diferente na linha germinal masculina e nos tecidos adultos somáticos. A regressão entre DNA e volume na série dos meiócitos espermatogenéticos é uma regressão muito regular e quando as coordenadas são escolhidas com as mesmas unidades de medida, “b” = 1, isto é, as variações de DNA são iguais às do volume. Chamamos anteriormente a êste tipo de regressão de “série eumegética”, conforme a nomenclatura de Valeri e Lison adotada com ligeiras modificações;

b) os vários tecidos somáticos aqui examinados apresentam todos a mesma forma de variação da relação plóido-megética, embora em grau quantitativo diferente. Praticamente todos estão com um teor em DNA dentro do que chamamos de “faixa diplóide”, isto é, com uma variabilidade de $2c-4c$ devida, em parte, aos fenômenos multiplicativos de uma certa percentagem de células e, em parte, aos desvios do teor em DNA que se verificam nos diferentes estados funcionais. Os volumes dos núcleos de cada tecido, pelo contrário, têm um campo de variação muito mais amplo e característico para cada um. Nas pesquisas precedentes, nos Mamíferos em geral, os valores modais dos histogramas de volume têm uma relação de duplicação entre si. Nos Ofídios esta regra, às vezes, é mascarada por fatores ainda não esclarecidos, mas que, por exemplo, para o fígado poderiam ser relacionados a condições fisiológicas excepcionais (jejum prolongado). Não podemos aqui examinar estes desvios mais detalhadamente; limitamo-nos a constatar que os diferentes tecidos somáticos têm volumes que desviam, às vezes, fortemente do valor que deveriam ter em base à ploidia. Isto significa que os núcleos se encontram naquela situação que Bloch define de interfase heterossintética.

O volume nuclear do pâncreas é geralmente o dobro do volume da série eumegética (espermatogônio); o do rim, nos Répteis, maior e não excluimos que possa ser afetado por medidas feitas no assim chamado segmento sexual característico do rim dos Répteis.

O fígado se encontra mais ou menos com um volume quatro vezes maior que o do correspondente estágio eumegético.

Os linfócitos e os eritrócitos, embora com ligeiros desvios no conteúdo em DNA, talvez devido a dificuldades técnicas da medição, têm nos Ofídios volume correspondente aos dos gônios e, portanto, têm uma relação eumegética. Nos trabalhos precedentes de Schreiber e Sant’Ana, nos timócitos do rato encontramos um valor do volume dos timócitos de $1/2$ o valor da célula diplóide típica, confirmando quanto tinha encontrado Jacobj nas suas pesquisas cariométricas (“Unterklassen”). Nos monócitos de Ofídios, pelo contrário, se verifica um caso de endopoliploidismo, estando o DNA na faixa de $4c$ e os volumes correspondentes exatamente na linha de regressão eumegética.

c) O estudo da relação “plóido-megética” do tecido hepático durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário nos Peixes e Anfíbios revelou um fenômeno novo. Pesquisas cariométricas precedentes, de Bruno Schreiber e Angeletti, nos Peixes, e de Giorgio Schreiber e Maria Romano Schreiber, nos Anfíbios, mostraram uma redução progressiva do volume nuclear por etapas de dimidiamento (chamado por G. Schreiber de “elaxis”). Nos Peixes (Sant’Ana) foi estudado, também, o teor em DNA e verificou-se estar a diminuição somente a cargo do volume, ficando constante o valor diplóide do DNA. Os núcleos embrionários e larvários, neste caso em situação polimegética, alcançam, por etapas de dimidiamento, o valor básico do núcleo no adulto. Este fenômeno foi por nós comparado com o progressivo dimidiamento do volume nuclear dos blastômeros durante a segmentação, sendo, provavelmente, a diminuição progressiva em certos tecidos pós-embrionários, um prolongamento do tipo de divisão característico dos blastômeros.

O megetismo dos blastômeros, porém, poderia ser devido a um tipo de proteínas diferente daquele que aparece na diferenciação histógena pós-embrionária. Devemos lembrar que o núcleo dos blastômeros em segmentação não possui ainda

genes ativados, salvo casos especiais, e, como demonstraram Bloch e Hew (1960), as histonas destes núcleos até à gastrulação pertencem a uma categoria diferente ("cleavage histones").

O caso do pâncreas, órgão altamente produtor de proteínas citoplasmáticas, e que geralmente apresenta hipermegetismo menor do que o fígado, deve-se talvez relacionar com um valor quantitativo do nucléolo, excepcionalmente superior aos demais tecidos (Schreiber e colaboradores). O caso do hipomegetismo dos linfócitos e eritrócitos deve ser ulteriormente estudado, estando a origem destas células ligada a processos característicos de maturação histógena permanente e não somente embrionária ou pós-embrionária.

O estudo de todos estes fenômenos deve ser estendido aos estádios histogênicos embrionários de cada órgão para se determinar o momento em que, para cada tecido, se estabelece uma dose múltipla de proteínas acídicas do suco nuclear ("multiple sets of proteins" de Pollister) e subsequente um volume nuclear específico.

Conforme foi dito antes, a base bioquímica de todos os fenômenos aqui relatados (hiper e hipomegetismo) deve-se encontrar no conceito de interfase heterossintética de Bloch (1958), durante a qual, a célula está empenhada em trabalho de síntese de materiais não genômicos que constituem fundamentalmente o suco nuclear (RNA e proteínas não histônicas ou acídicas), cuja variação é geralmente proporcional à variação do volume nuclear. Este tipo de proteínas acídicas são recentemente consideradas como os fatores que deslocam a histona do DNA (depressores), permitindo a função heterossintética dos genes e, portanto, a produção de proteínas específicas da função de cada tecido. Markert recentemente (XVI Int. Cong. of Zoology, Washington) escreve textualmente: "If histones are indeed inhibitors of gene function, then the removal of this inhibitors through complexing with non histonic proteins (or RNA) may be the basic event in gene activation".

Opinião análoga é expressa por Moore (1966), em base às pesquisas de Langan, que mostram ter a cromatina ativa o dobro de fosfoproteínas por unidade de DNA do que a cromatina repressa. Frenster (1966) também acha que as fosfoproteínas (não histônicas), que se encontram na cromatina expandida ativa em quantidade maior do que na cromatina condensada, têm a função de deslocar as ligações do DNA com as histonas que o reprimem.

Parece-nos, portanto, decididamente concordante o fato de que alguns tecidos somáticos (pelo menos nos Vertebrados e Moluscos) têm volume nuclear maior e, portanto, mais proteínas não histônicas do que a linha germinal. O fígado, de modo especial, se distingue nesse sentido; devemos lembrar que este órgão está empenhado em um metabolismo extremamente mais complexo que as demais glândulas e, portanto, seu genoma deve ter um número maior de genes ativados em interfase heterossintética.

A este propósito, uma observação na literatura sobre a distribuição das enzimas nos diferentes órgãos (tabela à página 452 e seguintes de West e Todd) nos indica grosseiramente a quantidade de enzimas diferentes nos vários tecidos dos Vertebrados. Resumimos aqui muito superficialmente esta situação, indicando que existem 13 enzimas específicas do fígado, 8 do pâncreas e 3 do rim. Estes valores estão na relação em que se encontram os volumes nucleares destes órgãos.

Tudo isto parece se dar nos Vertebrados. Nos Artrópodos, pelo contrário, como já mencionamos antes, o diferenciamento histógeno é acompanhado por um grau específico de poliploidia ou politenia, e as variações de volume dos núcleos entre os diferentes tecidos é paralela à variação do teor em DNA. Não queremos, portanto, generalizar demais o critério acima exposto da significação bioquímica do hipermegetismo no diferenciamento histógeno. Devemos, talvez, lembrar que os núcleos poliplóides dos Artrópodos têm uma grande parte de DNA sob forma de heterocromatina; é possível pensar que os genomas múltiplos não estejam todos funcionantes contemporaneamente, permitindo à totalidade das proteínas não histônicas correspondentes manifestar a sua ação ativadora somente sobre os genomas funcionantes.

Podíamos traduzir a descrição destes fenômenos em termos da genética molecular, considerando a "relação plóido-megética" como a expressão morfoquantitativa dos fatores de repressão e ativação dos genes durante a diferenciação dos tecidos somáticos.

SUMMARY

In the precedent papers of this series, we have studied the DNA content per per nucleus in the nuclear volumes in different tissues of Vertebrates and Molluscs. The present paper deals with the same problems in Ophidia.

The theoretical basis of these researches consists in facts studied by Bloch in which appears the existence of two types of interphasic growth of the nucleus (autosynthetic and heterosynthetic). In the first one, the three fundamental constitutions of the nucleus, i.e., DNA, histonic and non histonic proteins, are reduplicated. The nuclear volume follows, always, the quantitative variations of the non histonic proteins. In the second type of interphase, there is a reduplication of the non histonic proteins, only, and not of the DNA and histones. In this case, the volume of the nucleus increases without the increase of the DNA content. The comparative study of the DNA and of the nuclear volume reveals, thus, the variations of the ratio "genome non histonic proteins". These proteins have been recently considered as the factors that free the genic DNA from its bound with the histone and, thus, acting as "de-repressors", allow the DNA to synthetize the RNA, specific for the genic action.

The present research considers the ratio DNA/Volume in comparison with the spermatogenetic stages (in which the DNA and nuclear volume are always in fixed ratio), and with the somatic tissues, in which the nuclear volume can vary independently from the DNA content (heterosynthesis).

Thus, in *Crotalus* and *Philodryas*, we present here the regression line between the DNA and the nuclear volume in the spermatogenetic stages, and in some tissues (liver, pancreas, kidney, etc.). It is well evident, by these diagrams, that the somatic tissues have, all of them, characteristic nuclear volume greater than that of the spermatogonia (diploid typical cell). We call this DNA/Volume ratio, as the "plóido-megetic ratio".

We can correlate this excess of volume of the nucleus with the content in non histonic proteins, in each somatic tissue, that can explain the "de-repressing" action upon the specific gene loci.

Agradecimentos

Queremos, aqui, agradecer ao Dr. H. E. Belluomini, do Instituto Butantan, pelo fornecimento do material ofiológico.

Agradecemos, também, ao nosso colaborador Prof. Luis Alexandre Fallieri, pela revisão definitiva do texto.

TABELA I — CASCAVEL — *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti)

Tecidos	Nº	DNA		VOLUME			
		$\bar{X} \pm S$	Mo	Md	$\bar{X} \pm S$	Mo	Md
Espermátides	20	4,0 $\pm$ 0,9	4,0	4,0	3,0 $\pm$ 0,8	3,0	3,0
Espermatócitos I	34	16,0 $\pm$ 1,6	16,0	16,0	11,0 $\pm$ 2,4	12,0	11,0
Fígado	35	8,0 $\pm$ 1,2	8,0	8,0	Bimodal (encoberto)	22,0	21,0
Pâncreas	20	8,0 $\pm$ 1,0	8,0	8,0	8,0 $\pm$ 1,8	8,0	8,0
Rim	20	8,0 $\pm$ 1,5	9,0	9,0	Polimodal	11,0 — 17,0 — 23,0	18,0
Hemácias	5	6,0 —	—	—	4,0	—	—

TABELA II — PARELHEIRA — *Philodryas schottii* (Schlegel)

Tecidos	Nº	DNA			VOLUME		
		$\bar{X} \pm S$	Mo	Md	$\bar{X} \pm S$	Mo	Md
Espermátides	31	7,0 $\pm$ 0,8	6,0	6,0	6,0 $\pm$ 0,9	6,0	6,0
Espermatogônios	31	13,0 $\pm$ 1,4	14,0	13,0	9,0 $\pm$ 1,1	9,0	9,0
Espermatócitos I	31	25,0 $\pm$ 1,9	25,0	25,0	21,0 $\pm$ 2,7	17,0	16,0
Fígado	30	14,0 $\pm$ 1,6	14,0	14,0	31,0 $\pm$ 5,0	30,0	31,0
Pâncreas	41	14,0 $\pm$ 1,9	13,0	13,0	16,0 $\pm$ 3,3	17,0	16,0
Tireóide	31	10,0 $\pm$ 1,5	10,0	10,0	—	—	12,0
Supra-renal	31	16,0 $\pm$ 2,0	16,0	17,0	26,0 $\pm$ 3,8	25,0	26,0
Linfócitos	31	15,0 $\pm$ 1,7	14,0	15,0	9,0 $\pm$ 1,4	8,0	9,0
Monócitos	31	31,0 $\pm$ 3,5	32,0	32,0	23,0 $\pm$ 4,4	23,0	22,0

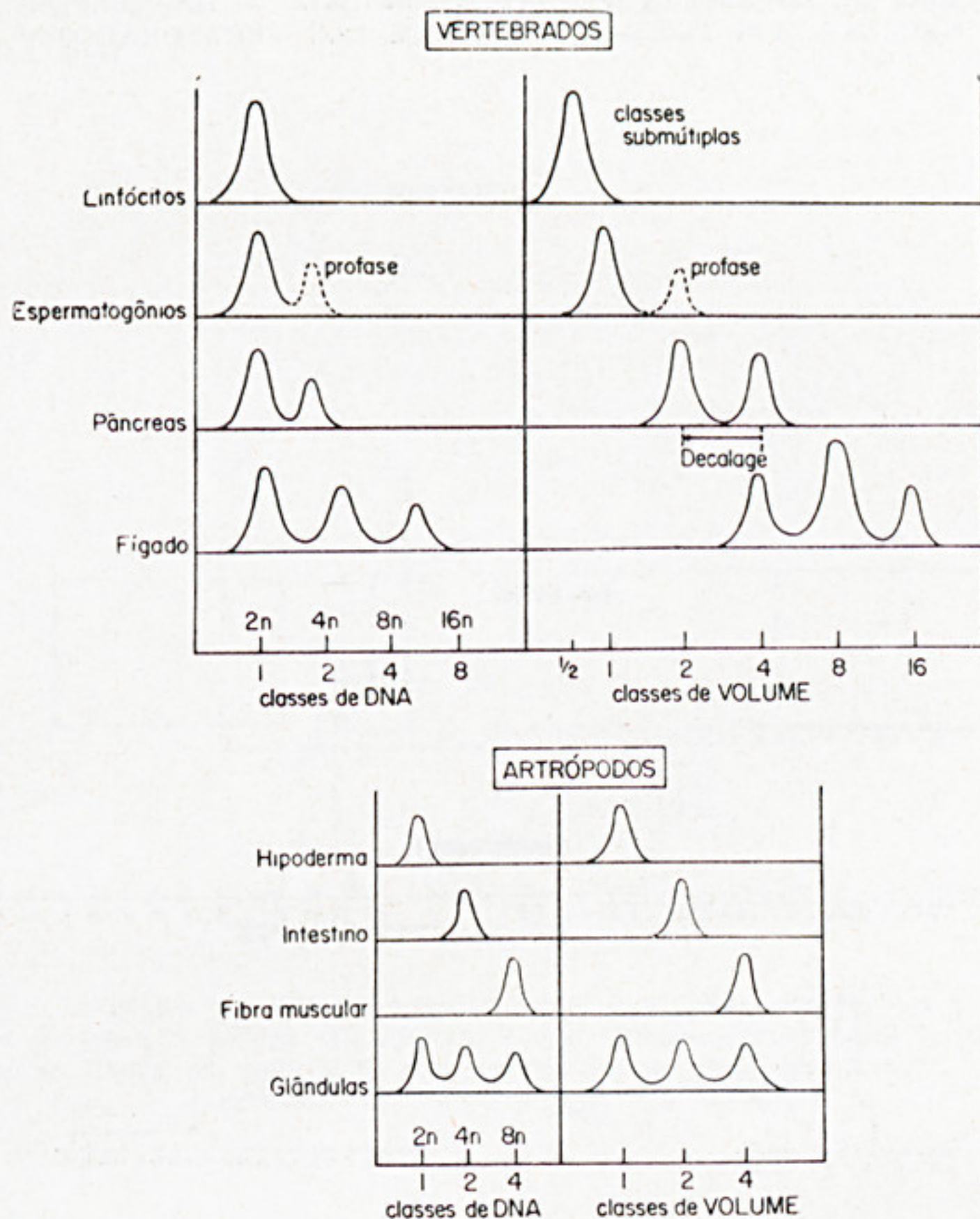


Fig. 1 — Curvas de frequência do DNA e do volume nuclear em diferentes tecidos de Vertebrados e de Artrópodos.

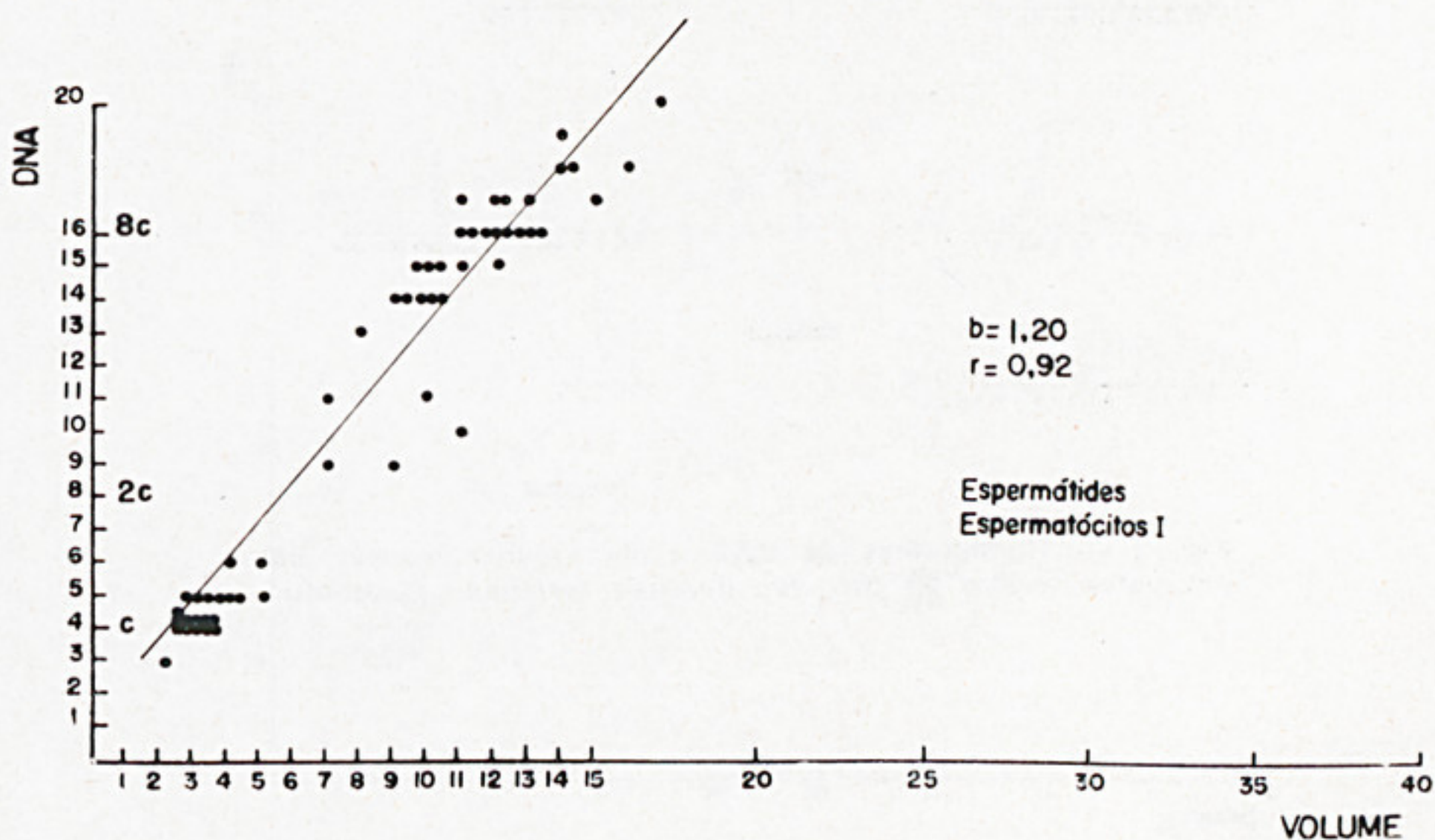


Fig. 2 — Diagrama de regressão entre DNA e volume nuclear na série espermato-genética de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti).

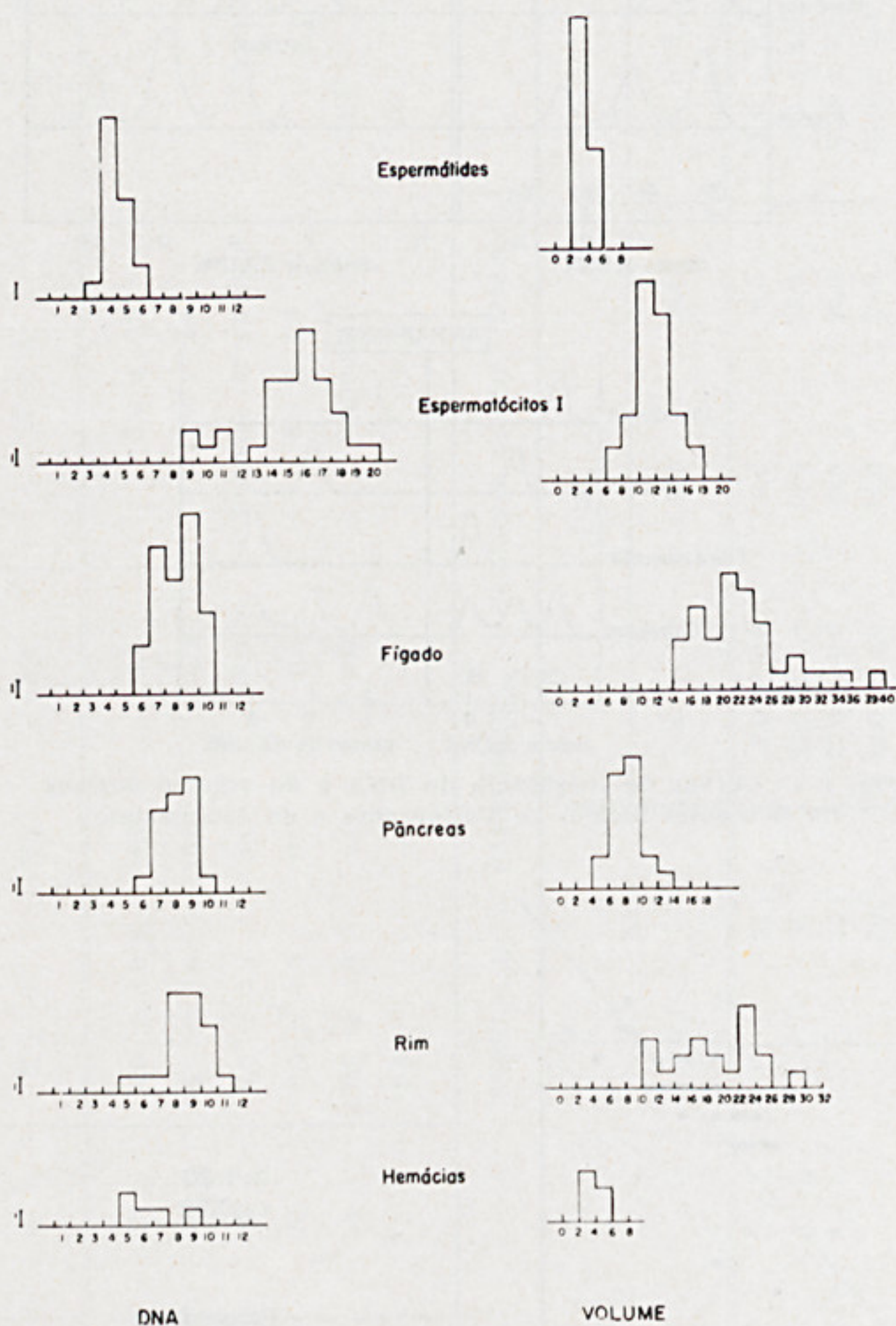


Fig. 3 — Histogramas do DNA e do volume nuclear nos diferentes tecidos de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti).

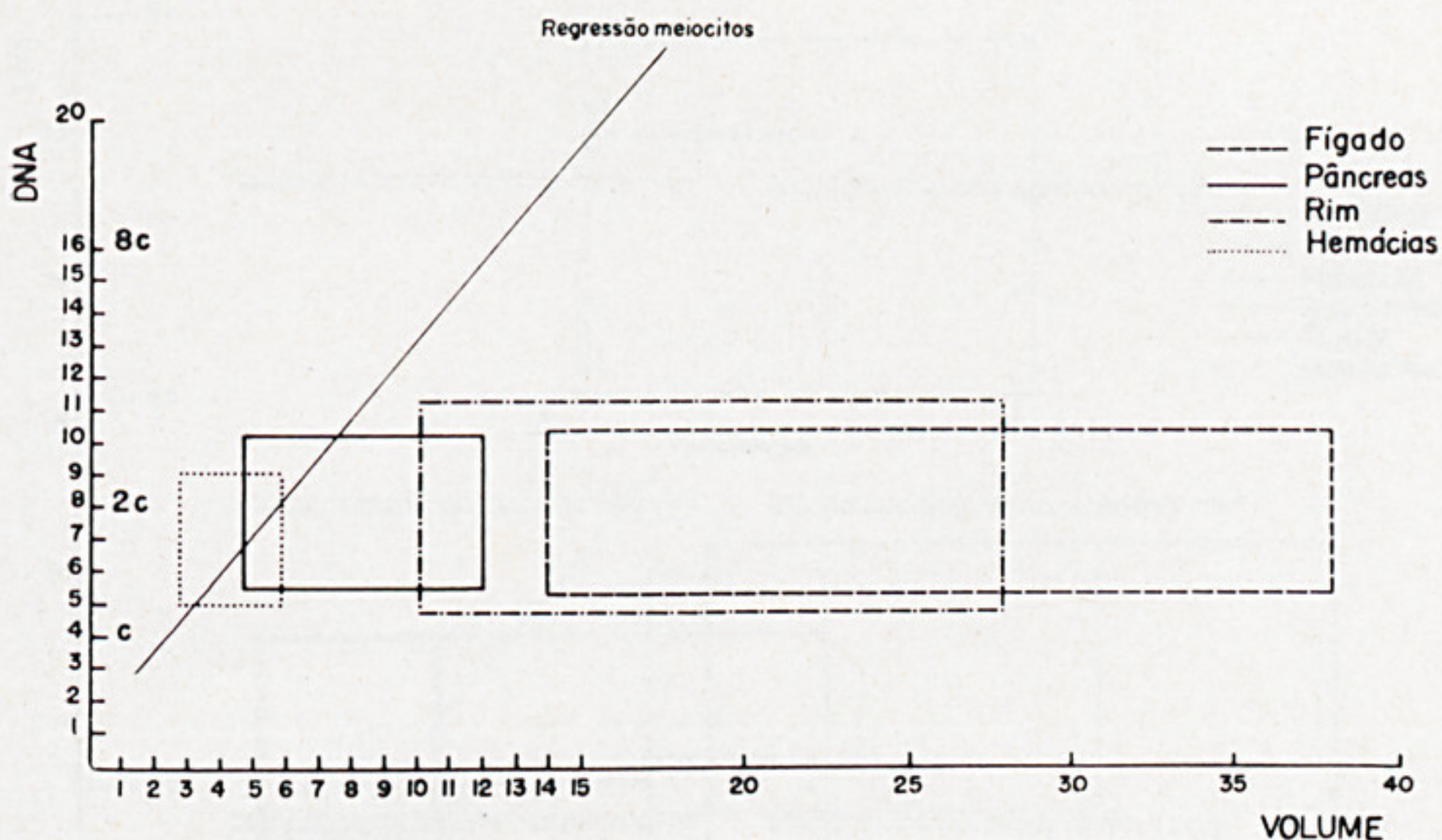


Fig. 4 — Diagrama de regressão entre DNA e volume nos tecidos somáticos de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). Cada retângulo representa a área de distribuição de todos os valores de um tecido ("área ploidomegética"). A linha de regressão representa a série dos meiócitos.

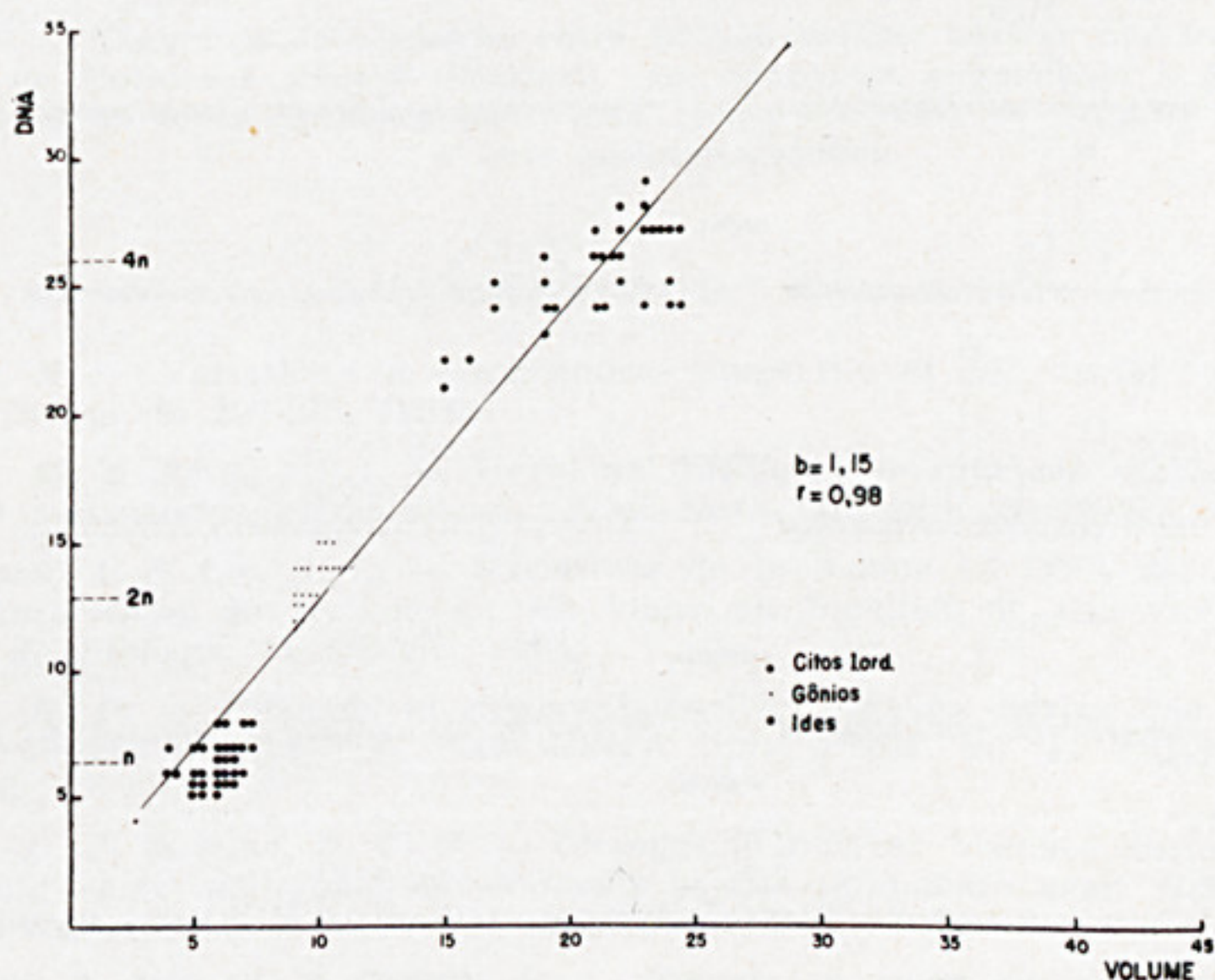


Fig. 5 — Diagrama de regressão entre DNA e volume nuclear da série espermatogênética em *Philodryas schottii* (Schlegel).

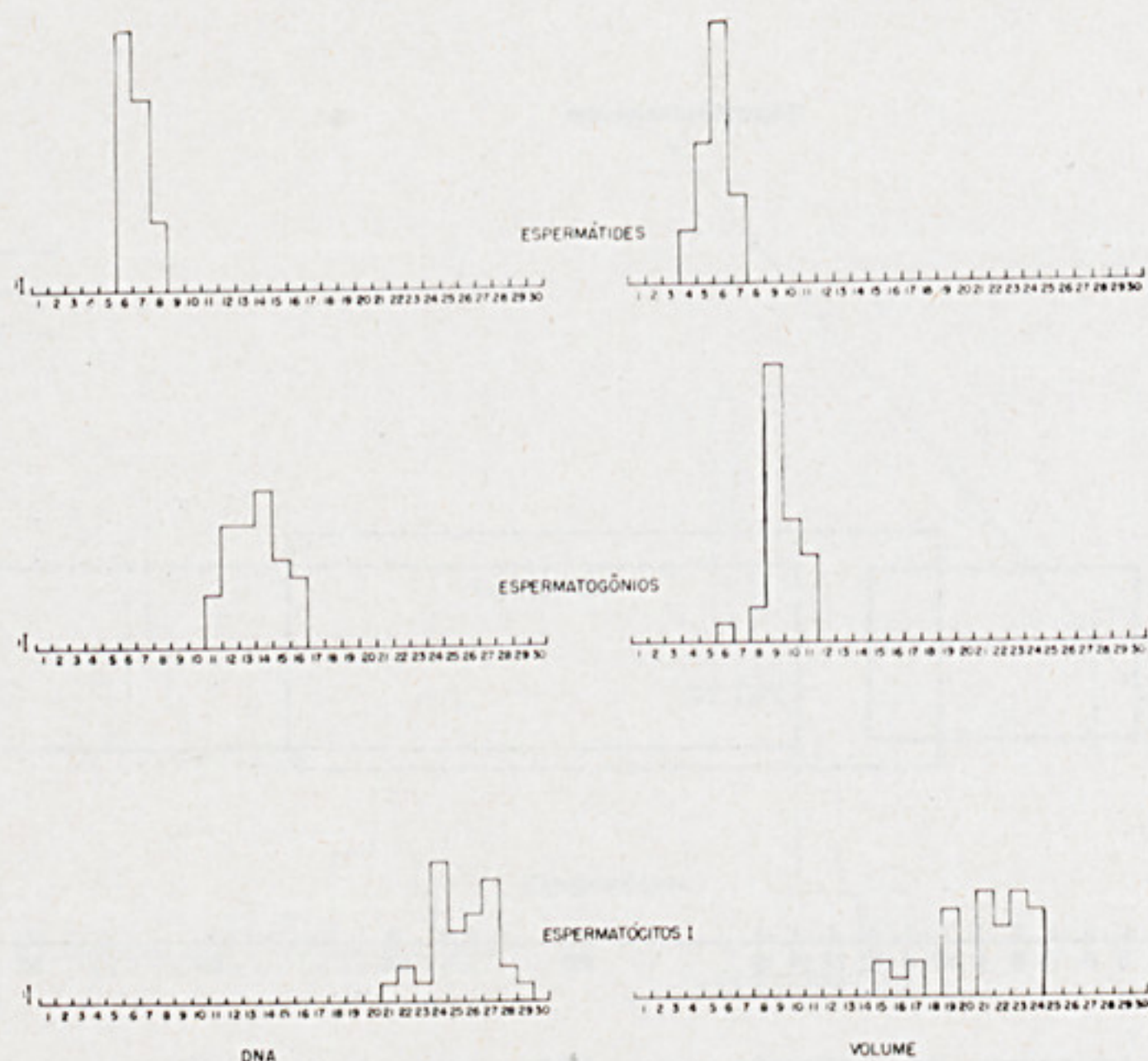


Fig. 6 — Histogramas do DNA e do volume nuclear na série espermatogênica de *Philodryas schottii* (Schlegel).

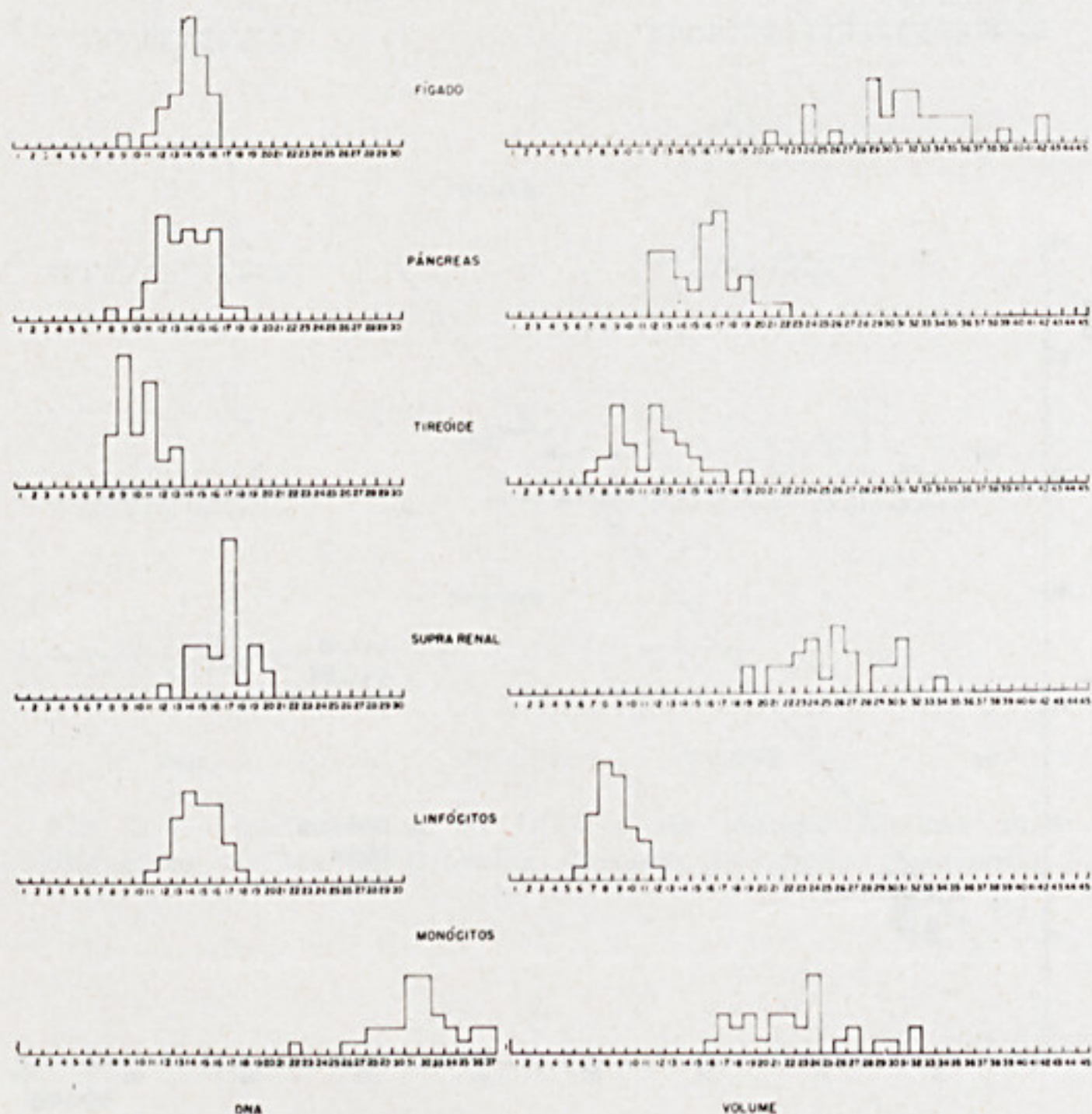


Fig. 7 — Histogramas do DNA e do volume nuclear nos tecidos somáticos de *Philodryas schottii* (Schlegel).

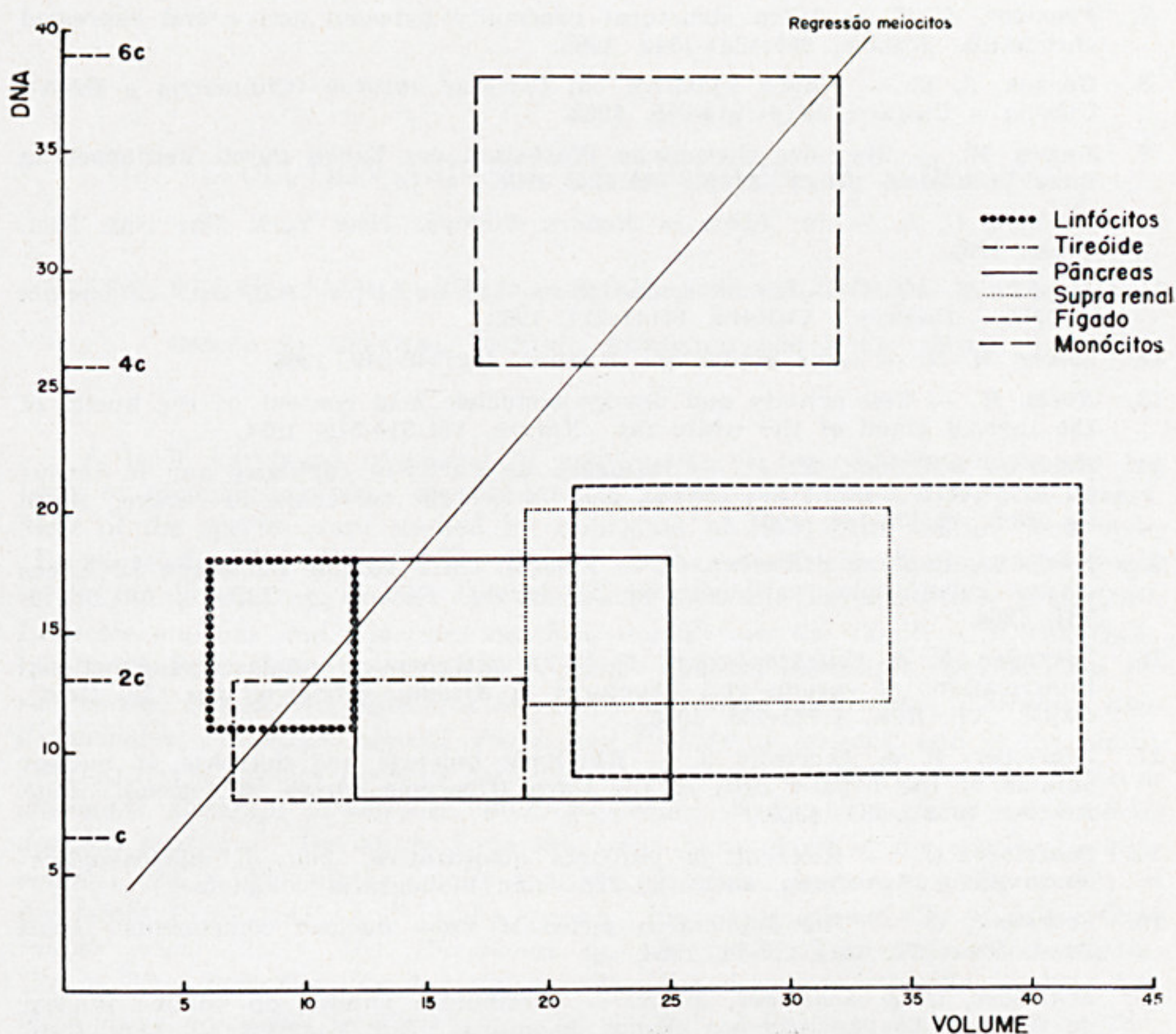


Fig. 8 — Diagrama de regressão entre DNA e volume nuclear nos tecidos somáticos de *Philodryas schottii* (Schlegel). Os retângulos representam a área de distribuição de todos os dados para cada tecido. A linha de regressão representa a série espermatogênética.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfert, M. — Variations in cytochemical properties of cell nuclei. *Exptl. Cell. Res.*, (Suppl. 6):227-235, 1958.
2. Alfert, M. & Bern, H. A. — Hormonal influence on nuclear synthesis. I, Estrogen and uterine gland nuclei. *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **37**:202-205, 1951.
3. Anteunis, A. & Liu, S. L. — Variations de la teneur en DNA des noyaux du tissu interstitiel du testicle du rat blanc en fonction de l'activité cellulaire. *Arch. de Biologie*, **71**:228-233, 1960.
4. Bloch, D. P. — Changes in desoxyribonucleic complex during the cell cycle. In: *Frontiers in Cytology*, New Haven Univ. Press, Ed. L. Palay, 1958, pp. 113-166.
5. Bloch, D. P. & Hew, H. Y. C. — Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate snail *Helix aspersa*. *J. Biophysical and Biochemical Cytology*, **8**:69-81, 1960.
6. Fautrez, J., Pisi, E. & Cavalli, G. — Teneur en acide desoxyribonucleique et volume du noyau dans le pancreas exocrine du rat. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, **88**:315-320, 1957/8.

7. Frenster, J. H. — Ultra structural continuity between active and repressed chromatin. *Nature*, **205**:1341-1342, 1965.
8. Gerken, S. E. — Ploidia somática em *Cricetus auratus* (Citometria e DNA). *Ciência e Cultura*, **14**(4):214-215, 1962.
9. Jacobj, W. — Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. *Roux' Arch.*, **106**:124, 1925.
10. Markert, C. L. — In: *Ideas in Modern Biology*. New York, The Nat. Hist. Press, 1965.
11. Melucci, N. M. B. — Ploidia somática em *Siphonops* (Anf. Ap.) (Citometria e DNA). *Ciência e Cultura*, **14**(4):214, 1962.
12. Moore, R. D. — Gene activation. *Science*, **152**:548-549, 1966.
13. Roels, H. — Cell activity and desoxyribonucleic acid content of the nuclei of the thyroid gland of the white rat. *Nature*, **174**:514-516, 1954.
14. Roels-de Schrijver, M. P. — Influence de l'activité cellulaire sur le teneur en ADN et le volume des noyaux dans la medulle surrénale du cobaye. *Arch. de Biol.*, **72**:174-184, 1961.
15. Sant'Ana, Y. X. & Schreiber, G. — Relação entre volume nuclear e DNA nas classes submúltiplas cariométricas de Jacobj. *Ciência e Cultura*, **16**(2):179-181, 1964.
16. Schrader, F. & Leuchtenberger, D. — A cytochemical analysis of functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Exptl. Cell. Res.*, **1**:421-453, 1956.
17. Schreiber, B. & Angeletti, S. — Rhythmic increase and decrease of nuclear volume of the hepatic cells of the Carp (*Cyprinus carpio* var. spec.). *Anat. Record*, **76**:431-439, 1940.
18. Schreiber, G. — Ricerche di citologia quantitativa. *Zeit. f. mikroskopisch-anatomische Forschung*, **66**(3):301-328 (com bibliografia completa).
19. Schreiber, G. — The duplication series of some nuclear components. *Anais Acad. Bras. Ci.*, **36**(1):73-84, 1964.
20. Schreiber, G. & Schreiber, M. R. — Diminuição rítmica do volume nuclear do fígado e do pâncreas nos girinos de anuros. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. Univ. de São Paulo*, **22**.º — *Zool.* **5**.º:234-264, 1941.
21. Schreiber, G. & Schreiber, M. R. — Researches on quantitative cytology. XVII. The somatic ploidy in gland tissues of Gastropods. *Rivista di Biologia*, **57**:265-310, 1964.
22. Schreiber, G., Schreiber, M. R. & Carnevalli, N. E. D. — Researches on quantitative cytology. XVIII. Somatic ploidy in the tissues of the "multifide gland" of *Vaginula taunaysii* Ferrussac. *Riv. di Istochimica Normale e Patologica* (1965 — no prelo).
23. Schreiber, G., Melucci, N. M. B., Kaiserman-Abramof, I. R. & Memória, J. M. P. — Researches on quantitative cytology. XIII. Quantitative variations of the nucleolus in secretory cells. Symposium on Cell. Secretion — Belo Horizonte, 1955- pp. 100-120.
24. Schreiber, G. & Sant'Ana, Y. X. — Volume nucleare e DNA negli epatociti di *Tilapia melanopleura* (Duméril) durante lo sviluppo postembrionale. *Acc. Naz. Lincei*, série 8, **39**:348-351, 1965.
25. Valeri, V. — Estudo da relação volume nuclear/ácido desoxyribonucleico em células normais e patológicas. Tese Fac. Med. Ribeirão Preto, U.S.P., 1962.
26. Verwoerd-Verhoef, H. L. & Verwoerd, C. D. A. — Start and progress of increase of desoxyribonucleic acid content after stimulation of cell activity. *Nature*, **193**:1208, 1962.
27. West, E. S. & Todd, W. R. — *Text book of Biochemistry*, 2nd. ed., New York, 1956.