

## O CRESCIMENTO INTERFÁSICO DO NÚCLEO

*Pesquisas cariométricas sobre a espermatogênese dos ofídios (\*)*

POR GIORGIO SCHREIBER

(Da Escola Livre de Sociologia e Política, Instituição Complementar da Universidade de São Paulo e do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

### SUMÁRIO

#### I) INTRODUÇÃO

- a) O problema do crescimento interfásico do núcleo.
- b) Os fundamentos do método cariométrico no estudo da interfase.

- 1) Relações entre genoma e volume nuclear.
- 2) Variações rítmicas do volume nuclear com módulo 1:2.
- 3) Variações rítmicas do volume nuclear com módulo diferente de 2.
- 4) Variações rítmicas do volume nuclear em sentido diminutivo.
- 5) Fins do trabalho.

#### II) MATERIAL E MÉTODO

- a) Escolha do material.
- b) Técnica histológica e cariométrica.
- c) Elaboração estatística dos resultados.

#### III) RESULTADOS

#### IV) DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

- a) Relação entre volume e valor múltiplo do genoma.
- b) A "sesquifase" no ciclo mitótico.
- c) A "ritmicidade" do crescimento interfásico.

#### V) RESUMO — ABSTRACT — RIASSUNTO.

#### VI) BIBLIOGRAFIA

---

(\*) Pesquisas executadas no Laboratório de Citogenética do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, subvencionadas por uma bolsa dos Fundos Universitários de Pesquisa da Universidade de São Paulo.

Recebido para publicação em 22-4-47.

## I) INTRODUÇÃO

a) *O problema do crescimento interfásico do núcleo.*

Num campo de pesquisa tão vasto e cheio de brilhantes descobertas e de possibilidades experimentais, como é a citogenética, pode parecer inútil e banal, limitar-se ao estudo do volume do núcleo. Alguns fenômenos que serão considerados e discutidos no curso do presente trabalho permitem considerar o estudo do volume nuclear sob uma visão mais otimista e convencer-se que ainda a simples medida do volume nuclear, quando feita sobre material convenientemente escolhido e com tôdas as reservas e objeções, aliás, perfeitamente justificadas relativas aos mecanismos genéticos, metabólicos e geométricos que determinam o volume nuclear, pode-nos fornecer contribuições de notável interêsse no estudo dos mecanismos fundamentais do genoma.

O volume no núcleo é o resultado de uma série extremamente complexa de fenômenos químicos, físicos e fisico-químico que atuam não somente sobre o volume, mas também sobre a superfície do núcleo e, portanto, a forma geométrica deste corpo adquire uma significação de importância notável.

Existem indubitavelmente algumas condições que modificam o volume nuclear de modo totalmente independente do genoma. Devemos, todavia, frisar que em outras condições o genoma, na sua expressão quantitativa, está ligado ao volume nuclear de modo absolutamente rígido. Um dos fins deste trabalho é a especificação de algumas destas condições.

As técnicas citogenéticas que permitem, hoje, uma análise do genoma tão íntima no que se refere ao número e à constituição dos cromosomas (número e disposição de cromonemas, espiralização, cromocentros, heteropicnose, etc.) infelizmente quase nada nos podem dizer do que acontece no período no qual os cromosomos não estão visíveis, isto é, na interfase.

Os estudos citoquímicos sobre os ácidos nucleínicos vão preencher parte desta lacuna. As pesquisas das Escolas de Caspersson e de Brachet (9) nos permitem ver no futuro u'a maior compreensão da natureza de ao menos parte dos fenômenos metabólicos que caracterizam a interfase.

Não podemos esquecer que este período é tão importante para a vida das células como e até mais do que as fases da mitose e da meiose. Os fenômenos da divisão nuclear são as manifestações finais de um ciclo no curso do qual os gens se multiplicam e atuam no citoplasma. A atividade efetiva do genoma se dá na interfase e não nas fases nas quais os cromosomas são reveláveis pelas técnicas citológicas comuns. O fenômeno fundamental da vida, a autoreprodução

do gen, é um fenômeno interfásico, e os virus que o apresentam como única manifestação típica que os separa do mundo mineral faltam totalmente de todas as manifestações do ciclo cromosômico.

Qualquer contribuição que nos permita indagar quer diretamente quer indiretamente esta interfase, vem contribuir ao estudo do fenômeno fundamental da biologia: a reprodução dos gens. É, portanto, justificado insistir no estudo de um fenômeno tão simples e grosseiro como a variação volumétrica do núcleo, mesmo se as interpretações forem depois sujeitas a uma necessária verificação por meio de outros métodos mais refinados ou de hipóteses acessórias que, devidamente discutidas, poderão nos indicar novos rumos de pesquisas.

\* \* \*

As presentes pesquisas, executadas sobre material bastante especializado, representam a extensão de uma série de estudos levados a termo sobre outros materiais, durante os quais apareceu a necessidade de estudar o desenvolvimento do núcleo durante a interfase, como problema básico para a interpretação dos fenômenos que se vinham revelando pelo estudo quantitativo do volume nuclear.

Além disso, a confusão existente na literatura sobre as relações entre o volume do núcleo, a sua superfície e o seu conteúdo em cromosomas, levaram o autor à convicção de que era preciso esclarecer estes pontos antes de tentar a interpretação de novos fenômenos de ordem cariométrica, que se verificam, por exemplo, no curso do desenvolvimento embrionário.

As relações estreitas entre o tamanho do núcleo (em volume e superfície) e aquele do citoplasma são um outro problema, que visam mais os efeitos dos gens no desenvolvimento e funcionamento das células do que os próprios fenômenos da reprodução dos gens. Isto, às vezes, contribue para complicar as interpretações das pesquisas de citologia quantitativa, e precisa sempre não esquecer que o citoplasma não é todo diretamente implicado na vida do genoma, mas uma parte dele está mais ou menos fóra do ciclo e inerte, especialmente nas células embrionárias (Conklin 12). De outro lado vários fenômenos mostraram que no citoplasma ativo das células embrionárias existem materiais de origem nuclear cuja incorporação no núcleo se procede progressivamente nas segmentações sucessivas (Godlewsky 22, Brachet 9), e mesmo nas células adultas materiais citoplasmáticos de natureza nucleínica concorrem ao abastecimento do núcleo durante o processo de duplicação interfásica; como também materiais nucleínicos formados no núcleo em relação com o processo de duplicação dos gens podem passar ao citoplasma especializado das células glandulares (Painter, 42).

É, portanto, absolutamente necessário esclarecer o que acontece nas células em condições normais, e confrontar, depois, estes fenômenos com os que se verificam nas condições mais especializadas acima especificadas. Os blastômeros, especialmente, não são ainda células definitivas, pois têm capacidades prospectivas mais amplas do que as células do organismo desenvolvido. Não há dúvida que, apesar dos resultados das clássicas pesquisas de embriologia experimental sobre a totipotência nuclear durante o desenvolvimento, os fenômenos de especialização celular têm uma altíssima significação para interpretar a função do genoma no desenvolvimento, provavelmente em relação com a estrutura ou constituição dos materiais do citoplasma recebidos e segregados durante a segmentação (Morgan, 40 — Goldschmidt, 23, etc.). Portanto, para evitar estas complicações, o estudo do mecanismo normal da duplicação dos gens deve ser abordado prevalentemente nas células que estejam em uma situação a mais possível definitiva.

\* \* \*

O estudo do crescimento interfásico do núcleo não é sempre fácil e vários foram os rumos seguidos pelos pesquisadores.

O estudo do macronúcleo dos Infusórios, levado a termo especialmente por Popoff (18), foi a primeira tentativa neste campo; todavia, este material nos parece especializado de mais para ser confrontado diretamente com o núcleo das células dos metazoários. Provavelmente, o macronúcleo representa um núcleo fortemente aumentado por repetidas endomitoses e, portanto, os fenômenos podem ser aqui mais complexos.

Outra possibilidade do estudo do aumento nuclear existe com as culturas "in vitro" e de fato a escola russa de Wermel (58) alcançou resultados básicos que serão examinados mais adiante.

Um terceiro método de análise da interfase consiste no estudo estatístico de uma "população" de núcleos homogêneos em reprodução ativa. As frequências dos diferentes tamanhos encontrados estão relacionadas com as velocidades de variação dos tamanhos. Este foi o método usado nas presentes pesquisas e o material, as espermatogônias de ofídios, revelou-se particularmente interessante. O mesmo método aplicado aos maristemas vegetais levou às mesmas conclusões obtidas nas espermatogônias. Por este fato acreditamos que a coincidência dos resultados obtidos em materiais tão diferentes não seja casual, mas reflita a realidade com uma boa aproximação. Examinemos, portanto, este método mais detalhadamente.

b) *Os fundamentos do método cariométrico no estudo da interfase*

1) *Relação entre genoma e volume nuclear. Frequência dos volumes e velocidade de crescimento.* As pesquisas cariométricas que abriram toda uma série de estudos quantitativos sobre os núcleos foram iniciadas por Jacoby na escola de Heidenhain (32-35).

Medindo o volume de um certo número de núcleos e distribuindo os volumes em classes estatísticas de frequência, este autor verificou que eles são distribuídos com frequência de volume nuclear unimodais, sendo as curvas do tipo bem conhecido em forma de sino (curva de Galton). Existem, porém, tecidos nos quais estas curvas apresentam duas ou mais classes de máxima frequência: Jacoby verificou que nestes casos os volumes das classes modais estão entre si em relação simples e constante, isto é, como 1:2:4:8:16:, etc..

Devemos salientar que esta variabilidade do volume nuclear não reflete somente a variabilidade flutuante casual, mas também, e principalmente a variação devida ao crescimento próprio dos núcleos. Portanto, as curvas de frequência não são exatamente curvas de Galton. Durante este crescimento os núcleos passam de uma classe de volumes para outra: o fato de ter algumas classes frequência maior do que outras, indica que os núcleos nesse crescimento permanecem mais demoradamente em alguns volumes do que em outros. As classes de maior frequência representam, portanto, volumes nos quais os núcleos têm menor velocidade de crescimento, isto é, paradas do processo de crescimento.

Baseados nestes postulados teóricos, nos é permitido estudar um fenômeno dinâmico como é o crescimento nuclear sobre material fixado. Um sistema semelhante de análise de um processo dinâmico sobre material estático é a determinação das velocidades relativas das diferentes fases cariocinéticas, deduzidas da porcentagem das diferentes fases verificadas nas culturas de tecidos fixados. Möllendorff (39) mostrou que este processo oferece resultados satisfatoriamente concordantes com os resultados das medições diretas da duração das fases cariocinéticas em filmes microcinematográficos.

Resumindo o princípio deste método, podemos dizer que a frequência de um estágio é diretamente proporcional à sua duração e inversamente proporcional à velocidade do processo no estágio em exame.

Voltando ao caso das curvas de frequência dos volumes nucleares, si as modas têm volumes múltiplos de dois (2:4:8:16.) podemos concluir que os núcleos durante o crescimento duplicam de volume. Durante este crescimento o núcleo passa para volumes progressivamente maiores com uma sucessão de velocidades diferentes; parando ou retardando este crescimento ao alcançar um volume duplo do inicial.

Este tipo de crescimento foi denominado "rítmico" ou, segundo se exprime Painter, "periódico".

As pesquisas de Jacobj, integradas nas considerações teóricas de Haidenhain (Protomeren-Theorie) mostravam que a matéria viva, célula ou núcleo, cresce por duplicação. Vários outros autores sucessivamente pensaram que o crescimento "rítmico" fosse devido à duplicação dos cromosomios e, afinal, dos gens. Geitler (20), especialmente, baseando-se nas suas pesquisas sobre a endomitose e poliploidização dos núcleos somáticos nos insetos considera o crescimento rítmico dos núcleos, descobertos por Jacobj, como verdadeiras endomitoses.

A demonstração efetiva deste fato foi dada por vários autores entre os quais D'Ancona (13-14) sobre o fígado dos mamíferos em regeneração e Biesele, Poyner e Painter (7) sobre os núcleos de tecidos neoplásticos. Estes últimos autores usando contemporaneamente a análise estatística — cariométrica e citológica e a determinação do volume dos cromosomios, do volume dos nucléolos e do número dos mesmos, verificára a estreita dependência do volume nuclear do número de cromosomas, ou de cromonemas, componentes dos cromosomios. Com estas pesquisas elimina-se tôda e qualquer objeção que ponha em dúvida a correlação entre volume nuclear e duplicação do genoma.

Esses autores refutam várias outras interpretações do crescimento nuclear, pois a correlação entre classes de máxima frequência do volume nuclear e o número de "organizadores do núcleo" exclue de modo absoluto qualquer interpretação que não tome em consideração a duplicação dos constituintes do núcleo (\*).

Sucessivamente (1944) Biesele (5,6) admitiu a existência de dois fatores que contribuem para o aumento do volume nuclear nos tumores. Em alguns núcleos a duplicação dos cromosômios provoca o aumento volumétrico, ao passo que *em todos* os núcleos há um aumento de volume independente do aumento cromosômico. Este fato, porém, agindo sobre *todos* os núcleos é independentemente do fator genético cromosômico que age especificamente sobre os núcleos poliploides ou politenicos.

Biesele, (6) mais recentemente, acha que a variação de volumes dos cromosômios observadas nos casos de leucemia, não seja devida a variações de número dos cromatídeos, mas sim a variações do conteúdo em proteínas

---

(\*) "Hydration does not explain the periodicity of nuclear volumes, and it could not change the number of nucleolar organizer".

dos mesmos, e, portanto, acha que as conclusões de Biesele, Poyner e Painter, de 1941, no que se refere ao volume dos cromosômios devem ser revistas. Não queremos entrar aqui na discussão do problema específico do volume dos cromosômios, porém, é claro que o problema deve ser considerado caso por caso e quando há efetivamente variação no número dos "nuclear organizer" trata-se efetivamente de variação do número de cromatídios.

Precisa lembrar que os linfocitos são células um pouco especiais e das quais existem várias categorias diferenciáveis pelas dimensões e não estão bem classificadas e constituem ainda um provável problema da hematologia. São portanto células que não constituem nas circunstâncias usadas um material apto a tirar afirmações definitivas, mesmo não tendo por elas indicações no que se refere aos nucleolos.

Acrescentamos ainda que os trabalhos de Biesele (Cancer Res. 4. 232-235 1944, Am Natur. 78, 380-382. 1944, Cancer Res. 4. 529-539 1944, Cancer Res. 4. 540-546. 1944) evidenciam um comportamento no Rato diferente do Camundongo e os demais animais, no sentido que em certas condições (idade, regeneração etc.) o aumento do volume dos cromosômios se processaria por aumento da eucromatina e não por duplicação dos cromonemas.

Devemos salientar que este fato aliás muito interessante pelas relações funcionais (vitaminas, etc.) e pela relação de 1,5 as vezes encontrada, não considera o volume nuclear interfásico nas suas fases de crescimento, mas somente o volume dos cromosômios metafásicos. Estes dois fenômenos, pelos resultados mesmos de Biesele não sempre são em direta relação. Não devemos portanto confundir dois fenômenos diferentes. O volume dos cromosômios varia também em outras situações, diferentes daquelas consideradas por Biesele, por exemplo por fatores genéticos e representa segundo Federley um verdadeiro caráter fenotípico.

Todos estes fatos portanto, esclarecem alguns fenômenos de ordem bioquímica, mas não afetam o problema fundamental do crescimento rítmico do núcleo durante a interfase, isto é proporcional a um volume básico.

\* \* \*

Para resumir estes fenômenos podemos dizer que:

- 1 os núcleos crescem duplicando de volume.
- 2 esta duplicação do volume é devida à duplicação do genoma.

3 esta duplicação do volume se dá com velocidades diferentes, sendo que os núcleos param depois de alcançadas as etapas de duplicação.

Para fazer um confronto com o processo de crescimento geral dos organismos (ao qual com toda probabilidade se submetem os núcleos também) podemos dizer que o crescimento do núcleo se pode representar por uma série de curvas "S" sucessivas, cada uma das quais representando um ciclo de duplicação dos gens nucleares.

Podemos representar este ciclo como uma curva cumulativa da curva de frequência, sendo que nos casos das curvas polimodais, as "S" sucessivas, correspondem a ciclos de duplicação. Na realidade a transformação da curva de frequência em curva de crescimento deve-se fazer considerando a frequência como o inverso da velocidade.

Esta representação deve se considerar como puramente teórica pois outros fatores interferem na determinação da "variabilidade" estatística qual nos relevamos nos estudos da população de núcleos. Todavia, ela nos dá uma base para o estudo dinâmico do crescimento nuclear em material fixado.

A coincidência entre os ciclos de crescimento sucessivos e a variabilidade estatística foi verificada diretamente nas pesquisas da escola de Wermel (57) nas quais foram fotografados os núcleos de células em cultura de tecidos durante intervalos de tempo sucessivos. A curva dos volumes calculados sobre estes fotogramas é uma típica curva "S" em ciclos sucessivos e os volumes alcançados nos ciclos sucessivos correspondem aos valores modais das curvas de frequência construídas sobre o material preparado histologicamente.

2) *Variações rítmicas do volume nuclear com relação 1:2.* Muitos autores assinalaram relações volumétricas entre os núcleos nas mais variadas condições: num mesmo tecido, entre tecidos diferentes da mesma espécie, entre os núcleos do mesmo tecido em épocas diferentes da vida do indivíduo (embrião, larva ou adulto), em condições patológicas como, por exemplo, entre um tecido normal e um neoplasma do mesmo tecido, etc. Uma detalhada revista bibliográfica destas pesquisas nos levaria longe demais; daremos somente a indicação dos mais significativos trabalhos nos quais estas relações têm sido verificadas (Jacobj, Clara G. Hertwig, Sauser, Freerksen, Wermel, D'Ancona, Beams e King, Sulkin, Keller, Muller, etc.), Geitler (literat. cit. Schreiber 49-50-52-53).

Todos êstes pesquisadores esclareceram de modo indubitável que o crescimento do núcleo se dá por alternância de períodos de rápido aumento com pausas nas quais o crescimento é mais vagaroso ou nulo.

As relações entre as classes de frequência máxima e o número de cromonemas que os constituem, nos indicam que êstes períodos de pausa correspondem a estádios poliploides ou politênicos. Especialmente o trabalho de Biesele Poyner, e Painter nos parece não deixar duvida neste ponto. O estudo contemporâneo do volume nuclear, do volume dos cromosomas, do volume aproximativo das fases mitóticas, e o número dos plasmosomas, deram a certeza de que os núcleos homólogos de um mesmo tecido mas com volumes diferentes têm valores múltiplos do genoma. Estes núcleos se formam por endomitose sendo possíveis tôdas as combinações entre a duplicação dos cromonemas e a dos centrômeros. Podem, portanto, existir no mesmo tecido núcleos com número diploide de cromosomas com um cromonema, (vol. 2), núcleos diploides com 2, 4, 8 cromonemas (vol. 4, 8, 16), núcleos tetraploides com 1, 2, 4, 8 cromonemas (vol. 4, 8, 16, 32) e assim por diante.

O número de plasmosomas, refletindo o número de "nucleolar organizers" indica o número de cromonemas e portanto, dos genomas.

Insistimos neste pormenor, pois achamos que esta constatação é de maior interêsse na interpretação dos fenômenos cariométricos estudados na presente pesquisa.

\* \* \*

De outro lado uma vastíssima série de pesquisas nos vegetais poliploides mostraram também uma correlação direta entre volume nuclear e número de cromosomas. Nestas pesquisas, porém, frequentemente é tomado em consideração o volume celular em lugar do volume nuclear. Este fato, às vêzes, comporta variações da relação com o número de cromosômios devido à fracção de citoplasma inerte com vacúolos ou outras inclusões. Uma recente pesquisa de G. Schreiber (52) sôbre material rigorosamente controlado, seja como número de cromosômios, seja porque se refere à técnica cariométrica sôbre poliploides de café, trouxe uma ulterior confirmação à esta correlação.

3) *Variações rítmicas do volume nuclear com relação difirente de 2.* Estabelecida assim a natureza genética do crescimento rítmico por sucessi-

vas duplicações do volume nuclear, poderia-se pensar não ter dúvida nenhuma sobre este fenômeno. Porém, desde as primeiras pesquisas de Jacobj apareceram desvios desta regra e em alguns casos os valores modais das curvas de frequência estão em relação diferente de 2, com um algarismo geralmente inferior a 2.

Jacobj encontra na comparação entre núcleos de células hepáticas embrionárias, que ele considera como "Grundform" ou medida básica, com as espermátidas, uma relação de mais ou menos 1:1,3. Ele considera essa diferença como não significativa e devida principalmente à diferente embebição de água (Wasseraufnahme).

É preciso dizer que em geral as indicações de Jacobj não são totalmente isentas de crítica do ponto de vista metodológico e que os julgamentos que ele faz das diferenças entre os valores reais e os que deveriam ser encontrados pela teoria de duplicação são frequentemente arbitrários.

É importante, porém, lembrar que na discussão surgida depois de uma comunicação de Jacobj (35) na Anatomische-Gesellschaft de Bresslau, em 1931, Haidenhain, comentando as bases teóricas da sua doutrina do crescimento ritmico esclarece que se a divisão dos elementos unitários se procede sincronicamente dá-se o crescimento com duplicação (Verdoppelungsgesetz) (1:2). Se pelo contrário uma das duas metades do sistema se divide sucessivamente, então se verifica uma relação 1:3 ou seja definitivamente 1:2:3. : (0.5:1:1.5) ("... bei synchron fortschreitender Teilung erhalten wir das Verdoppelungsgesetz (1:2); wenn jedoch nur der eine Paarling sich weiterhin teilt, so bekommen wir das Verhältniss 1:3").

Voltaremos em seguida sobre este ponto que nos parece de maior interesse na interpretação da natureza destas classes de frequência intermediária. É importante, todavia, frisar que Jacobj não dá a eles a importância devida. Sucessivamente Freerksen (19), aluno de G. Hertwig encontra valores de frequência máxima que estão em relação de mais ou menos 1:1,3. Estes valores são encontrados nos eritroblastos dos quais ele reconhece gerações sucessivas de tamanho decrescente.

Quem porém, deu a estas exceções à regra de duplicação uma importância significativa foi Wermel. Este autor com uma série de colaboradores publicou um notável número de contribuições sobre o crescimento das células e do núcleo. Wermel chama estes valores "Zwischenklassen" ou "Unterklassen" e apesar de não dar uma interpretação causal, as considera

como reais exceções à lei da duplicação e não como fenômenos concomitantes de ordem metabólica. Wermel e Scherschulskaya (59) encontraram a relação 1:1,5 entre dois modos do volume nuclear das células gordurosas do bicho da seda. Bogoyawlensky (8), da mesma escola russa, encontrou valor 1:1,5 (média de 1,7 — 1,6 — 1,42 — 1,49) entre as classes de frequência máxima nas células do intestino médio do mosquito.

Devemos salientar aqui que em todos estes casos trata-se sempre de valores estatísticos cuja significação está entre certos limites de exatidão e, portanto, uma delimitação destes valores não é sempre possível; esse fato será para nós de grande interesse na discussão sobre a natureza destas classes intermediárias pois entre as diversas interpretações teóricas a escolha dever-se-ia fazer exclusivamente na base do real valor do módulo, quando não seja possível uma verificação citológica.

Dois autores consideram estas classes intermediárias com interesse particular tentando uma explicação teórica da sua natureza. G. Hertwig já tinha estudado o problema do crescimento rítmico dos núcleos e considerado este como estritamente relacionado à duplicação do conteúdo cromosômico. Em 1932 Hertwig (25) considerou sob este ponto de vista os núcleos gigantes das glândulas salivares dos dípteros cuja constituição múltipla em termos cromosômicos está hoje bastante bem estabelecida.

Num trabalho sobre os desvios da regra da duplicação dos núcleos (29) ele toma em consideração as pesquisas de Freerksen, Jacoby e Erich, respectivamente no pronefros, nas glândulas mamárias e nos ductos de outras glândulas nos quais os núcleos crescem a 40-50% do volume esperado pela duplicação. Além disso Hertwig confronta os núcleos no cerebelo de dois indivíduos (os núcleos das células da neuroglia e dos grânulos). Os volumes nucleares são iguais nos dois indivíduos ao passo que as células de Purkinje estão num indivíduo 1,5 maiores do que no outro. Em outros indivíduos o mesmo autor encontra as seguintes relações:

Em três indivíduos ; grânulos:Purkinje=1:16  
Em um indivíduo ; grânulos:Purkinje=1:32  
Em cinco indivíduos ; grânulos:Purkinje=1:24.

Isto é, as células de Purkinje podem estar em indivíduos diferentes em relação de 1:2 ou 1:1,5.

No Congresso Internacional de Citologia em Zurich (1937) Hertwig considerou estes valores de 1:1,5 como devido à duplicação num núcleo diploide de somente a parte materna ou da parte paterna. Assim os núcleos estão 3 ou 6 etc. vezes maiores em lugar de 2 ou 4 etc. vezes.

Hertwig, porém, repudiou no trabalho de 1938 esta interpretação, sem dar uma justificação, mas somente por achar mais provável uma nova interpretação sobre outra base. Relatamos aqui brevemente esta interpretação.

Hertwig parte das pesquisas de Boveri nas quais este autor acha ser o número de cromosômios proporcional a superfície nuclear e não ao volume. Assim, núcleos haploides estão aos diploides como  $1:2\sqrt{2} = 2,828$ .

Outros trabalhos no campo da embriologia experimental deram indicações semelhantes; (Hinderer e Landauer), Herbst, 1919, especialmente encontrou ovos de ouriço do mar com quatro tamanhos de núcleos diferentes; Herbst acha serem estas classes nucleares devidas à quantidades diferentes de cromatina respectivamente 2 ou 4 vezes mais. Os volumes destes núcleos estão em relação

1023:2144:2752:3918.

I II III IV

As classes I, II e IV, representam núcleos duplicados ao passo que a II seria segundo Herbst afetada por um fator desconhecido que induziria o núcleo a variar de volume até ter uma superfície dupla da classe II. Hertwig acha esta interpretação de Herbst aplicável a todos os casos de "Zwischenklassen" e admite a existência de dois tipos de relações entre o número de cromosômios e tamanho nuclear. Num tipo o número de cromosômios seria proporcional ao volume nuclear, no outro seria proporcional a superfície. Núcleos de igual número de cromosômios, mas nos quais atuam os dois diferentes fatores de correlação, teriam volumes que estariam em relação como  $1:\sqrt{2}$  isto é 1:1,41.

Para confirmar a sua tese Hertwig relata ainda dois casos. O primeiro é tirado do trabalho de Hvitische e Tanner. No epitélio intestinal do rato mantido à nutrição cárnea aparece nas pesquisas cariométricas u'a moda intermediária entre as duas que se encontram normalmente. Hertwig interpreta este fato como consequência do aumento funcional das células que mobilitaria o fator que relaciona o conteúdo nuclear com a superfície do núcleo.

O segundo é um trabalho de Katsuki, da escola de R. Hertwig. Confrontando os tamanhos nucleares dos ovocitos e espermatocitos de *Áscaris* em três estádios diferentes (início, metade e fim do período de crescimento) a série dos valores do espermatocito tem três modos que estão alternados com os modos das séries dos ovocitos. Conforme a interpretação de Hertwig as fases femininas seriam de mais ou menos 1,41 maiores do que as correspondentes fases masculinas. Uma relação mais ou menos semelhante (1,34) foi verificada por Sauser (44) na comparação das células intestinais dos machos e fêmeas de *Áscaris*.

Parece-nos que o trabalho de Hertwig apesar de ter muitas indicações efetivamente interessantes é viciado por uma visão teórica muito fraca.

\* \* \*

O segundo trabalho que considera estas etapas intermediárias do crescimento nuclear é o de Brummelkamp (11) baseado, porém, sobre fenômenos bastante diferentes. Este autor parte também de uma comparação entre medidas nucleares encontradas na literatura e que tem uma relação diferente de dois. A comparação é feita entre materiais muito heterogêneos como, por exemplo, entrẽ os dois máximos de frequência dos volumes nucleares de histiocitos da galinha; entre os núcleos do fígado de rã; entre os núcleos do rim, do embrião humano e do recém-nascido; entre os núcleos das células da glândula parotis confrontados com os núcleos do ducto secretor; entre os núcleos de células de Leydig intersticiais de idade diferentes ou patológicas; entre os núcleos de fígado de espécies diferentes (Faisão: galinha, cobaia: coelho, truta macho: fêmea, *Ascaris*, macho: fêmea, etc.). Além disso são considerados vários casos patológicos como células hepáticas e dos capilares biliares na cirrose, células neoplásticas confrontadas com as correspondentes células normais.

Em todos êstes casos, num total de 36, Brummelkamp encontra relações cujo valor está muito perto do algarismo  $\sqrt{2}$ . Os desvios do valor real com o valor teórico (por exemplo  $0,96 \sqrt{2}$  ou  $1,05 \sqrt{2}$ ) são considerados como devidos a êrros de observação. Analisando sumariamente os elementos teóricos da interpretação dêste autor.

Brummelkamp tinha anteriormente estudado a aplicabilidade a diferentes espécies da fórmula de Dubois e de Snell concernente as relações matemáticas entre pêso do corpo e pêso do cérebro. Nestas pesquisas êle encontrou que um coeficiente desta fórmula varia nos diferentes casos considerados conforme a série geométrica  $1/2, 1/\sqrt{2}, 1, \sqrt{2}, 2$ , etc.

A coincidência entre o fator  $\sqrt{2}$  desta série é a mesma encontrada nas comparações entre as classes nucleares mencionadas mais acima, levou Brummelkamp a tentar uma interpretação da natureza das classes intermediárias.

A base para esta interpretação é a curva de crescimento do macronúcleo dos Infusórios estudada por Popoff.

Este tipo muito especializado de núcleo passa durante a intercinese por duas fases com diferentes velocidades de crescimento chamadas respectivamente "Funktionelle Wachstum Phase" e "Teilungs Wachstum Phase".

Na primeira fase, de crescimento mais vagaroso, o núcleo cresce até alcançar um volume mais ou menos 1,32 vezes o volume inicial para depois na segunda fase com um crescimento muito mais rápido alcançar o duplo do volume inicial. Durante a primeira fase Brummelkamp verifica que quando o núcleo aumenta de um até 1,32, o citoplasma varia de um até 1,80. Como

o quadrado de 1,32 é 1,74 Brummelkamp acha poder considerar este valor aproximadamente igual a 1,80 e portanto ser válida a relação  $K \sim C^{1/2}$ . isto é, o volume nuclear igual a raiz quadrada do volume do citoplasma. No caso da primeira fase o crescimento é tal que para uma duplicação do citoplasma o núcleo aumentaria de um valor proporcional a  $\sqrt{2}$  vezes o valor originário. O autor confessa não encontrar uma interpretação causal desta relação. Ele depois complica enormemente as coisas considerando as pesquisas de vários outros autores sobre vários materiais que parecem indicar que a massa nuclear é proporcional a superfície celular ou seja  $K \sim C^{2/3}$ . Para demonstrar que as duas relações estão ambas válidas Brummelkamp constrói um diagrama em coordenadas logarítmicas no qual duas linhas retas com inclinação respectivamente  $1/2$  e  $2/3$  indicam as duas funções supracitadas, entre volume do núcleo e volume do citoplasma e volume do núcleo e superfície celular. Neste diagrama ele constata que as duas linhas são "aproximadamente coincidentes" na região do diagrama onde se encontram os dados da "Funktionelle Wachstumsphase" e das células nervosas previamente estudadas por Bock. Ele acha, portanto, que ficando válida a proporcionalidade do volume nuclear com a superfície celular dá-se também a validade aproximada da relação entre o volume do núcleo e o do citoplasma  $K \sim D^{1/2}$ . Portanto, segundo Brummelkamp as classes intermediárias ou " $\sqrt{2}$  Klassen" como ele as chama, seriam representadas por núcleos de células nas quais o citoplasma teria duplicado e o núcleo teria aumentado de  $\sqrt{2}$  vezes o inicial conforme as aproximações acima explicadas.

Tudo isto nos parece absolutamente pura especulação não tendo nem uma base biológica que permita esta explicação. As duas fases do crescimento do macronúcleo tem, com certeza, uma significação biológica, considerando também que o coeficiente de variação térmica ( $Q_{10}$ ) das duas fases é diferente e apresenta algumas relações com o comportamento dos núcleos na segmentação (Fauré-Fremiet, 18). O único ponto que achamos interessante na teoria de Brummelkamp é que as classes intermediárias representariam fases do crescimento intercinético do núcleo, o que não aparece absolutamente na teoria de Hertwig.

\* \* \*

Achamos necessário relatar detalhadamente estas especulações de Brummelkamp e de Hertwig para esclarecer como se baseiam essas teorias nas quais o algarismo de  $\sqrt{2}$  aparece como uma espécie de chave mágica

para a compreensão destes fenômenos. A explicação de Hertwig é puramente teórica com os dois fatores desconhecidos que relacionam o número de cromosômios uma vez ao volume e outra a superfície do núcleo. A teoria de Brummelkamp é, apesar da sua estrutura matemática, totalmente arbitrária, sendo as aproximações admitidas de valor puramente subjetivo.

Ambas nos parecem carecer de base para uma explicação dos fenômenos de crescimento rítmico ou descontínuo com módulo diferente de 2 estando além disso, bem longe de qualquer relação com os fenômenos genéticos.

Mais recentemente a relação de 1:1,5 foi encontrada no estudo cariométrico dos núcleos cutâneos isolados, por D. Ziegler Kraemer (58). Esta autora verificou constantemente um aumento de 50% do volume depois do tratamento com os carcinógenos. Isto quer dizer que os volumes passam de um valor 1 a 1,5. Outra verificação desta relação foi dada por Salvatore e G. Schreiber (45) no ciclo do crescimento interfásico dos tecidos uterinos (seja endo que miométrio) nos quais foi verificada uma série de valores volumétricos "rítmicos" (modas das curvas de frequência) que seguem rigorosamente a série 1: 1,5: 2: 3: 4: 6: 8: 12, etc.

4) *Variações rítmicas do volume nuclear em sentido diminutivo.* Até agora temos considerado o crescimento descontínuo do núcleo e as relações entre as classes estatísticas de tamanho diferente na comparação entre núcleos de indivíduos ou de espécie diferentes ou em condições patológicas. Várias pesquisas, porém, mostraram que o volume nuclear pode apresentar uma série de valores proporcionais e descontínuos em sentido diminutivo. Sobre certos aspectos este fenômeno se depara mais simples como interpretação pois uma divisão sempre leva a formação de classes nucleares de tamanho geralmente da metade do inicial. Raríssimas vezes a divisão nuclear leva a dois produtos de tamanhos diferentes. Estes fenômenos poderiam por si mesmos endereçar a uma interpretação das classes de tamanho rítmicas em sentido rigidamente genético. O que varia nas divisões, equacionais ou reducionais é sempre o número de cromosômas, e, portanto, a proporcionalidade dos volumes deveria ser de óbvias interpretações. Mesmo na mitose normal nós devemos a rigor considerar o núcleo profásico como tetraploide e os dois núcleos filhos voltam a situação diploide.

A existência, porém, de reduções com intervalos volumétricos menores do dimidiação complica a situação e vem nos fornecer alguns dados pela interpretação das classes intermediárias em termos genéticos

\* \* \*

Desde os primeiros estudos de Jacobj apareceu claro o dimidiação do volume nuclear na série espermatogênica. Os espermatocitos de primeira ordem, dos de segunda ordem, e os espermatídios estão em relação volumétrica de 4:2:1.

Mais um outro caso de redução rítmica do volume nuclear foi verificado na espermatogênese. Além das indicações que já mencionamos de Jacobj (34) e Freerksen (19) na espermatogênese normal, G. Hertwig (28) e Spuhler (54) indicaram outros casos nos quais existe uma terceira divisão depois do espermatídio que dimidia mais uma vez o volume nuclear. Hertwig mostrou nestes casos que a relação entre o volume do auxocitos e o último produto das divisões espermatogenéticas é de 8 vêzes em lugar de 4 como de costume. Nos insetos, onde pela característica estrutura testicular é possível contar o número de espermatozoides produzidos em cada quisto e possível portanto, determinar o número de divisões de cada espermatogônio. Neste caso, contrariamente ao que se verifica nos vertebrados parece se alcançar um volume 8 vêzes menor com somente duas divisões. Hertwig comentando êstes achados admite a possibilidade de que durante a divisão parte do conteúdo nuclear seja perdido no citoplasma analogamente ao que acontece nos conhecidos casos de "diminuição cromatínica" do *Ascaris* e do *Ditiscus*. Resultaria assim, em cada divisão, uma diminuição maior do que a metade.

Parecem-nos êstes fenômenos, se ulteriormente confirmados, ser do maior interêsse e ter uma certa analogia com os fenômenos que acontecem na ruptura da vesícula germinativa e mereceriam ser mais profundamente estudados tendo também presente o fenômeno inverso da reincorporação dêstes materiais nucleares do citoplasma durante a segmentação que já mencionamos.

\* \* \*

Além da série gametogenética cuja interpretação em termos cromossômicos é absolutamente clara devemos analisar aqui duas séries de fenômenos diminutivos, do volume nuclear: a dos núcleos dos blastômeros em segmentação, e a dos núcleos de tecidos já diferenciados nas fases mais adiantadas do desenvolvimento embrionário ou larval.

G. Hertwig (27-30) considera as sucessivas divisões dos blastômeros que levam a uma progressiva diminuição do volume nuclear no conjunto destes fenômenos cariométricos. Êle constata que esta redução se dá com dimidiação progressiva do tamanho nuclear e êle chama êste processo "Multiple Succedanteilungen". Para êste processo poder-se verificar, é necessário que os núcleos estejam inicialmente "mitosebereit" ou seja, prontos para a mitose. Isto se pode dar somente nos núcleos fortemente poliploides ou "polimeros" ou "politênicos" ou "meertwertig" (conforme as denominações de autores diferentes para êstes dois últimos termos) isto é com os cromosômios em número múltiplo de um valor básico ou com os cromosômios constituídos pela reunião de um número múltiplo de cromonemas.

Devemos aqui lembrar que não sempre as divisões de segmentação levam os núcleos a um dimidiação nas sucessivas gerações de blastômeros. Entre uma segmentação e a sucessiva pode haver crescimento interfásico mais ou menos extenso. Além disso ao que parece das pesquisas de Godlewsky (22) os núcleos dos blastonieros seriam ligeiramente maiores do que a metade do núcleo progenitor por ter-se em cada geração de blastômeros incorporada no núcleo uma certa fração do material nuclear existente no citoplasma do ovo e que se tinha localizado alí no momento da ruptura da vesícula germinativa. Todos estes fatos nos parecem da maior significação pela interpretação a participação nuclear no desenvolvimento, mas devemos confessar que pouco ou nada foi feito até agora com rigoroso método quantitativo. Devemos lembrar aqui somente as pesquisas de Godlewsky (22), Conklin (12), Enriques (16-17) e Levi (36), sôbre as mais diferentes espécies animais que mostraram que o ritmo do crescimento total da massa nuclear nas sucessivas gerações de blastômeros não é igual nas diferentes espécies e em diferentes períodos da segmentação. Porém, um estudo comparativo sôbre o volume dos núcleos dos blastômeros durante o desenvolvimento nas diferentes espécies ainda não existe.

\* \* \*

O fenômeno de dimidiação dos núcleos durante o desenvolvimento não é limitado à fase de segmentação mas continúa também nos órgãos especializados. Isto foi constatado estatisticamente por B. Schreiber e Angeletti (46), no estudo cariométrico do fígado durante o desenvolvimento da carpa (*Cyprinus carpio* var. *specularis*). Nos alevinos deste peixe de 17 mm os núcleos hepáticos apresentam um polígono de frequência com u'a moda ao volume 18,8; os alevinos de 22 mm o máximo de

frequência é ao valor 9,4; a 40 mm o valor modal é 4,77. Os alevinos de 175 mm e os de 360 mm apresentam uma curva de frequência com 2 formas respectivamente, 4,77 e 9,4. Os alevinos de 540, 670, 760 mm têm três modas respectivamente, 4,77 — 9,4 — 18,8 e os de 850 mm também três modas: 9,4 — 19,8 — 37,6.

Podemos dividir, portanto, o desenvolvimento larval em dois períodos, o primeiro anterior aos 40 mm de comprimento, no qual o fígado apresenta uma diminuição do volume nuclear que se processa por dimensões sucessivas. Alcançado um tamanho mínimo as células crescem ritmicamente, isto é, por endomitose, dando núcleos duplos, quádruplos e óctuplos do mínimo. O momento no qual este valor mínimo é alcançado corresponde àquêle no qual se dá o início do diferenciamento citológico da célula hepática e do funcionamento específico (aparecimento de granulações e vacuolação do citoplasma). No estágio de 17 e 22 mm somente foram encontradas mitoses (mais ou menos 3%) ao passo que em nenhum outro estágio elas estão presentes. Isto leva os autores a considerar a diminuição do volume como devida a divisões sem crescimento interfásico ("Multiple Succedanteilungen" de G. Hertwig) ao passo que depois de 40 mm há crescimento interfásico sem divisão (endomitose).

Análogos fenômenos foram encontrados no embrião e adulto de pinto por A. Binda e relatados por B. Schreiber.

\* \* \*

Em pesquisa destinada a controlar os fenômenos descritos por B. Schreiber e Angeletti, G. Schreiber e M. Romano-Schreiber (53) nos girinos de *Bufo vulgaris* encontraram uma situação um pouco diferente. Foi estudada a variabilidade do volume nuclear no fígado e no pâncreas de uma série de girinos fixados em Padua (Italia) constituída de indivíduos de 10, 14, 29, 51, 72, 80 dias após a eclosão e de 7 estádios da metamorfose de idade entre 72 e 100 dias. Depois de iniciada a metamorfose a indicação em dias não é mais conveniente devido a notável variabilidade individual do andamento da metamorfose. Portanto a partir do início desta foi convencionalmente indicado o estágio padrão previamente estabelecido por G. Schreiber (47) por esta espécie.

Para cada estágio foi calculado o valor modal das curvas de frequência nuclear. Pelas razões já expostas foi este o valor utilizado como representativo do volume nuclear em cada estágio.

Como se vê na Figura 1, e diagrama que representa estes valores modais em função do tempo (idade ou estágio) o volume do núcleo di-

minue ritmicamente, isto é, de modo descontínuo e com valores proporcionais. O módulo desta proporção foi apontado aproximadamente como 1,41 para confrontá-los com os dados de Brummelkamp e de G. Hertwig ficando, porém, com reserva a respeito da realidade dêste algarismo. Do

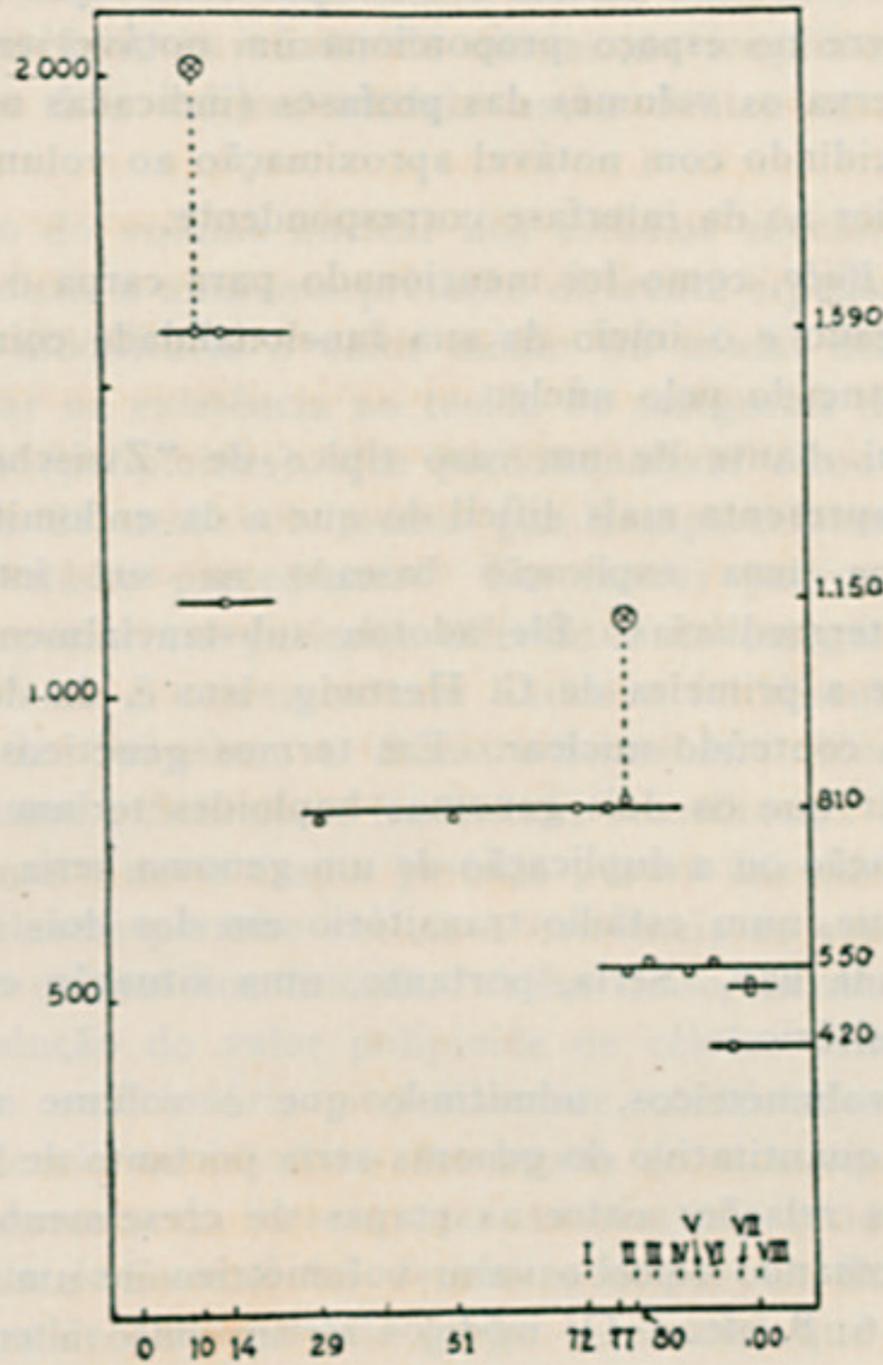


FIG. 1

Volumes nucleares (valores modais) durante o desenvolvimento do fígado dos girinos de *Bufo*.

Em abscissas — estádios de desenvolvimento (dias).

Em ordenadas — volumes nucleares (à direita, valores médios dos diferentes níveis)

⊕ profases.

(de Schreiber & Romano-Schreiber modificado.)

exame do diagrama pode-se constatar que durante todo o período premetamórfico dos núcleos ficam a um certo volume (810). Logo antes da metamorfose dá-se uma redução. Durante a metamorfose até o seu acabamento o núcleo fica ao nível 550 e num estágio final da metamorfose êle diminue ainda alcançando o nível de 420.

Nos dois estádios mais precoces de 10 e 14 dias o núcleo tem os valores de 1600 e 1200. Nestes dois estádios e no 77 dias, isto é, logo no começo da metamorfose encontram-se numerosas mitoses e a variabilidade é maior. Nestes estádios foram medidos os volumes das profases com a reserva, porém, de, estando os núcleos em profases elipsoides de rotação a sua orientação livre no espaço proporciona um notável erro nas medidas. Apesar desta reserva os volumes das profases (indicadas no diagrama com (x) ) estão coincidindo com notável aproximação ao volume do nível imediatamente superior ao da interfase correspondente.

Também no *Bufo*, como foi mencionado para carpa o diferenciamento histológico do fígado e o início da sua funcionalidade coincide com o volume mínimo alcançado pelo núcleo.

Estamos aqui diante de um caso típico de "Zwischenklassen", cuja interpretação se apresenta mais difícil do que a da endomitose. G. Schreiber (49), esboçou uma explicação baseado na sua interpretação geral destas classes intermediárias. Ele adotou substancialmente a explicação de Heindenhein e a primeira de G. Hertwig, isto é, da duplicação de somente metade do conteúdo nuclear. Em termos genéticos esta explicação leva-nos a admitir que os dois genomas haploides teriam diferentes velocidades de duplicação ou a duplicação de um genoma seria sucessiva aquela do outro assim que, num estádio transitório um dos dois seria já duplicado e o outro ainda não. Seria, portanto, uma situação correspondente a um triploide transitório.

Os valores volumétricos, admitindo que o volume nuclear exprima fielmente o valor quantitativo do genoma seria portanto de 1,5 maior do que o precedente. As relações entre as etapas de crescimento sucessivas seriam, portanto, tomando como o valor volumétrico de um núcleo diploide, 1: 1, 5: 2: 3: 4: 6: 8, etc.. Os módulos seriam então alternadamente  $3/2$  e  $4/3$ , isto é, 1,5 e 1,33.

No trabalho de 1943 foi frisado que por acaso a média aritmética entre 1,5 e 1,33 é 1,415 e, portanto, a coincidência deste valor com o algarismo de  $\sqrt{2}$  (1,413) teria encaminhado Hertwig e Brummelkamp para as interpretações que foram examinadas acima e que, portanto, poderiam carcer de fundamento. A notável variabilidade dos dados estatísticos não permite sempre uma exata avaliação dos módulos e, portanto, no conjunto das diferentes pesquisas, o valor médio de 1,41 aparece mais frequentemente.

Foram indicadas várias provas da natureza citológica deste fenômeno como também num trabalho sucessivo, de 1946, foram indicadas outras interpretações que porém não alteram a essência do fenômeno.

A série diminutiva dos volumes nucleares de *Bufo* seria determinada pela combinação do crescimento interfásico limitado a 1,5 vezes com uma divisão por dimidiação destes núcleos, sempre naturalmente em núcleos politênicos ou poliploides.

No pâncreas dá-se absolutamente a mesma situação, ligeiramente complicada pela existência, às vezes, de curvas de frequência bi-modais nas quais, porém, os dois valores modais estão dentre os valores da série descrita.

Esta redução do volume nuclear nos estádios sucessivos de desenvolvimento pode induzir a uma interpretação diferente e pensar em um "efeito estatístico" que modificaria o valor médio ou modal do volume nuclear. Poder-se-ia pensar na existência no tecido de categorias de células diferentes por tamanho (poliploides), que predominariam como número nos estádios sucessivos de desenvolvimento por desaparecimento das que predominavam no estágio precedente. Em outras palavras poderia haver proliferação diferencial em períodos diferentes de categorias diferentes de células. O problema é evidentemente básico e foi discutido desde o primeiro trabalho de Schreiber e Romano-Schreiber. Num trabalho mais recente de Salvatore e Schreiber, fenômenos semelhantes foram verificados nas células uterinas e neste caso a perfeita pureza das curvas de frequência dos volumes nucleares permite excluir a existência de categorias diferentes de células desde os estádios iniciais. Além disso, existem fenômenos semelhantes de redução do valor poliploide de células somáticas durante o desenvolvimento embrionário perfeitamente controladas citologicamente (Berger e sua Escola no intestino das larvas de mosquito) que autorizam a pensar em fenômenos do mesmo tipo também nos tecidos somáticos dos vertebrados. Este fenômeno foi denominado por G. Schreiber em 1943 (49) com o termo de "elasse" (do grego — elassis) que significa redução mas não pode confundir-se com outros fenômenos reducionais como a meiose ou a "chromatin diminution".

Depois destas pesquisas sobre o *Bufo*, Dussa (1944) (15) verificou também uma diminuição volumétrica do núcleo no fígado dos girinos, mas segundo este autor esta não seria "rítmica" mas sim devida a fenômenos de hidratação nuclear. Não tendo podido por causa da situação atual alcançar o trabalho original de Dussa, achamos inútil por enquanto contestar aqui estes resultados. Sucessivamente (1945) Paccagnella (41) verificou no Axolotl a redução rítmica do volume nuclear durante o primeiro ano de vida, seguida no segundo ano por um aumento do volume segundo a série de duplicação. Isto é exatamente como na Carpa. Paccagnella encontra também as "Zwischenklassen" de 1,5 vezes o volume básico.

Este autor interpreta a diminuição do volume nuclear como devida à prevalência em períodos sucessivos de células diploides, em seguida ao desaparecimento das tetraploides prevalentes nos estádios precedentes. Este problema já foi discutido mais acima.

Achamos necessário conhecer mais profundamente o que acontece durante a interfase antes de nos permitir uma interpretação definitiva dos fenômenos de redução rítmica e especialmente dos de redução com as classe 1.5.

5) *Fim do trabalho e escolha do material.* O problema do crescimento do núcleo como foi até agora examinado abrange o problema mais complexo e importante da multiplicação dos gens e a duplicação dos cromossomas no núcleo interfásico.

Para ter a possibilidade de deduzir algo sobre este fenômeno em base aos estudos cariométricos é absolutamente preciso estabelecer antes se o volume do núcleo corresponde a situação quantitativa do genoma, ou se esta correspondência não estiver perfeita em quais condições esta correspondência é válida.

Já mencionamos que uma possibilidade de esclarecer este problema é o estudo cariométrico dos poliploides. Muitos trabalhos foram feitos especialmente no campo botânico neste sentido. G. Schreiber (52) verificou mais uma vez esta correlação numa série de plantas poliploides de *Coffea*, e analisou nesta ocasião as condições que devem ser observadas nas pesquisas para poder ter confiança nos resultados.

Outro campo de pesquisas nos é fornecido pelos trabalhos sobre a espermatogênese como os de Jacobj (33), Freerksen (18), Hertwig (24,27), Wermel (55), Spuhler (54), e B. Schreiber (45). Todas elas verificaram, apesar de certas discordâncias, como no caso dos insetos (Wermel, 56), que, ao menos na maioria dos casos, a correlação entre o valor múltiplo do genoma e o volume nuclear é perfeita.

Poderia, portanto, parecer inútil voltar neste assunto, mas achamos que em todas as pesquisas precedentes foi dada pouca atenção ao espermatogônio.

De fato esta categoria de células testiculares está fóra da série meiótica e tem por sua conta uma série de ciclos mitóticos independentes da meiose. Alguns animais apresentam antes de iniciar a meiose uma série de divisões espermatogoniais sucessivas nas quais o volume nuclear destes gônios diminui progressivamente. Não queremos aqui entrar na análise deste fenômeno que nos parece muito semelhante ao da "elasse" embrional que foi analisado a propósito do fígado.

O que achamos interessante, aqui, é confrontar os núcleos das espermatogônias durante o seu crescimento interfásico, com os núcleos das fases

meióticas. Nós temos aqui uma situação que achamos preciosa: isto é, a possibilidade de ter no mesmo tecido, e, portanto, sujeitos às mesmas alterações devidas ao tratamento histológico, um núcleo em crescimento interfásico e uma série de núcleos cuja constituição cromosômica está bem conhecida e que se dividem sem crescimento interfásico.

Temos, em linguagem figurada, um núcleo que percorre um caminho: os marcos milliários ao longo deste caminho marcam etapas sucessivas correspondentes ao número de genomas.

A dificuldade que a maioria dos animais apresenta para um estudo cariométrico das espermatogônias é que os núcleos destas células são geralmente de forma não perfeitamente esférica; frequentemente achatado, ou deformado nas mais variadas direções. Uma apreciação do volume destes núcleos seria, portanto, muito aleatória.

Já foi discutido o problema da forma do núcleo nas pesquisas cariométricas (G. Schreiber, 52) e não queremos voltar aqui neste assunto. Achamos somente que algumas das pesquisas cariométricas, que se encontram na literatura, estão viciadas por este defeito. Nos ofídios, esta dificuldade não existe, pois, na totalidade das espécies que foram examinadas no presente trabalho, os núcleos espermatogoniais são perfeitamente esféricos.

\* \* \*

No crescimento do núcleo da espermatogonia devemos distinguir duas fases nitidamente diferentes: uma é o crescimento interfásico das mitoses proliferativas; a outra é o crescimento auxocitário que leva o espermatogônio, depois da última mitose gonial, a se transformar em espermatocita de primeira ordem.

A diferença entre estas duas interfases é substancial, pois, no segundo tipo se dão o pareamento e o "crossing-over" dos cromosomas que são os fenômenos fundamentais da sexualidade. Qual é a causa pela qual, depois de um ciclo mitótico, o núcleo gonial desvia para o crescimento auxocitário, nós não conhecemos. Com certeza, acontece um fenômeno de endomitose, pois, os gens duplicam-se, os cromosômios se desdobram, sem se formar antes o fuso nuclear e a divisão dos centrômeros. A essência do fenômeno, como é concebido por Darlington é uma precocidade de algumas das manifestações da divisão respeito a outra. De qualquer modo o resultado é um núcleo tetraploide ou tetravalente, isto é, com 4 complementos de gens haploides e, como será ilustrado mais adiante, o volume do auxocito no fim do seu crescimento (paquiteno) corresponde perfeitamente ao volume da profase espermatogonial ( $4n$ ).

Podemos, portanto, confrontar as duas interfases que temos examinado antes: interfase das mitoses goniais e interfase auxocitária. O intervalo de crescimento é o mesmo. O que nestas pesquisas se revelou é a diferença do ritmo deste crescimento.

Levi e Terni (37) analisaram o crescimento auxocitário nos anfíbios do ponto de vista citométrico, mas os resultados não nos fornecem dados esclarecedores no que se refere ao volume nuclear e achamos muito importante analisar mais profundamente este assunto no futuro.

\* \* \*

Para resumir esta introdução podemos definir o fim destas pesquisas como o estudo cariométrico dos núcleos das espermatogonias em ativa multiplicação mitótica confrontando com os estádios de variação do volume nuclear das fases da meiose com número de cromosômios conhecido.

A situação topográfica no lumem do canalículo e o aspecto morfológico dos núcleos nos proporcionam a possibilidade de reconhecer com absoluta certeza as 4 categorias de células germinais e obter assim polígonos de frequência perfeitamente puros de cada tipo de células.

## II) MATERIAL E MÉTODOS

### a) *Escolha do material*

As pesquisas foram realizadas sobre os testículos de ofídios brasileiros, aproveitando o copioso material vivo que chega continuamente ao Instituto Butantan de toda parte do Brasil.

O material foi colhido em diferentes épocas do ano, sendo, portanto, para cada espécie, escolhida a época de maturação. Na descrição dos resultados será dada, para cada caso, a indicação do grau de maturidade sexual do testículo estudado. Em alguns casos foi estudado também o testículo em fase juvenil ou em repouso. De uma espécie foi possível estudar um testículo embrional (*Xenodon*).

### b) *Técnica histológica e embriológica*

Os testículos, colhidos em ligeira narcose etérea ou clorofórmica, foram fixados quase todos em líquido de Dubosq-Brasil (Bouin alcoólico) em pequenos pedaços bem abertos, de forma a apresentar a superfície in-

terna do testículo ao fixador. Praticamente isto se obtém facilmente abrindo o testículo com uma tesoura com um corte longitudinal e revolvendo para fóra a parte interna do testículo, ficando assim, a massa esponjosa dos canaliculos em direto contacto com o fixador.

Este procedimento permite sempre contar os cromosômios nas metafases das primeiras divisões e a perfeita visibilidade dos quiasmas nas diacineses dos espermatocitos de primeira ordem.

Os cortes foram feitos geralmente de 10 a 12 micra, coloridos com Hematoxilina de Harris ou de Heidenhain com eosina.

As medidas foram executadas desenhando com a câmara lúcida a uma amplificação de 1890 de mais ou menos duzentos núcleos de cada estágio, sendo porém às vezes, bastante difícil encontrar suficientes espermatocitos de segunda ordem.

Sobre os desenhos assim obtidos foram medidos os dois diâmetros cruzados (maior e menor) e feita a média aritmética destas medidas. O valor do diâmetro médio (em milímetros a ampliação do desenho) foi usado como variável estatística, grupados em classes de meio milímetro e feita a curva de frequência.

A medida dos diferentes tipos de núcleos é facilitada pela possibilidade de reconhecê-los imediatamente, seja pela localização, seja pelo aspecto morfológico. Às vezes, foram medidos juntos os núcleos dos espermatocitos de segunda ordem e das espermatídas devido a dificuldade de encontrar os primeiros e somente foram depois separados na curva de frequência as duas modas nitidamente distintas. Dos espermatocitos de primeira ordem foram medidos somente as formas de paquitenos e diplotenos e não as de leptotenos que estão ainda em crescimento interfásico (êste fenômeno será objeto de um trabalho sucessivo) e as fases de diacinese, que se apresentam às vezes mais deformadas.

As espermatogonias estão estritamente localizadas imediatamente em baixo da parede do canalículo e se distinguem perfeitamente das primeiras fases do auxocito como também dos espermatocitos de segunda ordem, que têm mais ou menos o mesmo tamanho. O núcleo das espermatogonias é perfeitamente esférico e isto foi uma das razões pela qual as medidas deram um resultado bem claro. As profases das espermatogonias, pelo contrário, estão mais elíticas e não orientadas. As suas medidas, portanto, não têm uma exatidão tão grande como as dos outros estádios. Estas medidas, portanto, não foram utilizadas nos cálculos da curva de regressão e as indicações foram dadas como média aritmética das medidas individuais ou em poucos casos onde as profases se encontram mais frequentes como moda.

c) *Elaboração estatística dos resultados*

Das curvas de frequência dos diâmetros foram calculados os valores modais por perequação das frequências e aplicação da fórmula:

$$M_o = L_{mo} + \frac{F}{F \times f} \times i$$

onde  $L_{mo}$  é o limite inferior da classe modal,  $F$  é a frequência da classe superior à da moda  $f$  a inferior e  $i$  é o intervalo de classe (0,5) (Arkin e Colton, 2).

Obtidos assim os valores modais dos diâmetros foram calculados os volumes das esferas correspondentes.

Para o estudo da relação entre volume nuclear e valor múltiplo do genoma, os valores modais das diferentes categorias de núcleos em cada espécie de ofídio foram diagramados no seguinte modo: nas abcissas os valores múltiplos do genoma e nas ordenadas os valores modais das curvas dos núcleos das diferentes fases espermatogénicas. Assim foram consideradas como haploides ( $n = 1$ ) as espermatídias, como diploides ( $n = 2$ ) os espermatocitos de segunda ordem e as espermatogonias e como tetraploides ( $n = 4$ ) os espermatocitos de primeira ordem e os profases goniais.

Neste diagrama foi calculada a equação de regressão (\*\*\*) e com os respectivos valores teóricos para cada valor da abcissa foi calculado o "Erro de estimação"  $\bar{S}_y = \sqrt{\frac{\sum D^2}{N-2}}$  usando o valor  $N-2$  devido ao pequeno número de valores incluídos no cálculo.

O erro de estimação é a medida que nos permite julgar da atendibilidade dos valores que se afastam dos valores teóricos da linha de regressão e de julgar, portanto, se os afastamentos devem ser considerados no limite dos desvios causais ou se pelo contrário estes afastamentos são devidos a causas definidas, e portanto, revelarem uma significação específica.

(\*\*\*)

$$y' = \bar{y} + \frac{S_{(dx, dy)}}{S_{dx^2}} \cdot (\bar{x} - x)$$

### III) RESULTADOS

Reproduzimos aqui para cada espécie, o gráfico (A) dos histogramas das frequências dos diâmetros nucleares de cada estágio espermatogenético e o gráfico de correlação entre volume modal e valor múltiplo do genoma (B). Os valores das ordenadas do gráfico B, portanto, correspondem aos valores modais das curvas dos gráficos A.

Como já temos esclarecido foram considerados os espermatocitos de primeira ordem como tetraploides, aqueles de segunda ordem como diploides e as espermatídias como haploides. As espermatogônias teoricamente são diploides, porém, elas têm crescimento interfásico que as leva ao valor tetraploide da profase. Durante este crescimento os núcleos variam de volume e, como será indicado mais adiante, a maioria dos espermatogônias têm um valor maior do que os diploides e está bem afastado do valor teórico diploide da linha de regressão. Este valor é, porém, bem coincidente com o valor teórico triploide e em quase todos os diagramas B está bem coincidente com o ponto correspondente da linha de regressão e dentro do limite fiducial do Erro de estimação. Portanto, no cálculo da linha de regressão estes valores dos volumes dos espermatogônias foram considerados efetivamente como pertencentes a abscissa  $3n$ . A absoluta constância deste fenômeno em todas as espécies examinadas nos leva a convicção de que este valor tem uma real significação biológica que será considerada mais adiante.

Em alguns casos as espermatogônias têm uma curva de frequência nitidamente bimodal, sendo uma das modas, geralmente a maior no valor de  $3n$  e a outra perfeitamente coincidente com a de  $2n$  das espermatocitas de segunda ordem. Nestes casos todos os dois valores modais foram utilizados no cálculo da equação de regressão um como  $2n$  e outro como  $3n$ .

\* \* \*

Foram estudados com este método os testículos das seguintes cobras constantes do seguinte esquema, em ordem sistemática (Lista remissiva dos ophidios do Brasil, de Afranio do Amaral, 2.<sup>a</sup> Ed., 1936 (1).

Fam. BOIDAE

sub-fam. *Boinae*

*Constrictor constrictor constrictor* L. (97)

## Fam. COLUBRIDAE

sub-fam. *Colubrinae**Chironius carinatus* L. (87)*Xenodon merremii* Wagler (19-65-77)sub-fam. *Boiginae**Pseudoboa trigemina* D. et B. (17-21)*Thamnodynastes (Dryophylax) pallidus pallidus* L. (27) (\*)*Tomodon dorsatus* D. et B. (68)*Phylodryas olfersii* Lichtenstein (66)*Phylodryas schotii* Schlegel (1-15)

## Fam. CROTALIDAE.

sub-fam. *Lachesinae**Bothrops atrox* L. (84)*Bothrops jararaca* Wied (47)sub-fam. *Crotalinae**Crotalus terrificus terrificus* Laurenti (61)

\* \* \*

Durante estas pesquisas foram examinados muitos mais exemplares dos que aqui estão apresentados; o número reduzido aqui se deve, além da dificuldade de encontrar machos em algumas espécies, ao ponto de termos escolhido somente aqueles nos quais os testículos se apresentavam mais favoráveis ao estudo pelo grau de maturidade. Alguns dos exemplares estudados são muito jovens justamente para o estudo das fases iniciais da espermatogênese em relação especialmente ao tamanho das espermatogonias. O número entre aspas e a indicação do protocolo.

Damos aqui as indicações pormenorizadas dos casos estudados com os diagramas "A" dos histogramas dos volumes nucleares nas diferentes células testiculares e "B" o diagrama da correlação entre o volume nuclear (valor modal) de cada tipo de células testiculares e o número de cromosomas (valor múltiplo do genoma haploide correspondente).

\* \* \*

(\*) Esta espécie é atualmente objeto de uma revisão sistemática na Secção de Ofiologia do Instituto Butantan. Portanto deve ser considerada como provisória e poderá ser no futuro modificada.

Fam. BOIDAE

Sub-fam. *Boinae*

*Constrictor constrictor constrictor* L. (Prot. 97) Tab. I.

Indivíduo de 1 300 cm. Sacrificado no dia 28 de Maio de 1946. O testículo estava em maturação avançada.

Espermatogonias com poucas mitoses. Espermatocitas de 1a. ordem prevalentes nas fases iniciais (leptotenos). Raras as metafases Ias. O estágio dominante é o do espermatídio e o da espermiogênese. Raríssimos os espermatocitas de 2a. ordem.

Espermatozóides maduros no centro do canalículo, porém, sem lume vazio do canalículo.

O diagrama das frequências do volume nuclear, Fig. 2 A, é bastante regular para os espermatocitas de 1a. e 2a. ordens e as espermatídias. As espermatogônias têm um histograma bimodal.

O diagrama de correlação (Fig. 2 B) mostra uma perfeita correlação entre os valores modais e o valor múltiplo do genoma haploide. A segunda moda do histograma das espermatogônias coincide perfeitamente com o valor  $3n$  e quando diagramado em abcissa  $2n$  está num valor de ordenada bem além de  $3 S_y$  (Diferença entre valor do espermatogônio  $2n$  e 2a. moda é de  $345 ; 3 S_y = 88,05$ ).

TABELA I

*Constrictor constrictor constrictor* L. (97)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					1
8.5					7
9					29
9.5					65
10	3			3	53
10.5	9			2	8
11	33			10	2
11.5	22			13	
12	17			20	
12.5	22			5	
13	57		3	4	
13.5	55		17	0	
14	34		18	1	
14.5	18		25		
15	5	1	25		
15.5	3		11		
16			10		
16.5		1	3		
17					
17.5					
18					
Modas	795 1155	—	1596	808	452.5

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 961.2 \\ b' &= 379.4 \\ \overline{S_y} &= 29.35 \\ 3 S_y &= 88.05 \\ d &= 345 \end{aligned}$$

As profases goniais são escassas (2 sobre 278 gonias ou seja 0,7%) e os valores correspondentes a  $4n$ , porém, com notável variabilidade devida provavelmente a forma elipsóide não orientada (calculados como esferas de diâmetro médio entre os dois diâmetros, maior e menor, e isto dá valores diferente daqueles do elipsóide correspondente, se medido com os diâmetros orientado).

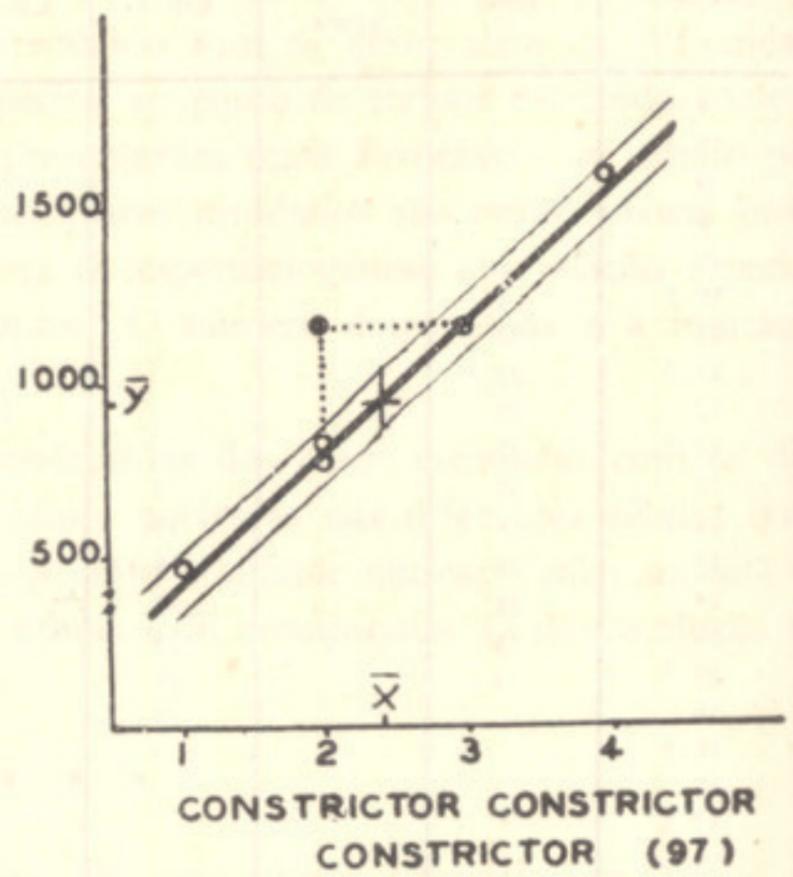
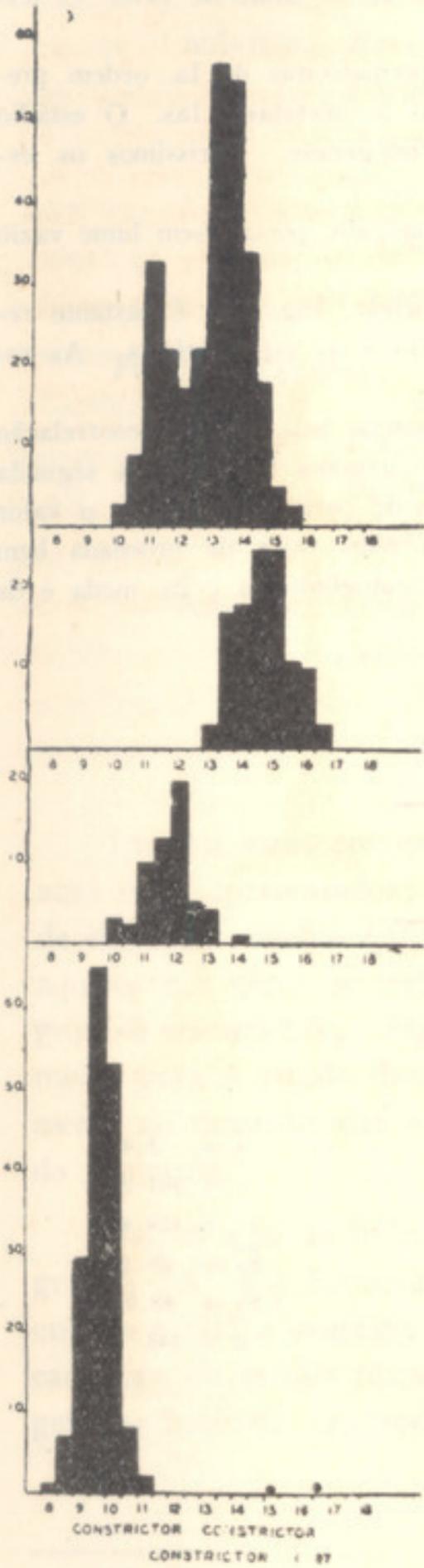


FIG. 2 A e B.

Fam. COLUBRIDAE

Sub-fam. *Colubrinae*

*Chironius carinatus* L. (Prot. 87) Tab. II.

Indivíduo de 114 centímetros. 20 de Abril de 1946. Testículo em perfeita maturação. Canálculos com amplo lume. Espermatozoides de 1a. ordem em tôdas as fases auxocitárias com frequentes metafases Ias. Espermatozoides de 2a. ordem bastante frequentes. Espermátidas e fases histogénicas em quantidades mais ou menos iguais. Espermatozoides em vários graus de maturidade em disposição colunar radial, poucos espermatozoides livres no lume.

Notável a frequência das profases goniais dispostas em grupos. A atividade mitótica destas células se reflete na irregularidade do histograma das espermatogônias.

Devido a esta irregularidade não foi calculada a moda dêste histograma e no diagrama de correlação foram considerados somente os elementos da série meiótica. (Fig. 3B).

Os histogramas (Fig. 3A) da série meiótica são absolutamente regulares.

Neste exemplar foram medidos alguns núcleos das células intersticiais. Os volumes nucleares destas células estão muito perto dos espermatozoides de 2a. ordem, isto é, dos diploides.

TABELA II

*Chironius carinatus* L. (87)

Diametro	Gonia	Profase gonial	Cit. I	Cit. II	Ide.	Intersticial
7.5						
8					1	
8.5					8	
9					25	
9.5					34	
10					31	
10.5				2	2	
11	2			5		
11.5	4			9		4
12	16			18		7
12.5	14			10		3
13	19		1	5		6
13.5	13		1	1		3
14	13		2			2
14.5	12		3			
15	17	4	15			
15.5	6	2	39			
16	2	4	24			
16.5		3	7			
17		1	4			
Modas	—	Média 2082	2027	904.2	449	997

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.6 \\ \bar{y} &= 1269 \\ b' &= 518.6 \end{aligned}$$

Neste exemplar não foi calculado o erro de estimação devido à irregularidade do histograma das espermatogônias acima mencionadas. Este fato deve ser encarado como um sintoma de atividade reprodutiva das espermatogônias cuja porcentagem de mitose é de 12,7%.

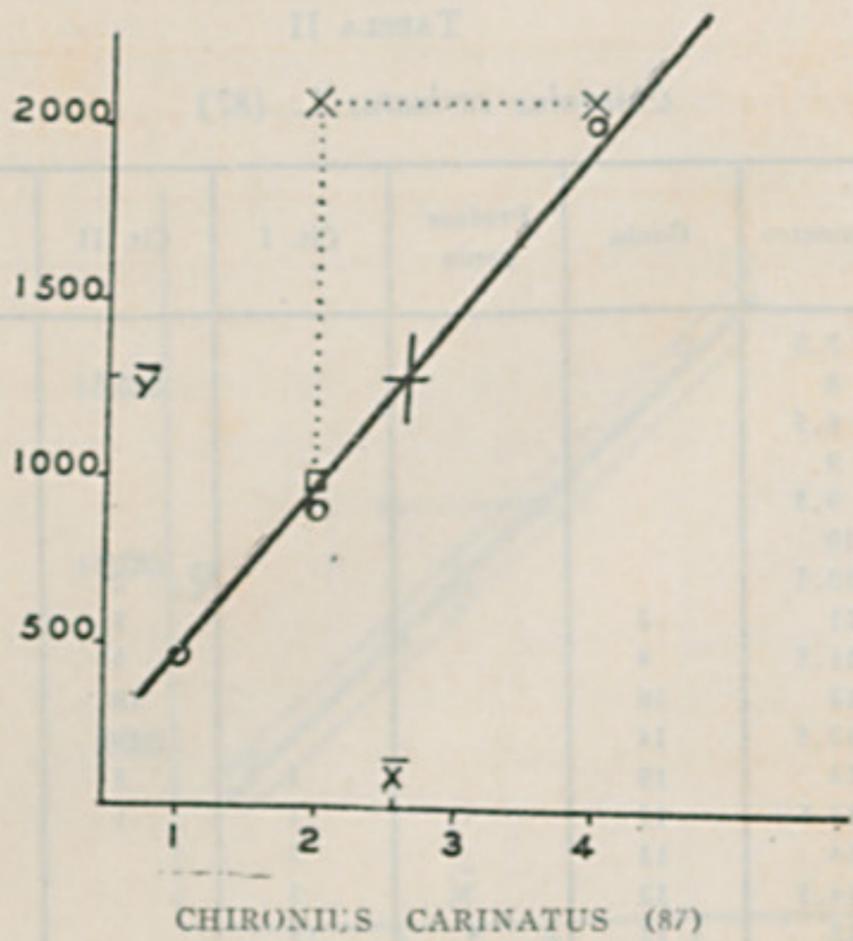
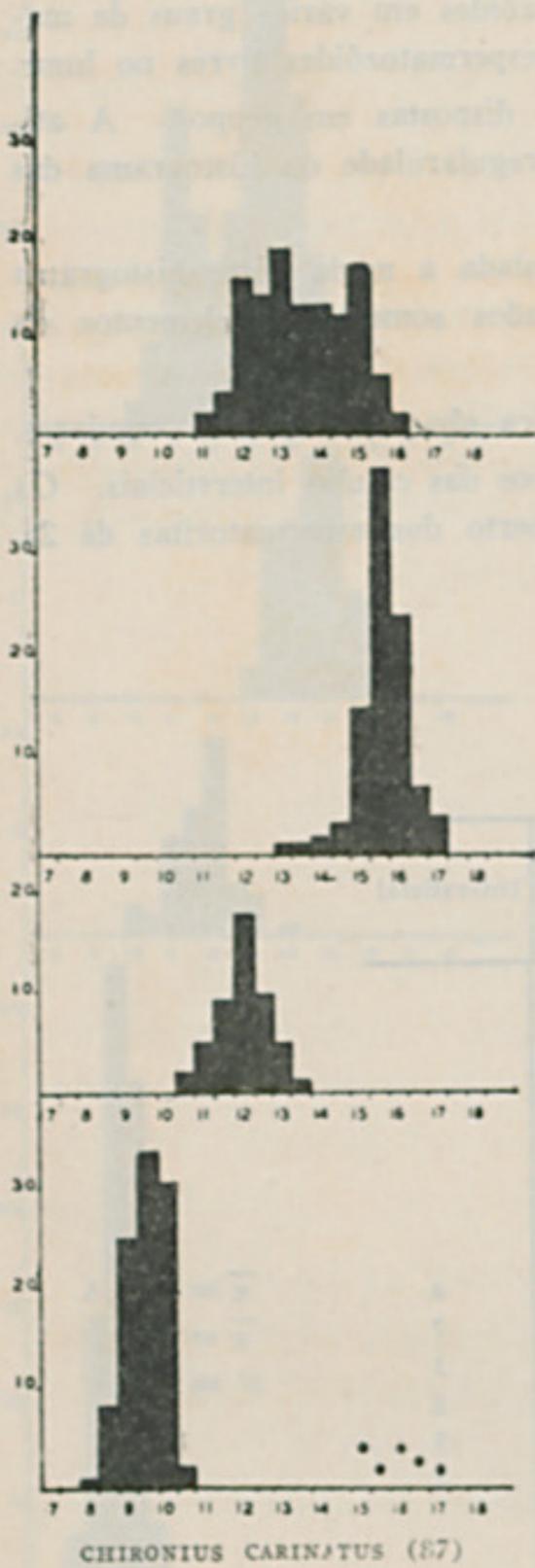


FIG. 3 A e B.

*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 19) Tab. III.

Indivíduo de 82 centímetros. Capturado durante a copulação em 31 de agosto de 1945. Histologicamente o testículo é perfeitamente maduro. Canalículos com lume vazio contendo espermatozoides maduros e em maturação pegados à parede. Espermatogônias com escassas profases (3,2%). Espermaticitas de primeira ordem escassos em maioria paquitenos com algumas ilhas de metafases primeiras. A fase predominante é a de espermatídio e de espermiogênese.

A Fig. 4 indica uma grande regularidade dos histogramas dos volumes nucleares. Os espermaticitos de primeira ordem têm uma ligeira moda mais ou menos coincidente com aquela das gonias que porem poderia desaparecer com uma ampliação do intervalo de classe e, portanto, não deve ser tomado em consideração.

O diagrama da Fig. 4B indica uma correlação bastante boa entre volume e cromossomos da série meiótica. O volume modal das espermatogônias como nos casos precedentes discorda com o valor diplóide sendo aproximadamente concordante com o valor 3n. A diferença entre o valor teórico 2n e o valor real é ligeiramente inferior a 3 Sy, sendo, porém, superior a 2 Sy.

TABELA III

*Xenodon merremii* Wagler (19)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					
8.5					7
9					33
9.5				1	41
10				0	35
10.5				6	5
11	2			21	
11.5	5			32	
12	7			36	
12.5	13			14	
13	14			6	
13.5	17			1	
14	17	1	7		
14.5	10		4		
15	4	1	10		
15.5	4		19		
16	1		18		
16.5			12		
17		1	7		
17.5			3		
18			2		
18.5			1		
Modas	1288	—	2132	805	449

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1168.5 \\ b' &= 523.2 \\ \bar{S}_y &= 182.9 \\ 3 \bar{S}_y &= 548.7 \quad 2 \bar{S}_y = 365 \\ d &= 381.6 \end{aligned}$$



*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 65) Tab. IV.

Indivíduo de 71 centímetros fixado em 26 de outubro de 1946. Testículo completamente maduro. Canaliculos vazios com espermatozoides livres e muitos outros empilhados na parede. Fase predominante é a da espermatídia e a da espermiogênese.

Gônios com numerosíssimas mitoses (35% profases sobre os gônios interfásicos medidos). Este número, é porém, ligeiramente superior ao real por serem as profases escolhidas ao passo que as interfases são medidas ao acaso. Espermatoцитas de primeira ordem relativamente escassos.

Os histogramas são regulares sendo aquêle dos espermatoцитas de primeira ordem ligeiramente assimétrico nos valores altos.

O histograma das espermatogônias tem uma segunda moda na classe 15. Calculando o valor modal dêste histograma com intervalo 1 em lugar de 0,5 o valor modal aumenta (1475). Este valor coincide muito mais de perto com o valor  $3n$  da equação de regressão do que aquêle calculado com intervalo 0,5. A este fato se deve a diferença com o valor indicado na tabela do trabalho precedente de 1946, para o mesmo indivíduo.

O diagrama de correlação, Fig. 5 B revela uma perfeita correlação entre os valores meióticos e a diferença com o valor diploide do volume espermatogonial significante sendo o erro de estimação muito pequeno.

TABELA IV

*Xenodon merremii* Wagler (65)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					6
8.5					25
9					34
9.5					25
10				1	15
10.5				5	3
11	5			9	
11.5	2			22	
12	7			47	
12.5	20			18	
13	36			13	
13.5	46		1	5	
14	34		2	1	
14.5	22	2	7		
15	26	8	17		
15.5	6	8	20		
16	1	5	15		
16.5	0	5	13		
17	1	1	9		
17.5		0	5		
18		1	3		
Modas	1475.5	1931	1933	904.7	383.7

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ y &= 117.9 \\ b' &= 527.87 \\ S_y &= 27.37 \\ 3 S_y &= 82.1 \\ d &= 560.24 \end{aligned}$$

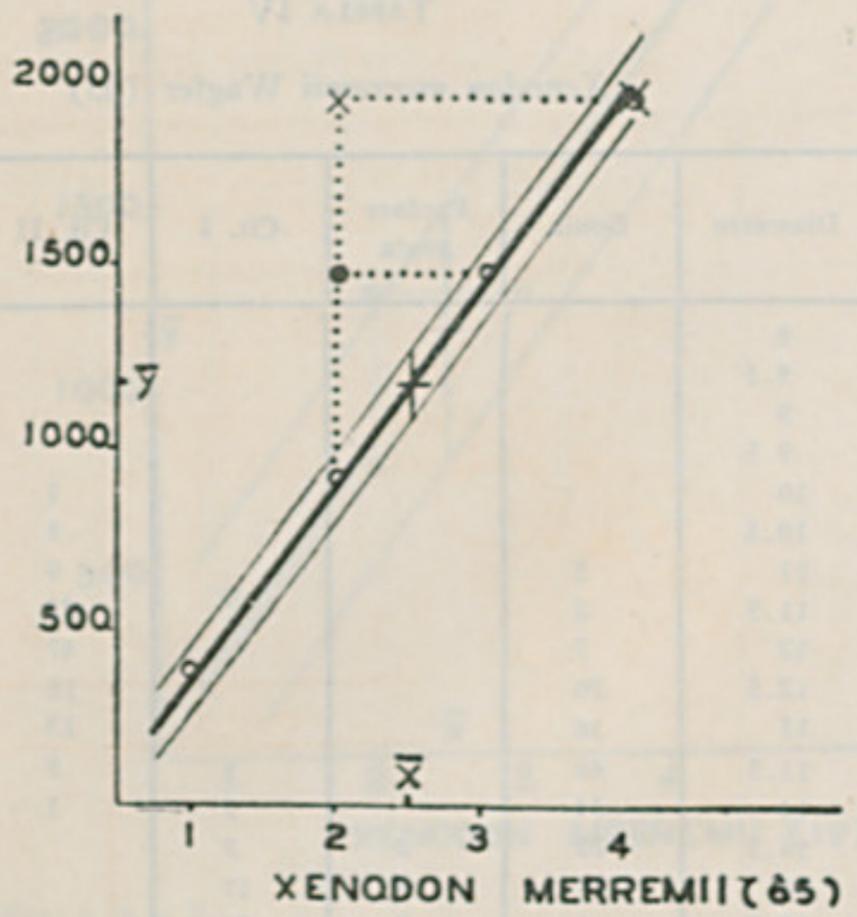
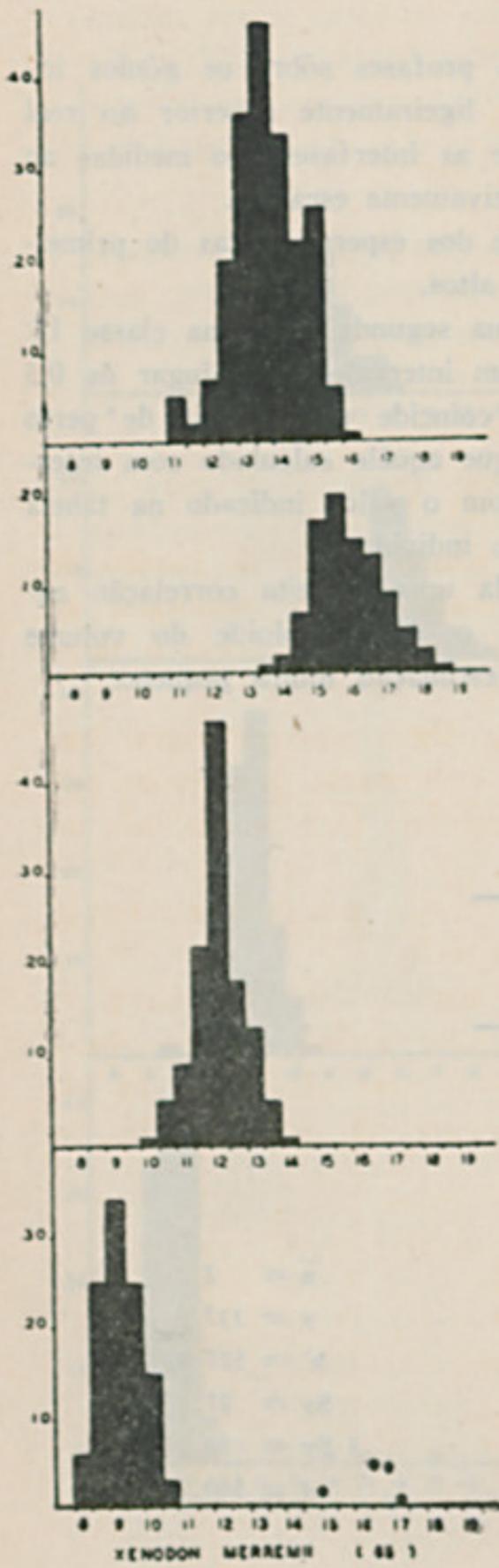


FIG. 5 A B

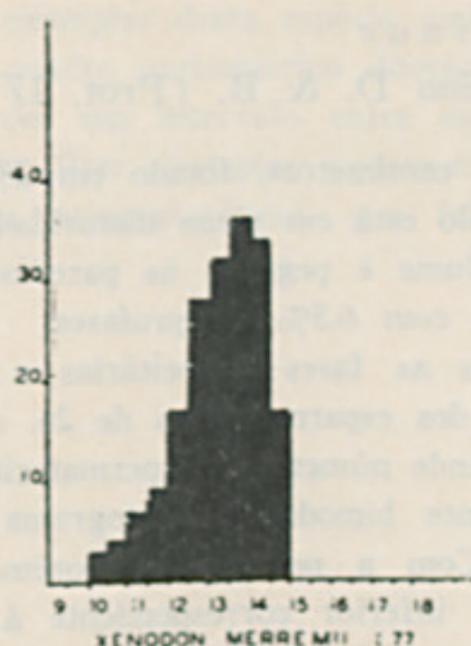


FIG. 6

*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 77) Tab. V.

Indivíduo muito jovem, de 36 centímetros, fixado em 15 de janeiro de 1946. Testículos extremamente pequenos, não maduros com canálculos ao estágio de cordões epiteliais cheios de espermatogônias em repouso e raras profases e ainda mais raras as metafases goniais.

A Fig. 6 mostra os resultados das medidas destes espermatogônias que dão um histograma bastante regular, embora ligeiramente assimétrico nos valores baixos. O valor modal de 1287 é concordante com os dos dois indivíduos maduros previamente examinados.

Como será discutido mais adiante este fato indica que estes espermatogônias estão em atividades multiplicativas, embora fraca.

Além disso este fato indica que as espermatogônias, nos indivíduos jovens antes da maturação sexual têm o mesmo valor nuclear dos espermatogônias dos indivíduos maduros e pelo menos entre estas idades não há gerações de gônias de volume diferente como se verifica, por exemplo, em outros vertebrados (Peixes).

TABELA V

*Xenodon merremii* Wagler (77)

Diametro	Gonia
10	3
10.5	4
11	7
11.5	9
12	17
12.5	28
13	32
13.5	36
14	34
14.5	17
Modas	1287

Sub-fam. *Boiginae*

*Pseudoboa trigemina* D. & B. (Prot. 17) Tab. VI

Indivíduo de 76 centímetros, fixado em 28 de Agosto de 1945. Histologicamente o testículo está em plena maturidade. Canalículos bem ocos com espermatozoides no lume e pegados às paredes.

Espermatogônias com 6.5% de profases. Espermatocitas de 1a. ordem, abundantes em tôdas as fases auxocitárias e frequentes as 1as. metafases.

Os histogramas dos espermatozocitas de 2a. ordem e das espermatídias são juntos devido ao grande número de espermatocitas de 2a. ordem. Isto dá um diagrama perfeitamente bimodal. Histograma das espermatogônias ligeiramente irregular. Com a perequação, porém, resulta nitidamente bimodal com o valor modal inferior correspondente à moda dos espermatocitas de segunda ordem e a outra intermediária entre 2a. e 1a. ordem (Fig. 7 A).

O diagrama de correlação (Fig. 7 B) dá uma linha de regressão na qual o valor da moda maior das espermatogônias é discordante com o valor diploide da abcissa, mas pelo contrário, coincide bastante bem com o valor 3n. A diferença é estatisticamente significativa, pois a ordenada da segunda moda está bem fóra do limite de confiança de 3 Sy.

TABELA VI

*Pseudoboa trigemina* D. e B. (17)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II Ide.
8				
8.5				16
9				43
9.5				26
10	2			25
10.5	2			9
11	3			19
11.5	10			21
12	4			29
12.5	8			10
13	4		1	6
13.5	12		1	0
14	17		3	0
14.5	15		10	1
15	12	1	22	1
15.5	3	0	14	
16	1	4	15	
16.5	0	1	12	
17	1		1	
17.5			1	
18			2	
18.5				
19				
Modas	900.3 1544	Média 2110	1942	441.8 845

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 1134.6 \\ b' &= 522.5 \\ \overline{Sy} &= 78.82 \\ 3 \overline{Sy} &= 236.46 \\ d &= 346 \end{aligned}$$

Um segundo exemplar desta espécie será examinado num trabalho sucessivo por ter um quadro cariométrico diferente e indica a existência de uma terceira divisão com um intervalo entre espermatocita de 1a. ordem e espermatídia de 8:1. Êste exemplar apresenta além disso uma dimegalia em tôdas as fases da espermiogênese, que falta no indivíduo 17 (Schreiber 1946:50).

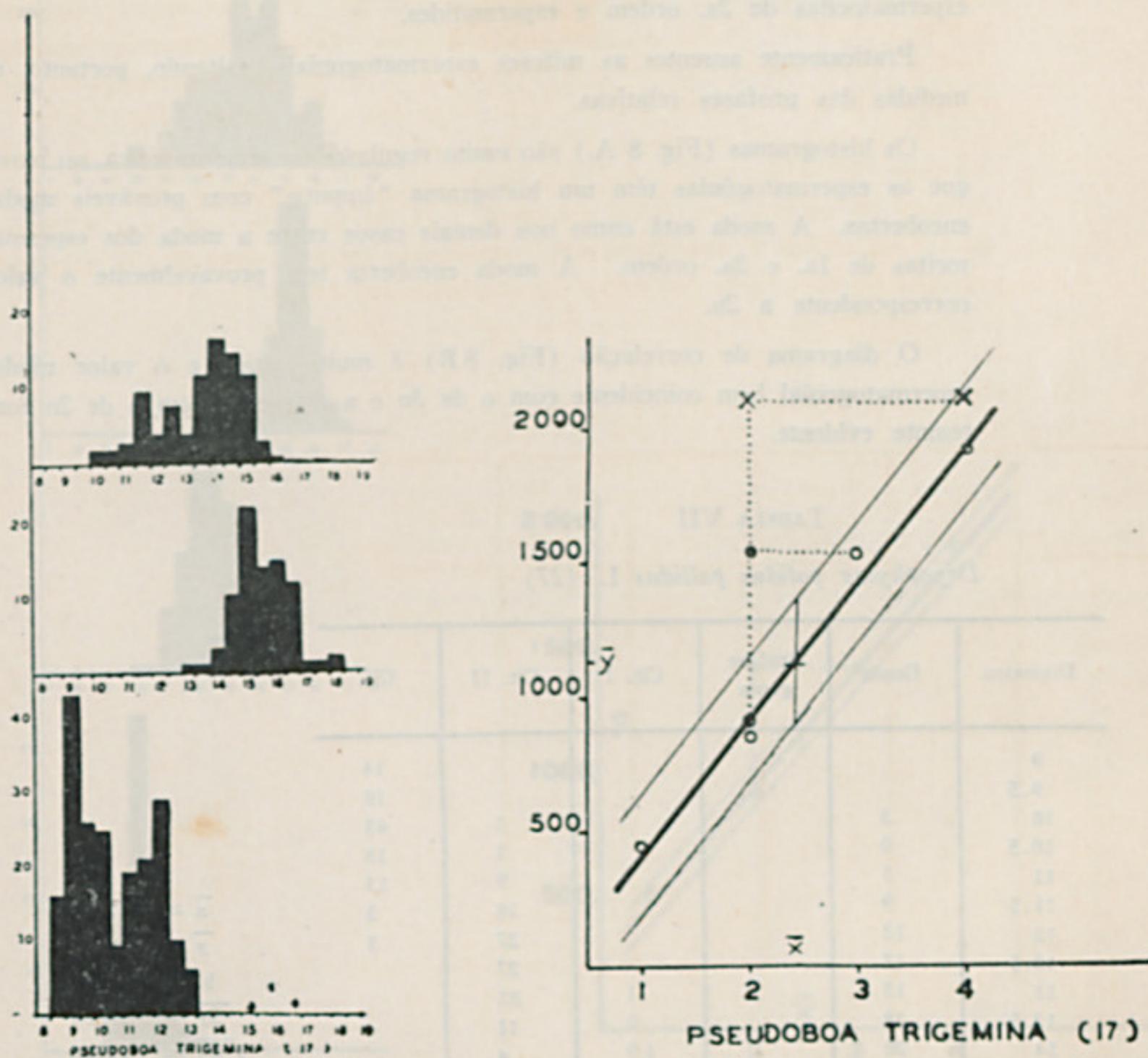


Fig. 7 A e B

*Dryophylax pallidus* L. (Prot. 27) Tab. VII.

Indivíduo de 26 centímetros fixado em 5 de setembro de 1945. Histologicamente o testículo é imaturo. Os túbulos têm lume oco, porém, sem espermatozoides formados e as fases espermiogonéticas são totalmente ausentes.

A fase fundamental predominante é a do espermatocita de 1a. ordem, sendo frequentes os canalículos cuja parede é formada por uma camada de espermatogônias e muitas camadas de auxocitas em tôdas as fases. Poucos espermatocitas de 2a. ordem e espermátides.

Praticamente ausentes as mitoses espermatogoniais, faltando, portanto, as medidas das profases relativas.

Os histogramas (Fig. 8 A.) são muito regulares na série meiótica, ao passo que as espermatogônias têm um histograma "impuro" com prováveis modas encobertas. A moda está como nos demais casos entre a moda dos espermatocitas de 1a. e 2a. ordem. A moda encoberta tem provavelmente o valor correspondente a 2n.

O diagrama de correlação (Fig. 8 B) é muito nítido e o valor modal espermatogonial bem coincidente com o de 3n e a diferença com o de 2n fortemente evidente.

TABELA VII

*Dryophylax pallidus pallidus* L. (27)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
9					14
9.5					19
10	3			1	45
10.5	0			1	18
11	5			9	13
11.5	9			16	3
12	12			27	1
12.5	12			27	
13	13		1	23	
13.5	28		0	11	
14	20		9	4	
14.5	26		13	3	
15	16		31	3	
15.5	7		31		
16	9		14		
16.5	3		4		
17	1		1		
17.5					
Modas	1436.5	—	1931	949.8	522

$\bar{x} = 2.5$   
 $\bar{y} = 1204.8$   
 $b' = 471.37$   
 $\overline{Sy} = 27.26$   
 $3\overline{Sy} = 71.78$   
 $d = 465.3$

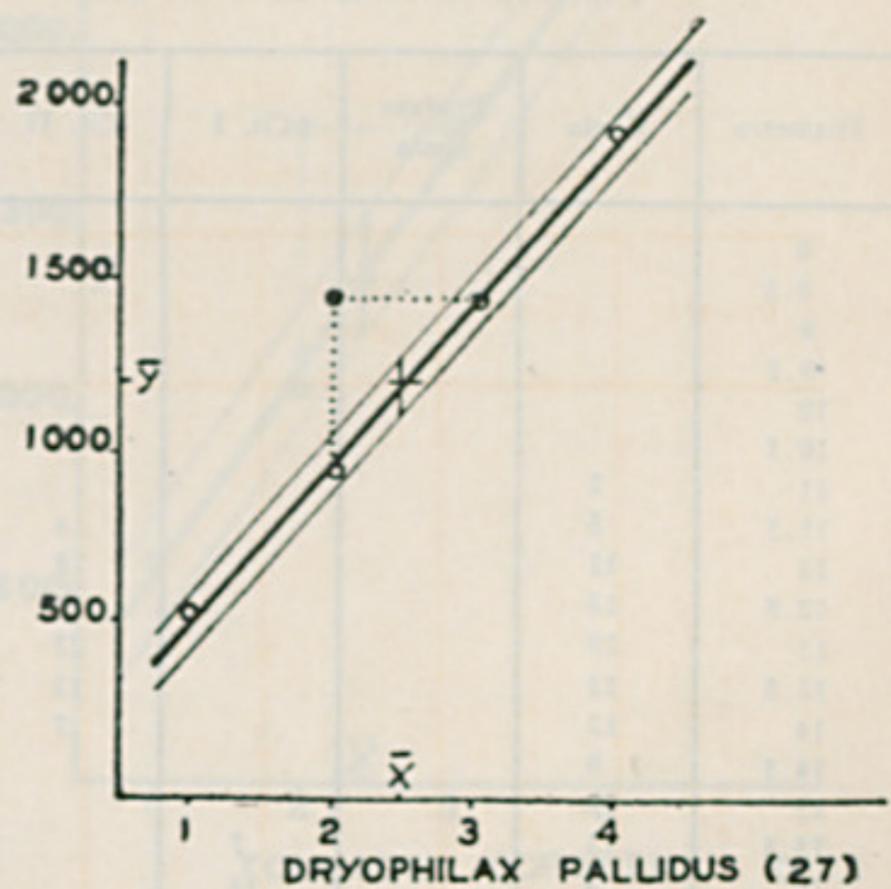
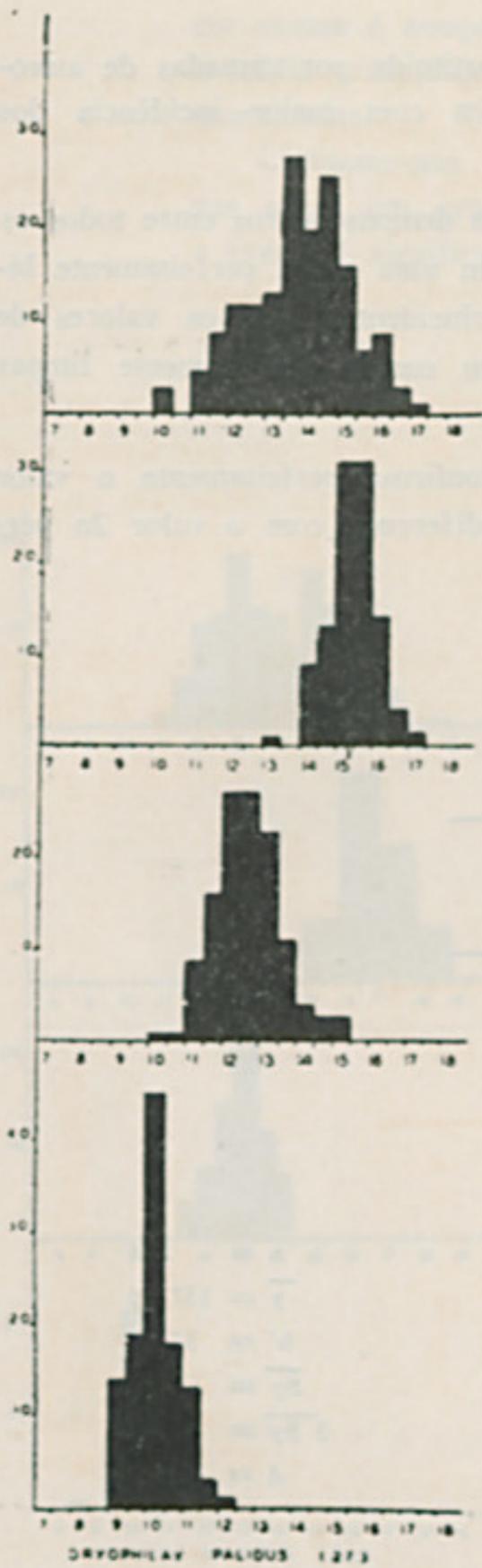


FIG. 8 A e B.

*Tomodon dorsatus* D. & B. (Prot. 68) Tab. VIII.

Indivíduo de 45 centímetros fixado em 14 de novembro de 1945. Testículo imaturo. Canalículos com lume oco, às vezes, porém, frequentemente cheios de espermatídias. Falta quase total de espermatozóides e fases histogenéticas.

A parede dos canalículos é geralmente constituída por camadas de auxocitas nas diferentes fases da profase meiótica com maior incidência dos leptotenos.

O histograma da (Fig. 9 A) é um dos mais demonstrativos entre todos os que tivemos até agora. As espermatogônias têm uma curva perfeitamente bimodal com as duas modas respectivamente coincidentes com os valores de abscissa de  $2n$  e  $3n$ . As fases meióticas têm curvas perfeitamente limpas e regulares.

O diagrama de correlação (Fig. 9 B) confirma perfeitamente o valor  $3n$  da moda maior espermatogonial com uma diferença com o valor  $2n$  perfeitamente significativa.

TABELA VIII

*Tomodon dorsatus* D. e B. (68)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					
8.5					1
9					0
9.5					8
10					22
10.5					24
11	1				10
11.5	5			4	1
12	11			8	
12.5	12			15	
13	19			23	
13.5	13			12	
14	12			7	
14.5	9				
15	17				
15.5	13		7		
16	8		14		
16.5	1		0		
17	4		12		
17.5	0		3		
18	0		4		
18.5	1		2		
Modas	1147 1765		2286	1071	5889

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 1371.6 \\ b' &= 575.2 \\ \bar{S}_y &= 51.4 \\ 3 \bar{S}_y &= 154.2 \\ d &= 623.5 \end{aligned}$$

Devemos salientar aqui uma consideração interessante: se confrontarmos os valores *absolutos* dos volumes das singulas fases da espermatogênese desta espécie, com as correspondentes das demais espécies examinadas, podemos constatar que pelo menos este exemplar de *Tomodon dorsatus*, tem células bem maiores do que os outros offídios. Um primeiro ensaio estatístico sobre este fenômeno nos indicou o seguinte: o tamanho nuclear do *Tomodon* em exame é sempre em todos os estádios maior do que  $M + 3\sigma$ , sendo M a média aritmética de todos os valores do mesmo estágio das demais espécies examinadas.

Limitamo-nos a apontar este fato na espera de que medidas extensivas sobre um grande número de espécies possam dar maior esclarecimento e eventual significação sistemática a este fenômeno.

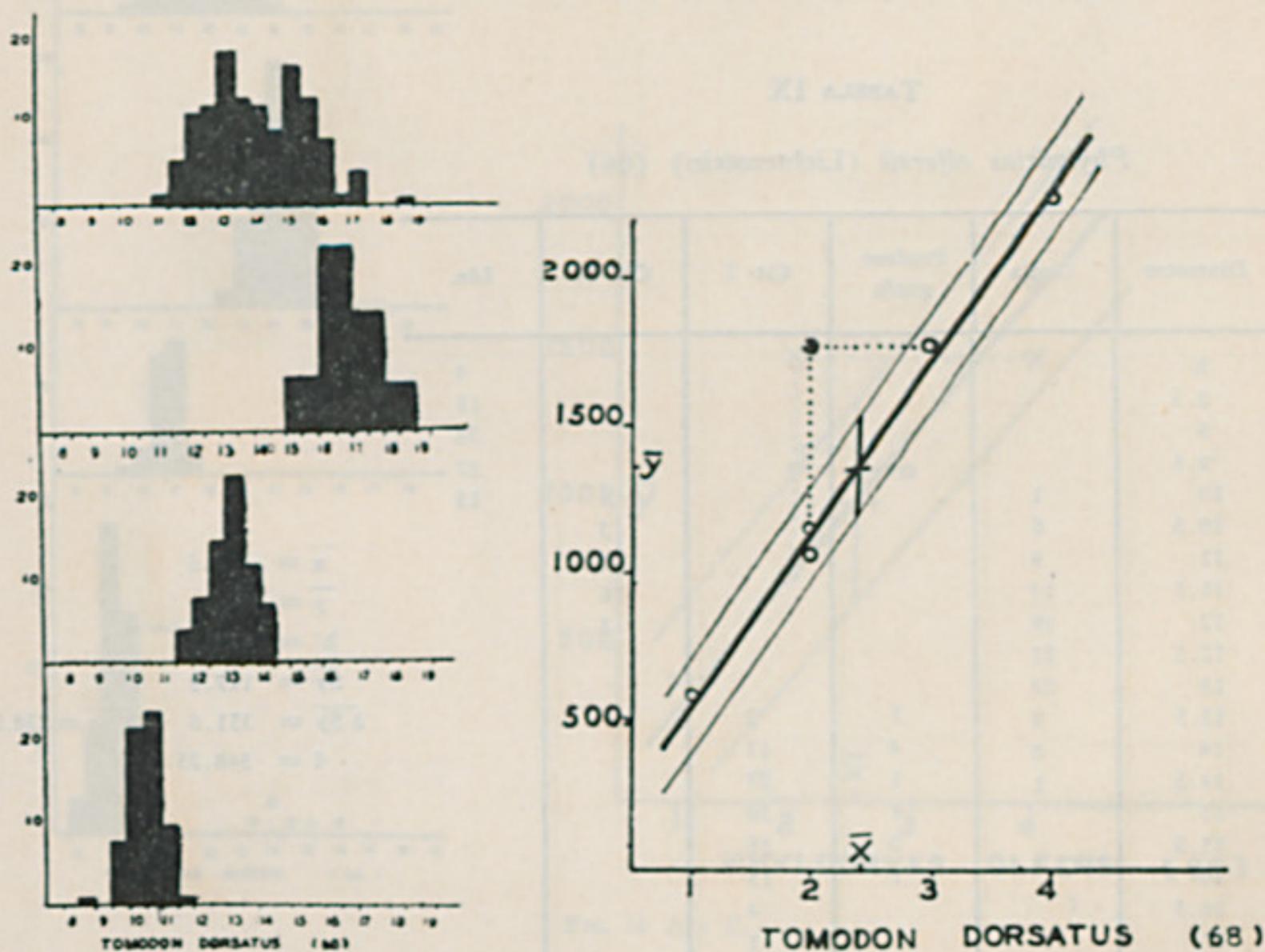


FIG 9 A e B.

*Philodryas olfersii* Lichtenstein (Prot. 66) Tab. IX.

Indivíduos de 88 centímetros, fixado em 31 de outubro de 1945. Canaliculos cheios de espermatozoides e fases de espermiogênese que constituem a fase mais abundante.

Espermatocitas de primeira ordem raras. Algumas profases goniais.

O histograma da Fig. 10 A é bem regular para as formas meióticas, ao passo que a curva das espermatogônias está fortemente assimétrica para os valores menores o que provavelmente indica u'a moda encoberta aos valores diploides.

O diagrama de correlação reflete esta diferença pois os limites fiduciais do erro de estimação são bastante grandes e o valor modal das espermatogônias está no limite de 3 Sy, sendo, porém, bem fóra do valor 2 Sy tomado por vários autores como limite fiducial. O volume das profases goniais está dentro do limite fiducial do volume de 4 n.

TABELA IX

*Philodryas olfersii* (Lichtenstein) (66)

Diâmetro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					4
8.5					13
9					38
9.5					27
10	1			1	15
10.5	6			3	
11	9			14	
11.5	13			16	
12	19			3	
12.5	21				
13	22				
13.5	8	1	2		
14	8	4	11		
14.5	1	1	23		
15		1	30		
15.5		0	15		
16		1	15		
16.5			4		
17			1		
17.5					
Modas	1122	Média 1504	1750	767	406

$\bar{x} = 2.5$   
 $\bar{y} = 1010$   
 $b' = 472.5$   
 $Sy = 117.2$   
 $3 Sy = 351.6$      $2 Sy = 238.1$   
 $d = 348.25$

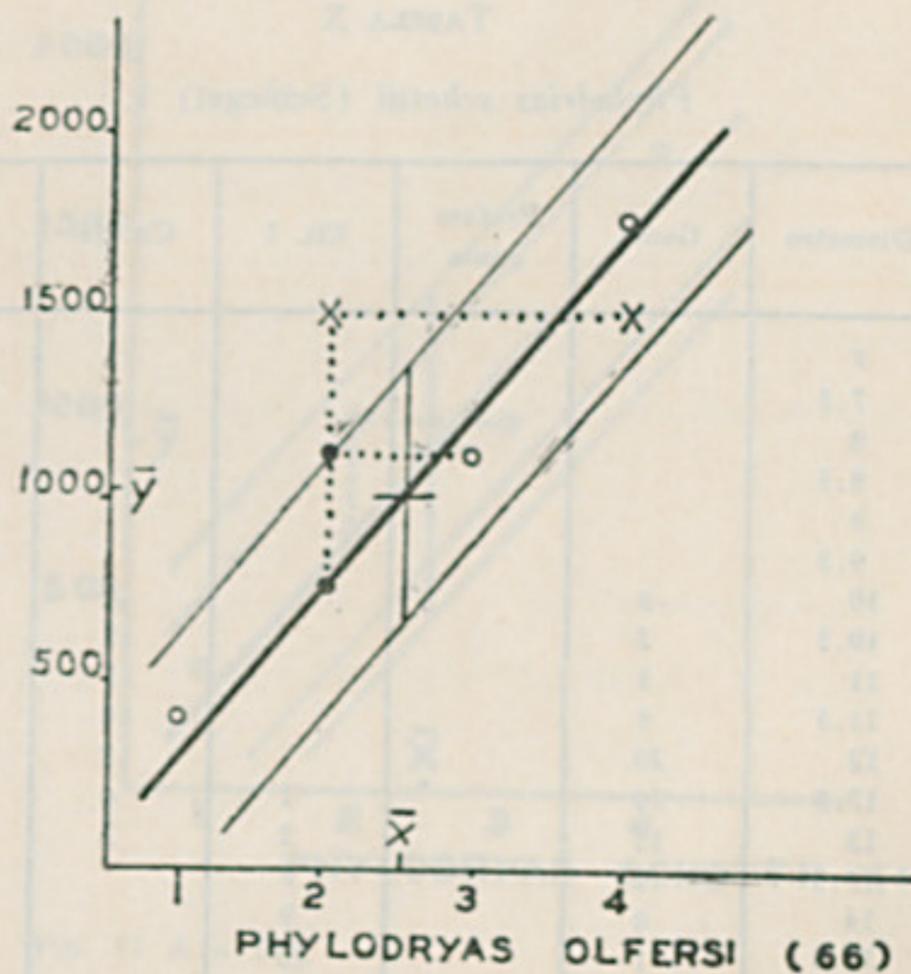


Fig. 10 A e B.

*Philodryas schottii* Schlegel (Prot. 1) Tab. X.

Indivíduo de 139 centímetros fixado em 7 de Agosto de 1945. Testículo em perfeita maturação histológica. Canalículos ocos com espermatozoides pegados às paredes e tôdas as fases da espermiogênese.

Abundantes os auxocitas em tôdas as fases de crescimento e notável abundância de metafases 1.<sup>as</sup>. Raríssimas as profases espermatogoniais.

É característico dêste indivíduo o fenômeno que se apresenta seja nos espermatocitas de 1.<sup>a</sup> ordem e 2.<sup>a</sup> ordem e espermatídias, de estar reunidos em grupos de 4-8 núcleos evidentemente derivados de um mesmo espermatogônia. Êste fato é localizado em certos canalículos faltando em outros, e foi por nós verificado em seguida em outros exemplares também e de outras espécies no testículo ao fim do período maturativo.

Os histogramas são bastante regulares (Fig. 11) e a correlação entre volume e cromosômio boa, embora não tanto perfeita como nos casos precedentemente examinados. A moda dos espermatogônias correspondente aproximadamente ao valor de 3n, porém, a diferença com o valor de 2n é menor do que de 3 Sy.

TABELA X

*Phylodrias schottii* (Schlegel) 1.

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
7					
7.5					13
8					37
8.5					39
9					47
9.5					18
10	2			4	4
10.5	3			15	
11	5			15	
11.5	8			14	
12	20			12	
12.5	20		1	6	
13	13		2	3	
13.5	9		5		
14	0		9		
14.5	1		20		
15	0		20		
15.5	1		12		
16			10		
16.5			3		
17			5		
17.5			1		
18					
18.5					
Modas	1018	--	1760	700.7	323.8

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 950.8 \\ b' &= 462.5 \\ \bar{S}_y &= 141.6 \\ 2 \bar{S}_y &= 285.2 \\ 3 \bar{S}_y &= 424.8 \\ d &= 298.5 \end{aligned}$$

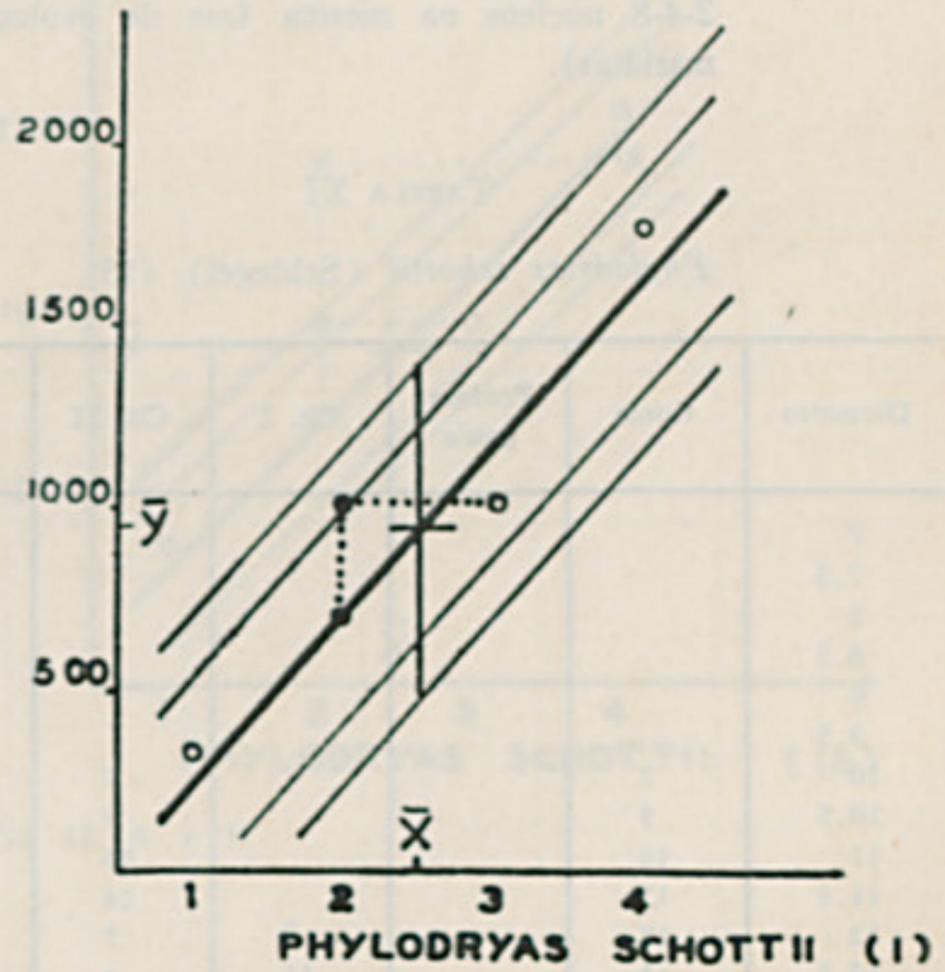
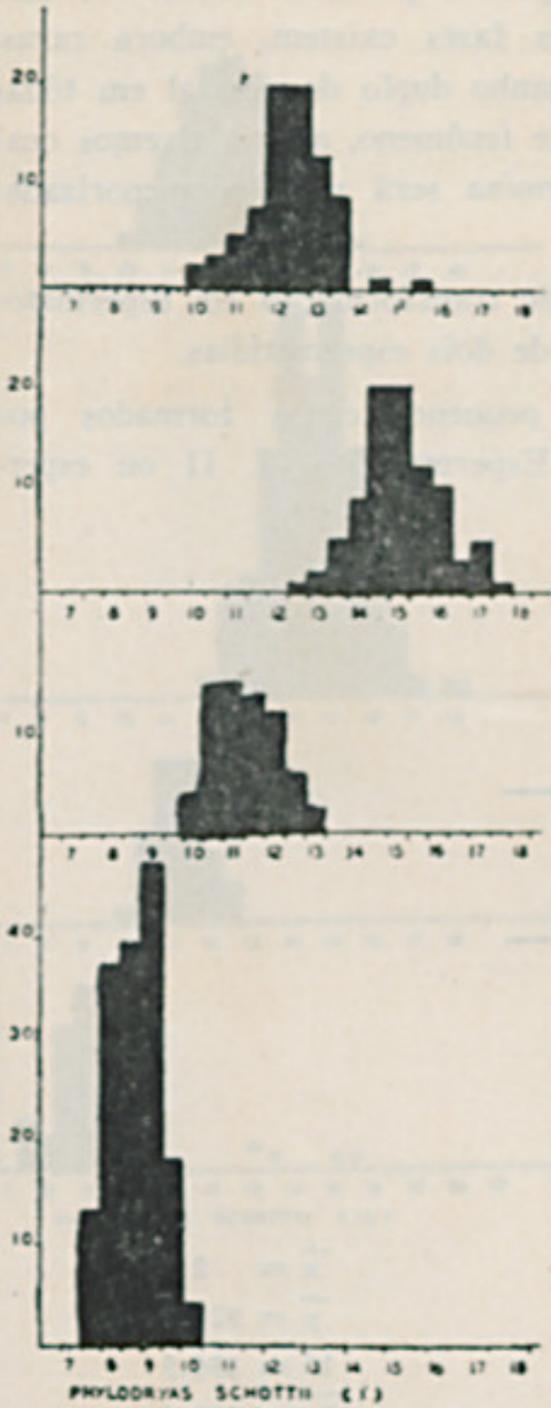


FIG. 11 A e B

*Philodryas schottii* Schlegel (Prot. 15) Tab. XI.

O segundo exemplar desta espécie foi capturado no momento da cópula e fixado em 27 de Agosto de 1945. Comprimento 102 centímetros.

O testículo é histologicamente maduro, provavelmente já na fase final do período reprodutivo. Canalículos com espermatozoides livres no lume, além das formas de evolução espermiogénicas. A parede dos canalículos apresenta lacunas e são abundantes os espermatocitos de primeira ordem em todas as fases auxocitárias. Espermatogônias com poucas profases (5%). A fase predominante é a da espermiogênese e nestas fases existem, embora raras, formas de dimegalia, isto é, elementos de tamanho duplo do normal em todas as fases de histogênese do espermatozoide. Este fenómeno, que já tivemos ocasião de descrever na espécie *Pseudoboa trigemina* será mais pormenorizadamente descrita em trabalho sucessivo.

Algumas formas de espermatidia em via de transformação em espermatozoide dão a impressão de ser devidas à fusão de dois espermatídias.

Neste exemplar se encontram também pequenos cistos formados por 2-4-8 núcleos na mesma fase de evolução (Espermatocitos I, II ou espermatídias).

TABELA XI

*Philodryas schottii* (Schlegel) (15)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
7					
7.5					5
8					3
8.5					14
9					18
9.5					11
10	2			2	2
10.5	5			9	
11	10			14	
11.5	15			14	
12	18		2	7	
12.5	19		11	4	
13	17	2	12		
13.5	10	1	24		
14	3	0	37		
14.5	3	0	31		
15	1	1	38		
15.5	1	1	24		
16			18		
16.5			7		
17			2		
Modas	1018	Média 1459.5	1597	704.5	379.8

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 924.8 \\ b' &= 396.5 \\ \bar{S}_y &= 100.2 \\ \sqrt[3]{S_y} &= 300.6 \\ d &= 292 \end{aligned}$$

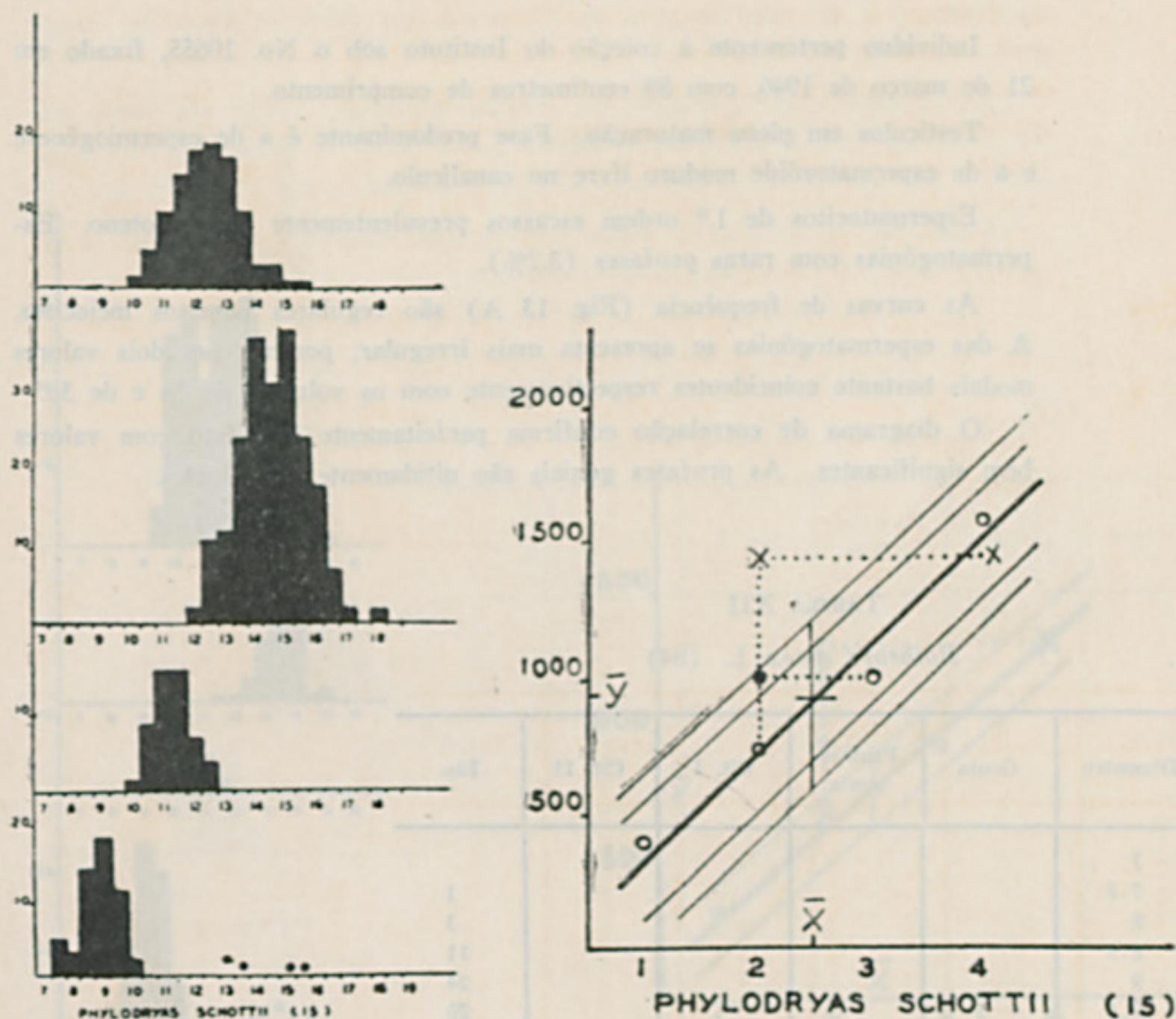


FIG 12 A e B

As curvas de frequência dos volumes nucleares são bastante regulares, sendo como em tôdas as outras espécies a correlação perfeita entre os valores da série meiótica. As espermatogônias têm um valor modal ao redor do volume correspondente a  $3n$ , ao limite do valor fiducial de  $3 Sy$  (diferença  $292$ ;  $3 Sy = 300,6$ ).

Os volumes das profases, embora com as reservas já feitas pelos demais casos concordam com o volume tetraploide.

Fam. CROTALIDAE

Sub-fam. *Lachesinae*

*Bothrops (Trimerisurus) atrox* L. (Prot. 84) Tab. XII.

Indivíduo pertencente à coleção do Instituto sob o No. 10655, fixado em 21 de março de 1946, com 89 centímetros de comprimento.

Testículos em plena maturação. Fase predominante é a de espermiogênese e a de espermatozóide maduro livre no canalículo.

Espermatocitos de 1.<sup>a</sup> ordem escassos prevalentemente em leptoteno. Espermatogônias com raras profases (3,2%).

As curvas de frequência (Fig. 13 A) são regulares para os meiócitos. A das espermatogônias se apresenta mais irregular, porém, com dois valores modais bastante coincidentes respectivamente com os volumes de 2n e de 3n.

O diagrama de correlação confirma perfeitamente este fato com valores bem significantes. As profases goniais são nitidamente tetraploides.

TABELA XII

*Bothrops atrox* L. (84)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
7					
7.5					1
8					3
8.5					11
9					24
9.5	5				20
10	27			2	6
10.5	31			4	
11	21			5	
11.5	31		1	2	
12	30		1	1	
12.5	32		3		
13	21	2	8		
13.5	10	3	11		
14	8	2	13		
14.5	3	1	1		
15	2		2		
15.5					
16					
Modas	697 905	1288	1279	662.9	306.4

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 770.6 \\ b' &= 310.6 \\ \overline{Sy} &= 46.5 \\ 3 \overline{Sy} &= 139.5 \\ d &= 259 \end{aligned}$$



*Bothrops jararaca* Wied (Prot. 47) Tab. XIII.

Indivíduo de 97 centímetros fixado em 18 de setembro de 1945. Testículo não perfeitamente maduro. Túbulos com lume amplo, mas ainda sem espermatozoides. Raras as formas histogenéticas. Raras mitoses goniais e a fase predominante é a de espermatocita de 1.<sup>a</sup> ordem em tôdas as fases de crescimento auxocitário.

Histogramas muito regulares nas formas meióticas; gonias um pouco menos regulares com uma ligeira tendência a u'a moda na classe 12 correspondente a 2n. A moda principal coincide perfeitamente com o valor de 3n.

Diagrama de correlação indica com grande evidência a situação 3n da espermatogônia e de 4n das profases goniais.

TABELA XIII

*Bothrops jararaca* (Wied) (47)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					5
8.5					8
9					20
9.5					30
10	1			2	6
10.5	3			4	
11	5			14	
11.5	9			13	
12	17			13	
12.5	16			9	
13	31			4	
13.5	27				
14	40		9		
14.5	26		14		
15	14		23		
15.5	0	1	27		
16	3	1	12		
16.5	0		6		
17	0		3		
17.5	1		2		
18					
18.5					
19					
Modas	1294	Média 2047	1781	851.5	390

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1079 \\ b' &= 460.16 \\ \bar{S}_y &= 15.38 \\ 3 \bar{S}_y &= 46.14 \\ d &= 445 \end{aligned}$$

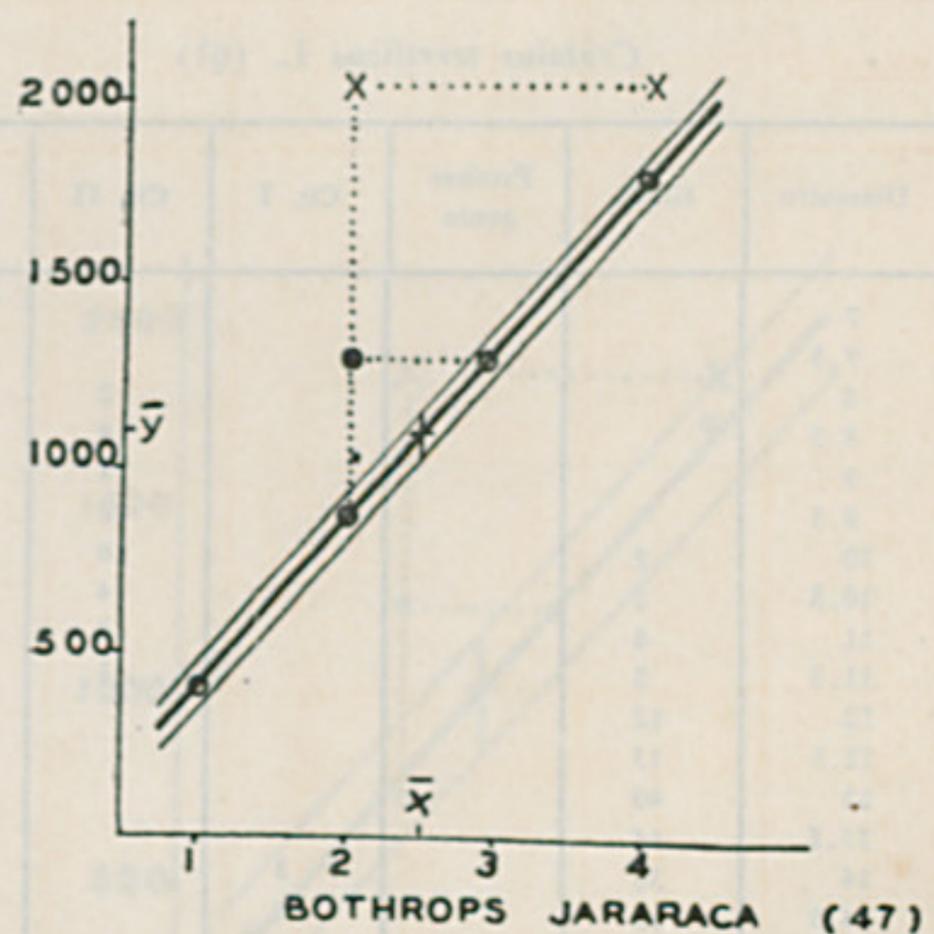
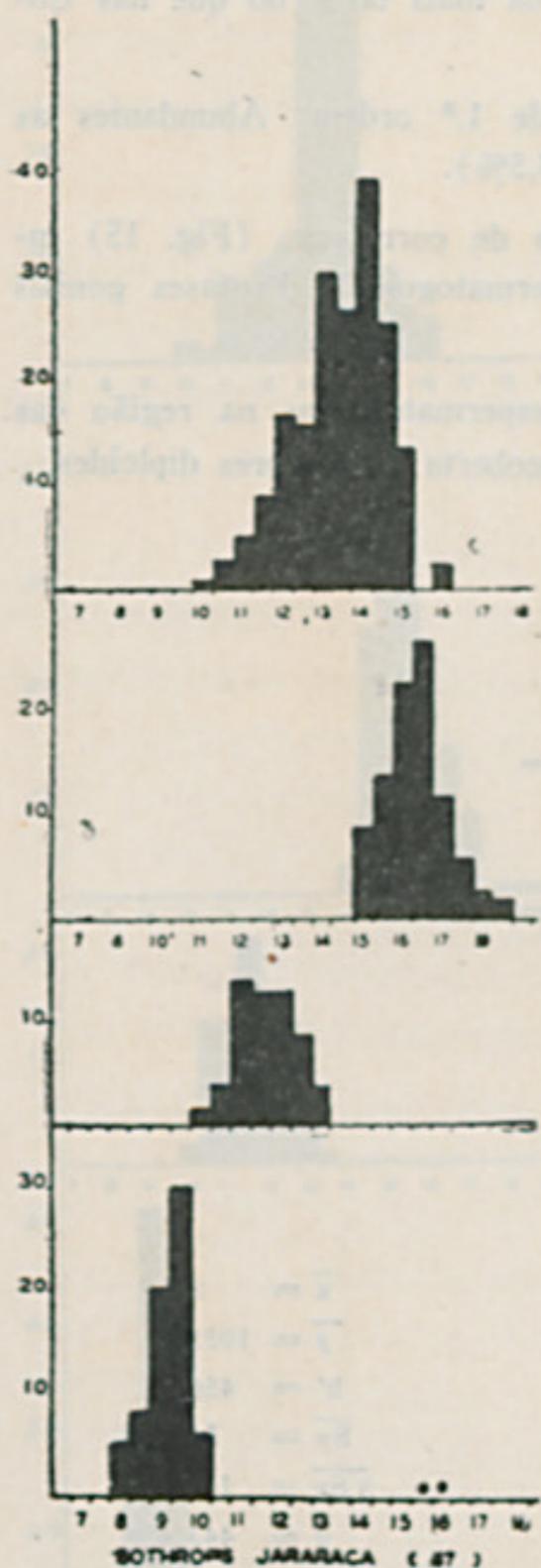


FIG. 14 A e B

Sub-fam. *Crotalinae**Crotalus terrificus* L. (Prot. 61) Tab. XIV.

Indivíduo de 104 centímetros fixado em 15.10.45. Testículo não perfeitamente maduro. Isto confirma tudo quanto já foi observado nas outras espécies de Crotalidae que a maturidade sexual se dá mais tarde do que nas Colubridae.

Fase predominante é a de espermatocita de 1.<sup>a</sup> ordem. Abundantes as espermatogônias, porém, com poucas mitoses (3,5%).

Histogramas muito regulares e o diagrama de correlação (Fig. 15) indica perfeitamente a situação 3n da moda espermatogonial. Profases goniais perfeitamente coincidentes com o valor de 4n.

Uma ligeira extensão do histograma das espermatogônias na região das classes baixas indica provavelmente u'a moda encoberta aos valores diploides.

TABELA XIV

*Crotalus terrificus* L. (61)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
7					12
7.5					31
8				2	52
8.5				14	41
9				14	10
9.5				22	4
10	2			10	
10.5	1			14	
11	8			4	
11.5	8			1	
12	12				
12.5	13				
13	40				
13.5	44				
14	36		3		
14.5	13		26		
15	9	4	47		
15.5	5	2	36		
16	4	0	24		
16.5		1	14		
17			8		
17.5			0		
18			1		
18.5			1		
19			1		
Modas	1270	1900	1785	782	386

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1055 \\ b' &= 456.8 \\ \bar{S}_y &= 56.24 \\ \sqrt{3} \bar{S}_y &= 168.72 \\ d &= 443.6 \end{aligned}$$

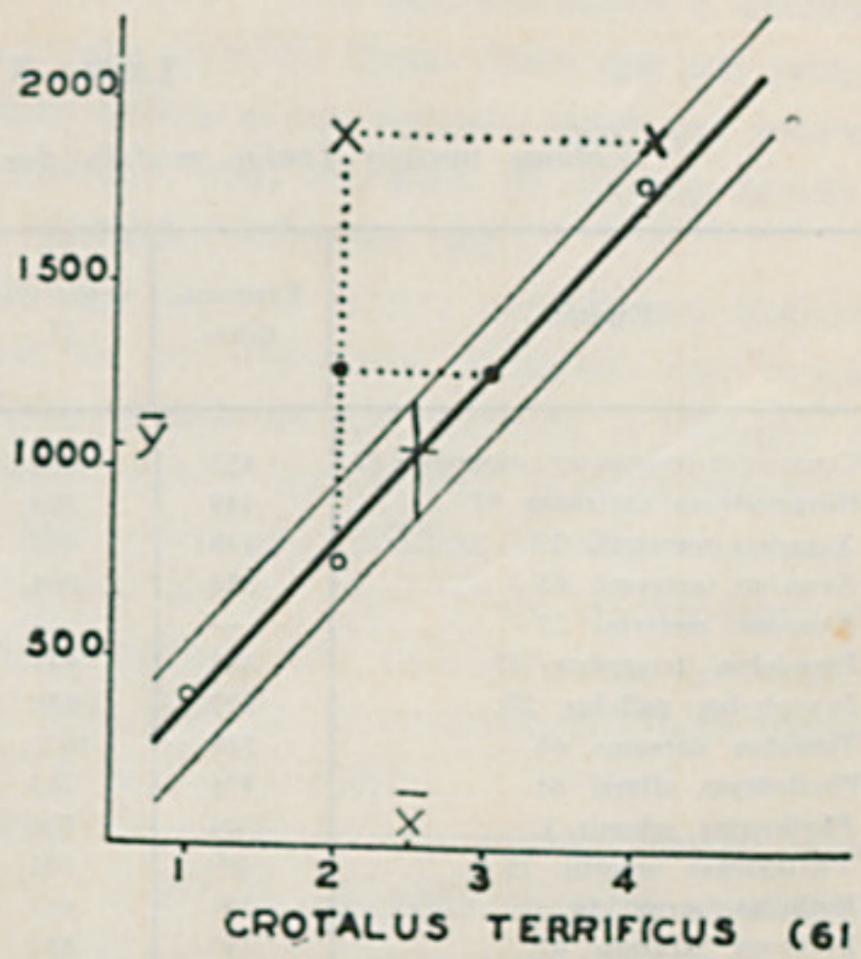
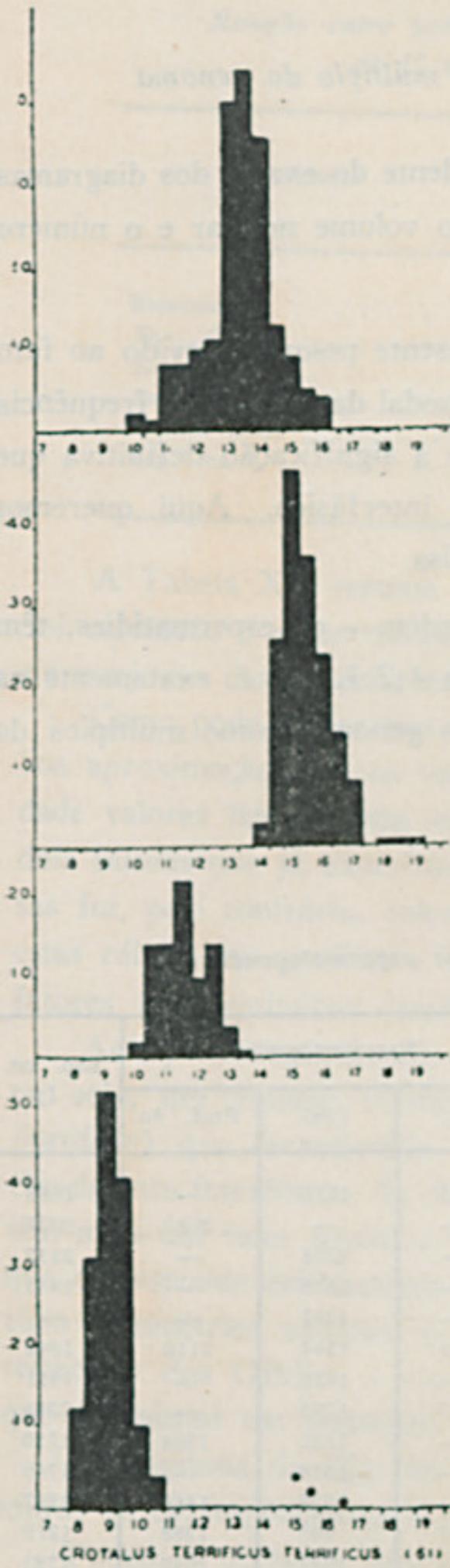


FIG. 15 A e B

## IV) DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

a) *Relação entre volume nuclear e valor múltiplo do genoma*

Em todos os casos estudados, como resulta evidente do exame dos diagramas de correlação, existe uma estrita correlação entre o volume nuclear e o número de cromossômios.

Este fato se manifesta bem nitidamente na presente pesquisa devido ao fato de ter considerado como valor volumétrico o valor modal das curvas de frequência dos volumes nucleares. Discutiremos mais adiante a significação definitiva que este valor modal tem no estudo do crescimento interfásico. Aqui queremos agora salientiar as conclusões imediatas desta pesquisa.

Os espermatocitos de 1.<sup>a</sup> ordem, os de 2.<sup>a</sup> ordem e as espermatídias, têm os volumes nucleares respectivamente na relação de 4:2:1, isto é, exatamente na mesma relação em que se encontram os respectivos genomas como múltiplos do genoma haploide.

TABELA XV

*Volume nuclear (valor modal) dos estádios espermatogênicos*

Espécie	Espermatídias	Esp. cit. II	Espermatogonias			Esp. cit. I
			2n	(3n)	Prof. 4n	
<i>Constrictor constrictor constrictor</i> 97	452	808	795	1155	—	1568
<i>Herpetodryas carinatus</i> 87	449	904	—	—	2082	2027
<i>Xenodon merremii</i> 19	449	805	—	1288	—	2132
<i>Xenodon merremii</i> 65	383	904	—	1475	—	1953
<i>Xenodon merremi</i> 77	—	—	—	1287	—	—
<i>Pseudoboa trigemina</i> 17	442	845	900	1544	2110	1942
<i>Dryophylax pallidus</i> 27	522	950	—	1436	—	1931
<i>Tomodon dorsatus</i> 68	589	1071	1147	1765	—	2286
<i>Phyllodryas olfersi</i> 66	406	763	—	1122	1504	1750
<i>Phyllodrias schottii</i> I.	324	701	—	1018	—	1760
<i>Phyllodryas schottii</i> 15	380	705	—	1018	1460	1597
<i>Bothrops atrox</i> 84	306	663	697	905	1288	1279
<i>Bothrops jararaca</i> 47	390	852	—	1294	2047	1781
<i>Crotalus terrificus</i> 61	386	782	—	1270	1900	1785
Médias	414	825	884	1271	1765	1824

TABELA XVI

*Relação entre volumes nucleares (média entre os valores modais de 11 espécies com 14 indivíduos) e genoma*

Células	Volume	Genoma n	Relação Vol./genoma	$\frac{\text{Vol.} \times n}{\text{Vol. n}}$	Relação teórica
Espermatide .....	414	n	4.14	1	1
Esp. cita II .....	825	2n	4.1	1.99	2
Esp. gonia .....	884	2n	4.4	2.14	2
Esp. gonia .....	1271	(3n)	4.23	3.08	3
Profase gonia .....	1765	4n	4.4	4.26	4
Esp. cita I .....	1824	4n	4.55	4.4	4

A Tabela XV resume todos os dados dos volumes modais e desta Tabela foi calculado o valor médio destes volumes para cada estágio espermatogenético no conjunto das espécies estudadas.

Como pode-se ver nas Tabelas XV e XVI estes valores médios estão com boa aproximação com os valores 16000 : 800 : 400, tendo os auxocitas na realidade valores ligeiramente superiores (17-1800). Isto provavelmente é devido a dois fatores que já examinamos: a forma elipsóide destas fases que nas pesquisas foi, pelo contrário, calculada como esfera e em segundo lugar por estarem estas células em profase e terem, portanto, uma alteração do volume devido a fatores físico-químicos (embebição, variações coloidais, etc.).

As espermatogônias são caracterizadas por três valores volumétricos distintos, ou seja, um volume correspondente ao dos elementos diploides, um volume (profase) que corresponde ao volume tetraploide que delimita a extensão do crescimento interfásico, do ciclo mitótico; dentre estes limites, as espermatogônias têm mais um valor modal o qual é pelo menos nos Ofídios, o mais frequente e que corresponde estritamente a um volume de 3n. Esta moda intermediária no ciclo volumétrico mitótico é um dos fenômenos mais constantes na cariometria testicular dos Ofídios e representa uma fase do desenvolvimento intercinético que chamamos em trabalhos anteriores de "sesquifase".

O diagrama da Fig. 16 representa esta situação com grande clareza resumindo os correspondentes diagramas de correlação de todos os casos estudados.

Podemos, portanto, concluir que nos meiocitas a relação entre volume nuclear e número de genomas haploides que constituem o núcleo é absolutamente válida, se o volume considerado é o volume modal, isto é, de máxima frequência das curvas de variabilidade estatística. Voltaremos logo ao significado biológico desta constatação.

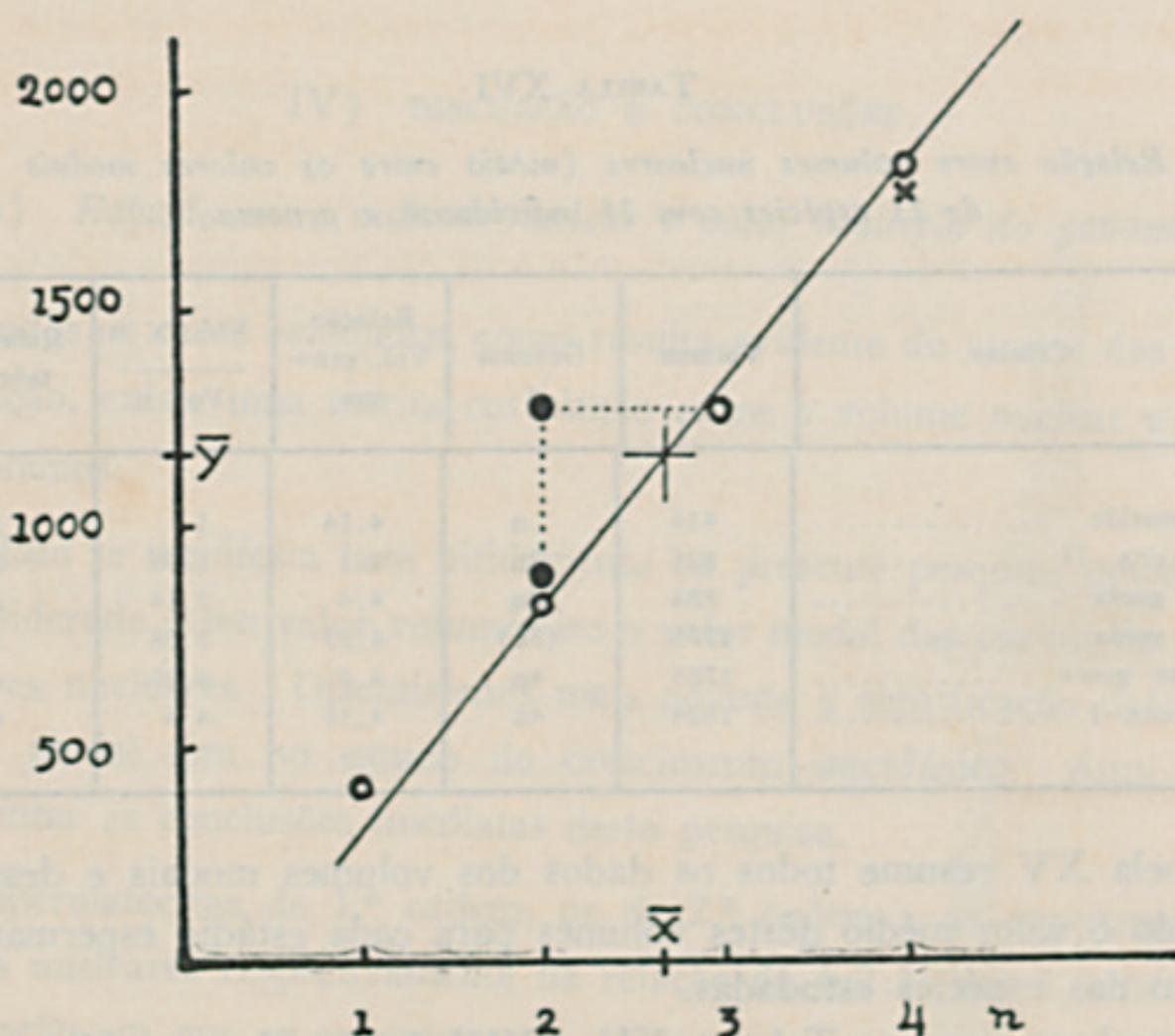


FIG. 16.

Correlação entre volume nuclear (val. modal) e múltiplos do genoma haploide. Valores médios entre 14 exemplares pertencentes a 11 espécies.

- O — série meiótica
- — espermatogonia (interfase)
- × — espermatogonia (profase)

#### b) A "sesquifase" no ciclo mitótico

Como temos discutido no Capítulo I a) os máximos de frequência das curvas dos volumes nucleares correspondem a etapas do crescimento. Estas etapas correspondem, geralmente, a valores múltiplos do genoma, antes e depois de um ciclo de duplicação. Isto vale sem dúvida nenhuma para toda a série de valores volumétricos que estão entre si em relação como 1:2:4:8:16:32, sendo claramente demonstrado que os núcleos que alcançam estas etapas são respectivamente di, tetra, octo, 16-ploides.

O exame dos valores modais dos espermatogônias de cobra nos revela agora um fenômeno novo: as etapas do crescimento estão entre si em relação como 1 : 1,5 : 2 :, sendo o valor 1 igual ao volume do espermatocita de 2.<sup>a</sup> ordem é portanto diploide. O valor 2 é o do volume da profase gonial e é igual ao do espermatocita de 2.<sup>a</sup> ordem, isto é, tetraploide. A diferença entre estes volumes corresponde, portanto, perfeitamente ao intervalo de duplicação do genoma diploide, seja no ciclo mitótico das espermatogônias, seja no ciclo de crescimento auxocitário.

A etapa de valor 1,5 que se revela como o estágio principal durante o crescimento interfásico mitótico deveria ser interpretada à luz dos conceitos até agora ilustrados e ser, portanto, considerada como um estágio no qual o genoma tem o valor de  $3n$ , isto é, depois de ter duplicado metade do genoma diploide ou, um genoma haploide.

Já temos discutido esta possibilidade na introdução (Cap. Ib3,) como interpretação das "Zwischenklassen" das pesquisas cariométricas sobre tecidos de adultos ou embriões normais e patológicos, nas quais, não se tem como nas presentes pesquisas, a possibilidade de controlar rigorosamente os valores volumétricos estudados com valores cromosômicos certos. Neste sentido somente as já citadas pesquisas de D'Ancona (13, 14) sobre o fígado de mamífero e as da Escola de Painter (7) sobre material neoplástico deram a demonstração da relação entre o volume "rítmico" e o diferente grau de poliploidismo dos núcleos.

A denominação de "sesquifase", ou seja, a fase de uma vez e meia maior do que a normal nos parece a mais adequada e mais estritamente ligada à natureza dos fenômenos estudados. Uma verificação direta desta interpretação em termos cromosômicos nos falta ainda por ter esta fase o aspecto morfológico de núcleo em repouso. É provável que nunca apareçam metafases correspondentes a estes núcleos de  $3n$ , mas em outras pesquisas cariométricas, sobre as células uterinas (Salvatore, e Schreiber, 42), tivemos ocasião de verificar que os núcleos apresentam a série de volumes 1:1,5:2:3:4:6:8 e têm profases seja ao volume 2, como no volume 3. Isto poderia significar que núcleos sesquifásicos (1,5), continuando o crescimento interfásico até o valor tetraploide podem não iniciar a profase a este valor, mas sim continuar a duplicar isoladamente os genomas haploides e iniciar a profase na situação hexaploide ou seja ao duplo da sesquifase.

Resumindo este assunto podemos concluir que o núcleo das espermatogônias durante o crescimento interfásico passa por um estágio de 1,5 vezes o volume diploide no qual o crescimento para por um certo tempo para depois continuar até alcançar o volume da profase tetraploide e dividir-se em seguida. Este fenômeno está representado esquematicamente na Fig. 17 na qual estão também representadas as etapas volumétricas da série meiótica como controle da situação múltipla do genoma.

Devemos por fim evidenciar que com estas pesquisas sobre o ciclo mitótico das espermatogônias a "sesquifase" parece ser uma fase de crescimento interfásico e não deixa dúvidas sobre a identidade das células pertencentes às classes diferentes de volume como acontece no estudo cariométrico de tecidos diferentes e de espécies diferentes ou de casos patológicos nas quais aparecem as "Zwischenklassen" de mais ou menos 1,5 vezes o valor das classes modais, e que foram assinaladas por G. Hertwig (29) e por Brummelkamp (11). Nestas presentes pesquisas a etapa de 1,5 está integrada no ciclo de crescimento de

uma única espécie celular e portanto se homologa perfeitamente com as etapas de 1,5 vezes verificadas por Wermel e Portugalow (57) na interfase das células cultivadas *in vitro* em pesquisas cinematográficas.

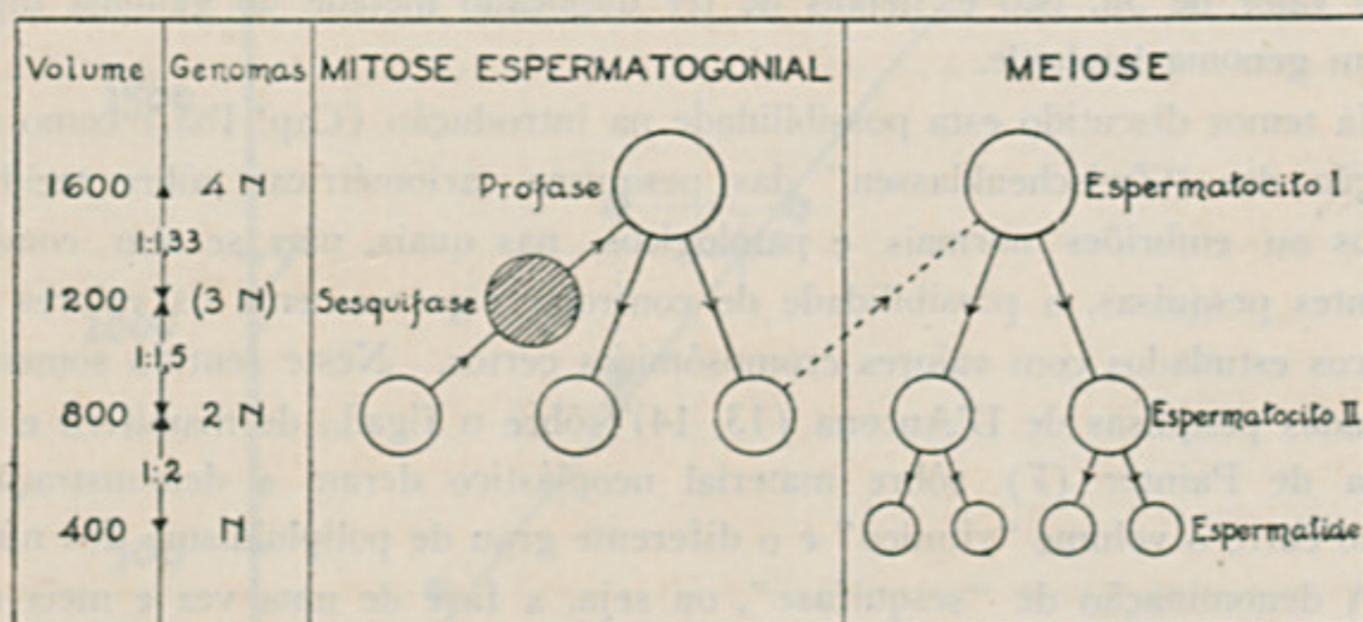


FIG. 17  
Explicação no texto

Em outros trabalhos (Schreiber 49, 50) discutimos a base citológica teórica desta explicação do fenômeno da sesquifase e não queremos aqui continuar esta discussão antes de ter novos e mais positivos fatos para apoiá-la. Aguardemos por enquanto o fato fundamental, isto é, que o núcleo cresce durante a interfase com um ritmo descontínuo cujas etapas correspondem a volumes múltiplos do volume haploide e não do volume diploide. Este fato confere ao genoma haploide pelo menos no que se refere ao ritmo de duplicação um valor unitário. Com isto não queremos decidir se este genoma que duplicaria como uma entidade unitária seja constituído pelos cromossomos de igual origem gamética, ou por um "set" de cromossomos haploides independentes da sua origem gamética (como acontece no processo meiótico para o livre sorteamento dos cromossomos). A unidade neste sentido é mais fisiológica e não podemos dar, por enquanto, nenhuma explicação mais pormenorizada porque se refere à morfologia.

Várias possibilidades neste sentido foram sugeridas nos trabalhos já citados e achamos por enquanto necessário esperar novos fatos que o estudo morfológico possa nos fornecer em futuro para resolver o problema.

### c) A "ritmicidade do crescimento interfásico"

Encontra-se frequentemente a objeção contra as pesquisas cariométricas, que a relação entre volume nuclear e número de cromossomos não pode ser um valor constante pois na determinação do volume nuclear intervem uma série de fatores extremamente variados como o grau de embebição hídrica, estado coloidal, per-

meabilidade da membrana, estádios de metabolismo, etc.. Precisamos esclarecer de forma definitiva que estes fatores determinantes do volume nuclear estão bem evidentes ao pesquisador e que estes fatores não são constantes, quer no tempo quer nos diferentes tipos de células.

Devemos ainda considerar que estes fatores se sucedem durante o desenvolvimento nuclear e que os diferentes mecanismos que determinam o volume nuclear concorrem de forma diversa nas diversas fases deste crescimento. Este crescimento é, porém, determinado como causa prima pelo processo de duplicação do genoma que por uma sequela de fenômenos diferentes age sobre o volume nuclear. Uma vez, porém, alcançada a duplicação, a constituição química e físico-química do núcleo deve ser tal que os materiais que acompanham o genoma na constituição morfológica do núcleo estão em relação quantitativa constante com o genoma mesmo. Se o genoma é duplo, duplicam também a quantidade de todos os elementos que constituem o núcleo "em repouso" de forma que o volume deste conjunto resulta também duplo. Sobre este conjunto que forma o "resting nucleus" é que agem os fatores genéticos que às vezes aparecem nas pesquisas cariométricas, alterando as relações previsíveis entre espécies ou variedades diferentes.

A validade do postulato da relação entre número de cromossomos e volume nuclear existe, portanto, somente no confronto das etapas entre as fases de crescimento nuclear e não durante os períodos de crescimento durante os quais o conjunto deste sistema nuclear se encontra "em movimento" químico e físico-químico. Uma destas fases de movimento provavelmente é a reconstrução do núcleo telofásico até alcançar a situação típica do "resting".

Por estas razões é que somente os valores modais estão entre si em relação simples e constante, como os são os valores múltiplos do genoma ("Rhythmische Wachstum" de Jacobj) considerados como a "unidade" atomística da duplicação.

Esclarecidos estes conceitos que nos parecem de notável valor explicativo podemos concluir que embora o estudo do volume nuclear nas fases de crescimento nada nos possa dizer no que se refere aos fenômenos químicos e físico-químicos que nele se processam, o estudo das relações quantitativas entre os volumes nucleares nas fases de parada deste crescimento nos revela claramente uma estrita relação entre o valor quantitativo do genoma e o volume nuclear.

Isto quer dizer que nestas fases de parada o material gênico é sempre acompanhado por materiais acessórios que são sempre constantes seja em quantidade seja no estado físico-químico de forma a determinar sempre, nos núcleos esféricos, um volume proporcional ao genoma.

Isto se depara das pesquisas cariométricas sobre os poliploides que tivemos ocasião de estudar em outro trabalho (52) e nas atuais pesquisas sobre a série

espermatogénica dos ofídios, ambos os casos nos quais os volumes nucleares puderam ser relacionados com o valor múltiplo do genoma seguramente acertado e nos quais o estudo do volume se processa com os princípios básicos estatísticos que evidenciaram as etapas do crescimento interfásico.

#### V) RESUMO

O problema do crescimento interfásico do núcleo foi estudado sobre o ciclo mitótico das espermatogónias nos Ofídios, tendo como base de confronto o volume do núcleo dos elementos da série meiótica nos quais o valor múltiplo do genoma haploide é perfeitamente conhecido.

Foi discutido o lado teórico do problema como também os fundamentos do método usado, que consistiu na medida do volume nuclear e no estudo estatístico da sua variabilidade. Foi considerado como ponto de partida o fato de serem os volumes modais correspondentes aos volumes das etapas durante o crescimento interfásico.

O estudo da série dos meiocitos revela uma estrita correlação entre volume nuclear e número de cromosómios. Esta validade porém é perfeita somente para os valores modais que representam fases homólogas do crescimento nuclear.

O crescimento das espermatogónias durante um ciclo interfásico abrange um intervalo de duplicação do volume, isto é, tem como base um volume correspondente ao volume dos núcleos diploides (igual ao dos espermatocitas de 2.<sup>a</sup> ordem) e vai até o volume duplo, das profases que correspondem ao do núcleo tetraploide das espermatogónias de 1.<sup>a</sup> ordem no fim do crescimento auxocitário. Entre este intervalo o crescimento volumétrico do núcleo gonial apresenta uma etapa a um volume que corresponde a um núcleo com genoma  $3n$ , isto é, de 1,5 vezes o volume inicial. Esta fase intermediária foi chamada de "sesquifase", é interpretada como provavelmente resultante da duplicação precoce de um genoma haploide. Nesta explicação hipotética não pode ser esclarecido se este genoma corresponde aos cromosómios de igual origem gamética ou se a precocidade se manifesta ao acaso em um "set" haploide independentemente da sua origem. Outras interpretações, porém, poderiam ser dadas na espera de ulteriores pesquisas.

Como conclusão fundamental pode ser considerar que o crescimento interfásico do núcleo se dá por ciclos ("Rhythmische Wachstum" de Jacoby) cujos volumes finais correspondem a valores múltiplos do genoma haploide que, portanto, aparece como uma unidade no processo de duplicação.

ABSTRACT

The problem of the interphasic growth of the nucleus was studied on the mitotic cycle the spermatogonia of the Ophidia taking as basis for comparison the volume of the nucleus of the elements of the meiotic series, whose multiple value of the haploid genom is well known.

The theoretic side of the problem, as well as the principles of the method used, which consisted of the measurement of the nuclear volume and the statistic study of its variability, were discussed. The fact that the modal volumes of the nucleus correspond to the volumes of the stop during the interphasic growth was taken as starting point.

The study of the meiotic elements revealed a strict correlation between the nuclear volume and the number of cromosomes. This validity, however, is only perfect for the modal values which stand for the homologous phases of the nuclear growth.

The growth of the spermatogonia, during and interphasic cycle consists of a duplication of the volume, that is, at first it has a volume corresponding to that of the diploid nucleus (the same as that of the 2nd spermatocyte) and then growth to twice the volume (prophases) which corresponds to the tetraploid nucleus of the 1st spermatocytes at the end the auxocytic growth. During this space of time the volumetric growth of the spermatogonial nucleus passes a stage in which its volume corresponds to a nucleus with  $3n$  genomes, that is 1,5 times the inicial volume. This intermediate phase has been called "sesquiphase" and is explained as probably resulting, from a premature duplication of one haploid genome. It cannot be explained in this hypothesis whether this genom corresponds to cromosomes of the same gametic origin or whether the precocity occurs by chance in a haploid set independently of their origin. However, other interpretations can arise, until more researches are made.

As fundamental conclusion it may be maintained that the interphasic growth of the nucleus occurs in cycles ("Rhythmische Wachstum" by Jacobj) and that the final volumes of each cycle are multiple values of the haploid genom, which therefore may be considered as a unity in the process of duplication.

RIASSUNTO

Venne studiato l'accrescimento interfaseico del nucleo dello spermatogonio durante il ciclo mitotico negli Ofidi, prendendo come termine di confronto dei volumi, quelli dei nuclei nella serie meiotica il cui valore multiplo del genoma

aploide è perfettamente noto. Venne discussa la parte teorica del problema consistente nel fatto che nello studio statistico di nuclei in accrescimento i valori modali delle curve di frequenza corrispondono a pause dello accrescimento stesso.

Lo studio cariometrico degli elementi della serie meiotica rivela una strettissima correlazione tra volume e numero di cromosomi. Questa correlazione però è valida solamente per i valori modali, vale a dire per fasi omologhe del accrescimento nucleare. Nella serie meiotica questi fenomeni si manifestano particolarmente chiari non essendovi accrescimento interfascico in queste cellule.

Lo spermatogonio si comporta differentemente avendo un ciclo di mitosi con accrescimento interfascico che si estende per un intervallo di duplicazione del genoma. Lo studio cariometrico di queste cellule mostra che vi sono tre valori modali, uno corrispondente al valore diploide, l'altro a quello tetraploide e corrisponde alla profase goniale. Tra questi due valori che limitano l'intervallo di duplicazione vi è una terza moda che in tutte le specie studiate è quella predominante, ad un valore esattamente corrispondente ad un genoma di  $3n$  cioè 1,5 volte la moda diploide. Questa fase nella quale i nuclei dello spermatogonio si fermano per una pausa durante l'accrescimento interfascico è stata chiamata precedentemente dall'A. "sesquifase" ed è interpretata come il risultato della duplicazione indipendente e sfasata nel tempo dei due genomi aploidi del nucleo diploide dello spermatogonio. Non viene per ora chiarito con questo se i due genomi corrispondono a cromosomi di egual origine gametica oppure se la duplicazione prematura avviene in un "set" aploide di cromosomi assortiti a caso ed indipendentemente dalla loro origine gametica. Altre interpretazioni però sono prospettate. Come conclusione fondamentale di queste ricerche risulta che il nucleo interfascico cresce a cicli ("Rhythmische Wachstum") di Jacoby) e che i volumi finali di ogni ciclo corrispondono a valori multipli interi del genoma aploide il quale per ciò si può considerare come una unità nel processo di duplicazione che caratterizza l'interfase.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Amaral, Afranio do — Contribuição ao conhecimento dos Ophidios do Brasil. VIII. Lista remissiva dos Ophidios do Brasil. 2.ª Ed. *Memórias do Instituto Butantan*, 10:87-161, 1935/35.
2. Arkin, H. & Colton, R. R. — An outline of statistical methods. 4th. Ed., New York, 1942.
3. Beams, H. W. & King, R. L. — The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. *The Anat. Record*, 83:281-297, 1942.
4. Bieseke, J. L. — Chromosome size in normal rat organs in relation to B. Vit., ribonucleic acid and nuclear volume. *Cancer Research*, 4:529-539, 1944.

5. Biesele, J. L. — Chromosome complexity in regenerating rat liver, *Cancer Research*, 4:232-235, 1944.
6. Biesele, J. J. — Chromosomes in Lymphatic Leukemia of C58 Mice. *Cancer Research*, 7:70-78. 1947.
7. Biesele, J. L., Poyner, H. & Painter, Th. — Nuclear phenomena in mouse cancer. *The University of Texas Publications*, No. 4243:1-68, 1942.
8. Bogojawlensky, R. S. — Studien über Zellengrosse und Zellenwachstum. XI. Mitt. Über Beziehungen zwischen Struktur und Volumen der somatische Kernen bei Larven von *Anopheles maculipennis*. *Zeitschr. Zellf. u. mikr. Anatomie*, 22:47, 1935.
9. Brachet, J. — Embryologie chimique. Masson, Paris, 1944.
10. Breton, le E. & Schaeffer, G. — Variations biochimiques du rapport nucleo-plasmatique au cours du developpment embryonnaire. Fac. Med. de Strasbourg: Travaux de l'Inst. de Physiologie, Masson, Paris, 1923.
11. Brummelkamp, R. — Das sprungweise Wachstum der Kernmasse *Acta Neerl. Morphologiae*, 2:178-187, 1939.
12. Conklin, E. G. — Cell size and nuclear size *J. exper. Zoology*, 12, 1912.
13. D'Ancona, U. — Grandezze nucleari e poliploidismo nelle cellule somatiche. *Monitore Zoologico Italiano*, 50(8-9):225-231, 1939.
14. D'Ancona, U. — Sul poliploidismo delle cellule epatiche *Boll. Soc. Ital. Biologia speriment.*, 16(1):49-50, 1941.
15. Dussa, M. — Beitr. zur vergl. Anat. der Zellengrosse an der Entwicklung. *Anat. Anzeiger*, 91, 1941 (Cit. Paccagnella).
16. Enriques, P. — Sull'aumento della sostanza nucleare nello sviluppo embrionale nella *Aplysia limacina*. *Rend. R. Acad. delle Scienze dell'Istituto di Bologna (Cl. Sci. Fis.)*, 1913-14.
17. Enriques, P. — La formazione della sostanze nucleare nello sviluppo. Studio biometrico nella *Aplysia limacina*. "*Bios*", 2:183-193, 1914.
18. Fauré-Frémiet, E. — La cinétique du développement. Les Presses Univ. de France, Paris, 1925.
19. Freerksen, E. — Ein neues Beweis für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergl. volumetrische Untersuchungen am dem Zellkerne von Meerschweinchen und Kaninchen. *Zeitschr. Zellf. u. mikr.*, 18, 1933.
20. Geitler, L. — Das Wachstum des Zellkernes in tierischen und pflanzliche Gewebe. *Ergebnisse der Biologie*, 18:1-54, 1941.
21. Godlewsky Jr. — Plasma und Kernsubstanz in der normalen und in der durch äussere Faktoren veränderte Entwicklung der Echiniden. *Arch. f. Entwicklungsmechanik*, 26:278, 1908.
22. Godlewsky, E. — (citado por Huxley e De Beer e Brachet), *C. R. S. Biologie*. Reun. Plen. 24 avril 1925.
23. Goldschmidt, R. — Physiological genetics. New York Mc Graw Hill Co., 1938.
24. Hertwig, G. — Die hypothese des Kerns und Chromosomes Wachstums durch rhythmische Volumenverdoppelung. *S. B. Abh. Naturf. Gesellsch. Rostok.*, 3. Folge Bd 3, 1930-32.

25. Hertwig, G. — Allg. Betrachtungen über Kernwachstum und Kernteilung auf Grund eines Vergl. der Kerngrösse von somatische und generative Zellen bei Maus und Ratte. *S. B. Abh. Naturf. Gesellsch. Rostock.*, 3 Folge Bd 3:549-558, 1942.
26. Hertwig, G. — Die Vielwertigkeit der Speicheldrüsenkerne und Chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. *Z. Abstammungslehre*, Bd. 70, 1932.
27. Hertwig, G. — Die Befruchtungs- und Vererbungsproblem im Lichte der vergleichend-quantitativen Kernforschung. *Anat. Anzeiger (Vern. Anat. Ges.)*, 75, 1932.
28. Hertwig, G. — Die dritte Reifeteilung in Spermiogenese des Menschen und der Katze. *Z. mikr. anat. Forsch.*, 33, 1933.
29. Hertwig, G. — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung. *Anat. Anzeiger*, 87:65-73, 1938-39.
30. Hertwig, G. — Der Furchungsprozess des Mauseies ein Beispiel für die wiederholte Volumenhalbierung polymere Kerne und Chromosomen durch multiple succedane Teilungen. *Z. mikr. Anat. Forsch.*, 45, 1939.
31. Huxley, J. S. & De Beer, G. R. — The elements of experimental Embriology. Cambridge, 1934. Cambr. Univ. Press.
32. Jacoby, W. — Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihre Volumens. *Arch. f. Entwicklungsmechanik*, 106, 1925.
33. Jacoby, W. — Über das Wachstum der Zellen nach einem Gesetz der konstanten Proportionen. *Munch. Mediz. Wochenschr.*, 20:859, 1926.
34. Jacoby, W. — Die Kerngrösse der männlichen Geschlechtszellen beim Säugetieren in Bezug auf Wachstum und Reduktion. *Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgeschichte*, 81:563, 1926.
35. Jacoby, W. — Volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen des Menschen und das allgemeine Problem der Zellkerngrösse. *Anat. Anzeiger*, 72, 1931 (Verh. Anat. Gesellsch. Bressanone) 1931.
36. Levi, G. — Studi sulla grandezza delle cellule. III. Le modificazioni della grandezza cellulare e nucleare e dell' indice plasmatico-nucleare durante i più precoci periodi dell'ontogenesi dei Mammiferi. *Rivista de Biologia (25.º anniv. Lustig)*, 1915.
37. Levi, G. & Terni, T. — Le variazioni dell'indice, plasmatico-nucleare durante l'intercinesi. *Archivio Italiano d'anatomia ed embriologia*, 10:545, 1911.
38. Meyer, R. — Zur Statistik der Verteilung nukleare e Stoffe. Zugleich eine Kritik der bisherigen variationstatistischen Untersuchungen der Kernvolumina. *Zeitschr. Zellf. u. mikr. Anatomie* 25:353, 1937.
39. Möllendorff, v. W. — Zur Kenntniss der Mitose II. Auszählung der Phasenprozente im fixirtem Präparaten. *Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anatomie*, 27(3):303-325, 1937.
40. Morgan, Th. H. — Embriology and Genetics, New York, 1934.
41. Paccagnella, B. — Ricerche quantitative sulle grandezze nucleari nelle cellule epatiche di Axolotl. *Atti R. Ist. Veneto di Scienze Lettere ed Arti*, 104:433-466, 1944-45.
42. Painter, Th. — Nuclear phenomena associated with secretion in certain gland cells with special reference to the origin of cytoplasmic nucleic acid. *J. exper. Zool.*, 100(3):523-539, 1945.

43. *Salvatore, C. A. & Schreiber, G.* — Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravídico. *Memórias do Instituto Butantan*, 20, 1947.
44. *Sauser, G.* — Die Grösse der Zellkerne in verschiedenen Tierklassen unter Berücksichtigung des Geschlechtes der Domestikation end Kastration. *Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anatomie*, 23:681, 1936.
45. *Schreiber, B.* — Recherche sulla spermatogenesi accelerata nelle Anguille. *Archivio Zoologico Italiano*, 24:147-167, 1937.
46. *Schreiber, B. & Angeletti, S.* — Rhythmic increase and decrease of nuclear volume of the hepatic cells of the Carp *Cyprinus carpi* var. *specularis*. *Anat. Record*, 76:431-439, 1940.
47. *Schreiber, G.* — La definizione degli stadi della metamorfosi del Bufo. *Rend. R. Accademia Naz. Lincei. Roma*, 25:342, 1937.
48. *Schreiber, G.* — Discontinuous and proportional decreasing of nuclear size in the liver of tadpoles during development and metamorphosis. *Anat. Record*, 81:80 (Suppl. Am. Soc. Zool.), 1941.
49. *Schreiber, G.* — O volume do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e a interfase. *Revista de Agricultura*, 18(11-12):453-474, 1943 (Semana da Genética, Piracicaba).
50. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa: o crescimento interfásico da espermatogonia nos Ofídios. *Revista Brasileira de Biologia*, 6(2):199-209, 1946.
51. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. II. A terceira divisão e a dimegalia na espermatogenese dos Ofídios. I.ª Reun. Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil, São Paulo, 1946.
52. *Schreiber, G.* — Estudo cariométrico dos poliploides de *Coffea*. Discussão do problema e primeiros resultados. *Bragantia*, Campinas, 7:279-298, 1946.
53. *Schreiber, G. & Romano Schreiber, M.* — Diminuição rítmica do volume nuclear do fígado e do pâncreas nos girinos de Anuros. *Boletim Fac. Filos., Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo*, XXI. Zoologia, 5:234-264, 1941.
54. *Spuhler, O.* — Genitalzyclus und Spermio-genese der Mausmaki (*Nicticebus murinum* Mull.). *Zeitschr. Zell. u. mikr. Anatomie*, 23(4):442-463, 1936.
55. *Sulkin, Norman M.* — A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. *Am. J. Anat.*, 73(1):107-125, 1943.
56. *Wermel, E.* — Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. Mitt. IV. Über dimension der Samenzelle u. s. w. der Seidenraupen. *Zeitschr. Zellf. und mikr. Anatomie*, 17:505, 1933.
57. *Wermel, E. & Portugalow, W. W.* — Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. XII. Mitt. Ueber der Nachweis des rhythmischen Zellenwachstums. *Zeitschr. Zellf. und mikr. Anatomie*, 22:183, 1935.
58. *Wermel, E. & Scherschulskaya, L. W.* — Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. VIII. Mitt. Ueber proportionelle rhythmische Wachstum. *Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anatomie*, 20:459, 1934.
59. *Ziegler, Kraemer, D.* — Epidermal nuclear size changes in methylcholanthrene induced carcinogenesis. *Anat. Record*, 94(3):289-310, 1946.

