

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

BOLETINS DA FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

XVII  
15



# *Biologia Geral n.º 3*



**1939**

Os Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, são editados pelos Departamentos das suas diversas secções.

Toda correspondência deverá ser dirigida para o Departamento respectivo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Caixa Postal, 2926, São Paulo, Brasil.

The "Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo", are edited by the different departments of the Faculty.

All correspondent should be addressed to the Department concerned, Caixa Postal, 2926, São Paulo, Brasil.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor:

*Prof. Dr. Domingos Rubião Alves Meira.*

Diretor da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras:

*Prof. Dr. Alfredo Ellis Junior.*

---

## DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL.

Diretor:

*Prof. Dr. André Dreyfus.*

Assistente Científico:

*Prof. Dr. Edgard Barrozo do Amaral.*

Assistente adjunto extra numerário:

*Licenciada Rosina de Barros.*

Assistente técnico:

*Marta Breuer.*

Monitor:

*Eng. Agr. João Ernesto de Souza Campos.*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

---

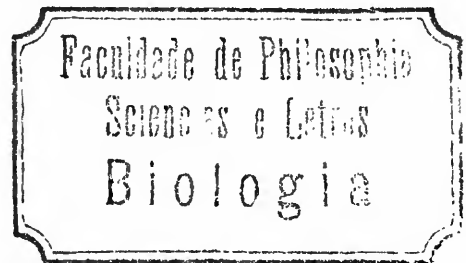
BOLETINS DA  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

XVII

# *Biologia Geral N.º 3*

INDICE

DREYFUS, A. E SOUZA CAMPOS, J. E.: Estudos sobre cromosomas de Marsupiais Brasileiros .....	3
BARROZO DO AMARAL, E.: Contribui- ção para o estudo da origem e natureza da célula de Leydig ..	29
BARROS, R. DE: A colchicina e os pa- ramécios .....	97



SÃO PAULO — BRASIL  
1939

CONTENTS:

DREYFUS, A. and SOUZA CAMPOS, J. E.: Studies in chromosomes of Brazilian Marsupials I — The chromosomes in spermatogenesis of <i>Dydelphis aurita</i> (Wied)	
Abstract .....	3
BARROZO DO AMARAL, E.: Contribution to the study of origin and nature of Leydig's cell.	
Abstract .....	29
BARROS, R. DE: The colchicine and <i>Paramecia</i> .	
Abstract .....	97

# Estudos sobre cromosomas de Marsupiais Brasileiros

## I. — OS CROMOSOMAS NA ESPERMATO- GÊNESE DE *DIDELPHYS AURITA* (WIED).

ANDRÉ DREYFUS e JOÃO ERNESTO DE SOUZA CAMPOS

### I — INTRODUÇÃO

Os Marsupiais Brasileiros pareceram-nos objeto digno de interesse desde que: a) dentre os marsupiais nacionais só em espécies do genero *Didelphys* foram feitos estudos citológicos relativos à fórmula cromossômica, b) são os *Eutheria*, no dizer de KAN OGUMA e SAJIRO MAKINO (1) os unicos Vertebrados no qual “the behaviour of sex-chromosomes is known with certainty during meioses”.

O estudo dos cromosomas dos *Didelphidae* já tem sido feito em varias espécies do genero *Didelphys*. Assim podemos citar os trabalhos de JORDAN (2), HILL (3), HARTMANN (4), PAINTER (5 e 6), HOY e GEORGE (7) e SAEZ (8 e 9).

As espécies estudadas foram *D. paraguayensis* por SAEZ, *D. aurita* por HILL e *D. virginiana* pelos demais autores.

Resolvemos iniciar nosso trabalho pelos cromosomas dos *Didelphidae*. Acreditamos que este estudo, além de seu interesse citológico e genético, poderá talvez contribuir para esclarecer a sistemática zoológica, tão complexa, dos marsupiais.

A presente nota expõe nossos primeiros resultados no testículo de *D. aurita*, vulgarmente gambá, raposa, jupati ou sarigueia. Iniciámos nosso trabalho por esta espécie, não só por ser muito comum em São Paulo, mas ainda por ter HILL, único autor que se ocupou de *D. aurita* só acidentalmente, em trabalho embriológico, tratado dos cromosomas desta espécie zoológica. Além disso as determinações de HILL foram feitas sem o rigor com que habitualmente se fazem as contagens de cromosomas.

## II — MATERIAL E TÉCNICA

Foram utilizados dois exempláres do sexo masculino de *D. aurita* fornecidos pelo Instituto Butantan, ao qual somos muito grátos e classificados no Departamento de Zoologia da Faculdade por gentileza do Prof. PAULO SAWAYA. Esses animais sacrificados em épocas diferentes, janeiro e maio de 1939, foram anestesiados pelo cloroformio e ainda em vida retirados os testículos e rapidamente cortados em peças muito pequenas, que eram logo introduzidas nos líquidos fixadores.

Foram utilizados os seguintes fixadores:

- I — Champy — Minouchi;
- II — Flemming — Heitz;
- III — Bouin — Allen;
- IV — Carothers; \*
- V — Gilson — Petrunkevitch.

O método I embora tenha sido seguido com todo o rigor da técnica indicada por O. MINOUCHI (10) não deu bons resultados, muito possivelmente em virtude da grande pureza do ácido ósmico fabricado após a grande guerra, fáto assinalado por WINIWARTER. (11)

Sua preparação obedeceu à seguinte técnica:

Sol. ácido ósmico a 2% — 4 cc.

Sol. ácido crômico a 1% — 8 cc.

Sol. bicromato de potássio — 8 cc.

Fixadas as peças durante 24 horas, a seguir lavadas em água corrente e depois deshidratadas, clareadas em óleo de cedro e daí levadas ao clorofórmio, toluol, toluol-parafina e incluídas em parafina.

Os nucleos das células, após o uso deste método, córam-se fracamente. Para sanar essa dificuldade foi usado o seguinte tratamento: depois de clareados em água oxigenada, foram os cortes introduzidos na seguinte mistura (de Chura) por 24 horas:

Ácido acético glacial... 50 partes

Sol. aquósa saturada de

ác. pícrico ..... 50 partes

Obtivemos resultados bastante satisfatórios com Flemming-Heitz que, como se sabe, é o Flemming fórte, sem ácido acético, aconselhado por MATTHEY (12). Sem dúvida alguma os melhores fixadores foram os III, IV e V dos quais destacamos o III para espermatozóitos e o IV para espermatogonias e espermatozóitos.

Incluído o material em parafina com 5% de cêra, foram feitos córtes seriados de 10 a 15 microns de espessura, segundo o método de coloração, já que o Feulgen e os métodos com violeta são compatíveis com o emprego de córtes mais espessos.

As colorações empregadas foram:

- A) Hematoxilina férrica;
- B) Feulgen;
- C) Violeta de genciana.

Deste último corante usámos os métodos de NEWTON (13) e a modificação de SMITH (13), bem como a seguinte variante do técnico de nosso laboratório Snr. Gualberto E. Nogueira:

- 1.º — Lavar os córtes alguns segundos em água destilada.
- 2.º — Corár pelo violeta de genciana 15'.
- 3.º — Tratamento pelo líquido de Lugól 10'.
- 4.º — Diferenciação pelo álcool absoluto.
- 5.º — Completar a diferenciação pelo óleo de cedro.
- 6.º — Xilól.
- 7.º — Fechar em bálsamo.



Este método ainda inédito mostrou-se mais regular em seus resultados do que os dois acima citados, fornecendo, além disso, belíssimas preparações.

### III — OBSERVAÇÕES E DISCUSSÃO

A) *Mitóses nas espermatogônias* — As mitóses das espermatogônias dos *Didelphidae* foram estudadas por JORDAN (2), PAINTER (5) e SAEZ (8 e 9).

JORDAN em espermatogônias em divisão encontra 17 cromosomas, ao passo que tanto PAINTER como SAEZ contam 22. Em seu trabalho de 1922, PAINTER explica claramente a causa do erro de JORDAN (técnicas imperfeitas e superposição de cromosomas).

Nossos resultados em *D. aurita* estão de pleno acôrdo com os de PAINTER e SAEZ. As figs. 1 a 4 mostram plâcas equatoriais de espermatogônias vistas de face. Vemos logo que ha sempre dois cromosomas menores situádos no centro de um anél formado por cromosomas maióres. Nesté anél os bastonetes mostram a extremidade externa mais gróssa do que a interna. Nas figs. 3 e 4 os dois cromosomas menóres são os únicos que se encontram no centro do anél. A presença destes 2 cromosomas, os menóres de todos, no centro do anél já foi vista por PAINTER (5) que não a considera como obrigatoria e por SAEZ (8 e 9). E' curioso notar que HOY e GEORGE (7) em mitóses somáticas viram, por vêses, mais dois cromosomas, também dos menóres, nesta mesma situação. Ora, nas nossas

figs. 1 e 2 vemos muito bem, além dos 2 cromosomas menóres já citados, mais um (fig. 2) ou dois (fig. 1) cromosomas, nem sempre dos menóres, também ocupando o centro do anél. Este fáto nos parece digno de registo por não ter ainda sido descrito em espermatogônias.

Procurando ordenar, de acôrdo com seu tamanho, os cromosomas das espermatogônias, o que foi feito na fig. 5 proveniente dos planos equatoriais das figs. 1 a 4, vemos que existem 11 pares de cromosomas que formam uma série quasi contínua pelo seu tamanho. HOY e GEORGE (7) e SAEZ (9) admitem haver no genero *Didelphys* três pares de cromosomas grandes, dos quais geralmente um maior e oito pares de cromosomas pequenos, o que não concórda muito com nossas figuras. O menór dos pares é constituído por dois elementos de tamanho desigual, o maior deles sendo o cromosoma X, o outro o cromosoma Y, sobre os quais voltaremos a falar. Os cromosomas tem fôrma de bastonetes, pelo menos os maióres e sua inserção é telomítica.

A observação cuidadosa dos pares mostra-nos que existem em alguns casos pequena diferença de tamanho entre os dois constituintes do par. A explicação deste fáto é simples: nem sempre todos os cromosomas se dispõem na metafáse num mesmo plano. Basta que um cromosoma não esteja rigorosamente parálelo aos demais, para que resulte disso uma *aparente* diminuição de seu comprimento.

B) *Mitóses de maturação* — No presente trabalho não nos interessámos pela profáse da 1.<sup>a</sup> mitóse de

maturação, assunto que pretendemos estudar ulteriormente.

Os espermatócitos de 1.<sup>a</sup> ordem mostram, na metáfase, 10 tétrades típicas e um elemento formado por duas peças pequenas ligadas a uma terceira por um filamento. Trata-se do complexo XY (figs. 6 e 7). Como mostram claramente as figuras, o elemento X vai para uma das células filhas, o Y para outra. Assim, metade dos espermatócitos (os que recebem o cromosoma X) serão fatores de fêmeas, a outra metade (contendo o cromosoma Y) de machos.

A fig. 8 corresponde à ordenação das tétrades segundo seu tamanho. Em 8a, correspondente à fig. 6, as tétrades são alongadas, o que indica estarmos mais próximos de sua separação em díades.

A fig. 9 mostra com clareza uma anáfase em que o par de cromosomas sexuais se apresenta atrás em relação aos autosomas. Nem sempre observamos isso. Na maioria das anáfases os cromosomas sexuais separaram-se sincronicamente com os autosomas [fig. 10 (anáfase) e 11 (telófase)]. Precissão, afirmada por PAINTER (5), nunca vimos. É notável (fig. 13) que mesmo na 2.<sup>a</sup> mitose de maturação um certo atraso na separação dos cromosomas sexuais ainda pode ser observada.

São facilmente observáveis nos espermatócitos de 1.<sup>a</sup> ordem, quando a coloração é feita com hematoxilina férrica, corpos cromatóides, fato já assinalado por PAINTER (5). Segundo este autor haveria um em cada célula; nós, ao contrario, sempre os encontramos mais

numerósons. Vemo-los com clareza nas figs. 9, 10 e 11 únicas onde os desenhamos. Estão geralmente situádos fóra do fuso. Sem querer entrar aqui na discussão tão complexa de sua orígem e significação, desejamos apenas assinalar que nos foi possível estabelecer com segurança, que sua natureza independe da da cromatína, pois o estudo das preparações pelo método de FEULGEN nunca mostra tais elementos.

Quanto à segunda mitóse (figs. 12 e 13) vemos nitidamente que ha dois tipos de espermatócitos de 2.<sup>a</sup> ordem. Em um deles (fig. 12) contam-se 11 cromosomas, dos quais um é formado por dois elementos muito menóres do que os demais. Trata-se do cromosoma Y que vai ser distribuído às duas espermatides filhas. No segundo tipo (fig. 13) ha também 11 cromosomas (nem todos visíveis na nossa figura) mas um deles, também o menor (cromosoma X), é constituído por quatro elementos, dois dos quais vão para uma das espermatides, os outros dois para a outra.

São frequentes, nos testículos de gambá por nós observados, anomalias nas mitóses de maturação. As figs. 14 e 15 ilustram esta observação. A fig. 14 corresponde a uma mitóse tripolar em um espermatócito de 1.<sup>a</sup> ordem e a fig. 15 móstra um atrazo considerável de 2 autosomas numa mitóse de espermatócito de 2.<sup>a</sup> ordem.

C) *Os cromosomas sexuais em D. aurita* ♂ —  
As observações por nós feitas a propósito dos cromosomas nas espermatogônias e principalmente nos

espermatoócitos de *D. aurita*, conduzem-nos à conclusão, que está inteiramente de acôrdo com os trabalhos de PAINTER (5) e SAEZ (8 e 9) segundo os quais este animal pertence ao tipo X-Y. Já nos referímos acima às críticas de PAINTER (5) ao trabalho de JORDAN (1) que havia admitido ser o opóssum masculino um animal de tipo X-O. A causa disso se deveria segundo PAINTER (5) a defeitos na técnica usada que o levaram a interpretar uma tétrade deslocada como o cromosoma X, que desta maneira não teria parceiro.

D) *O número de cromosomas nos "Didelphidae"*  
— Concordam todos os trabalhos modernos em atribuir, tanto a *D. paraguayensis* [SAEZ (8 e 9)] como a *D. virginiana* [PAINTER (5), HOY e GEORGE (7)], 22 cromosomas como número diplóide. No presente trabalho trouxémos uma confirmação destes dados na especie *D. aurita*.

Trabalhos mais antigos haviam chegado, como já dissémos, a resultados diferentes.

E' assim que o primeiro autor que tratou do problema, JORDAN (1), encontrou 17 cromosomas nas espermatoogônias, 8 ou 9 nos espermatoócitos de 1.<sup>a</sup> ordem; nos espermatoócitos de 2.<sup>a</sup> ordem chegou a admitir 4 ou 5 cromosomas, em consequência de um fenômeno análogo ao descrito por GUYER (14) na galinha com o nome de "dupla redução", fenômeno que seria como um segundo pareamento cromosômico. PAINTER (5) mostrou claramente que a supósta segunda redução responsável pelos números 4 ou 5 nos espermatoócitos de

2.<sup>a</sup> ordem, bem como os números 8 e 9 para os espermatócitos de 1.<sup>a</sup> ordem ou 17 para as espermatogônias, devem-se simplesmente a defeitos de técnica conduzindo à fusão de cromosomas. HILL (3), o único autor que trabalhou com *D. aurita* num estudo sobre o desenvolvimento precóce do ovo, só muito acidentalmente trata de cromosomas nos seguintes têrmos (a proposito dos ovos ainda não segmentados): “Adjacent to the first polar body, but to one side of it, is the second polar spindle with an equatorial group of chromosomes (? twelve in number in egg D.)”. Muito embora não tenhamos trabalhado com fêmeas, pensamos, baseados nos números observádos pelos outros autores, que verificaram 22 como número constante de cromosomas nos dois séxos e em todas as espécies de *Didelphys* já estudadas [PAINTER (5), HOY e GEORGE (7). SAEZ (8 e 9)], que muito provavelmente a observação de HILL (2) não póde ser aceita. Quanto a HARTMANN encontrou 12 para o número haplóide da femea de *D. virginiana*. PAINTER (5) estudou minuciosamente os preparados de HARTMANN e pode mostrar que o número 12 era devido a uma separação precóce da tétrade correspondente ao par de cromosomas X. É assim, que nas figuras de HARTMANN vemos 11 tétrades quadripartidas e dois cromosomas formádos apenas por dois elementos. A demonstração crucial foi dada por PAINTER que nos próprios preparados de HARTMANN encontrou um glóbulo polar com 11 cromosomas, todos formados por quatro elementos. A conclusão é

que, do proprio material de HARTMANN, resulta o número 11 como característico do número haplóide dos cromosomas de *D. virginiana* ♀.

#### IV — CONCLUSÕES

Tendo resolvido estudar os cromosomas nos Marsupiais brasileiros iniciámos nosso trabalho por *D. aurita*, vulgarmente gambá, raposa, jupatí ou sarigueia, chegando às seguintes conclusões:

a) que o número diplóide de cromosomas é 22, concordando com os resultados obtidos por PAINTER (5), HOY e GEORGE (7) e SAEZ (8 e 9) em outras espécies do genero *Didelphys*;

b) que na metafáse da espermatogônia, os autosomas formam um anél em cujo centro se encontram os dois cromosomas sexuais, que são os menores de todos;

c) que algumas vêses, além dos cromosomas sexuais, aparécem no centro do anel um ou dois autosomas;

d) que *D. aurita* é um animal do tipo X-Y em relação aos cromosomas sexuais, como o são os outros do mesmo genero até agora estudados;

e) que todos os autosomas são mais ou menos em forma de bastonete com inserção telomítica e em geral com a extremidade externa mais grossa que a interna;

f) que os cromosomas sexuais em numero de dois, são: um cromosoma X, um pouco maior, constituído, nos espermatozóitos de 1.<sup>a</sup> ordem por dois elementos, e o outro, o cromosoma Y, menor e de forma arredondada;

g) que algumas vezes o complexo X-Y se atraz em relação aos autosomas. É digno de nota que um certo atrazo na separação dos cromosomas X, também pôde ser observado na segunda mitose de maturação;

h) que ha duas espécies de espermatozóitos de 2.<sup>a</sup> ordem, uns com o cromosoma Y constituído por duas peças e outros com o cromosoma X formado por quatro elementos. As espermátides receberão respectivamente um ou dois desses pequenos elementos;

i) que *D. aurita*, *D. virginiana* e *D. paraguayensis* são citologicamente identicos pelo menos em relação ao número, às dimensões relativas e tipo sexual dos cromosomas;

j) que são frequentes nos testículos de *D. aurita* anomalias nas mitoses de maturação, como mitoses tripolares e atrazos de autosomas;

k) que são facilmente observáveis nos espermatozóitos de 1.<sup>a</sup> ordem corpos cromatóides em geral fóra do fuso. O método de FEULGEN mostra que esses corpos cromatóides não devem ser da mesma natureza que a cromatina, pois não ficam corados por esse processo.



### ABSTRACT

The present work deals with the testis's chromosomes of a very common Marsupial, *Didelphys aurita*, vulgarly named "gambá", "jupati", "sarigueia", or "raposa".

The results can be grouped in the following conclusions:

a) there are 22 chromosomes as diploid number, what is in accord with the results of PAINTER (5), HOY & GEORGE (7) and SAEZ (8 and 9) in other species of genus *Didelphys*. This number was found by counting chromosomes of the spermatogonia (fig. 1 — 4);

b) in the metaphase of the spermatogonia the arrangement of the autosomes makes a sort of ring in the middle of which we can find two sex chromosomes, the smallest of all. (fig. 3, 4);

c) sometimes, beside the sex-chromosomes, we can find in the middle of the ring one or two autosomes (fig. 1, 2);

d) *D. aurita* is typical X-Y type for sex-chromosomes, just like other species of the same genus, which have been already studied;

e) all the autosomes are more or less rod-shaped with telomitic insertion and generally with outer end larger than the inner;

f) from the two sex-chromosomes, the X-chromosome, somewhat bigger than other, is composed

in the first spermatocyte by two elements, while the Y-chromosome is constituted by one round-shaped element;

g) sometimes the X-Y sexual-chromosome complex retards in regard to the autosomes (fig. 9) but this is not the rule (fig. 10, 11). It is to be noticed that a certain retard can be seen in the second maturation mitoses during X-chromosomes disjunction (fig. 13);

h) there are two kinds of secondary spermatocyte: one of them carrying the Y-chromosome, (fig. 12) which is composed of two small masses and the other carrying the X-chromosome (fig. 13) made up of four elements. In either case the sex-chromosome divides equationally and we may find in the sperm-cells respectively one or two of these small bodies;

i) *D. aurita*, *D. virginiana*, and *D. paraguayensis* are cytologically similar at least what concerns number, relative size and type of the chromosomes;

j) anomalies in maturation mitoses are frequently seen in testis of *D. aurita* as tripolar atypical mitoses (fig. 14 — first spermatocyte) and retard of the autosomes (fig. 15 — secondary spermatocyte);

k) “chromatoides bodies” can often be seen in the first spermatocyte, generally out of the spindle (figs. 9, 10 e 11). FEULGEN’s method shows that this “chromatoides bodies” must not be of the same nature of chromatin, because they are not stained by such a process.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — OGUMA, KAN e SAJIRO MAKINO, 1937 — A new list of the chromosome numbers in Vertebrate (March 1937) J. Fac. Sc., Hokkaido Imp. Univ. Series VI, Zool., Vol. V, N.º 4, pg. 318.
- 2 — JORDAN, H. E., 1911 — The spermatogenesis of the opossum (*Didelphys virginiana*) with special reference to the accessory chromosome and the chondriosomes. A. Zf., pg. 41.
- 3 — HILL, J. P., 1918 — The early development of *Didelphys aurita*. Q. J. M. A., 63, pg. 91.
- 4 — HARTMANN, C. G., 1919 — Studies in the development of the opossum (*Didelphys virginiana*). J. M., 32, pg. 1.
- 5 — PAINTER, TH. S., 1922 — Studies in Mammalian spermatogenesis. I. The spermatogenesis of the opossum (*Didelphys virginiana*) J. E. Z. 35, pg. 13.
- 6 — PAINTER, TH. S., 1924 — Studies in Mammalian spermatogenesis. III. The fate of the chromatin nucleolus in the opossum. J. E. Z., 39, pg. 197.
- 7 — HOY, W. E. & GEORGE, W. C., 1929 — The somatic chromosomes of the opossum (*Didelphys virginiana*). J. M., 47, pg. 201.
- 8 — SAEZ, F. A., 1930 — Los cromosomas de algunos mamíferos de América del Sur. Nota sobre el complejo cromosómico de *Didelphys paraguayensis* (Oken): Marsupialia. Con. Inter. Biol. Montevideo, 7 — 12, Oct. 1930, pg. 1.
- 9 — SAEZ, F. A., 1931 — The chromosomes of the south American opossum, *Didelphys paraguayensis*. A. N., 65, pg. 287.
- 10 — MINOUCHI, O., 1928 — On the fixation of the chromosomes in mammals and some other animals. Jap. Journ. Zool., Vol. 1, N.º 6.
- 11 — WINIWARTER, H., 1938 — Nouvelles recherches sur la formule chromosomiale du Chat (*Felis domest.*) Arch. Biol. Tome XLIX — fasc. 1.
- 12 — MATHEY, R., 1938 — Contribution Nouvelle à l'Étude des Hétérochromosomes chez les Mammifères, et singulièrement chez les Rongeurs. J. Genet. Vol. 36, N.º 1, pg. 82.
- 13 — GATENBY, J. B. & PAINTER, T. S., 1937 — Bolles Lee's microtomist's vademecum. Churchill. Tenth edition. London.
- 14 — GUYER, M. F., 1919 — The spermatogenesis of the domestic chicken (*Gallus domest.*) Anat. Anz. Bd. 34, pg. 573.

## LEGENDA DAS FIGURAS

Todas as figuras foram desenhadas pela assistente técnica de nosso laboratório Snra. Martha Breuer com o auxílio da câmara clara. Usou-se uma objetiva Zeiss apocromática 120 x, a.n. 1,3, combinada com uma ocular compensadora Zeiss 15 x. O aumento pôde ser julgado pela escala em microns.

- Fig. 1 — Fix. Carothers. Col. Hematox. férrica.  
Pláca equatorial de espermatogônia exibindo 22 cromosomas dos quais quatro centrais. Os dois menores são os cromosomas sexuais.
- Fig. 2 — Fix. Carothers. Col. Hematox. férrica.  
Pláca equatorial de espermatogônia mostrando em seu centro três cromosomas. Os dois menores são os cromosomas sexuais.
- Fig. 3 — Fix. Flemming — Heitz. Col. Feulgen.  
Pláca equatorial de espermatogônia mostrando em seu centro os dois cromosomas sexuais.  
Notar que pelo método de Fulgen, os cromosomas se apresentam mais delgados.
- Fig. 4 — Fix. Carothers. Col. Violeta, seg. G. E. Nogueira.  
Pláca equatorial análoga à da fig. 3.
- Fig. 5 — Ordenação dos cromosomas das figs. 1 a 5a, 4 a 5d, segundo seu tamanho. Vê-se com clareza a existencia de pares, dos quais o último é constituído por elementos de tamanho desigual, o maior sendo o cromosoma X, o menor Y.
- Fig. 6 — Fix. Carothers. Col. Hematox. férrica.  
Espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem mostrando as 10 tétrades e o compléxo X-Y.
- Fig. 7 — Fix. Bouin — Allen. Col. Hematox. férrica.  
Espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem, como acima.

- Fig. 8** — Ordenação dos cromosomas das figs. 6 e 7 segundo seu tamanho. As tétrades da fig. 6 (8a) são mais alongadas do que as da fig. 7 (8b), o que se deve ao fato de estarmos mais próximos da anáfase, na fig. 6.  
O complexo X-Y é o menor e é constituído por duas peças (X) presas por um filamento a uma terceira (Y).  
Na fig. 8b, ha uma tétrade (a oitava) cujo contorno está apenas delineado, pois como se deduz da fig. 7, esta tétrade só mostrava uma pequena parte correspondente à região representada na fig. 8b por uma linha contínua.
- Fig. 9** — Fix. Bouin-Allen. Col. Hematox. férrica.  
Telófase de espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem. Vemos o complexo X-Y muito atrasado em relação aos autosomas. Veem-se também diversos corpos cromatóides (cr).
- Fig. 10** — Fix. Gilson-Petrunkewitsch. — Col. Hematox. férrica.  
Anáfase de espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem mostrando tres corpos cromatóides (cr) situados fóra do fuso.
- Fig. 11** — Fix. Carothers. — Col. Hematox. férrica.  
Telófase de espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem mostrando corpos cromatóides (cr) e uma placa fusorial (pl).
- Fig. 12** — Fix. Carothers. — Col. Hematox. férrica.  
Espermatocito de 2.<sup>a</sup> ordem em mitóse.  
Contam-se 10 díades e um par de cromosomas muito menor (Cromosoma Y).
- Fig. 13** — Fix. Carothers. — Col. Hematox. férrica.  
Anáfase de espermatocito de 2.<sup>a</sup> ordem.  
De cada lado ha 10 cromosomas (nem todos visíveis no corte) e um cromosoma menor, constituído de duas pequenas peças (cromosoma X).  
Notar o atrazo na separação dos cromosomas X e sua união por um filamento.
- Fig. 14** — Fix. Carothers. — Col. Hematox. férrica.  
Mitóse tripolar num espermatocito de 1.<sup>a</sup> ordem.
- Fig. 15** — Fix. Carothers. — Col. Hematox. férrica.  
Espermatocito de 2.<sup>a</sup> ordem em anáfase. Vemos 2 autosomas estacionados no equador da célula.



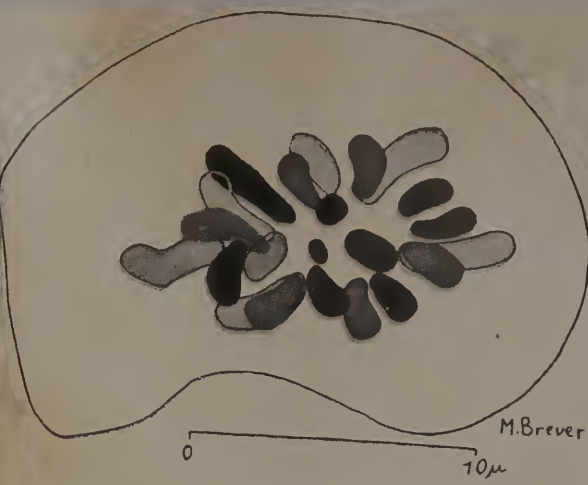


Fig. 1



Fig. 2

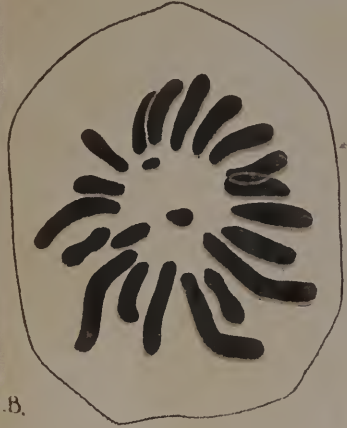


Fig. 3



Fig. 4

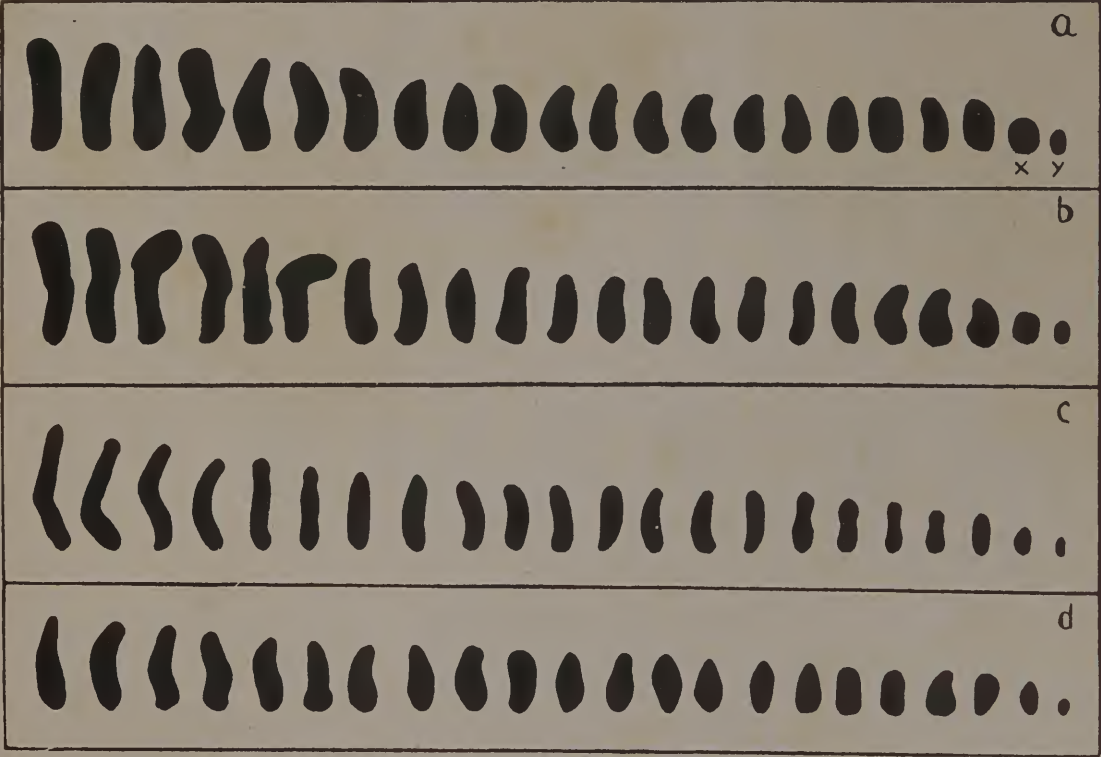


Fig. 5







Fig. 6

Fig. 7

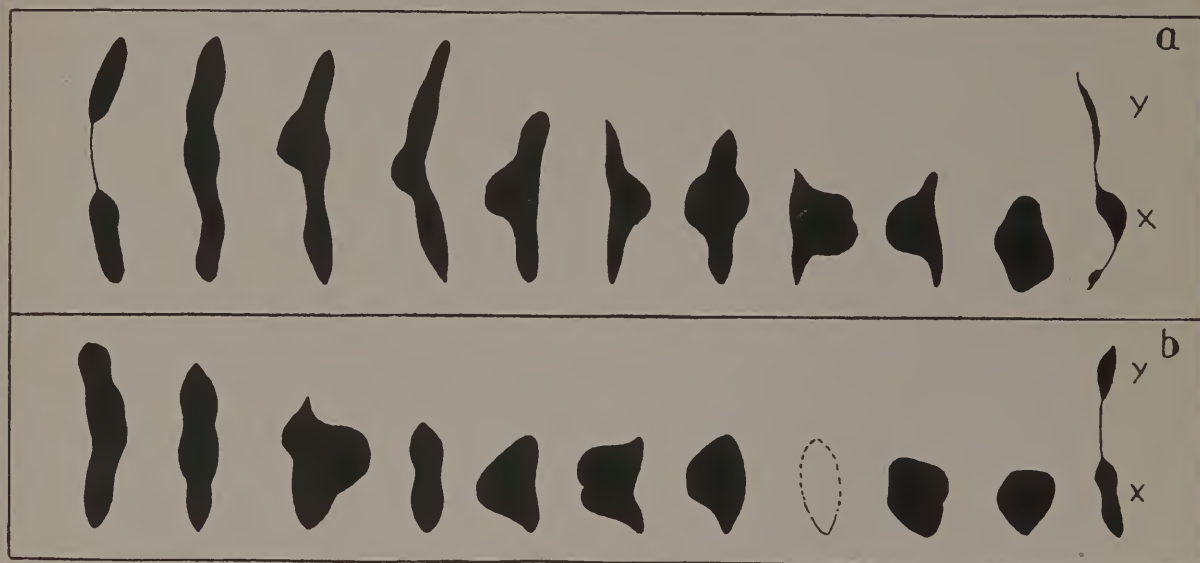


Fig. 8



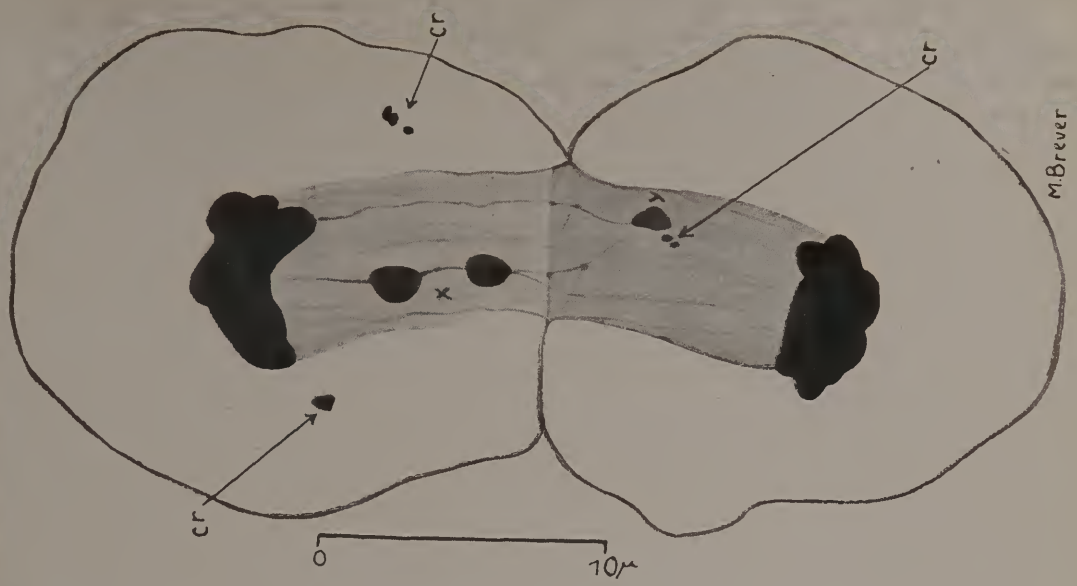


Fig. 9

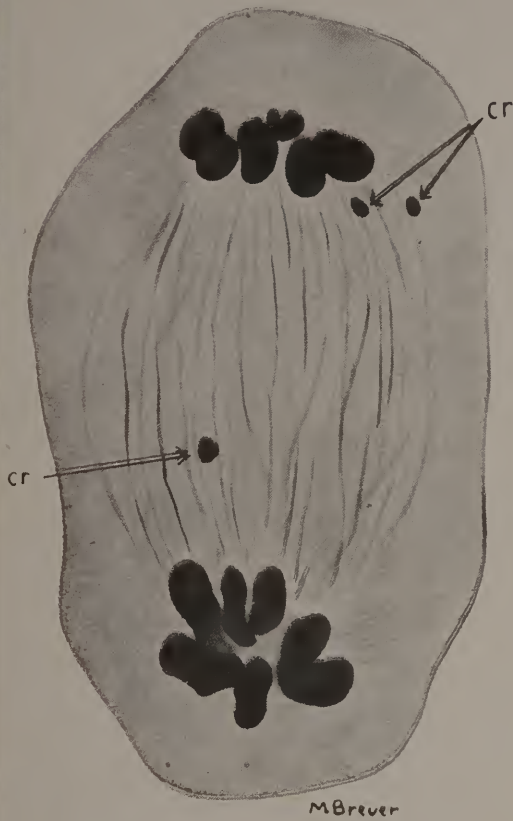


Fig. 10

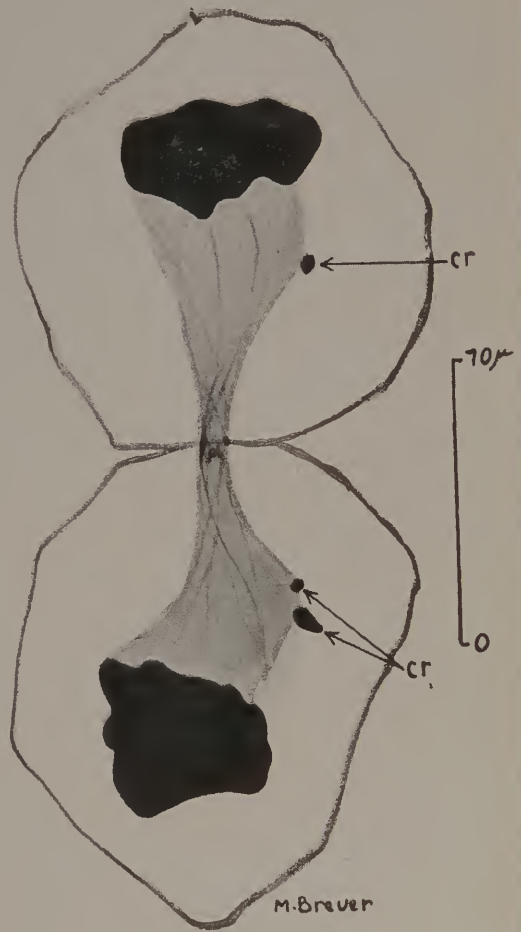


Fig. 11





Fig. 12

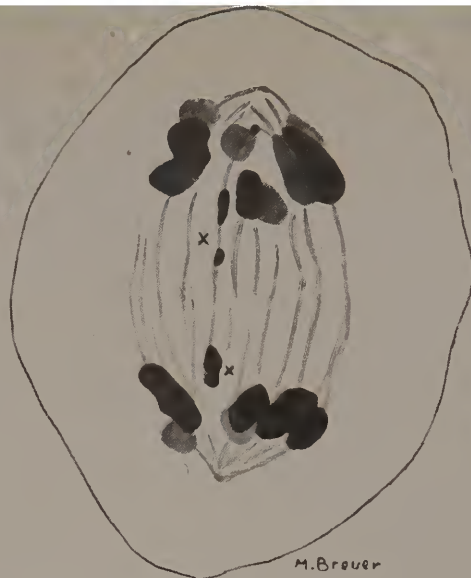


Fig. 13

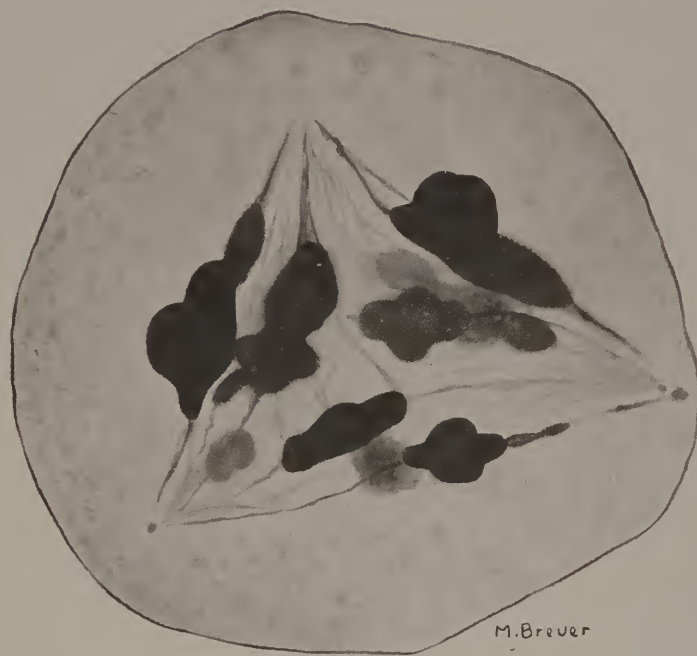


Fig. 14

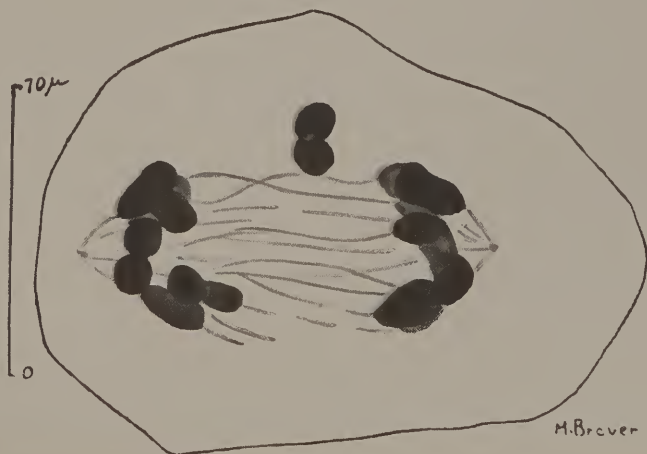


Fig. 15



# Contribuição para o Estudo da Origem e Natureza da Célula de Leydig.

E. BARROZO DO AMARAL

## HISTÓRICO E ESTADO ATUAL DA QUESTÃO

Em 1904, R. H. WHITEHEAD inicia sua monografia sobre o desenvolvimento das *células intersticiais do testículo*, surpreendido pelo pequeno número de trabalhos de pesquisa sobre a histogênese desses elementos.

Trinta e cinco anos depois, fica-se, ao contrário, admirado da quantidade de publicações a respeito e surpreendido de encontrar a questão ainda não resolvida de maneira definitiva.

Esses elementos, cuja paternidade de descobrimento foi dada a KÖLLIKER (ANCEL & BOUIN), são conhecidos também pelo nome de "*células do interstício*" (LEYDIG), "*células diastemáticas*" (BOUIN & ANCEL) ou "*células de Leydig*", e o seu conjunto pelo de "glândula da puberdade" (STEINACH).

São células poliédricas, relativamente volumosas nos mamíferos e que se apresentam, geralmente, com o aspecto epitelióide. Possuem, indiscutivelmente, os caracteres de células glandulares: condrioma abundante,

riqueza de enclaves e pigmentos e citoplasma frequentemente alveolar. Apresentam em certos animais de atividade sexual periódica modificações estruturais cíclicas, que demonstram de maneira cabal sua natureza glandular. Dispostas em cordões ou conglomerados estão em relação estreita com os vasos sanguíneos e linfáticos dos espaços “inter tubuli seminífera”. Parece que sua presença é geral nos animais de todas as classes. Alguns autores, todavia, pretenderam negar sua existência em alguns animais, até mesmo em mamíferos, fato que hoje está demonstrado não ser verdadeiro. Pesquisas citológicas honestas constataram que se encontram nos testículos de todos os mamíferos.

Tais são os elementos dos quais nos propomos a estudar a gênese, e em torno da qual vamos encontrar na “literatura” interpretações as mais discordantes.

Em 1850, FRANZ LEYDIG descreve-os pela primeira vez detalhadamente e verifica sua constancia nos testículos dos mamíferos, considerando-os como *células do tecido conjuntivo*. Esta maneira de vêr é aceita por KÖLLIKER.

LETZERICH, em 1868, atribue ás células de Leydig uma origem e uma função nervosa; seriam células multipolares, dispostas sob a forma de ganglios entre os tubos seminíferos.

Para LA VALETTE SAINT GEORGE, 1871, são elementos enigmaticos “provavelmente de origem conjuntiva”. Nesta mesma época, von EBNER estuda-os de maneira mais detalhada. Seus trabalhos primitiva-



mente no rato, mais tarde no coelho, cão, gato e homem, descrevem a forma poligonal das células intersticiais, seu citoplasma carregado de pigmento e gordura e a constancia das suas relações com os vasos. Quanto à sua origem, admite serem de natureza conjuntiva. BOLL em dois trabalhos sucessivos (1871-1876) chega à mesma interpretação; no segundo trabalho considera as células em apreço como elementos conjuntivos transformados, (apud BOUIN e ANCEL).

Em 1872, HOFMEISTER retoma o estudo da questão em diferentes mamíferos, o homem inclusive: “Apresentam um aspecto nitidamente conjuntivo em certos animais e epitelial noutros” (sic). Não tira conclusões definitivas sobre a origem. Parece-nos, todavia, convencido, sem afirmar, que se trata de elementos de natureza epitelial.

Um ano mais tarde, MIHALCOVICS publica seu primeiro trabalho sobre o mesmo assunto. Termina acreditando serem células de origem conjuntiva. Todavia, em 1895, abandona esta maneira de vêr: compara os elementos intersticiais do testículo aos do corpo amarelo do ovario, aos da glandula intercarotidiana e às células da placenta e admite que sua gênese se dê à custa de restos embrionários dos cordões sexuais.

HENLE, em 1874, retoma a opinião de LETZERICH, segundo a qual fariam parte (as células intersticiais) de um “aparelhamento nervoso terminal”.

JACOBSON também é adepto desta opinião; tenta, por meio da técnica de impregnação pelo cloreto de ou-

ro, resolver definitivamente o problema, demonstrando a presença de fibras nervosas. Porém, nada consegue.

WALDEYER, em 1875, na sua memoria de conjunto sobre as células do tecido conjuntivo, estabelece o grupo das células plasmáticas (Plasmazellen). “São grandes células esféricas, de citoplasma abundante, mantendo muitas vezes relação íntima com os vasos sanguíneos. Constituem, assim, um tipo especial e são denominadas “células perivasculares”. Seriam esses os elementos encontrados “enchendo” os espaços intertubulares do testículo, por consequencia, elementos nitidamente de origem mesenquimatosa, idênticos aos encontrados no corpo amarelo do ovário e na decídua.

Mais ou menos na mesma época aparecem duas memórias de EHRLICH. Observa o ilustre químico alemão que entre os Plasmazellen de WALDEYER uns fixam com avidêz o violête de Dhalia em solução alcoólica, outros permanecem incolôres ou tomam muito pouco corante. As células intersticiais do testículo entrariam nesta ultima categoria, bem como as células do corpo amarelo do ovário, das capsulas suprarenais, (cortex?) e da placenta. Esses elementos mereceriam então, o nome de “células granulosas”, conservando-se o nome de “perivasculares” para aquelas que tomam violentamente o violête de Dhalia. Em conclusão, esse autor opina que as células intersticiais do testículo seriam células conjuntivas altamente diferenciadas.

Os trabalhos de EHRLICH despertaram novamente a atenção de JACOBSON, que resolve estudar atenta-

mente a morfologia e a função dos elementos intersticiais do testículo. Termina este autor, admitindo, agora, serem elementos de função especial e de origem conjuntiva.

Tambem TOURNEUX insiste sobre a natureza conjuntiva destas células, apesar de afirmar que a sua gênese é idêntica à das do corpo amarelo, à das da cortex suprarenal e decídua serotina, (apud BOUIN e ANCEL).

Ao contrario pensa NUSSBAUM, 1880: “São elementos provenientes dos cordões do epitélio germinativo. São absolutamente distintos das células plasmáticas de Waldeyer, podendo encontrar-se simultaneamente no testículo uma ao lado da outra. Não possuem as reações cromáticas dos Plasmazellen (violêta Dhalia negativo); são de natureza nitidamente epitelial”.

As opiniões de REINKE e de LUBARSCH (1896) se opõem à de NUSSBAUM. Ambos imaginam para os elementos em apreço uma origem conjuntiva. (LUBARSCH, apud WHITEHEAD).

Estudo mais aprofundado sobre a morfologia e a gênese da célula de Leydig foi realizado nesse tempo por LENHOSSÉK. Tal pesquisa feita com material humano, constituiu o trabalho mais extenso até então publicado. Depois de uma descrição exaustiva da forma e das relações da célula intersticial verifica a presença dos cristaloides descritos por LEYDIG e LUBARSCH, bem como a riqueza de granulações amarelas. No que concerne à origem, o autor não admite que provenha de elementos mesenquimatósos. “São restos

do testículo embrionário, como admitem STIEDA, MIHALCOVICS, BOUIN e DAVIDOFF”. Apoiar-se sobre os seguintes argumentos na demonstração da sua hipótese: *a*) as células intersticiais formam um arranjo, que apresenta um aspecto epitelial; *b*) a presença de cristaloides, que nunca foi verificada em células conjuntivas; *c*) o aumento de seu número, por mitose em testículos patológicos, o que já tinha sido verificado por HANSEMANN, apud Whitehead. A mesma opinião é seguida por VON BARDELEBEN, que acredita tratar-se de uma forma jovem (Jugendform) dos elementos sertolianos, sem substância fundamental intersticial, como é peculiar aos tecidos mesenquimatosos. Como as “células nutritivas”, tem uma origem epitelial e são derivadas do epitélio germinativo. Quatro anos antes MINOT afirmava essa mesma concepção: “São remanescentes celulares dos cordões sexuais não aproveitados no tubo seminífero”.

J. PLATO é contrario a essa hipótese. Faz suas observações em embriões de gatos de sete semanas e afirma ter presenciado todas as etapas de transição da célula conjuntiva típica para a célula de Leydig. Essa opinião é imediatamente refutada por BEISSNER (1898) que pretende demonstrar serem os grupos de células intersticiais pedaços do epitélio germinativo (cordões medulares) que pararam a sua evolução.

Um ano mais tarde, vamos encontrar na nossa pesquisa bibliográfica o trabalho de CLAUDE REGAUD. As principais verificações deste autor se encontram em

conjunto com um dos seus alunos L. SÉNAT (tése de doutoramento). Não tivemos oportunidade de lêr essa tése. As conclusões de REGAUD no tratado de Renault sobre a histogênese dos elementos diastemáticos são duvidosas: células conjuntivas (perivasculares) ou leucocítos?

Esta origem sanguínea vae ser mais tarde a conclusão de FIRKET sobre a gênese das células em estudo. Nessa ocasião, entretanto, é vivamente combatido por GANFINI em duas monografias sucessivas (1902 e 1903), bem como por LOISEL (1902), (apud BOUIN e ANCEL). Ambos acreditam ser a célula diastemática de origem epitelial, opinião que é também a de Bozzolo (1902), (apud GANFINI).

Chega o observador ao ano de 1903, data marcante no estudo das células intersticiais do testículo.

A monografia classica de BOUIN e ANCEL sobre o testículo dos mamíferos, onde pela primeira vês se fez luz sobre o significado funcional das células em apreço, é de uma pobreza de palavras decepcionante para quem se interessa no assunto que nos propuzémos a estudar. Desse trabalho tirámos a maioria das referencias bibliográficas anteriores a 1900. Todavia, nada de novo se encontra, a respeito da histogênese das células de Leydig, nas conclusões finais. Colocam-se completamente alheios ao problema embriológico. No seu apanhado histórico, percebe-se estarem ao lado daqueles que pensam serem as células intersticiais de origem epitelial.

O mesmo não acontece com ALLEN (B.M.) e WHITEHEAD que neste mesmo ano (1904) trataram exaustivamente do assunto. O primeiro sobre a gênese do testículo em geral, e, o segundo, sobre a das células intersticiais em particular. Ambos admitem que a célula mesenquimatosa indiferenciada seja capaz de se transformar (em qualquer tempo, aliás) em célula glandular do testículo. Fazem questão de acentuar ser somente o mesênquima, que limita a eminência genital, capaz dessa transformação.

Todavia, a interpretação dada por WHITEHEAD à fig. 1, pag. 172 (“células conjuntivas anastomosadas”), não satisfaz, pois as células glandulares vacuolisadas podem apresentar o mesmo aspecto.

BENNET ALLEN, apesar de ser da mesma opinião, confessa que no estado jovem elas não se distinguem das células que constituem os cordões sexuais, a não ser pela ausência de membrana basal.

Sómente quem está habituado ao estudo de material embrionario pôde aquilatar a dificuldade de distinção tão sutil entre os elementos epiteliais e conjuntivos.

Em 1906, WALDEYER escrevendo a parte referente aos órgãos genitais do tratado de embriologia de O. HERTWIG, afirma mais uma vez a procedência conjuntiva dessas células, baseando-se, principalmente, em pesquisas sobre material humano.

Infelizmente, não nos foi possível lêr o trabalho de SAINTMONT (1905), uma das maiores autoridades no assunto. Segundo a sua opinião, que conhecemos

por intermédio de v. WINIWARTER, as células diastemáticas são de origem conjuntiva.

GIANELLI (1905) pesquisando o desenvolvimento do testículo e do ovário de *Lepus cuniculus*, chega à conclusão de que as células intersticiais do testículo proveem dos cordões sexuais. “São restos dos cordões, pequenas células que se multiplicam por mitose e acabam por se localizar entre os canais seminíferos; ao lado, podem-se encontrar células conjuntivas”. Quanto ao ovário, está de acordo com aqueles que atribuem uma origem conjuntiva aos elementos intersticiais. Da mesma opinião é RUBASCHKIN. Este autor, em 1912, estuda na cobáia os estados muito precoces da gonadogênese e descreve ao lado dos cordões sexuais, células “epitelioides particulares”. Elas proviriam da mesma fonte dos cordões sexuais, isto é, do epitélio celomático e se transformariam em células intersticiais. O aparecimento das células intersticiais seria, segundo RUBASCHKIN, muito precoce: contemporaneas das células dos cordões (gonocítos e células de SERTOLI).

Esta concepção será mais tarde, o ponto de apoio das idéias de FÉLIX e das experiencias de VÉRA DANTCHAKOFF e WITSCHI.

Em 1912, v. WINIWARTER em continuação a uma série de artigos iniciados em 1901, trabalhando em testículos de gato, verifica que os elementos de Leydig são simples transformação do mesênquima do estrôma da gonada. É um dos autores mais peremptorios nas suas afirmativas.

Essa conclusão é aceita pelos AA. americanos FIRKET e SWIFT, em memorias publicadas em 1914 e 1916 sucessivamente.

Entretanto, em 1914 vamos encontrar na Alemanha opinião diametralmente oposta: é a de KOHN, que acredita terem os elementos intersticiais a mesma origem das células de SERTOLI: “As pequenas células do epitélio celomático irão constituir mais tarde não só as células de SERTOLI, como também as células intersticiais”.

Nada de interesse encontramos publicado nos anos de 1917 a 1920 sobre o assunto.

Em 1921 H. STIEVE publica um trabalho sobre a gênese das células intersticiais do testículo, concluindo que sejam elas simples transformação do mesênquima do “esboço gonadal”. Essa opinião é mantida até hoje. (Veja Handb. d. mikrs. Anat. d. Menschen — WILH. VON MÖLLENDORF, 1930).

1922. — JACQUES BENOIT, o paladino moderno da corrente que admite serem as células intersticias de origem epitelial, publica sua primeira monografia sobre o assunto, já tão discutido. Como todos os seus antecessores, baseia-se unicamente na forma e na disposição das células de Leydig no embrião e no adulto. Sómente mais tarde (trabalhos de 1924 e 1935) estuda o comportamento destes elementos no criptorquidismo experimental e nos órgãos tratados pelos raios X.

As observações de BENOIT são confirmadas por NONIDIZ (1924) que mostrou nos embriões de galos Sebright a transformação de certas células dos cor-



dões sexuais em autênticas células intersticiais. (\*) Também por PELLEGRINI, que em diversas monografias (1925, 1926, 1927) estuda o comportamento das células intersticiais ora na regeneração testicular, ora nas lesões experimentais do testículo, ou ainda, nos testículos de animais de atividade sexual cíclica. Conclue que são “elementos de origem nitidamente epitelial”.

Seguindo a mesma ordem de ideias, BATAGLIA (1925) lembra que muitas vezes são confundidas duas variedades celulares: as células intersticiais propriamente ditas (de natureza epitelial) ou diastemáticas e as células intersticiais “lipodíferas de CIACCIO”, estas fazendo parte do sistema retículo histiocitário, e, portanto, de origem mesenquimatosa.

Consultando a bibliografia verifica-se que BENOIT é acompanhado por uma plêiade de autores que acreditam, também, não ser possível dar como origem da célula intersticial, outra que não o epitélio celomático; KITAHARA (1923), Mlle. GUYON (1923), LIPSCHÜTZ (1925 e 1932), CUTORE (1928) BOZZOLO (1928), ARON, E. (1929), STEIN (1931), HERLANT (1932 e 1933), DIAMARE (1934) e RISLEY (1934). Este ultimo, estudando a histogênese da célula de LEYDIG na tartaruga mostra magnificas microfotografias, fig. 13 e 14 J. of Anat.) onde se vê a migração de pequenas células do epitélio celomático, que ora penetram nos tubos seminíferos, ora persistem no estrôma inter-

---

(\*) Aliás, o mesmo A. concorda com POPOFF (1909), que estas células desaparecem e são substituídas, mais tarde, à custa de elementos mesenquimatosos do estrôma.

tubular, constituindo assim verdadeiras células intersticiais.

De outro lado, uma série ainda maior de autores continúa acreditando na concepção de LEYDIG, isto é, que as células intersticiais do testículo sejam de origem conjuntiva. HUMPHREY (1921), BASCOM (1923), YAMAKAWA (1925), BRUNI (1926) FISCHER (1929), ESAKI (1928), DREYFUS & PIRES FERRAZ (1933) e muitos outros.

Nos tratados modernos de embriologia e de histologia a histogênese fundamental da glandula intersticial continúa sendo encarada como questão não resolvida.

Alguns autores não entram no mérito do assunto: HILL, POLICARD, WATSON, KRAFKA. Outros preferem não dar opinião; assim FALCONE, SHUMWAY, VIGNOLI, HARTRIDGE & HAINES, MAXIMOW & BLOOM e LANGLEY restringem-se a apresentar a questão como sendo mais um terreno litigioso da embriologia.

P. BOUIN, depois de considerar que a opinião mais comumente admitida é que tais elementos proveem do mesênquima, afirma que uma outra concepção (a origem epitelial) "s'acredite de plus en plus". BOEM, DAVIDOFF e HUBER acreditam que provenham de restos epiteliais dos tubos de WOLFF, opinião também aceita por KEITH. SHARPEY-SCHAFFER (E.) limita-se a chamar a atenção para o fato de existirem histiocitos entremeiados com autênticas células intersticiais. KEIBEL e MALL consideram que sejam provenientes de células genitaloides (epitélio celomático); a mesma

expressão é usada por JORDAN e KINDRED. TOURNEUX, ao contrario, escreve sobre as células em apreço, como oriundas de elementos mesenquimatósos que se transformam; é acompanhado por FISCHÉL. DUBREUIL se abstém de opinar; entretanto, “aconselha” ao leitor que siga a opinião de FELIX como a maior autoridade no assunto, o qual admite que as células de LEYDIG provenham dos cordões sexuais. Segundo BRACHET as células remanescentes dos cordões se perdem no mesênquima e participam da formação da glândula sexual.

BRANCA, CHIARUGI, C. DA COSTA e ROBERTO CHAVES, TRAUTMANN & FIEBIGER, COWDRY, BEILOT e BAUDRIMONT, BRAUS, STÖHR e muitos outros ficam com a opinião de LEYDIG: elementos de natureza conjuntiva. .

ROMEIS acredita que só um estudo experimental poderá resolver o problema controvertido da origem epitelial ou mesenquimatosa das células intersticiais.

Verifica-se neste apanhado historico, que as opiniões são as mais contraditórias no que respeita à gênese das células de LEYDIG. Em síntese: uma maioria que admite serem “elementos conjuntivos diferenciados”, provindo diréta ou indirétamente (p. ex. globulos brancos) da célula mesenquimatosa. Uma minoria que afirma serem as células intersticiais de *origem epitelial*: ou do epitélio celomático ou dos cordões sexuais ou ainda dos tubos do corpo de WOLFF. Finalmente, um grupo muito restrito de autores antigos,

que imagina uma origem nervosa para os elementos da glandula da puberdade de STEINACH.

Provavelmente, deve-nos ter escapado um grande número de trabalhos a respeito da gênese das células intersticiais de LEYDIG. A quantidade de monografias computadas parece-nos suficiente, entretanto, para demonstrar que o problema, no momento atual, é encarado sob dois aspectos diversos: origem mesenquimatosa ou origem epitelial. A solução definitiva do assunto dependerá de novas pesquisas, para cuja elucidação resolvemos trazer a presente contribuição.

### MATERIAL E MÉTODO

As pesquisas realizadas nos laboratórios de Biologia Geral da F.F.C. e L. e de Histologia da E.P.M. foram iniciadas ha dois anos com embriões de diversos vertebrados e testículos de mamíferos adultos.

Pela dificuldade de se conseguir material embrionário humano nas condições exigidas pelas experiências, que logo passamos a descrever, não nos foi possível até o momento realiza-las em "anima nobili".

### MATERIAL EMPREGADO

Qualidade	Quantidade
Embrião de galinha Leghorn branca de 4 dias.....	8
” ” ” ” ” ” 6 ” .....	10
” ” ” ” ” ” 8 ” .....	8
” ” ” ” ” ” 9 ” .....	12
” ” ” ” ” ” 11 ” .....	6

Qualidade	Quantidade
Embrião de galinha Leghorn branca de 12 dias.....	5
” ” ” ” ” ” 14 ” .....	4
Córtes seriados em congelação de 15 a 30 micra.	
Embrião de rato ( <i>Mus albinus</i> ) de 8 dias .....	10
” ” ” ” ” ” 12 ” .....	10
” ” ” ” ” ” 14 ” .....	10
” ” ” ” ” ” 18 ” .....	10
” ” ” ” ” ” 20 ” .....	10
Ratos recém-nascidos de 21 a 22 dias .....	10
Testículos de ratos jovens 15 a 30 dias .....	10
” ” ” ” 1 mês a 1½ meses .....	10
Embriões de gambá ( <i>Didelphys aurita</i> ) (2 centimét.)	6
” ” ” ” ” (5 ” )	6
” ” ” ” ” (7 ” )	6
Testículos de gambá (9 centímetros).....	8
(ainda no marsupio)	
Testículo de gambá jovem .....	1
” ” ” adulto .....	2
Testículo de gato jovem ( <i>Felix catus</i> ) 20 dias.....	4
” ” ” ” ” ” 1 mês .....	4
” ” ” adulto .....	3
” ” cão jovem ( <i>Canis domesticus</i> ) .....	1
” ” ” adulto ” ” .....	2

## Fixação

Experiencias anteriores nos ensinaram que para a conservação do material, cujos córtes se pretenda submeter ao tratamento pelo reactivo de Schiff, é necessario o emprego de um fixador contendo bicloreto de platina. Devido ao preço excessivo deste producto, fizemos varias tentativas para diminuir sua dosagem. As quantidades preconizadas por Lison e Verne correspon-

dem a 70 partes de formól a 10% para 30 partes de solução aquósa de cloreto de platína a 1%. Chegámos à conclusão de que 95 partes de formól e 5 partes de cloreto de platína são suficientes para conservar, por tempo indeterminado, num tecido, a capacidade de reagir ao acido fucsínico sulfuroso.

A delicadeza do material e as suas pequenas dimensões não permitem a realização de córtes em congelador, sem ser fixado préviamente. Esta operação, apesar de diminuir o tamanho do embrião lhe confére uma certa rigidês, graças à qual se obtêm melhores córtes (sem fragmentação). Os embriões pequenos (galinha e rato) não devem permanecer por mais de 24 horas no liquido de fixação e os embriões muito desenvolvidos são decapitados para uma penetração maior do fixador. Verne, em trabalho recente, aconselha o emprego exclusivo de uma solução de formól a 10%, prescindindo do bicloreto de platina ou mesmo do sublimado, outróra usado. As poucas fixações assim realizadas impédem-nos de dar uma opinião a respeito; temos, porém, a impressão que o reativo de Schiff reáge de uma maneira menos enérgica no material assim tratado. Por varias vêses tentámos cortar material não fixado, para fazer, em seguida, a reação de Feulgen-Verne. Infelizmente, os córtes eram tão frágeis que essa intenção foi sempre frustrada..

### **Microtomía**

Após a fixação, é a peça lavada em agua corrente durante 2 horas, no mínimo, para retirada do formól.

Todos os córtés foram feitos em micrótomo de congelação (Leitz). Com uma espessura abaixo de 15 micra ficam fragmentados ou completamente dobrados, razão pela qual não pódem ser aproveitados. Nos embriões de rato e de gambá realisámos córtés grossos até atingir a presuntiva região da gonada. Uma vez alcançada esta região fazíamos o exame rápido de 1 cóрте, já corado pelo azul de metileno, e sómente quando tínhamos a certeza de estar no ponto desejado, começavamos “a seriação”.

Resolvemos o problema da “seriação” dos córtés usando uma série de tampas de Borrel (8 a 10) enumeradas, dentro das quais eram colocados de 1 a 3 córtés. Apesar de todas as precauções tomadas (navalhas bem afiadas, confecção de córtés grossos — 35 micra, retirada dos córtés da navalha com pincel sêco) o numero de córtés perdidos foi muito grande (fragmentados ou dobrados). Tentámos sanar esses inconvenientes usando a inclusão em gelatina: solução aquósa a 10%, endurecimento, reinclusão em solução a 20% em banho-maria. Apesar disso, não obtivemos resultados satisfatórios. A reação de Feulgen-Verne se processa, mas, podemos afirmar, de uma “maneira frusta”. No material testemunha (embriões e testículos da mesma idade) cortado em congelação, a reação era muito mais nítida. Por esse motivo abandonámos aquele processo de inclusão.

Póde-se avaliar a dificuldade de conseguir córtés relativamente finos, bem distendidos e inteiros de um tecido que passou por um ácido relativamente forte!

Emquanto que nada acontece com os embriões jovens, onde as gonadas ainda estão inteiramente “presas” ao epitélio do celôma, nos embriões de idade mais avançada, ou nos recém-nascidos, o esboço do testículo se perde com as alças intestinais, que se desprendem logo após a microtomia ou durante as manipulações da reação. O nosso fíto exclusivo era pesquisar a reação de F.V. nas gonadas de diferentes idades. Contudo, a inclusão em parafina e a coloração pela Hematoxilina-Eosina foram frequentemente usadas para contróle.

### Reação de Feulgen-Verne

A reação plasmática (ou plasmal) de Feulgen-Verne é caracterizada pela propriedade que apresentam certos encláves lipídicos de recolorir (voltar a côr) o reativo fucsino sulfuroso de Schiff, em adsorvendo-o. Essa capacidade só é adquirida após uma *hidrólise*, relativamente ligeira (HCl N/10), durante 3 horas, à temperatura ambiente ou *oxidação*. Por sua vês, esta oxidação póde ser lenta quando os córtes são abandonados à agua 24 horas ou rápida, quer pela fixação, quer “passando” por uma solução de bicloreto de mercúrio ou de cloreto de platina.

Em 1866, HUGO SCHIFF estudando as reações de diversos corpos aromáticos, descobre incidentalmente que a fucsina em solução aquósa era descorada por um excêso de ácido sulfuroso e que a solução assim obtida dava nascimento a uma matéria coráda (vermelho-azulada), quando em presença de um traço de aldeído.



de Schiff para a pesquisa da função aldeídica, vulgarizando assim o reagente fucsíno sulfuroso (apud LISON). FEULGEN é o primeiro a introduzir essa reação na citologia como reagente *específico* da cromatina. Muitos anos depois, CARO e SMITH utilizam a reação. Mais tarde, continuando seus trabalhos em colaboração com BEHRENS, verifica que no citoplasma de diversos elementos existe uma substância diferente dos ácidos nucleínicos, capaz também de dar reação com o reagente de Schiff, após certos tratamentos (hidrólise ou oxidação).

Como Schiff, Feulgen imaginava que o líquido descorado fosse resultante da ação do  $\text{SO}_2$  sobre a fucsina básica em solução aquosa formando o bisulfeto de pararosanilina e que se tratasse de uma reação eletiva dos aldeídos. Trabalhos modernos vieram contestar essa opinião: O reagente de Schiff é uma combinação instável de ácido sulfuroso com o ácido para-fucsínico-leuco-sulfônico. O “ácido fucsíno sulfuroso” é, pois, o ácido para-fucsino-leuco (Lison).

Como demonstraram Lison e Gerard esta reação não é específica dos corpos de função aldeídica; ela é também positiva com as acetonas alifáticas e um certo número de compostos lipídicos não saturados.

Isto em nada tira o mérito da reação proposta por Feulgen e Behrens e utilizada com habilidade por Verne na histoquímica dos lípidos.

Segundo a concepção de Feulgen, existe em um grande número de células (mamíferos), uma substância ligada aos enclaves lipídicos, podendo ser extraída

pelo alcool, insolúvel na agua e soluvel nos solventes organicos. Chama-a de *plasmalógeno* que propriamente não reáge com o reatívo fucsínico sulfuroso. E' necessário o uso de hidrolisantes (HCl N/10) ou de sais pesados que o transformem de uma maneira lenta (HCl) ou rápida (HgCl<sub>2</sub> p. ex.) em *plasmal*. Não ha verdadeiramente uma transformação, mas uma "separação". O plasmal, provavelmente está ligado a uma substancia que dele se sepára após uma hidrólise ou oxidação (Feulgen e Voigt). Apresenta esta substancia, cuja natureza química ainda não é bem conhecida, todas as reações dos aldeídos: produção de hidrazôna e tio-semicarbazôna com a fenilhidrazina, coloração violêta pelo reatívo de Schiff, etc. (Feulgen, Imhäuser e Behrens). Para o conceituado químico da Universidade de Giessen, o plasmal é uma mistura de aldeídos esteárico e palmítico na proporção de 10 para 90. Pesquisas mais modernas de Feulgen com seu colaborador Behrens demonstram, entretanto, a existencia de mais um componente, provavelmente, de função aldeídica. E' uma substancia ainda não determinada, dotada de um cheiro muito fórte, propriedade esta que não se encontra nos aldeídos palmítico e esteárico. (\*)

Verne consegue reproduzir "in vitro", sobre o ácido oleico, a reação plasmatica. Conclúe que sob a ação do oxigenio do ar, este ácido se transforma parcialmente em compostos aldeídicos.

---

(\*) Em 1930, novamente FEULGEN acompanhado de seu assistente BERSIN, volta ao assunto e acredita que se trate de um "acetoaldeído".

Gerard repetindo as experiencias de Verne observa a formação de dois corpos distintos sob a influencia das reações empregadas: um de função aldeídica, outro de função oxidante. Termina afirmando que o fato mais importante da reação plasmática é “*déceler, au niveau des enclaves, une fonction oxydante acquise secondairement*”. Para nós o interesse maior da reação não está propriamente no estudo do seu mecanismo e sim na diferenciação que possa ser feita entre as diversas “*espécies*” celulares, usando o reativo de Schiff.

Baseado nos trabalhos de Verne, demonstrando a distinção entre células glandulares pela reação que traz o seu nome, resolvemos iniciar estas pesquisas.

Já em trabalho anterior tínhamos adquirido grande prática na realização da reação F. V. Em pesquisas ainda inéditas tivemos oportunidade de constatar as afirmações de Verne sobre a existencia, em diversos tecidos, de categorias de substancias lipídicas, que se comportam de maneira diferente deante da referida reação:

- I — Lípidos que não dão a reação de FEULGEN-VERNE e só as colorações gerais das “gorduras”.
- II — Lípidos que dão a reação de FEULGEN-VERNE e concomitantemente as reações gerais das “gorduras”.
- III — Lípidos que só dão a reação de FEULGEN-VERNE e não dão as colorações gerais das “gorduras”.

Inclusões do primeiro tipo encontram-se nas células adiposas do tecido conjuntivo, em certos tubos do rim e nas células hepáticas.

As do segundo tipo existem em células de varios órgãos: em certas células dos tubos urinarios dos mamíferos carnívoros, nas pequenas células alveolares do pulmão, nas células epiteliais das vias biliáres, nas células das glandulas do tracto genital masculino e nas *células intersticiais do testículo*.

Entre os raros elementos do terceiro tipo (certos tubos do rim, células do parênquima alveolar do pulmão em certas circunstâncias) encontra-se a *medula supra-renal*. Trabalhos posteriores do mesmo autor demonstráram que se trata sómente de uma impregnação, nesta zona, de produtos elaborados pela fasciculada da *cortical*, que seriam oxidados na zona medular, donde o aparecimento do plasmalógeno. Tanto isto é verdade, que os resultados da reacção em células dos paragânglios são negativos.

Podemos afirmar que as células do hilo do ovário ou células de Berger, (Barrozo, E. 1938) estão incluídas no segundo tipo, bem como o epitélio dos tubos do mesonéfros e as células de Sertoli (pequenas granulações F.V. positivas).

Verifica-se do exposto acima que nos grupos II e III não são encontrados elementos de origem mesenquimatosa. As observações de Verne não permitem dúvidas a respeito.

\* A técnica, por nós seguida, é uma combinação das preconizadas por Feulgen, Verne e Lison com algumas modificações.

### Técnica da Reação de Feulgen-Verne

A.) Imersão dos córtex (3 de cada vês) na solução de cloreto de platina a 1% ou no bicloreto de mercurio (solução saturada) em cuba de cristal. Tempo 1' a 3'.

B.) Passagem diréta para o reatívo de Schiff em cubas de cristal de fundo negro. Tempo 15' a 18' mais ou menos, dependendo da grossúra dos córtex; quanto mais grosso, mais tempo.

C.) Agua distilada, rápidamente.

D.) Passagem em tres vidros (Godets) fechados, contendo ácido sulfuroso exatamente como na reação nuclear. Tempo 1' em cada vidro é o suficiente.

E.) Lavagem em agua distilada num tempo necessario para se descorar até a côr violête pálido. Usámos para isso cristalisadores colocados em fundo branco.

Montagem em xarôpe de Apathy ou glicerina gelatinada. Lutagem do preparado (conserua-se pouco tempo).

De preferencia deve-se usar a solução de cloreto de platina, porque o sublimado deixa, no córtex, cristais que sempre prejudicam a visibilidade. Os fixadores contendo bicromato, ácido cromico, ou ácido ósmico

absolutamente não podem ser usados, pois oxidam demasiado a substancia a pesquisar, impedindo, assim, a reacção.

### Coloração vital

Foi usado sómente o *litio-carmim* (Grübler). Soluções aquósas a 1% em injeções intra-peritoniais de 1,5 cc durante 7 dias consecutivos — 6 ratos brancos.

Solução aquósa a 3% — Inj. int. perit.. 8 injeções de 1,00 cc — dias alternados — 3 ratos brancos.

Solução aquósa de 2,5% a 3,5%. 10 injeções de 1 cc a 3cc em dias consecutivos — 3 gatos jovens.

Solução aquósa de 1 cc em injeção no testículo, 6 injeções em dias alternados — 3 gambás jovens.

Suspensão oleosa a 2% em injec. justa testicular, 2 injeções em dias consecutivos — 2 gatos adultos.

### DISCUSSÃO E RESULTADOS

O fáto das células intersticiais do testículo serem consideradas como de natureza conjuntiva por alguns histologistas, constitúe uma rara excepção entre os elementos que intégram os órgãos de secreção interna.

Assim vejamos: O aparelho tiroidiano — tiróide e paratiróide — provém do intestino faringeano e dos terceiro e quarto pares de bolsas branquiais, respectivamente (epitélio do entoderma). A hipófise tem os seus elementos, quer os do lóbulo anterior, quer os do intermédio ou do posterior oriúndos da folha epitelial

ectodermica (bolsa de Ratke) ou nervosa (3.º ventrículo). A mesma origem “nervosa” tem a “medula suprarenal” (crista ganglionar). Quanto à cortex desta glandula não ha discussão a respeito da sua gênese; ela se dá à custa do epitélio celomático (epitélio do mesoderma). As células dos ilhéus de LANGHERANS proveem, como suas irmãs de secreção exócrina (células acinosas), de um brôto do intestino primitivo. O mesmo se verifica com a célula hepática (epitélio do endoderma). O tímico e a epífise, si os considerarmos como órgãos endócrinos, têm, também, origem epitelial.

Quanto ao ovario, sua dupla secreção endócrina (foliculina e progesterôna) tem, como substrato morfológico, células, para a maioria dos especialistas e também para nós, de origem epitelial. As células foliculosas (granulosa) são responsáveis pela secreção desses dois hormônios, secreção que ocorre nas duas etapas de sua evolução cíclica. Essa concepção é admitida ainda mesmo pelos autores que acreditam na natureza conjuntiva das células de Leydig. É assim que no folículo as células foliculosas secretariam a foliculina; rompido esse e transformado em corpo amarelo, passariam a secretar progesterôna.

Não ha ainda um critério único a respeito da formação do corpo amarelo. Alguns AA. imaginam que a célula mesenquimatosa da teca interna, que acompanha os capilares no momento da penetração destes após a rutura do folículo, se transforma mais tarde em autêntica célula glândular, não pondo, todavia, em dú-

vida, que a maior parte do corpo amarelo provém das células foliculósas (epiteliais). A maioria deles, entretanto, e entre os quais CELESTINO DA COSTA, afirma que o órgão responsável pela produção da progesterona é formado exclusivamente à custa da multiplicação das células foliculósas remanescentes. Os elementos mesenquimatósos da téca interna entrariam sómente como constituintes do esqueleto da glandula. O mesmo poderíamos dizer do folículo atrésico, tido também por muitos como órgão elaborador de foliculina.

Restará discutir o problema da célula intersticial do ovario. Todos estão de acordo que a “glandula intersticial” da gonada femea é irregularmente encontrada nos diversos mamíferos. A abundancia em alguns e a escassez noutros já foram fartamente demonstradas.

Nas espécies ricas desses elementos, como p. ex. o coelho, onde as células intersticiais são tão numerosas, motivo pelo qual BOUIN considerou o ovario como glandula de secreção interna, não ha uniformidade no modo com que os AA. encararam sua origem. Muito mais difficil está o estudo da gênese das células intersticiais dos animais onde se acham representadas de uma maneira mais modésta. A concepção mais confortavel é admitir que parte desses elementos provenha de modificações das células do estrôma conjuntivo, outra parte sendo de origem epitelial. Entretanto, no ovario da porca não se encontram células epitelioides fóra do folículo ou do corpo amarelo. Neste caso pelo menos, não existe dúvidas nem campo para discussões.



Na especie humana a questão também é discutida de maneira bastante confusa, não só pelo fato desses elementos serem encontrados em quantidade escassa, mas, também, pela dificuldade de localisa-los, considerando que muitas vezes não são identificaveis no ovario, mas nas suas cercanías. A confusão aumenta ainda devido a certos histologistas que denominam as células mesenquimatósas da téca, de *células intersticiais*, quando não chegam ao ponto de confundir os macrófagos errantes com a célula intersticial. Finalmente, ha até quem negue sua existencia.

A célula intersticial do ovário existe realmente na mulher, contudo sómente é encontrada em pequena quantidade na região do hilo e do mesovario. Nunca tivemos oportunidade de observar cordões ou células isoladas do tipo intersticial entre os folículos, na região cortical.

As células intersticiais na mulher apresentam um carater nitidamente epitelial. São células poliédricas de contorno nítido, de volume mais ou menos avantajado, com nucleo relativamente grande e vesiculoso. Contem granulações que “tomam” os corantes gerais das gorduras (Sudan III, Scharlach R, Azul de Nilo), reduzem o tetraoxido de osmio e fazem voltar a côr do reativo de Schiff na reação de Feulgen-Verne. No que respeita à histoquímica, essas células comportam-se em tudo e por tudo como as células intersticiais do testículo. Não é apenas na esfera da histoquímica que se encontram analogías entre as células intersticiais do ovario (células do hilo e do ovario) e as células

intersticiais do testículo. Sua origem é, provavelmente, idêntica à das células de Leydig. Segundo a opinião geralmente adotada, as células intersticiais do ovario são elementos remanescentes do primeiro surto do epitélio celomático. E' comum encontrarem-se fileiras de células na região do hilo, onde são conhecidas com o nome de “cordões medulares” (réstos da primeira “poussée”). Esses cordões devem também ser considerados como constituídos por autênticas células intersticiais do ovario.

Como se vê, os órgãos responsáveis pela secreção dos hormônios são todos integrados por células de origem epitelial.

Porque, então, deverá a célula intersticial de Leydig, responsável pela secreção do hormônio masculino, ser “simples modificação” do histiocito, enquanto que a célula foliculosa, geralmente tida como substrato anatômico da secreção ovariana, é considerada de origem epitelial? Ambas secretam substâncias que pertencem à mesma família química (esteróis), ambas possuem as mesmas reações histoquímicas (reações “gerais” das gorduras e reação plasmática de F.-V., como foi demonstrado por BECHER (1937) e confirmado por nós no presente trabalho. O estudo dos hormônios secretados pelas células endócrinas do testículo, como as do ovario, também conduzem ao estabelecimento de estreitas relações entre esses dois tipos de células.

A foliculina (hormônio feminino) é também encontrada na urina dos indivíduos do sexo masculino, o

mesmo, acontecendo com a testosterona (hormônio masculino), a qual pôde ser identificada na urina dos indivíduos dos dois sexos. A capacidade do “garranhão” de secretar foliculina em altas doses é devida exclusivamente à riqueza desses indivíduos em células intersticiais do testículo, pois os animais castrados não possuem esta propriedade. Por sua vez, a homologia dos produtos secretados pela célula intersticial do testículo e pela célula epitelial da “cortex suprarenal” é notável. Ambas secretam hormônios, cujas fórmulas químicas têm diferenças quasi imperceptíveis (testosterona de BUTENANDT e corticosterona de REICHSTEIN). Ambas as células se parecem muito quanto à morfologia. Suas reações histoquímicas são idênticas: colorações gerais da gordura, siderofilia, reação de F.V. (VERNE, LISON, BECHER, BARROZO). Entretanto (mirabile dictu!), a homologia de sua origem embriológica não seria aceita pelos autores que defendem a origem mesenquimatosa da célula intersticial do testículo. Não seria mais razoável conceder a mesma origem para todas as células que apresentassem caracteres morfológicos, histoquímicos e funcionais semelhantes, como é o caso para a célula intersticial do ovario, para a célula da cortex suprarenal, para a célula foliculosa, para a de Leydig e para a de Sertoli? Uma origem comum para todas estas células (pequenas células germinativas do epitélio celomático ou células vegetativas de BENDA) parece razoável.

Também não nos parece possível admitir, como querem alguns autores, que primitivamente a célula in-

tersticial do testículo seja de origem epitelial e que mais tarde, no adulto, seja então de natureza conjuntiva. O fato destas células desaparecerem, ou melhor, quasi desaparecerem durante um certo período da ontogênese não implica que sua néoformação no adulto se dê à custa do estrôma conjuntivo. O mesmo fenômeno é observado na cortéx suprarenal: desaparecimento das células da zona X (fasciculada jovem) durante os dois primeiros anos de vida (HOWARD, HOERR, GROLLMANN, WHITEHEAD. Tal fenômeno não obriga o histologista a admitir que a regeneração dessa região se faça à custa dos elementos conjuntivos locais.

O maior argumento dos que pretendem uma origem mesenquimatosa para as células de Leydig é a capacidade que possuem esses elementos de “tomar” o corante vital.

Muitos foram os que ventilaram o assunto. Injetando suspensões coloidais de carga elétrica negativa que são floculadas pelos elementos do sistema reticulo-endotelial (azul de tripan, azul de pirrol e litio-carmin), GOLDMANN (1909), KYRLE (1910), TESTA (1929), TRAMONTANO-GUERRITORE (1930) e DREYFUS & PIRES FERRAZ, afirmam ter encontrado, nos testículos injetados, células intersticiais ora repletas, ora vasias, ora ainda com pequena quantidade de corante; enfim, uma “gama” de côres!

Entretanto, um numero muito maior de autores, que estudaram esta questão sob o mesmo prisma, constatou a presença, ao lado de histiocitos e fibrocitos repletos de suspensões coloidais floculadas, de células de

aspecto epitelial glandular que não fixam os corantes vitais (ADDISON & THORINGTON (1916) ISHIBASHI (1920) BATTAGLIA (1925), CUTORE (1928), ESAKI (1928), CAPPEL (1929), GUERREIRO (1930), BRATIANO (1930), STEIN (1931) HERLAHT (1933) BENOIT (1935).

ESAKI não somente encontrou células de aspecto epitelioide ao lado de autênticos representantes do sistema retículo-endotelial nos testículos examinados, como também cultivou as células intersticiais “in vitro”, chegando à conclusão que se trata, indiscutivelmente, de dois tipos diferentes na forma e na função.

Os depoimentos de GUERREIRO e BRATIANO têm uma importancia muito grande, levando-se em conta que o primeiro é o criador do termo *coloidopéxia* e o segundo é uma das maiores autoridades na questão “sistema retículo-endotelial”. Ambos afirmam serem os elementos que tomam os corantes vitais, encontrados entre os tubos seminíferos, autênticos histiocitos, pois floculam a carga coloidal. Com as outras células, também encontradas neste ponto, tal não acontece: são as verdadeiras células de Leydig.

A opinião de DREYFUS & PIRES FERRAZ realmente é interessante. Estes AA. verificaram em testículos corados vitalmente, ao lado de autênticos histiocitos (histiocitos típicos), células de aspecto epitelial que não tomaram o corante; além desses dois tipos celulares, um terceiro, que, apesar de tomar pouco o corante vital, apresentava um aspecto morfológico idêntico ao das células de Leydig. Imaginam estes AA.

que a “célula intersticial do testículo” seja um elemento conjuntivo (cromóforo) na última etapa da sua evolução, tal como outros elementos pirrolóforos encontrados nos tecidos e de origem mesenquimatosa (Mastzellen e Plasmazellen). Não sabemos porque motivo esses AA. não querem admitir, com a maioria, que existem células epiteliais glandulares ao lado de elementos do sistema retículo-histiocitário. O fato de observarem células que tomam de *maneira modesta* o corante vital não permite uma afirmação tão peremptória: a da transformação gradativa do histiocito em célula de Leydig, isto é, uma célula pirrolófila em célula pirrolófora. Esses elementos que não floclum tão intensamente o corante vital tanto podem ser fibrocitos, como histiocitos que tomaram uma carga menor.

É sabido que nu’a mesma região nem todos os histiocitos tomam de maneira idêntica os corantes vitais (BRATIANO).

Além dos argumentos que acabámos de apresentar contra a opinião dos dois ilustres histologistas patrios, poderíamos adiantar que a presença de histiocitos na gonada masculina não é constante em todas as etapas da ontogênese dos mamíferos. Estes representantes do “sistema criado por ASCHOFF e LANDAU”, em certos indivíduos só aparecem num período muito adiantado da evolução da gonada. Nos testículos jovens de gato, gambá ou cachorro, por exemplo, não se consegue identificar histiocitos entre os tubos seminíferos, nos tres primeiros meses da vida extrauterina.

Como veremos mais adiante, os elementos do sistema retículo-endotelial invadem provavelmente os espaços intertubulares num período em que as autênticas células intersticiais já são encontradas em grande número.

Foram os argumentos que acabámos de criticar, que nos levaram a imaginar um critério diferente do adotado até então para distinguir e determinar a origem dos diversos elementos encontrados entre os tubos seminíferos.

A solução do problema só poderia ser dada, se existisse uma reação histoquímica capaz de distinguir as células epiteliais (epitélio do celoma) das mesenquimatósas.

Uma tal reação, sendo as células intersticiais de origem epitelial, permitirá acompanhá-las desde o seu nascimento na eminencia germinativa. Sejam, ao contrário, as células de Leydig de origem mesenquimatósa; então, será nelas, em todas as suas etapas evolutivas, negativa a reação em questão.

No caso de serem as células diastematicas de origem epitelial e identificáveis por uma reação histoquímica, mais convincente será ainda a demonstração da natureza epitelial, se essa reação também fôr positiva nas células homólogas de outros órgãos (células de Sertoli, células foliculósas, células de cortex suprarenal e células intersticiais do ovario).

Uma reação histoquímica com todos esses preditados, foi procurada e foi achada. É a que demons-

tra a presença do plasmal nos elementos acima enumerados, ou seja, a reação de Feulgen-Verne.

Até o momento atual, não nos foi possível fazer a reação de F.-V. conjuntamente com a coloração vital, em embriões de galinha ou de mamíferos. As doses empregadas teem sido letais, (impedem o desenvolvimento, quando injetadas na alantóide ou diretamente no útero, respectivamente). Por essa razão, nos embriões só fizemos a reação de F.-V.

Em animais jovens e adultos utilisámos as técnicas já descritas para a reação do ácido fucsínico sulfuroso em combinação com a coloração vital pelo litio-carmim.

Os resultados por nós obtidos foram os seguintes:

Embriões de galinha de quatro dias. = Os córtes por congelação e corádos pelo F.-V. mostram na região da eminencia germinativa (epitélio celomático em frente ao corpo de Wolff) a coloração intensa, característica do plasmal, vermelho-violête. Com maior aumento, observa-se que as grandes células germinativas (gonócitos primordiais) ficam mais claras. Não sabemos si pelo fáto de possuírem núcleo maior ou devido a uma reação menos positiva (intensa) do citoplasma. Como no testículo púbere, o epitélio seminal é fracamente F.-V. positivo. Parece-nos mais provavel que os gonócitos primordiais, aos quais cabe engendrar, mercê de mitoses repetidas, a linhagem seminal, tambem sejam, de fáto, fracamente F.-V. positivos.



O mesênquima “inter-túbulos”, bem como o que fórma a eminencia germinativa, não reage à F.-V. Fica corádo em azul pálido (Figs. 1 e 2 e fig. B da prancha).

Os córtes, apesar de gróssos (30 micra) mostram o contraste das duas côres (vermelho-violête e azul pálido) visível mesmo nas microfotografias. Nos embriões com mais de dois dias (Fig. 2) essa verificação se torna ainda mais fácil. Pode-se também observar a positividade à F.-V. do epitélio celomático que reveste o méso.

Os embriões de rato de 8, 12 e 14 dias apresentam um aspecto muito parecido com os embriões de galinha de 6, 8 e 9 dias: eminencia germinativa, epitélio celomático e tubos do mesonéfros fortemente corádos em vermelho-violête. O mesênquima não corádo faz sobressair os pontos acima enumerados.

Nos córtes de embriões de galinha de oito e nove dias, respectivamente (Figs. 3 e 4), as gonadas já diferenciadas, mas ainda presas ao epitélio celomático mostram, quando tratadas pela reação F.-V., um aspecto muito especial: a região periférica intensamente coráda, bem como os pólos superiores e inferiores contrastando com a região central, onde se observa uma menor coloração vermelho-violête. Devemos atribuir esse fenômeno ao fato de, em tal época, estarem as pequenas células germinativas, que são fortemente F.-V. positivas, acumuladas nas zonas onde a coloração intensa se observa. Convém salientar, também, a reação particularmente intensa dos tubos do mesonéfros, que em alguns embriões tomam uma coloração tão viva,

a ponto de darem na microfotografia impressão de uma “chapa velada”.

Nos embriões mais velhos (galinhas de 11, 12 e 14 dias), vamos observar as gonadas, agora, já diferenciadas para o sexo masculino. Apresentam aspecto idêntico aos “testículos” dos embriões de rato de 18 e 20 dias (Fig. 5 e Fig. A da prancha): cordões epiteliais separados por tecido conjuntivo, massas de células coradas intensamente, localizadas de preferencia na superfície (cortex) e nos pólos, em violento contraste de côr com os elementos do interior dos cordões e do conjuntivo do estrôma. A gonada é envolvida por um tecido (albugínea), onde não se verifica célula alguma reagindo positivamente ao F.-V.

Convém salientar que nos testículos de ratos jovens de 15 dias a mês e meio, assim como nos testículos de gambá de 5, 7 e 9 centímetros (ainda no marsúpio) ha uma grande diminuição do número das células capazes de tomar a côr vermelho-violête. São as “futuras” células intersticiais de Leydig. Os testículos desta idade (inclusão em parafina, coloração hematoxilina-eosina), mostram uma pobreza muito grande em células de aspecto epitelióide, isto é, em células intersticiais, células que nesta idade já começaram a invadir os espaços entre os cordões epiteliais. A fig. n.º 6 mostra o seguinte aspecto: túbos, cuja luz está completamente obstruída por elementos F.-V. negativos, envolvidos por uma capsula fibrósa e entre os quais quasi não se encontram células epitelióides (F.-V. positivas).

Nos testículos onde ha pobrêza de células intersticiais, como no caso que acabámos de descrever, pôde-se notar melhor a reação positiva das células nutritivas de Sertoli, fáto esse que explica o aspecto da fig. 6 (límites do túbo fortemente corádos em vermelho-violete).

E' digno de nota que pelo menos nos testículos de rato, gambá e gato, nos primeiros mêses de idade, o período de desaparecimento das células intersticiais é muito curto. Aos três mêses já se encontram novamente células intersticiais em relativa abundancia. Não tivemos oportunidade de verificar a nova involução desses elementos, já descrítos, em idades mais avançadas, isto é, nas proximidades da puberdade, por não termos tido material adequado. Devemos acentuar que a gambá adulta possúe uma quantidade especialmente grande de células intersticiais. As verificações por nós feitas (figs. 6 e 11) devem ser avaliadas em confronto com a fig. 13.

Fáto mais importante é a ausencia de elementos histiocitários entre os túbos seminíferos durante os primeiros mêses de vida.

A fig. n.º 7 mostra um córte de testículo de gato de 30 dias, animal "injetádo" durante 6 dias com 1/2 cc. de litio-carmim em solução a 2%. Verifica-se que as células estão localizadas na região cortical do testículo, logo abaixo da albugínea (nesta figúra o córte grosso e o aumento pequeno não permitem identificar sua fórmula). Os histiocítos ficam todos espalhados

nesta capsula fibrósa. Não se encontram células pirrolófilas entre os túbos seminíferos.

A fig. 8 (grande aumento de uma região da fig. 7), mostra muito bem o local onde estão situados os histiocitos (séta superior), assim como massas epitelióides F.-V. positivas (séta inferior) entre a albugínea e os túbos seminíferos.

Existe forçosamente uma fásē, no momento ainda não determinada por nós, em que os histiocitos invadem os espaços intertubulares, verificação que esperamos fazer mais tarde.

Continuando a análise de testículos de animais cada vês mais velhos, chegamos à fig. 11 que nos mostra um testículo de gambá jovem com pequena quantidade de células de Leydig corádas pelo F.-V. ao lado de histiocitos.

Os fátos acima referidos nos levam à concepção de que todas as células mesenquimatósas da gonada indiferente sejam aproveitadas na “fabricação” da parede dos túbos seminíferos.

Os elementos, que tomam o corante vital, encontrados nos testículos jovens e adultos ao lado de células de aspecto epitelióide são células migradoras. Elas aparecem no testículo numa época que varia de espécie para espécie. No gato observamos que sómente após quatro mēses de vida extra-uterína, encontramos células capazes de tomar o corante vital entre os túbos seminíferos. Na gambá observamos que mais ou menos aos seis mēses de idade, ocorre esse fenômeno; no rato, o aparecimento, como também foi por nós verificado,

é mais precóce: um e meio a dois meses. Tivemos oportunidade de examinar um único testículo de cão jovem com mais ou menos quatro meses. Este já possuía ao lado de autênticas intersticiais de Leydig, células tomando intensamente o lítio-carmim.

No que diz respeito ao número de células intersticiais podemos confirmar o que já é sabido: é muito variável de espécie para espécie. Na gambá (fig. 13) (*Didelphys aurita*), por exemplo, encontram-se esses elementos em quantidade tal, que sua massa é comparável, senão maior que a dos túbos seminíferos. No cão as células de Leydig se disseminam no conjuntivo da rête-téstis tornando-a particularmente rica em tais elementos. Entretanto, entre os túbos seminíferos não são tão numerosas como na gambá. Esta observação explicaria a dificuldade em, pela castração, se obter o desaparecimento dos caractéres sexuais do cachorro. Tal animal teria células intersticiais extratesticulares (na rête-testis), e, talvez, em outras partes mais afastadas dos dutos seminíferos em quantidade suficiente para assegurar a persistencia desses caractéres.

Emquanto que 100 % das células de aspecto epitelioide encontradas entre os túbos da rête tomam particularmente a côr vermelho-violête pela reação de F.-V. (fig. 12), observa-se que nos espaços intertubulares ha células F.-V. positivas e outras negativas. Estas ultimas são histiocítos, os quais são pirrolófilos e F.-V. negativos, ao contrario das primeiras que são pirrolófobas (pois são autênticos elementos epiteliais) e F.-V. positivas (fig. C da prancha).

Quanto aos testículos adultos, o exame minucioso de centenas de córtex seriados nos mostrou um aspecto sempre uniforme no que diz respeito à capacidade de certas células intersticiais reagirem ao reactivo de Schiff, após hidrólise. Estão sempre coradas em vermelho-violête (figs. 9 e 10). As observações de BECHER e VERNE foram por nós absolutamente confirmadas. Acreditamos que os AA. citados não se tendo preocupado com o mesmo problema que nos interessa, não se detiveram em analisar minuciosamente seus preparados, afim de verificar se *todas* ou apenas *muitas* células intersticiais eram F.-V. positivas. Em nossas preparações (testículos de rato, gambá e gato de animais injectados com soluções diversas de litio-carmin (veja pag. 28), especialmente nas coradas vitalmente pelo litio-carmin e em seguida pelo F.-V. vê-se bem esta dualidade: células com citoplasma vermelho (células intersticiais mesênquimatósas) e células com citoplasma vermelho-violête (células intersticiais epiteliaes, células que tudo indica deverem ser o substrato anatómico da secreção dos hormônios masculinos). Chegase mesmo em alguns preparados a encontrar mais células pirrolófilas do que pirrolófobas.

O contraste entre a cor vermelha amarelada do litio-carmin e o arroxeadado da reacção de F.-V., permite, melhor que qualquer outro processo de coloração, e, com grande facilidade, essa observação (Fig. C da prancha). Realmente, histiocitos podem apresentar um aspecto morfológico idêntico ao das células de Leydig, alguns mesmo com pequena quantidade de co-

rante vital incorporada ao citoplasma (nem todos tomam o corante da mesma maneira). Todavia, a coloração pelo litio-carmim é sempre o suficiente para a diferenciação entre o elemento epitelial e o conjuntivo.

Em resumo: Aquilo a que os AA. chamaram de células intersticiais do testículo corresponderia a elementos tendo dupla origem: a) células provenientes das pequenas células germinativas da “eminencia genital”, (epitélio do celoma) células que irão constituir os elementos verdadeiramente dignos do nome de células glandulares de secreção interna do testículo (\*) (células intersticiais *sensu strictu* ou células de Leydig); b) células provenientes do mesênquima, tardiamente encontradas nos interstícios do testículo (células intersticiais mesenquimatósas). Células intersticiais do testículo *sensu latu*, abrangem, portanto, as duas categorias acima enumeradas e correspondem ao conceito habitual de “célula intersticial do testículo”. Resta responder à pergunta: Se às células intersticiais epiteliais cabe secretar os hormônios masculinos responsáveis pelos caracteres sexuais secundários, que função caberia aos histiocitos dos interstícios do testículo que chegam por vezes a ser morfológicamente indistinguíveis das células intersticiais epiteliais? Nenhuma resposta precisa possuímos no momento para tal pergunta. Acreditamos, porém, que uma tão notável coexistência de elementos de

---

(\*) Em todo nosso trabalho sempre que nos referimos à secreção interna do testículo, subentendemos hormônios ligados aos caracteres sexuais secundários. Aqui não nos preocupamos com a provável secreção interna do epitélio germinativo.

aspecto glandular com origem embrionaria diferente, reações histoquímicas diferentes, morfologia por vêses idêntica e funções certamente diversas pode ser o ponto de partida para um estudo que esperamos emprender e que talvez se possa estender através de todo o sistema endocrínico, a saber: o problema das relações funcionais entre glandulas de secreção interna e sistema reticulo-endotelial.

Não terminaremos sem agradecer vivamente o prestimoso auxilio de nossa coléga de Laboratório D. Rosina de Barros, bem como a Gualberto Evangelista Nogueira que não mediram esforços na elaboração do presente trabalho. À Marta Breuer, artista que mais uma vês nos ajuda com sua habilidade técnica, meus agradecimentos.

As pesquizas bibliográficas, na sua maioria, foram realizadas na Bibliotéca Bovero do Laboratório de Anatomia da F. de Medicina da Universidade de S. Paulo, onde sempre tivemos ótimo acolhimento.



## CONCLUSÕES

### I

As células da eminencia germinativa dos embriões dos vertebrados (rato, gato, gambá, galinha), bem como as células de todo o epitélio celomático possuem um citoplasma, onde se póde identificar a presença do plasmal, revelavel pela reação de Feulgen-Verne (R. F.-V.).

### II

Os gonocítos primordiais se apresentam pela reação de F.-V. menos intensamente corados do que as pequenas células germinativas.

### III

A coloração vermelho-violête da reação de F.-V., evidente no epitélio celomático, eminencia germinativa inclusive, bem como nos tubos do mesonéfros, contrasta com o aspecto sem coloração específica do mesênquima circumvisinho.

### IV

Nos embriões mais desenvolvidos, nos quais a gônada começa a se individualisar, póde-se verificar a presença das pequenas células germinativas localizadas

na sua periferia tomando intensamente a cor vermelho-violetê.

## V

Mais tarde, células que recolorem o reativo de Schiff são encontradas entre os cordões epiteliaes das gonadas indiferentes. São as pequenas células germinativas, que continuaram sua migração.

## VI

Nos testículos de animais recém-nascidos das espécies por nós examinadas (cão, gato, gambá e rato), não são encontrados elementos histiocitários entre os túbos seminíferos durante os primeiros meses de vida extra-uterina.

## VII

Provavelmente, o mesênquima existente entre os túbos de Wolff utilizados na formação da gonada masculina, bem como o que se acha em relação com o epitêlio germinativo fornecerá exclusivamente material para a construção da parede dos túbos e envoltórios.

## VIII

Da conclusão anterior resulta que os histiocitos encontrados ao lado de células que não tomam o corante vital nos testículos jovens e adultos só podem ser elementos imigrados.

## IX

O momento exato em que se dá a penetração dos histiocitos que vão assumir o aspecto de “células intersticiais” e permanecer entre os túbos seminíferos confundindo-se mais ou menos com as autênticas células intersticiais epiteliais, não pôde por nós ser determinado. E' variavel segundo o animal considerado.

## X

Nos testículos jovens a reação de F.-V. é positiva em certas células intersticiais (seriam as verdadeiras células secretoras do hormonio masculino) bem como no sincício sertoliano, isto é, nos dois elementos de reação homóloga à das “pequenas células germinativas” da eminencia genital.

## XI

Ha uma época de “pobreza” em células intersticiais nas gonadas jovens (animais recém-nascidos), onde se pôde verificar com maior nitidês a coloração violêta nas células nutritivas de Sértoli.

## XII

As células intersticiais do testículo encarregadas da secreção dos hormonios masculinos (células de Leydig — sensu strictu), têm origem no epitélio celomático (eminencia germinativa) e podem ser seguidas, graças à reação de F.-V. positiva nelas, nas diversas etapas

de sua evolução, desde o epitélio do celoma até o testículo adulto.

### XIII

Podemos afirmar que a célula intersticial de Leydig é de origem epitélia, pois além de sua morfologia, da significação fisiológica de sua secreção e de suas reações histoquímicas, fatos esses já observados, tem origem embriológica e comportamento perante o reactivo de Schiff que justificam essa natureza epitélia a partir do epitélio do celoma.

### XIV

As células intersticiais do testículo (células intersticiais, *sensu lato*) descritas pelo autor, dividem-se em dois tipos: a) células de origem epitélia (células intersticiais, *sensu strictu*), encarregadas da secreção interna do testículo; b) células de origem mesênquimatosa, pirrolófilas, de função desconhecida.

### XV

A presença de numerosos histiocitos entre as células intersticiais epitéliais no testículo, comparada ao fenómeno semelhante observado em outras glandulas de secreção interna (p. ex. ovario), permite levantar a hipótese de uma interação fisiológica de natureza secretora entre esses dois tipos de células, hipótese que só trabalhos futuros poderão confirmar ou infirmar.

## ABSTRACT

The present research intends to contribute to the enlightenment of origin and nature of the interstitial cells of the testicle. It consist of 3 parts:

The first contains a historical review of the opinions uttered to the problem treated here, and analyzes especially the two between which nearly all authors working on the subject are divided. The interstitial cells are considers as epithelial (epithelium of the coeloma) by some authors and as mesenchymal by others.

In the second part material and methods are described. We worked with embryos of chicken, rat and opossum and with testicles of rat, opossum, dog and cat. We needed a technique to stain the epithelial cells electively and another one that allows to identify the mesenchymal elements electively. For the first purpose we applied the process to show plasmal, the well-known method of Feulgen-Verne; for the second vital injection of lithium-carmin. On the coloured plate of figs. A and B., both from Feulgen-Verne slides, fig. A shows a testicle of a 20 days old rat (the microphoto is fig. 9); fig. B is the coelomatic epithelium of a chicken embryo, to point out the Feulgen-Verne positiveness of the small germ cells. Fig. C, from the

interstitium of an adult opossum testicle, serves to demonstrate the co-existence of cells of equal aspects of interstitial testicular cells, of which some are Feulgen-Verne positive (reddish violet), while others have stores lithium carmine (red).

In the third part we discuss the arguments of the earlier authors concerning origin and nature of the interstitial cell and confront them with our own results. Finally we come to the following conclusions:

I — The cells of the genital ridge of vertebrate embryos (rat, cat, opossum, chicken) like those of every coelomatic epithelium have a cytoplasm that allows to identify the presence of plasmal by means of the Feulgen-Verne reaction (R. F. V.).

II — In the chicken the primordial gonocytes stain less intensely with R.F.V. than the small germ cells.

III — The reddish violet staining of the R.F.V., shown in the coelomatic epithelium including the genital ridge, and in the mesonephric tubules, contrasts with the aspect without specific staining in the neighbouring mesenchyme.

IV — In more advanced embryos, in which the gonad begins to individualize, one may verify the presence of the small germ cells lying in its periphery and staining intensely reddish violet.

V — Later on the cells staining with Schiff's reactive appear among the epithelial cords of the indifferent gonads. These are the small germ cells that have continued their migration.

VI — In the testicles of new born animals of the species examined (dog, cat, opossum and rat) one does not find histiocyte elements between the seminiferous tubules in the first months of extra-uterine life.

VII — Probably the mesenchyme between the Wolffian ducts that contribute to the formation of the male gonad, as well as that in connections with the germ epithelium, will only produce material for the construction of the wall of the tubules and the capsule.

VIII — From the previous conclusion results, that the histiocytes found among the cells that do not stain with vital die, in the young and adult testicles, only can be immigrated elements.

IX — We cannot determine the exact moment for the penetration of the histiocytes that are going to assume the aspect of "interstitial cells" and to stay between the seminiferous tubules where they mingle with the authentic epithelial interstitial cells. The moment varies corresponding to the animal examined.

X — In young testicles the R.F.V. is positive in certain interstitial cells (that might be the true secretory cells for the male hormone) as well as in the sertolian syncytium, that is, in the two elements of reaction equal to that of the "small germ cells" of the genital ridge.

XI — There is a period of scarcity of interstitial cells in young gonads (of new born animals) when the reddish violet staining of the sertolian nurse cell is seen more clearly.

XII — The interstitial cells of the testicle charge with the secretion of the male hormone (Leydig-cells properly speaking) originate in the coelomatic epithelium (genital ridge) and can be traced, thanks to their positive R.F.V. in the various steps of their development from the epithelium of the coeloma to the adult testicle.

XIII — We can ascertain that the interstitial Leydig-cell is of epithelial origin, because, beside its morphology and the physiological signification of its secretion and its histochemical reactions, that are already well-known facts, its embryological descent and reaction to Schiff's reactive justify this epithelial nature from the time when it leaves the coelomatic epithelium.

XIV — The interstitial cells of the testicle (interstitial cells generally speaking) described by the author, are divided into two types: a) cells of epithelial origin (interstitial cells properly speaking) charged with the inner secretion of the testicle and b) pirrolophile cells of mesenchymal origin and unknown function.

XV — The presence of numerous histiocytes among the epithelial interstitial cells of the testicle, compared with similar phenomena in other endocrine glands (for instance the ovary) allow to exhibit the hypothesis of a physiological interaction of the secretori nature in these two types of cells. This hypothesis may be approved or rejected by future research.



## BIBLIOGRAFIA

- ADDISON (W. H. F.) — THORINGTON (J. M.) 1916 — 17. — The behaviour of the interstitial cells of the testis towards vital dyes (*Anat. Rec.*, t. II, p. 318-319).
- ALLEN (B. M.) 1904. — The embryonic development of the ovary and testis of the Mammalia (*Amer. J. Anat.*, t. 3, p. 86-146).
- ARON (E.) 1929. — Influence de l'ischémie sur l'évolution des éléments du testicule des Mammifères. Transformations des cellules de Sertoli en cellules de type interstitiel (*C.R.S.B.*, t. 120, p. 1062).
- ARON (M.) 1929. — Greffes Testiculaires chez les Batraciens (*Bull. d'Hist. app.*, t. 6, p. 189-204).
- BARDELEBEN (von) 1897. — Die Zwischenzellen des Säugetierhodens (*Anat. Anzeiger ns.* 19, 20, p. 529).
- BARROZO (E.) 1938. — Contribuição ao estudo das Celulas de Berger. *Bol. da Fac. de Fil., Cienc. e Letr. S. Paulo* — *Biol. Geral* n. 2.
- BASCOM (K. F.) 1923. — The interstitial cells of the gonads of cattle with special reference to their development and significance (*Amer. J. Anat.*, t. 31, p. 223-252).
- BATTAGLIA (F.) 1925. — Die Leydig'schen Zellen und Ciaccio's Lipoidinterstitialzellen (*Virchow's Arch.*, t. 257, p. 662-674).
- 1926. — Ricerche istiochimiche in testicoli normali e dopo autolisi (*Haematologica*, v. 7, p. 189).
- BECHER (H.) 1937. — Histochemische Untersuchungen an den inkretorischen Organen mit der Plasmalreaktion (*Verh. Anat. Gesel.*, p. 38).
- BENOIT (J.) 1922. — Sur les cellules interstitielles du testicule du Coq domestique. Évolution et structure (*C. R. S. B.*, t. 87, p. 1382).
- 1923. — Sur l'origine des cellules interstitielles dans le testicule du Coq domestique (*C. R. Ac. Sc.*, t. 177, p. 412).
- 1924. — Action des rayons X sur le testicule du Coq (*C. R. S. B.*, t. 90, p. 802).
- 1927. — Néof ormation de cellules interstitielles, d'origine épithéliale coelomique, dans les glandes sexuelles des Galinacés adultes (*C. R. S. B.*, t. 97, p. 273).
- 1935. — Le Testicule. *Act. Scient. et Industr. Nr. 259 Paris. Hermann et Cie.*
- BEYLOT (E. M.) — BAUDRIMONT (A.) 1932. — Manuel theor. et prat. d'Histologie. Paris — Vigot Frères — 3 ed.

- BINET (L.) — VERNE (J.) — PARROT (J. L.) 1937.** — Histophysiologie des lipides pulmonaires. Cycle digestive des lipides pulmonaires chez le chien (C. R. S. B., v. 125, p. 121).
- BÖHM (A. A.) — DAVIDOFF (M. v.) — HUBER (G. C.) 1920.** — A text-Book of Histology. Philadelphia e London, W. B. Saunders Comp. 2. ed.
- BÔUIN (P.) ANCEL (P.) 1903.** — Recherches sur les cellules interstitielles de testicule des mammifères (Arch. Zool. Exp. Gen. T. I, p. 437).
- BOUIN (P.) 1932.** — Éléments d'histologie. II. vol. — Paris — Felix Alcan.
- BOZZOLO — vid. opus Dreyfus e Pires Ferraz 1933.**
- BRACHET (A.) 1935.** — Traité d'embryologie des vertébrés. — Paris — Masson & Cie. — 2. ed.
- BRANCA (A.) VERNE (J.) 1934.** — Précis d'Histologie. — Paris — Masson & Cie.
- BRATIANO (S.) 1930.** — Les cellules à fonction colloïdopexique du testicule du Cobaye (C. R. S. B., t. 103, p. 710).
- BRUNI (A. C.) 1926.** — Tessuto connettivo e sistema R. E. (Att. Soc. Lomb. Sc. M. e Biol. T. XV Bovero).
- 1921. — Sulla presenza de grasso negli elementi migranti del testuto inter. del testiculo (Gion. Acad. Med. Torino).
- CAPPELL (R.) 1929.** — Intravital and supravital staining (J. of Path. and Bact. vol. 32. II).
- CHIARUGI (G.) 1929.** — Trattato di Embriologia — Società Editrice Libreria — Milano.
- C. DA COSTA (A.) — CHAVES (R.) 1937.** — Manual de Histologia. II. vol. — Lisboa J. Rodrigues & Cia.
- COWDRY (E. V.) 1938.** — A textbook of Histology. — London — Henry Kimpton — 2. ed.
- CUTORE (G.) 1933.** — Cellule interstiziele et cellule xantocrome (Monit. Zool. Ital. Sup. vol. XLIV, p. 15-31).
- DANTCHAKOFF (V.) 193.** — Le devenir du sexe (Act. Scientif. et Industri., Paris — Hermann & Cie.).
- 1928. — Modificazioni citologiche nel testicolo in seguito ad iniezioni di sostanze coloranti intra vitam (Boll. Soc. ital. Biol. sperim. t. 3, p. 588-591).
- DIAMARE (V.) 1934.** — Sessualità "interesse" e la questione di un ormone interstiziali (Giorn. Ass. Napo. Med. Natural n. 4, p. 3).
- DREYFUS (A.) — PIRES FERRAZ 1933.** — Changes in the gonads of the white mouse under the influence of simultaneous injections of pregnant woman's urine and trypan-blue (Rev. Biol. e Hyg. vol. 4, n.º 1, p. 16).
- DUBREUIL (G.) 1929.** — Leçons d'embryologie humaine. — Paris — Vigot Frères.

- EBNER** (von) 1871. — Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen (Untersuchungen aus dem Institut für Physiol. und Histol. in Graz. Leipzig H. II).
- EHRlich** 1876, 1879. — Whitehead.
- ESAKI** (S.) 1928. — Ueber Kulturen des Hodengewebes der Säugetiere und über die Natur des interstitiellen Hodengewebes und der Zwischenzellen (Z. F. mikr. ant. Forsch., t. 15, p. 368-404).
- FALCONE** (C.) 1912. — L'Embrione Umano — Milano — Ulrico Hoepli, Editore.
- FELIX** — vid. opus Dubreuil (G.) 1929.
- FEULGEN** (R.) — **BERSIN** (Th.) 1939. — Zur Kenntnis des Plasmalogens (Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. Physiologische Chemie, Bd. 206, ns. 5 e 6, p. 217).
- FEULGEN** (R.) — **IMHÄUSER** (K.) — **BEHRENS** (M.) 1929. — Zur Kenntnis des Plasmalogens (Hoppe Seyler's Ztschr. f. Phys. Chem. 180, p. 161).
- FIRKET** (J.) 1914. — Recherches sur l'organogenèse des glandes sexuelles chez les Oiseaux I. (Arch. Biol., t. 29, p. 201-349).  
— 1920. — On the origin of germ cells in higher Vertebrates (Anat. Rec., t. 18, p. 309-316).
- FISCHEL** (A.) 1930. — Über die Entwicklung der Keimdrüsen des Menschen (Z. Anat., t. 92, p. 34-72).
- FISCHEL** (A.) 1929. — Lehrb. d. Entwicklung des Menschen. — Wien u. Berlin — J. Springer.
- GANFINI** (C.) 1903. — La cellule interstiziali del testicolo negli animali ibernanti (Boll. Accad. med. Genova, t. 17, p. 279-284).  
— 1902. — Sullo sviluppo delle cellule interstiziali del testicolo (Arch. di Anat. e Embr. V. I, p. 233).
- GÉRARD** (P.) 1935. — Sur la réaction plasmale (Bull. d'Histol. app. n.º 7, p. 274).
- GIANELLI** (L.) 1909. — Ricerche sulla sviluppo delle cellule interstiziale dell'ovario e del testicolo di *Lepus cuniculus* (Atti. Acc. Scienze med. e nat. in Ferrara).
- GROLLMANN** (A.) 1936. — The Adrenals. The William and Wilkins Comp. Baltimore. U.S.A.
- GROOME** (J. R.) 1934. — The modification of the testes of the Mouse with age with special reference to interstitial tissue (P. zool. Soc. London, Part. II, ps. 235-240).
- GUERRIERO** (C.) 1930. — Sur la propriété phagocytaire des éléments du tissu interstitiel du testicule de Cobaye (C.R.S.B., t. 103, p. 1147).
- GUYON** (Mlle.) vid. opus Benoit 1924.
- HARTRIDGE** (H.) — **HAYNES** (F.) 1930. — Histology for medical students. — Oxford University Press.
- HENLE** 1866. — Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Vol. II Braunschweig.
- HERLANT** (M.) 1932. — Recherches d'histophysiologie genitale chez le Hérisson hibernant (Arch. d'Anat. micr., t. 28, p. 335-362).

- 1933. — Recherches histologiques et expérimentales sur les variations cycliques du testicule et des caractères sexuels secondaires chez les reptiles (Arch. Biol., t. 44, p. 347-468).
- HERTWIG (O.) 1900. — Traité d'Embryologie — Paris — Schleicher Frères — 2. ed.
- HILL (Ch.) 1937. — Manual of normal Histology and Organography. — Philadelphia e London — W. B. Saunders Comp. — 7. ed.
- HOERR (N.) 1931. — The cells of the suprarenal cortex in the guinea pig. their reaction to injury and their replacement (Amer. J. of Anat. 48, pg. 139).
- HOFMEISTER (W.) 1872. — Untersuchungen über der Zwischensubstanz im Hoden der Säugetiere (Sitzungsberichte der Kais Akad. der Wissensch. math. naturw. Klasse Vol. 70, III p. 77).
- HOWARD (E.) 1930. — The X zone of the suprarenal cortex in relation to gonadial maturation in monkeys and mice, etc. (Anat. Record. vol. 46, pg. 93).
- HUMPHREY (R. R.) 1921. — The interstitial cells of the Urodele testis (Amer. J. Anat. 29, p. 213-279).
- ISHIBASHI (M.) 1920. — über Zwischenzellen (Tokyo Univ. Journ., t. 22).
- JACOBSON — vid. opus Bouin, AnceI 1903.
- JORDAN (H. E.) — KINDRED (J. E.) 1937. — A textbook of Embryology — New York e London — D. Appleton — Century Comp. — 3. ed.
- KEIBEL (F.) — MALL (F. P.) 1911. — Entwicklungsgeschichte des Menschen. — S. Hirzel — Leipzig.
- KEITH (A.) 1923. — Human Embryology and Morphology. — London — E. Arnold — 4. ed.
- KITAHARA (Y.) 1923. — über die Entstehung der Zwischenzellen der Keimdrüsen des Menschen und der Säugetiere und deren Bedeutung (Arch. f. Entwicklungsmech., t. 52, p. 550-604).
- KOHN (A.) 1914. — Synkainogenese (Arch. f. Entwicklungsmech., t. 39, p. 112-130).
- 1920. — Der Bauplan der Keimdrüsen (Arch. f. Entwicklungsmech., t. 47, p. 95-118).
- KÖLLIKER 1889. — Mikroskopische Anatomie der Gewebelehre des Menschen. Leipzig — Bd. II H. 2.
- KRAFKA (J.) 1936. — A Textbook of Histology. — London — Baillière Tindall & Cox.
- LANGLEY (J. N.) 1920. — Practical Histology. — Cambridge — W. Hefter & Sons — 3. ed.
- LENHOSSÈK 1897. — Beiträge zur Kenntnis der Zwischenzellen des Hodens (Arch. f. Anat. und Physiol. Abt. Anat.).
- LETZERICH 1868. — Ueber die Bedingungsweise der Nerven im Hoden der Säugetiere und des Menschen. (Arch. f. pathol. Anatomie).
- LEYDIG (F.) 1857. — Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere. — Frankfurt a. M.

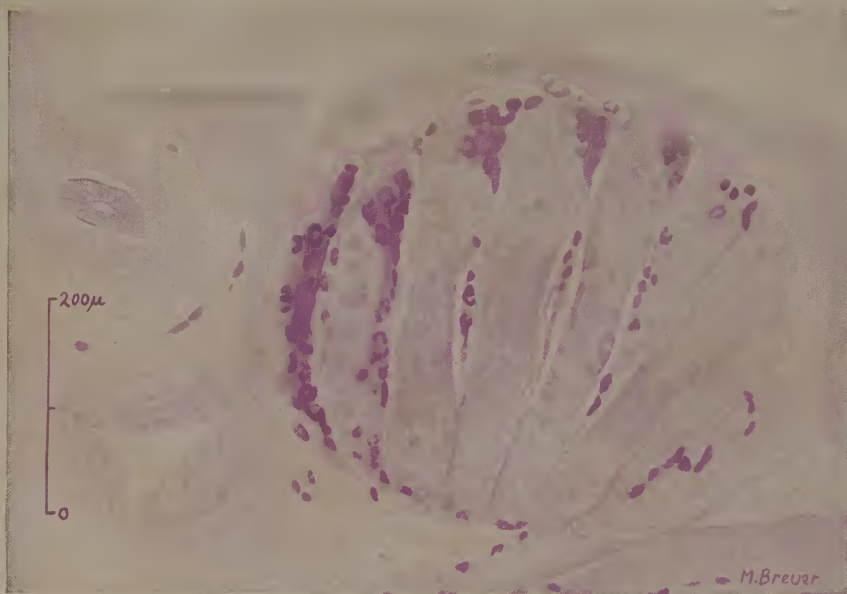
- LIPSCHÜTZ (A.) 1925. — Nouveaux faits relatifs à la fonction endocrine des fragments testiculaires (Bull. d'Hist. appl., t. 2, p. 1-13).  
— 1932. — Der Ursprungsort des Hodenhormons (Mediz. Welt, n.º 35, 10 pp.).
- LISON (L.) 1936. — *Histochimie Animale*. — Paris — Gauthiers Villars Edit.  
— 1932. — Sur la spécificité du réactif de Schiff (Fuch sine décolorée par SO<sub>2</sub>) envers les Aldéhydes (Bull. d'Histol. app. n. 6, p. 177).  
— 1933. — Études sur l'histochimie des corps gras. II. Table dichotomique d'analyse histochimique des lipides (Bull. d'Histol. app. n.º 9, p. 292).
- MAXIMOW (A.) BLOOM (W.) 1938. — *A Textbook of Histology*. — Philadelphia e London — W. B. Saunders Comp. — 3. ed.
- MIHALKOVICS (von) 1873. — Beiträge zur Anatomie und Histologie des Hodens (Berichte der math. phys. Classe der Königl. sächs. Gesellsch. der Wissenschaften), vid. opus Bouin e Ance! 1903.  
— 1885. — Untersuchungen über die Entwicklung des Harn — und Geschlechtsapparates der Amnioten (Internat. Monatsschr. d. Anat. u. Histol., t. 2, p. 41-106 et 284-485).
- MINOT (C. S.) 1894. — Gegen das Gonotom (Anat. Anz., t. 9, p. 210-213).
- NAGEL (W.) 1889. — über das Vorkommen von Primordialeiern ausserhalb der Keimdrüsenanlage beim Menschen (Anat. Anz., t. 4, p. 496-498).
- NONIDEZ 1922. — The origin of the so called luteal cells in the testis of hen-feathered cocks (Am. J. Anat. t. 31, p. 109-124).
- NÜSSBAUM 1880. — Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich (von der Bedeutung der Hodenzwischensubstanz p. 85) (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. XVIII).
- PELLEGRINI (G.) 1925. — Sur les cellules interstitielles du testicule (C.R. Ass. Anat., p. 314).  
— 1926. — Sulle modificazioni degli elementi interstiziali del testicolo negli animale ad attività sessuale periodica (Arch. ital. di Anat. e di Embriol., t. 22, p. 550-585).  
— 1926. — Sur l'augmentation des éléments interstiziels dans les lésions expérimentales du testicule (C. R. Ass. Anat., t. 21, p. 464).
- PLATO (J.) 1897. — Zur Kenntnis der Anatomie und Physiologie der Geschlechtsorgane (Arch. f. Mik. Anat. Bd. XLVII).
- POLICARD (A.) 1934. — *Précis d'Histologie Physiologique*. — Paris — G. Doin & Cie. — 3. ed.
- POPOFF (N.) 1909. — L'ovule mâle et le tissu interstitiel du testicule chez les animaux et chez l'homme (Arch. Biol., t. 24, p. 435).
- PRENANT (A.) 1896. — *Elements d'Embriologie*. — Paris — G. Steinhell — 2. ed.
- REGAUD (C.) vid. opus Renault (J.) 1893.
- REINKE (C.) 1896. — über Kristalloidbildungen in den interstitiellen Zellen des menschlichen Hodens (Arch. f. mikr. Anat. Bd. XLVII).

- RENAULT (J.) 1893. — *Traité d'Histologie Pratique*. — Paris — Rueff & Cie.
- RISLEY (P. L.) 1934. — The activity of the coelomic germinal epithelium of the male musk turtle — *Sternotherys odoratus* (J. of Morphol., t. 56, p. 59).
- ROMEIS (B.) 1926 — Hoden, Samenableitende Organe und accessorische Geschlechtsdrüsen. in *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie* (Bethe, Bergmann, Embden, Ellinger) (Fortpflanzung, Entwicklung und Wachstum — erster Teil.) Berlin — Julius Springer.
- RUBASCHKIN (W.) 1912. — Zur Lehre von der Keimbahn bei Säugetieren. Über die Entwicklung der Keimdrüsen (Anat. Hefte, t. 46, p. 345-411).
- SAINTMONT (G.) 1905. — Recherches relatives à l'organogenèse du testicule et de l'ovaire chez le Chat (Arch. Biol., t. 22, p. 71-162).
- SPANGARO (S.) 1902. — Über die histologischen veränderungen des Hodens, Nebenhodens und Samenleiters von Geburt an bis zum Greisenalter (Anat. Hefte, t. 18, p. 593-771).
- SENAT (L.) — These de doutoramento (apud Bouin e Ance).  
SHARPEY — SCHAFFER (sir E.) 1934. — *Essentials of Histology*. — Edited by H. M. Carleton — London — Longmans, Green and Co. — 13. ed.
- SHUMWAY (W.) 1938. — *Introduction to vertebrati Embryology*. — New York — John Wiley & Sons — 3. ed.
- STEIN (A.) 1931. — Experimentelle Untersuchungen über die Zellformen des interstitiellen Hodengewebes (Z. f. Zellf., t. 12, p. 483-517).
- STIEVE (H.) 1921. — *Entwicklung, Bau und Bedeutung der Keimdrüsenzweischenzellen* München u. Wiesbaden — Verlag Bergmann, 249 pp.  
— 1927. — Die Entwicklung der Keimzellen und der Zwischenzellen in der Hodenanlage des Menschen. Ein Beitrag zur Keimbahnfrage (Z. f. mikr. anat. Frosch., t. 10, p. 225-285).  
— 1930. — Männliche Geschlechtsorgane (Handb. d. mikr. Anat. d. Menschen von W. v. Möllendorf, t. 7, 2.<sup>a</sup> P., p. 1-399).
- STÖHR (F.) 1921. — *Tratado de Histologia*. Trad. espanhola. Salvat Editors.
- SWIFT (C. H.) 1916. — Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick (Amer. J. of Anat., t. 20, p. 375-409).
- TESTA (M.) 1929. — Sulla genesi e funzione delle cellule interstiziali e luteiniche dell'ovario e di quelle interstiziali del testicolo (Haematologica t. 10, p. 113).
- TOURNEUX (F.) 1921. — *Précis d'Embryologie Humaine* — Paris — G. Doin, Editor. — 3.ed.
- TRAMONTANO-GUERRITORE. 1929. — La col. vitale dell "interstiziale" nel testicolo sotto-posto alla azione dei raggi Roentgen (Monit. Zool. ital. n. 40).

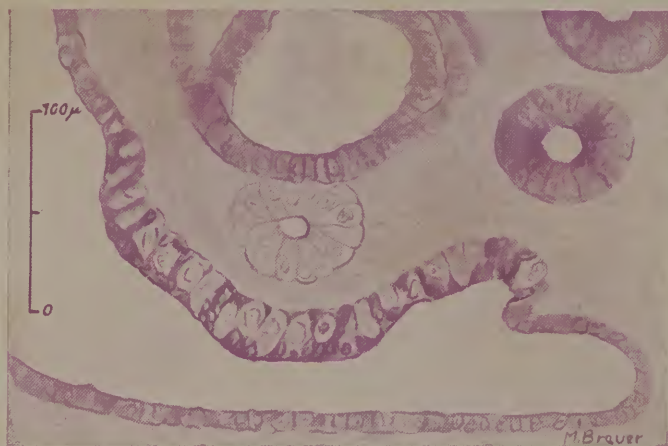
- TRATMANN (A.) — Fiebiger (J.) 1931. — Lehrbuch d. Histologie und vergleich. mikrosk. Anat. der Haussäugetiere. — Berlin — Paul Parey — 6.ed.
- LA VALLETE SAINT GEORGE — vide opus Bouin e Ancel 1903.
- VERNE (J.) 1928. — Démonstrations histochemique de la formation de corps a fonction aldéhydiques aux dipens des enclaves graisseuses et lipidiques (C. R. S. B., v. 99, p. 266).
- VERNE (J.) 1928. — Recherches sur la réaction de Schiff en histochemie (C. R. Assoc. Anat. n. 3, p. 465).
- 1936. — Caroténoides et oxydation des lipides (C. R. Soc. Biol., t. 121, p. 609).
- 1937. — Considérations sur les états histochemiques des lipides (Bull. d'Histol. app. n.º 10, p. 269).
- 1936. — Observations histochemiques sur l'oxydation des lipides et ses rapports avec les caroténoïdes (Bull. d'Histol. app., n.º 10, p. 433).
- VIGNOLI (J.) 1926. — Manual de Embriologia humana. Trad. española. — Barcelona — Salvat Editors, S. A.
- WALDEYER (W.) 1906. — Die Geschlechtszellen (Handb. d. vergl. u. exper. Entwicklungslehre von O. Hertwig, t. 1, 1.º Hälfte p. 86-476).
- WATSON (A. Mc L.) 1928. — A Handbook of Histology. — Edinburgh — E. & S Livingstone.
- WHITEHEAD (R. H.) 1904. — The embryonic development of the interstitial cells of Leydig (Am. J. of Anat., vol. 3, p. 167).
- 1933. — Involution of the transitory cortex of the mouse adrenal. J. of Anat. vol. 67, pg. 387.
- DE WINIWARDER (H.) 1901. — Recherches sur l'ovogenèse et l'organogenèse de l'ovaire des Mammifères (Lapin et Homme) (Arch. Biol., t. p. 33-200).
- 1912. — Observations cytologiques sur les cellules interstitielles du testicule humain (Anat. Anz., t. 41, p. 309-320).
- WITSCHI (E.) vid. opus Allen, Danforth and Doisy.
- YAMAKAWA (H.) 1925. — Action des rayons X sur les testicules du Rat albinos. Coloration vitale des cellules interstitielles (Japan. Med. World., t. 5, p. 297).



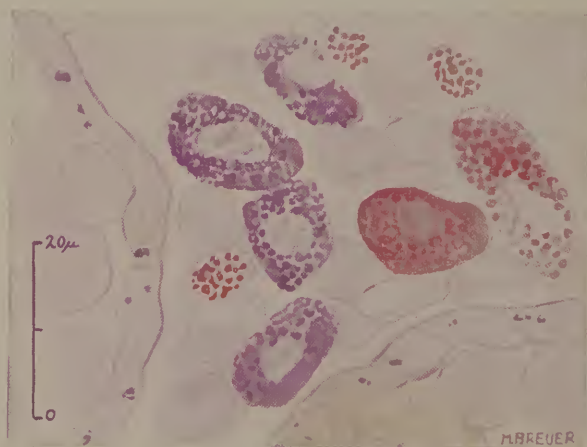




A



B



C





FIG. 1

Oc.: 9 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. formól-platina — congelação — reação de Feulgen-Verne. "Embrião de galinha de 4 dias e meio". Região do mesonéfros. Eminencia germinativa fortemente coráda.



FIG. 2

Oc.: 9 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. formól-platina — congelação — R. F.-V. "Embrião de galinha de 6 dias". Região do mesonéfros. Epitélio celomático, túbos do corpo de Wolff e eminencia germinativa intensamente corádos. Mesênquima em torno dos túbos e revestindo o epitélio: reação negativa.

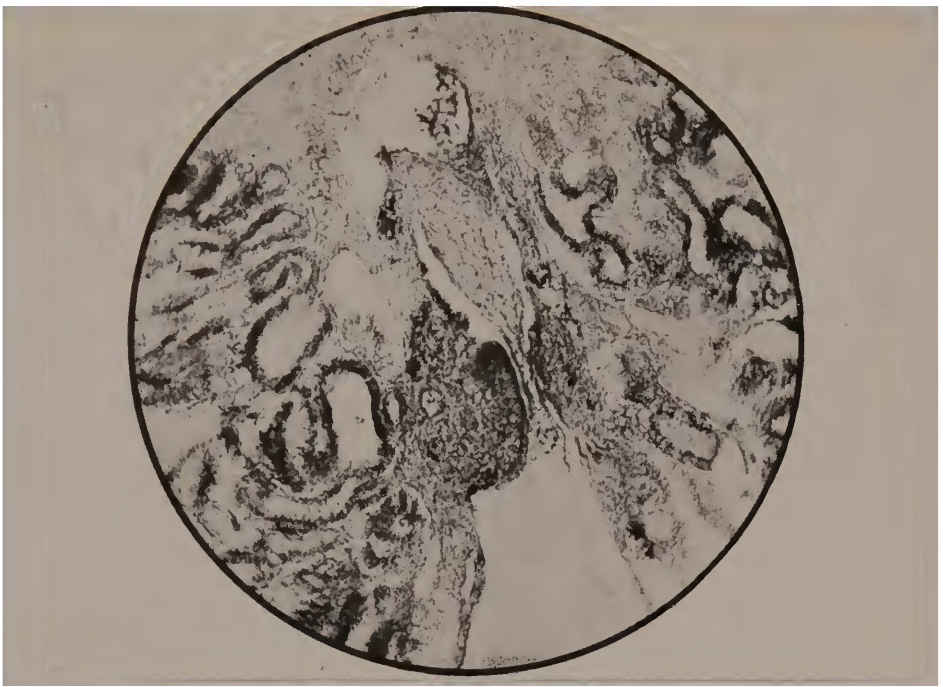


FIG. 3

Oc.: 9 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. formól-platina — congelação — R. F.-V. "Embrião de galinha de 8 dias". Região do pólo caudal do mesonéfron. Gonada ainda presa ao epitélio celomático. Túbos do nefron idem. Mesênquima adjacente fortemente corada. Migração das pequenas células germinativas para o conjuntivo que reveste a gonada.



FIG. 4

Oc.: 9 — Obj.: 8 — Zeiss. Fix. formól-platina — congel. — R. F.-V. "Embrião de galinha de 9 dias". Região das gonadas. Entre os néfrons e o mesentério, gonadas já diferenciadas e fortemente coradas em vermelho-violêto (preto na fotografia). Epitélio celomático e túbos também intensamente corados.

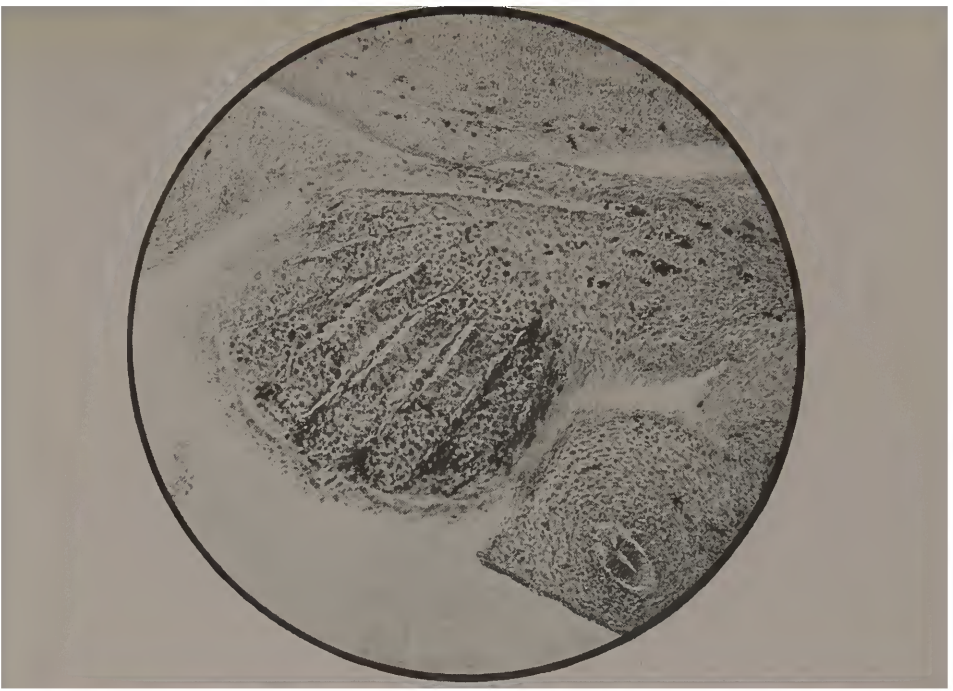


FIG. 5

Oc.: 9 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. formól-platina — congelação — R. F.-V. "Gonada de rato de 20 dias". Cordões epiteliais com raras células coradas. Mesênquima R. F.-V. negativa. Células extra "cordonais" intensamente coradas na superfície do órgão e no pólo superior (peq. cel. germinat.). Albuginea F.-V. negativa. Ac ma e à esquerda túbo de Wolff: epitélio F.-V. positivo.



FIG. 6

Oc.: 9 — Obj.: 40 — Zeiss. Fix. formól-platina — Congei. — R. F.-V. "Testículo de gambá de 7,5 cts. ainda no marsúpio". Túbos seminíferos repletos de células F.-V. negativas. Limites dos tubos F.-V. positivos. Ausencia quasi completa de elementos intersticiais.



FIG. 7

Oc.: 6 — Obj.: 6 — Zeiss. Fix. formól-platina — Congel. — R. F.-V. "Testículo de gato de 30 dias injetado de litio-carmin". Células coradas intensamente R. F.-V- dispostas na superfície do órgão entre os tubos seminíferos e a albuginea. Histiocítos "impregnados" de litio-carmin situados no conjuntivo da albuginea. Não se encontram elementos histiocitários entre os túbos seminíferos.

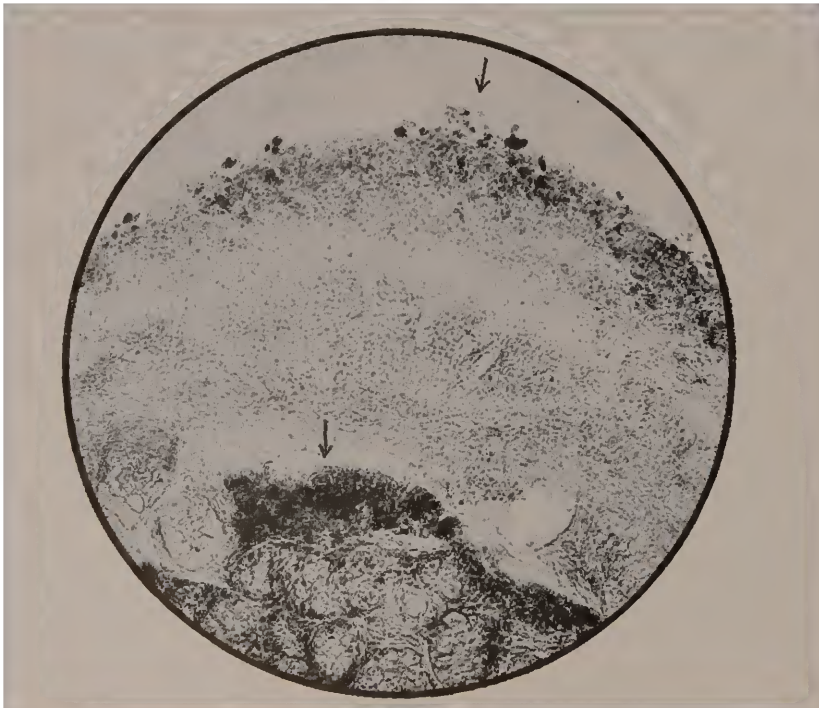


FIG. 8

Oc.: 6 — Obj.: 20 — Zeiss. Grande aumento do côrte anterior. Seta superior: histiocítos na albuginea. Seta inferior: Massa de células F.-V. positivas; são as células intersticiais. (em preto).

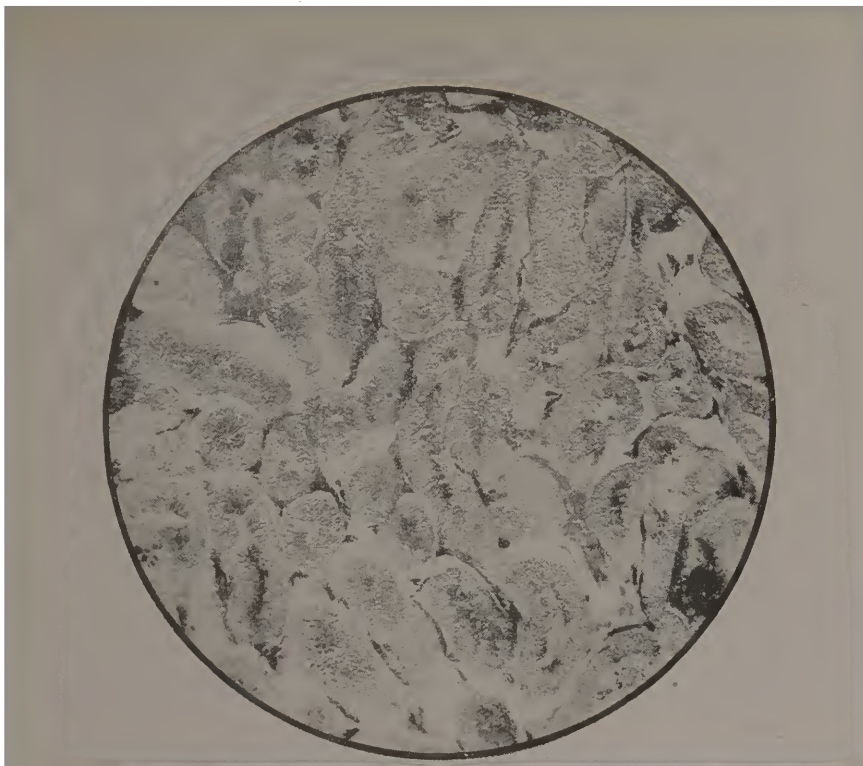


FIG. 9

Oc.: 9 — Obj.: 8 Zeiss. Fix. formól-platina — Congel. —  
R. F.-V. "Testículo de cão". Células intersticiais coradas inten-  
samente (em preto) pelo F.-V.

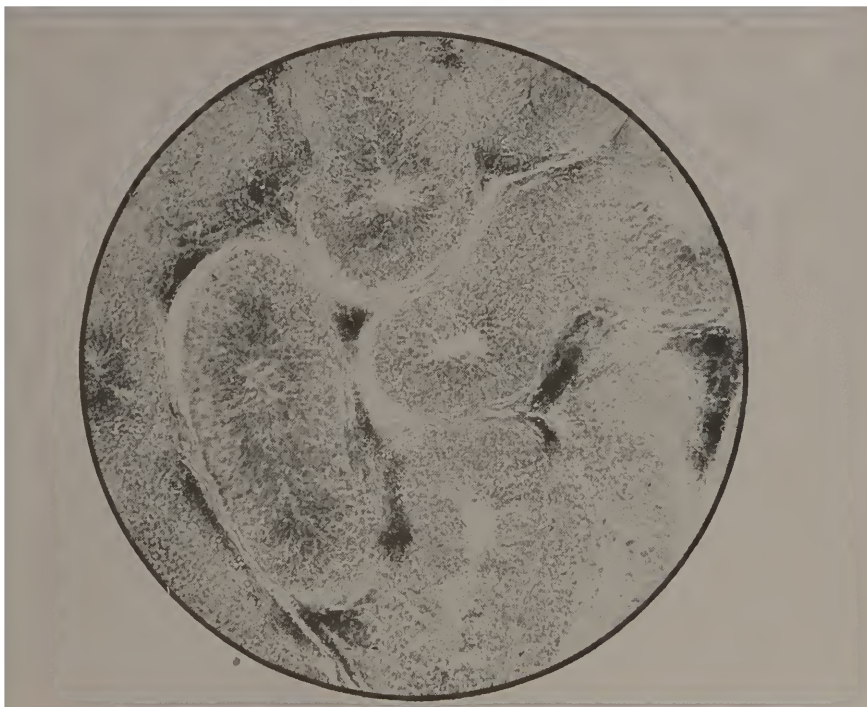


FIG. 10

Oc.: 9 — Obj.: 40 — Zeiss. Grande aumento de uma região do  
córte anterior. As cabeças dos espermatozoides estão relativamente  
coradas.

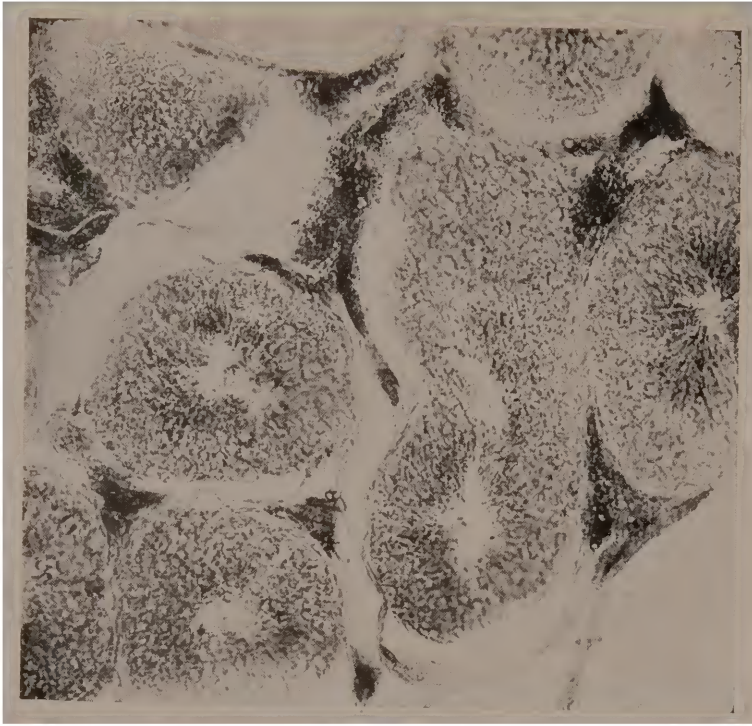


FIG. 11

Oc.: 9 — Obj.: 40 — Zeiss. Fix. formól-platina — Congel.  
 — R. F.-V. "Testículo de gambá joven". Ao lado de células  
 intersticiais coradas intensamente pela F.-V. (preto) fileiras de  
 "células conjuntivas" F.-V. negativas (cinzento).

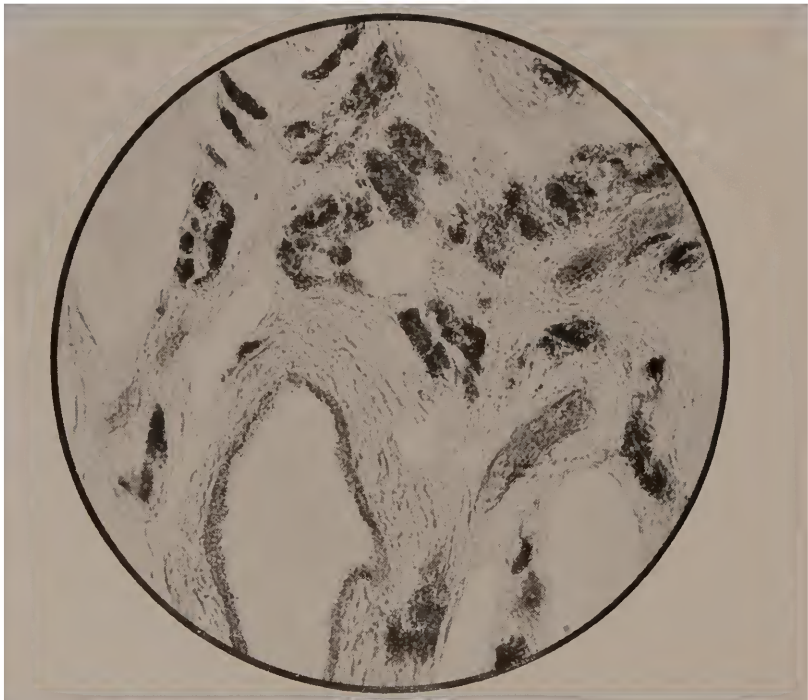


FIG. 12

Oc.: 9 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. formól-platina — Congel.  
 — R. F.-V. "Testículo de cão adulto". Região da réte-téstitis.  
 Grupo de células intersticiais de Leydig em torno dos tubos, co-  
 radas intensamente pela F.-V. O epitélio dos tubos também  
 tem uma reação positiva.



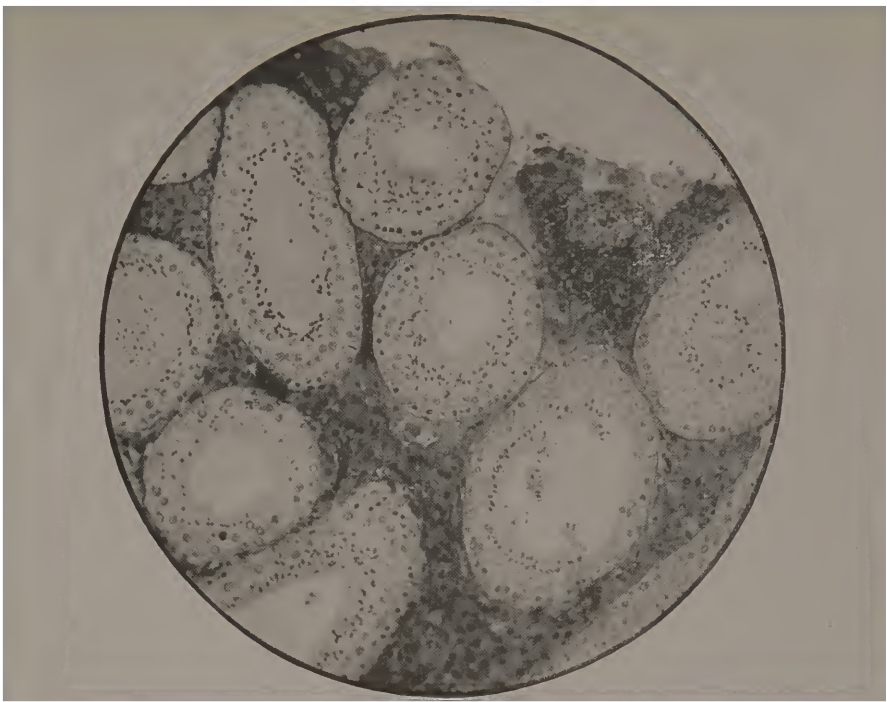


FIG. 13

Oc.: 6 — Obj.: 20 — Zeiss. Fix. Formól-platina — Inclusão em parafina. H. E. "Testículo de gambá adulto". Entre os tubos seminíferos: riqueza de células intersticiais intensamente coradas.



FIG. 14

Oc.: 9 — Obj.: 8 — Zeiss. Fix. Formól-platina — Congel. — R. F.-V. "Testículo de cão jovem". Aspecto da região da rête-téstis. Cêls. intersticiais coradas intensamente pela F. V. (em escuro) contrastando com o conjuntivo.



# A colchicina e os paramécios

ROSINA DE BARROS

## INTRODUÇÃO

A colchicina tem, atualmente, chamado a atenção do mundo científico pelos seus efeitos verdadeiramente surpreendentes sobre certas plantas. Assim, NEBEL (16), DERMEN (9), MORRISON (15), BLAKESLEE (1-8) e seus colaboradores (AVERY, WARMKE, etc.), SMITH e HAROLD (17) e outros aplicando o método colchicínico de DUSTIN (11 e 12), primeiro Autôr que observou o efeito carioclásico da colchicina, conseguiram induzir novos tipos, chegando à análise citogenética dos mesmos.

BLAKESLEE tratando sementes com a colchicina, obteve plantas poliplóides de *Datura* e *Portulaca* com tecidos  $4n$  e  $8n$ . Pude conseguir uma flôr com pólen  $8n$  a partir de sementes  $4n$  submetidas a este tratamento.

DERMEN dobrou três e até quatro vêses o número diplóide ( $2n = 12$ ) de cromosomas em células dos pêlos estaminais de *Rhoeo discolor*.

Sem grandes dificuldades, novos tipos vegetais pôdem-se formar com o emprêgo da colchicina. Citê-

mos como exemplo o fáto de que BLAKESLEE em colaboração com AVERY (2) conseguiu duplicar, em pouco mais de um día, o número de cromosomas em 65 tipos diferentes de plantas com flôres pertencentes a 41 espécies, 24 gêneros e 14 famílias.

Presentemente, estudos desta natureza estão sendo feitos sobre o café no Instituto Agronômico de Campinas, por TEIXEIRA MENDES (comunicação verbal).

Podemos acrescentar aos resultados acima descritos um outro de grande importância para o geneticista prático:

É assim que BLAKESLEE e WARMKE (8) transformaram, por meio desta dróga, plantas híbridas, antes estéreis, resultantes do cruzamento entre espécies diferentes (*Nicotiana tabacum*  $\times$  *Nicotiana glutinosa*, etc.) em férteis. O mesmo éxito alcançaram SMITH e HAROLD (17) com plantas híbridas estéreis do gênero *Nicotiana* (*N. tabacum*  $\times$  *N. rústica*, etc.).

Êstes resultados representam um notável progresso na cíto e na fíto genética, e, quiçá, na zoogenética. Parece-nos que entre os animais, DUNHAM, HOWARD e REID (10) conseguiram induzir com esta dróga três tetraplóides de *Daphnia longispina*. Digo *parece*, porque fizeram esta afirmação baseando-se em observações sobre a viabilidade, crescimento, atividade reprodutôra, tamanho, robustês geral e duração de vida (em menór gráu que nos indivíduos paternos) e não em estudos citológicos.

Outros efeitos tem sido obtidos entre os animais. NEBEL (16) submeteu óvos de *Arbacia punctulata* ao tratamento pela colchicina e verificou que em determinadas concentrações esta droga inibe o desenvolvimento do ovo.

Em experiências ainda não publicadas, observámos os seguintes efeitos da droga sobre *Drosófilas* da raça *black*.

a) Fracas concentrações de colchicina (0,001%) determinam a morte do animal após nove a dez dias de permanencia no meio colchicinado. Ha postúra de óvos, dos quais uns se desenvolvem até o estado de larva jovem e outros não;

b) Submetido a concentrações mais fortes deste alcalóide (0,01%), o animal morre dentro de sete ou oito dias, não havendo postúra de um só ovo.

Desejando investigar a ação da colchicina sobre os paramécios, fizemos varias experiencias, que passamos a descrever.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material com que trabalhámos é representado por ciliados pertencentes à espécie *Paramecium caudatum*, Ehrbg. e provenientes de um meio preparado com folhas secas de alfáce e agua de tornêira. Esses paramécios foram o manancial de onde retirámos o material para nossos trabalhos.

Fizémos oito experiencias, a maioria com material bacterizado e meio de cultura bacterizado ou não. Chamaremos “uma experiencia” a um conjunto de observações sobre repicagens a partir de um material homogêneo, que teve por origem um único paramécio. Nas duas primeiras experiencias usámos caldo de alfáce não esterilizado, como meio de cultura. Nas quatro seguintes este meio foi substituído por caldo de carne a 0,2% e nas últimas por caldo de carne a 0,06% e 0,025%, respectivamente.

Na preparação do caldo de carne, tanto para as culturas esterilizadas como para as não esterilizadas, foi observada a seguinte técnica:

1 — Dissólve-se 1 gr. de extráto de carne em 500 cc. de água distilada.

2 — Férve-se até completa dissolução; em seguida, junta-se carbonato de sódio até alcalinizar o meio, ao papel de turnesól.

3 — Férve-se novamente durante cinco minutos e, finalmente,

4 — Autocláva-se a 120° durante quinze minutos.

Uma experiencia abrangia duas séries de quatro culturas cada série: uma cultura testemunha e três culturas (1.<sup>a</sup>, 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup>) com concentrações progressivamente maiores de colchicina. O número das repicagens variou, em cada série, entre 2 e 14, conforme as experiencias. Os resultados, no que respeita ao número de animais, foram registrados vinte e quatro horas, bem como quarenta e oito horas após cada repicagem.

Para a obtenção de um paramécio destinado a uma experiência, isolávamos um animal da nossa cultura heterogênea; no fim de quarenta e oito horas tínhamos, para iniciar as repicagens, um lote de paramécios-irmãos (quasi sempre 16 indivíduos), geneticamente iguais, oriundos todos do mesmo tronco.

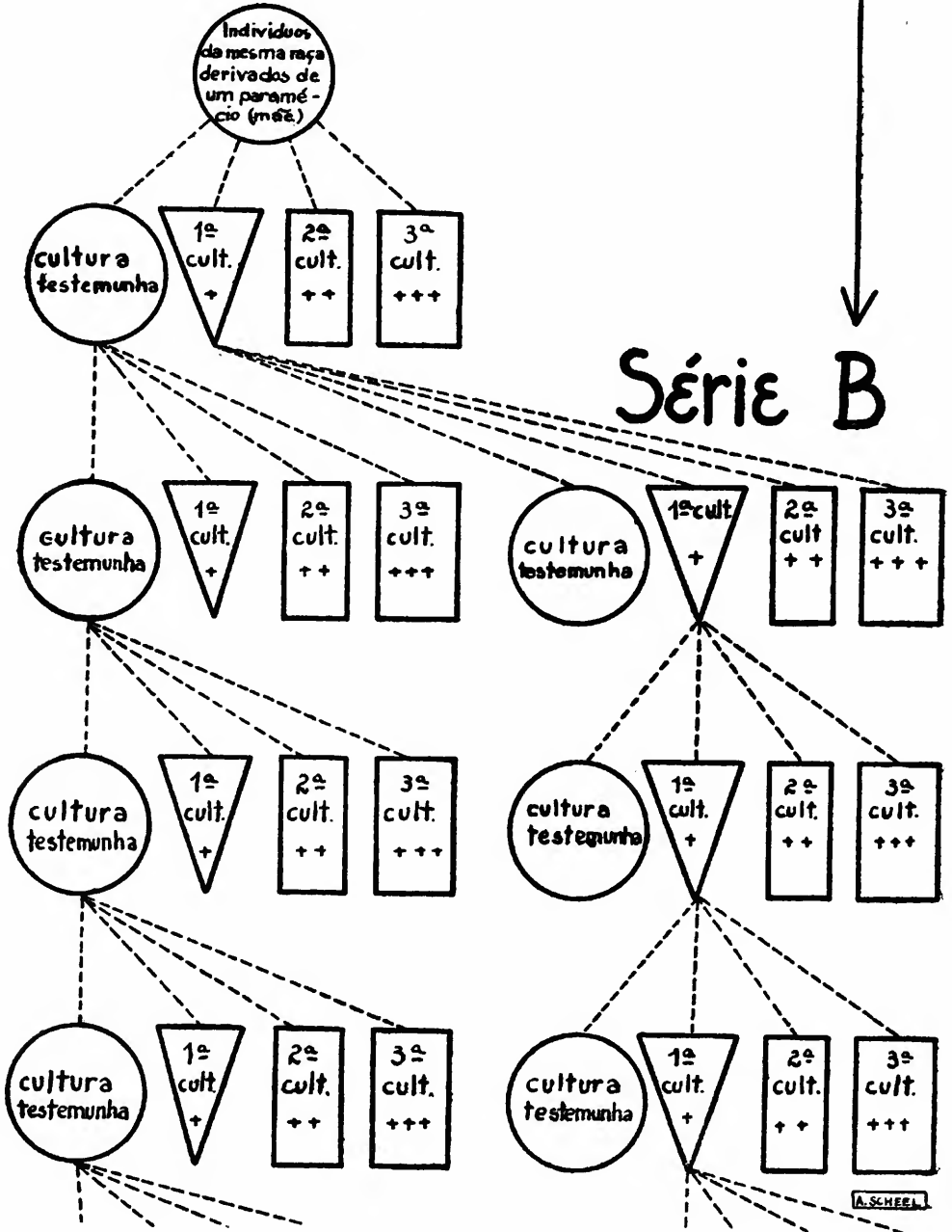
Como já dissémos atrás, dividimos cada experiência em duas séries:

Série A — Uma vês obtído um lote de paramécios-irmãos, colhíamos desse lote os quatro animais para as quatro culturas. Para as successívas repicagens, os animais provinham da cultura testemunha da repicagem anteriôr. Cada repicagem era feita, portanto, a partir de animais que não haviam, anteriormente, sofrído a ação da colchicina.

Série B — Quando procedíamos à primeira repicagem dos animais da série A, iniciávamos esta série colhendo quatro animais da 1.<sup>a</sup> ou da 2.<sup>a</sup> cultura inicial da série A, e, nas outras repicagens, o animal era colhído sempre da 1.<sup>a</sup> ou da 2.<sup>a</sup> cultura da repicagem precedênte. Portanto, trabalhávamos com material já antes colchicinado. O esquêma A esclarece a maneira com que conduzimos as experiências.

O animal era transportado em uma pipêta capilar para um vidro de relógio contendo uma gôta do meio de cultura. Isto para facilitar a verificação da presença do ciliádo no novo meio. Com um conta-gôtas completávamos o volume do meio de cultura, e, em

# SÉRIE A ← Experiencia





seguída, adicionávamos a colchicina contida num outro vidro conta-gôtas.

No decorrer das nossas experiências, 0,001% e 2% foram os limites mínimo e máximo das concentrações usadas, ou seja, o mesmo limite máximo das concentrações aconselhadas por DERMEN (9) na indução de plantas poliplóides, para um limite mínimo de 0,025%.

Técnica adotada nas experiências com material e meio asépticos:

1 — Colheita de alguns animais (em geral seis para evitar possível perda do material) sendo, no fim, aproveitados quatro.

2 — Passagem por nove vidros de relógio contendo 10 gôtas do mesmo meio de cultura, porém, mais diluído (caldo de carne a 0,025%) e cobertos com placas de Pétri, substituindo-se a pipêta capilar de três em três banhos.

3 — Transporte de cada animal, a partir do 9.º vidro para mais seis vidros contendo 10 gôtas do meio a 0,025%, substituindo-se as pipêtas de dois em dois vidros, e, nos dois últimos banhos, uma pipêta para cada vidro. As borrachas para as pipêtas permaneciam na água em ebulição até o momento de uso.

Êstes dois tempos (2 e 3) visávam lavar o infusório e privá-lo, assim, dos germens que poderiam contaminar a cultura.

4 — Passagem do animal para um godê de vidro, o qual contém o meio de cultura definitivo.

Todas estas operações eram controladas ao microscópio estereoscópico e obedeciam à técnica para a

obtenção de culturas asépticas. A esterilização dos objéto e do caldo de carne fazia-se em fôrno Pasteur e autocláve, respectivamente.

Para as culturas colchicinadas foi empregada colchicina Merck em solução a 0,04% em água destilada.

### OBSERVAÇÕES

Trabalhámos com paramécios dificilmente cultiváveis, mesmo quando, como recomenda METALNIKOV (13 e 14), empregávamos caldo de carne a 0,025%. Frequentemente, após algumas repicagens, os animais morriam. Não conseguímos ultrapassar quatro repicagens nas culturas da série A. Em consequencia, um primeiro resultado se destacou em todas as experiencias :

A adição de colchicina ao meio de cultura aumenta a resistencia desses infusórios, o que explica o maior número de repicagens para as culturas da série B, repicagens feitas a partir de material colchicinado.

Como não nos interessava obter culturas indefinidas de paramécios, mas, sim, estudar a ação da colchicina sobre êles, acreditamos que o fáto de termos usado um meio relativamente desfavorável aos animais com que lidámos, não apresenta inconveniente, servindo, ao contrário, para demonstrar este curiôso aumento da resistencia dos paramécios, desde que tratados pela colchicina, o que passaria despercebido num meio inteiramente favorável.

Os resultados das nossas experiencias foram concordantes no que diz respeito à ação da colchicina, tanto com material com bactérias, como sem elas. Dissémos “no que diz respeito à ação da colchicina”, pois no meio com bactérias a táxa das divisões foi maior, consequencia da maior quantidade e qualidade de alimento.

A título de illustração trazemos aquí os resultados da experiencia IV, séries A e B (quadros n.º 1 e n.º 2).

Quadro n.º 1  
Experiencia IV

Data	Série	Ordem das Culturas	Tempo para leitura dos resultados	Numero de divisões entre uma e outra repicagem.			N.º de gotas de colchicina a 0,04%	N.º de gotas de caldo de carne a 0,2%	Concentração de colchicina nas div. culturas	Média do N.º de divisões
				1 rep.	2 rep.	3 rep.				
31-1-1939 α 6-2-1939	A (Repicagens de 48 em 48 horas a partir da cultura testemunhal)	T	24 h	1	3	não reg.º	0	30	0%	2
			48 h	1¾	3¾	2				2¼
		1ª	24 h	1	3	não reg.º	24	6	0,032%	2
			48 h	3¼	4¾	4¼				4
		2ª	24 h	1	3		27	3	0,036%	2
			48 h	1¾	5					3¼
		3ª	24 h	0			28	2	0,037%	1
			48 h	0						1

## Quadro nº 2 Experiencia IV

Data	Série	Ordem das culturas	Tempo para leitura dos resultados	Numero de divisões entre uma e outra repicagem.														Nº de gotas de colchicina a 0,04%	Nº de gotas de caldo de carne a 0,2%	Concentração de colchicina nas div. culturas	Média do Nº de divisões
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
2-2-1939 a 1-3-1939	B (Repicagens de 48 em 48 horas a partir da cultura Nº1)	T	24 h	2	2	1	2	2	2	1	0	2	mor-te	mor-te	mor-te	não reg.	não reg.	0	30	0%	1
			48 h	0	2	2	2	4	3	mor-te	mor-te	3	2	3	1 ¼						
		1ª	24 h	2	2	2	2	2	2 ½	2	1	não reg.	4	2	não reg.	não reg.	não reg.	24	6	0,032%	2
			48 h	0	3 ½	4	4	5	2	4	1	5	não reg.	2 ½	5 ½	6	5				3 ¼
		2ª	24 h	3	2	2	2	2	2	2	1	não reg.	4	2	não reg.	não reg.	não reg.	27	3	0,036%	2
			48 h	4 ½	4	4	4	4	2	2	4	5	5 ½	3 ½	3 ½	não reg.	4 ½				4
		3ª	24 h	não foi feita	2	2	2	1 ½	mor-te	1	1	não reg.	mor-te	1 ½	não reg.	não reg.	28	2	0,037%	1 ½	
			48 h	feita	3 ½	3 ½	3 ½	2 ½	3 ½	2 ½	4 ½	1	3 ½	feita	mor-te	2 ½					

A. SCHUBERT

Pela análise do quadro n.º 1, verificamos que a maior taxa das divisões foi assinalada nas seguintes culturas: 1.ª repicagem — 1.ª cultura ( $3 \frac{1}{4}$ ); 2.ª repicagem — 2.ª cultura (5) e 3.ª repicagem — 1.ª cultura ( $4 \frac{1}{4}$ ).

O ritmo de divisão na série B (quadro n.º 2) foi mais acelerado na 1.ª cultura com 5, 4,  $5 \frac{2}{4}$ , 6 e 5 divisões correspondentes às 5.ª 7.ª 12.ª, 13.ª e 14.ª repicagens, respectivamente; na 2.ª cultura com  $4 \frac{1}{4}$ , 4,  $5 \frac{3}{4}$  e  $3 \frac{2}{4}$  divisões nas 1.ª, 2.ª, 8.ª, 10.ª e 11.ª repicagens, respectivamente. Nas 3.ª, 4.ª e 9.ª repicagens a taxa máxima foi registrada concomitantemente nas 1.ª e 2.ª culturas.

Estes máximos de divisão nas culturas 1.ª e 2.ª seriam determinados pela ação da colchicina acelerando o ritmo das divisões.

Os resultados desta experiência IV, confirmados pelas demais, veem demonstrar:

a) Dentro das doses de colchicina por nós usadas, os paramécios adquirem maior resistência. Assim, na experiência IV, a série A, onde os animais eram retirados da cultura T, limitou-se a três repicagens, ao passo que na série B, cujos animais provinham da cultura n.º 1 este número subiu a quatorze. Nas demais experiências os resultados estudados nas duas séries, comparativamente, foram da mesma ordem.

b) Ha uma aceleração do ritmo de divisão por unidade de tempo, pois, os máximos das divisões foram geralmente verificados tanto na série A, como na

série B, com material colchicinado e este resultado foi confirmado com culturas asépticas. Em uma ou outra repicagem observa-se um efeito contrário, isto é, maior taxa na cultura T. É o que acontece com a 6.<sup>a</sup> repicagem da experiência IV, série B (quadro n.º 2). Não sabemos a causa. Talvez a qualidade do alimento...

Foram empregadas nas experiências I e IV as concentrações mais fracas e mais fortes, respectivamente, das culturas ns. 1, 2 e 3. Em consequência, houve passagem do máximo das divisões, sempre observado na 3.<sup>a</sup> cultura da experiência I para a 1.<sup>a</sup> ou 2.<sup>a</sup> cultura da experiência IV.

Em nossas varias experiências verificámos que há uma larga faixa de concentrações (de 0,013% a 0,036%) dando resultados da mesma ordem de grandeza e correspondentes a máximos de divisão.

Num meio a 0,037% de colchicina para 0,013% de meio nutritivo (3.<sup>a</sup> cultura das experiências IV e V) o retardamento do ritmo de divisão póde ser atribuído ao empobrecimento alimentar do meio e provavelmente também ao pH. Verificámos que a água destilada (de reação ácida ao papel de turnesól) é incompatível com a sobrevivencia dos nossos paramécios. Dissolvem-se após 10-30 minutos de permanencia nesta água.

Ora, como já dissémos atrás, a solução de colchicina (0,04%) foi preparada com água destilada. Assim, uma grande diluição do meio de cultura acarretaria úa maior alteração de seu pH. O animal em meio a 0,038% de colchicina, ou seja: 1 gôta de meio

para 29 gôtas deste alcalóide, dissólve-se mais ou menos no mesmo espaço de tempo que na água destilada já referida. Trata-se, portanto, da influencia do p H.

Para, por outro lado, provar a influencia do empobrecimento do meio, fizémos uma cultura com 2% de colchicína e 0,1% de caldo de carne. O paramécio sobreviveu e se dividiu. Isto significa que a colchicína a 0,038% não constitúe a causa-mórtis do animal e que um meio onde a concentração do alcalóide é 54 vêses maior que 0,038%, e onde a quantidade de alimento (dezeseis vêses superior à do meio a 0,038% de colchicína) permite ao animal responder à ação do estimulante, dividindo-se. Explica-se, tambem, assim, a diminuição da táxa das divisões nas culturas onde o meio colchicinado é bastante diluído.

A maior resistencia dos paramécios da série B em consecuencia da ação da colchicína não deve ser interpretada como capaz de demonstrar a transmissão hereditária de um caráter adquirído, pois que os paramécios ao se reproduzírem (não houve conjugação durante as experiencias) não fazem mais do que separar o seu corpo em dois pedaços, cada um dos quais está impregnado das substancias contídas no meio em que vive.

Queremos salientar aqui que não fizémos úa minuciósa análise citológica de nossos paramécios, mas não observámos modificações de tamanho ou de fórmula no decorrer das experiencias, e, por isso, acreditamos que nos paramécios a colchicína não entrave a divisão

do citoplasma, fato determinante, nas plantas, do poliploidismo (já que a divisão dos cromosomas não o é).

Assim, aos efeitos da colchicina sobre as plantas duplicando o número de cromosomas, e, em consequência, induzindo a formação de novas espécies, transformando híbridos estéreis, resultantes do cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes, em férteis; sobre os animais provocando a cicatrização rápida ao nível das inflamações crônicas, aumentando o grau das estimulações hormonais, paralisando a segmentação do ovo, etc., podemos acrescentar a aceleração do ritmo de divisão dos paramécios por unidade de tempo, bem como o aumento de sua resistência.

E' o que concluímos das oito experiências que realizámos entre 24 de novembro de 1938 e 22 de abril de 1939 no Departamento de Biología Geral da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, dirigido pelo nosso mestre Prof. ANDRÉ DREYFUS, a quem somos reconhecida pelas atenções que nos vem dispensando, pondo à nossa disposição laboratório e material para êstes e outros estudos que estamos empreendendo, sugerindo, orientando e revêndo o presênte trabalho.



## CONCLUSÕES

1 — A colchicina determina um aumento da taxa de reprodução do *Paramecium caudatum*, Ehrbg., sem atingir o seu patrimônio hereditário, o que se demonstra pelos resultados perfeitamente idênticos da cultura T da série A com os da cultura T da série B.

2 — Este efeito tem um limite, além do qual (talvês devido ao empobrecimento do meio e à modificação de sua reação) se observa uma diminuição no ritmo de divisão.

3 — Paramécios tratados pela colchicina adquirem maior resistência que os não tratados, efeito que persiste apenas enquanto são submetidos à ação da droga.

4 — Pela conclusão anterior, elimina-se a afirmativa da transmissão hereditária de um caráter adquirido, no que diz respeito à resistência.

5 — Não foi observado que a colchicina pudesse determinar nos paramécios parada de divisão do citoplasma, sem impedir os fenômenos nucleares da mitose, fato verificado em muitas plantas.

## SUMÁRIO

Diante dos resultados experimentais alcançados com a colchicina, resolvemos investigar o efeito desta droga sobre os paramécios.

Fizémos oito experiencias, a maioria com material bacterizado e meio bacterizado ou não e orientadas segundo o esquema A. O número de repicagens variou entre 2 e 14, conforme a experiencia. Trabalhámos com ciliados geneticamente iguais, portanto, da mesma raça, classificados como *Paramecium caudatum*, Ehrbg.. Os animais eram difficilmente cultiváveis mesmo em caldo de carne a 0,025% (METALNIKOV — 13 e 14). Usámos como meio de cultura: caldo de alfáce (exper.<sup>s</sup> I e II); caldo de carne a 0,2% (exper.<sup>s</sup> III, IV, V e VI), a 0,06% (VII) e 0,025% (exper. VIII).

No decorrer destas experiencias foi empregada colchicina Merck em concentrações que atingiram um mínimo de 0,001% e um máximo de 2%, abrangendo assim as concentrações empregadas na indução de plantas poliplóides.

Os resultados alcançados na experiencia IV (quadros n.º 1 e n.º 2) foram confirmados pelos das outras experiencias. São eles:

a) Maior resistencia adquirida pelos paramécios em meio colchicinado, e, em consequencia, possibilidade de maior número de repicagens na série B em relação à série A.;

b) Aceleração do ritmo de divisão desses animais em culturas tratadas pela colchicina;

c) Nenhum efeito inibidor sobre a divisão do citoplasma.

*Conclusão* — A colchicina age sobre os paramécios aumentando a sua resistência e a sua taxa de reprodução.

#### ABSTRACT

The effect of colchicine on *Paramecium caudatum*, Ehrbg., studied in 8 series of experiments with bacterized, non-bacterized and half-bacterized cultures, as shown in scheme A. The cultures were replanted 2 to 14 times. All the paramecia in each one of the experiments were of the same origin and consequently genetically identical. Culture, even in meat broth 0,025% (Metalnikov 13 and 14) was difficult. The animals were cultivated in the following liquids: broth of lettuce (exp. I and II), meat broth 0,2% (exp. III, IV, V and VI), to 0,06% (exp. VII) and 0,025% (exp. VIII).

In these experiments we applied colchicine Merck in concentrations from 0,001% to 2,0%, that include those used in the experiences inducing polyploidy in plants. The results of our series IV (graphics n. 1 and 2) were ascertained by those of the other experiments. They are:

a) Greater resistance of paramecia in colchicized medium, and consequently possibility of a greater number of replantations in series B than in series A.

b) Acceleration of the division rate in the animals cultivated with colchicine.

c) No effect whatever preventing the division of protoplasm.

*Conclusion* — Colchicine acts on *Paramecium caudatum*, Ehrbg., augmenting their resistance and the reproduction rate.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 — BLAKESLEE, A. F. and AVERY, A. G., 1937 — Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. The Journ. of Heredity. V. 28, n.º 12, pgs. 393-412.
- 2 — BLAKESLEE, A. F., 1939 — The present and potencial service of chemistry to plant breeding. American Journ. of Botany. V. 26, n.º 3.
- 3 — BLAKESLEE, A. F. and AVERY, A. G., 1939 — Induction of diploids from haploids by colchicine treatment. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 85.
- 4 — BLAKESLEE, A. F., BERGNER, A. D. and AVERY, A. G., 1939 — Sectorial chimeras chromosome deficiencies and doubling of chromosome number in *Datura stramonium* induced by colchicine treatment. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 65.
- 5 — BLAKESLEE, A. F., WARMKE, H. E. and AVERY, A. G., 1939 — Characteristics of induced polyploids in different species of Angiosperms. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 66.
- 6 — BLAKESLEE, A. F., SINNOTT, E. W. and WARMKE, H. E., 1939 — The effect of colchicine-induced polyploidy on fruit shape in cucurbits. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 84.
- 7 — BLAKESLEE, A. F. and WARMKE, H. E., 1939 — Effect of polyploidy upon the sex mechanism in dioecious plants. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 88.
- 8 — BLAKESLEE, A. F. and WARMKE, H. E., 1939 — Induction of tetraploidy in *Nicotiana sanderae* and in the sterile hybrid *N. tabacum* x *N. glutinosa* by colchicine treatment. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 85.
- 9 — DERMEN, H., 1938 — A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes of temperature. Journ. of Heredity. V. 29, n.º 6, pgs. 210-229.
- 10 — DUNHAM, HOWARD, H. and REID, W., 1939 — Colchicine treatments on *Daphnia longispina*. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 69.

- 11 — DUSTIN, A. P., HAVAS, L. et LIRS, F., 1937 — Action de la colchicine sur les divisions cellulaires chez les vegetaux. C. R. de l'Assoc. des Anatom.
- 12 — DUSTIN, A. P. et CHODKOWSKI, K., 1937 — Étude de la cicatrisation par la réaction colchicinique. C. R. de l'Assoc. des Anatom.
- 13 — METALNIKOV, 1924 — Immortalité et rajeunissement dans la biologie moderne. Flammarion. Paris.
- 14 — METALNIKOV, 1937 — La lutte contre la mort. Gallimard, Paris.
- 15 — MORRISON, G., 1938 — The production of a tetraploid Zinnia by colchicine treatment. The Journ. of Heredity. V. 29, n.º 5, pgs. 187-188.
- 16 — NEBEL, B. R. and RUTTLE, M. L., 1938 — The cytological and genetical significance of colchicine. The Journ. of Heredity. V. 29, n.º 1, pgs. 2-9.
- 17 — SMITH, HAROLD, H., 1939 — Induction of polyploidy in Nicotiana species and species hybrids by treatment with colchicine. Genetics. V. 24, n.º 1, pg. 85.

BOLETINS DA FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E  
LETRAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

VOLUMES PUBLICADOS:

- I — ZOOLOGIA n.º 1 — 1937
- II — BOTÂNICA n.º 1 — 1937
- III — BIOLOGIA n.º 1 — 1937
- IV — ZOOLOGIA n.º 2 — 1938
- V — FÍSICA n.º 1 — 1938
- VI — LETRAS n.º 1 — 1938
- VII — BIOLOGIA n.º 2 — 1938
- VIII — MINERALOGIA n.º 1 — 1938
- IX — HISTÓRIA DA CIVILIZAÇÃO BRASILEIRA n.º 1 — 1939
- X — MINERALOGIA n.º 2 — 1939
- XI — ETNOGRAFIA BRASILEIRA E LINGUA TUPI — GUARANÍ n.º 1 — 1939.
- XII — HISTÓRIA DA CIVILIZAÇÃO
- XIII — ZOOLOGIA n.º 3 — 1939
- XIV — BOTÂNICA n.º 2 — 1939
- XV — QUÍMICA n.º 1 — 1939
- XVI — HISTÓRIA DA CIVILIZAÇÃO BRASILEIRA n.º 2

Índices dos Boletins de Biologia já publicados:

- BIOLOGIA n.º 1: Dreyfus, A. — Contribuição para o estudo do ciclo cromosômico e da determinação do sexo de Rhabdias Fülleborni Trav. 1926.
- BIOLOGIA n.º 2: Barrozo do Amaral, E. — Contribuição ao estudo das células de Berger.



Impresso na  
E. G. "Revista dos Tribunais"



