

PESQUISAS CARIOMETRICAS NO CICLO ESTRAL E GRAVIDICO (*)

Pesquisas de citologia quantitativa: IV

POR CARLOS ALBERTO SALVATORE (**) & GIORGIO SCHREIBER (***)

(Do Laboratório de Citogenética da Secção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

a) *O problema do crescimento interfásico do núcleo*

O problema do crescimento do núcleo durante a interfase está sendo estudado por um de nós, ha alguns anos pela observação do volume nuclear nas células em atividade reprodutiva. Este problema apresenta notável interesse, pois que as variações volumétricas do núcleo, embora dependentes de um grande número de fatores físicos, fisico-químicos e químicos, está controlada pela atividade do genoma. O estudo do ritmo das variações deste volume durante a interfase pode fornecer algumas informações sobre o ritmo da duplicação do genoma ou pelo menos, sobre a variação quantitativa dos fenômenos físicos e químicos que o acompanham.

É necessário frizar que uma série de precauções de ordem teórica e técnica, têm que ser levadas em conta para um estudo desta natureza, afim de eliminar-se qualquer dúvida acerca da legitimidade dos fenômenos observados.

A primeira destas precauções é o de esclarecer-se de forma absolutamente indubitável, a relação entre o valor quantitativo do genoma (múltiplos inteiros do número de cromosomas haploides) e o volume nuclear. O estudo desta correlação foi levado a termo por vários autores e mais recentemente por

(*) Comunicado à Sociedade de Biologia de S. Paulo, sessão de 9 de dezembro de 1946.

(**) Da Clínica Ginecológica da Escola Paulista de Medicina e do Instituto Butantan.

(***) Da Escola Livre de Sociologia e Política de S. Paulo. Subvenção dos Fundos Universitários de Pesquisas.

Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1946.

Schreiber (10,12 e 13) que re-examinou o problema seguindo duas vias diferentes. Em primeiro lugar, com o estudo dos volumes nucleares em uma série de plantas de café, poliploides (22,44,66,88 cromosomas) (15): quando observadas algumas precauções técnicas no estudo cariométrico-estatístico, o volume nuclear é estritamente e diretamente correlativo ao número de cromosomas. Em segundo lugar, estudou a relação mútua entre o volume nuclear e o genoma dos núcleos da série espermatogenética. Apesar deste estudo ter sido feito sobre testículos de mamíferos e de insetos, por outros autores, Schreiber re-examinou esta correlação nos ofídios (13) tomando em conta não somente a série dos elementos meióticos mas, também o ciclo mitótico das espermatogonias, obtendo uma confirmação extremamente clara da correlação entre o volume nuclear e o valor múltiplo do genoma. Os volumes dos núcleos dos espermatócitos de 1.^a ordem, de 2.^a ordem e das espermatídias estão exatamente na relação 4: 2: 1. Nas espermatogonias, contrariamente ao que deveria ser em base ao número diploide de cromosomas, o volume (frequência máxima estatística) está constantemente a um valor triplo do valor dos núcleos haploides. A relação 1: 1,5 verificada entre os núcleos, indubitavelmente diploides dos espermatócitos de 2.^a ordem e os núcleos das espermatogonias é um fenômeno que como será exposto no curso deste trabalho, se encontra também nos núcleos em atividade mitótica das células uterinas.

Do conjunto das numerosas pesquisas cariométricas executadas nos últimos decênios pode-se concluir que o volume nuclear varia com valores descontínuos e proporcionais a uma série 1:2:4:8:16 etc. Este fenômeno está relacionado com a duplicação do genoma, que preside ao crescimento nuclear e portanto, a "ritmicidade" deste crescimento está perfeitamente explicada pela "atomicidade" da variação do genoma. Particularmente Biesele, Poyner e Painter, (1), em 1941, num estudo extensivo sobre os volumes nucleares dos tecidos neoplásticos, insistem sobre a natureza genética destas variações descontínuas do volume nuclear e, com base nas constatações do número de cromonemas e de cromosomas das células desses tecidos, frizam que nenhuma variação por embebição de água ou qualquer outro fenômeno puramente físicoquímico por si só, poderiam explicar a variação dos núcleos de valores rigidamente múltiplos e perfeitamente coincidentes com o número de cromosomas ou de cromonemas (este último verificado com o número dos "organizadores do nucleolo" e com o volume dos cromosomas, individualmente).

Em outros casos a variação volumétrica dos núcleos é proporcional a série 1:1,5:2:3:4:6:8 etc. Como foi repetidamente indicado por Schreiber, esta série, se integra perfeitamente com aquela dos múltiplos de dois, quando se considera o volume 1 como aquele dos núcleos diploides, e as variações se dão em função

dos múltiplos inteiros do valor básico haploide. Por esta razão, o estadio nos quais os núcleos têm um valor múltiplo de 1,5 foi chamado com o termo de "sesquifase". A significação teórica deste tipo de variação volumétrica do núcleo parece ser de grande interesse, pois a estrita correlação entre o volume nuclear e múltiplos do genoma estabelecidas nas numerosas pesquisas cariométricas, induz a considerar como base desta variação, o genoma haploide (Schreiber) (12).

b) *Fim das pesquisas e plano do trabalho.*

As presentes pesquisas, integradas nos problemas acima expostos, têm por fim o estudo do crescimento nuclear, aproveitando os imponentes fenômenos de crescimento do útero nas diferentes fases da vida sexual, e ao mesmo tempo utilizar os fenômenos de variação quantitativa nuclear para elucidar vários problemas do ciclo estral e gravídico relacionados a fenômenos endócrinos.

O interesse que estas pesquisas apresentam deriva também da falta quasi total de exatas noções a respeito do mecanismo do aumento quantitativo das células uterinas. No que se refere ao endométrio, existe o trabalho de O'Leary (7) em material humano, cujas conclusões nos parecem pouco evidentes, pelo fato de evidenciar mais as modificações conjuntas do citoplasma e do núcleo, do que analisar mais detalhadamente e estatisticamente os fenômenos nucleares. A mesma falta de análise estatística pode-se notar nos trabalhos de Fabris (5), Stieve (16) e Fröbose (6) sobre as células musculares do útero.

O trabalho foi levado a termo sobre os dois tecidos uterinos, endométrio e miométrio, considerando-os durante o ciclo estral, prenhez, na castração e éstro-contínuo provocado pelos hormônios no castrado.

No presente trabalho serão considerados mais pormenorizadamente os resultados do ponto de vista cariométrico e citológico, isto é, as variações fisiológicas do órgão considerados mais como meio de estudo das variações nucleares.

Em sucessivos trabalhos, serão analisados por Salvatore, os resultados mais sobre o ponto de vista fisiológico e endocrinológico, isto é, considerando os fenômenos citológicos como um meio para esclarecer vários detalhes ; problemas da fisiologia uterina.

MATERIAL E METODOS

A pesquisa foi realizada exclusivamente em ratas albinas da criação do Instituto Butantan (raça "BWB"). O estudo foi levado a termo com um rigoroso controle do ciclo vaginal, sendo cada animal sacrificado depois de tempos variados, quando apresentarem fases bem típicas do ciclo vaginal.

O material foi sempre fixado em líquido Dubosq-Brasil e incluído em parafina. Foram realizados cortes com 10 micras, coradas com hematoxilina-eosina e hematoxilina de Heidenhain. Precisamos dar alguns breves esclarecimentos no que se refere a técnica cariométrica, enviando o leitor para maiores pormenores, aos trabalhos precedentes de Schreiber (1941-46) sobre o assunto.

O fundamento do método estatístico-cariométrico, é baseado sobre a constatação de que o núcleo passa por volumes progressivamente maiores, durante o crescimento interfásico. Porém, este crescimento não se efetua com velocidades constantes, mas como foi também verificado nas culturas de tecidos por Wermel e Portugalow (17), dá-se por ciclos sucessivos de velocidade maior alternadas com retardamentos ou paradas. Numa massa homogênea de núcleos de um mesmo tecido em crescimento interfásico, os volumes alcançados serão representados por frequência tanto maiores quanto mais vagarosa é a variação do volume naquele instante do ciclo interfásico e vice-versa. As pausas de crescimento serão por conseguinte, representadas estatisticamente nas curvas de frequências dos volumes nucleares por valores modais distintos.

Esclarecida esta premissa teórica, a determinação do volume nuclear se apresenta muito simples.

Nos cortes do utero, tanto transversais como longitudinais, foram desenhados com a câmara clara, na ampliação de 1.890 diâmetros, algumas centenas (200 a 300) de núcleos de uma determinada região homogênea, seja do endométrio como do miométrio. Neste último tecido foram sempre escolhidos trechos nos quais as fibras musculares se apresentavam rigorosamente paralelas ao plano do corte, com o fim de se evitar os erros de medição consequentes à inclinação dos núcleos.

Este problema é dos mais importante nas pesquisas deste tipo, pois pode-se medir o volume de núcleos de forma mais ou menos elipsoide sómente se temos absoluta certeza da sua orientação ($v = a^2b: 1,91$), com o eixo maior "b" paralelo ao plano do desenho. Si esta condição não se verificar, é preferível, entre certos limites bastantes restritos, considerar o núcleo como esférico tendo o diâmetro, igual a média aritmetica dos dois diâmetros (maior e menor) revelados no desenho. Todavia, esta condição nunca se verifica para as fibras musculares cuja forma é sempre elipsoide muito pronunciada. No endométrio, pelo contrário, a diferença não é grande, e a medida como esferas pode ser realizada. Porém, temos que frisar que mesmo assim é preferível escolher zonas de tecido nas quais a orientação seja controlável, porque as medidas calculadas como elipsoides dão maior garantia e revelam as vezes valores modais que nas medidas como esferas passam despercebidas.

No miométrio os núcleos apresentam-se rigidamente orientados no eixo longitudinal da fibra e quando escolhido o lugar oportuno com as fibras bem orientadas a medição não apresenta dificuldade. No endométrio devemos distinguir o epitélio interno do útero e as glândulas. Nestes, os núcleos são mais arredondados, e sómente em cortes bem perpendiculares a superfície interna (Figs. 47 e 48) pode-se controlar a orientação destes núcleos, cujo maior diâmetro em geral apresenta-se em posição radial, com respeito a cavidade uterina. O mesmo se verifica nas glândulas, nos quais as células possuem os núcleos alongados segundo a direção radial do lume do canaliculo. Portanto, foram excluídas da medição todas as áreas em que a cavidade uterina aparece cortada em direção oblíqua.

Para todas as medidas foram tabelados os valores dos dois diâmetros perpendiculares, e para cada núcleo, calculado o volume. Os volumes foram sucessivamente recolhidos em classes, cujo intervalo varia caso por caso. O intervalo será indicado nas tabelas I a VI. Tratando-se de um estudo de variações de volumes, o valor absoluto não têm muita importância. Portanto, os valores volumétricos são dados sempre em unidades cúbicas calculadas pelos diâmetros em milímetros à ampliação do desenho. Em todas as medições, um milímetro corresponde a 0,53 micra.

Construídos os histogramas de frequência com estes valores volumétricos, foi determinado o valor modal aplicando a fórmula $M_0 = L + \frac{F}{F + f} \cdot i$ na qual:

L = é o limite inferior da classe modal.

F = é a frequência da classe superior a classe modal.

f = é a frequência da classe inferior a classe modal.

i = é o intervalo de classe.

A escolha do valor modal como representante da população de núcleos, deriva das considerações acima citadas, sobre a relação entre a frequência dos diferentes tamanhos alcançados no crescimento interfásico e a velocidade deste crescimento.

De particular interesse se apresentava o estudo da frequência das mitoses nos diferentes tecidos uterinos em relação as fases da fisiologia uterina. Portanto, para cada caso, foi calculado o index mitótico em % de mitoses sobre os núcleos medidos. O problema das mitoses no útero e a sua significação, será discutido nas conclusões, relacionando-as com as variações volumétricas dos núcleos. A detalhada discussão da literatura sobre este fenômeno será dada no trabalho seguinte de Salvatore.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) *Esclarecimentos gerais:*

No presente trabalho, para resumir a exposição dos resultados, damos na maioria dos casos as tabelas e os gráficos dos diferentes casos sob a forma de médias das observações de pelo menos tres casos homólogos estudados. Por exemplo, foram estudados tres animais no mesmo estádio de diestro. De cada animal foram medidos os volumes nucleares das glândulas uterinas. Obtidas as tres curvas de frequência, foi construída uma curva "média" com os valores médios (média aritmetica) das frequências de cada classe.

Portanto, denominamos "gráfico médio" aquele assim construído, ao passo que chamamos "gráfico individual" aquele original obtido com as médias de um só animal, como foi feito em certos casos. Nas tabelas serão indicados seja o número de animais de mesmo estádio juntamente agrupados, seja o número total de núcleos medidos para cada estádio (últimas colunas das tabelas I a VI).

As tabelas reúnem as indicações de cada tecido (endometrio glandular, superficial e miometrio) durante o ciclo estral e prenhez. Dentro de cada tabela, os indivíduos estão agrupados conforme as diferentes fases do ciclo estral, gravidez, castração etc. Em cada tabela foi também indicado o index mitotico.

As modas foram calculadas com as curvas médias representadas nos gráficos. As figuras 44 e 45 (tab. VIII e IX) dão uma idéia bem evidente da variação dos volumes nucleares nas diferentes fases fisiológicas uterinas. A direita, nas ordenadas do mesmo gráfico foram indicados as médias aritmeticas dos valores modais. A figura 46 representa uma esquematização das variações das curvas de frequência nas diferentes fases uterinas, ao lado da representação gráfica do crescimento interfásico das divisões nucleares.

b) *Núcleos das glândulas:*

O gráfico da Fig. 1. Representa as frequências dos volumes nucleares de três indivíduos em diestro. O histograma é unimodal, com moda a 664 e foi construído com um total de 631 núcleos. Nenhum dos três indivíduos apresenta mitoses. Este volume que é o menor dos volumes encontrados, adiante será por nós considerado como básico (moda I), e presumivelmente corresponde ao volume de um núcleo diploide.

O gráfico da Fig. 2. Representa a frequência dos volumes nucleares de três indivíduos em proestro. O histograma possui 4 modas bem distintas que não desaparecem quando duplicado o intervalo de classe. Os três indivíduos considerados separadamente possuem as mesmas 4 modas, que se sobrepõem perfeitamente no gráfico das frequências médias aqui apresentados. A primeira moda coincide mais ou menos com a do diestro, da Figura I (valor modal 738).

TABELA I
CICLO ESTRAL
Endométrio glandular

N. da figura	Fase do ciclo	Valor modal				VOLUME NUCLEAR																		N. de indi- viduos	N. total de nucleos	Média do indice mitótico			
		I	II	III	IV	350	450	550	650	750	850	950	1050	1150	1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850	1950	2050				2150	2250	
1	diestro. . . .	664				2,3	10,0	32,6	69,3	59,0	18,3	13,6	2,6	1,0	0,3												3	631	—
2	proestro . . .	738	1036	1427	2016		1,6	8,0	16,6	20,6	10,3	22,3	35,0	12,6	14,0	43,3	52,0	16,6	10,3	2,6	1,6	6,0	8,0	1,3	0,3	3	851	—	
3	estro.		901	1423	2033			2,6	3,3	4,0	4,0	19,6	18,0	18,6	22,0	52,0	69,6	16,0	8,0	1	0,3	0,6	1,3	0,3	3	725	6		
4	estro-meta- estro . . .	665	1056	1419				2,5	19,2	38,7	37,2	18,2	19,0	29,2	24,2	19,7	36,0	49,2	8,7	3,2	0,2					4	1223	1,8	
5	metaestro. . .	653				6,5	17,2	56,5	97,0	64,2	13,7	4,7	1,2													4	1045	—	
6	castrado . . .	683				5	7	15	100	77	10	3														1	227	—	
7	estro-contínuo			1420	1971								1	9,0	28,0	59,0	85,5	15,0	8,0	0,5	1	3	2,5	1,5		2	429	—	
8	post-estro contínuo. .		1039	1429	2000				3,5	3,5	8	17,0	31,0	17,5	32,0	52,0	57,5	22,0	7,5	0,5	—	0,5	1,5	—		2	528	0,75	

18-579

FIG. 1



FIG. 2

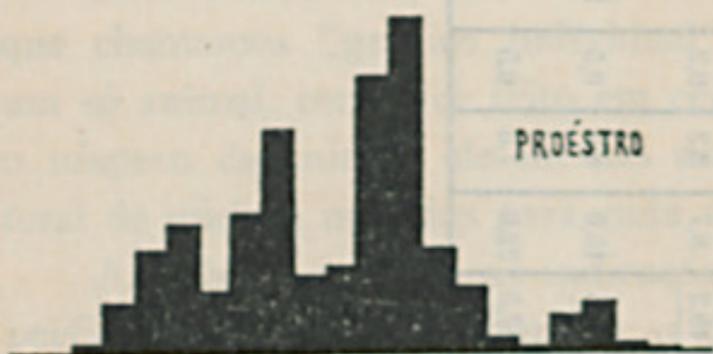


FIG. 3

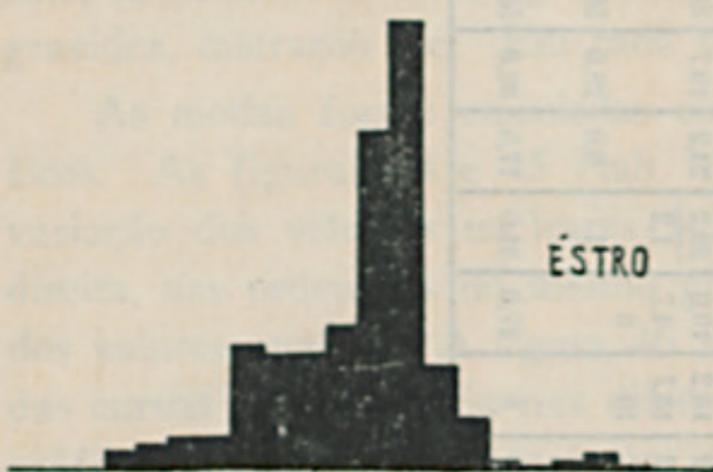
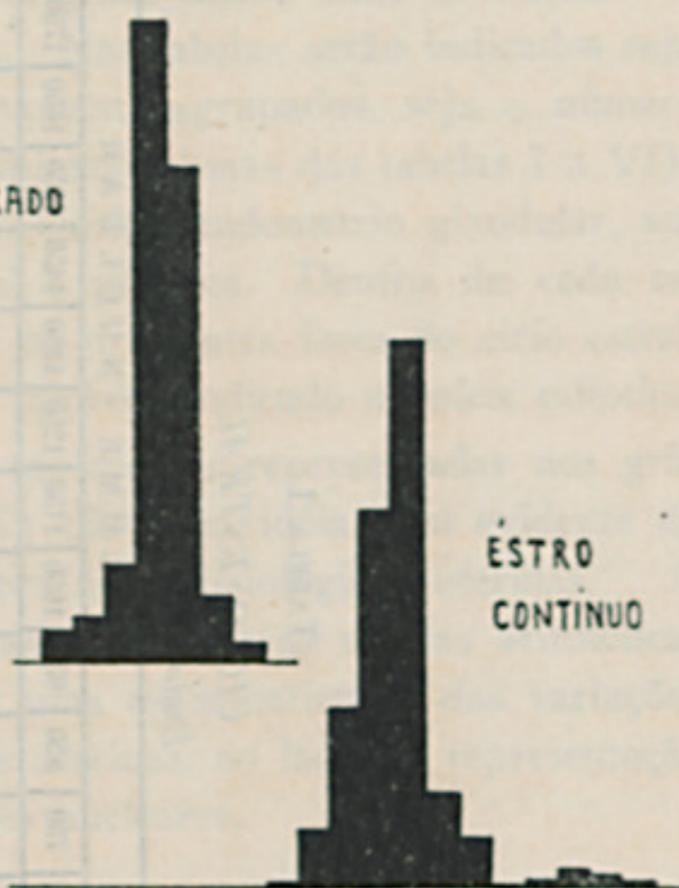
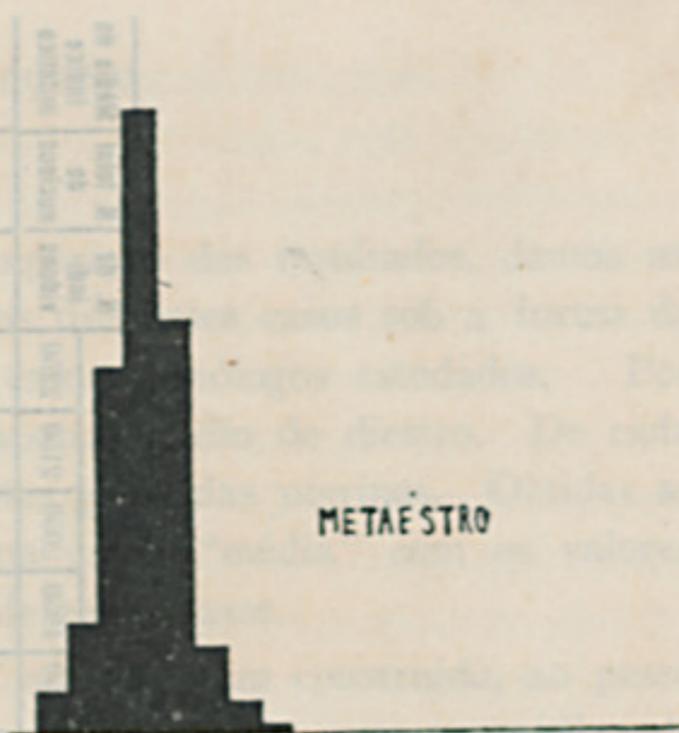


FIG. 4



25 45 65 85 105 125 145 165 185 205 225

25 45 65 85 105 125 145 165 185 205 225

FIG. 1-8
 Frequências dos volumes nucleares nas células glandulares uterinas.

A segunda moda é mais ou menos a um valor 1,5 maior do que a primeira (1036), e a terceira moda apresenta um valor duplo da primeira (1427). Uma IV moda é ligeiramente evidente a 2017.

Não foram encontradas mitoses, mas é evidente que os núcleos estão em crescimento interfásico, alcançando o volume duplo na grande maioria, e alguns até três vezes o volume da classe modal inicial (2017). Inicia-se nesta fase a infiltração leucocitária no conjuntivo uterino, fenômeno este, que será analisado mais pormenorizadamente no trabalho sucessivo de Salvatore.

O gráfico da Figura 3. Apresentam as frequências de três indivíduos em éstro. O histograma mostra uma moda III a 1423, como valor fundamental, e outras modas secundárias correspondentes a II (981) e IV (2033) do histograma do proéstro. Isto significa que a máxima quantidade de núcleos alcança nesta fase o valor duplo do valor básico (I). Nesta fase aparecem mitoses (3,6%) e além disso, grande infiltração leucocitária e picnose nuclear. A curva foi construída com 3 indivíduos, em um total de 861 núcleos.

O Gráfico da Fig. 4. Representa a situação volumétrica durante o breve período entre o fim do éstro e o início do metaéstro ("éstro-metaéstro"). É bastante difícil encontrar esta fase de transição, que nos foi possível obter em 4 indivíduos cujo exame vaginal foi efetuado de duas em duas horas, em lugar de 24 horas como de costume.

O histograma é muito interessante pois apresenta bem nitidas as três modas que já foram encontradas no proéstro, com a diferença que tendo se verificado muitas divisões mitóticas, a moda I está aumentada em comparação com as outras. Os valores são respectivamente 665, 1056 e 1419. Nesta fase encontra-se ainda grande infiltração leucocitária que invade até o lumen das glândulas, mitoses e várias células com núcleo picnotico e detritos cromáticos no lumen glândular. A curva foi construída com 4 indivíduos, com um total de 1223 núcleos.

O gráfico da fig. 5. Mostra a variabilidade dos volumes nucleares na fase de metaéstro (4 indivíduos; 1045 núcleos). O quadro que se apresenta é absolutamente demonstrativo pois encontram-se somente núcleos pequenos da moda I como no diéstro.

A histologia do utero nesta fase é tipicamente de repouso, desaparecendo totalmente os leucocitos e faltando completamente as mitoses. É evidente que este quadro é determinado pela falta total de crescimento interfásico em todos os núcleos de volume básico produzido nas mitoses do éstro. O desaparecimento dos núcleos grandes da Fig. 4, é devido em parte a dimidiação dos mesmos e, em parte, provavelmente aos fenômenos cariолiticos do éstro e éstro-metaéstro.

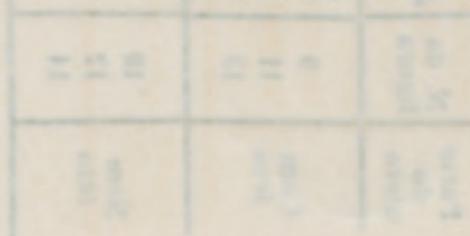
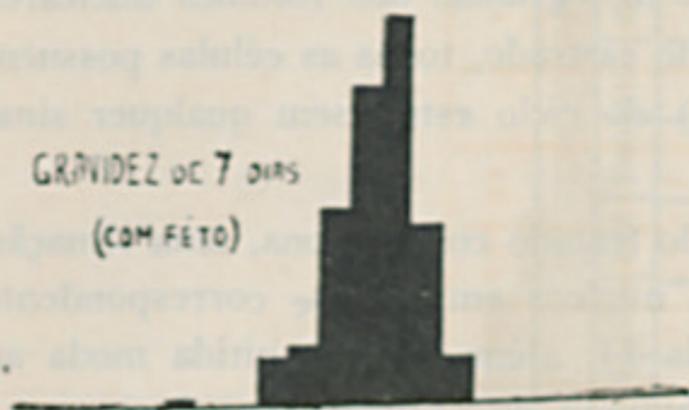


TABELA II
 PRENHEZ
 Endométrio glandular

Parte do utero	N. da figura	Dias de gravidez	Valor modal				VOLUME NUCLEAR																				N. de indivíduos	N. total de nucleos	Média do índice mitótico		
			I	II	III	IV	350	450	550	650	750	850	950	1050	1150	1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850	1950	2050	2150	2250					
Com feto	9	7			1435																								2	392	—
	11	13-14	686	1026	1439																								2	371	—
	13	20-21			1430	2002																							3	741	1,9
Sem feto	10	7			1437																								2	344	—
	12	13-14	686	978	1427																								2	396	—
	14	20-21			1426	1980																							3	725	1,7

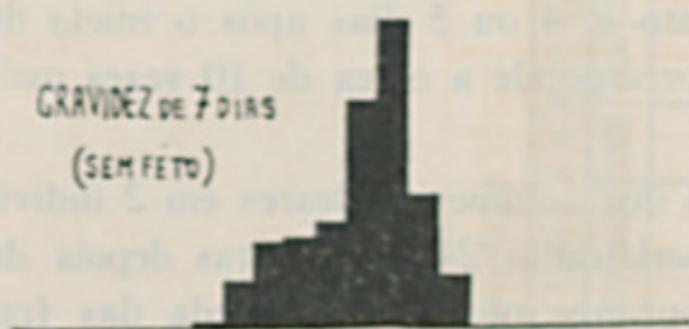
GRAVIDEZ DE 7 DIAS
(COM FÊTO)

FIG. 9



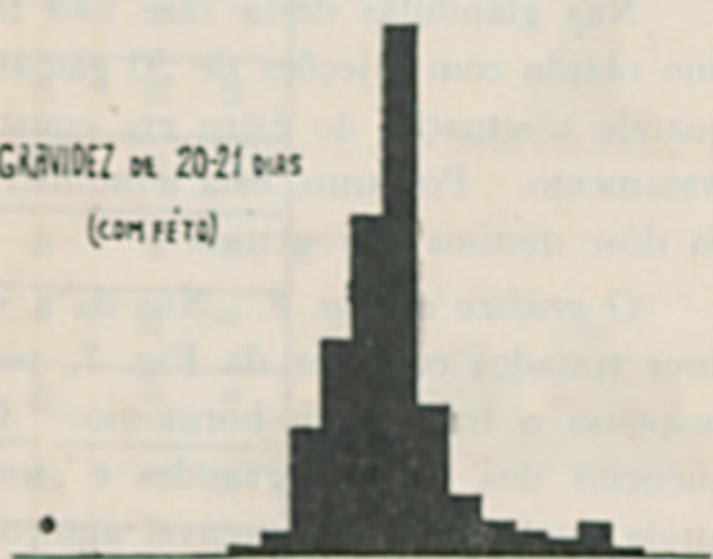
GRAVIDEZ DE 7 DIAS
(SEM FÊTO)

FIG. 10



GRAVIDEZ DE 20-21 DIAS
(COM FÊTO)

FIG. 13



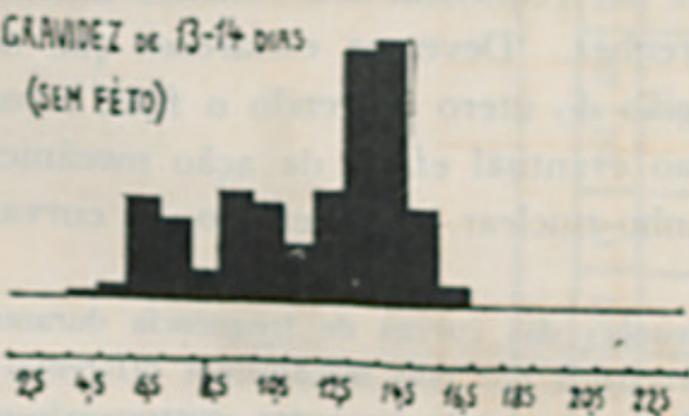
GRAVIDEZ DE 13-14 DIAS
(COM FÊTO)

FIG. 11



GRAVIDEZ DE 13-14 DIAS
(SEM FÊTO)

FIG. 12



GRAVIDEZ DE 20-21 DIAS
(SEM FÊTO)

FIG. 14

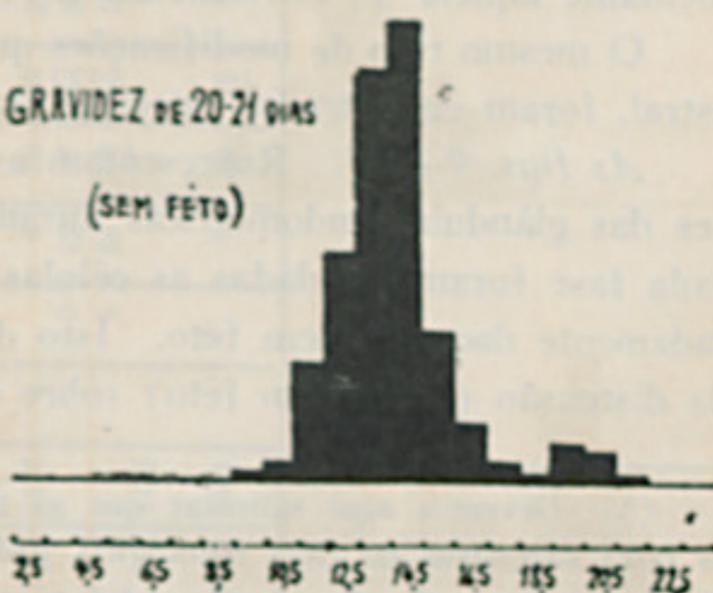


FIG. 9-14

Frequências dos volumes nucleares nas células glandulares uterinas.

Além das diferentes fases do ciclo estral em condições fisiológicas foram estudados alguns indivíduos castrados e outros, também castrados, mas tratados com estrona.

Os gráficos da Fig. 6 e 7. Mostram os histogramas dos volumes nucleares nestas duas situações. A fig. 6 mostra que no castrado, todas as células possuem tamanho pequeno igual ao da moda I (683) do ciclo estral sem qualquer sinal de atividade reprodutiva.

A fig. 7, pelo contrário indica no castrado tratado com estrona, uma situação igual àquela do éstro com a totalidade dos núcleos em volume correspondente a moda III (1420) (volume duplo da moda I), além de uma nitida moda ao valor triplo do volume básico (I) (1971), embora de pequena frequência.

Nas glândulas desta fase não foram encontradas mitoses. O éstro contínuo obtido com injeções de 50 gamas de estrona diárias, e o animal sacrificado quando a situação do éstro era constante, isto é, 4 ou 5 dias após o início do tratamento. Portanto, esta administração corresponde a cerca de 10 vezes mais da dose mínima estrogênica.

O gráfico da fig. 8. Nos dá a situação dos volumes nucleares em 2 indivíduos tratados como os da Fig. 7, porém sacrificados 24 e 48 horas depois de suspenso o tratamento hormonal. O histograma mostra uma queda das frequências dos núcleos grandes e aumento dos de classes inferiores, com uma nitida moda II, e um notável aumento, embora não suficiente para determinar uma verdadeira moda, na região da moda I. Observa-se também a existência de um certo número de mitoses, apresentando esta situação mais ou menos semelhante àquela do éstro-metaéstro (*).

O mesmo tipo de modificações que encontramos até agora nas fases do ciclo estral, foram encontradas no ciclo gravídico.

As figs. 9 a 14. Representam as curvas de frequência dos volumes nucleares das glândulas endométricas durante a prenhez. Devemos esclarecer que de cada fase foram estudadas as células da região do útero contendo o feto, separadamente daquelas sem feto. Isto devido ao eventual efeito da ação mecânica da distensão (parte com feto) sobre o tamanho nuclear. Entretanto, as curvas

(*) Devemos aqui salientar que as transformações das curvas de frequência durante as fases sucessivas do ciclo fisiológico, pode ser produzida por dois mecanismos diferentes: 1) A transformação de um tipo celular corresponde a uma moda em outra, correspondente a outra moda. 2) A proliferação diferencial de dois ou mais tipos de células correspondentes às modas diferentes e contemporaneamente existentes no tecido, desde o início em quantidades diferentes. A falta total de núcleos de tamanho III no diéstro, metaéstro e castrado, e de tamanho I no éstro-contínuo indica o primeiro dos dois mecanismos aqui considerados, isto é, a transformação direta das células pequenas nas grandes. (Este fenômeno, já foi salientado por Schreiber desde 1940).

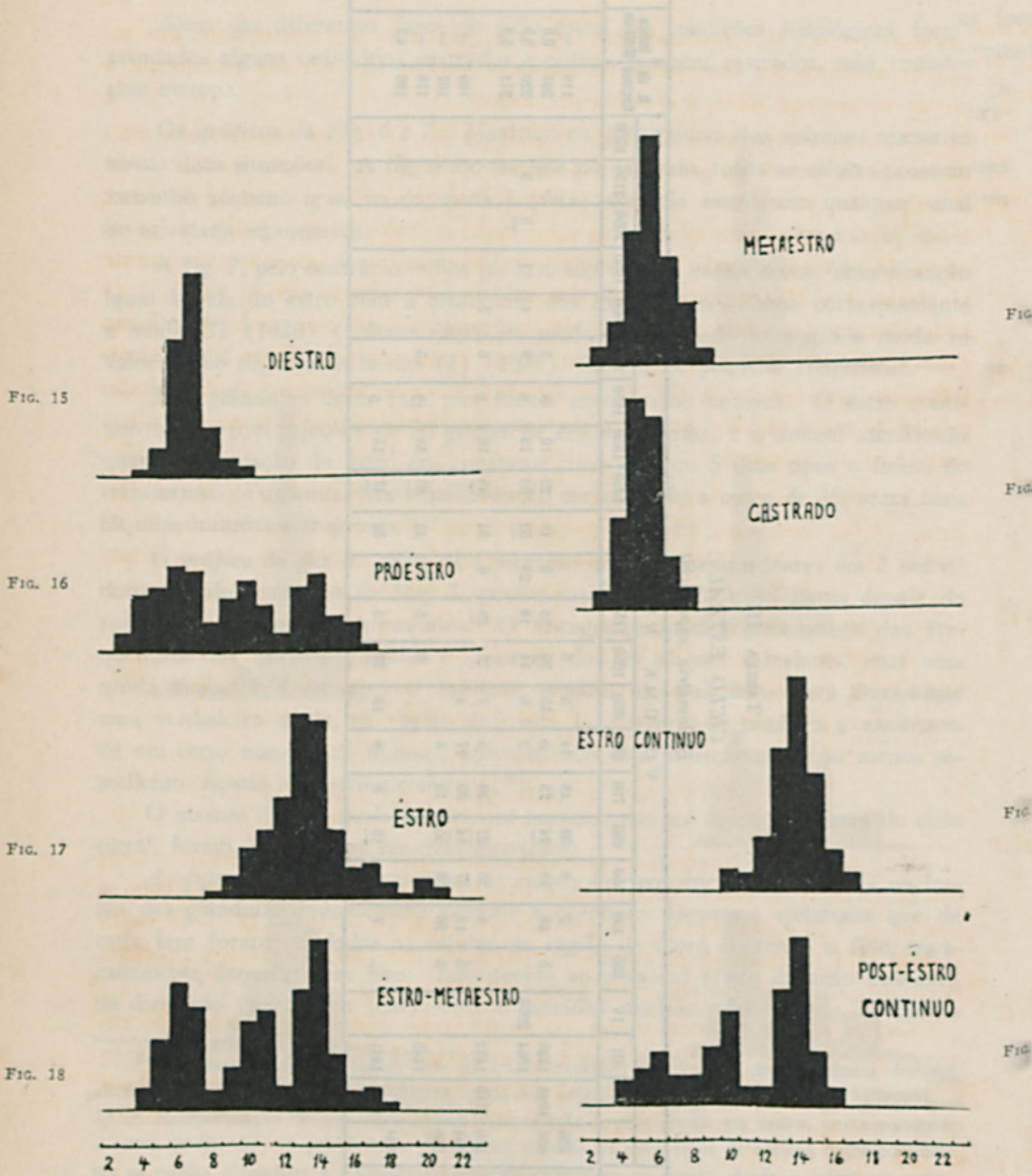


FIG. 15-22
Frequências dos volumes nucleares nas células do endométrio superficial.

das duas regiões são absolutamente idênticas, indicando por conseguinte, que todas as modificações observadas no tamanho nuclear são devidas puramente a efeitos endócrinos sobre o crescimento nuclear. ê

O exame comparativo das Figs. 9 e 10 e Figs. 11-12 nos mostram que mais ou menos na metade da gravidez, têm-se uma alteração da situação nuclear. Até o sétimo dia, existe uma situação perfeitamente parecida com aquela do éstro, tendo praticamente uma só moda ao valor duplo do valor básico (1437), ao passo que a 13-14 dias, a moda III diminui consideravelmente e aparecem novamente as modas I e II (respectivamente dos valores volumétricos 686 e 1026). O aparecimento dos núcleos menores simultaneamente com uma onda de mitoses (index mitótico 1,9%) nos faz pensar a um fenômeno semelhante a um éstro-metaéstro, análogo ao da fig. 4. A significação deste fenômeno de reprodução celular do útero da rata durante a prenhez, será também discutida nos trabalhos sucessivos de Salvatore.

Ao termo da prenhez, o quadro apresenta-se semelhante ao do éstro (figuras 13-14) com uma absoluta preponderância dos núcleos de volume duplo (moda III) (1426 e 1480) e pequena quantidade de núcleos de volume triplo (moda IV) mais ou menos 2000). Podemos portanto, pensar que houve crescimento interfásico das células pequenas formadas nas mitoses do 13-14 dias.

A pureza das curvas do ciclo estral nas fases finais, parece dar uma indicação certa que as variações efetuam-se na totalidade dos núcleos e, que a sincronia dos ciclos mitóticos destes núcleos é praticamente perfeita.

c) Núcleos do endométrio superficial.

Os gráficos que representam este tecido são todos construídos com os valores das frequências de únicos indivíduos, e não como nos casos precedentes, com as médias de 3 ou 4 indivíduos. Os gráficos das Figs. 15 — 16 — 17 — 18 — 19 (tabela III) representam as curvas de frequência nas fases de diéstro, proéstro, éstro, éstro-metaéstro e metaéstro respectivamente.

Os fenômenos observados são totalmente iguais àqueles dos núcleos do endométrio glândular. O diéstro tem uma só moda (I) ao valor 726 o que é ligeiramente mais alto de todos os valores modais deste estadio em outros casos. O proéstro apresenta três nitidas modas (I, II, III) aos valores respectivamente de 656, 1046 e 1435.

O éstro tem uma moda (III) predominante a 1364 e uma menor a 2075 (IV). Na região da moda II a curva denota uma ligeira assimetria que poderia ser uma moda II encoberta. Neste estadio são frequentes as mitoses com um index de 3,5%.

TABELA IV
 PRENHEZ
 Endométrio superficial

Parte do útero	N. da figura	Dias de gravidez	Valor modal				VOLUME NUCLEAR																				N. de Nucleos	Indice Mitotico	Infiltração leucocitária			
			I	II	III	IV	350	450	550	650	750	850	950	1050	1150	1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850	1950	2050	2150	2250				2350		
Com feto	23	7		1061	1432							4	10	20	16	20	42	60	20	5										197	—	—
	25	13	657	1050	1431	1933	2	3	9	23	12	10	10	19	10	13	31	40	14	10	2	2	6	1				217	4,3	+		
	27	20			1444	1937									5	12	30	74	24	24	13	5	10	3				200	—	+		
Sem feto	24	7			1437								5	10	10	24	38	55	23	7								172	—	—		
	26	13	654	1037	1430	1900		2	5	15	6	8	10	25	6	14	28	35	12	7	5	1	3				182	3,1	++			
	28	20			1443	1966									2	10	26	62	60	13	8	1	5	2			149	1,7	+			



FIG. 23



FIG. 24



FIG. 25

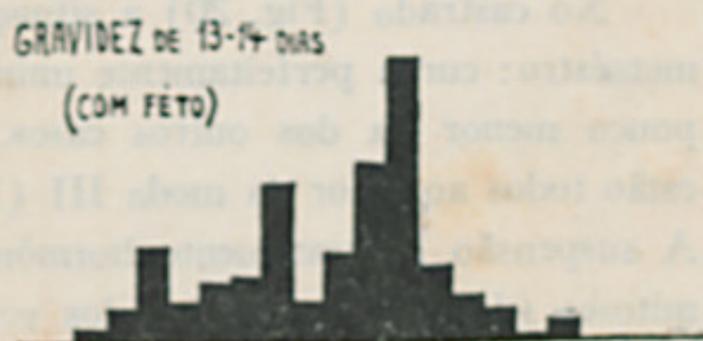


FIG. 26

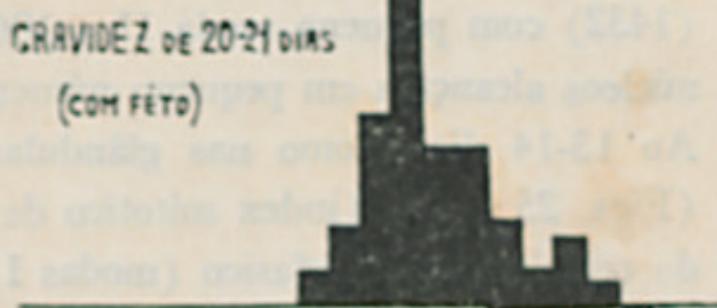


FIG. 27

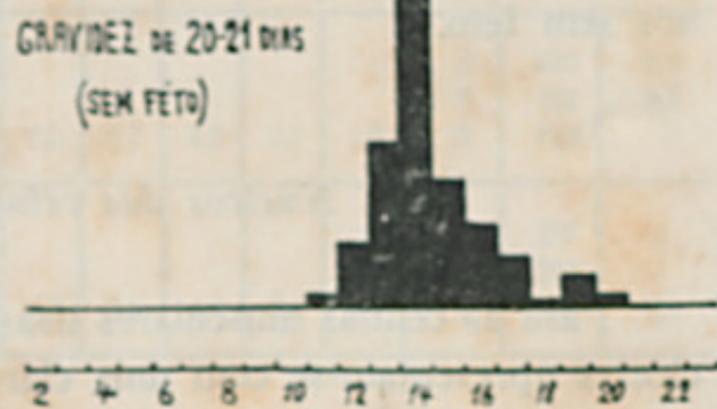


FIG. 28

FIG. 24-28

Frequências dos volumes nucleares nas células do endométrio superficial.

No éstro-metaéstro reaparecem as modas e e II bem nitidas, respectivamente aos valores de 659 e 1119, e uma moda III a 1432. As mitoses alcançam a maior percentagem verificada, isto é, 5,3%, o que explica claramente o reaparecimento dos valores modais pequenos. No metaéstro volta a situação de repouso com uma curva regular unimodal I a 644 e falta totalmente as mitoses. Os núcleos deste tecido durante o diéstro e éstro, estão representados nas Figs 47 e 48.

No castrado (Fig. 20) a situação é perfeitamente igual ao do diéstro e do metaéstro: curva perfeitamente unimodal (I) (568). Esta moda porém, é um pouco menor da dos outros casos. No éstro-contínuo (Fig. 21) os núcleos estão todos ao valor da moda III (1445) exatamente como no éstro fisiológico. A suspensão do tratamento hormônico faz aparecer um abundante número de mitoses (4,7%) e as modas dos volumes inferiores (modas I e II, respectivamente 644 e 1023) (Fig. 22).

Na gravidez (tabela IV) os gráficos das figs. 23 e 24 mostram que nos primeiros dias, os núcleos estão predominantemente no volume da moda III (1432) com pequena moda II a 1061. Ao fim da gravidez (Figs. 27 e 28) os núcleos alcançam em pequeno número os valores da moda III como no começo. Ao 13-14 dias, como nas glândulas, também aqui, aparecem o ciclo mitótico (Figs. 25 e 26) (index mitótico de 3,4%), e toda a série de valores nucleares do crescimento interfásico (modas I — II — III).

Como já salientamos para o endometrio glândular, as medidas e as respectivas variações são perfeitamente iguais nos segmento uterinos com feto como nos sem feto.

d) *Núcleos das células musculares do miométrio.*

Para as células musculares lisas do miométrio, também as modificações nucleares apresentam-se com uma clareza notável que evidencia fenômenos de ordem multiplicativos tanto mitóticos como endomitóticos.

As fases do ciclo estral são representadas pelas Figs. 29 a 32 (tabela V) nos quais observa-se que possuem valores modais do volume nuclear bem nitidas e diferentes. Assim, na Fig. 29 a curva de frequência (média de três indivíduos) do diéstro têm uma moda única de valor que chamamos "básico" (I) (424). No proéstro (Fig. 30) aparecem as modas II (626), III (863) e IV (1168), que nos indicam que os núcleos alcançaram os valores volumétricos de 1,5, 2 e 3 vezes aquele do diéstro.

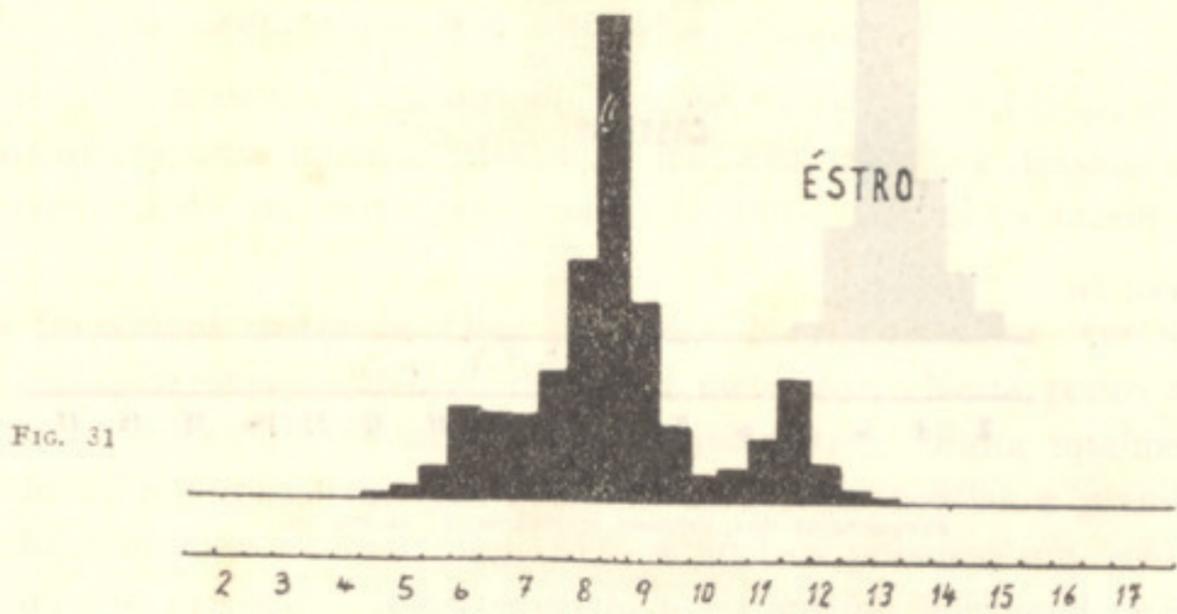
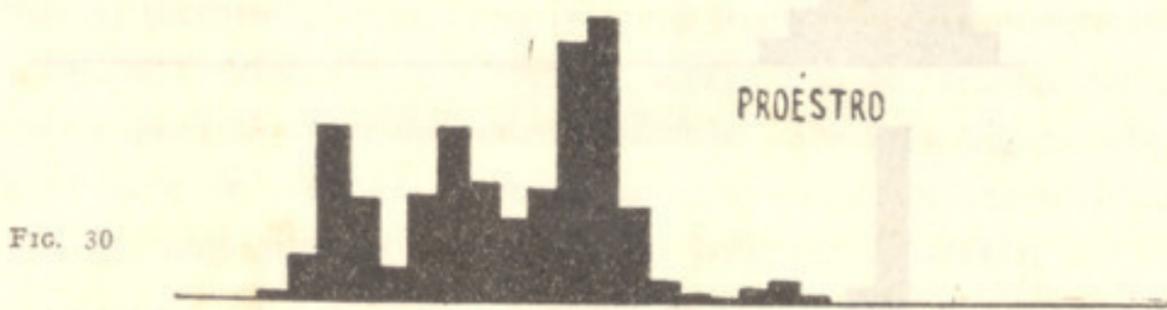


FIG. 29-31
Frequências dos volumes nucleares do miométrio..

Revista Brasileira de Genética
Vol. 1, No. 1, 1958

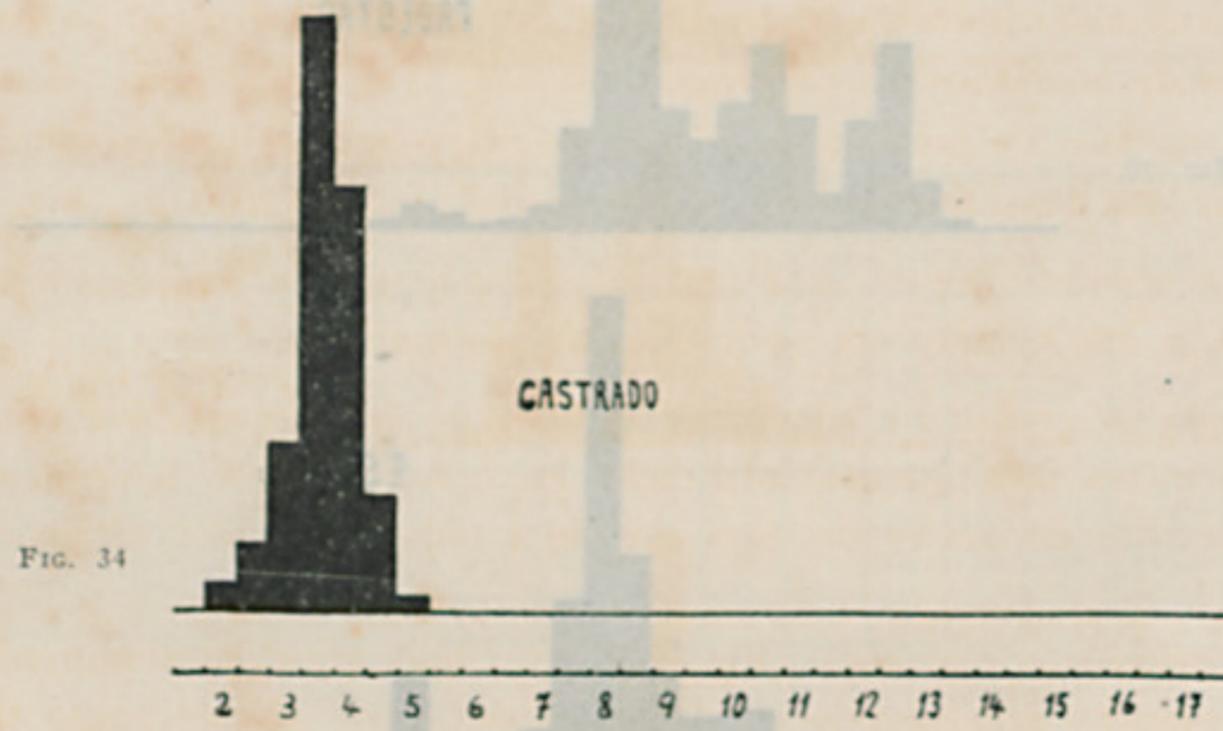


FIG. 32-34
Frequências dos volumes nucleares do miométrio..

Na fase de éstro (Fig. 31) o volume nitidamente predominante é o da moda III, isto é, duplo volume do diéstro (860). Existe ainda uma moda II ao valor 1,5 (626) vezes básico, mas de uma frequência inferior àquela do estádio precedente. Embora extremamente raras existem nesta fase algumas mitoses.

No éstro-metaéstro, Fig. 32 diminuem as frequências das modas superiores e reaparecem os núcleos pequenos do valor inicial (moda I) (388) que no éstro faltam por completo.

No metaéstro (Fig. 33) sómente encontram-se estes valores pequenos exatamente como no diéstro e, desaparecem totalmente os núcleos médios e grandes.

Éstas transformações das curvas de frequência são com toda probabilidade devida a um *efetivo ciclo interfásico* seguido por uma divisão. Embora as mitoses sejam muito raras, elas existem. Lembramos que em geral as mitoses no miométrio do utero foram demonstradas durante o ciclo estral por meio do acúmulo das metafases pela ação da colchicina, e normalmente elas se encontram muito raramente.

A existência de uma verdadeira multiplicação das células musculares do utero é ainda assunto discutido na literatura. Não queremos entrar nesta discussão, mas as modificações quantitativas dos núcleos perfeitamente múltiplas de um valor inicial (rítmicas), só podem indicar, como foi frizado na introdução, uma *atividade multiplicativa do genoma nuclear*. De fato, alguns núcleos, especialmente na fase de prenhez se encontram no volume 4 vezes o inicial, indicando com isto, uma situação octoploide ou politenicos (1600).

O que acontece depois, seja uma divisão mitótica ou stenótica ou uma degeneração, é um assunto que será estudado futuramente.

Iniciada no proéstro e adquirindo o acme no éstro, verifica-se entre as células musculares uma intensa infiltração leucocitaria. Este fenômeno, porém, não é específico do miométrio, mas comum a todos os tecidos uterinos.

Nos indivíduos castrados (Fig. 34), as fibras musculares têm núcleos de tamanho pequeno igual àquele do diéstro e metaéstro. Neste ponto também o miométrio se comporta exatamente como o endométrio. Falta totalmente qualquer atividade multiplicativa, com ausência de formas médias e grandes. No castrado injetado com estrona (Fig. 35) os núcleos possuem um volume duplo do castrado não injetado. Interrompendo o tratamento hormonal, aparecem as outras modas como no éstro-metaéstro (Fig. 36) (tabela V).

Na prenhez de 7 dias (Figs. 37-38) (tabela VI), os núcleos apresentam 1,5 e 2 vezes o inicial (moda I e II) sendo o valor dois, o predominante.

ESTRO-CONTINUO

FIG. 35



POST-ESTRO CONTINUO

FIG. 36



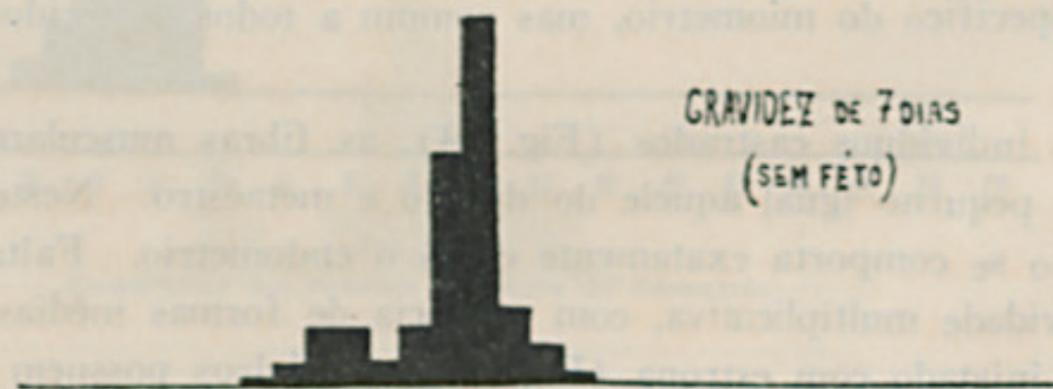
GRAVIDEZ DE 7 DIAS (COM FÊTO)

FIG. 37



GRAVIDEZ DE 7 DIAS (SEM FÊTO)

FIG. 38



2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

FIG. 35-38

Frequências dos volumes nucleares do miométrio..

É importante lembrar que nas nossas pesquisas, o volume nuclear é absolutamente independente do efeito da distensão mecânica provida pela presença do embrião embora as experiências de Reynolds (9) no coelho demonstrem um efeito hiperplástico.

Aos 13-14 dias (Fig. 39) reaparecem os núcleos pequenos da moda I e os da moda II aumentam de frequência, correspondendo a uma situação de éstro-metaéstro. Como no endométrio, também aqui parece haver um ciclo mitótico neste período da gravidez. Apresentamos nas Figs. 51 e 52 duas micro-fotografias de células musculares em mitoses. A diminuição relativa das frequências dos núcleos grandes e a presença de mitoses apesar de rara nos induz a insistir sobre esta interpretação.

No 20º dia de prenhez (Figs. 41 e 42) o quadro cariométrico apresenta-se muito interessante: desaparecem por completo os núcleos pequenos e predominam os de tamanho duplo. Aumentam os de tamanho 3 (moda IV) e aparece uma pequena quantidade de núcleos de tamanho 4 e até 6 vezes o inicial (moda V — octoploides ?):

Salientamos ainda que nas células musculares como nas epiteliais do endométrio, o aumento ritmico do núcleo efetua-se por pulos de 1,5 vezes o inicial ("sesquifase"), e é conveniente lembrar que este fenômeno aparece claramente tanto nos núcleos quasi esféricos das células epiteliais, como nos núcleos fortemente elipsoides do miométrio. Portanto, qualquer dúvida sobre a sua natureza devido a fatores técnicos não têm fundamento.

d) *O volume da profase.*

No problema do crescimento interfásico do núcleo, o volume alcançado pelo núcleo no momento da profase é particularmente interessante, pois representa o fim deste crescimento.

As profases nos tecidos como o epitelial monoestratificado do endométrio apresentam-se com orientação variável, e a sua medida como elipsoide de rotação é sujeita a erros muito evidentes. Além disso, o estado de embibição do núcleo profásico parece maior do que o núcleo interfásico representando um fator de alteração da relação volume nuclear e por consequente, o valor do genoma.

Apesar destas dificuldades, aproveitamos um número bastante grande de profases observadas em certos estádios do ciclo estral e na gravidez, suficientes para se fazer um ensaio da variabilidade estatística destes núcleos. Estas medições estão resumidas na tabela VII e no gráfico da Fig. 43.

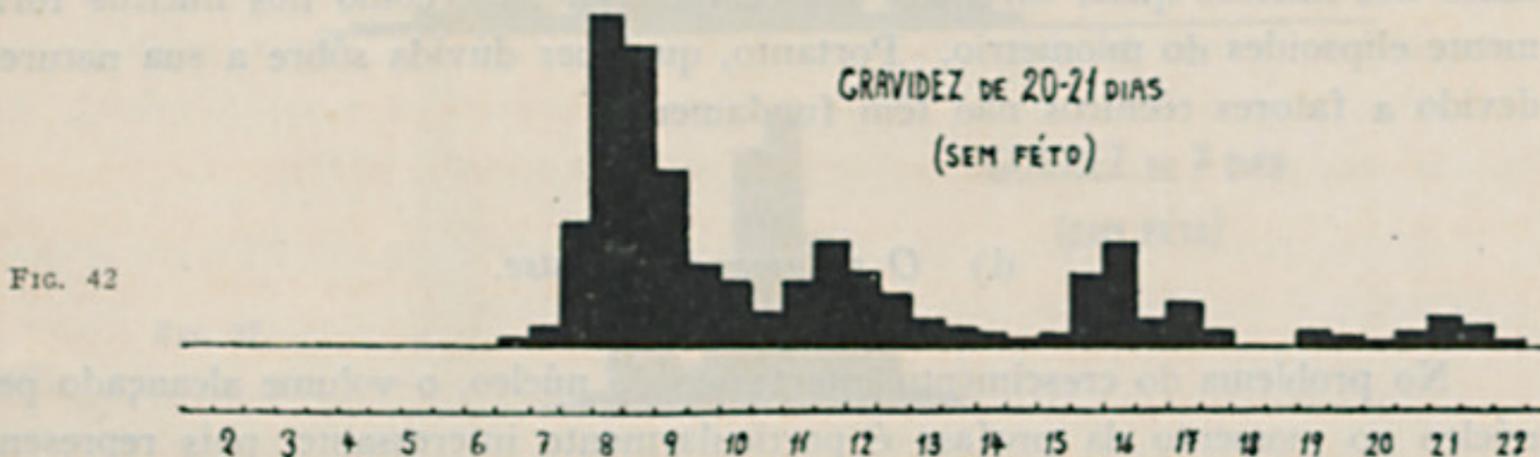
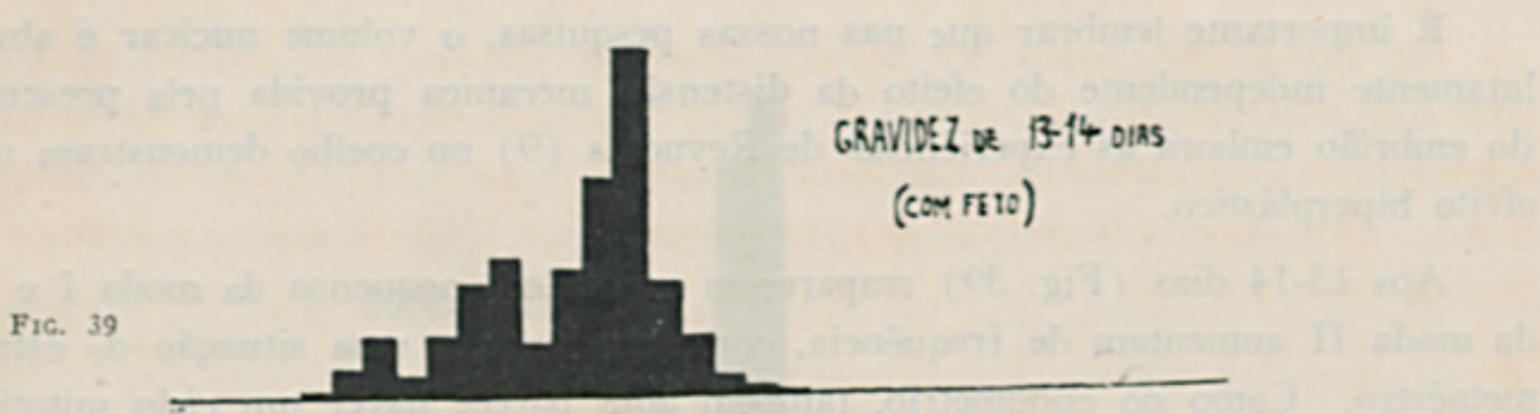


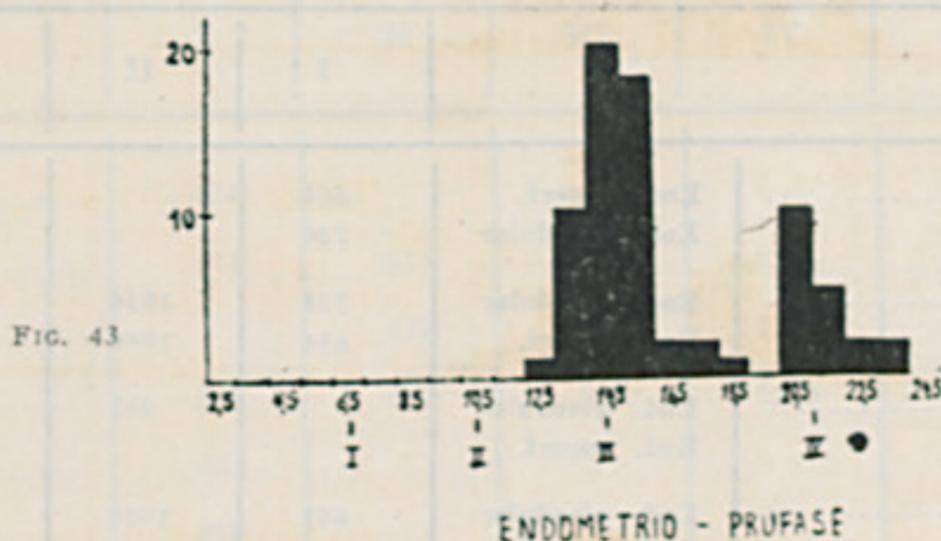
FIG. 39-42

Frequências dos volumes nucleares do miométrio..

Embora, baseado sobre um número pequeno de medidas, nos parece bastante evidente o agrupamento dos valores volumétricos das profases ao redor dos mesmos volumes modais dos núcleos interfásicos, isto é, das modas III e IV. Este fato provavelmente indica que os valores deduzidos da curva das profases possuem certo valor interpretativo.

A moda III, de todas as curvas aqui analisadas, têm um volume duplo do volume que consideramos como o "básico" (moda I). Logo, o fato das profases terem em sua maioria o volume duplo do básico, fortalece a suposição de que houve uma duplicação do genoma na passagem do volume da moda I até III.

De outro lado, temos um certo número de profases ao volume mais ou menos de 2100 ou seja da moda IV. O interesse que estas profases apresentam é possuírem o volume duplo da moda II, isto é, daquela definida como "sesqui-fase". Isto poderia significar que no processo de multiplicação do genoma a profase pode aparecer ou ao volume duplo ou aquele triplo do genoma diploide.



Temos já esclarecido que o valor em redor de 1050 (moda II) não representa uma categoria de núcleos diferentes dos outros, e que tomaria a liderança de uma moda em certas fases do ciclo estral substituindo outros de outras modas, mas representa uma real fase de transição dos núcleos da moda e no seu crescimento interfásico. Tudo isto aparece claro no exame comparativo das diferentes curvas onde faltam por total os núcleos da moda II, isto é, nas fases do ciclo onde não há crescimento interfásico (castrado, di e metaéstro).

Destas observações podemos deduzir que os núcleos correspondentes a um volume de genoma hexaploide (ou seja três vezes o do volume básico diploide) podem se dividir iniciando uma profase regular, e não temos razões para duvidar que os produtos destas divisões sejam os núcleos de volume de moda II (1,5 o volume básico).

Este fenômeno pode explicar o aparecimento dos núcleos da moda II nas fases de transição (éstro-metaéstro, post-éstro provocado etc), mas não temos elementos para excluir que estas modas II sejam também produzidas por núcleos dos ciclos interfásicos normais que se recomeçam nestas situações do ciclo estral. Estas possibilidades foram indicadas no diagrama esquemático da Fig. 44 com os trechos pontilhados.

A possibilidade de ciclos mitóticos em núcleos de tamanho múltiplo dispar do volume básico, foi discutida por Schreiber (12) e invocado para explicar a diminuição de volume ritmico por etapas de 1,5 vezes, no fígado dos anuros durante o desenvolvimento larval.

Parece-nos que os fenômenos aqui observados possam dar maior valor a esta explicação, a qual falta, ainda devemos portanto admitir uma verificação citológica em termos de cromosomas ou de cromômas.

TABELA VII

ENDOMÉTRIO

(valores modais)

		I	II	III	IV
Diéstro	End. superf.	664			
	End. glandular	726			
Proéstro	End. glandular	738	1036	1427	2017
	End. superf.	656	1046	1435	
Éstro	End. glandular		981	1423	2033
	End. superf.			1364	2075
Éstro-metaéstro	End. glandular	665	1056	1419	
	End. superf.	659	1119	1432	
Metaéstro	End. glandular	653			
	End. superf.	644			
Castrado	End. glandular	683			
	End. superf.	568			
Éstro contínuo	End. glandular			1420	1971
	End. superf.			1445	
Post-éstro contínuo	End. glandular		1039	1429	2000
	End. superf.	644	1023	1431	
Gravidez 7 dias e com feto	End. glandular		1061	1435	
	End. superf.			1432	
Gravidez 7 dias e sem feto	End. glandular			1437	
	End. superf.			1437	
Gravidez 13 dias e com feto	End. glandular	686	1026	1439	
	End. superf.	657	1050	1431	1933
Gravidez 13 dias e sem feto	End. glandular	686	978	1427	
	End. superf.	654	1037	1430	1900
Gravidez 21 dias e com feto	End. glandular			1430	2002
	End. superf.			1444	1937
Gravidez 21 dias e sem feto	End. glandular			1426	1980
	End. superf.			1443	1966
Média dos valores modais		665,5	1037,6	1428	1983
Profases				1460	2100

TABELA VIII
MIOMÉTRIO
(valores modais)

	I	II	III	IV	V	VI
Diéstro	424					
Proéstro	432	626	863	1168		
Éstro		637	872	1168		
Éstro-metaéstro	388	670	867	1130		
Metaéstro	423					
Castrado	387					
Éstro contínuo		678	857	1120		
Post-éstro contínuo	388	636	868	1128		
Gravidez 7 dias c/ feto		664	869			
Gravidez 7 dias s/ feto		660	862			
Gravidez 13 dias c/ feto	462	665	867			
Gravidez 13 dias s/ feto	458	628	870			
Gravidez 21 dias c/ feto			863	1182	1572	2245
Gravidez 21 dias s/ feto			835	1176	1612	2131
Médias das modais	420	651.5	863	1152	1592	2188

TABELA IX
ENDOMÉTRIO
Frequência dos volumes das Profases

1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850	1950	2050	2150	2250	2550
1	10	20	18	2	2	1	—	10	5	2	2

ENDOMETRIO

○ SUPERFICIE
△ GLANDULAS

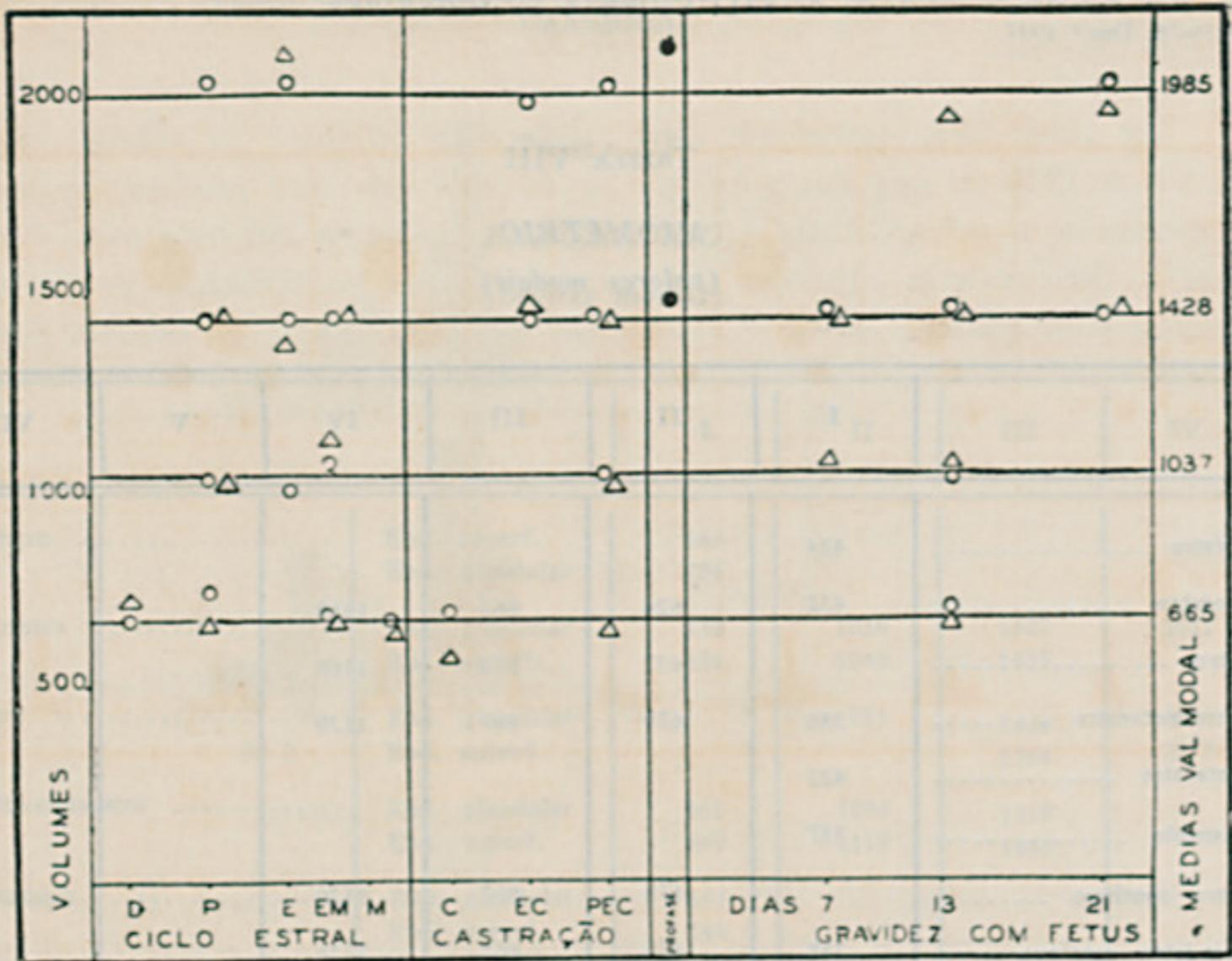


FIG. 44

MIOMETRIO

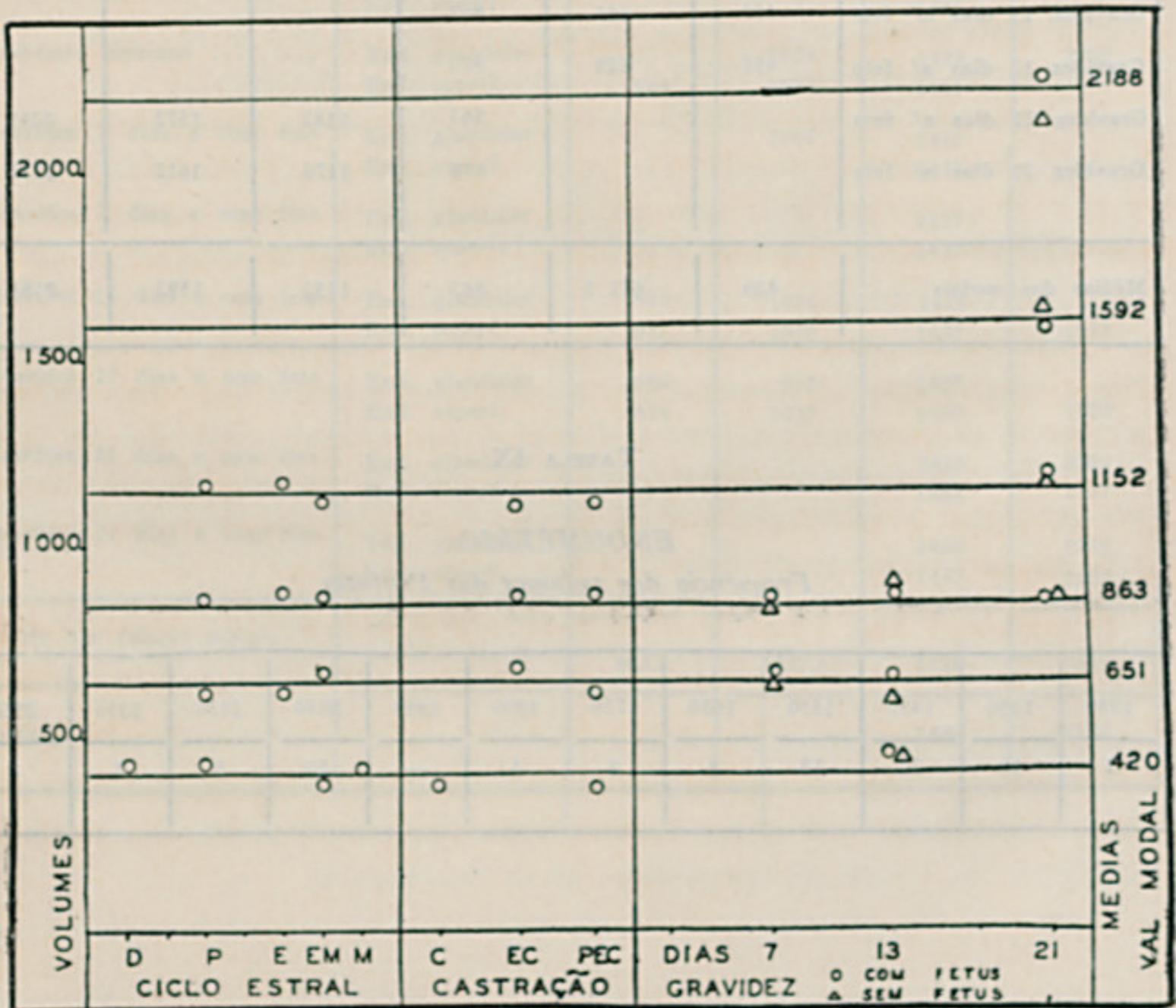
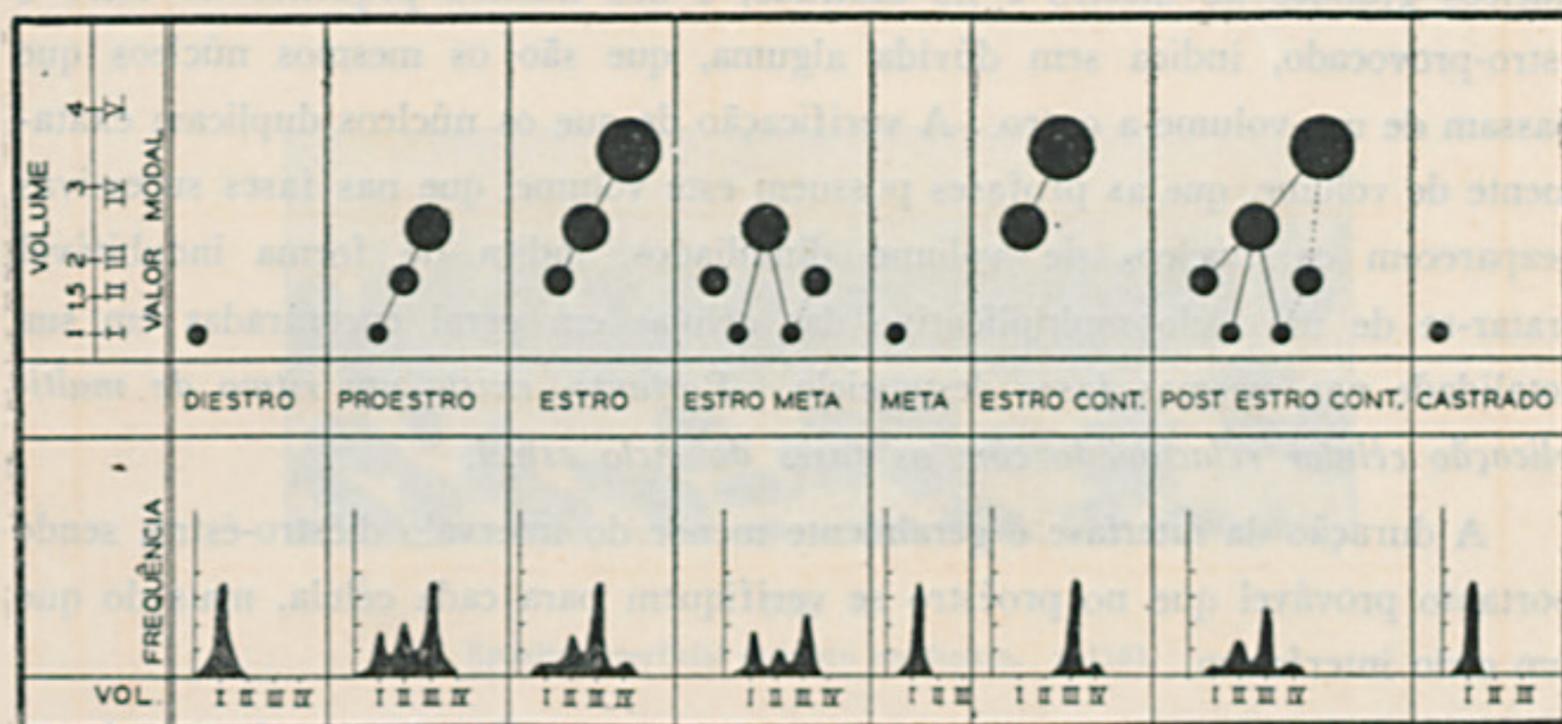


FIG. 45



O VOLUME NUCLEAR NAS FASES FISIOLÓGICAS DO ÚTERO

FIG. 46

Esquema das modificações das curvas de frequência dos volumes nucleares e dos correspondentes crescimentos interfásicos.

4) CONCLUSÕES

a) Conclusões citológicas.

As variações do volume nuclear constatadas nas presentes pesquisas nos permitem tirar algumas conclusões que esclarecem vários problemas tanto no que se refere ao ritmo do crescimento nuclear por si mesmo, como no que se refere a participação da multiplicação celular nas variações fisiológicas do útero.

Do ponto de vista *citológico* evidenciaremos em primeiro lugar, que as variações de tamanho nuclear dos tecidos uterinos são todas tipicamente "rítmicas", isto é, proporcionais a um valor básico. Pelo que se conhece, com base ao conjunto de pesquisas cariométricas, significa que estas variações de volume nuclear *efetua-se por fenômenos de multiplicação do genoma nuclear*, e não por fenômenos assim chamados "tróficos" ou de embibição.

O fenômeno mais típico desta variação é a duplicação do volume nuclear em *todos os núcleos sincronicamente* na passagem de diestro ao éstro. Este fato, como foi repetidamente esclarecido é um fenômeno de crescimento dos mesmos núcleos e não um efeito "estatístico" de predominância de classes de volume diferente em momentos sucessivos do ciclo estral. A falta total de

núcleos grandes no diéstro e no castrado, e dos núcleos pequenos no éstro e éstro-provocado, indica sem dúvida alguma, que são os mesmos núcleos que passam de um volume a outro. A verificação de que os núcleos duplicam exatamente de volume, que as profases possuem este volume, que nas fases sucessivas reaparecem os núcleos de volume dimidiados, indica de forma indubitável tratar-se de um ciclo multiplicativo das células em geral encontradas em sua totalidade nas mesmas fases deste ciclo. *Portanto, existe um ritmo de multiplicação celular relacionado com as fases do ciclo estral.*

A duração da interfase é geralmente menor do intervalo diéstro-éstro, sendo portanto provável que no proéstro se verifiquem para cada célula, mais do que um ciclo interfásico.

O resultado, é o aparecimento de todos os estádios do crescimento interfásico e, as fases nas quais o crescimento é mais vagaroso são aquelas que apresentam os máximos de frequência, ou seja as modas I, II e III.

Nas fases extremas do ciclo estral (diéstro e éstro) os núcleos param respectivamente aos volumes das modas I e III. Evidentemente no diéstro e metaéstro existem condições que não permitem o crescimento interfásico e os núcleos depois de divididos na fase precedente não iniciam outra interfase acumulando-se ao volume I. No éstro, pelo contrário, todos ou quasi a totalidade dos núcleos, acabado o crescimento interfásico alinham-se sincronizados ao volume duplo (moda eII). No éstro fisiológico e experimental, e na gravidez é possível o crescimento interfásico além do intervalo de duplicação normal aparecendo por consequente, as modas IV e V que provavelmente representam núcleos éxa e octoploides.

Na passagem do éstro para o metaéstro dá-se algo que permite o aparecimento das mitoses e por consequente voltam a aparecer os volumes inferiores das etapas do crescimento interfásico.

Outro fenômeno que aparece claramente nestas pesquisas é a assim chamada "sesquifase". As variações "ritmicas" do volume nuclear realizam-se por etapas proporcionais aos valores 1: 1,5: 2: 3: 4: 6: 8 etc., isto é, com valores proporcionais ao volume do núcleo haploide considerado como unidade de duplicação.

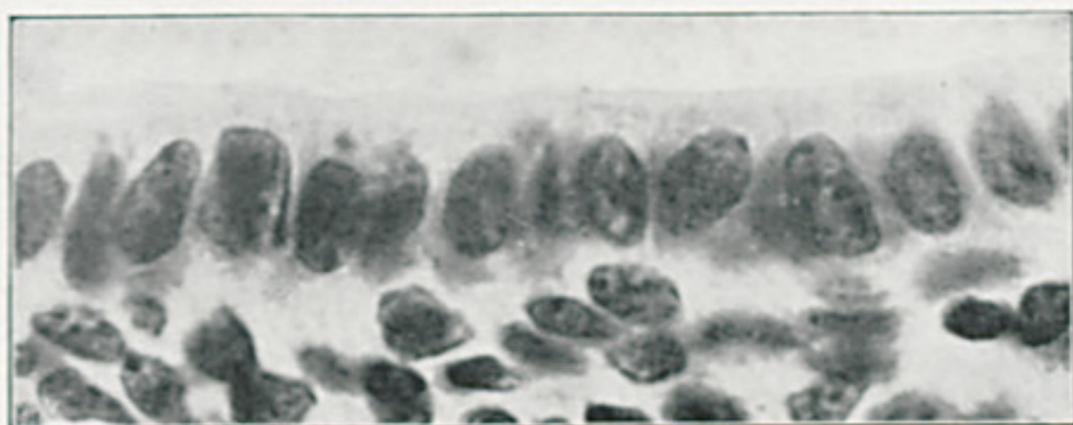


FIG. 47

Epitelio superficial do utero em diestro. x 1161.



FIG. 48

Epitelio superficial do utero em estro. x 1161.



FIG. 49

Fibras musculares do miometrio em diestro. x 1161.

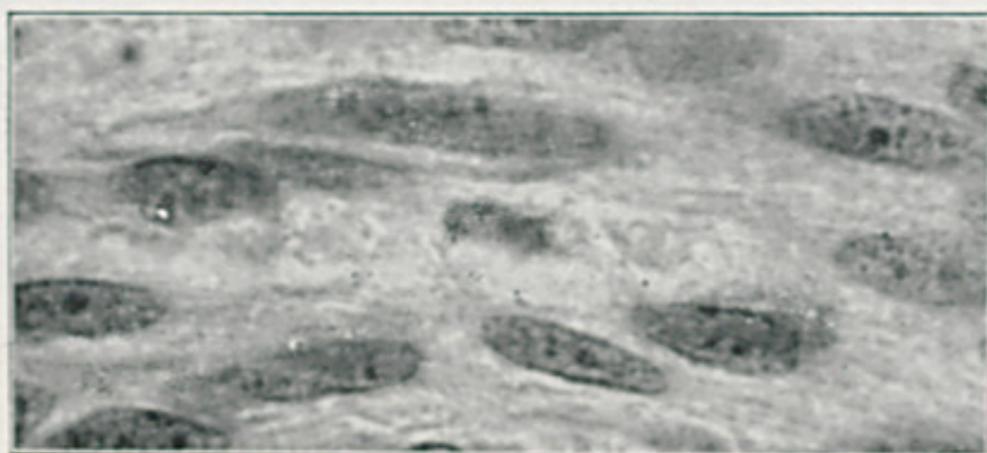


FIG. 50
Fibras musculares do miometrio em estro. x 1161.



FIG. 51
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos
21 dias de prenhez. x 1161.



FIG. 52
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos
21 dias de prenhez. x 1161.

Este resultado confirma os que Schreiber obteve no estudo cariométrico de outros tecidos em atividade reprodutiva (espermatogonias) e os que Wermel (17) e colaboradores constataram nas células cultivadas "in vitro" com pesquisas cinematográficas. Enviamos aos trabalhos anteriores de Schreiber a discussão e interpretação deste crescimento sesquifásico. Queremos somente salientar algumas outras considerações que dão maior valor aos fenômenos aqui constatados.

A existência desta "sesquifase" manifesta-se nos tecidos uterinos com particular evidência. Especialmente nos gráficos 2,4,11,12,16,18,22,25,30 e 36, as modas estão perfeitamente distintas. Nos tecidos uterinos o estudo cariométrico nos evidencia claramente a natureza interfásica desta fase. Pelas considerações já feitas, sobre a significação estatística das variações das curvas de frequência, devemos frisar também a propósito da sesquifase, isto é, da moda II, que as variações relativas as modas I e III especialmente confrontando o diestro e castrado e o éstro natural e experimental, indicam que são consequentes a transformação dos núcleos de um valor a outro e não a predominância de núcleos de categorias diferentes pre-existentes desde o início em épocas diferentes.

Portanto, neste caso, a sesquifase têm uma significação mais clara do que nos casos em que se compara tecidos diferentes segundo a natureza ou por época de desenvolvimento ou por condição patológica como aquelas notadas por Brummelkamp (2) e por Hertwig (8).

Nas células uterinas temos um caso, sob certo ponto de vista, tão favorável como o das espermatogonias, isto é, células em ciclo mitótico bem definidas e localizadas topograficamente, tendo algumas etapas deste ciclo distintamente marcadas por volumes fixos facilmente determináveis e com valor múltiplo do genoma conhecido. No caso da espermatogonia, estes marcos miliares de crescimento interfásico são representados pelos estádios das divisões meióticas, ao passo que nos tecidos uterinos, os marcos são representados pelos valores "básicos" que se encontram fixos nos estádios extremos do ciclo (diestro, metaestro e castrado). O outro marco limite, é aquele representado pelo volume das profases exatamente duplo do dos estádios de repouso agora mencionados. As variações dos valores modais nas fases intermediárias do ciclo estral e da gravidez, perfeitamente sincronizadas com o aparecimento das mitoses e com o aparecimento das modas que antes eram ausentes, permite interpretar corretamente a natureza interfásica do crescimento ritmico nuclear.

b) *Conclusões fisiológicas.*

Sob o ponto de vista endocrinológico, o estudo detalhado dos fenômenos óra relatados, será publicado sucessivamente por Salvatore, porém, salientaremos algumas conclusões que interessam o estudo citológico uterino.

E primeiro lugar, podemos indicar que o ciclo fisiológico do éstro e da gravidez é acompanhado por manifestações citológicas em todos os tecidos uterinos constituídas por ciclos de multiplicação nuclear. A "hipertrofia" descrita por vários autores, ao menos no que se refere ao núcleo celular deve considerar diretamente ligada ao crescimento interfásico do núcleo. Não estamos habilitados a concluir o mesmo para o citoplasma.

A castração deixa os núcleos absolutamente em repouso e perfeitamente sincronizados nesta fase, sem nenhum vestígio de crescimento interfásico. Portanto, a secreção ovariana age tipicamente sobre o crescimento interfásico dos núcleos e ao iniciar-se a elevação do limiar desta secreção todos os núcleos iniciam uma série de ciclos interfásicos e de consequentes mitoses. Não podemos dizer qual é o fator que desencadeia a mitose propriamente dita, pois a administração de estrona induz a maioria dos núcleos a ficarem no volume final do crescimento interfásico e acumularem-se nesta fase. A falta de núcleos pequenos nesta situação estaria a indicar que é necessário algum fator a mais do que o hormônio, ou alguma variação da situação hormonal para que as mitoses se produzam.

O efeito mais típico da ação hormonal sobre o ciclo de crescimento nuclear se revela nas duas situações opostas, isto é, na castração e no éstro-provocado. As variações destas situações provoca o "movimento" do ciclo nuclear e o aparecimento das fases intermediárias e das mitoses.

Além destas conclusões de ordem geral, podemos dizer que todos estes fenômenos de multiplicação nuclear, mitóticos ou endomitóticos efetuam-se também para as fibras do miométrio. O ciclo de crescimento interfásico dos núcleos é neste tecido tão evidente como no epitélio endometrial, embora as fases mitóticas sejam extremamente raras.

Outro fenômeno que evidenciamos nestas pesquisas é a presença de ciclos de multiplicação celular em todos os tecidos uterinos numa época mais ou menos a metade da gravidez. Este fato parece indicar uma variação da situação hormonal superposta ao estado gravídico, quiçá implicando ciclos funcionais ovarianos durante este estado.

Muitos problemas se abrem com estes estudos. Um deles é o destino das células neoformadas pelos ciclos mitóticos uterinos. A infiltração leucocitária e os notáveis fenômenos cariolíticos que verificam-se em certas fases, indicam que, ao menos parte das células em cada ciclo é destinada a morrer.

Qual dos elementos produzidos pela divisão são destinados a degenerar, e quais os que ficam para repetir o ciclo, constitue um dos problemas a serem esclarecidos.

A existência de núcleos de tamanho múltiplo do básico, interpretada por analogia com o que se conhece em outros tecidos (D'Ancona (3) (4) para o fígado, e Painter (1) e colaboradores, para os neoplasmas), como poliploides, permite supôr-se que este poliploidismo possa ser ligada à degeneração de parte dos elementos citológicos uterinos. Além disso, esta labilidade nos limites da multiplicação do genoma durante os intensos fenômenos multiplicativos dos tecidos uterinos poderia estar ligada a incidência de neoplasmas neste órgão.

RESUMO

Foram estudados os volumes nucleares das células uterinas (endométrio, glândulas e miométrio) pelo método estatístico-cariométrico na rata, durante as fases do ciclo estral, gravidez, castração e no éstro-provocado pela estrona.

As variações das curvas de frequências dos volumes nucleares indicam que no ciclo estral as células que estão em repouso no diéstro, iniciam um crescimento interfásico alcançando no éstro o volume duplo do encontrado no diéstro, seguindo-se a divisão celular.

Durante este crescimento interfásico os núcleos apresentam uma etapa a 1,5 vezes o volume inicial. Este fenômeno verificado em inúmeros outros tecidos e em condições fisiológicas e patológicas das células, foi precedentemente definido por Schreiber com o nome de "sesquifase".

As profases iniciam-se geralmente a um volume duplo do inicial e, as vezes a um volume triplo ou seja o duplo da sesquifase. Uma pequena parte das células continua o crescimento interfásico alcançando um volume quatro ou seis vezes o inicial.

Na prenhez os núcleos apresentam um volume duplo daquele encontrado no diéstro. Ciclos multiplicativos verificam-se no meio da prenhez (13-14 dias).

Na castração, todos os núcleos estão na fase de repouso sincronizados ao volume inicial, igual ao do diéstro e sem nenhum vestígio de crescimento interfásico. No éstro-provocado (castrados, injetados com estrona) observa-se uma

situação idêntica àquela do éstro fisiológico. Ao se interromper o tratamento aparecem todas as classes de volumes inferiores (1: 1,5: 2), isto é, a presença do crescimento interfásico do núcleo.

Pode-se excluir que as variações das curvas de frequência, sejam devidas a um fenômeno "estatístico", isto é, a substituição em momentos diferentes, de categorias de núcleos diferentes pré-existentes no tecido. As variações perfeitamente sincronas e complementares das diferentes categorias de volumes nas diversas situações, e a sucessão cronológica destas variações, ligada com a presença das profases, não deixa dúvida nenhuma que, as *diferentes classes de volume nucleares representam etapas do crescimento interfásico dos núcleos*.

Todos estes fenômenos indicam que as fases fisiológicas uterinas sincronizadas com as variações hormonais, estão nitidamente relacionadas a fenômenos multiplicativos dos genomas nucleares e com o mecanismo da mitose.

ABSTRACT

In this paper, statistic-caryometric methods have been applied to the measurement of the nuclear volume of uterine cells (endometrium, glands and miometrium) during the various phases of the oestral cycle pregnancy, after castration as well as during artificial oestrus induced by oestrone injections (rat).

The variations of the frequency curves of the nuclear volumes during the oestral cycle reveal an interphasic growth of those cells which are at rest during the diestric phase; these cells attain twice their initial volume, before they divide.

This interphasic growth of the nuclei has a rhythmical character which manifest itself by a distinct stop of growth (modal value of the frequency curve) when the nuclear size has reached 1,5 of its basic initial volume. This stage of arrest has equally been found in numerous other growing tissue cells in various normal and pathological conditions which have been studied extensively by various Authors. Schreiber termed in previous papers this phenomenon as "sesquiphase".

Nuclei in the prophase generally possess twice the basic volume and only occasionally three times the basic volume. A small part of the cells continues its interphasic growth without entering division which results in an increase of nuclear volume three to four times the basic volume (polyploid or polytenic nuclei).

During the oestrus there is a stop of the interphasic growth and an accumulation of double-sized (tetraploid?) nuclei. The succeeding stage "oestrus-metaoestrus" reveals again all modal values corresponding to the interphasic growth and numerous mitosis.

The metaoestrus is characterized by a total absence of interphasic growth; all nuclei possess the basic volume.

The uterine cells of castrated rats reveal a nuclear picture perfectly behaviour as during the oestral phase; on the 13th day however a mitotic activity reappears and consequently the interphasic growth which follows the division. To the end of pregnancy the nuclei stop growing, after having reached a volume two, three or four times the basic value.

The uterine cells of castrated rats reveal a nuclear picture perfectly identical to the pro and metaoestrus; artificially induced oestrus determines the growth of all nuclei to the double the initial volume. Interruption of the treatment is followed by the appearance of mitosis and an succeeding interphasic growth, exactly as in the physiological "oestrus-metaoestrus".

The sincronous transformation of the frequency curves and the total disappearance of the basic form at a stage where all the nuclei have reached the double volume does indicate that the variation consists in a real interphasic growth and not, as some authors believe, the existence of different cell categories of characteristic nuclear size, which succeed each other during the various phases of the oestral cycle.

All these phenomena indicate that the hormones elaborated during the oestral cycle are active upon the nuclear interphasic growth as well as on the mitosis, affecting likewise myometric and endometric cells.

Agradecemos à Da. Nicolina Pucca, do Departamento de Farmacologia deste Instituto, pela valiosa colaboração no controle do ciclo vaginal das ratas.

BIBLIOGRAFIA

1. Biesele, J. J.; Poyner, H. & Painter, T. S. — Nuclear phenomena in mouse cancers. *The University of Texas Publication*, 4243:1-68, 1942.
2. Brummelkamp, R. — Das sprungweise Wachstum der Kernmasse. *Acta Neerlandica Morphologiae*, II(2):178-187, 1939.

3. *D'Ancona, U.* — Grandezze nucleari e poliploidismo nelle cellule somatiche, *Monit. Zool. Ital.*, 50(8-9):225-231, 1939.
4. *D'Ancona, U.* — Sul poliploidismo delle cellule epatiche, *Boll. S. Ital. B. Sper.*, 16(1):49-50, 1941.
5. *Fabris, M.* — Le grandezze nucleari del miometrio, *Atti d. Soc. Med. Chir. di Padova*, marzo, 1935.
6. *Fröbose, H.* — Die Neubildung von Muskelzellen während der Tragzeit in der Gebärmutterwand der Hausmaus, *Ztschr. f. mikr. anat. Forsch.*, 37:17-48, 1935.
7. *O'Leary, J. L.* — A quantitative study of the relation of nucleus to cytoplasm in the human endometrium during the menstrual cycle, *Anat. Record*, 50:33-44, 1931.
8. *Hertwig, G.* — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung, *Anat. Anz. Bol.*, 87:65-73, 1938-39.
9. *Reynolds, S. R. M.* — Physiology of the Uterus, *P. Hoeber, Inc.*, 1939.
10. *Schreiber, G.* — Discontinuous and proportional decreasing of nuclear size in the liver of tadpole during development and metamorphosis, *Anat. Record.*, 87(4) supp. 1941.
11. *Schreiber, G. & Schreiber, M. R.* — Diminuição do volume nuclear do fígado e do pâncreas nos girinos de Anuros, *Boll. Fac. Fil. Cien. e Letras da Univ. S. Paulo, XXII Zoologia*, 5:234-264, 1941.
12. *Schreiber, G.* — O volume do núcleo durante o desenvolvimento e a interfase, *Rev. de Agricultura (Piracicaba)*, 18(11-12):453-474, 1943.
13. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. I. O crescimento interfásico da espermatogonia nos Ofídios, *Rev. Bras. de Biol.*, 6(2):199-209, 1946.
14. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. II. A terceira divisão e a dimegalia da espermatogenese dos Ofídios. 1.^a Reunião Conjunta das Soc. de Biologia do Brasil (S. Paulo), set., 1946.
15. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. III. Pesquisas cariométricas sobre os poliploides de Coffea. "Bragantia" (Inst. Agrônomo de Campinas) em curso de publicação.
16. *Stieve, H.* — Die Neubildung von Muskelzellen in der Wand der schwangeren Gebärmutter, *Verhandl. Anat. Ges.*, 38:27-35, 1929.
17. *Wermel, E. & Portugalow, W. W.* — Studien über Zellengröße und Zellenwachstum. XII. Mitt. Ueber d. Nachweis d. Rhythmischen Zellenwachstums, *Z. Zellf. u. mikr. Anatomie*, 22:183. 1935.