

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN
1947 - Vol.20



M e m
I B



SciELO



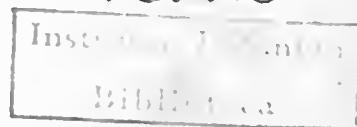
MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1947

TOMO XX

*

18.579



São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65



As "MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas à publicação de trabalhos realizados no Instituto ou com sua contribuição. Os trabalhos são dados à publicidade, separadamente, logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memorias", pedindo-se nesse caso o obsequio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondencia editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa postal 65
S. Paulo — BRASIL

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED



INDICE

		Pag.
395	1. VALLEJO-FREIRE, A. — Febre maculosa no Mexico. Cultivo de Rickettsias <i>Spotted fever in Mexico. Culture of Rickettsia.</i>	1-12 ✓
396	2. LEAO, A. T. & EICHBAUM, F. W. — Ação vermícida do óleo de cajú (<i>Anacardium occidentale</i>) e derivados. Experiências em cães <i>Vermicidal activity of the cashew oil (Anacardium occidentale) and derivatives. Experiments in dogs.</i>	13-30 ✓
397	3. BIER, O. — Estudo quantitativo da reação de floculação entre o antiveneno crotálico e uma fração purificada do veneno da Cascavel neotropical (<i>Crotalus t. terrificus</i>). <i>Quantitative studies of the flocculation reaction between the crotalic antivenom and a purified fraction of the Neotropical rattlesnake venom (Crotalus t. terrificus).</i>	31-38 ✓
398	4. SALVATORE, C. A. & SCHREIBER, G. — Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravídico. Pesquisas de citologia quantitativa: IV ... <i>Caryometric researches in the oestral and gravidic cycles. Researches of quantitative cytology: II'.</i>	39-78 ✓
399	5. EICHBAUM, F. W. — Ação dermatotóxica de venenos ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos <i>Dermatotoxic activity of ophidic venoms and their neutralization by the antivenoms.</i>	79-94 ✓
400	6. EICHBAUM, F. W. — O fator de difusão ("Spreading factor") dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> e de <i>Crotalus terrificus terrificus</i> <i>The spreading factor of the venom of B. jararaca and Crotalus t. terrificus.</i>	95-106 ✓
401	7. VALLEJO-FREIRE, A. — Transmissão do vírus da febre maculosa mexicana por <i>Amblyomma striatum</i> Koch, 1844 <i>Virus transmission of Mexican spotted fever by Amblyomma striatum Koch, 1844.</i>	107-112 ✓
402	8. SCHREIBER, G. — O crescimento interfásico do núcleo. Pesquisas cariométricas sobre a espermatogênese dos oídios <i>Interphasic growth of the nucleus. Caryometric researches on the ophidic spermatogenesis.</i>	113-180 ✓
403	9. HOGE, A. — Notas erpetológicas. 2. Dimorfismo sexual nos Boídeos <i>Notes on Herpetology. 2. Sexual dimorphism in Boidae.</i>	181-188 ✓
404	10. PRADO, A. — Notas ofiológicas. 20. Descrição do alotipo de <i>Dryophylax rutilus</i> Prado, 1942. <i>Notes on Ophidia. 20. Description of the allotype of Dryophylax rutilus Prado, 1942.</i>	189-192 ✓
405	11. HOGE, A. — Notas erpetológicas. 3. Uma nova espécie de <i>Trimeresurus</i> <i>Notes on Herpetology. 3. A new species of Trimeresurus.</i>	193-202 ✓

406	12. EICHBAUM, F. W. — Potenciação da ação vermífida do hexylresorcinol por detergentes. Experiências in vitro com <i>Ascaris</i> de porco	203-218 /
407	13. MILLER DE PAIVA, L. — Ovario e adrenal. Suas relações com a alimentação e com o benzoato de estradiol	219-226 /
408	14. AMARAL, J. P. DO & LACERDA JR., M. G. DE — Estudos sobre a vacinação antitífica. I. Vacinação pelo método de Felix	227-232 /
409	15. BÜCHERL, W. — Estudo comparativo das espécies brasileiras do género <i>Pamphobeteus</i> Pocock, 1901 (<i>Mygalomorphae</i>)	233-282 /
410	16. PRADO, A. & HOGE, A. — Notas oofológicas. 21. Observações sobre serpentes do Perú	283-295 /
411	17. BÜCHERL, W. — Duas novas espécies do género <i>Eupalaestrus</i> Pocock, 1901	297-314 /
412	18. ROSENFELD, G. — Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. — Noções práticas sobre corantes paneromícos e estudo de diversos factores	315-328 /
413	19. ROSENFELD, G. — Corante paneromíco para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido	329-334 /
414	20. SALVATORE, C. A. & SCHREIBER, G. — Pesquisas de citologia quantitativa. V. Estudo cariométrico das células foliculares e luteínicas	335-352 /

FEBRE MACULOSA NO MÉXICO. CULTIVO DE RIQUETSIAS

por A. VALLEJO-FREIRE

(Do Laboratório de Imanologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Em trabalhos anteriores (1-2) estudamos o comportamento experimental do vírus isolado por Bustamente e Varela (3-6) de casos humanos de uma infecção exantemática, semelhante à febre maculosa, verificada nos Estados de Sinaloa e Sonora, no México.

Em vista de serem conseguidas a partir de cultivo em tecidos vacinas eficazes contra a maioria das riquetsioses humanas, procuramos cultivar a amostra do vírus mexicano, para obter antígeno em quantidade suficiente, assim como estudar o comportamento das riquetsias cultivadas.

Entre as técnicas utilizadas para esse fim, sobressai pela simplicidade e melhores resultados obtidos a originalmente usada por Barykine e colaboradores (7) no cultivo do vírus do tifo epidêmico. Consiste esta técnica em inocular o material infetante no interior da bolsa vitelina de embriões de galinha em desenvolvimento. O método foi aperfeiçoado por Cox (8,9), que o utilizou para cultivar riquetsias tanto do grupo do tifo, como do da febre maculosa e é hoje internacionalmente conhecido sob a denominação de método de Cox.

Com o método de Cox diversos pesquisadores conseguiram cultivar riquetsias isoladas de casos humanos de infecções exantemáticas, verificados nas mais variadas localidades geográficas (10-15), o que permitiu igualmente produzir vacinas eficazes contra as diferentes riquetsioses observadas nos continentes europeu e americano (16-19).

Durante a última guerra a proteção das tropas e mesmo de grandes populações contra o tifo epidêmico e endêmico e mesmo contra a febre maculosa foi possível devido à utilização da técnica de Cox para o cultivo de riquetsias, que permitiu a produção de vacinas em grande escala. Com os métodos de Weigl (20), Zins-er e colaboradores (21-24), Castañeda (25) ou Spencer-Parker (26) não

Recebido para publicação em outubro de 1945.



teria sido possível produzir antígenos necessários para a produção de grandes volumes de vacinas, pois que todos eles são de difícil execução, requerendo pessoal altamente especializado.

As amostras de vírus da febre maculosa isoladas no continente americano, principalmente nos Estados Unidos e no Brasil, são todos cultiváveis pelo método de Cox e a grande maioria das vacinas hoje utilizadas é preparada com antígenos obtidos por esta técnica.

Neste trabalho relatamos resultados de cultivo de uma amostra do vírus mexicano, que temos utilizado no Instituto Butantan para a produção de vacina contra a febre maculosa em São Paulo. Descrevemos com detalhe o material e a técnica por nós empregados com bons resultados há algum tempo, o que nos tem permitido maior segurança nas manipulações assépticas e diminuição do número de contaminações bacterianas, principalmente durante a fase de inoculação e colheita dos embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovos — Ovos fecundados de galinha Leghorn, mantidos em incubadora comum à temperatura de 38.5 a 39.5°C durante 5 a 8 dias.

Vírus B. V. ()* — Isolado de caso de febre maculosa no México por Bustamante e Varela. Remetido ao Instituto Butantan em *Ornithodoros* sp. e mantido em passagens sucessivas em cobáia.

Inoculação — As inoculações são feitas com auxílio de seringas montadas com agulhas de 3 a 4 cm de comprimento e 0.3 a 0.5 mm de diâmetro.

Os embriões antes de inoculados são examinados por transiluminação. Nesta ocasião assinala-se na casca os limites da câmara-de-ar e marca-se o local, que corresponde ao ponto mais próximo da mancha ocular. Esta última referência facilitará ao técnico atingir o interior da bolsa vitelina no momento da inoculação.

Para facilitar a inoculação, usa-se um maçarico alimentado com mistura de oxigênio e acetileno (oxy-acetileno blow-pipe Oswald, tipo W-29, bico N.º 2), que permite formar chama bem fina, curta e intensa. Com este maçarico calcina-se em um segundo pequena área da casca, correspondente à câmara-de-ar, aproximando a base da chama tangencialmen-

(*) Recebido por gentileza do prof. Ayrosa Galvão.

te à parte mais saliente do polo do ovo (Foto 1). Dêste modo, não só se esteriliza, como se torna irriável o local por onde vai passar a agulha para atingir, através da câmara-de-ar, o saco da gema, evitando a manobra de se perfurar a câmara-de-ar com estilete, o que é a causa frequente de contaminações.

As inoculações de ovo a ovo foram feitas em volume, variando de 0.1 a 0.5 cm³ da suspensão obtida de u'a membrana vitelina em 15 a 20 cm³ de líquido.

Com a seringa contendo o material inietante, com golpe brusco, procura-se orientar a agulha através da parte calcinada da casca, aproximadamente para o centro do ovo e no lado oposto da marca correspondente à mancha ocular, procurando evitar movimentos laterais, que podem dilacerar a membrana da casca, que protege e forma a câmara-de-ar. Dêste modo, atinge-se facilmente o interior do saco da gema, porém, para maior segurança, convém, antes de injetar o "inoculum", aspirar pequeno volume de gema.



Foto 1

Inoculado o material, o orifício feito pela agulha é fechado com u'a mistura de parafina fundida (ponto de fusão 70°C) ou gutapercha em bastões, idêntica à utilizada pelos dentistas.

Podem-se inocular vários ovos com a mesma seringa, usando-se neste caso seringas de 5 cm³ de capacidade para inocular no máximo 10 ovos. De cada "inoculum" ou, melhor, com material usado em cada seringa, procede-se, antes das inoculações, a provas de esterilidade bacteriológica, para afastar a hipótese de eventuais contaminações, semeando algumas gotas em caldo glicosado.

Incubação — Os embriões inoculados permanecem em incubadora ou estufa apropriada na temperatura de 34 a 35°C, até que se verifique a morte ou quando observados por transluminação, mostrarem movimentos tão lentos, apenas perceptíveis que indiquem estar no limite da vitalidade.

Abertura — Antes de se proceder à abertura dos ovos para retirada dos embriões, desinfeta-se por meio de tintura de iodo a parte da casca correspondente à câmara-de-ar até 1 cm abaixo de seus limites previamente assinalados.

A técnica que vimos utilizando com bons resultados para a abertura asséptica dos embriões é a de Penna (27) modificada. Como suporte dos ovos usamos uma caixa metálica, cuja parte superior é constituída por uma chapa de aço inoxidável, por onde passam quatro pinos, que servem para encaixar os recipientes dos ovos. No interior da caixa um motor idêntico aos utilizados nas vitrolas, permite fazer girar os suportes dos ovos com velocidade regulável por um "dial" graduado entre 50 a 150 r.p.m.: rotineiramente, usa-se 70 r.p.m. (Foto 2).

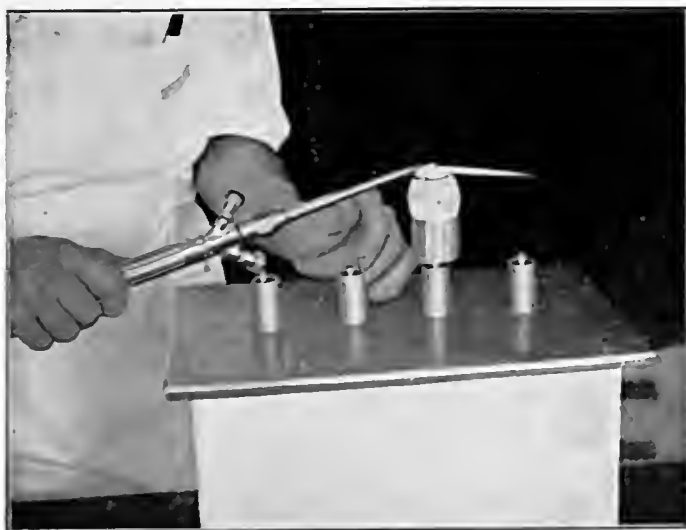


Foto 2

Colocados os ovos nos suportes e com a câmara-de-ar mantida para cima, antes de acionar o motor, com auxílio do maçarico, utilizando sempre a base da chama, calcina-se novamente um pequeno ponto da parte superior da casca. Com esta manobra evita-se que, ao aplicar a chama para abrir o ovo, a dilatação do ar na câmara provoque a saída violenta do material injetado.

Ligado o motor e girando os ovos a 70 r.p.m., aproxima-se a base da chama tangencialmente à parte lateral do ovo, próximo e pouco acima do limite previamente marcado da câmara-de-ar. Em 2 a 3 segundos ao máximo, isto é, completadas duas a quatro rotações, "corta-se" estérilmente a parte da casca correspondente à câmara-de-ar, que se pode remover facilmente, deixando ainda a membrana da casca protegendo o embrião. Com auxílio

de pinça esta pode ser retirada, para se proceder à colheita do embrião ou apenas da membrana do saco da gema, removendo-a para recipiente estéril, onde com maior segurança se poderá trabalhar ao abrigo de contaminações (Foto 3).



Foto 3

Com esta técnica, a chama capaz de abrir o ovo não chega a provocar aumento apreciável de temperatura ao embrião, não influindo, portanto, sobre a viabilidade do vírus nele cultivado. Com precaução, no entanto, pode-se, antes de abrir os ovos, mantê-los por algum tempo na geladeira.

Coloração de riquetsias — As preparações para a pesquisa de riquetsias foram feitas de esfregaços tão finos quanto possível de fragmentos de tecido da membrana vitelina ou ainda da suspensão resultante do triturado pronto para ser inoculado nos embriões.

Para coloração foi usado o método de Macchiavello (28).



Foto 4

RESULTADOS

Tentamos cultivar o agente da febre maculosa no México a partir de sangue, suspensões de tecido cerebral ou triturado de vaginais de cobaias infectadas.

Foram bem sucedidas as séries de passagens em embriões, iniciadas com 0.5 a 1.0 cm³ de vírus-sangue, colhido no primeiro ou segundo dia de circulação do vírus.

Conseguimos culturas positivas de uma série iniciada com material proveniente de emulsão de tecido cerebral de cobáia infectada.

As tentativas de cultivo feitas com suspensões contendo riquetsias, obtidas de "tunica vaginalis", raspagem ou lavagem da parede do peritônio parietal de cobaias infectadas, não foram levadas adiante, por terem sido verificadas contaminações bacterianas, devidas, provavelmente, às manobras durante a colheita.

Nas passagens de embrião a embrião, foram utilizadas membranas vitelinas de embriões infectados, colhidas no dia da morte, trituradas logo a seguir ou após permanência no frigorífico (temperatura entre 6 e 10.°C) durante algumas horas ou mesmo 2 a 3 dias, em certas ocasiões.

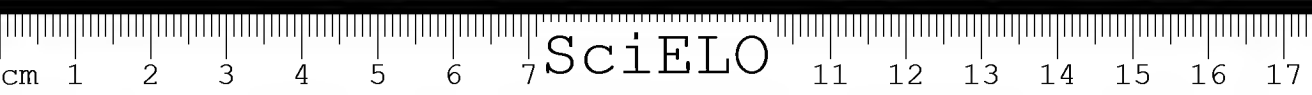
As membranas foram lavadas em solução fisiológica ou em soro de leite fresco descremado, congeladas, trituradas, suspensas em soro de leite, centrifugadas a baixa rotação durante tempo apenas suficiente para remover as partículas mais grosseiras do tecido. O líquido sobrenadante foi utilizado para inocular a série seguinte de embriões.

Em duas séries iniciadas com inoculação de vírus-sangue citratado encontramos riquetsias em número elevado logo nas primeiras passagens. Em uma destas séries foram feitas 12 passagens e na outra apenas 7. Nesta segunda série perdemos o material devido a desarranjo havido na estufa de manutenção dos embriões inoculados e na primeira interrompemos voluntariamente o trabalho após doze passagens consecutivas em embriões.

Para cada "inoculum" preparado com membrana de um único embrião, injetamos como mínimo 5 outros. De cada série por vezes utilizamos membranas de 2 ou 3 embriões. As membranas que apresentaram maior riqueza de crescimento foram as escolhidas para serem utilizadas na manutenção da amostra.

Em ambas as séries os embriões inoculados com vírus-sangue morreram entre o 7.º e 9.º dia, não levando em conta os mortos antes de decorridas 48 horas da inoculação. Em todos os embriões examinados não verificamos a presença de riquetsias, apesar de cuidadoso e demorado exame das preparações.

Na primeira passagem de embrião a embrião, a morte verificou-se entre o 6.º e 8.º dia e nas demais, quando o "inoculum" foi positivo, entre o 4.º e 6.º dia.



Nas membranas vitelinas dos embriões que serviram para a primeira passagem da série mais longa de inoculações, encontramos riquetsias em número regular em todos os que morreram no 6.º dia e em um morto no 8.º dia. Foram igualmente encontradas riquetsias em número abundante em todos os embriões logo na primeira passagem. O aspecto e a abundância das riquetsias foram praticamente semelhantes aos verificados na passagem seguinte. Sómente a partir da 6.ª passagem e excepcionalmente em alguns embriões obtivemos membranas mais ricas em riquetsias.

Mais frequentemente encontramos crescimento abundante nos embriões mortos entre o 4.º e 6.º dia, sendo raras as vezes em que verificamos riquetsias em grande número nos mortos depois do 7.º dia. Nunca observamos crescimento em embriões mortos antes de decorridas 72 horas da inoculação, sendo nestes casos até mesmo raro encontrar riquetsias extracelulares, correspondentes ao material inoculado.

As duas fotografias apresentadas (Foto 5-6) foram obtidas: uma de preparação feita com membrana da gema de embrião inoculado com material de 11.ª passagem e de embrião morto entre o 5.º e o 6.º dia de inoculação; a outra corresponde a material de 6.ª passagem.

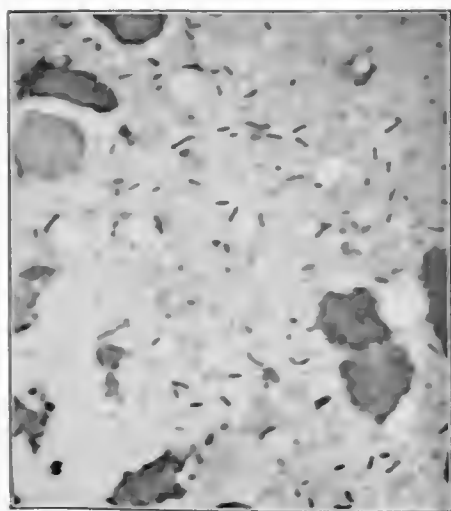


Foto 5

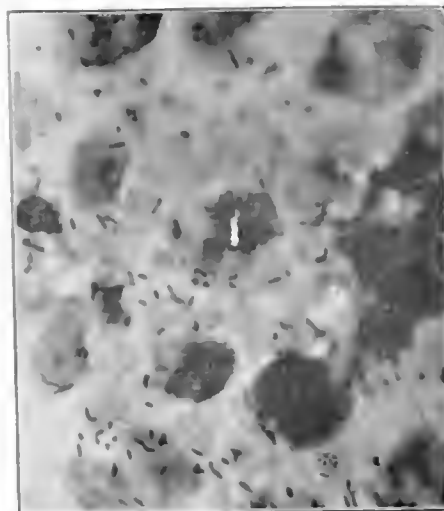


Foto 6

São bem visíveis em ambas as fotografias riquetsias situadas intraprotoplasmicamente e também outras nos espaços intercelulares. Quer com a técnica de coloração de Macchiavello, quer com a de Giemsa, não conseguimos localizar riquetsias de situação intranuclear.

Quanto à forma, predomina a de pequenos bastonetes e de diplobacilo, com elementos mais raros com aspecto de diplococos. O polimorfismo das riquétsias nas culturas em embriões não é tão grande, quanto o que se verifica nas preparações de material de cobáias infetadas, que apresentam variações mais amplas e principalmente formas de bastonetes de maiores dimensões.

As observações feitas em cobáia depois de inoculadas com membranas de embriões infetados de culturas correspondentes até a 12.^a passagem, mostraram que as características originais do vírus mexicano foram integralmente mantidas, inclusive a capacidade de provocar intensas reações escrotais em animais inoculados, quer seja pela via subcutânea, quer pela via peritoneal.

Em membranas de embriões, que após a morte foram mantidos por 2 a 4 dias à temperatura ambiente do laboratório, encontramos algumas vezes maior número de riquétsias do que em membranas de embriões da mesma série, abertos imediatamente após a morte. No entanto, tivemos dificuldade de manter séries, quando utilizamos membranas vitelinas de embriões mantidos depois de mortos à temperatura ambiente do laboratório. Cobáia, porém, inoculadas com material destes embriões, poucas vezes reagiram positivamente, mostrando assim que as riquétsias estavam mortas. Quando, entretanto, 12 a 15 dias depois foram reinoculadas com 1 cm³ de vírus-sangue de passagem em cobáia, quase todos os animais se apresentaram imunes.

CONCLUSÕES

A amostra de vírus BV é facilmente cultivada pela técnica de Cox.

Não foram notadas diferenças significativas entre o comportamento dos embriões inoculados com amostra de vírus mexicano e os inoculados com vírus de outras procedências. Apenas verificamos a maior facilidade com que são encontradas as riquétsias logo na primeira passagem de embrião a embrião, fato este, que parece ocorrer com menos frequência com riquétsias isoladas de casos de febre maculosa no Brasil e nos Estados Unidos. Com as outras amostras de vírus da febre maculosa até hoje estudadas, só se observam riquétsias em número razoável a partir da 4.^a passagem e por vezes o crescimento só é abundante, quando atinge a 6.^a ou 7.^a passagem. Com esta amostra, na 1.^a e 2.^a passagem podem-se encontrar com relativa facilidade riquétsias nas preparações feitas com membranas vitelinas em número suficiente para serem encontradas em todos os campos das melhores preparações.

O cultivo do vírus mexicano permitirá obter facilmente vacinas contra a febre maculosa no México. A identidade imunológica existente entre este vírus e os da febre maculosa nas Montanhas Rochosas e no Brasil



(S. Paulo e Minas Gerais), aliada à facilidade de cultivo da amostra mexicana, leva a sugerir a sua utilização no preparo das vacinas contra a febre maculosa verificada em diversos países do continente americano (Estados Unidos, Brasil, Colombia e México).

RESUMO

São descritos os métodos e detalhes da técnica utilizada para o cultivo, de u'a amostra de vírus da febre maculosa isolada no México e apresentados os resultados alcançados.

Foram conseguidas culturas positivas a partir de vírus-sangue de cobáia infetada, fazendo-se neste trabalho uma série de 12 passagens em embriões. As características do vírus, quanto ao comportamento em relação à infecção provocada na cobáia, foram integralmente mantidas.

Já na 1.^a passagem, ao contrário do que se verifica com as demais amostras de vírus da febre maculosa, as riquêtsias podem ser vistas em grande número na membrana vitelina dos embriões inoculados. O número de riquêtsias encontradas a partir da 5.^a passagem é muito superior ao que tem sido verificado em outras amostras de febre maculosa.

O autor é de opinião que, devido à facilidade com que se cultiva esta amostra, pode ser a de escolha para o preparo de vacinas contra a febre maculosa em geral, visto que, como ficou provado em trabalho anterior, ela é imunologicamente idêntica à febre maculosa no Brasil e nos Estados Unidos.

ABSTRACT

The methods and details are described of the technique used for the cultivation, by Cox' method, of a strain of spotted fever virus, isolated in México by Bustamente and Varela of a human case of the disease, and the results presented.

Positive cultures were secured from virus-blood of infected guinea-pig, a series of twelve passages in chicken embryos being made. The virus' characteristics as to its behaviour in regard to experimental infection in guinea-pig, were entirely maintained.

Already in the first passage a considerable number of Rickettsiae could be found in the yolk sac of the inoculated embryos, which is in contrast with what happens with other strains of spotted fever viruses. The number of Rickettsiae observed from the fifth passage on is much higher than that seen in other spotted fever strains.

Due to the easy cultivation of this strain, the author suggests its use for the preparation of vaccines against all spotted fevers, since immunologically it is identical to that of the spotted fever in Brazil and in the Rocky Mountains (U. S. A.) as has been proven in a former paper.

Agradecemos ao Sr. Arnaldo França o auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

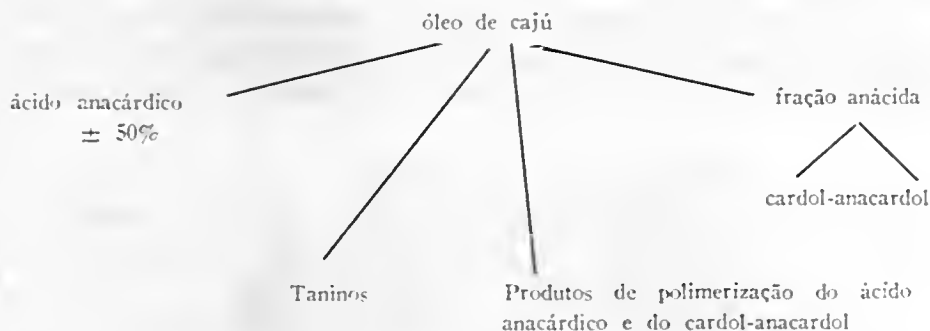
1. *Vollejo-Freire, A.* — Estudo experimental do vírus da nova riquetsiose verificada no México, *Mem. Inst. Butantan*, 20, em publicação.
2. *Vollejo-Freire, A.* — Transmissão da riquetsiose mexicana verificada nos Estados de Sonora e Sinaloa, por ixodidas do gênero *Amblyomma*, *Mem. Inst. Butantan*, 20, em publicação.
3. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Una nueva rickettsiosis in México. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa e Sonora, *Rev. Inst. Salubr. y Enf. Trop.*, 4:189-210, 1943.
4. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Características de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa, México, *Rev. Inst. Salubr. y Enf. Trop.*, 5:129-136, 1944.
5. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Aislamiento de una cepa de fiebre manchada idéntica a la de las Montañas Rocosas en Sinaloa, México, *Bol. Ofic. San. Panam.*, 23:117-118, 1944.
6. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Estudio estadístico de dos cepas mexicanas de fiebre manchada, *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 5:187-196, 1944.
7. *Barykine, W.; Kompaneecz, A.; Botcharova, A. & Bauer, H.* — Nouvelle methode de culture du virus du typhus exanthematique, *Office Inter. d'Hyg. Publique (Bulletin Mensuel)*, 30:326-331, 1938.
8. *Cox, H. R.* — Use of yolk sac developing chick embryo as medium for growing Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever and typhus groups, *Public Health Reports*, 53:2241-2247, 1938.
9. *Cox, H. R.* — Cultivation of Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever typhus and Q-fever groups in embryonic tissues of developing chicks, *Science*, 94:39-403, 1941.
10. *Cox, H. R.* — The cultivation of *Rickettsiae diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chick embryos, *Public Health Reports*, 54:2171-2178, 1939.
11. *Tchong, J. & Motheses, G. B.* — Culture of Rickettsiae of Chinese typhus in yolk sac of developing chick embryo, *Chinese Med. J.*, 57:47-50, 1940.
12. *Troxussos, J. & Vallejo-Freire, A.* — Cultivo em série da riquetsia da febre maculosa em São Paulo na membrana da gema de embriões de galinha, *Rev. Biologia e Higiene*, 11:101-102, 1940.
13. *Pong, K. H. & Zia, S. H.* — Studies on typhus Rickettsiae cultivated in yolk sac of developing chick, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 45:76-78, 1940.

14. *Gildemeister, E. & Haagen, E.* — Fleckfieberstudien; über die Züchtung der *Rickettsia mooseri* und der *Rickettsia prowazeki* im Dottersack des Hühnereies und über die Herstellung von Kulturimpfstoffen, *Zentralbl. f. Bakt.*, (abt, 1) 148:257-264, 1942.
15. *Gallardo, E.; Sanz, J. & Perez Gallardo, F.* — Datos experimentales sobre el cultivo de la *Rickettsia prowazeki* en la membrana vitelina de embrion de pollo, *Rev. Sanidad e Hig. Publica*, 18:269-273, 1944.
16. *Cox, H. R.* — Rocky Mountain spotted fever. Protective value for guinea-pigs of vaccine prepared from Rickettsiae cultivated in embryonic chick tissues, *Public Health Reports*, 54:1070-1077, 1939.
17. *Cox, H. R.* — Epidemic and endemic typhus: protective value for guinea-pigs of vaccines prepared from infected tissues of the developing chick embryo, *Public Health Reports*, 66:110-115, 1940.
18. *Tchang, J. & Mathews, G. B.* — Anti-typhus vaccine prepared from *Rickettsia prowazeki* cultivated in yolk sac of developing chick embryo, *Chinese Med. J.*, 58:440-445, 1940.
19. *Travassos, J. & Vallejo-Freire, A.* — Vacina de Cox contra a febre maculosa, *Rev. Bras Biologia*, 4:161-166, 1944.
20. *Weigl, R.* — Die Methoden der aktiven Fleckfieber-Immunisierung, *Bull. Acad. Polon. Sc. Med.*, 25, 1933.
21. *Zinsser, H. & Castañeda, M. R.* — A method of obtaining large amounts of *Rickettsia prowazeki* by X-ray radiation of rats, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 29:840-844, 1931/32.
22. *Zinsser, H. & Macchiavello, A.* — Enlarged tissue cultures of European typhus Rickettsiae for vaccine production, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 35:84-87, 1936/37.
23. *Zinsser, H.; Wei, H. & Fitzpatrick, F.* — Agar slant tissue cultures of typhus Rickettsiae, both types, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 37:604-606, 1937/38.
24. *Zinsser, H.; Wei, H. & Fitzpatrick, F.* — Nouvelles methodes de culture de Rickettsiae du typhus a propos de la production de vaccins. *C. R. Soc. Biol.*, 127:229-232, 1938.
25. *Castañeda, M. R.* — Experimental pneumonia produced by typhus Rickettsiae, *Amer. J. Path.*, 15:467-475, 1939.
26. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — Rocky Mountain Spotted Fever: vaccination of monkeys and man, *Public Health Reports*, 40:2159-2167, 1925.
27. *Penna, H. A.* — New technique for aseptic removal of chick embryo from egg, *Amer. J. Trop. Med.*, 19:589-592, 1939.
28. *Macchiavello, A.* — Estudios sobre bacteriologia e inmunologia del tifo exantematico. Santiago, Chile, *Soc. Imprensa y Litografia Universal*, 1938.



comercialmente, por um processo de aquecimento que faz arrebentar as castanhas deixando em liberdade o óleo. Além do óleo puro, foram ainda usados: ácido anacárdico, anacardato de sódio, anacardol, a fração cardol-anacardol, que denominaremos doravante de "fração anácida", representando a parte sobrenadante depois da precipitação do ácido anacárdico pelo hidróxido de chumbo.

A composição do óleo de cajú pode ser esquematizada da maneira seguinte:



O ácido anacárdico foi usado tanto como ácido puro, como sob a fórmula do sal sódico (anacardato de sódio).

Tôdas as substâncias purificadas foram preparadas na Seção de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelo Prof. H. Hauptmann e Srta. Hanna Rothschild. Pormenores dos caracteres físico-químicos dos mencionados produtos e os métodos de sua preparação foram descritos por Eichbaum, Hauptmann e Rothschild (7).

Após observações *in vitro* com várias concentrações de anacardato de sódio que mostraram ação nitidamente vermicida sobre *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis* e *Toxocara canis*, resolvemos iniciar experiências *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este fim usamos cães num total de 26 que nos foram fornecidos pela Prefeitura da Capital. Não levamos em consideração quer a raça, sexo ou côr dos animais e todos faziam parte dos chamados "vira lata" que são capturados diariamente nas ruas da Capital.

Para a verificação do grau de infestação usamos exclusivamente o método original de Stoll (8), porém ao em vez de uma lâmina contávamos duas, diminuindo assim, ainda mais, as possíveis causas de erro. Fazíamos sempre três contagens antes (às vezes quatro e raramente duas) e três depois (às vezes quatro ou cinco e raramente duas), em dias seguidos, da medicação. Levamos

sempre em consideração a consistência das fezes, tomando como base fezes "formadas", portanto multiplicávamos o número de ovos encontrados por 2 quando em face de fezes moles e por 4 quando diarréicas. Não fizemos verificação quanto ao número de vermes expulsos. Os nossos números se referem, por tanto, ao número de ovos encontrados antes e depois da medicação, bem como ao número de vermes encontrados depois da necropsia.

Para comparação quanto ao número de ovos por grama de fezes, fizemos contagens em 6 cães não tratados os quais foram posteriormente sacrificados e os seus vermes contados. Estes resultados são referidos no quadro No. I, os quais servirão de base para os nossos cálculos. Como mostra esta tabela, no

QUADRO I

(relação ovo-verme por grama de fezes)

(*Ancylostoma*)

Cão No.	No. médio de ovos por grama	Vermes encontrados	N.º de ovos por verme
10	6.383	193	33
18	10.966	137	80
37	3.666	23	159
40	4.189	19	220
41	2.837	22	129
42	7.462	45	165
Total — 6	35.501	439	786
Média por cão	5.912	73	131

caso de *Ancylostoma*, a relação verme-ovo por grama de fezes é de 1:130; no caso de *Trichuris* esta relação é aproximadamente de 1:25, precisando-se ainda de mais dados estatísticos para apurar estes resultados obtidos em número relativamente pequeno de animais. Quanto à relação ovo-verme de *Toxocara* não temos elementos suficientes para uma comparação exata ou mesmo aproximada, basrando-se os nossos resultados somente nos exames pré e post-medicação dos cães Nos. 13, 25 e 39.

Nenhum dos cães tratados mostrou, durante o tempo de observação, que variou de 5 dias a 4 semanas, sinal de intoxicação.



Para controlar o efeito vermicida nos cães tratados estes eram sacrificados 3-4 dia após a medicação, o intestino e o estômago foram dessecados para a verificação da presença ou ausência de vermes. Depois da inspeção macroscópica dos órgãos parenquimatosos, pedaços de fígado, rim, baço, coração, pulmão, intestino e estômago eram retirados e fixados em formol-fisiológico a 10% e submetidos a exame microscópico (cortes histológicos corados pelo sudan-hematoxilina e eosina-hematoxilina).

Em alguns casos (4 cães tratados e 2 de controle) foram feitos testes funcionais de fígado, a saber a reação de Takata, o teste da floculação da cefalina (Hanger) e a determinação da bilirubina, direta e indireta no soro (Tabela I e II).

Para fins de estudos toxicológicos aplicamos nos cães Nos. 14, 15, 17, 28 e 36 quantidades de drogas (óleo puro, ácido anacárdico) variando de 6 a 40 cm³, aplicadas 1-2 vezes no período de 14 dias. Os animais assim tratados foram sacrificados e autopsiados 3-4 semanas após o início do tratamento.

Todos os cães destinados ao tratamento receberam a última ração às 14 horas, permanecendo sem receber novo suprimento até às 9 horas do dia seguinte quando então eram medicados.

As substâncias enumeradas mais detalhadamente nos protocolos, eram aplicadas por via gástrica, seja por meio de cápsulas gelatinosas contendo cada uma 1 cm³ da droga, seja por meio de sonda. Fora das quantidades excessivas, aplicada com o fim de verificar a toxidez, as doses variaram de 2½ a 8 cm³, levando para tanto, em geral, em consideração o peso do animal, não se considerando, entretanto, com rigor este ponto.

Como referimos linhas atrás as nossas experiências preliminares *in vitro* foram realizadas usando-se o sal sódico do ácido anacárdico (anacardato de sódio) razão pela qual também as primeiras experiências *in vivo* foram feitas com este sal.

Não sendo animadores os resultados obtidos, passamos a ensaiar, em seguida, o óleo puro tendo como veículo u'a emulsão de goma arábica (julepo gomoso) e que será sempre referido como "emulsão". Aqui os resultados foram bastantes encorajadores, o que nos levou a insistir nas experimentações.

Passamos em seguida a experimentar o óleo puro (sem nenhuma mistura), sobre o qual mais insistimos pelo fato de obtermos resultados plenamente satisfatórios. Pesquisamos ainda a ação do ácido anacárdico, ácido anacárdico

TABELA I

Os resultados dos exames histológicos são resumidos na tabela seguinte

Cão No.	Peso	Medicação oral	Autopsia ... dias após últ. medicação	Histologia	
				Fígado	Rim
14	18 kg	2x100 cm ³ de emulsão c/ intervalo de dois dias	7	Coloração marron laranja difusa das células hepáticas. Vacuolização + óleo nos grandes ductus biliares ++	Glomerulos: normais; acumulação (eliminação) do óleo em quasi todos túbulos contortos e na alça de Henle +++
15	12 kg	Idem	1	Vacuolização das células hepáticas +. Óleo nos grandes ductus biliares ++	Glomerulos: normais; óleo nos túbulos contortos e na alça de Henle +
17	22 kg	2x125 cm ³ de emulsão c/ intervalo de dois dias	3	Vacuolização das células hepáticas ++++. Acumulação de óleo nas cél. reticul. ++	Óleo nos glomerulos ++. Óleo nos túbulos contortos e na alça de Henle ++.
23	7 kg	15 cm ³ de óleo puro	16	Vacuolização das células hepáticas ++++. Óleo nas cél. reticul. ++ e nos grandes ductus biliares +++.	Fraca coloração difusa marron-laranja dos tub. ret. (alça de Henle) e contortos.
11 kg	35	7 cm ³ de ácido anacárdico	4	Vacuolização das células hepáticas 0. Células hep. c/ lig. col. laranja difusa. Óleo nos grandes ductus biliares ++.	Óleo em isolados glomerulos +; lig. col. laranja difusa dos túbulos contortos.
36	6 kg	6 cm ³ de óleo puro	1 h 30'	Vacuolização das células hepáticas ++. Óleo nos grandes ductus biliares +++.	Glomerulos: normais; óleo nos túbulos contortos +, na alça de Henle +++.
Normal I	18 kg	Não recebeu tratamento	Inchação turva das cel. hept.: infiltr. gordurosa + na periferia dos lóbulos.	Nefrite intersticial +. Glomerulos: normais.
Normal II	15 kg	Idem	Ligeira vacuolização das cél. hept. +. Infiltr. gordurosa na perif. dos lóbulos +++.	Glomerulos, túbulos contortos e retos de aspecto normal.

TABELA II

Provas funcionais de fígado

Caso No.	Peso	Medicação	Bilirubina mg.	Bilirubina direta	Cefalina		Takata
					24 hs.	48 hs.	
Normal I	?	Sem medicação	0,305	neg.	++++	++++	++
Normal II	?	Idem	0,278	neg.	++++	++++	+
28	7 kg	15/6/46; 15 cm ³ de óleo puro	a 18/6/46; 18/6/46;	neg.	+++	++++	neg.
29	7½ kg	6/6/46: 2,5 cm ³ de anacardol, 13/6: ana-cardol, 18/6: 3 cm ³ fração anacida + 3 cm ³ ácido anacárdico	0,204	neg.	+	++++	++
31	10 kg	13/6/46: 6 cm ³ fração anácida, 18/6: 3 cm ³ fração anácida + 3 cm ³ ácido anacárdico	18/6/46 0,250 27/6/46; 0,370	neg. neg.	+++ +	+++ ++++	neg. +
6½ kg	32	13/6/46: 6 cm ³ fração anácida, 18/6: 3 cm ³ fração anácida + 3 cm ³ ácido anacárdico	18/6/46; 0,398 27/6/46; 0,241	neg. neg.	+++ +	+++ ++++	neg. +

+ fração anácida, fração anácida e, finalmente, em um único caso, o anacardol. Todas as experiências foram feitas de acordo com o esquema seguinte:

TABELA III
(exemplificação das diversas experiências)

Cão No. 22	Peso: 11½ kg	Data: 21/5/46
Diagnóstico	{ Ancylostoma Trichuris	
No. médio de ovos por grama de fezes	{ Ancylostoma 177320 Trichuris 1040	
No. de vermes que devia existir	{ Ancylostoma 1353 Trichuris 42	

TRATAMENTO

A 23/5/46 recebeu 5 cápsulas de óleo puro (= 5 cm³)

		Redução
1.ª contagem (24/5/46)	{ Ancylostoma: 800 ovos 99,55 % Trichuris: negativo 100 %	
2.ª contagem (27/5/46)	{ Ancylostoma: 100 ovos 99,9 % Trichuris: 800 ovos 23,1 %	

Sacrificado a 27/5/46:	Redução
<i>Ancylostoma</i> : Havia 2 ♂♂ e 2 ♀♀ da espécie <i>Ancylostoma braziliense</i>	99,8%
<i>Trichuris</i> : Havia 3 ♀♀ e 1 ♂	90,5%

RESULTADOS

1) *Ação vermífida do anacardato de sódio.* Nas experiências com o anacardato de sódio usamos somente 2 cães, os quais receberam 1.1 e 1.2 g respectivamente. Não foram feitas contagens de ovos antes da medicação, baseando-se, por isso, os resultados apresentados, somente na positividade ou negatividade dos exames de fezes posteriores ao tratamento e após o sacrificio do animal. Resulta daí não termos elementos seguros para julgar o valor real da droga empregada, excepto que nas doses usadas não teve efeito decisivo em nenhuma espécie dos seguintes vermes: *Ancylostoma*, *Trichuris* e *Dipylidium*.

2) *Ação vermífida da "emulsão".* Denominamos "emulsão" a mistura de julepe gomoso contendo 20% de óleo puro. Pensando numa possível ação irritante sobre as mucosas gástricas e entéricas foi que lançamos mão da mistura acima referida, imaginando que assim poderíamos contornar, em certo grau, aquêle efeito desagradavel, bem como servir de corretivo.



QUADRO III

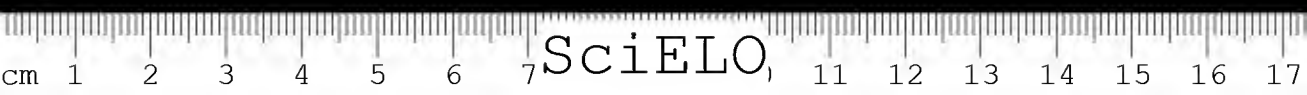
Resumo dos resultados obtidos como óleo puro de café

Cão	NOPG			NTV		Tratamento		NDUM			NOPG			Autopsia					
	No.	Peso (kg)	A	Tr	To	A	Tr	To	Dr	Dg	A	Tr	To	VE			RV		
														A	Tr	To	A	Tr	To
16	15	4,280	33	2		8 cm ³	OP		4	100	0	0		3	1		91%	50%	
20	8	6,400	45	83		4 cm ³ +	"		3	150	0	0		6	0		87,5%	100%	
21	10	6,500	46	15		4 cm ³	"		3	250	50			1	1		97,9%	93,4%	
22	11½	117,327	1,040	42		6 cm ³	"		4	100	800			4	4		99,8%	90,5%	
23	2½	88,800	266	10		2,5 cm ³	"		4	0	0			0	4		100%	60%	
24	10	11,518	87			6 cm ³	"		3	0				2			100%		
25	6	2,600	19		633	5 cm ³	"		3	0	0			0			100%		100%
27	5½	4,033	31	94		6 cm ³	"		28	0	0			0			100%		
28	7	6,175	47	6		15 cm ³	"		16	—	—			0	0		—		
39	8	4,681	36	3		6 cm ³	"		4	50	0	0		2	6		99%	100%	
Médias gerais	8,35	312,36	237,7	26,5		6,75			7,2	65	85	0		18	16		93,8%	77,5%	
			622,2														96,5%	74,1%	100%

A. Braziliense
 A manheceu morto 9 dias após a medicação
 Havia 2 ♂♂ de *Trichuris*
 Não foi acrificado
 Havia cerca de 1 dezena de *Dipylidium*.

LEGENDAS:

- NOPG = No. de ovos por grama de fezes
- NDUM = No. de dias depois da última medicação
- NTV = No. teórico de vermes
- ROP = Redução dos ovos nas fezes
- VE = Vermes encontrados
- E = Exumado
- Dr = Droga
- Dg = Dosagem
- A = Ancylostoma
- Tr = Trichuris
- To = Toxocara
- OP = Óleo puro



Usamos um total de 8 cães cujos resultados foram sintetizados no Quadro II. Sobre o *Ancylostoma* os resultados foram sempre bons, dando uma percentagem de redução elevada, em geral acima de 77,5%, excepto num cão (No. 7) que foi apenas de 25%. Em *Trichuris* foram os resultados obtidos igualmente animadores, elevando-se em geral a 100% a percentagem de redução, salvo no cão No. 11, sobre o qual parece não ter agido (ver Quadro II).

3) *Ação vermicida do "óleo puro"*. O óleo puro da castanha de cajú, sem nenhuma mistura, era administrado por meio de cápsulas gelatinosas ou sonda gástrica. As cápsulas continham sempre 1 cm³ da substância. Nas experiências com o óleo puro utilizamos 10 cães nos quais, aparentemente, houve tolerância perfeita. Sobre o *Ancylostoma* agiu bem, dando uma percentagem de redução acima de 95%, excepto no cão No. 20 que foi apenas de 87, 5%. Em relação aos *Trichuris* também foi elevada a percentagem de redução, salvo em 2 casos em que foram baixas, sendo 1 de apenas 25% (cão No. 39) e outro de 50% (cão No. 16). Também em 2 casos infestados com *Toxocara* obtivemos uma eliminação total. Damos, em resumo, no Quadro III, os resultados alcançados. ^{a)}

4) *Ação vermicida do "ácido anacárdico"*. Foram usados somente 2 cães, Nos. 34 ^{b)} e 35 ^{c)}. No animal No. 34 houve uma redução no número de ovos de cerca de 78, 9% em relação ao *Ancylostoma*, e de 100% em relação ao *Trichuris*. Este cão foi posteriormente medicado com o óleo puro o que resultou uma redução de 94,8% em relação ao *Ancylostoma*. O animal No. 35 estava infestado só com *Ancylostoma*, dando uma redução final de 100%. O protocolo seguinte serve para exemplificar o andamento das diversas experiências (Tabela II)

5) *Ação vermicida da "fração anácida"*. As experiências com a fração anácida (cardol-anacardol) absorveram somente 3 cães, Nos. 31, ^{d)} 32 ^{e)} e 33). ^{f)} pois os resultados obtidos não foram encorajadores. Nos cães, Nos. 31 e 33 a droga foi destituída de qualquer ação. Embora no cão No. 32 parecesse, em princípio, haver certa redução no número de ovos, este chegou a se elevar a 29.500 por grama de fezes, o que veio confirmar o valor negativo das experiências, pelo menos é o que podemos afirmar, levando em consideração as doses administradas.

a) a quantidade de óleo puro aplicada variou entre 2,5 — 8 cm³, de acordo com o peso dos animais (2,5 — 15 kg).

b) quantidade aplicada de ácido anacárdico no cão No. 34 (8 kg) = 5 cm³.

c) quantidade de ácido anacárdico aplicada no cão No. 35 (11 kg) = 7 cm³.

d) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 31 (10 kg) = 6 cm³.

e) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 32 (6,5 kg) = 9 cm³.

f) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 33 (7,5 kg) = 6 cm³.

Os cães Nos. 31 e 33 receberam então 5 e 7 dias respectivamente, depois, 6 cm.³ de óleo puro, apresentando em seguida uma redução de 100%. O cão No. 32, 5 dias após a medicação pela fração anácida, recebeu u'a mistura de 3 cm.³ de ácido anacárdico + 3 cm.³ da fração anácida, o que conduziu em 2 dias a um desaparecimento quase total de todos os vermes (*Ancylostoma* e *Trichuris*).

Os resultados assim obtidos foram praticamente iguais àqueles obtidos com o óleo puro.

TABELA IV

Exemplo de uma experiência mista (aplicação de 2 drogas)

Cão No. 34 Peso: 8 kg Data: 11/7/46

Diagnóstico { *Ancylostoma*
Trichuris

No. médio de ovos por grama de fezes { *Ancylostoma* 7500
Trichuris 140

No. de v. q. teoríc. devia existir { *Ancylostoma* 57
Trichuris 6

TRATAMENTO

A 15/7/46 recebeu 6 cápsulas de ácido anacárdico

		Redução
1.ª contagem (16/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 9.050 ovos <i>Trichuris</i> : 50 ovos	0 % 64,3%
2.ª contagem (19/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 3.600 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	52,4 % 100 %
3.ª contagem (23/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 2.500 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	77 % 100 %
4.ª contagem (24/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 3.350 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	55,7 % 100 %
5.ª contagem (25/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 1.600 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	78,9 % 100 %

A 25/7/46 recebeu 6 cápsulas de óleo cru

1.ª contagem (26/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 1.650 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	78,2 % 100 %
2.ª contagem (31/7/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 100 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	98,7 % 100 %
3.ª contagem (1/8/46)	{ <i>Ancylostoma</i> : 50 ovos <i>Trichuris</i> : negativo	99,4 % 100 %
Sacrificado a 1/8/46:		
<i>Ancylostoma</i> : Havia 2 ♂♂ e 1 ♀		94,5 %
<i>Trichuris</i> : negativo		100 %



RESULTADOS DAS AUTOPSIAS

Macroscópico

O aspecto do estômago e do intestino delgado e grosso não mostrou nada de anormal em caso algum: ausência de qualquer irritação local. Também os órgãos parenquimatosos: fígado e rim, baço, pulmão, coração, etc. ofereceram aspecto perfeitamente normal.

Microscópico

Exame microscópico do rim, fígado, baço, pulmão, coração, estômago, intestino de 6 cães tratados (Nos. 14, 15, 17, 28, 35 e 36) e de 2 cães não tratados (I e II).

Fixação em forma a 10% durante 48 horas e coloração pelo sudan III-hematoxilina (cortes de congelação) e hematoxilina-eosina (cortes de parafina).

Visto que o óleo de cajú e o ácido anacárdico formam com o sudan um complexo de cor marron-laranja, a sua presença pode ser facilmente identificada nos cortes histológicos. Uma certa dificuldade de identificação encontramos somente no baço, onde tinha também nos cães não tratados numerosos pigmentos hematogênicos, que em geral apresentam, aliás, uma coloração mais escura, sem o nape de laranja.

Assinalando nos protocolos a presença do óleo em certas células, deixamos aberto, si se trata de fato do óleo sob a forma aplicada, ou de produtos secundários formados no organismo (*).

Estômago e intestino: mostraram em todos os casos uma mucosa intacta, sem qualquer sinal de irritação local.

Coração e pulmão: de aspecto normal.

Baço: Em alguns casos dos animais tratados verificou-se intensa deposição de um pigmento marron-escuro no retículo, que aliás foi encontrado também no baço de um dos cães não tratados (contrôle).

Fígado: O fígado dos animais não tratados mostrou uma ligeira infiltração gordurosa, principalmente na periferia dos lóbulos, notando-se ainda uma inchação turva na maioria das células parenquimatosas. Quatro dos seis animais tratados com altas doses de óleo apresentaram uma difusa vacuolização das

(*) Deve-se lembrar que o óleo de cajú forma complexos com a formalina, fato este muito usado na fabricação de substâncias plásticas na base do óleo

células parenquimatosas e uma deposição do óleo nas células de Kupfer e nos histiocitos do campo peri-portal. A maior acumulação do óleo notou-se nos epitelios dos grandes dutos biliares, que estavam infartados com gotículas oleosas. O grau de vacuolização não mostrou relação nítida com a quantidade de óleo aplicada por kg de peso corporal (Tabela I). Assim, um cão tratado com 2 x 100 cm³ de u'a emulsão de óleo a 20% (cão No. 15) apresentou um fígado praticamente normal, na autopsia 1 semana após a última ingestão do óleo; outro animal (No. 28) tratado com 15 cm³ de óleo puro e sacrificado 16 dias após, revelou um alto grau de vacuolização das células hepáticas.

Rim: Cães não tratados:

Cão I — nefrite intersticial

Cão II — sem particularidades

Cães tratados: Em todos os casos verificou-se uma acumulação intensa de óleos nos túbulos contortos e mais fracamente na alça de Henle. No interior dos capilares do glomerulo só raramente foram encontrados maiores quantidades de gotículas de óleo. Fora disso, as células parenquimatosas não apresentaram nenhum sinal de lesão.

O número dos exames histológicos não é suficiente para se chegar a uma conclusão definitiva, tanto mais que os cães não tratados mostraram certas alterações das células hepáticas que não podem ser consideradas normais.

Nos cães tratados impressiona que a maioria mostre uma vacuolização mais ou menos generalizada das células hepáticas, indicando um certo comprometimento do parenquima; seriam necessárias observações em maior número de animais e com um tempo mais dilatado de observação para se poder apurar estes achados.

Quanto à acumulação (eliminação?) do óleo nos grandes dutos biliares e no rim, impressiona o fato que mesmo nos cães sacrificados 7-16 dias depois da última medicação o óleo aparentemente ainda não havia sido inteiramente eliminado.

Como mostra a Tabela II, praticamente não existe diferença nos resultados dos testes funcionais de fígado obtidos dos cães normais e dos cães tratados. A bilirubina direta foi negativa em todos os casos; a dosagem da bilirubina em mg deu em todos os casos valores dentro do limite normal, variando de 0.204 a 0.398 (nos cães tratados) e de 0.278 a 0.305 (nos cães normais). A flocculação da cefalina foi positiva em todos os animais, a reação de Takata + - ++ nos cães normais e nos tratados variando de 0 — ++.



DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Pelas experiências descritas ficou provado que o óleo de cajú aplicado por via oral em cães, infestados espontaneamente com certas espécies de vermes, possui uma nítida ação vermícida sobre *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e, em grau mais ou menos elevado sobre *Trichuris vulpis*. As doses que provocam tal efeito estão a grosso modo compreendidas entre 2.5 a 8 cm³ em cães de peso entre 2½ a 16 kg. A atividade vermícida se manifesta em primeiro lugar, de acordo com as nossas observações, sobre o *Ancylostoma caninum*, cujo número é reduzido com uma única aplicação da droga a cerca de 95%, em média. Conquanto as observações em cães infestados com *Toxocara canis* sejam relativamente pequenas para permitir uma apreciação detalhada, — a atividade do óleo de cajú sobre esta espécie de helminto parece ser excelente. Temos a impressão de que seja mesmo mais sensível que o próprio *Ancylostoma caninum*, pois que com uma única dose e nos três casos neste trabalho relatados a eliminação foi total. (Quadro No. III) Em relação ao *Trichuris vulpis* os resultados obtidos não são tão conclusivos. Posto que só na metade dos animais tratados a redução tenha sido de 90-100%, nos outros, esta variou entre 25-60%. Também os cães infestados com *Dipylidium*, que depois de medicados ainda revelaram a presença de exemplares vivos no intestino, não permitem nenhuma conclusão certa sobre o poder vermícida do óleo de cajú sobre esta espécie de verme.

Quanto à atividade *in vivo* do ácido anacárdico, substância altamente ativa *in vitro*, obtivemos em 1 caso (11 kg de peso) tratado com 7 cm³ da substância a eliminação total dos *Ancylostoma* e num outro (8 kg de peso) que recebeu 6 cm³ a redução foi de 78,9%, valor este abaixo da média dos cães tratados com o óleo puro. Por outro lado a combinação do ácido anacárdico com a fração anácida — por si só sem efeito vermícida — eleva a atividade do ácido anacárdico, dando uma redução de 90-100%. Parece assim que a atividade do ácido anacárdico é reforçada em presença da fração anácida, composta na maior parte de cardol e anacardol; experiências em maior escala teriam que decidir, provavelmente, em favor desta hipótese, que está em certo paralelo com as observações de Roger (9) que verificou uma ativação do poder vermícida do hexilresorcinol em presença de detergentes.

O anacardol, igual à fração anácida, parece destituído de ação vermícida na dose empregada.

O óleo de cajú não exerceu ação tóxica local ou geral que se manifestasse clinicamente nos animais tratados. Entre 26 animais tratados houve apenas 1 caso de morte num cão de 2½ kg de peso medicado com 2,5 cm³ de óleo, sem que pudéssemos relacionar, com certeza, este acidente ao tratamento, posto que outros cães tratados com doses maiores (cálculo por kg de peso) não revelaram quaisquer sintomas clínicos de intoxicação. Quanto a certas alterações histológicas no fígado dos cães medicados (vacuolização) não chegamos a uma apreciação definitiva porquanto também os fígados dos animais não tratados mostraram ligeiras modificações das células hepáticas. Um outro fato ao qual no início de nossas experiências não prestamos a devida atenção foi o tóxico usado para o sacrifício dos animais, o cloroformio, o qual poderia também influenciar no aspecto histológico do fígado.

Depois de termos verificado a ausência de sintomas tóxicos para os cães, experimentamos em nós mesmos o efeito de 2 cm³ do óleo de cajú puro, que ingerimos na parte da manhã, em jejum. Enquanto um de nós tenha tido cerca de 2 h depois da ingestão evacuações nitidamente diarreicas, o outro apresentou tão somente ligeira sensação de peso no estômago que persistiu por algumas horas; na urina eliminada 4 horas depois verificou-se a presença do óleo, que no frasco abandonado no ambiente, se separou em duas camadas, sendo que a superior formou na superfície uma película iridescente.

Depois destas experiências preliminares em nós mesmos, começamos as observações clínicas em pacientes portadores de ancilostomose (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*). Fora dos exames parasitológicos realizados 3-5 dias antes (contagens de ovos) do tratamento, todos os casos foram submetidos a rigorosos testes complementares, tais como testes funcionais de fígado (Takata, Henger, bilirubina), função renal (exame químico geral, uréa clearance, sedimento), bem como exame clínico e hematológico.

A quantidade de óleo aplicada em cápsulas gelatinosas variou de 2 a 8 cm³. Na maioria dos casos a ingestão da droga era seguida 2 h depois por evacuações diarreicas. Como sintomas subjetivos os pacientes assinalaram unicamente ligeira dor no epigastro direito, que desaparecia logo depois das primeiras evacuações.

Podemos adiantar que contamos até agora só com 2 casos humanos bem estudados e com os seguintes resultados: 1.º) apresentando 150 ovos de *Necator* por grama de fezes, não revelando, após 3 dias do tratamento a presença de



ovos. O segundo caso, apresentando cerca de 10.000 ovos por grama de fezes, igualmente foi negativo mesmo após 3 dias de observação. Este apresentou após 10 dias uma contagem de 400 ovos ou seja uma redução de 96%.

RESUMO

No presente trabalho os A. A. demonstram que o óleo de cajú — fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) — e derivados possuem nítida ação vermicida tanto *in vitro*, como *in vivo* (cães) sobre o *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e, em grau relativamente elevado, sobre o *Trichuris vulpis*. Nos 2 casos de cães infestados com *Dipylidium caninum* não obtiveram resultados positivos.

As doses empregadas variaram de 2,5 a 8 cm³. Posto que quantidades muito maiores tenham sido empregadas com o fim de estudos toxicológicos, nenhum sintoma de intoxicação foi observado.

A administração foi sempre pela via oral, por meio de cápsulas gelatinosas contendo 1 cm³ da substância ou com sonda gástrica.

Os melhores resultados foram obtidos com o óleo puro (sem nenhuma mistura), cuja percentagem de redução se elevou a 96,8% no caso de *Ancylostoma*, a 100% em relação ao *Toxocara* e de 77,3% sobre o *Trichuris*.

Foi notado um efeito purgativo em vários cães medicados quer pelo óleo puro, quer pelo ácido anacárdico.

Doses maciças usadas nos testes toxicológicos não provocaram sintomas clínicos ou lesões macroscópicas do canal intestinal e dos órgãos parenquimatosos. Nos cortes histológicos de fígado foi verificada uma forte acumulação de óleo nas células de Kupfer e nos epitélios dos grandes dutos biliares, evidenciando-se ao mesmo tempo, na maioria dos casos, uma difusa vacuolização das células hepáticas, — alterações pouco conclusivas —, tanto que também os animais não tratados revelaram sinais de ligeiro comprometimento celular hepático. Os rins evidenciaram forte acumulação de gotículas de óleo, particularmente nos túbulos contortos, na alça de Henle e, isoladamente, também nos glomerulos. Fóra disso as células renais apresentavam aspecto normal. Não foi encontrado nenhum sinal macro - ou microscópico indicando irritação local das mucosas gastro-intestinais.

Os testes funcionais de fígado deram resultados concordantes nos animais tratados e não tratados.

A clínica humana já foi iniciada e com resultados promissores.

ABSTRACT

Cashew oil, the nutshell liquid of the Brazilian tree *Anacardium occidentale* L., and its main constituent, anacardic acid, have a strong vermifugal activity *in vitro*, as has been shown recently by Eichbaum. The present experiments, which were performed on a total of 26 dogs, spontaneously infested with a variety of worms, revealed a strong anthelmintic activity of these substances also in living animals, without clinically apparent signs of local or general toxicity.

There could be noted too a marked purgative effect of cashew oil and anacardic acid.

The drugs were applied by gastric tube or in gelatine capsules, containing 1 g. of substance, each. The given dosis varied between 2.5-8g. according to the body weight of the treated animals.

Among the drugs tested (crude oil, sodium anacardate, anacardol, a mixture of cardol-anacardol) the crude oil showed the highest activity.

The best results were obtained in dogs infested with *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis*; the elimination of worms — controlled by autopsies — varied in these cases between 90-100% after the application of a single dose (4g. on the average).

The activity against *Trichuris vulpis* was less pronounced, but even here the reduction of worm eggs reached, in half of the treated animals, values between 90-100%; in the other half, the reduction value observed varied between 25-60%, with an average reduction value of approximately 75% for all animals treated.

Functional liver tests in animals treated with very high dosis (up to 15g) gave the same results as those obtained in the control animals: in both group — treated and non-treated dogs — the cephalin flocculation test was positive as well as the Takata reaction; the bilirubin blood level was normal in most cases.

There were no microscopical lesions of the gastric and intestinal mucosa or the parenchymatous organs. The histological examination revealed the elimination of the drug by the larger bile ducts and the renal tubuli; an accumulation of the oil (or sub-products) was also found in the Kupfer cells of the liver, which showed in most cases, a general vacuolisation of the parenchymatous cells. These findings have only a relative value, since also in



non-treated "normal" animals the structure of the liver cells indicated a slight degenerative process. The renal glomeruli and tubuli, heart, lung, gastric and intestinal mucosa showed a histologically normal structure.

Agradecimentos — É-nos grato deixar aqui consignados os nossos melhores agradecimentos a todos aqueles que tão desinteressadamente nos auxiliaram na realização deste trabalho. Tais foram o Prof. Dr. Moacyr Amorim, pelos valiosos conselhos nas interpretações histológicas; Dr. A. Hoge, pelos testes funcionais de fígado, à Srta. Ingrid Hofstetter e Da. Maria Battaglia, pela confecção de cortes histológicos, ao Prof. Dr. H. Hauptmann e à doutoranda H. Rothschild, pela preparação das substâncias puras.

BIBLIOGRAFIA

1. *Duchêne, E. A.* — Répertoire des plantes utiles. Jules Renouard, Paris, 1836.
2. *Dujardin-Beaumez et Égasse, E.* — Les plantes medicinales indigènes et exotiques. Octave Doin, Paris, 1889.
3. *Dorland, N.* — The American illustrated medical dictionary. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, 1938.
4. *Penna, M.* — Dicionário brasileiro de plantas medicinais. Livraria Kosmos, editora, 3.^a ed., pag. 27. Rio de Janeiro. 1946.
5. *Eichbaum, F. W.* — Biological properties of anacardic acid, cardol and derivatives. *Nature* (3988) :449. 1946.
6. *Eichbaum, F. W.* — Biological properties of anacardic acid (o-penta-decadienyl-salicylic acid) and related compounds, *Mem. Inst. Butantan*, 19:69. 1946.
7. *Eichbaum, F. W., Hauptmann, H. e Rothschild, H.* — Preparação e ação biológica do ácido anacardico e de alguns derivados, *Anais da Ass. Quim. do Brasil*, 4:83, 1945.
8. *Stoll, N. R.* — Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces, *Amer. Jour. Hyg.*, 3:39. 1923.
9. *Rogers, W. P.* — Studies on the anthelmintic activity of hexylresorcinol and tetrachlor-ethylene, *Parasitology*, 36:98, 1944.



ESTUDO QUANTITATIVO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO
ENTRE O ANTIVENENO CROTÁLICO E UMA FRAÇÃO
PURIFICADA DO VENENO DA CASCAVEL NEOTRÓPICA
(*CROTALUS T. TERRIFICUS*) (*)

POR OTTO G. BIER

(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em trabalho anterior (1), apresentamos alguns dados quantitativos referentes ao N precipitado de uma quantidade constante de antiveneno crotálico em presença de quantidades crescentes do veneno correspondente. Verificou-se, então, que o decurso da reação é muito semelhante ao que se observa no sistema toxina-antitoxina diftérica, não tendo sido possível, entretanto, calcular a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno, a qual só pode ser avaliada indiretamente, admitindo-se a hipótese de que a fração do veneno precipitado correspondia á *crotalina* de Slotta *et al* (2), existente na proporção de 60% do veneno bruto.

Proseguindo nesta ordem de pesquisas, são referidos no presente trabalho os resultados das análises dos precipitados formados pelo antiveneno crotálico mediante a adição de quantidades crescentes de uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *C. terrificus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação do veneno. Para a purificação do veneno foi utilizado um processo baseado na precipitação em pH próximo do ponto isoeletrico (4.4 a 4.6), tal como o usado por Slotta & Fraenkel-Conrat (2) para o preparo da crotalina amorfa.

1 g. de veneno crotálico seco, antigo, do estoque do Instituto Butantan, foi dissolvido em 12 ml de sol. N/10 de HCl, do que resultou um soluto opalescente,

(*) Trabalho realizado no Dept. of Medicine & Biochemistry, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, com a ajuda de uma bolsa da "John Simon Guggenheim Memorial Foundation".

Recebido para publicação em 6 de dezembro de 1946.

ao qual se adicionaram 84 ml de H₂O destilada. Após uma noite a 0°C separou-se por centrifugação o precipitado existente e ao sobrenadante, cujo pH era 4.37, adicionou-se suficiente sol. N/1 de NaOH para elevar o pH a 4.6 (electródios externos imersos na solução). Adicionando-se 2 ml de alcool etílico e resfriando-se o soluto por imersão do frasco em água com gelo picado, desenvolveu-se imediatamente abundante precipitação. Depois de uma noite na geladeira, foi o precipitado separado por centrifugação em câmara fria e dissolvido em 10 ml de sol. 4% de NaCl, com a adição de gotas de sol. N/10 de NaOH, de maneira a assegurar um pH final próximo de 7.0.

A seguir foi o soluto transferido para um tubo de celofane e dialisado contra 500 ml de sol. 4% de NaCl tamponada com fosfatos a pH 7.4, com mudança diária do líquido de diálise, durante 4 dias, a 0°C. O soluto dialisado, após centrifugação enérgica em centrífugo de ângulo, deixou separar apenas um pequeno residuo insolúvel e um líquido sobrenadante perfeitamente límpido. Teor de N (micro-Kjeldahl): 1.44 mg por ml, ou seja, em proteína, 0.9%.

Verificação da pureza da fração isolada. O soluto acima foi analisado electroforéticamente em aparelho tipo Tiselius (3): apenas 1 componente foi observado.

Determinação da toxicidade. Feita mediante a injeção intraperitoneal em camundongos de 15-20 g. Nestas condições, a nossa solução de "crotoxina" (*) mostrou uma D.L.M. compreendida entre 0.11 e 0.055 de gama, ao passo que uma solução de veneno bruto se mostrou capaz de matar os camundongos em dose próxima de 0.25 de gama. Convém salientar que tais determinações prescindem de rigor pois são baseadas em pequeno número de animais e é pertinente lembrar que os valores acima registrados não podem ser comparados aos observados por Slotta & Szyszka (4), que utilizaram a via subcutânea.

Análise dos precipitados específicos. Quantidades crescentes de "crotoxina", representadas por 1 ml de diferentes diluições foram adicionadas a uma série de tubos contendo 1 ml de soro anti-crotálico (antiveneno do Instituto Butantan, cavalo n.º 213; 10 ml — 9 mg de veneno). Após 24 horas ou mais de permanência na geladeira, foram os precipitados separados por centrifugação em centrífuga refrigerada e lavados três vezes com porções de 3 ml de água fisiológica gelada.

(*) Por economia de expressão a palavra "crotoxina" será usada para denotar a fração purificada do veneno crotálico referida no presente trabalho. A identidade entre esta fração e a proteína obtida em estado cristalino por Slotta *et al.* requer, todavia, verificações adicionais.

As determinações de N foram feitas por uma modificação do método micro-Kjeldahl, recebendo-se a amônea acarretada por uma corrente de vapor d'água em solução de ácido bórico com indicador e titulando-se diretamente com HCl N/70. Análises em duplicata, tolerando-se apenas diferenças de 10 a 15 gamas.

RESULTADOS

Pode-se ver na Tabela I que quantidades de "crotoxina" compreendidas entre 450 e 644 gamas deram valores de N precipitado praticamente iguais, isto é, com diferenças compreendidas dentro dos limites do erro experimental. Os tubos correspondentes a 700, 800 e 900 gamas de "crotoxina" não deram valores satisfatórios para as análises em duplicata, o que se deve, sem dúvida, ao fato que, na zona de inibição por excesso de antígeno, a precipitação não é completa após uma noite de permanência na geladeira.

Com efeito, os sobrenadantes dos tubos correspondentes a 800 e 900 gamas eram distintamente opalescentes, e assim permaneceram mesmo quando se prolongou a 2 horas o tempo de centrifugação.

TABELA I

Floculação quantitativa do soro crostólico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após uma noite a 0°C.

"Crotoxina"		N/70 HCl		N precipitado por 1 ml de soro	N-antiveneno	Ratio N-antiveneno N-veneno
proteína	N					
gamas		ml		gamas	gamas	
450	72	4.94	4.90	984	912	12.6
500	80	5.08	5.14	1022	942	11.8
550	88	5.06	5.00	1006	918	10.4
600	96	4.96	4.92	988	892	9.3
700	112	4.75	4.37			
800	128	2.93	2.04			
900	144	.16	.40			

Uma segunda série de determinações foi, por isso, efetuada deixando-se completar a precipitação durante oito dias na geladeira (tabela II).



TABELA II

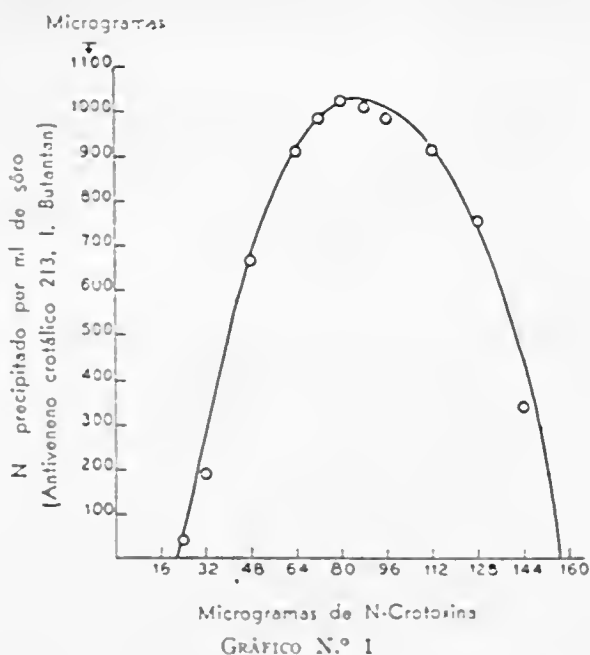
Floculação quantitativa do soro crotálico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após 8 dias a 0°C.

"Crotoxina"		N/70 HCl		N precipitado por 1 ml de soro	N-antiveneno	Ratio N-antiveneno N-veneno
proteína	N					
gamas		ml		gamas	gamas	
50	8	0	0	0		
100	16	0	0	0		
150	24	.02	.02	40		
200	32	.11	.08	190		
300	48	3.29	3.31	663		
400	64	4.55	4.56	911	847	13.2
600	96	4.90	4.84	974	878	9.15
700	112	4.56	4.60	916	804	7.18
800	128	3.74	3.82	756		
900	144	1.73	1.66	339		

DISCUSSÃO

Os resultados combinados das experiências referidas nas tabelas I e II vêm resumidos no gráfico N.º 1. A precipitação prolongada na geladeira, durante 8 dias permitiu estabilizar os valores de N-precipitado na zona de inibição por excesso de antígeno (700, 800 e 900 gamas de "crotoxina") e, presumivelmente, também na zona de inibição por excesso de anticorpo (150, 200 e 300 gamas). Os valores correspondentes aos pontos próximos da zona de equivalência (400 e 600 gamas) formam uma série coerente nas duas séries de experiências e, no que concerne a um ponto comum determinado em ambas as séries (600 gamas), os valores obtidos para o N precipitado (988 e 974 gamas) estão compreendidos dentro dos limites de erro do método analítico empregado.

Há bom fundamento para afirmar-se que a zona de equivalência para o antiveneno estudado é muito próxima de 500 gamas de "crotoxina" per 1 ml de soro. Com efeito, o máximo de N precipitado se observou com 500 e 550 gamas de "crotoxina" e, por outro lado, determinações feitas usando-se uma quantidade constante de veneno (1 ml de uma solução contendo 45 gamas de "crotoxina") em presença de quantidades variáveis de antiveneno, mostraram um ótimo de floculação, segundo Ramon, após um tempo de incubação de 20



minutos à temperatura de 56°C, nos tubos correspondentes a 0,08 e 0,1 de soro. Tomando-se como valor médio, 0,09 ml de soro para 45 gamas de "crotoxina", cada ml de soro corresponderá a $\frac{45}{0,09} = 500$ gamas de "crotoxina".

Verificações de toxicidade nos sobrenadantes foram feitas mediante a injeção de 0,5 ml no peritônio de camundongos de 15-20 g; ausência de "crotoxina" livre nos sobrenadantes correspondentes a 150, 400 e 600 gamas; morte imediata do animal injetado com o sobrenadante do tubo contendo 900 gamas de "crotoxina".

Mesmo em se admitindo, porém, uma zona de equivalência mais extensa, entre 450 e 600 gamas, as ratios observadas variam apenas entre 12,6 e 9,3 (ou 9,15) e confirmam, pois, as observações feitas anteriormente com soluções de veneno bruto (1).

No presente trabalho tais ratios foram calculadas diretamente dos valores de N dosados numa solução de "crotoxina" electroforéticamente homogênea.

Não foi possível, a exemplo do que fizeram Pappenheimer & Robinson (5) com a toxina diftérica, determinar por via imunológica a homogeneidade do antígeno utilizado, a partir dos valores de N precipitados de uma quantidade

constante de antitoxina. Nas experiências de Pappenheimer & Robinson foi possível observar que uma variação de 100 gamas na quantidade de N-toxina, dentro da zona de equivalência, é acompanhada de uma variação total de 100 gamas no teor de N precipitado, a qual se opera proporcionalmente á variação do antígeno. Tal não se logrou observar, entretanto, no sistema por nós estudado, em virtude de ser muito estreita a zona de equivalência (entre 450 e 550 gamas "crotoxina", ou sejam, 72-88 gamas de N-crotoxina). Dentro de tais limites, a variação observada no N precipitado foi de 38 gamas entre 72-80 e de 16, entre 80-88 gamas de N-crotoxina, de sorte que qualquer avaliação no sentido daquela feita por Pappenheimer & Robinson para o sistema toxina-antitoxina diftérica ficou obviamente prejudicada.

O essencial das verificações apresentadas no presente trabalho é a confirmação, por via direta, da ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno sugerida em trabalho anterior (*).

Atribuindo-se ao composto formado na zona de equivalência a composição molecular GA₂; ao antiveneno, o pêsso molecular de 180.000 (o mesmo da antitoxina diftérica, não digerida, de cavalo) e á "crotoxina", o pêsso molecular de 30.500 (**), a ratio esperada é de $(2 \times 180.000) : 30.500 = 11,8$, que foi exatamente aquela observada no ponto de equivalência.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Usando uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *Crotalus t. terrificus*, foi possível determinar diretamente a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno crotálico.

2. Como se podia esperar, em virtude do pêsso molecular da "crotoxina" (30-33000), tal ratio é próxima de 10, isto é, dupla daquela observada para a toxina diftérica (pêsso molecular, 70.000).

(*) Uma revisão dos cálculos apresentados em (1) leva a uma pequena correção, em virtude de se ter atribuído o valor de 0.78 mg (e não de 0.88 mg) á quantidade de veneno cru contida per ml do soluto de veneno empregado naquelas experiências. Tal correção modifica apenas ligeiramente os valores obtidos para a ratio na zona de equivalência, os quais persistem muito próximos de 10, sem alterar, portanto, as conclusões apresentadas.

(**) Segundo as verificações de Gralén & Svedeborg (6).

ABSTRACT

1. By using a purified, electrophoretically homogeneous fraction from the venom of *Crotalus t. terrificus*, it has been possible to make a direct evaluation of the combining ratios between venom and antivenom.

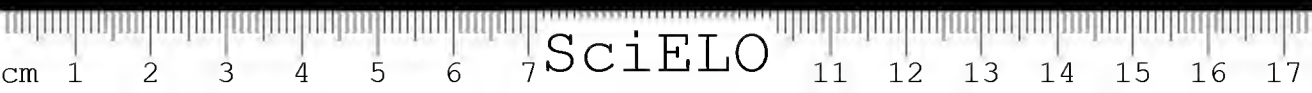
2. As expected from the molecular weight of crotoxin (30-33000) the ratio at the equivalence zone is near 10, i.e., double of that observed for diphtheria toxin (molecular weight 70.000) with equine antitoxin.

Desejamos expressar os nossos agradecimentos aos Drs. M. Heidelberger e M. Mayer, do "Dept. of Medicine, College of Physicians & Surgeons, Columbia University", pelas valiosas sugestões apresentadas e pelo constante interesse que demonstraram durante a realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. Bier, O. G. — Estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o anti-veneno crotálico. *Memórias do Instituto Butantan*, 18:27-32, 1945.
2. Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L. — Estudos químicos sobre os venenos oídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. *Memórias do Instituto Butantan*, 12:505-512, 1939.
3. Bier, O. G. & Moore, D. — Resultados não publicados.
4. Slotta, C. H. & Szyska, G. — Estudos químicos sobre venenos ophídicos. 1. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Memórias do Instituto Butantan*, 11:109-119, 1937.
5. Pappenheimer, A. M. Jr. & Robinson, E. S. — Quantitative study of Ramon diphtheria flocculation reaction. *J. Immunol.*, 32:291-300, 1937.
6. Gralén, N. & Sædeberg, T. — The molecular weight of crotoxin. *Biochem. J.*, 32:1375-1377, 1938.





PESQUISAS CARIOMETRICAS NO CICLO ESTRAL E GRAVIDICO (*)

Pesquisas de citologia quantitativa: II

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

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

INTRODUÇÃO

a) *O problema do crescimento interfásico do núcleo*

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

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

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

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

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

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

Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1946.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIAL E METODOS

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



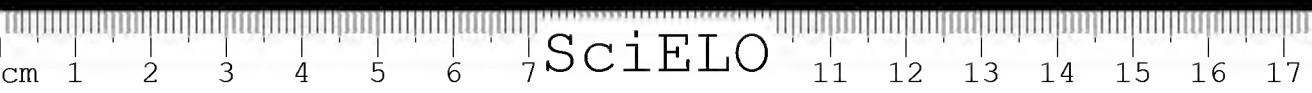
O material foi sempre fixado em líquido Dubosq-Brasil e incluído em parafina. Foram realizados cortes com 10 micras, coradas com hematoxilina-eosina e hematoxilina de Heidenhain. Precisamos dar alguns breves esclarecimentos no que se refere a técnica cariométrica, enviando o leitor para maiores pormenores,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

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

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

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

Este problema é dos mais importante nas pesquisas deste tipo, pois pode-se medir o volume de núcleos de forma mais ou menos elipsoide sómente se temos absoluta certeza da sua orientação ($v = a^2b: 1.91$), com o eixo maior "b" paralelo ao plano do desenho. Si esta condição não se verificar, é preferível, entre certos limites bastantes restritos, considerar o núcleo como esférico tendo o diâmetro, igual a média aritmetica dos dois diâmetros (maior e menor) revelados no desenho. Todavia, esta condição nunca se verifica para as fibras musculares cuja forma é sempre elipsoide muito pronunciada. No endometriô, pelo contrário, a diferença não é grande, e a medida como esferas pode ser realizada. Porém, temos que frizar que mesmo assim é preferível escolher zonas de tecido nas quais a orientação seja controlável, porque as medidas calculadas como elipsoides dão maior garantia e revelam as vezes valores modais que nas medidas como esferas passam despercebidas.



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

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

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

L = é o limite inferior da classe modal.

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

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

i = é o intervalo de classe.

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

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



RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) *Esclarecimentos gerais:*

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

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

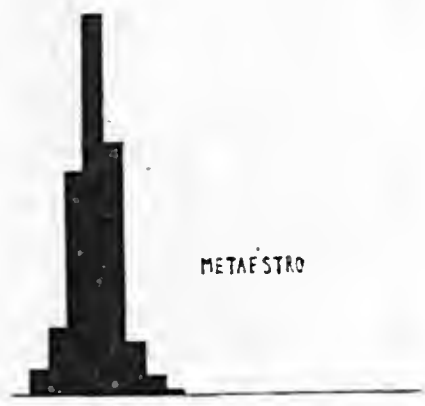
As tabelas reúnem as indicações de cada tecido (endométrio glandular, superficial e miométrio) durante o ciclo estral e prenhez. Dentro de cada tabela, os indivíduos estão agrupados conforme as diferentes fases do ciclo estral, gravidez, castração etc. Em cada tabela foi também indicado o index mitótico.

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

b) *Núcleos das glândulas:*

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

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



25 45 65 85 105 125 145 165 185 205 225

25 45 65 85 105 125 145 165 185 205 225

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

S

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

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

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

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

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

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

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

TABELA II
PRENHEZ
Endométrio glandular

Parte do útero	N. da figura	Dias de gravidez	Valor modal				VOLUME NUCLEAR												N. de linfócitos	N. total de núcleos	Média do índice mitótico										
			I	II	III	IV	350	450	550	650	750	850	950	1050	1150	1250	1350	1450				1550	1650	1750	1850	1950	2050	2150	2250	2350	
Com feto	9	7																											2	392	—
	11	13-14	686	1025	1439		0,5	1,5	10,5	9,5	9,5	25,5	31,5	9,0	6,0	27,5	33,0	18,0	2,5									2	371	—	
	13	20-21		1430	2002							1,6	3,6	20,0	31,3	53,6	83,6	23,3	9,3	5,0	3,6	2,6	5,0	1				3	741	1,9	
Sem feto	10	7																													
	12	13-14	686	978	1427		1,0	2,0	16,5	13,0	0,5	8,0	14,0	13,5	17,0	37,0	50,0	22,0	9,0									2	341	—	
	14	20-21		1426	1980							1,6	2,6	18,6	35,3	61,6	71,6	23,3	9,6	3,3	1,0	5,0	4,0	0,6				3	725	1,7	



FIG. 9

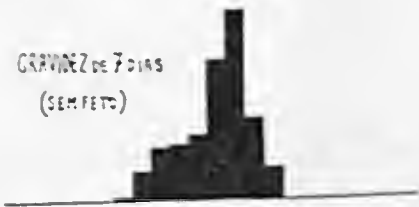


FIG. 10

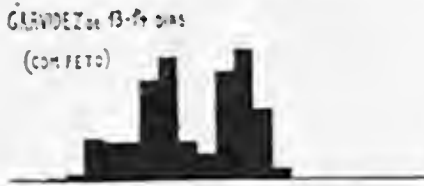


FIG. 11

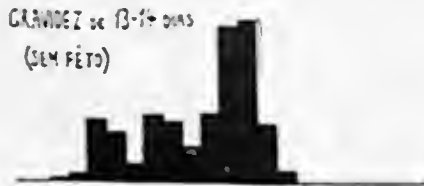


FIG. 12



FIG. 13

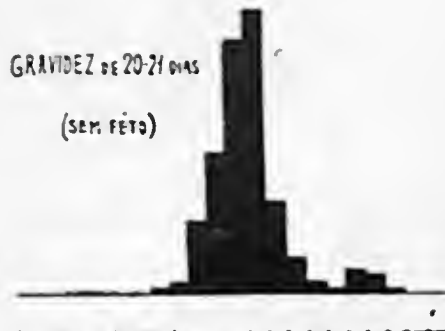


FIG. 14

25 35 45 55 65 75 85 95 105 115 125 135 145 155 165 175 185 195 205 215 225

25 35 45 55 65 75 85 95 105 115 125 135 145 155 165 175 185 195 205 215 225

FIG. 9-14
Frequências dos volumes nucleares nas células glandulares uterinas.

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

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

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

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

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

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

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

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

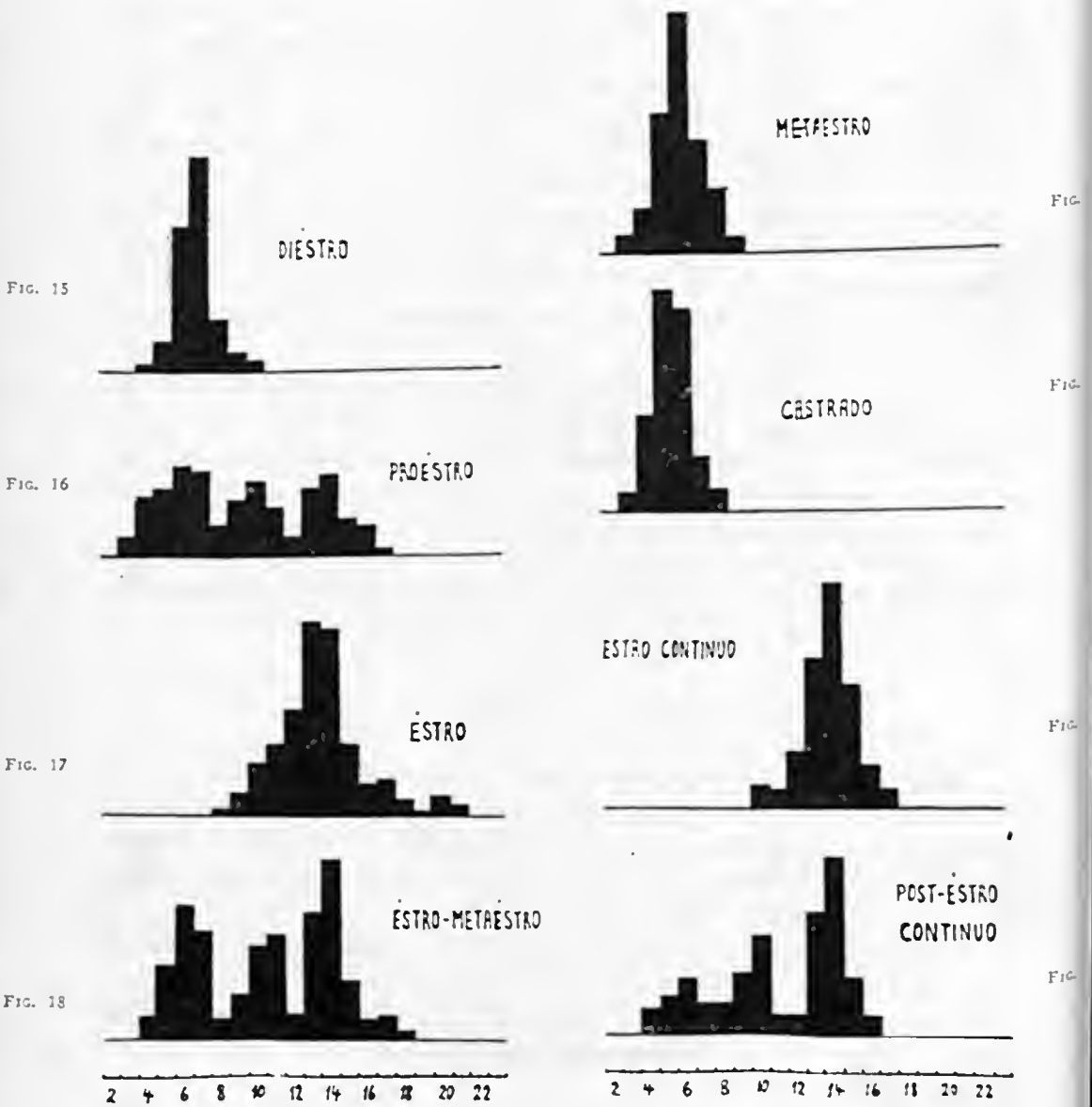
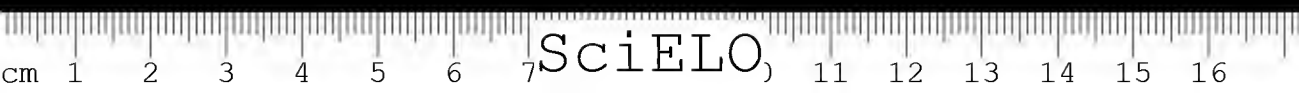


FIG. 15-22
Frequências dos volumes nucleares nas células do endométrio superficial.



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

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

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

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

c) Núcleos do endométrio superficial.

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

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

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

TABELA IV
PRENIEZ
Endométrio superficial

Parte do útero	N. da figura	Dia de gravidez	Valor modal				VOLUME NUCLEAR																N. de Núcleos	Índice Médio	Infiltração leucocitária							
			I	II	III	IV	350	450	550	650	750	850	950	1050	1150	1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850				1950	2050	2150	2250	2350		
Com feto	23	7		1061	1432																								197	—	—	
	25	13		637	1050	1431	1933	2	3	9	23	12	10	4	10	10	19	10	13	31	40	14	10	2	2	6	1		217	4,3	+	
	27	20				1141	1937										5	12	30	74	24	24	24	13	5	10	3		200	—	+	
Sem feto	24	7			1437																									172	—	—
	26	13		654	1037	1430	1900		2	5	15	6	8	6	10	25	6	14	28	35	12	7	5	1	3	2			182	3,1	++	
	28	20				1443	1966										2	10	26	62	60	13	8	1	1	5	2		149	1,7	+	

GRAVIDEZ DE 7 DIAS
(COM FÊTO)

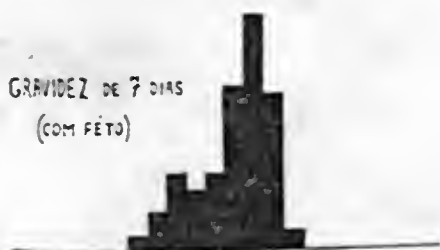


FIG. 23

GRAVIDEZ DE 7 DIAS
(SEM FÊTO)

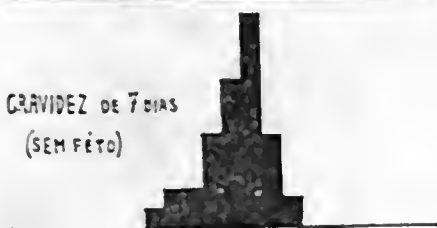


FIG. 24

GRAVIDEZ DE 13-14 DIAS
(COM FÊTO)

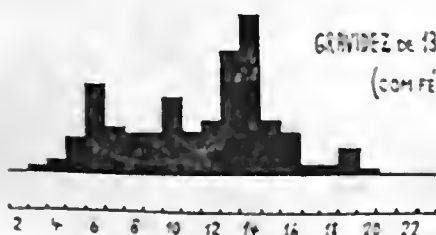


FIG. 25

GRAVIDEZ DE 13-14 DIAS
(COM FÊTO)

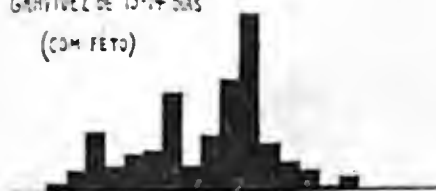


FIG. 26

GRAVIDEZ DE 20-21 DIAS
(COM FÊTO)



FIG. 27

GRAVIDEZ DE 20-21 DIAS
(SEM FÊTO)

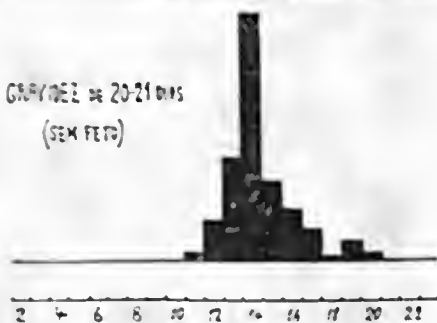


FIG. 28

FIG. 24-28

Frequências dos volumes nucleares nas células do endométrio superficial

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

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

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

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

d) Núcleos das células musculares do miométrio.

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

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

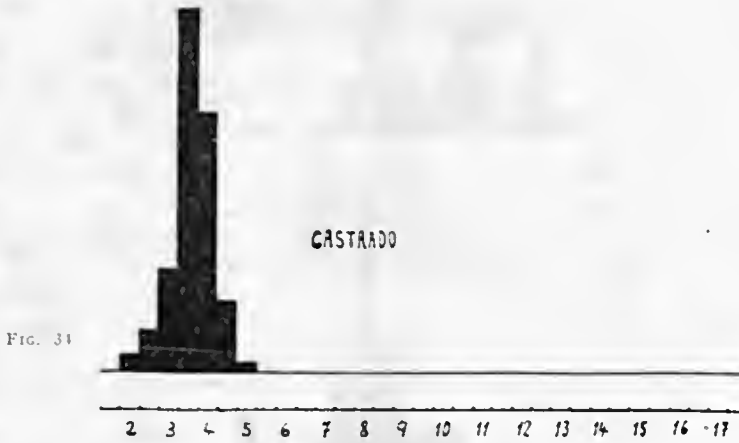


FIG. 32-34
 Frequências dos volumes nucleares do miométrio..

Na fase de éstro (Fig. 31) o volume nitidamente predominante é o da moda III, isto é, duplo volume do diestro (860). Existe ainda uma moda II ao valor 1.5 (626) vezes básico, mas de uma frequência inferior àquela do estádio precedente. Embora extremamente raras existem nesta fase algumas mitoses.

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

No metaestro (Fig. 33) somente encontram-se estes valores pequenos exatamente como no diestro e desaparecem totalmente os núcleos médios e grandes.

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

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

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

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

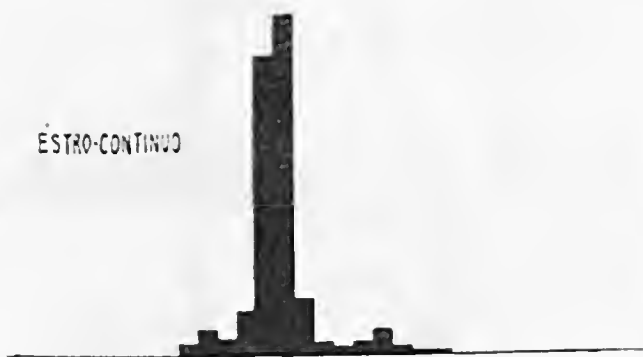
Nos indivíduos castrados (Fig. 34), as fibras musculares têm núcleos de tamanho pequeno igual àquele do diestro e metaestro. Neste ponto também o miométrio se comporta exatamente como o endométrio. Falta totalmente qualquer atividade multiplicativa, com ausência de formas médias e grandes. No castrado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

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



ÉSTRO-CONTINUO

FIG. 35



POST-ESTRO CONTINUO

FIG. 36



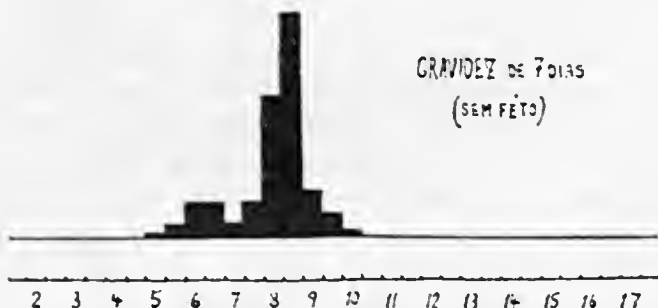
GRAVIDEZ DE 7 DIAS (COM FÊTO)

FIG. 37



GRAVIDEZ DE 7 DIAS (SEM FÊTO)

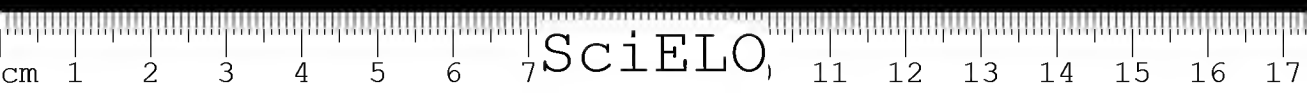
FIG. 38



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

FIG. 35-38

Frequências dos volumes nucleares do miométrio..



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

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

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

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

d) *O volume da profase.*

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

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

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



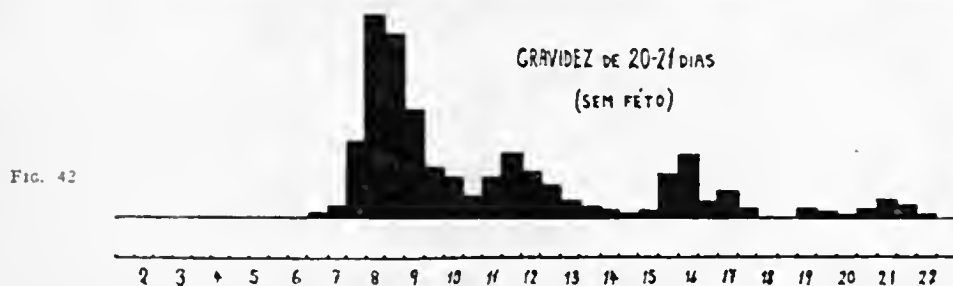
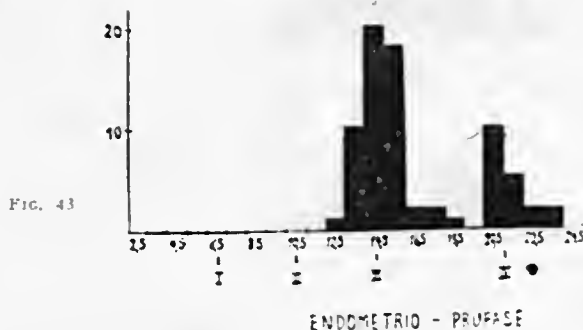


FIG. 39-42
Frequências dos volumes nucleares do miometrio..

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

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

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



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

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

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

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

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

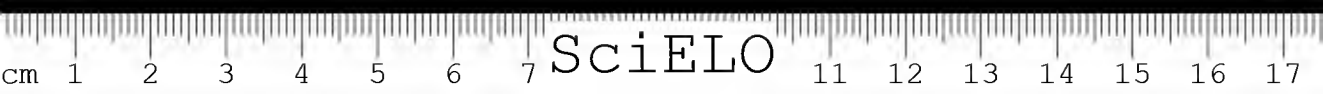


TABELA VII
 ENDOMÉTRIO
 (valores modais)

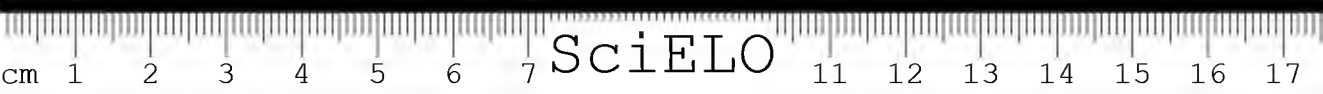
		I	II	III	IV
Diestro	End. superf.	664			
	End. glandular	726			
Proestro	End. glandular	738	1036	1427	2017
	End. superf.	656	1046	1435	
Estro	End. glandular		981	1423	2033
	End. superf.			1364	2075
Éstro-metaestro	End. glandular	665	1056	1419	
	End. superf.	659	1119	1432	
Metaestro	End. glandular	653			
	End. superf.	644			
Castrado	End. glandular	683			
	End. superf.	568			
Estro continuo	End. glandular			1420	1971
	End. superf.			1445	
Post-estro continuo	End. glandular		1039	1429	2000
	End. superf.	644	1023	1431	
Gravidez 7 dias e com feto	End. glandular		1061	1435	
	End. superf.			1432	
Gravidez 7 dias e sem feto	End. glandular			1437	
	End. superf.			1437	
Gravidez 13 dias e com feto	End. glandular	686	1026	1439	
	End. superf.	657	1050	1431	1933
Gravidez 13 dias e sem feto	End. glandular	686	978	1427	
	End. superf.	654	1037	1430	1990
Gravidez 21 dias e com feto	End. glandular			1430	2002
	End. superf.			1444	1937
Gravidez 21 dias e sem feto	End. glandular			1426	1980
	End. superf.			1443	1966
Média dos valores modais		665,5	1037,6	1428	1983
Profases				1460	2100

TABELA VIII
MIOMÉTRIO
(valores modais)

	I	II	III	IV	V	VI
Diéstro	424					
Proéstro	432	626	863	1168		
Éstro		637	872	1168		
Éstro-metaéstro	388	670	867	1130		
Metaéstro	423					
Castrado	387					
Éstro continuo		678	857	1120		
Post-éstro continuo	388	636	868	1128		
Gravidez 7 dias c/ feto		664	869			
Gravidez 7 dias s/ feto		660	862			
Gravidez 13 dias c/ feto	462	665	867			
Gravidez 13 dias s/ feto	453	628	870			
Gravidez 21 dias c/ feto			863	1182	1572	2245
Gravidez 21 dias s/ feto			835	1176	1612	2131
Médias das modais	420	651.5	863	1152	1592	2183

TABELA IX
ENDOMÉTRIO
Frequência dos volumes das Profasts

1250	1350	1450	1550	1650	1750	1850	1950	2050	2150	2250	2350
1	10	20	18	2	2	1	—	10	5	2	—2



ENDOMETRIO

○ SUPERFICIE
△ GLANDULAS

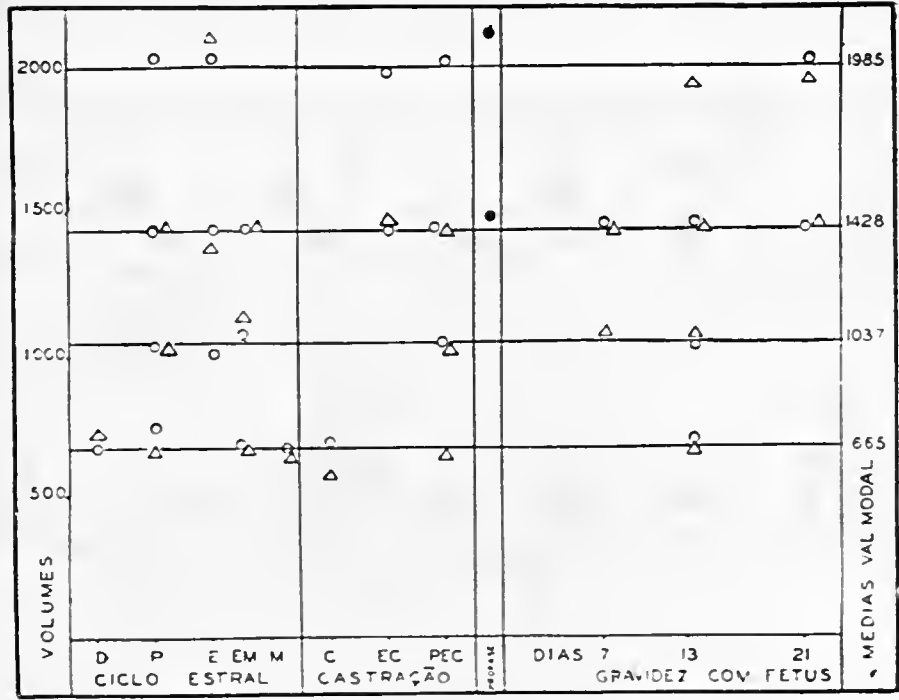


FIG. 44

MIOMETRIO

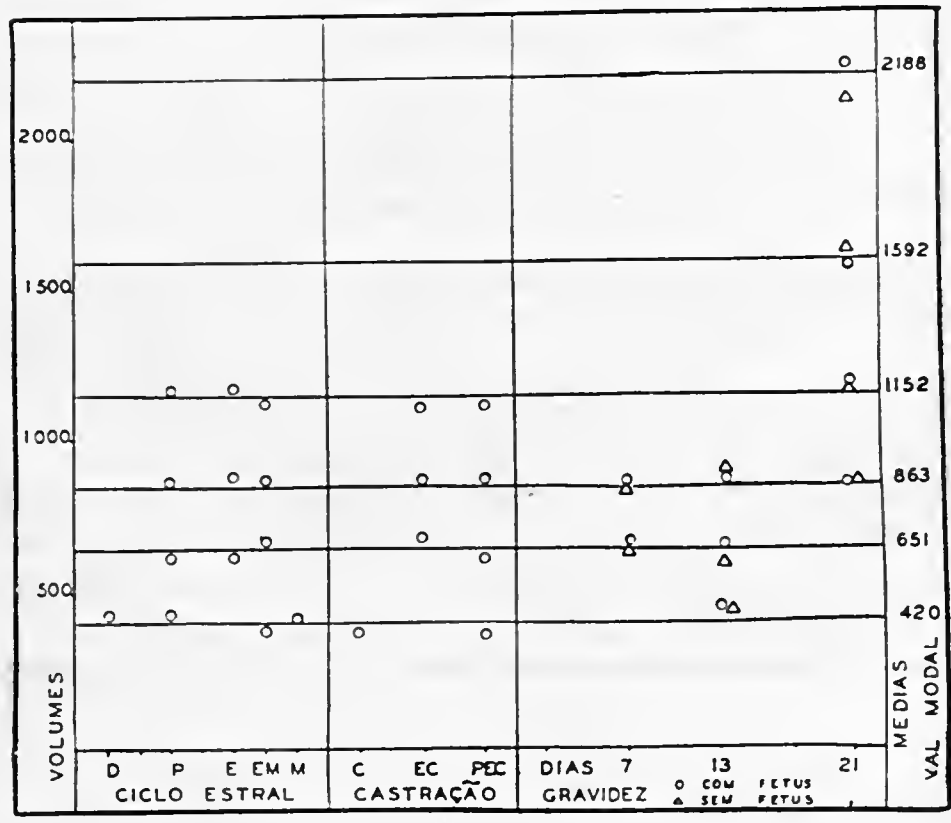
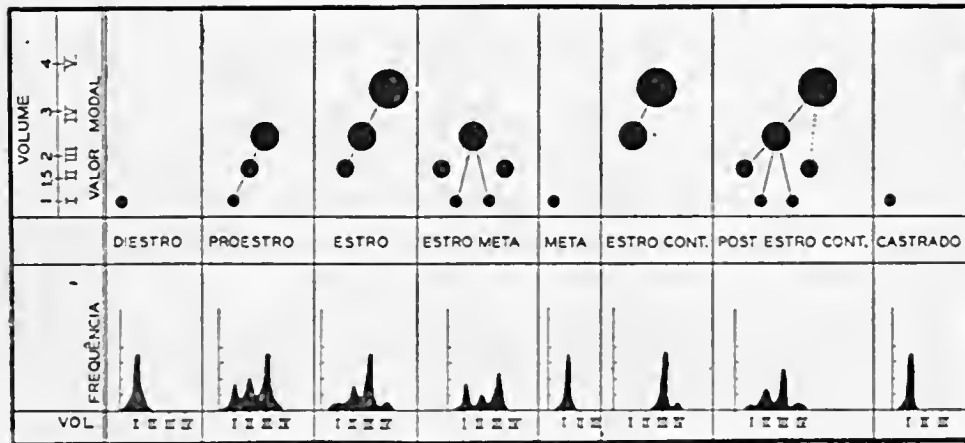


FIG. 45



O VOLUME NUCLEAR NAS FASES FISIOLÓGICAS DO ÚTERO

FIG. 46

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

4) CONCLUSÕES

a) Conclusões citológicas.

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

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

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

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

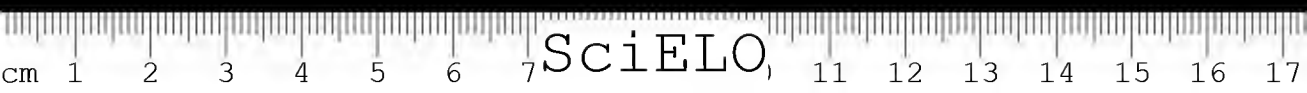
A duração da interfase é geralmente menor do intervalo diéstro-éstro, sendo portanto provável que no proéstro se verifiquem para cada célula, mais do que um ciclo interfásico.

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

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

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

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



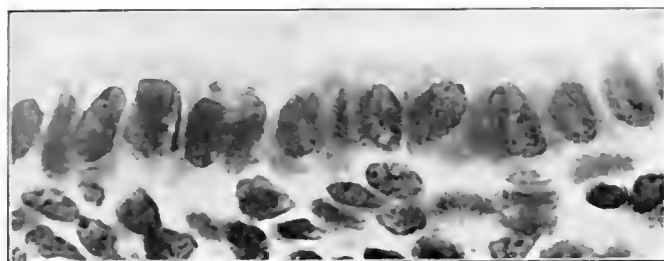


FIG. 47
Epitelio superficial do utero em diestro. x 1161.

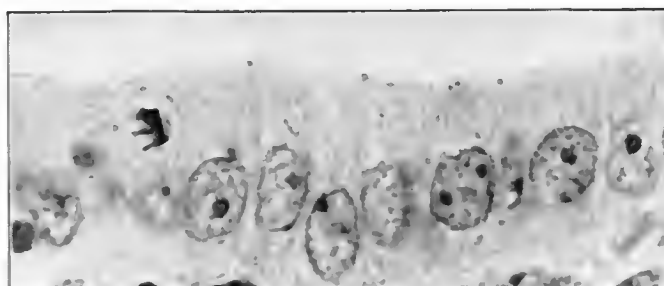


FIG. 48
Epitelio superficial do utero em estro. x 1161.

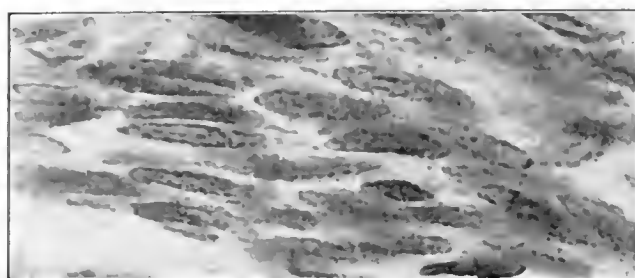


FIG. 49
Fibras musculares do miometrio em diestro. x 1161.

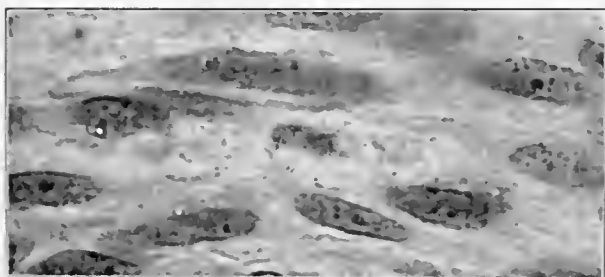


FIG. 50
Fibras musculares do miometrio em estro. x 1161.

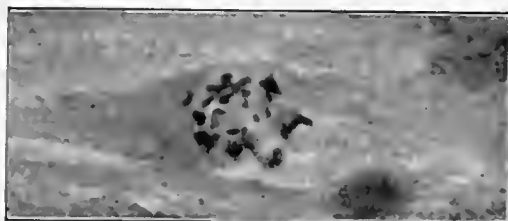


FIG. 51
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos
21 dias de prenhez. x 1161.

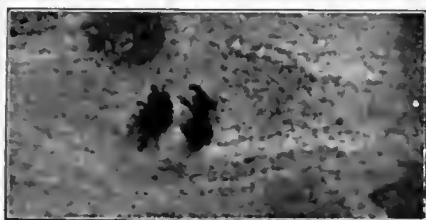


FIG. 52
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos
21 dias de prenhez. x 1161.

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

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

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

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



b) *Conclusões fisiológicas.*

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

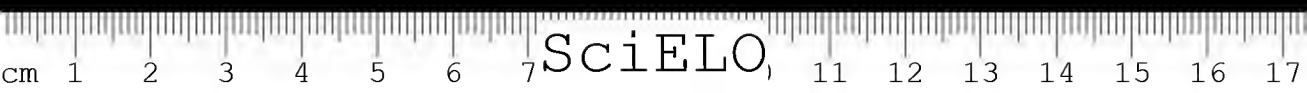
E primeiro lugar, podemos indicar que o ciclo fisiológico do éstro e da gravidez é acompanhado por manifestações citológicas em todos os tecidos uterinos constituídas por ciclos de multiplicação nuclear. A "hipertrofia" descrita por vários autores, ao menos no que se refere ao núcleo celular deve considerar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

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

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

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

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



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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

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

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



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

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

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

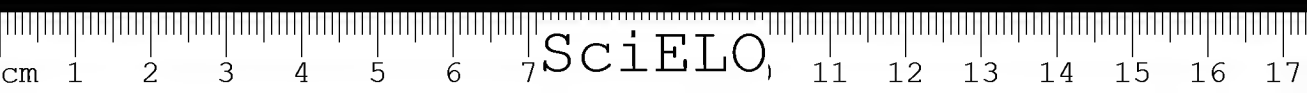
ABSTRACT

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

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

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

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



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

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

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

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

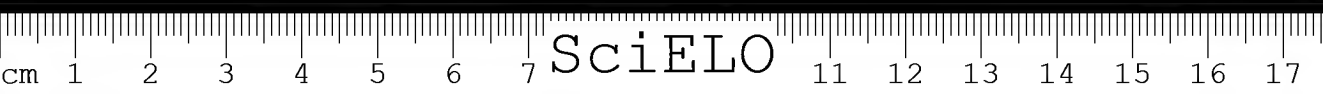
The synchronous transformation of the frequency curves and the total disappearance of the basic form at a stage where all the nuclei have reached the double volume does indicate that the variation consists in a real interphasic growth and not, as some authors believe, the existence of different cell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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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



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



AÇÃO DERMATOTÓXICA DE VENENOS OFÍDICOS E SUA NEUTRALIZAÇÃO PELOS ANTIVENENOS

POR F. W. EICHBAUM (*)

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

É fato conhecido há muito tempo que a injeção parenteral do soro anti-*Bothrops jararaca* protege o indivíduo contra a ação tóxica geral (**) do mesmo veneno, mas praticamente não é capaz de prevenir o desenvolvimento de uma necrose local, mesmo quando o antiveneno for injetado pouco tempo depois da mordida dentro do próprio tecido atingido.

Para analisar esta falha da ação protetora local do soro, estudamos no presente trabalho a ação dermatotóxica do veneno da *Bothrops jararaca* como também da *Crotalus terrificus terrificus* em relação aos antivenenos específicos, sob variadas condições experimentais.

MATERIAL E METODOS

Como animais de experiência servimo-nos de coelhos e cães cuja pele abdominal era depilada pela aplicação de uma solução de sulfureto de sódio.

Os vários reativos (soro, veneno, etc.) foram injetados com agulhas finas (N.º 24), intradermicamente, e as reações foram observadas em intervalos determinados.

RESULTADOS

A.) Ação dermatotóxica (***) do veneno de *Bothrops jararaca*

A ação dermatotóxica do veneno de *Bothrops jararaca* manifesta-se por 3 tipos diferentes de reação que têm certa relação com a quantidade do veneno depositado na pele.

(*) Estagiário.

(**) Chamaremos de "ação tóxica geral", o conjunto dos fatores que conduzem à morte dos animais em contraste com os fatores tóxicos discutidos detalhadamente neste trabalho.

(***) Preferimos falar neste trabalho de uma "ação dermatotóxica" dos venenos em vez de "hemorragina", termo usado por outros autores, visto que a hemorragina representa só um componente (fração) do complexo dermatotóxico total.

Entregue para publicação em 22 de janeiro de 1947.



1. *Edema* ("E")

No caso de um edema muito forte e persistente o edema se transforma no 3.º-4.º dia num endurecimento (infiltração circunscrita da pele (infiltração = "I")

2. *Hemorragia* ("H")3. *Necrose* ("N")

A próxima Tabela (N.º I) demonstra os vários tipos das lesões epidérmicas (no coelho) em relação à dose injetada.

TABELA I

Dosagem da dose necrosante mínima (D. N. M.) do veneno de Bothrops jararaca, na pele do coelho (1.500-2.000 g)

(Quantidade de veneno contido em 0.2 ml. Vol. total)

Quantidade de veneno em mg	Reação depois de				
	5'	60'	4 h	24 h	48 h
0.6	II +++	II +++++ E +++++	II +++++ E +++++	N +++ E +++	N +++
0.4	H ++	II +++++ E +++++	H +++++ E +++++	N +++ E +++++	N +++
0.2	H ++ E +++++	II ++ E +++++	II ++ E +++++	N ++	N ++
0.1	II =	H ++ E ±	II ++ E ±	H ++ E +++	I +
0.05	E +-+-	H = II +++++	H = E +++++	I+ E+-	I +
0.025	E +-+-	H = E +++++	II = E +++++	E +++	O
0.020	E ±	E ++	E ++	O	O

Nota: No presente trabalho tôdas as indicações de "mg de veneno" se referem a mg de venenos secos, redissolvidos em salina isotônica.

Leitura: O = sem reação; H = hemorragia; E = edema; N = necrose; I = infiltração.

A dose necrosante mínima (D.N.M.) foi de 0.2 mg (numa outra experiência era de 0.4 mg). A dose edemaciante mínima (D.E.M.) foi somente de 15-20 gamas.

Doses intermediárias de cerca de 0.1 mg produziram uma lesão hemorrágica que foi regularmente acompanhada de um forte edema. Acontecia, aliás, frequentemente, que com as doses produtoras de hemorragia, o edema aparecia

mais tarde do que aquêlê que se manifestava após a injeção de quantidades menores de veneno. Pode-se talvez explicar êste fenômeno (edema retardado com maiores doses) por uma coagulação intravascular nos pequenos vasos que inibe a transudação; não desprezamos a possibilidade de colaborarem nesse fenômeno outros mecanismos, atuando ou diretamente, ou por via reflexa, sôbre os vasos periféricos.

A necrose que segue a injeção intradérmica de 0.2 — 0.6 mg era antecedida regularmente por uma intensa hemorragia e mostrava pleno desenvolvimento somente 24-48 horas após a injeção do veneno.

Quer nos parecer que as lesões hemorrágicas e necróticas dependem unicamente de diferenças quantitativas da mesma fração do veneno. Quanto ao edema, as experiências a serem descritas mais adiante, parecem indicar ser produzida por uma fração separada do mesmo veneno.

Ação neutralizante do sôro anti-Bothrops jararaca sôbre a ação dermatotóxica do veneno de Bothrops jararaca

Foram realizados 4 tipos de experiências:

1. *Proteção geral* do animal pela injeção intramuscular de uma dose maciça do sôro, seguida 24 horas após por uma injeção intradérmica do veneno.

TABELA II

	Quantidade de veneno injetado (num volume total de 0.2 ml)	Reação depois de			
		10'	30'	3 h	24 h
Coelho A (proteção geral)	0.6 mg	H ++	H ++	H ++ E ++	N+ N+ E+
	0.4 mg	H ++	H ++	H ++ E ++	N+ H++ E+
	0.2 mg	H ±	H ±	H ± E ++	H± E++++
	0.1 mg	O	H ±	H ± E ++++	E ++++
Coelho B (Normal) contrôle	0.6 mg	H ++	H +++	H +++ E ++	N++ H+
	0.4 mg	H ++	H +++	H +++ E +	N++ E+
	0.2 mg	H ±	H ±	H ± E+	H± E+++
	0.1 mg	H ±	H ±	H +++ E +	H++ E++

2. *Proteção local* pela injeção intradérmica do soro; injeção sucessiva do veneno, no mesmo lugar, após 3-5.

3. Injeção intradérmica do veneno seguida, imediatamente, depois por uma injeção intravenosa de altas doses de antiveneno ("tratamento parenteral").

4. Injeção intradérmica do veneno, seguida por uma injeção de soro no mesmo lugar, 3-5' após (tratamento local).

5. Injeção simultânea do veneno + soro, que antes da injeção tinham ficado em contacto durante 30' a 37°C (*neutralização do veneno in vitro*).

TABELA III

Tipo de experiência	Substâncias injetadas	Reação depois de			
		5'	15'	60'	24 h
Contrôle soro	Antiveneno (*) 2 ml i. d.	O	O	O	E +--+ (I)
Contrôle veneno	Veneno 2 mg i. d. (contidos em 2 ml de água fisiol.	II +	II +++	H ++++	N ++++ E ++++
Ad 2) Proteção local	Antiveneno (*) 2 ml i. d. Depois de 5' no mesmo lugar Veneno 2 mg	E ++	E ++++ H =	E ++++ H +	E ++++ H +
Ad 3) Tratamento parenteral	Veneno 0.8 mg i. d. Depois de 1' Antiveneno (*) 5 ml por via venosa	H ++	H +++	H +++ E ++	N ++ H ++ E ++
Ad 4) Tratamento local	Veneno 2 mg i. d. Depois de 4-5' no mesmo lugar Antiveneno (*) 2 ml	H +	H ++++	H ++++ E ++	N ++ H +++ E ++
Ad 5) Neutralização <i>in vitro</i>	Antiveneno (*) 2 ml Veneno 2 mg injetados após contacto duran- te 30' a 37°	O	E +	E ++	E ++++

i. d. = intradérmica.

(*) Antiveneno = soro anti-*Bothrops jararaca* No. 18: 2 ml deviam neutralizar 4.4 mg de veneno de acordo com adosagem em pombos (método de Vital Brazil).

(**) Os intervalos de 5', 15', 60' e 24 h contam-se do momento em que o veneno foi injetado.

4

Resultado das experiências em 17 coelhos de 1500 — 1800 g;

1. O coelho *A*, de 1.800 g recebeu por via venosa 2,5 cm³ do soro antibotrópico (Op. 17), quantidade essa que, de acôrdo com a dosagem em pombos, devia neutralizar 4,75 mg de veneno. Vinte e quatro horas após, foram injetadas várias quantidades de veneno, em diferentes lugares. As reações observadas foram comparadas com as obtidas num outro coelho (B), não protegido pelo soro.

Fôra de ligeiras diferenças, atribuíveis à reatividade individual dos dois animais, a pele do animal "protegido" e a do animal normal reagiram idênticamente. *Conclusão*: a injeção parenteral do soro não protege a pele contra a ação necrotica e quase completamente a ação hemorrágica do veneno, mas não excesso. (Tab. II).

2. A infiltração prévia da pele com antiveneno (*proteção local*) neutraliza a ação necrotica e quase completamente a ação hemorrágica do veneno, mas não é capaz de neutralizar a ação edemaciante. (Tab. III).

3. *Tratamento parenteral*: — a ação hemorrágica-necrotica e edemaciante do veneno praticamente não é influenciada pela injeção de altas doses de antiveneno, aplicadas poucos minutos após a injeção do veneno. (Tab. III).

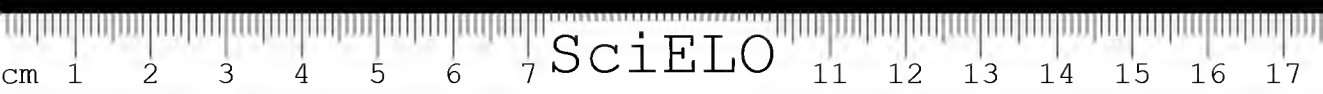
4. *Tratamento local*: — Como em 3. —, também a injeção local de soro no mesmo lugar onde o veneno era depositado, não influe sobre a ação dermatotóxica do último. (Tab. III).

5. *Neutralização in vitro*: — o contacto *in vitro* do antiveneno com o veneno neutraliza a ação hemorrágiconecrotica deste último, mas diminui somente de pouco a ação edemaciante. (Tab. III).

Contrôle de soro: — A injeção do soro deixa notar depois de 24 h uma ligeira infiltração edematosa, diferente do edema pastoso observável nos outros animais tratados com veneno ou veneno mais soro. (Tab. III).

Resultados análogos foram obtidos em dois cães:

1. *Proteção local por injeção prévia do soro* (soro antibotrópico No. 19: dosagem em pombos: 10 ml neutralizam 24 mg de veneno).



Cão No. 2, pêso 8 kg. injeção intradérmica na pele abdominal depilada de 2 ml de sôro (correspondendo a um valor neutralizante de 4.8 mg de veneno). Depois de 5', injeção de 0.2 ml = 1 mg de veneno botrópico (jararaca) no mesmo lugar. Paralelamente injetam-se em outro lugar da pele não tratada previamente e distante 15 cm do primeiro, 0.2 cm³ (= 1 mg de veneno).

Tempo de observação, contado da injeção do veneno	Resultado	
	a) Infiltração prévia da pele com sôro, seguido por injeção de veneno	b) Veneno na pele não protegida (contrôle)
5'	—	H ++
10'	E ++	H ++++ E ++++
60'	E ++++	H ++++ E ++++
4 horas	E ++++ II ÷	H ++++ E ++
24 horas	E ++ I +	N +++ E +
72 horas	I =	N ++ I +++

(O cão que depois de 1 hora apresentou evacuação sanguinolenta e forte abatimento, recebeu 10 ml de sôro, (*) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como na experiência em coelhos a proteção local prévia protege só contra a ação necrosante do sôro, mas não é capaz de evitar o aparecimento do edema.

2. Injeção intradérmica prévia do veneno seguida por uma injeção local do sôro:

Cão No. 5, pêso 8 kg. O animal recebe em diferentes lugares da pele abdominal as seguintes injeções:

- 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina (contrôle).
- 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina, e depois de 3 minutos, 2 ml do sôro No. 19 no mesmo lugar.
- como b, injetando-se, aliás 1 ml do sôro antibotrópico No. 19.
- ml do sôro antibotrópico No. 19 (contrôle).

(*) por via intraperitoneal.

TABELA V

Tempo de observação, contado da injeção do veneno	material injetado			
	a) veneno 1 mg i. d. (*) —	b) veneno 1 mg i. d. depois de 3' sôro 2 ml i. d.	c) veneno 1 mg depois de 3' sôro 1 ml i. d.	d) sôro 2 ml i. d.
R e a ç ã o				
5'	H+	H+	H+	—
10'	H+++ E+	H+++ E+	H+++ E-	I+
60'	H++++ E++++	H++++ E++++	H++++ E++++	I=
4 horas	H++++ E++	H++++ E++++	H++++ E++++	0
24 horas	N++++ E++++	N++++ E++++	N++++ E++++	0
72 horas	N++++	N++++	N++++	0

(O cão que depois de uma hora apresenta sintomas fortes de uma intoxicação geral, recebe 10 ml de sôro i.p. (**)) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como nas experiências em coelhos, a ação necrosante do veneno não foi neutralizada pelo sôro, mesmo quando este era injetado no mesmo lugar em que o veneno era depositado 3 minutos antes. (Notar que os 2 ml de sôro deviam neutralizar 4.8 mg de veneno). Nem a injeção adicional de uma grande dose de sôro aplicada por via venosa 1 hora depois da injeção de veneno modificou os resultados.

Pareceu ainda de um certo interesse tanto teórico como prático, verificar-se a relação quantitativa entre a ação anti-tóxica-geral e a ação antidermatotóxica do sôro antibotrópico.

Realizamos uma série de experiências com o sôro (nativo) Op. 17, que deu para este sôro uma certa aproximação entre a dose antineurotóxica (dosada em pombos) e antinecrosante-antihemorrágica (dosada na pele abdominal de coelhos). Verificou-se mais uma vez nesta experiência a falta absoluta de um princípio antiedemaciante mesmo com doses elevadas do sôro. (ci. Tab. VI).

B.) Ação dermatotóxica do veneno de *Crotalus terrificus terrificus*

A ação dermatotóxica do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* é muito menos pronunciada do que aquela dos venenos botrópicos. No veneno crotálico,

(*) i.d. = intradermal
(*) i.p. = intraperitoneal

TABELA VI

Ação antidermatotóxica do soro anti-Bothrops jararaca No. 17 — dosagem em coelhos (A)
 — Comparação com o poder anti-“táxico-geral” do mesmo soro, dosado em pombos (B)

A

Dosagem na pele abdominal do coelho

Soro antibotrópico	Sol. Vene- no <i>Bothrops</i> <i>jararaca</i> I mg/ml	Na Cl fisiol.	Reação intracutânea depois de					
			2 h	4 h	24 h	48 h	72 h	120 h
1.	0.1 ml	0.15cm ³	E++ H+	E++ H+	E++ N+	E++ N++	E++ N++	I++ N++
2.	0.1 ml	0.4 cm ³	E++	E++	E++	E++	E++	I++
3.	0.2 ml	0.3 cm ³	E+	E+	E++	E++	E++	N±
4.	0.3 ml	0.2 cm ³	E+	E+	E+	E++	E++	I+
5.	0.4 ml	0.1 cm ³	E+	E+	E++	E++	E++	I+
6.	0.5 ml	—	E+	E+	E++	E++	E++	I+
7.	—	0.25cm ³	E++ H++	E++ H++	E++ H++	E++ H++	E++ H++	O O
8.	—	0.5 cm ³	E++ H++	E++ H++	E++ H++	E++ H++	E++ H++	O O
9.	0.1 ml	0.65cm ³	E±	H+	E++	E++	E++	N++
10.	0.5 ml	0.15cm ³	E±	E±	N+	N++	N++	N++ N++

B

Dosagem em pombos

1. ^a	0.1 ml	0.5 ml	0.15 ml	pombo N.º 37 — peso 260 g — morto depois de 10'
2. ^a	0.1 ml	0.25 ml	0.4 ml	pombo N.º 24 — peso 250 g — sobrevive 48 h
3. ^a	0.2 ml	0.25 ml	0.3 ml	pombo N.º 26 — peso 260 g — sobrevive 48 h

Todos os reativos ficaram em contacto por 30' a 37º antes da injeção.

as doses infra-mortais (no coelho) que ficam entre 0.05 e 0. mg produzem somente um fraco efeito sobre a pele. A única reação que se observa é um ligeiro edema que aparece, em geral, 20 horas após a injeção intradérmica do veneno e que desaparece 24 horas após. Doses mais altas, de 1-2 mg, não mostram efeito algum durante as primeiras horas depois da injeção, além de um ligeiro edema local. Estas doses, porém, matam os animais entre 10-20 horas, tempo insuficiente para o desenvolvimento de nítidas reações locais. Pode ser, aliás, demonstrado, que o veneno crotálico possui, de fato, uma ação dermatotóxica injetando-se na pele do coelho 1-2 mg de veneno (0.2 ml de uma solução a 0.5 — 1.0%) e imediatamente depois o soro anticrotálico por via venosa, em quantidade suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno. Nestas condições, o soro protege o animal contra a ação geral (neurotóxica) e, sendo incapaz de neutralizar a ação dermatotóxica, a reação cutânea pode manifestar-

TABELA VII

Ação dermatotóxica do veneno crotálico evidenciada pela injeção simultânea do veneno por via intradérmica e do soro, por via venosa

Coelho N.º	Peso	Quantidade de veneno injetado intradermicamente	Antiveneno injetado intravenosamente		Reação depois de	
			Soro N.º	Quantidade	24 h	48 h
20	kg ± 1 500	1 mg	—	—	morto V± E+	—
165	± 1 500	2 mg	—	—	morto V+	—
115	± 1 500	a) 1 mg	173*	8.5 ml	a) V+ E++	N± E+++ h) N+++ E++
		b) 2 mg			b) V+++ E+++	
167	1 200	a) 1 mg	175**	4 ml	a) N+ E++++ V+++	N+++ E+++ V+++
		b) 2 mg			b) N+++ E++++ V+++	

Leitura: E = edema, V = "Vermelhidão" (Eritema), N = necrose.

(*) 1 ml de soro No. 173 neutraliza 0.8 mg de veneno (dosagem em pombos).

(**) 1 ml de soro No. 175 neutraliza 1 mg de veneno (dosagem em pombos).

Nota: Os animais 115 e 167 receberam as injeções de 1 e 2 mg de veneno em lugares diferentes da pele abdominal ("a" e "b"), guardando-se uma distancia de 8 cm entre os dois lugares injetados.

se nitidamente; depois de 24 horas aparece um forte edema e um eritema de cor vermelho-arroxeadado, acompanhado, por vêzes, de hemorragias petequiais. A necrose produzida por 2 mg de veneno é no primeiro dia após a injeção ainda pouco desenvolvida e fica nítida somente depois dum intervalo de mais de 24 horas. O edema persiste sempre até o segundo dia, enquanto que o eritema mostra uma certa tendência a regredir neste intervalo. Uma experiência deste tipo mostra a Tabela VII.

Quando o veneno (em quantidades de 1-2 mg) é depositado intradermicamente e depois de um intervalo de 5' uma quantidade equivalente do anti-sôro é injetado no mesmo lugar, a única reação a observar é um forte edema e ocasionalmente um ligeiro eritema, ambos aparecendo somente depois de um intervalo de 24 horas. O mesmo efeito é obtido quando sôro e veneno são misturados *in vitro* e injetados juntamente, depois de ter ficado em contacto à 37° durante 30'. Reações neurotóxicas não são observadas neste caso.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Veneno botrópico

O fato de que unicamente as ações hemorrágica e necrosante do veneno são neutralizadas pelo sôro enquanto que a ação edemaciante fica praticamente inalterada, mesmo em contacto com doses elevadas do sôro, parece indicar que os dois primeiros fenômenos, *hemorragia* e *necrose*, são devidas a uma fração antigênica do veneno, que é diferente de uma segunda fração não antigênica produtora do edema (*).

Podia-se pensar que o efeito edemaciante, não neutralizável pelo antiveneno, é devido a presença de histamina no próprio veneno ou causado pela libertação secundária de histamina da pele sob influencia do veneno. Esta ultima hipótese pode ser afastada, porquanto a fração proteolítica e a lecitinase do veneno — que não são geralmente responsáveis pela libertação secundária de histamina — ficam certamente neutralizadas por quantidades equivalentes do sôro.

As quantidades de histamina preexistentes nos venenos são tão *infinitesimais* que também não podem ser responsáveis por tal fenômeno.

(*) Existe mais um outro argumento que fala em favor da multiplicidade dos fatores dermatotóxicos no veneno botrópico: o aquecimento do veneno a 65° durante meia hora destrói completamente a ação hemorrágica e necrosante do veneno, enquanto que a ação edemaciante fica ainda mais nítida, especialmente com as doses mais altas do veneno. Um aquecimento do veneno ao ponto de fervura, durante 15' diminui muito pouco a ação edemaciante: um edema nítido (E++) é ainda produzido com doses de 30-40 gamas do veneno fervido, efeito comparável ao causado por doses de 10-20 gamas do veneno nativo.

Consignamos os nossos melhores agradecimentos ao nosso colega Dr. Ananias Porto do Instituto Butantan pela dosagem de histamina nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus*, que deram os seguintes resultados:

Veneno	Dose edemaciante mínima D. E. M.	Conteúdo em histamina por	
		1 grama	1 D. E. M.
<i>Bothrops jararaca</i>	0.02 mg	0.029 mg	6×10^{-7} mg
<i>Crotalus terrificus terrificus</i>	0.05 — 0.1 mg	0.010 mg	$5 \times 10^{-7} \cdot 10^{-6}$ mg

Estes resultados demonstram que a ação edemaciante dos 2 venenos aparentemente não tem relação alguma a histamina e deve ser atribuída, por isso, a uma fração específica que faz parte integral dos dois venenos.

A atividade anti-hemorrágica — anti-necrosante do sôro antibotrópico se manifesta unicamente quando se injeta uma mistura de veneno + sôro que tenham ficado em contacto, *in vitro*, por algum tempo, ou quando se injeta o veneno dentro de um depósito intradérmico de sôro — 2 tipos de experiência que tem pouco interesse do ponto de vista prático.

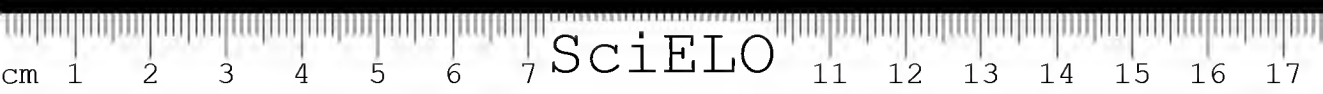
A incapacidade do sôro de neutralizar a ação dermatotóxica do veneno, mesmo quando as duas injeções (do veneno e do sôro) são feitas num curto intervalo de tempo no mesmo lugar, demonstra uma rapidíssima fixação do veneno pelas células tissulares; a injeção subsequente de sôro não consegue mais neutralizar o veneno fixado no tecido.

Uma imunização passiva por via intramuscular não exerce efeito sobre a ação dermatotóxica do veneno, da mesma forma como a injeção i.v. do sôro imediatamente depois da inoculação intradérmica do veneno; aparentemente a concentração do antiveneno nos tecidos é tão reduzida que não consegue alterar a afinidade do veneno pelo tecido cutâneo.

Veneno crotálico

Estas experiências mostram que o veneno crotálico contém, semelhante ao veneno botrópico, duas frações dermatotóxicas 1.) Fração produtora de eritema e necrose neutralizável pelo sôro anticrotálico 2.) Uma fração edemaciante que não é influenciada pelo sôro anticrotálico.

Em relação à termo-resistência, estas frações do veneno crotálico se comportam diferentemente das frações análogas do veneno botrópico. Um aquecimento do veneno a 65° durante 30' destrói o poder necrosante sem afetar niti-



damente o seu poder eritematoso e edemaciante. O aquecimento a 100° durante 5 não modifica muito o resultado; só há uma redução apreciável do eritema e do edema com veneno fervido por 10-20'.

Estes fatos parecem indicar que o aquecimento destrói em função do grau e tempo de aquecimento, gradativamente, o veneno inteiro, não se verificando uma termo-resistência ou labilidade específica das frações descritas.

A dose necrosante mínima do veneno crotálico é cerca de 10 vezes maior (= 2 mg) do que aquele do veneno botrópico (0.2 m), produtora do mesmo efeito; no caso do veneno crotálico, esta dose fica perto da dose letal mínima (para o coelho) e devido a sua ação lenta (24-48 h) não pode ser evidenciada sob condições normais. Uma reação hemorrágico-necrótica se produz unicamente quando o veneno é injetado intradermicamente e o soro na veia; nestas condições o soro neutraliza a ação neurotóxica, aparentemente sem atingir no tecido cutâneo uma concentração suficiente para inibir a ação local do veneno.

Contrariamente às observações feitas com o veneno e soro botrópico, tanto a ação tóxica geral como a ação local do veneno crotálico são neutralizadas (com exceção da ação edemaciante), quando o soro é injetado num lugar previamente infiltrado com uma dose mortal de veneno (1-2 mg).

Estes resultados concordam em parte com as observações de Githens que trabalhando com os venenos de crotalídeos norte - e centro-americanos, verificou uma neutralização *in vitro* pelos antivenenos homólogos e heterólogos. "A reação local dos venenos desenvolveu-se tão rapidamente que a injeção subsequente do antiveneno neutralizante não produziu efeito. A toxidez sistemática (geral) era maior com a injeção intradérmica do que com a subcutânea do veneno; nos venenos mais tóxicos a dose letal era menor do que a dermatotóxica." Contrariamente à ação das cascaveis sul-americanas, a maioria das cascaveis norte - e centro-americanas mostraram uma forte ação necrosante nas experiências de Githens.

RESUMO

O veneno de *Bothrops jararaca* possui uma forte ação dermatotóxica; a injeção intradérmica (em coelhos) de 0.2 — 0.4 mg de veneno causa após poucos minutos o aparecimento de um extenso edema e de hemorragia, seguidos por uma profunda necrose 24-48 horas depois. Doses menores (0.01 — 0.02 mg) causam unicamente um edema das camadas epidérmicas superficiais. Demonstramos neste trabalho que o veneno botrópico contém dois princípios dermatotóxicos diferentes: 1.) uma fração produtora do efeito hemorrágico-necrótico, neutralizável *in vitro* pelo antiveneno específico e destruída pelo aquecimento a

65° durante 30'. 22.) Uma fração edemaciante, não neutralizável mesmo por altas doses do antiveneno, resistente a um aquecimento de 100 graus durante 10' (Experiências em coelhos e cães).

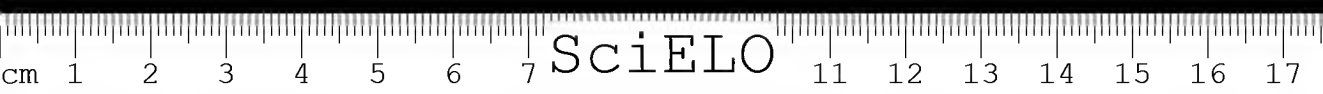
A afinidade das dermatotoxinas para com o tecido cutâneo parece muito grande, visto que a injeção de doses altas de antitoxina não conseguem neutralizar o veneno injetado poucos minutos antes no mesmo lugar. A presença de um anticorpo dirigido contra a ação hemorrágico-necrotica pode ser demonstrado pelo fato que u'a mistura do sôro + veneno, injetada após 30' de contacto a 37°, produz unicamente uma reação edematosa.

As atividades antitóxica-geral e antidermatotóxica de um sôro antibotrópico testado em pombos e coelhos, respetivamente, eram aproximadamente iguais.

Em contraste com a rápida e intensa reação dermatotóxica do veneno botrópico, o efeito local do veneno crotálico (de *Crotalus terrificus terrificus*) — no teste em coelhos — não é muito impressionante. Doses baixas (0.05 - 0.1 mg) injetadas intradermicamente produzem depois de algumas horas um edema pouco espalhado o qual desaparece geralmente depois de 24-48 horas. Doses maiores (1-2 mg) matam o animal dentro de 10-20 horas, verificando-se no lugar da injeção unicamente um ligeiro edema e vermelhidão (eritema).

Foi demonstrado, aliás, por um artifício de técnica que também o veneno crotálico possui um fator necrosante: quando se injetam 1-2 mg de veneno crotálico, intradermicamente, e ao mesmo tempo por via venosa uma quantidade de sôro suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno, o efeito visível depois de 24-48 horas será uma necrose nítida, cercada de um edema e intenso eritema. Aparentemente o antiveneno introduzido por via venosa não atinge no tecido cutâneo uma concentração suficiente para suprimir a ação necrosante. O sôro anticrotálico, aliás, possui por si mesmo, uma atividade antidermatotóxica, visto que a injeção combinada de sôro + veneno, ou mesmo a injeção sucessiva de veneno e sôro no mesmo local, inibe o desenvolvimento da necrose e do eritema como também o efeito neurotóxico. Como no caso do antiveneno botrópico, o sôro crotálico não contém anticorpo que neutralize a ação edemaciante do veneno (crotálico).

A resistência ao calor das duas frações dermatotóxicas do veneno crotálico difere das frações análogas do veneno botrópico porquanto o aquecimento a 65° por 30' abole unicamente o efeito necrosante do veneno crotálico, sem diminuir a sua atividade eritematosa e edemaciante. Somente quando fervido por mais de 10', o veneno perde gradualmente o poder de produzir os dois últimos sintomas. Este fato indica uma redução progressiva da atividade do inteiro complexo dermatotóxico em função do tempo e grau de aquecimento. Não existe, no caso do veneno crotálico, uma termolabilidade "específica" de diferentes frações dermatotóxicas, como foi observado no veneno de *Bothrops jararaca*.



ABSTRACT

The venom of *Bothrops jararaca* has a strong dermatotoxic activity. The intradermal injection (in rabbits) of 0.2 — 0.4 mgr. of the venom produces, after a few minutes, a very extensive edema and hemorrhage, which is followed 24-48 hours later by a deep necrosis. Smaller doses (0.01 — 0.02 mgr.) cause only an edema of the superficial skin layers. It could be shown in this paper, that the bothropic venom contains two different dermatotoxic fractions, one responsible for the hemorrhagic-necrotizing effect, the other one responsible for the development of an edema.

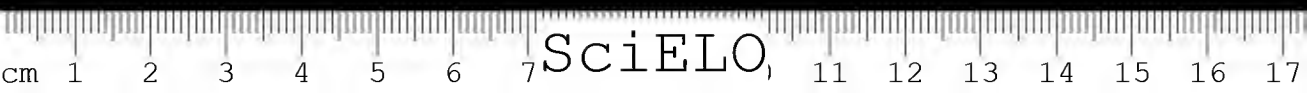
The hemorrhage-necrosis producing fraction (fraction I) is neutralizable in vitro by specific antiserum and is destroyed by heating to 65° for 30'. The edema producing fraction (fraction II) is not neutralizable even by high doses of specific antiserum and resists heating to 100° for 10-15' (Experiments in rabbits and dogs). The affinity of the dermatotoxins to the cutaneous tissue appears very strong, since the local injection of high antivenom doses is unable to neutralize the topical action of a venom, which had been injected at the same place a few (3-5) minutes before. The presence of an anti-dermatotoxic (fraction I) antibody can be proved by the fact that the intradermal injection of a serum-venom, mixture which had remained in contact for 30' at 37°, produces only an edematous reaction.

The general antitoxic and the anti-dermatotoxic power of an anti-bothropic serum — tested in pigeons and rabbits respectively — were about the same.

Contrary to the intensive dermatotoxic action of the bothropic venom, the local effect of the *Crotalus* venoms (from *Crotalus terrificus terrificus*) in rabbits is not very impressive. The intradermal injection of small venom doses (0.05 - 0.1 mgr.) produces after a few hours a fairly large edema, which generally disappears 24-48 hours later. Higher doses (1-2 mg) kill the animals within 10-20 hours, exposing the injected site slight edema and hyperemia.

By a special technique it can be shown, however, that also the crotalic venom possesses a necrotizing factor:

When the intradermal injection of 1-2 mg of crotalic venom is followed immediately afterwards by an antivenom injection of a serum-dose sufficient to neutralize the neurotoxic action, there will appear within 24-48 hour, a marked necrosis, surrounded by an edema and intensive erythema. Apparently, the intravenously injected serum did not attain, in the cutaneous tissue a sufficient concentration to suppress necrotizing action. The anticrotalic serum in order possesses an anti-dermatotoxic activity too, since the combined injection of serum + venom, or even a local serum injection applied 5-10' after the venom injection,



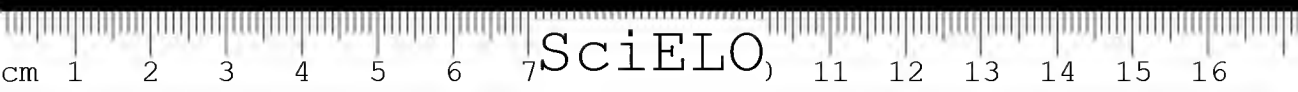
inhibits the development of necrosis and erythema, as well as the neurotoxic effect. As in the case of the antithroptic serum, the edema producing power of the crotalic venom is not interfered with even by high serum amounts.

The heat resistance of the two dermatotoxic fractions (*) of the crotalic venom differs from the homologous bothrops venom fractions in so far as heating to 65° for 30' abolishes only the necrotizing effect of the crotalic venoms without diminishing its edema and erythema producing activity. Only when the venom is boiled for more than 10', it loses gradually its power to cause the last mentioned symptoms. This fact points to a progressive reduction of activity of the entire dermatotoxic venom complex as a function of time and degree of heat applied: there is no specific heat lability of the different dermatotoxic fractions, as in the case of the *Bothrops jararaca* venom.

BIBLIOGRAFIA

Githens, T. S. — The polyvalency of Crotalidic antivenins. IV. Antinecrotic, anticoagulant and antiproteolytic actions, *J. Immunol.*, 42:149-159, 1941.

(*) Fraction I — causing erythema and necrosis, neutralizable by antivenom.
Fraction II — causing edema, not neutralizable by antivenom.





O FATOR DE DIFUSÃO ("SPREADING FACTOR") DOS
VENENOS DE *BOTHROPS JARARACA* E DE *CROTALUS*
TERRIFICUS TERRIFICUS

POR F. W. EICHBAUM (*)

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A injeção intradérmica de extratos testiculares aumenta intensamente a permeabilidade do tecido cutâneo, o que se manifesta pela rápida difusão de uma suspensão de tinta Nankin injetada no mesmo lugar (2, 3, 11, 12).

O poder de aumentar a difusão é atribuído a um fator específico ("spreading factor") contido nos extratos testiculares; uma certa avaliação quantitativa obtém-se medindo a área de infiltração preta produzida pela injeção simultânea do extrato + tinta Nankin, em comparação com a área preta produzida pela injeção de tinta Nankin em água fisiológica.

Um fator semelhante àquêle presente nos testículos foi encontrado mais tarde por Duran-Reynals e outros, em extratos bacterianos (estafilococos, pneumococos, bacilos de gangrena gasosa), em tumores malignos, nos venenos de espécies ofídicas norte-americanas e australianas como também em outros animais venenosos (aranhas, escorpiões, sanguessugas (4, 9, 10, 13, 14).

De acôrdo com os trabalhos de Duran-Reynals, o spreading factor "de venenos ofídicos sofre pouco pelo aquecimento à 65-100º, temperatura suficiente para destruir a ação tóxica geral do veneno da rattlesnake"; ao contrário, Madina-veitia (9) achou o "spreading factor" (mucinase) do veneno de *Crotalus atrox* mais termo-sensível do que os componentes neurotóxicos (protease, lecitinase).

Duran-Reynals mostrou ainda que os soros antiofídicos são capazes de neutralizar especificamente a ação tóxica local da spreading factor dos venenos.

A presença de fatores de difusão em órgãos, tecidos, líquidos de composição e proveniência tão diferente, constituiu um fenômeno problemático, até que Chain e Duthie (1) conseguiram demonstrar que o extrato testicular possui uma forte ação mucolítica; ésta atividade pode ser demonstrada pela queda rápida da viscosidade, que sofrem certas mucoproteínas (do corpo vítreo do olho, do cordão umbilical) em presença de extratos testiculares.

(*) Estagiario.

Entregue para publicação em 13 de fevereiro de 1947.

Esta observação sugeriu a probabilidade de que o spreading factor fosse nada mais do que uma mucinase — mais exatamente uma hyaluronidase — que agia sobre as substâncias mucoides intrafibrilares do colagênio da cutis (13,14). Esta hipótese foi ainda melhor apoiada pelas observações subsequentes de vários autores que verificaram que todos os produtos portadores de uma hyaluronidase provocam também o fenômeno do "spreading"; por outro lado Meyer e Chaffee (15, 16, 17) afirmam que nem tôdas substâncias causadoras de "spreading", contêm necessariamente uma hyaluronidase. Contra esta observação fica o peso da evidência de muitos outros autores que demonstraram uma coincidência constante do fator de difusão e da mucinase.

Faltam até agora suficientes experiências quantitativas para realmente provar a identidade do "spreading factor" e da hyaluronidase.

A presença de um fator de difusão nos venenos ofídicos de *Vipera aspis*, *Lachesis alternatus* e *lanceolatus* (= *Bothrops jararaca*). *Crotalus terrificus* *Naja haje* foi demonstrada por Tarabini-Castellani (19) em 1938: Favilli (5) verificou que os mesmos venenos possuem um enzima de alto poder mucolítico que é neutralizado pelos antivenenos específicos; o aquecimento do veneno a 70° durante 30' aboliu inteiramente o seu poder mucolítico. Também o veneno da *Vipera russellii* possui um fator que reduz a viscosidade de ácido hialurônico; pela digestão enzimática do muco libertam-se substâncias redutoras, como N-acetyl hexosamina, cuja quantidade é em certa relação quantitativa ao decréscimo da viscosidade (14) (*).

Madinaveitia (9) purificou a mucinase da *Crotalus atrox* por adsorção à terra de Fuller.

A importância prática do "spreading factor" reside no fato que este princípio parece intimamente ligado à facilidade com que certos germes piogênicos se implantam no tecido impregnado por tal fator. É de fato conhecido o grande perigo da infecção local das feridas causadas pela mordida de serpentes venenosas.

O presente estudo trata da presença do "spreading factor" nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelos sôros específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo do "spreading factor" na pele depilada de coelhos encontramos certas dificuldades de ordem técnica que conseguimos eliminar somente depois de repetidas experiências em numerosos animais. Além da dificuldade de depositar quantidades iguais do veneno sôro, etc., na mesma altura da epiderme,

(*) Também outras substâncias redutoras como o ácido ascórbico, phenylhydrazina, etc. produzem uma diminuição da viscosidade do muco.

os coelhos demonstraram uma reatividade individual bem variável tanto em relação ao soro como aos venenos ou a mistura dos dois. Para excluir o mais possível este fator individual injetamos no lado direito do abdomen os controles (tinta Nankin em salina, soro antiofídico + tinta Nankin; soro normal + tinta Nankin) e no lado esquerdo os respectivos reativos junto com o veneno.

O lugar da injeção (perto do processo xifoide ou da sínfise) parece pouco influenciar o tipo da reação. Por outro lado a leitura dos resultados fica em certos casos dificultada numa observação prolongada (2-3 horas) pela confluência das zonas de "spreading", impossibilitando desta maneira uma demarcação exata das lesões. Em tais casos repetimos a experiência num maior número de coelhos, nos quais foram aplicadas só 4 injeções por animal (2 para o teste, 2 para controle). No estudo do spreading factor é imprescindível escolher animais aproximadamente do mesmo peso e idade. Os animais com um peso acima de 2500 gramas apresentam geralmente uma pele rígida, grossa em que o fenômeno do "spreading" se desenvolve pouco nitidamente.

Preferimos para este estudo, em geral, coelhos (brancos) com um peso médio de 1200 — 1500 gramas, cuja pele fina é um indicador sensível ao "spreading factor". Uma avaliação quantitativa do grau do "spreading" fizemos medindo o diâmetro máximo da zona corada pela tinta Nankin.

Um fator que dificultou ainda o estudo da ação "anti-spreading" dos antivenenos, foi a propriedade de certos soros causarem por si só (sem presença do veneno) um nítido "spreading" em comparação com o controle. Encontramos este fenômeno principalmente com os soros anticrotálicos (tanto nativos como concentrados pelo sulfato de amônio). Em tais casos, naturalmente não se pode concluir sobre uma eventual neutralização do veneno.

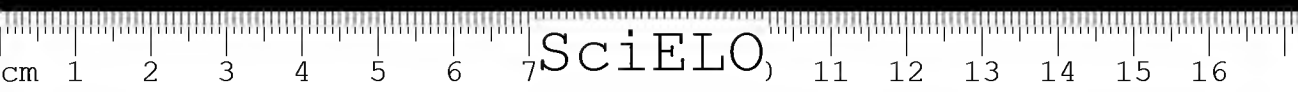
A maior frequência do spreading espontâneo dos soros anticrotálicos (observado ocasionalmente também com os soros anti-botrópicos) pode se explicar, em parte, pelo fato que a quantidade relativa do soro injetado era maior nos soros crotálicos devido ao seu menor título de neutralização. (outros pormenores da técnica podem ser vistos nas tabelas I e II).

Nos seguintes gráficos (I, IIa e IIb) estão condensados os resultados de várias experiências realizadas num total de 46 animais e com 4 soros antibotrópicos, 4 soros anticrotálicos e 8 soros normais de cavalo.

RESULTADOS

Gráfico I

"Spreading factor" do veneno de *Bothrops jararaca* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo do spreading em cm.



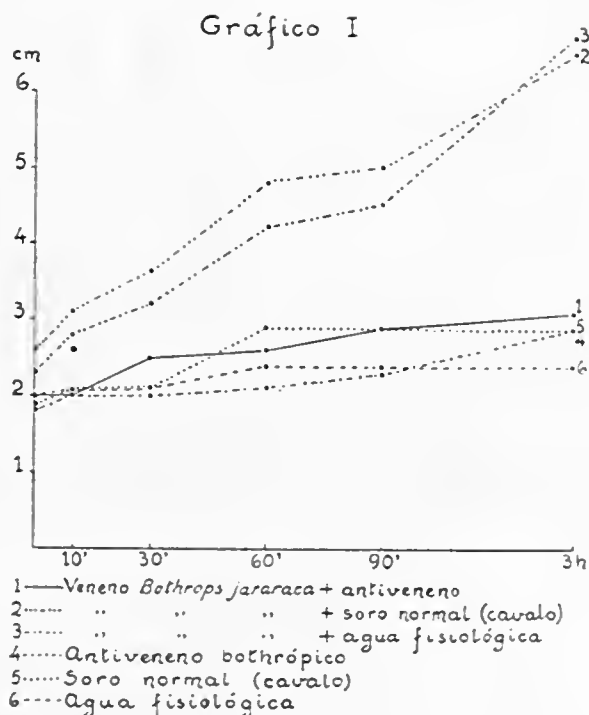


TABELA I

(mostrando a proporção dos vários reativos misturados in vitro)

S	Tubos n.º					
	1	2	3	4	5	6
Tinta Nankin 1/10 ..	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sol. veneno jararaca 10 mg/ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	—	—	—
Soro antibotrópico (**)	0.5 ml	—	—	0.5 ml	—	—
Soro normal de ca- valo (*)	—	0.5 ml	—	—	0.5 ml	—
NaCl fisiológico	—	—	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.6 ml

(*) Os sôros normais de cavalo nunca mostraram uma tendência a um "spreading" espontâneo, mesmo quando usados em doses elevadas. As pequenas quantidades de fenol, contidas nos antivenenos ofídicos, não influem sobre o "spreading" como conseguimos verificar em controles realizados neste sentido.

(**) 4 diferentes sôros nativos e concentrados pelo sulfato de amônio que se comportaram praticamente de modo idêntico. O título antitóxico dos 4 sôros testados em pombos variava de 1,9 mg a 2,4 mg de veneno neutralizado por 1 ml de soro.

De cada mistura, dos tubos 1-6, injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade do soro antibotrópico usado corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja a quantidade de veneno injetado nesta experiência.

Conclusão: 1) O veneno de *Bothrops jararaca*, injetado intradermicamente no coelho em quantidades de 0.2 mg (contido num volume de 0.2 ml) mostra nitidamente a presença de um "spreading factor". Êste fator é quase completamente neutralizado em presença de quantidades equivalentes (*) do antiveneno específico. Também o soro anticrotálico parece exercer uma certa inibição, que aliás - mais fraca do que a causada pelo soro botrópico (**). O soro normal de cavalo reforça nitidamente o "spreading" causado pelo veneno. Vários sôros normais testados sempre deram ausência de um "spreading factor", enquanto que alguns dos sôros anti-*Bothrops jararaca* também em ausência de veneno promoveram a difusão da tinta Nankin na epiderme do coelho; tais sôros não podiam ser usados no estudo da neutralização do "spreading factor" dos venenos.

B. Veneno crotálico

TABELA II

(mostrando a proporção dos vários reativos misturados in vitro)

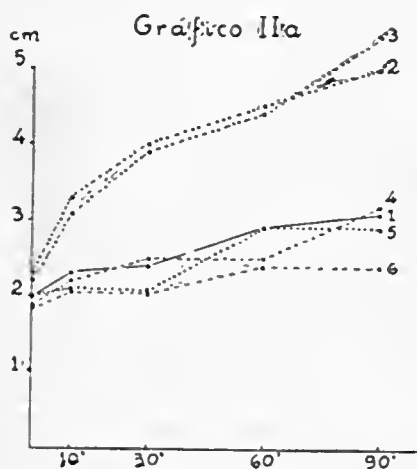
	Tubos n.º					
	1	2	3	4	5	6
Tinta Nankin 1/10 ..	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sol. veneno <i>C. t. terrificus</i> 5 mg/ml .	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	—	—	—
Soro anticrotálico (1 ml neutraliza 0.8 mg veneno)	1.3 ml	—	—	1.3 ml	—	—
Soro normal de cavalo	—	1.3 ml	—	—	1.3 ml	—
Na Cl. fisiol.	—	—	1.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	1.5 ml

(*) De acordo com o poder antitóxico geral testado em pombos. Experiências quantitativas no sentido de determinar a dose mínima do soro, capazes de inibir o "spreading", não foram feitas.

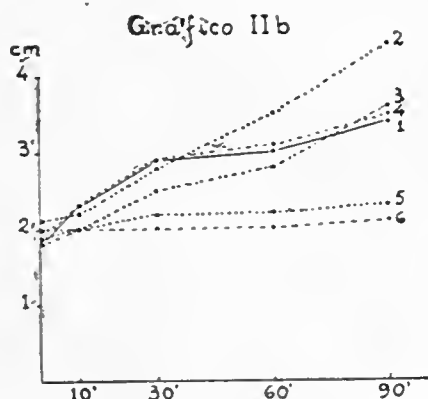
(**) Devido ao número relativamente pequeno de observações estes resultados não foram registrados no gráfico I.

Gráfico IIa e IIb

"Spreading factor" do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo em cm.



- 1—Veneno crotálico + antiveneno
- 2..... " " + soro normal (cavalo)
- 3..... " " + água fisiológica
- 4..... Antiveneno crotálico
- 5..... Soro normal (cavalo)
- 6..... Água fisiológica



- 1—Veneno crotálico + antiveneno
- 2..... " " + soro normal (cavalo)
- 3..... " " + água fisiológica
- 4..... Antiveneno crotálico
- 5..... Soro normal (cavalo)
- 6..... Água fisiológica

De cada mistura dos tubos 1-6 injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade de soro anticrotálico usada corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja, a quantidade de veneno usada nesta experiência. Devido ao baixo poder neutralizante destes sôros, comparados com os sôros antibotrópicos, a quantidade absoluta do soro nestas experiências é maior do que nas experiências com veneno e soro botrópico.

Os resultados obtidos foram divididos em 2 grupos; incluímos no gráfico IIa aquelas experiências em que os sôros crotálicos não possuíam fator intrínscico capaz de promover a difusão da tinta Nankin, permitindo desta maneira observar o seu poder neutralizante sobre o "spreading factor" do veneno; incluíram-se ainda os sôros de cavalo que aumentaram só fracamente o "spreading" causado pelo veneno. No gráfico IIb registramos as experiências com sôros anticrotálicos, que possuíam por si mesmos um fator de difusão e os sôros nor-

mais que promoveram fortemente o "spreading", quando combinados com o veneno crotálico. O conteúdo dos sôros anticrotálicos e normais (de cavalo) em fenol na quantidade de 0.2 — 0.4% não influe sobre o caráter do "spreading", como conseguimos verificar em experiências de contrôle.

Conclusão: O veneno de *Crotalus terrificus terrificus* possui um "spreading" factor neutralizavel pelo anti-sôro específico (gráfico IIa). Alguns dos sôros anticrotálicos possuem um poder intrínseco de aumentar a difusão da tinta Nankin (gráfico IIb), desconhecendo-se os fatores que determinam esta qualidade peculiar a alguns sôros. O sôro normal de cavalo, por si só incapaz de promover a difusão da tinta Nankin reforça o "spreading" causado pelo veneno crotálico; o valor ativador de sôros normais sobre o "spreading factor" do veneno crotálico varia de sôro para sôro (fraca ativação: gráfico IIa; forte ativação: gráfico IIb). Apesar de algumas observações indicarem uma fraca ação inibidora do sôro antibotrópico sobre o "spreading factor" do veneno crotálico, não incluímos estas experiências nos gráficos acima, devido à escassez de observações detalhadas.

Interessava ainda saber si os venenos botrópicos e crotálicos, portadores do "spreading factor" possuem também uma atividade mucolítica. Por falta de aparelhagem adequada, fizemos um test de orientação, no qual medimos o tempo de esvaziamento de uma pipeta de bola com uma capacidade de 18 cm³. Comparamos o tempo de esvaziamento da mistura muco (corpo vítreo de olho de boi) + veneno + buffer (*), depois de vários períodos de incubação à 37.º, com o tempo de esvaziamento de muco + buffer e de água + buffer.

Verificou-se em numerosos experiências paralelas, uma diminuição progressiva da viscosidade em tôdas as misturas muco + veneno, atingindo valores pouco acima do valor de água; contrariamente a mistura muco + buffer conservou uma viscosidade constante durante todo o tempo de observação.

Conclue-se disso que tanto o veneno de *Bothrops jararaca* como de *Crotalus terrificus terrificus*, portadores de um "spreading factor", possuem também uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de substratos ricos em ácido hyalurônico (corpo vítreo de olho de boi).

(*) buffer acetato pH 4.8 o que corresponde aproximadamente ao optimum da atividade da hyaluronidase.

TABELA III

*Diminuição da viscosidade do corpo vítreo de olho de boi em presença de venenos
botrópico e crotálico*

Contacto dos reat. à 37°	1)		2)		3)		4)	
	Corpo vítreo Ven. jararaca 20 mg/cm ³ buffer	17.0ml 1.0ml 2.0ml	Corpo vítreo Ven. crotálico 20 mg/cm ³ buffer	17.0ml 1.0ml 2.0ml	Corpo vítreo sol. fisiol. .. buffer	17.0ml 1.0ml 2.0ml	Água dist. ... sol. fisiol. buffer acet. pH 4.8	17.0 1.0 2.0
0 ...	36½"		37 "		37 "		29"	
1 h .	31 "		31 "		38 "		29"	
2 h .	30½"		31 "		37 "		29"	
3 h .	31 "		30½"		37½"		30"	

Os segundos indicam o tempo de esvaziamento de uma pipeta graduada de 18 cm³ volume.

DISCUSSÃO

Confirmam-se os resultados obtidos por Tarabini-Castellani (1938) sobre a presença de fatores de difusão nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus*.

Nossa observação de que a atividade do "spreading factor" dos venenos botrópico e crotálico é nitidamente reforçada em presença do soro normal parece interessante por que uma ativação pelo soro pode ser observada também em outras frações dos venenos:

1 Ativação do poder hemolítico em presença de soro; este fenômeno pode ser explicado pelo desdobramento da lecitina do soro com a formação de liso-lecitina, não podendo-se excluir a possível colaboração de outros fatores ativantes do soro.

2 Ativação do poder metahemoglobinizante do veneno de *B. jararaca* e de outros venenos botrópicos (observação não publicada do autor).

Não temos conhecimentos exatos de que maneira o soro ativa o "spreading factor", podendo-se admitir a formação de um produto secundário ativo, liberado do soro sob a influência do veneno.

A verificada diminuição da viscosidade de ácido hyalurônico (impuro) em contato com os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* confirma os resultados obtidos por Fayilli (5) demonstrando a coincidência, si

não a identidade, dos "diffusing factors" e da mucinase (hyaluronidase). De acôrdo com os recentes trabalhos de Humphrey (7,8) parece mais certo de admitir a existência de diferentes hyaluronidasas nos vários venenos e toxinas o que explicaria a especificidade dos antisôros capazes de suprimir o "spreading" causado por certa substância (venenos, extratos de órgãos etc).

Analizando os princípios responsáveis pela atividade do "spreading" dos venenos ofídicos, é preciso tomar em consideração também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo (18).

RESUMO

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem um fator de difusão ("spreading factor") neutralizável pelos respectivos anti-sôros específicos, mostrando-se ainda uma neutralização incompleta pelos sôros heterólogos.

A atividade do "spreading factor" é intensamente reforçada pela mistura dos venenos com sôro normal de cavalo; tais soros possuem por si só nenhuma atividade de "spreading". Entre os antivenenos botrópicos e crotálicos (ambos preparados em cavalos), encontraram-se alguns que possuíram um poder intrínseco de causarem o fenômeno de "spreading".

A ativação do "spreading factor" dos venenos pelo sôro normal têm uma certa analogia na ativação pelo sôro, observada em outras frações de venenos: ativação da hemólise, ativação do poder metahemoglobinisante (transformação da hemoglobina em metahemoglobina) (*).

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de ácido hyalurônico (corpo vítreo do olho de boi).

Analisando os princípios responsáveis pelo fenômeno do "spreading" causado pelos venenos ofídicos, é preciso considerar também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo.

ABSTRACT

The venoms of *Bothrops jararaca* and *Crotalus terrificus terrificus* are carriers of a spreading factor which is completely neutralized by the homologous antivenoms and partially by the heterologous antivenom.

(*) Observações do autor não publicadas.

The intensity of spreading caused by either venom is strongly activated in presence of normal horse serum, which had stayed in contact with the venom during 1/2 hour at 37°. Normal horse serum by itself does not increase the spreading of Indian ink, on intracutaneous injection. The activation of the spreading factor by normal sera has a certain analogy in the serum-activation of other toxic principles of some venoms: the activation of hemolysis, the activation of an oxydizing enzyme which transforms hemoglobin in to methemoglobin.

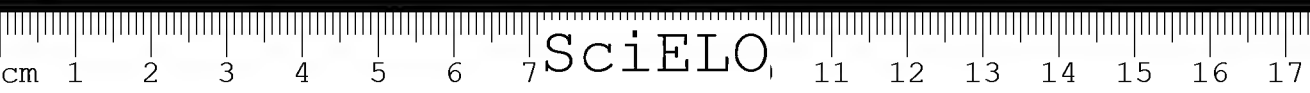
In some instances antithroptic and anticrotalic sera, both prepared in horses, were found to contain an intrinsic spreading promoting principle.

Bothropic as well as crotalic venoms reduce the viscosity of vitreous humour preparations (mucinase activity).

In appreciating the spreading activity of snake venoms and the supposed identity of the spreading factor and hyaluronidase, the histamin liberating power of these venoms should also be taken into account, since histamin by itself is known to promote the migration of colloidal particles in the dermal tissue.

BIBLIOGRAFIA

1. Chain, E. & Duthie, E. S. — Mucolytic enzyme in testis extracts, *Nature*, **144**:977-978, 1939.
2. Duran-Reynals, F. — Studies on a certain spreading factor existing in bacterial and its significance for bacterial invasiveness, *J. Exper. Med.*, **58**:161-181, 1933.
3. Duran-Reynals, F. — Further studies on influence of testicle extract upon effect of toxins bacteria and viruses and on Schwartzman and Arthur's phenomenon, *J. Exper. Med.*, **58**:451-463, 1933.
4. Duran-Reynals, F. — Spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action, *J. Exper. Med.*, **69**:69-81, 1939.
5. Favilli, G. — Mucolytic effect of several diffusing agents and diazotized compound, *Nature*, **145**:866-867, 1940.
6. Hoffman, D. C. & Duran-Reynals, F. — Influence of testicle extract on intradermal spread of injected fluids and particles, *J. Exper. Med.*, **53**:387-398, 1931.
7. Humphrey, J. H. — Studies on diffusing factors. I. The kinetic of the action of hyaluronidase from various sources upon hyaluronic acid, with a note upon anomalies encountered on the estimation of N-acetyl glucosamine, *Bioch. J.*, **40**:435-441, 1946.
8. Humphrey, J. H. — Studies on diffusing factors. II. The action of hyaluronidase preparations from various sources upon some substrates other than hyaluronic acid, *Bioch. J.*, **40**:442-445, 1946.
9. Madinaveitia, J. — Diffusing factors; concentration of mucinase from testicular extracts and from *Crotalus atrox* venom, *Bioch. J.*, **35**:447-455, 1941.
10. Madinaveitia, J. & Quibell, T. H. H. — Diffusing factors; effect of salts on action of testicular extracts on viscosity of vitreous humour preparations, *Bioch. J.*, **35**:456-460, 1941.



11. *McClellan, D.* — Influence of testicular extract on dermal permeability and response to vaccine virus. *J. Path. & Bact.*, **33**:1045-1070, 1930.
12. *McClellan, D.* — Further observations on testicular extract and its effect upon tissue permeability, *J. Path. & Bact.*, **34**:459-470, 1931.
13. *McClellan, D.* — Factor in culture filtrates of certain pathogenic bacteria which increases permeability of tissues, *J. Path. & Bact.*, **42**:477-512, 1936.
14. *McClellan, D. & Hale, C. W.* — Studies on diffusing factors; hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability, *Bioch. J.*, **35**:159-183, 1941.
15. *Meyer, K. & Chaffec, E.* — Mucopolysaccharide acid of pleura and possible relation to spreading factor, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **43**:487-489, 1940.
16. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffec, E. & Dawson, M. H.* — Hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes, *J. Exper. Med.*, **71**:137-146, 1940.
17. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffec, E. & Dawson, M. H.* — Relationship between "spreading factor" and hyaluronidase, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **44**:294-296, 1940.
18. *Rocha e Silva, M.* — Histamina e Anafilaxia, S. Paulo, Gráfica e Editora Edigraf Ltda., 1946.
19. *Tarabini-Castellani, G.* — Sulla presenza di "Fattori" di diffusione in alcuni veleni animali, *Arc. Ital. Med. Sper.*, **2**:969-978, 1938.





TRANSMISSÃO DO VIRUS DA FEBRE MACULOSA MEXICANA POR
AMBLYOMMA STRIATUM KOCH, 1844 (*)

POR A. VALLEJO-FREIRE

(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Em 1943, Bustamante e Varela (1,2) isolaram de doentes de febre maculosa, no México, um vírus, cujo comportamento experimental nos animais de laboratório tivemos oportunidade de estudar em publicação anterior (3). Os referidos autores examinaram inúmeros ixodidas capturados nos principais focos da doença, situados nos Estados de Sinaloa e Sonora, com o fim de encontrar exemplares naturalmente infetados, que pudessem ser responsabilizados como vetores desta riquetsiose (4).

As pesquisas feitas em vários lotes de ixodidas, num total de 2.190 exemplares, pertencentes às espécies *Argas persicus* (Oken, 1918), *Boophilus annulatus* (Say, 1821) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), não permitiram concluir serem estas espécies de ixodidas responsáveis pela transmissão da febre maculosa no México.

Posteriormente, Mariotte, Bustamante e Varela (5) encontraram sobre um cão exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infetados.

Dos estudos feitos por diversos autores sobre os vetores da febre maculosa no Brasil pode se concluir da facilidade com que os ixodidas do gênero *Amblyomma* se infetam e transmitem a infecção.

Salles Gomes (6) no homem e, posteriormente, Travassos (7) no cão encontraram *Amblyomma striatum* Koch, 1844, naturalmente infetado com o vírus da febre maculosa em São Paulo. Este último autor (8,9) mostrou também ser possível a transmissão experimental da febre maculosa em São Paulo pelo *Amblyomma striatum*.

Neste trabalho estudamos a possibilidade de *Amblyomma striatum* se infetar com o vírus mexicano e transmitir a infecção por picada.

(*) Com. à Soc. Biol. S. Paulo, em fevereiro de 1945.

Entregue para publicação em 14 de abril de 1947.

MATERIAL E METODOS

Os exemplares de *Amblyomma striatum* foram capturados sobre cães da Fazenda do Instituto Butantan, na fase adulta, sexuada. Nesse local, apesar de repetidas pesquisas, nunca foram encontrados carrapatos infetados. Para maior segurança, com alguns exemplares dos lotes colhidos foram feitas as provas rotineiras usadas para afastar a hipótese de eventual infecção natural.

Os ixodidas escolhidos foram colocados sobre cobaias infetadas, para que se alimentassem durante o período de circulação do vírus. Retirados antes de estarem totalmente alimentados foram mantidos à temperatura ambiente do laboratório e depois de alguns dias colocados sobre cobaias normais, afim de se tentar a transmissão da infecção por picada.

Virus BV. Originário do México, isolado de um doente de infecção exantemática por Bustamante e Varela. Recebido em *Ornithodoros* sp. e mantido por passagens sucessivas em cobaias.

RESULTADOS

1a. *Experiência*. 12 *Amblyomma striatum* normais, adultos, machos, depois de mantidos 20 dias à temperatura ambiente no laboratório, foram colocados sobre uma cobaia infetada durante o período correspondente à circulação do vírus no sangue. Decorridas 24 horas, encontramos 8 ixodidas alimentados, mas ainda fixos à pele da cobaia; os 4 restantes foram desprezados.

Três dias depois, 4 ixodidas foram separadamente triturados e o material obtido, suspenso em salina esteril. Inocularam-se quatro cobaias, cada qual com a suspensão correspondente a um ixodida. Três cobaias reagiram após período de incubação algo prolongado; duas morreram da infecção, uma no 10.º e outra no 11.º dia da inoculação; outra cobaia mostrou reação benigna, depois de 7 dias de incubação, sobrevivendo. Esta, quando reinoculada com vírus *BV* de passagem, apresentou sólida imunidade. A quarta cobaia, que não apresentou reação térmica, também se mostrou protegida, quando inoculada com vírus de passagem 16 dias depois de receber pela via subcutânea a suspensão do ixodida.

Decorridos 15 dias da alimentação infetante, verificou-se que, um exemplar dos quatro restantes estava morto. Cada qual dos 3 ixodidas vivos, foi triturado separadamente e o conteúdo de suas víceras, livres de carapaça, suspenso em 2 cm³ de salina esteril. Com a suspensão de cada carrapato inoculamos duas

cobaias pela via subcutânea, 1 cm³ em cada cobaia. Como resultados destas provas verificou-se que dois dos ixodidas mantiveram ativo o vírus *BV*, pois as cobaias inoculadas reagiram tipicamente. As cobaias inoculadas com material do terceiro carrapato não apresentaram infecção clínica característica, nem lesões correspondentes à invasão das riquetsias da *F. Maculosa Mexicana*.

2a. Experiência. Três exemplares machos de *Amblyomma striatum* (A, B e C) foram depositados sobre uma cobaia (No. 24.085) inoculada com vírus *BV* (6.ª passagem). Vinte horas depois, foram eles encontrados fixos à pele do animal, parcialmente alimentados; retirados, foram guardados durante 6 dias em tubos próprios para conservação de ixodidas e mantidos em estufa à temperatura de 26°C.

Um dos exemplares (A), depois de lavado externamente com solução fisiológica, foi triturado. O conteúdo de seus órgãos internos, isento das partes quitinosas suspenso em 2 cm³ de salina e inoculado pela via subcutânea em duas cobaias, cada qual com 1 cm³.

Só uma cobaia reagiu tipicamente, morreu da infecção e apresentou à necropsia as lesões características originais, provocadas pelo vírus *BV*. Nesta cobaia foi possível evidenciar a presença de riquetsias no protoplasma das células do exsudato peritoneal. Com sangue e tecido cerebral transmitimos a infecção a outras cobaias e o vírus foi a seguir mantido em série.

Os dois *Amblyomma striatum* restantes (B e C), após o 7.º dia da última alimentação parcial, completaram a alimentação em cobaias normais (Nos. 24.177 e 24.178) durante 48 horas. Deste modo, ao mesmo tempo que estimulávamos a multiplicação das riquetsias eventualmente introduzidas nos ixodidas durante a primeira alimentação, aproveitamos as cobaias para demonstrar a transmissão pela picada de *Amblyomma striatum*.

Um dos ixodidas (B), decorridas 24 horas depois de colocado sobre a cobaia No. 24.177, não estava fixado à pele do animal, mas sim após 48 horas, por ocasião da retirada, não tendo, no entanto, sugado a cobaia, pois o controle de peso antes e depois da colocação do ixodida não acusou aumento.

O outro ixodida (C), colocado sobre a cobaia No. 24.178, pelo contrário, estava fixo depois de 24 e 48 horas, sendo evidente o aumento de volume devido à sucção de sangue.

A cobaia No. 24.177 foi observada durante 10 dias depois de retirado o carrapato, não mostrando qualquer alteração térmica, nem mesmo à necropsia foi possível encontrar quaisquer alterações nos órgãos internos.



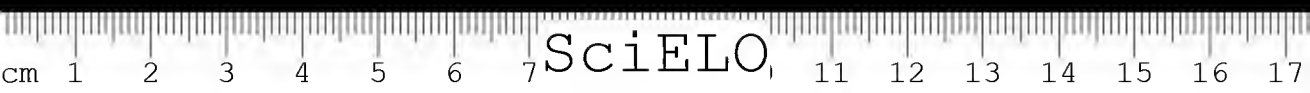
A Cobaia No. 24.178 ao terceiro dia apresentou reação térmica intensa (40°7), tendo-se mantido elevada a temperatura durante mais 5 dias, morrendo da infecção no 6.º dia e apresentando lesões típicas da infecção. Esta cobaia foi sangrada no 1.º dia de elevação térmica e o sangue obtido foi injetado pela via peritoneal em duas cobaias; uma delas reagiu mais ou menos tipicamente e ao ser sacrificada no 9.º dia apresentou lesões características. As passagens feitas com sangue colhido no 8.º dia resultaram negativas, talvez porque o material não tenha sido colhido em momento propício. Por este motivo a infecção não foi mantida em série.

Os dois carrapatos, B e C, decorridas 24 horas foram triturados de mistura com 4 cm³ de solução fisiológica. A emulsão obtida serviu para inocular duas cobaias (Nos. 24.281 e 24.282) pela via subcutânea. Em ambas se evidenciou a presença de vírus, pois sofreram infecção típica. A cobaia No. 24.282 no 8.º dia após a inoculação ou 5.º da temperatura elevada, foi sangrada e sacrificada. Tanto com o sangue, como com o cérebro deste animal de prova foram obtidas séries positivas de passagens de vírus de cobaia a cobaia, conservando as propriedades primitivas do vírus.

3a. Experiência. Uma outra experiência de transmissão foi feita com uma fêmea de *Amblyomma striatum*, colocada a sugar cobaia infetada com o vírus *BI'* no período da circulação do vírus e retirada 24 horas depois, quando parcialmente alimentada. Seis dias depois de permanecer a 35°C, esta fêmea foi colocada sobre cobaia normal durante 4 dias, sendo retirada engorgitada. A cobaia utilizada não apresentou febre maculosa, nem mesmo inaparente.

A seguir a fêmea cheia de sangue foi mantida à temperatura ambiente do laboratório (cerca de 22°C), iniciando a desova 20 dias depois. Os ovos postos nas primeiras 48 horas, em número aproximadamente de 150, foram lavados repetidas vezes, triturados de mistura com 3 cm³ de solução fisiológica. O material obtido foi inoculado em duas cobaias, recebendo cada animal pela via subcutânea 1.5 cm³ da emulsão. Estas cobaias não se infetaram e, quando reinoculadas com vírus de passagem, não se mostraram protegidas.

Decorridos mais 6 dias, com os ovos resultantes da postura feita nos 6 dias anteriores, repetimos a experiência, inoculando duas cobaias pela via subcutânea com o resultado da trituração de mistura com salina. Ambas reagiram tipicamente, inclusive com reação escrotal intensa. Uma morreu da infecção; a outra foi sangrada no 7.º dia, quando em plena reação febril, e o sangue obtido, inoculado em duas novas cobaias. Sacrificadas logo depois, retiramos o



cérebro e com êle preparamos u'a emulsão, que após ligeira centrifugação foi utilizada para inocular duas cobaias.

Tanto as cobaias inoculadas com sangue, como com cérebro, se infetaram e reagiram tipicamente, fornecendo passagens positivas em série. Em uma delas foi possível evidenciar a presença de riquetsias no exame feito no exsudato peritoneal.

O ixodida fêmeo utilizado nestas experiências morreu 6 dias mais tarde, isto é, 44 dias depois da alimentação infetante. Vinte e quatro horas após a morte foi triturado e o material resultante inoculado em duas cobaias. Estas não apresentaram reação típica de febre maculosa, porém, quando reinoculadas 15 dias depois, mostraram proteção para o vírus homólogo. Isto permite concluir que as riquetsias mortas aí existentes ainda foram antígenicamente capazes de provocar imunidade.

RESUMO

Amblyomma striatum se infecta ao se alimentar em cobaia infetada pelo vírus da riquetsiose mexicana em estudo e pode transmitir por picada a infecção.

Fêmeas de *Amblyomma striatum*, alimentadas em cobaia infetada, dão postura a ovos, que a partir do terceiro dia da desova podem fornecer emulsões infetantes.

ABSTRACT

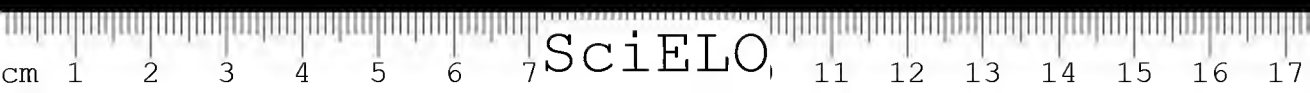
Amblyomma striatum is infected experimentally when feeding on guinea-pig infected with the Mexican spotted fever virus and transmits the infection by bite.

Female specimens of *Amblyomma striatum*, fed on infected guinea-pig, give posture to eggs, which render infectious emulsions from the third day of posture on.

BIBLIOGRAFIA

1. Bustamante, M. E. & Varela, G. — Una nueva rickettsiosis en Mexico. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa y Sonora. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 4:189-210, 1943.
2. Bustamante, M. E. & Varela, G. — Aislamiento de una cepa de fiebre manchada idéntica a la de las Montañas Rocosas en Sinaloa, Mexico. *Bol. Of. San. Pan.*, 23: 117-118, 1944.

3. *Vallejo-Freire, A.* — Spotted fever in Mexico. Immunological relationship between the virus of the rickettsiosis observed in Sonora and Sinaloa, Mexico, and other Spotted Fever viruses. *Mem. Inst. Butantan*, 19:159-180, 1946.
4. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Características de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa, Mexico. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 5:129-1936, 1944.
5. *Mariotte, C. E., Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico). *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 5:297-300, 1944.
5. *Gomes, L. Salles.* — Typho exanthematico de São Paulo. *Brasil-Medico*, 47:923-926, 1933.
7. *Travassos, J.* — La tique *Amblyomma striatum* Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infections naturelles en specimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la capitale (São Paulo). *C. R. Soc. Biol.*, 127:1377-1380, 1938.
8. *Travassos, J.* — Études expérimentales sur la transmission tu typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma striatum* Koch, 1844. *C. R. Soc. Biol.*, 127:462-464, 1938.
9. *Travassos, J.* — Transmission expérimental du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908. *C. R. Soc. Biol.*, 127:1375-1376, 1938.



O CRESCIMENTO INTERFÁSICO DO NÚCLEO

Pesquisas cariométricas sôbre a espermatogênese dos ofídios ()*

POR GIORGIO SCHREIBER

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

SUMÁRIO

I) INTRODUÇÃO

- a) O problema do crescimento interfásico do núcleo.
- b) Os fundamentos do método cariométrico no estudo da interíase.
 - 1) Relações entre genoma e volume nuclear.
 - 2) Variações rítmicas do volume nuclear com módulo 1:2.
 - 3) Variações rítmicas do volume nuclear com módulo diferente de 2.
 - 4) Variações rítmicas do volume nuclear em sentido diminutivo.
 - 5) Fins do trabalho.

II) MATERIAL E MÉTODO

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

III) RESULTADOS

IV) DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

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

V) RESUMO — ABSTRACT — RIASSUNTO.

VI) BIBLIOGRAFIA

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

Recebido para publicação em 22-4-947.

I) INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

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

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

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

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

* * *

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

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

Outra possibilidade do estudo do aumento nuclear existe com as culturas "in vitro" e de fato a escola russa de Wermel (38) alcançou resultados básicos que serão examinados mais adiante.

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

Para resumir estes fenômenos podemos dizer que:

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

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

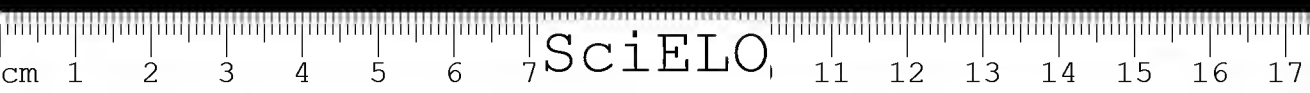
Para fazer um confronto com o processo de crescimento geral dos organismos (ao qual com toda probabilidade se submetem os núcleos também) podemos dizer que o crescimento do núcleo se pode representar por uma série de curvas "S" sucessivas, cada uma das quais representando um ciclo de duplicação dos gens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

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

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

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

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



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

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

O número de plasmomas, reiletindo o número de "nucleolar organizers" indica o número de cromonemas e portanto, dos genomas.

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

* * *

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

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



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

Jacobj encontra na comparação entre núcleos de células hepáticas embrionárias, que ele considera como "Grundform" ou medida básica, com as espermátidas, uma relação de mais ou menos 1:1.3. Ele considera essa diferença como não significativa e devida principalmente à diferente embebição de água (Wasseraufnahme).

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

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

Voltaremos em seguida sobre este ponto que nos parece de maior interesse na interpretação da natureza destas classes de frequência intermediária. É importante, todavia, frisar que Jacobj não dá a eles a importância devida. Sucessivamente Freerksen (19), aluno de G. Hertwig encontra valores de frequência máxima que estão em relação de mais ou menos 1:1.3. Estes valores são encontrados nos eritroblastos dos quais ele reconhece gerações sucessivas de tamanho decrescente.

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

como reais exceções à lei da duplicação e não como fenômenos concomitantes de ordem metabólica. Wermel e Scherschulskaya (59) encontraram a relação 1:1.5 entre dois modos do volume nuclear das células gordurosas do bicho da seda. Bogoyawlen-ky (8), da mesma escola russa, encontrou valor 1:1.5 (média de 1,7 — 1,6 — 1,42 — 1,49) entre as classes de frequência máxima nas células do intestino médio do mosquito.

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

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

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

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

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

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



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

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

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

1023:2144:2752:3918.

I II III IV

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

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

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

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

* * *

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

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

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

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

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

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



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

* * *

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

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

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

* * *

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



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

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

* * *

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

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

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

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

* * *

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

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

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

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

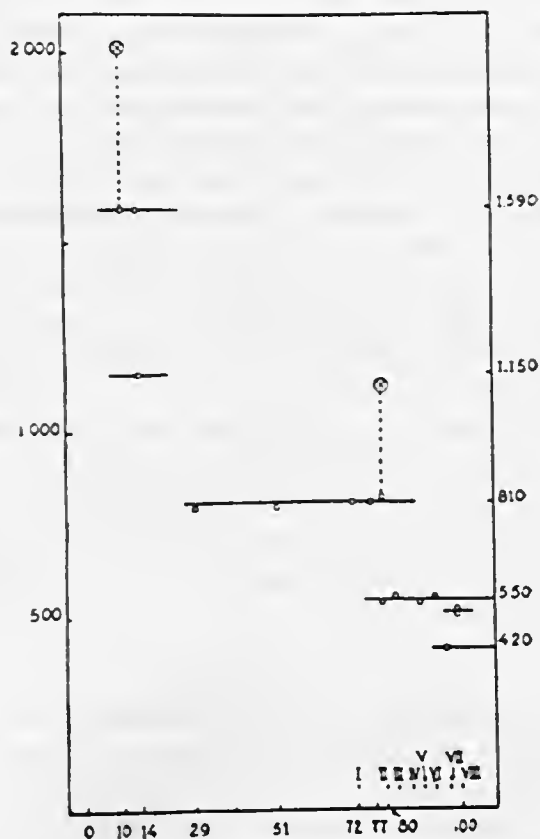


FIG. 1

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

Em abscissas — estádios de desenvolvimento (dias).

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

⊕ profases.

(de Schreiber & Romano-Schreiber modificado.)

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

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

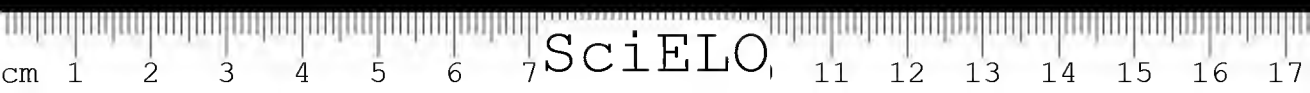
Também no *Bufo*, como foi mencionado para carpa o diferenciamiento histológico do fígado e o início da sua funcionalidade coincide com o volume mínimo alcançado pelo núcleo.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

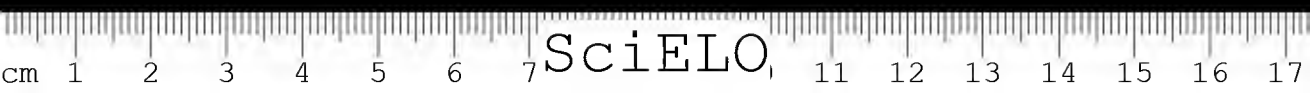
Já mencionamos que uma possibilidade de esclarecer este problema é o estudo cariométrico dos poliploides. Muitos trabalhos foram feitos especialmente no campo botânico neste sentido. G. Schreiber (52) verificou mais uma vez esta correlação numa série de plantas poliploides de *Coffea*, e analisou nesta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

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

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

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

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



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

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

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

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

* * *

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

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

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

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

* * *

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

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

II) MATERIAL E MÉTODOS

a) *Escolha do material*

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

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

b) *Técnica histológica e embriológica*

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

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

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

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

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

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

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

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

c) *Elaboração estatística dos resultados*

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

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

onde L_{mo} é o limite inferior da classe modal, F é a frequência da classe superior à da moda f a inferior e i é o intervalo de classe (0.5) (Arkin e Colton, 2).

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

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

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

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

(**)

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

III) RESULTADOS

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

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

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

* * *

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

Fam. BOIDAE

sub-fam. *Boinae*

Constrictor constrictor constrictor L. (97)

Fam. COLUBRIDAE

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

Fam. CROTALIDAE.

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

* * *

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

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

* * *

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

Fam. BOIDAE

Sub-fam. *Boinae*

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

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

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

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

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

O diagrama de correlação (Fig. 2 B) mostra uma perfeita correlação entre os valores modais e o valor múltiplo do genoma haploide. A segunda moda do histograma das espermatogônias coincide perfeitamente com o valor $3n$ e quando diagramado em abcissa $2n$ está num valor de ordenada bem além de $3 Sy$ (Diferença entre valor do espermatogônio $2n$ e 2a. moda é de $345 ; 3 Sy = 88.05$).

TABELA I

Constrictor constrictor constrictor L. (97)

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

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

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

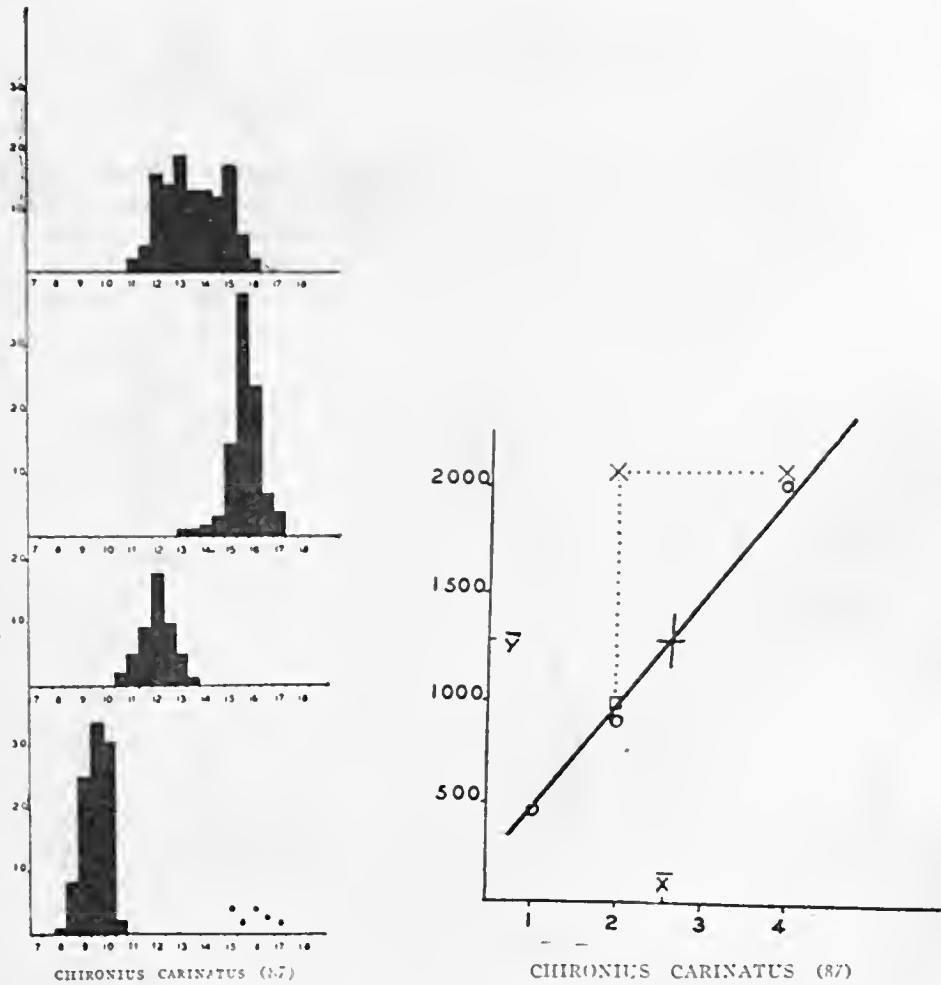


FIG. 3 A e B.

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

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

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

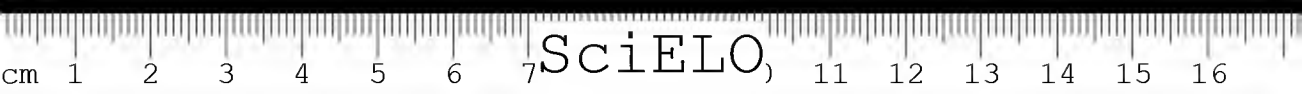
O diagrama da Fig. 4B indica uma correlação bastante boa entre volume e cromosômios da série meiótica. O volume modal das espermatogônias como nos casos precedentes discorda com o valor diploide sendo aproximadamente concordante com o valor 3n. A diferença entre o valor teórico 2n e o valor real é ligeiramente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

TABELA III

Xenodon merremii Wagler (19)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					
8.5					7
9					33
9.5				1	41
10				0	35
10.5				6	5
11	2			21	
11.5	5			32	
12	7			36	
12.5	13			14	
13	14			6	
13.5	17			1	
14	17	1	7		
14.5	10		4		
15	4	1	10		
15.5	4		19		
16	1		18		
16.5			12		
17		1	7		
17.5			3		
18			2		
18.5			1		
Modas	1233	—	2132	805	449

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



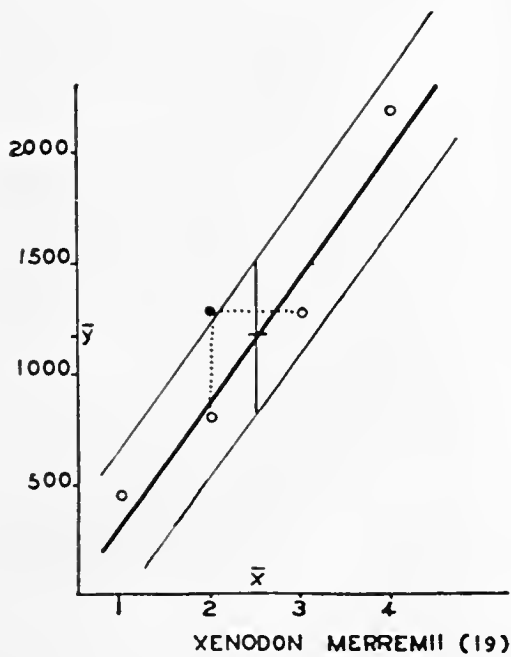
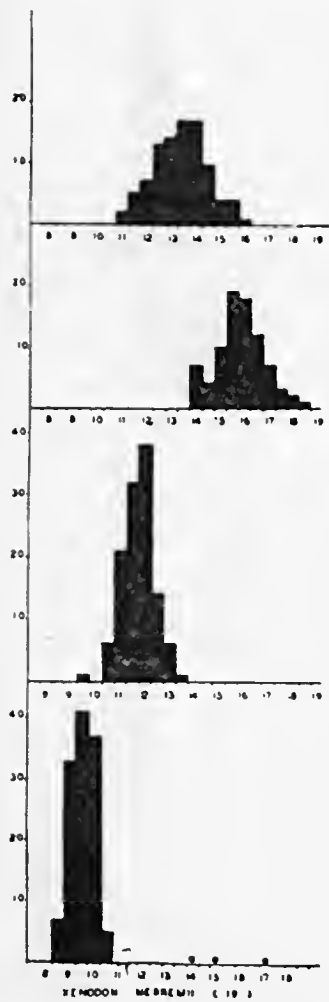
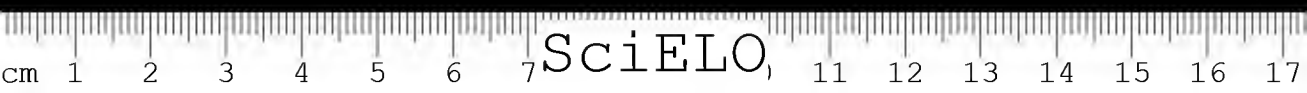


FIG. 4 A e B.



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

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

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

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

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

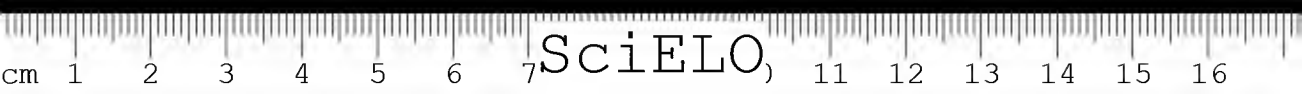
O diagrama de correlação, Fig. 5 B revela uma perfeita correlação entre os valores meióticos e a diferença com o valor diploide do volume espermatogonial significante sendo o erro de estimação muito pequeno.

TABELA IV

Xenodon merremii Wagler (65)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Idc.
8					6
8.5					25
9					34
9.5					25
10				1	15
10.5				5	3
11	5			9	
11.5	2			22	
12	7			47	
12.5	20			18	
13	36			13	
13.5	46		1	5	
14	34		2	1	
14.5	22	2	7		
15	26	8	17		
15.5	6	8	20		
16	1	5	15		
16.5	0	5	13		
17	1	1	9		
17.5		0	5		
18		1	3		
Modas	1475.5	1951	1933	904.7	383.7

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



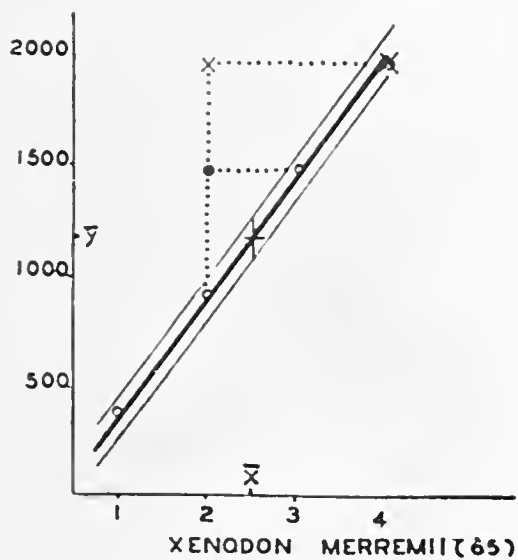
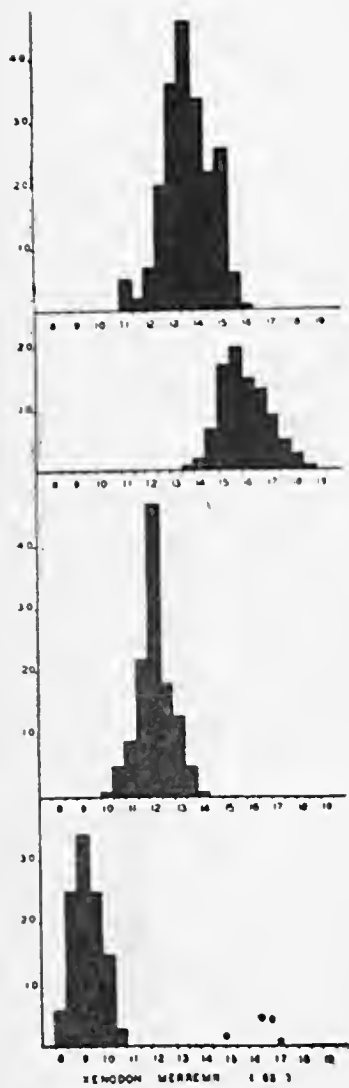
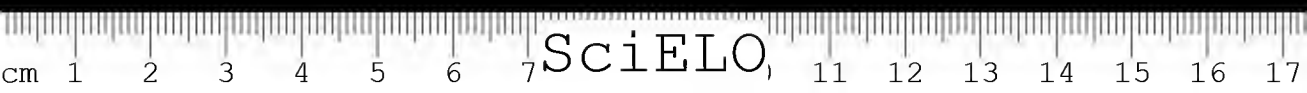


FIG. 5 A B



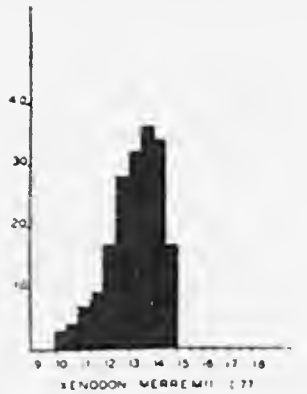


FIG. 6

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

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

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

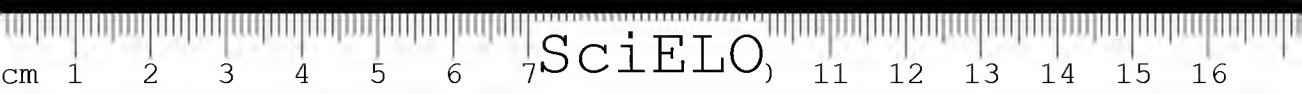
Como será discutido mais adiante este fato indica que estes espermatogônias estão em atividades multiplicativas, embora fraca.

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

TABELA V

Xenodon merremii Wagler (77)

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



Sub-fam. *Boiginae**Pseudoboa trigemina* D. & B. (Prot. 17) Tab. VI

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

Espermatogônias com 6.5% de proíases. Espermatocitas de 1a. ordem, abundantes em tôdas as fases auxocitárias e írequentes as 1as. metáfases.

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

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

TABELA VI

Pseudoboa trigemina D. e B. (17)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II Ide.
8				
8.5				16
9				43
9.5				26
10	2			25
10.5	2			9
11	3			19
11.5	10			21
12	4			29
12.5	8			10
13	4		1	6
13.5	12		1	0
14	17		3	0
14.5	15		10	1
15	12	1	27	1
15.5	3	0	14	
16	1	4	15	
16.5	0	1	12	
17	1		1	
17.5			1	
18			2	
18.5				
19				
Modas	900.3 1544	Média 2110	1942	441.8 845

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

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

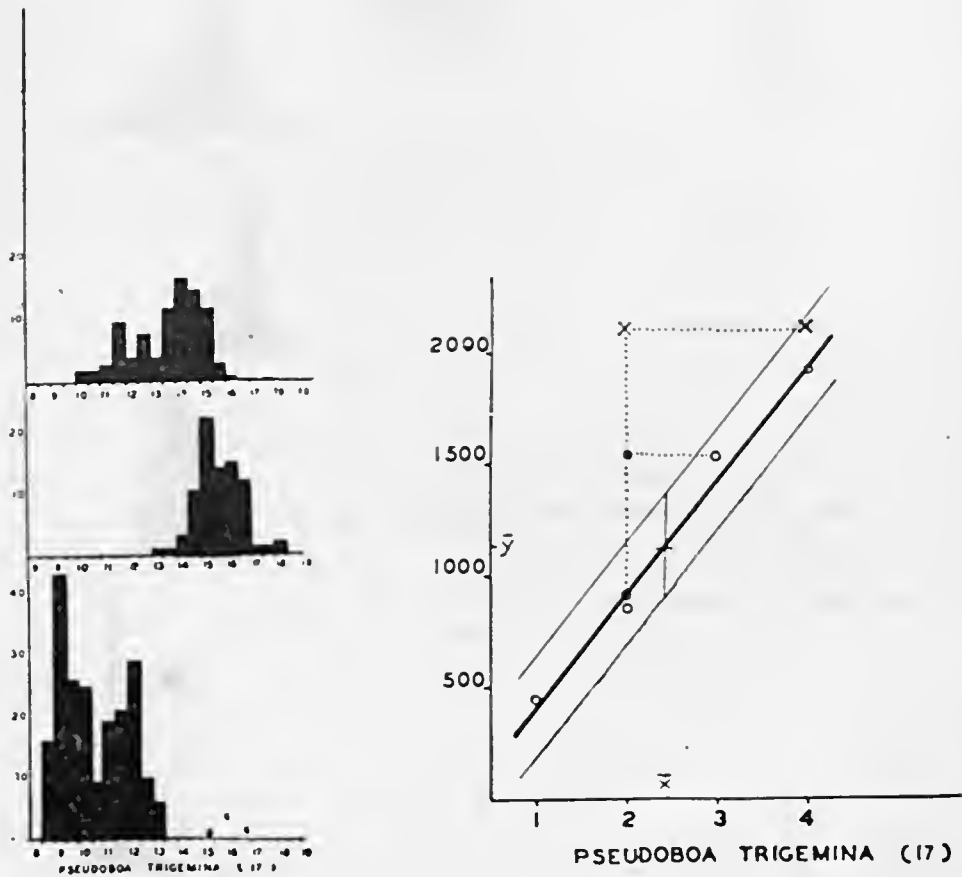


FIG. 7 A e B

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

Indivíduo de 26 centímetros fixado em 5 de setembro de 1945. Histo-logicamente o testículo é imaturo. Os túbulos têm lúmen oco, porém, sem espermatozóides formados e as fases espermiogonéticas são totalmente ausentes.

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

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

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

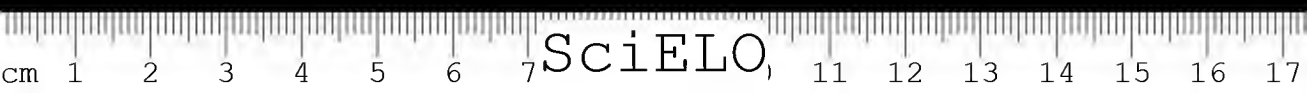
O diagrama de correlação (Fig. 8 B) é muito nítido e o valor modal espermatogonial bem coincidente com o de $3n$ e a diferença com o de $2n$ fortemente evidente.

TABELA VII

Dryophylax pallidus pallidus L. (27)

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1204.8 \\ b' &= 471.37 \\ \overline{Sy} &= 27.26 \\ \sqrt{Sy} &= 71.78 \\ d &= 465.3 \end{aligned}$$



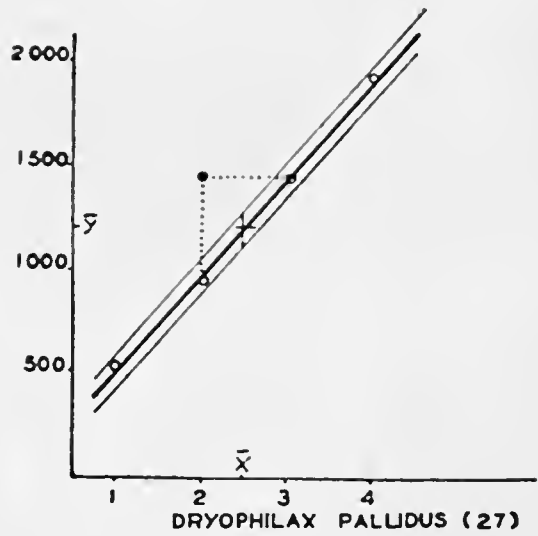
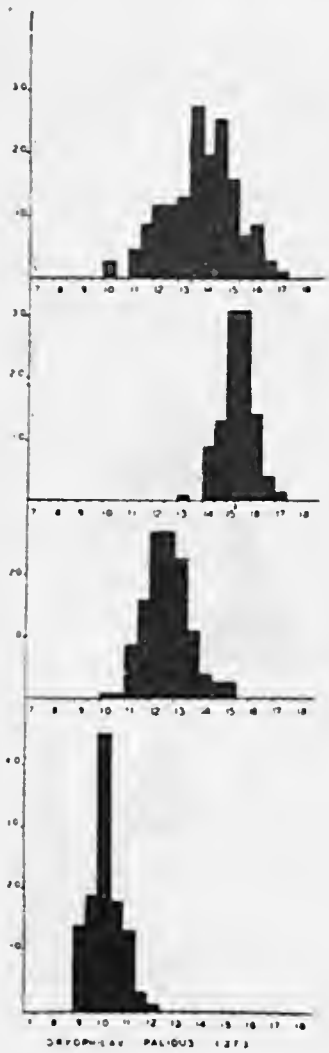


FIG. 8 A e B

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

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

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

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

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

TABELA VIII

Tomodon dorsatus D. e B. (68)

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 1371.6 \\ b' &= 575.2 \\ \overline{Sy} &= 51.4 \\ \sqrt[3]{\overline{Sy}} &= 154.2 \\ d &= 623.5 \end{aligned}$$

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

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

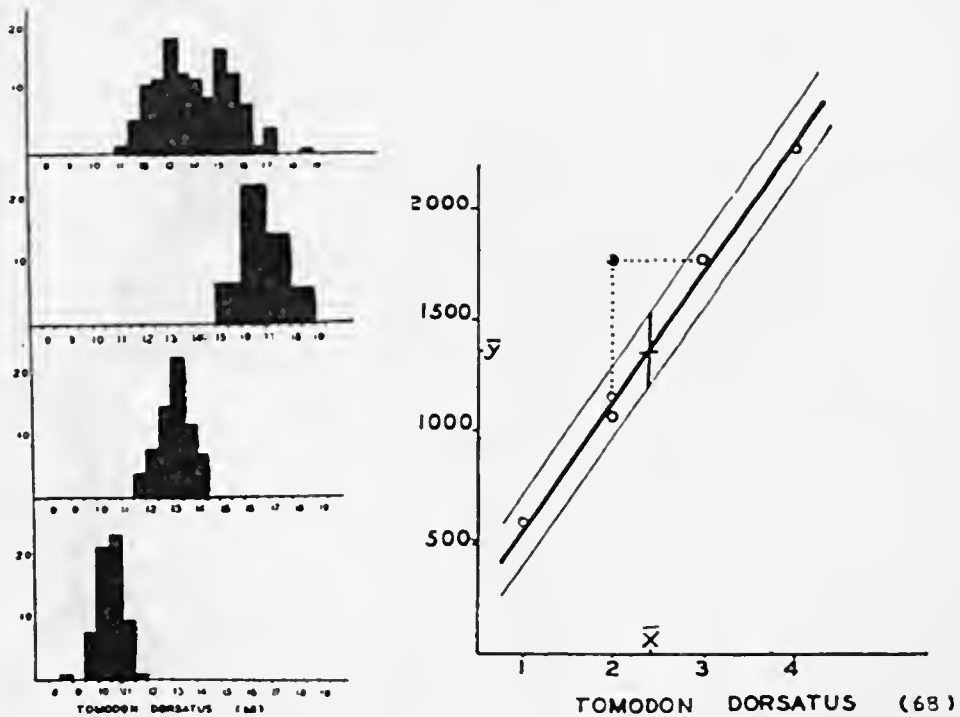
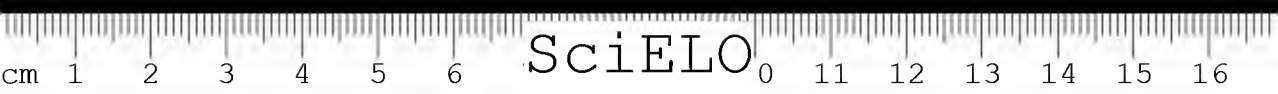


FIG 9 A e B.



Phylodryas olfersii Lichtenstein (Prot. 66) Tab. IX.

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

Espermatocitas de primeira ordem raras. Algumas profases goniais.

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

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

TABELA IX

Phylodryas olfersii (Lichtenstein) (66)

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1010 \\ b' &= 472.5 \\ \bar{S}_y &= 117.2 \\ \bar{3} \bar{S}_y &= 351.6 & \bar{2} \bar{S}_y &= 238.1 \\ d &= 348.25 \end{aligned}$$

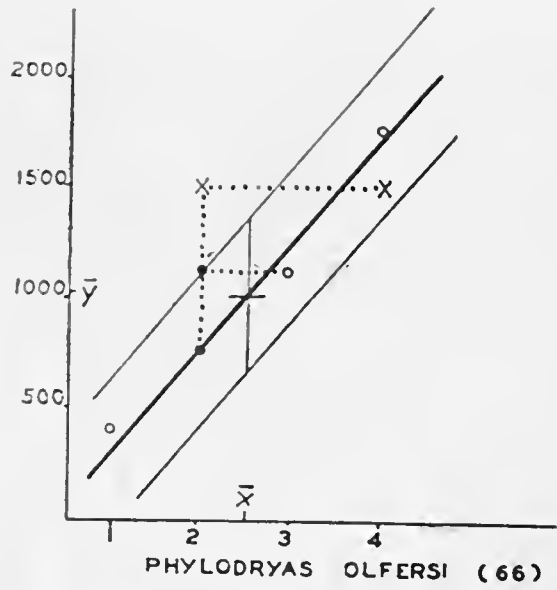
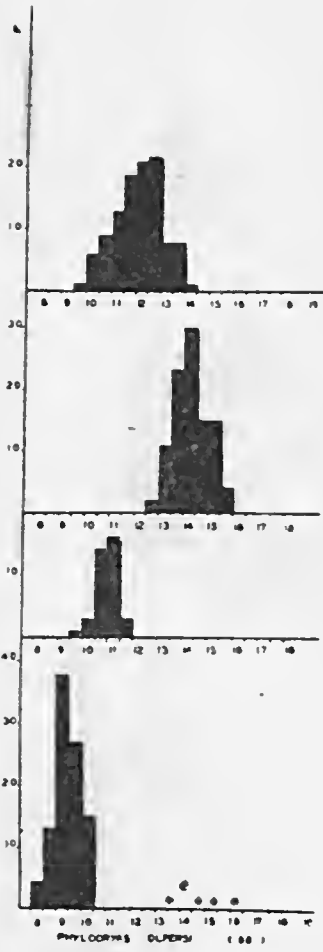


FIG. 10 A e B.



Phylodryas schottii Schlegel (Prot. 1) Tab. X.

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

Abundantes os auxócitos em todas as fases de crescimento e notável abundância de metafases 1.^a. Raríssimas as profases espermatogoniais.

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

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

TABELA X

Phylodryas schottii (Schlegel) 1.

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 950.8 \\ b' &= 462.5 \\ \bar{S}_y &= 141.6 \\ 2\bar{S}_y &= 283.2 \\ 3\bar{S}_y &= 424.8 \\ d &= 298.5 \end{aligned}$$

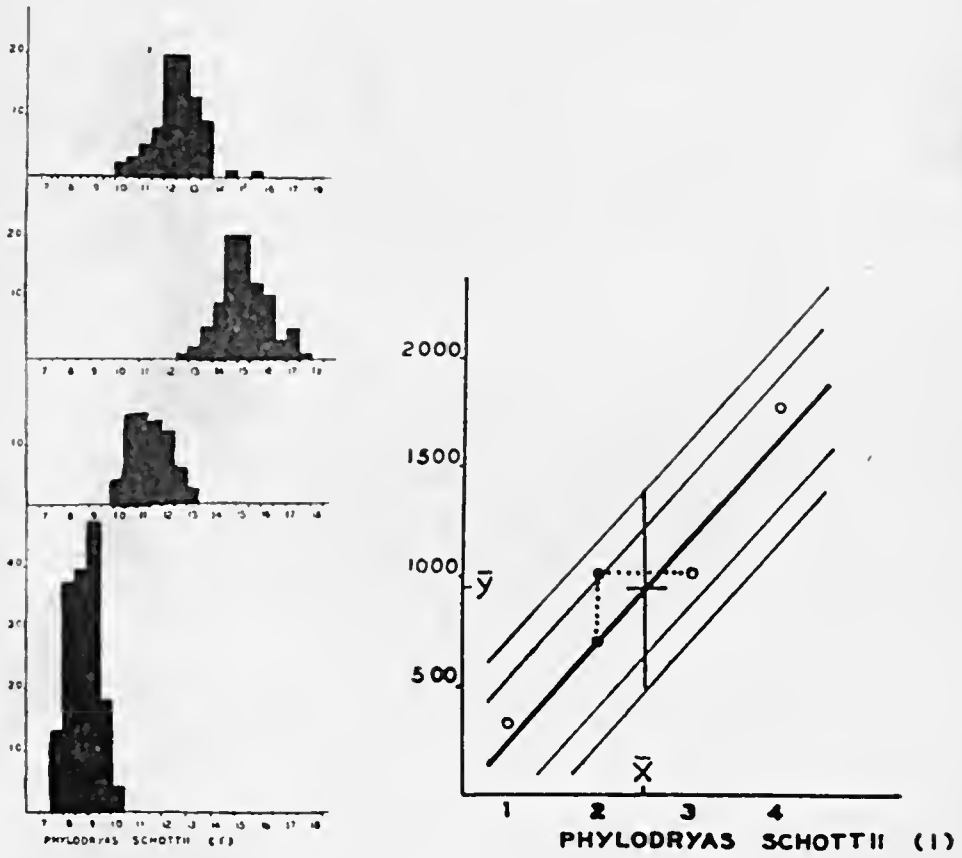


FIG. 11 A e B

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

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

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

Algumas fórmulas de espermatídias em via de transformação em espermatozóide dão a impressão de ser devidas à fusão de dois espermatídias.

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

TABELA XI

Philodryas schottii (Schlegel) (15)

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 924.8 \\ b' &= 396.5 \\ \overline{Sy} &= 100.2 \\ 3\overline{Sy} &= 300.6 \\ d &= 292 \end{aligned}$$

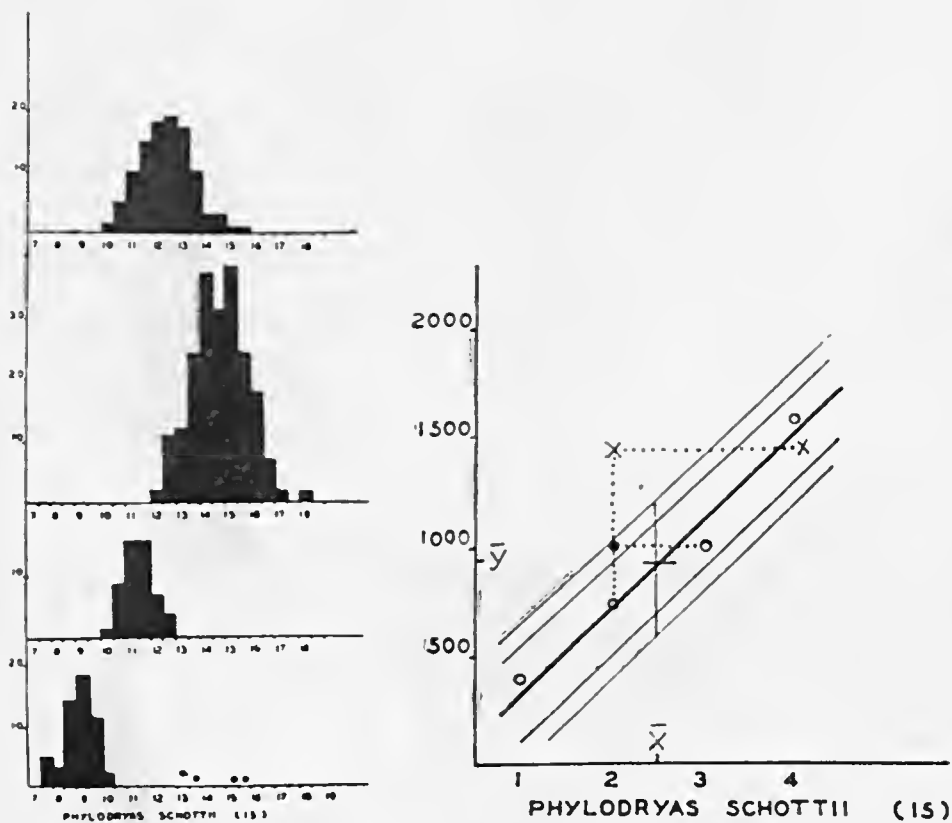


Fig 12 A e B

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

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

Fam. CROTALIDAE

Sub-fam. *Lachesinae**Bothrops (Trimerisurus) atrox* L. (Prot. 84) Tab. XII.

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

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

Espermatócitos de 1.^a ordem escassos prevalentemente em leptoteno. Espermátogônias com raras proiases (3,2%).

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

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

TABELA XII

Bothrops atrox L. (84)

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

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.4 \\ \bar{y} &= 770.6 \\ b' &= 310.6 \\ \bar{S}_y &= 46.5 \\ \sqrt{S_y} &= 139.5 \\ d &= 259 \end{aligned}$$

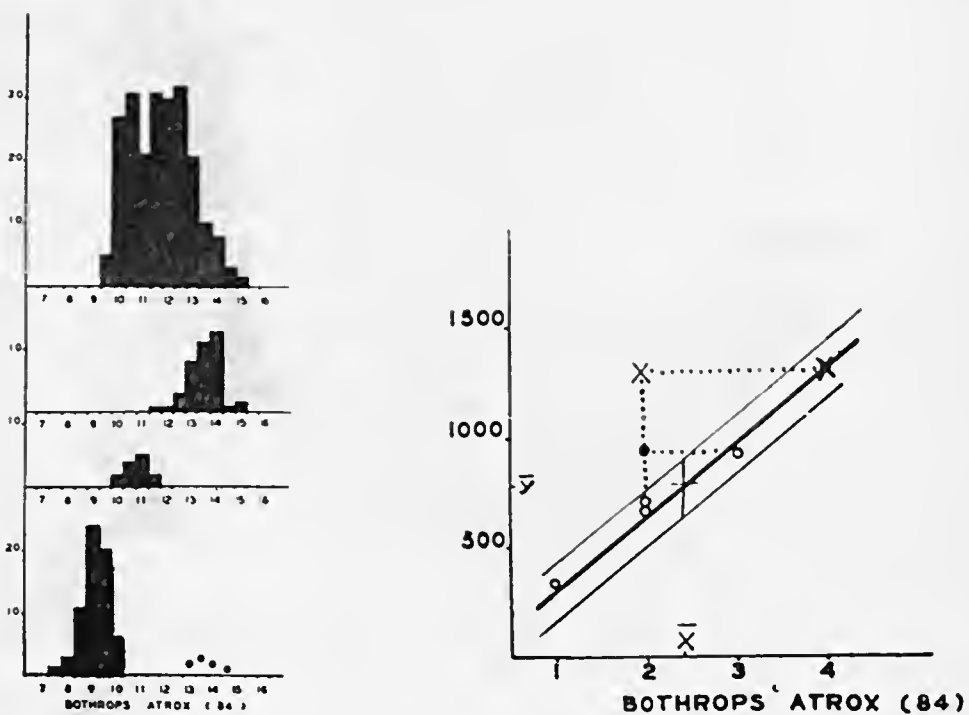


FIG. 13 A e E

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

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

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

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

TABELA XIII

Bothrops jararaca (Wied) (47)

Diametro	Gonia	Profase gonia	Cit. I	Cit. II	Ide.
8					5
8.5					8
9					20
9.5					30
10	1			2	6
10.5	3			4	
11	5			14	
11.5	9			13	
12	17			13	
12.5	16			9	
13	31			4	
13.5	27				
14	40		9		
14.5	26		14		
15	14		23		
15.5	0	1	27		
16	3	1	12		
16.5	0		6		
17	0		3		
17.5	1		2		
18					
18.5					
19					
Modas	1294	Média 2047	1731	851.5	390

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 2.5 \\ \bar{y} &= 1079 \\ b' &= 460.16 \\ \overline{Sy} &= 15.38 \\ \sqrt[3]{Sy} &= 46.14 \\ d &= 445 \end{aligned}$$

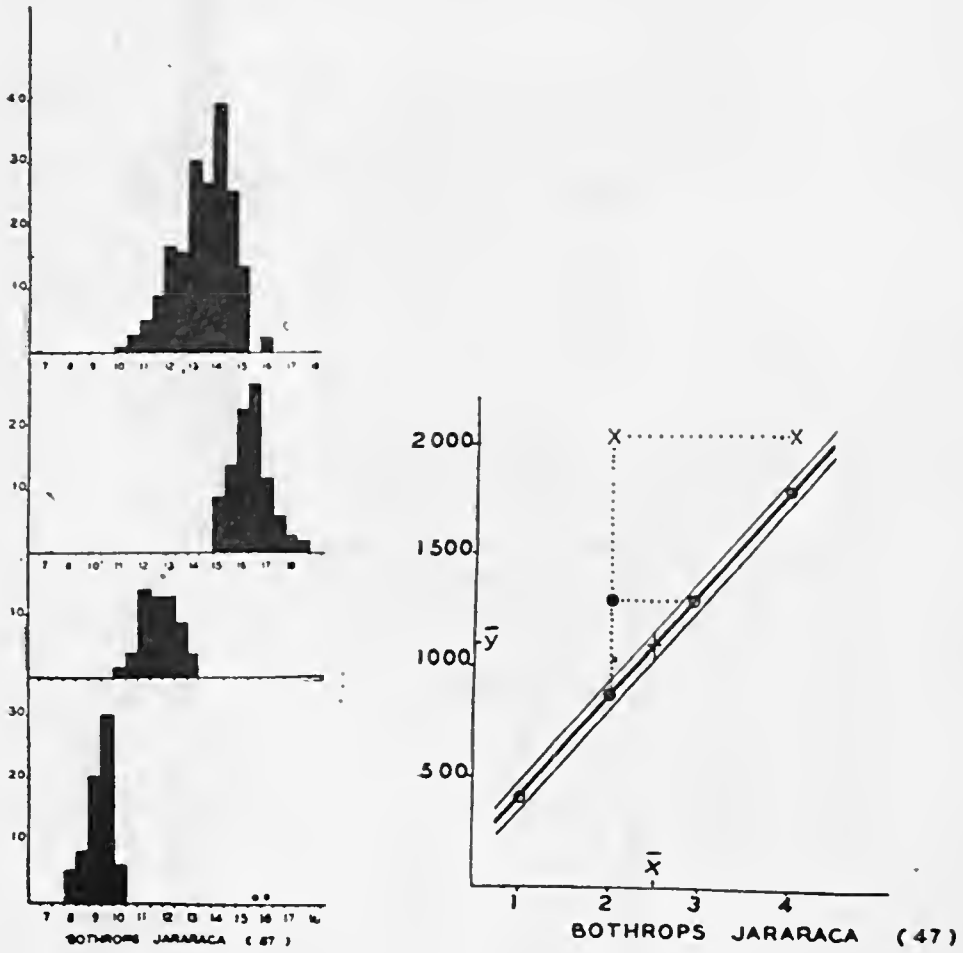
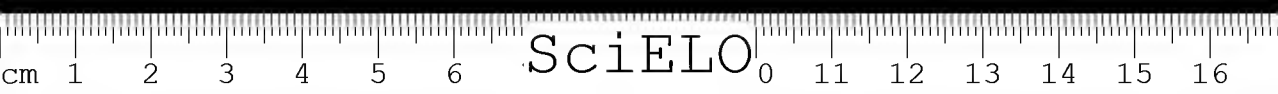


FIG. 14 A e B



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

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

Fase predominante é a de espermatócita de 1.^a ordem. Abundantes as espermatogônias, porém, com poucas mitoses (3,5%).

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

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

TABELA XIV

Crotalus terrificus L. (61)

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

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

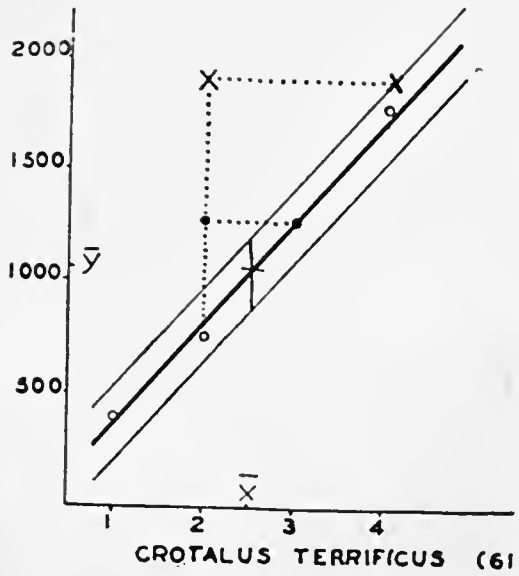
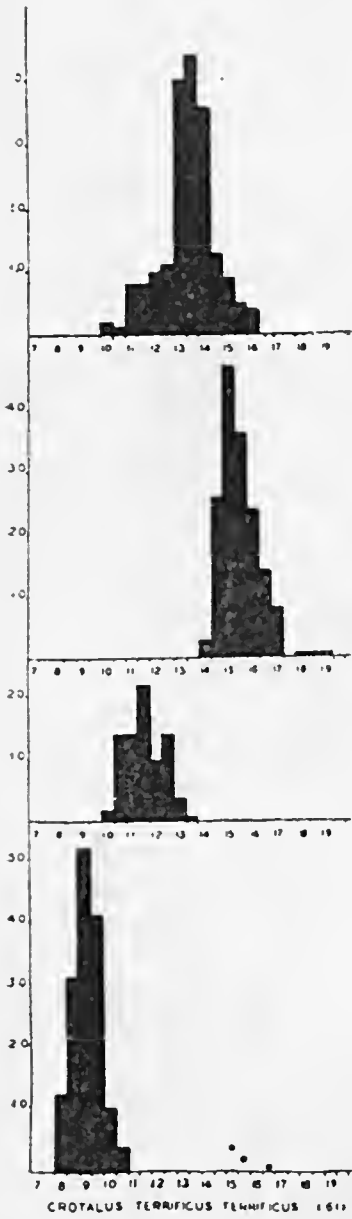


FIG. 15 A e B

IV) DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

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

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

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

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

TABELA XV

Volume nuclear (valor modal) dos estádios espermatogênicos

Espécie	Espermatídias	Esp. cit II	Espermatogonias			Esp. cit I
			2n	(3n)	Prof. 4n	
<i>Constrictor constrictor constrictor</i> 97	452	808	795	1155	—	1568
<i>Herpetodryas carinatus</i> 87	449	904	—	—	2082	2027
<i>Xenodon merremii</i> 19	449	805	—	1288	—	2132
<i>Xenodon merremii</i> 65	383	904	—	1475	—	1953
<i>Xenodon merremii</i> 77	—	—	—	1287	—	—
<i>Pseudoboa trigemina</i> 17	442	845	900	1544	2110	1942
<i>Dryophylax pallidus</i> 27	522	950	—	1436	—	1931
<i>Tomodon dorsatus</i> 68	589	1071	1147	1765	—	2286
<i>Phyllodryas olfersi</i> 66	406	763	—	1122	1504	1750
<i>Phyllodryas schottii</i> I.	324	701	—	1018	—	1760
<i>Phyllodryas schottii</i> 15	389	705	—	1018	1460	1597
<i>Bothrops atrox</i> 84	306	663	697	905	1288	1279
<i>Bothrops jararaca</i> 47	390	852	—	1294	2047	1781
<i>Crotalus terrificus</i> 61	386	782	—	1270	1900	1785
Médias	414	825	884	1271	1765	1824

TABELA XVI

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

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

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

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

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

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

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

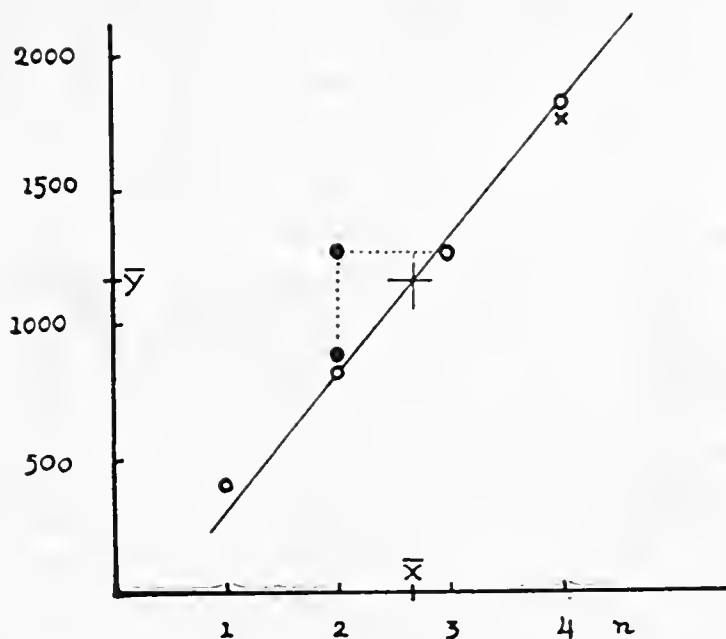


FIG. 16.

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

- — série meiótica
- — espermatogonia (interfase)
- x — espermatogonia (profase)

b) A "sesquifase" no ciclo mitótico

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

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

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

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

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

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

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

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

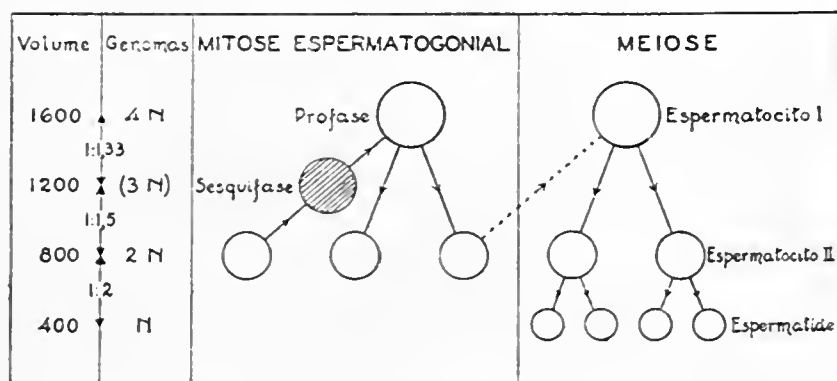


FIG. 17
Explicação no texto

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

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

c) A "ritmicidade do crescimento interfásico"

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

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

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

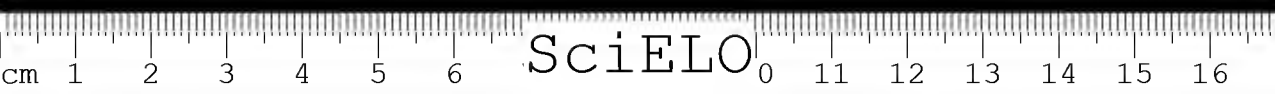
A validade do postulado da relação entre número de cromossômios e volume nuclear existe, portanto, somente no confronto das etapas entre as fases de crescimento nuclear e não durante os períodos de crescimento durante os quais o conjunto deste sistema nuclear se encontra "em movimento" químico e físico-químico.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

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

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

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

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



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

V) RESUMO

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

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

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

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

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



ABSTRACT

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

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

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

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

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

RIASSUNTO

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



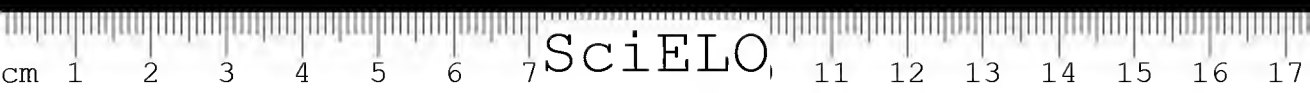
aploide è perfettamente noto. Venne discussa la parte teorica del problema consistente nel fatto che nello studio statistico di nuclei in accrescimento i valori modalis delle curve di frequenza corrispondono a pause dello accrescimento stesso.

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

Lo spermatogonio si comporta diversamente avendo un ciclo di mitosi con accrescimento interfascico che si estende per un intervallo di duplicazione del genoma. Lo studio cariometrico di queste cellule mostra che vi sono tre valori modalis, uno corrispondente al valore diploide, l'altro a quello tetraploide e corrisponde alla profase goniale. Tra questi due valori che limitano l'intervallo di duplicazione vi è una terza moda che in tutte le specie studiate è quella predominante, ad un valore esattamente corrispondente ad un genoma di $3n$ cioè 1.5 volte la moda diploide. Questa fase nella quale i nuclei dello spermatogonio si fermano per una pausa durante l'accrescimento interfascico è stata chiamata precedentemente dall'A. "sesquifase" ed è interpretata come il risultato della duplicazione indipendente e sfasata nel tempo dei due genomi aploidi del nucleo diploide dello spermatogonio. Non viene per ora chiarito con questo se i due genomi corrispondono a cromosomi di egual origine gametica oppure se la duplicazione prematura avviene in un "set" aploide di cromosomi assortiti a caso ed indipendentemente dalla loro origine gametica. Altre interpretazioni però sono prospettate. Come conclusione fondamentale di queste ricerche risulta che il nucleo interfascico cresce a cicli ("Rhythmische Wachstum") di Jacoby e che i volumi finali di ogni ciclo corrispondono a valori multipli interi del genoma aploide il quale per ciò si può considerare come una unità nel processo di duplicazione che caratterizza l'interfase.

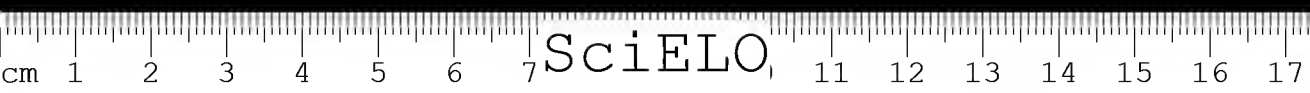
BIBLIOGRAFIA

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

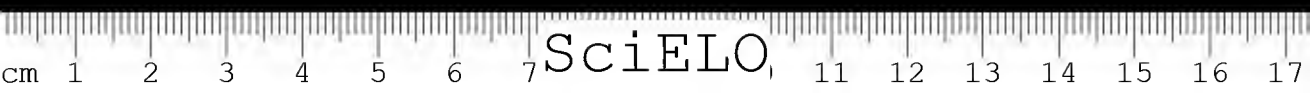


5. Biesele, J. L. — Chromosome complexity in regenerating rat liver, *Cancer Research*, 4:232-235, 1944.
6. Biesele, J. J. — Chromosomes in Lymphatic Leukemia of C58 Mice. *Cancer Research*, 7:70-78. 1947.
7. Biesele, J. L., Poyner, H. & Painter, Th. — Nuclear phenomena in mouse cancer. *The University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

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



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



NOTAS ERPETOLOGICAS

2. *Dimorfismo sexual nos Boídeos*

POR A. HOGE

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Desde muito tempo são conhecidas as variações a que estão sujeitos os esporões pélvicos dos Boídeos, variações estas ligadas ao sexo.

Boulenger. 1913. chama a atenção para este ponto "Spurs usually visible externally at least in males".

Stickel & Stickel, 1946, mencionam dados não publicados de Blanchard sobre o dimorfismo sexual verificado nos esporões de Boídeos Americanos.

Dwight, 1936, referindo-se aos esporões dos Boídeos escreve "In the male of many species this structure is a comparatively large, curved hook, whereas in the females is its often reduced to a tiny horny projection (fig. 32). It is not known whether the hypertrophy of this structure in males is correlated with the onset of puberty, and the material at hand is not extensive enough to determine this by an examination of series of immature and adult specimens of both sexes".

Stickel & Stickel, 1946, estudam a forma e o tamanho dos esporões no *Enygrus* em relação ao tamanho total e à maturidade sexual: "The spurs are present in all males of the series. They are well developed even in the newly born (200-250 mm. size group). Spurs are absent in all the juvenile females studied. Spurs are absent in six of the nine females of mature size (1. 3. in 67 per cent). When spurs are present in females they are about half as long as in the male snakes of similar total length, and are more or less concealed by the surrounding scales. The spurs of males are curved into a hook in females the spurs are straighter and more uniformly tapered. The spurs of males do not undergo a sudden growth at the onset of puberty. Instead, they are conspicuous at birth, and inspection of the graph suggests that they developed gradually in direct proportion to the growth of the snake in total length. The left and right spurs are usually of the same size, but in either sex one spur may be as much as twice as long one on the opposite side".

Recebido para publicação em 25-6-47.

Examinando exemplares de *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758), com o fim de verificarmos a ocorrência do dimorfismo sexual nos esporões, notamos ausência do ilio nos exemplares, fêmeas de serpentes desta espécie. O exame de todos os exemplares da coleção do Instituto Butantan, veio confirmar a nossa primeira observação.

MATERIAL E MÉTODOS

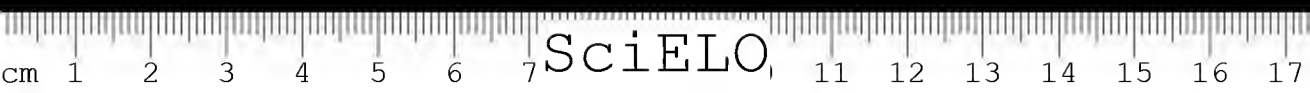
O material examinado consta de 52 exemplares conservados, sendo 23 machos e 29 fêmeas. Além destes espécimes, examinamos vários exemplares vivos, a fim de podermos julgar das eventuais modificações, determinadas pela conservação durante longo período de tempo.

Os esporões e ilios foram medidos por meio de um calibrador, permitindo desta maneira maior exatidão nas medidas. Para a confecção dos gráficos tomamos somente em consideração as medidas da parte visível dos esporões, isto é, da parte não recoberta pelas escamas, porque notamos que o dimorfismo sexual é mais pronunciado em relação a esta medida do que em relação à do comprimento total dos esporões. Quando havia diferença de tamanho entre o lado direito e o esquerdo, tomavamos sempre em consideração a medida máxima.

Os ossos pélvicos com os respectivos esporões foram sempre que possível tirados do lado esquerdo, a fim de se deixar o outro lado intacto para futuras observações ou verificações; em seguida eram medidos e montados em laminas numeradas e fichadas.

RESULTADOS

Esporões — Podemos resumir da seguinte maneira as nossas observações sobre os esporões pélvicos: o maior comprimento da parte visível dos esporões nos machos, isto é, da parte não recoberta pelas escamas, é devida não somente a um maior tamanho deste órgão, mas também em grande parte à presença de um ilio (fig. 1), que impele o esporão para fora evitando que esteja parcialmente recoberto pelas escamas vizinhas; em todos os machos os esporões estão presentes e bem visíveis, mesmo nos recém-nascidos; o crescimento dos esporões é proporcional ao aumento do comprimento total da serpente, não estando por conseguinte o desenvolvimento deles ligado à puberdade; nos esporões das fêmeas, quando presentes, a parte visível é aproximadamente 3 vezes menor do que nos machos de tamanhos correspondentes; nas fêmeas os esporões não são aparentes na classe de 500 a 1000 mm; os valores encontrados nos machos não se afastam muito da linha de regressão; nas fêmeas a dispersão é muito maior (gráfico 1) quanto a forma, os esporões dos machos são mais recurvados do que os das fêmeas (fig. 1), o que concorda com as observações de Stickel & Stickel no *Enygrus*.



Ilio — O exame dos exemplares confirma a nossa primeira observação sobre a ausência do ílio nas fêmeas de *Constrictor constrictor constrictor* (L.).

O exame dos gráficos permite as seguintes conclusões: o ílio é completamente inexistente em todos os exemplares examinados; em todos os machos estudados o ílio é sempre presente e bem ossificado (num único exemplar No. 7597, o ílio apresentava uma forma fibrosa).

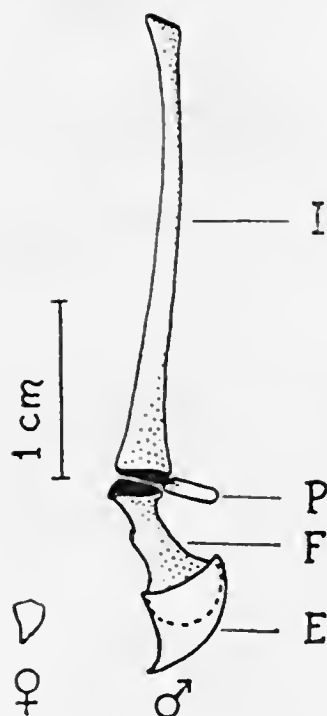


FIG. 1

Ossos pelvicos e esporão de *Constrictor constrictor constrictor*

- I — ílio
- P — ischio-pubis
- F — femur
- E — esporão

A regressão do comprimento do ílio sobre o comprimento total da cobra segue visivelmente uma reta até o tamanho de 2000 mm. Um exemplar de mais de 2500 mm apresenta uma notável redução do tamanho do ílio em relação ao comprimento total (gráfico 2). Si conseguimos um grande número de exemplares de *Constrictor constrictor constrictor* entre 2000 e 3000 mm poderemos verificar si se tratou de uma dispersão maior nestes tamanhos ou si se trata de uma curva de saturação ao invés de uma reta, razão pela qual deixamos pelo momento de fazer o estudo estatístico da curva.

Lista dos exemplares de *Constrictor constrictor constrictor* (L)

N.º na col. Inst Butantan	Procedência	Sexo	Esporoões mm.	Compr. total mm.	Fio mm.
6284	Corrego Fundo, S. Paulo, Brasil	♂	0,8	480	3,8
2143	Sem procedência	♂	0,0	490	3,8
7544	Lins, S. Paulo, Brasil	♂	0,9	495	4,2
7492	Sapezal, S. Paulo, Brasil	♂	0,7	500	5,7
8504	Santa Lina, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	510	0,0
6915	Araguary, Minas Gerais, Brasil	♂	0,5	520	5,0
7903	Santa Adelia, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	525	0,0
7839	Matão, S. Paulo, Brasil	♂	0,8	535	4,2
9085	Saint Martin, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	550	0,0
8760	Monção, Rio de Janeiro, Brasil	♂	0,0	560	0,0
9626	Oiti, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	560	0,0
6135	Lins, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	565	0,0
7546	Lins, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	610	0,0
8761	Monção, Rio de Janeiro, Brasil	♂	1,4	625	3,0 Quebrado
8428	Itapetininga, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	630	0,0
8641	Santos, S. Paulo, Brasil	♂	1,4	645	4,8
7501	Piratininga, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	650	0,0
7597	Continental, S. Paulo, Brasil	♂	1,1	645	5,0 Fibroso
8308	Ipanema, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	650	0,0
6968	Vera Cruz, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	660	0,0
7148	Ribeirão Preto, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	670	0,0
9627	Pirajui, S. Paulo, Brasil	♂	1,2	680	4,9
7852	Loreto, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	770	0,0
5828	Passagem, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	770	0,0
5829	Franca, S. Paulo, Brasil	♂	2,1	800	4,3
4503	Tapajóz, Pará, Brasil	♂	0,0	800	0,0
10089	Porto Berrio, Colombia	♂	1,5	800	7,6
9095	Monção, Rio de Janeiro, Brasil	♂	2,0	870	7,0
5830	Monlevade, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	880	0,0
5827	Barretos, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	900	0,0
5831	Lins, S. Paulo, Brasil	♂	2,0	985	8,7
9731	Maceió, Alagoas, Brasil	♂	0,0	1010	0,0
9722	Maceió, Alagoas, Brasil	♂	0,0	1020	0,0
10769	Toriba, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	1020	0,0
10011	Terenos, Mato Grosso, Brasil	♂	0,0	1020	0,0
1496	Ribeirão Bonito, S. Paulo, Brasil	♂	2,2	1170	14,2
1615	Iguatemi, S. Paulo, Brasil	♂	2,1	1210	13,0
1427	Sampaio Vidal, S. Paulo, Brasil	♂	1,3	1270	0,0
5637	Taunay, Mato Grosso, Brasil	♂	3,1	1380	18,0
—	Serpentario do Instituto Butantan	♂	3,2	1400	20,8
—	Serpentario do Instituto Butantan	♂	0,6	1530	0,0
10896	Canindé, S. Paulo, Brasil	♂	0,0	1540	0,0
5650	Santa Adelia, S. Paulo, Brasil	♂	0,5	1540	0,0
7495	Pocatuha, Sergipe, Brasil	♂	3,7	1545	18,7
—	Serpentario do Instituto Butantan	♂	4,0	1580	?
—	Serpentario do Instituto Butantan	♂	3,7	1590	23,5
2005	Trinidad?	♂	0,0	1610	0,0
275	Pernambuco (Estado), Brasil	♂	2,6	1690	0,0
—	Serpentario do Instituto Butantan	♂	1,3	1760	0,0
1536	Sorocaba, S. Paulo, Brasil	♂	5,5	1960	26,5
731	Sorocaba, S. Paulo, Brasil	♂	1,5	2015	0,0
4620	São Fidelis, Ipca, Rio de Janeiro, Brasil	♂	5,6	2670	23,5

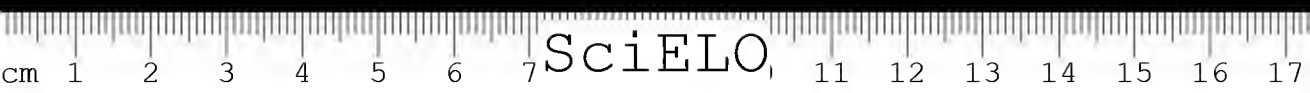
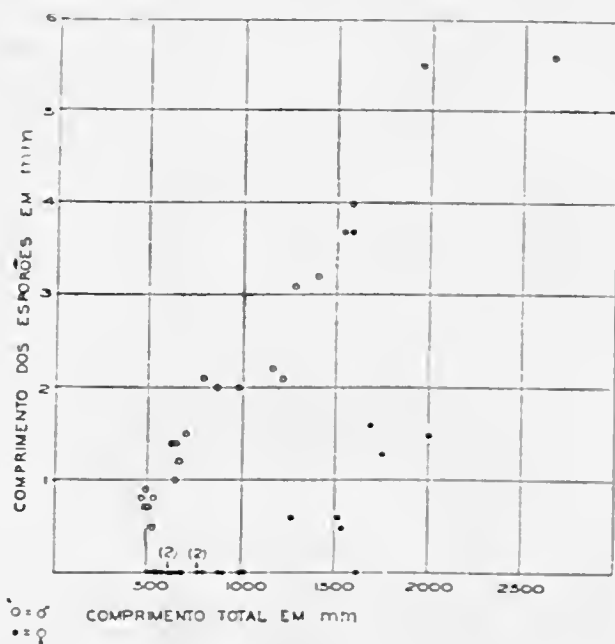


GRÁFICO I

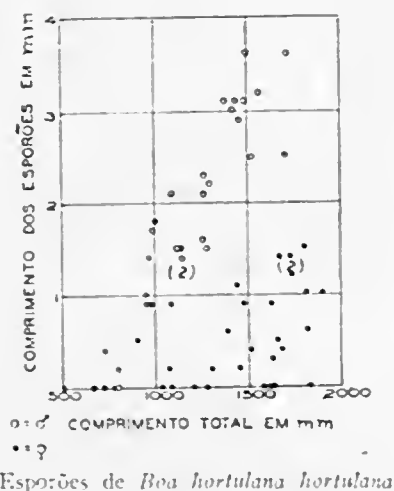


Como nos outros Boídeos e ilio dá inserção a vários músculos. A contração destes músculos projeta o esporão para fora ficando desta maneira completamente liberado das escamas vizinhas.

A mobilidade dos esporões devida à contrações musculares parece-nos mais um argumento em favor da atuação dos esporões, seja como fixadores, seja como excitadores durante a copula.

Examinado alguns exemplares de *Constrictor constrictor imperator* (Daudin, 1803), *Constrictor constrictor occidentalis* (Philippi, 1873), *Constrictor constrictor mexicanus* (Jan. 1864), notamos também maior comprimento dos esporões nos machos e a falta de ilio nas fêmeas, porém o número relativamente reduzido de exemplares não nos permitiu conclusões definitivas.

GRÁFICO III



Examinamos também séries de *Boa hortulana hortulana* (L. 1758), *Boa hortulana cookii* (Gray, 1842), *Epicrates ceuchria ceuchria* (L. 1758), *Epicrates ceuchria crassus* (Cope, 1862), assim como alguns exemplares de *Boa conina* (L. 1758), e outros Boídeos, não observamos a ausência de ilio nas fêmeas. Possivelmente o exame de maior número de exemplares destas espécies e espécies de gêneros afins confirmará a nossa impressão de tratar-se de um possível carácter genérico.

Existem dimorfismo sexual seja quanto ao comprimento, seja quanto ao volume do ilio nas espécies onde as fêmeas são providas deste osso.

No que concerne o maior desenvolvimento dos esporões dos machos, o facto parece ser geral para os Boídeos. Damos a título de comparação um gráfico mostrando a relação entre o comprimento dos esporões e o comprimento total em *Boa hortulana hortulana* (L.) (gráfico 3).

RESUMO

São aqui estudadas as relações entre o comprimento dos esporões e o comprimento total em *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758), onde se demonstra o marcado dimorfismo sexual.

É descrito como caracter sexual, a ausência de ílio nas fêmeas dessa mesma espécie, com a provável generalidade do fenômeno no gênero *Constrictor*.

Depende a aceitação do fenômeno como caracter genérico do exame de maior número de exemplares entre os representantes do gênero *Constrictor* e gêneros afins.

ABSTRACT

This paper deals with the relation between length of spurs and total length of *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758). The existence of marked sexual dimorphism could be shown.

Absence of the Ilium in females of this species is described as a sexual character and the hypothesis put forward that this peculiarity is a possible generic character for the *Constrictor* genus.

Further examination of large series of the various species of the *Constrictor* genus and related genus are necessary in order to appreciate the significance of this phenomenon as generic character.

ZUSAMMENFASSUNG

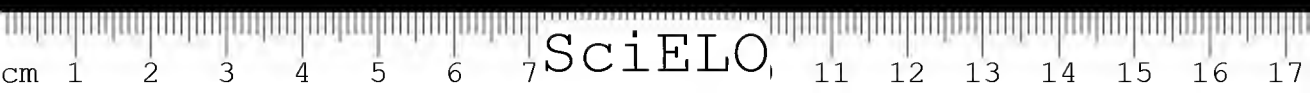
In vorliegender Arbeit werden Beziehungen zwischen der Laenge der Nagelglieder und der totalen Laenge von *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758) studiert und der ausgesprochene sexuelle Dymorphismus dargelegt.

Die Abwesenheit des Iliums der Weibchen der gleichen Spezies wird als Geschlechtscharakter beschrieben und dieses Merkmal wird als ein moegliches generisches Merkmal, das allen Weibchen des Genus *Constrictor* zkommt, dargestellt.

Die Gewissheit dieses generischen Geschlechtsmerkmals haengt von der Untersuchung und Vergleichung einer groe-seren Anzahl von Tieren von der Gattung *Constrictor* und anderen verwandten Gattungen ab.

BIBLIOGRAFIA

1. Boulenger, G. A. — The snakes of Europe, London, 1913, v. 11, pp. 269.
2. Dwight, E. D. — Courtship and mating behavior in snakes, *Zool. Scr. Field. Mus. Nat. Hist.*, 20:257-290, 1936.
3. Stickel, W. H. & Stickel, L. F. — Sexual dimorphism in the pelvic spurs of *Enygrus*. *Copeia*, 1:10, 1946.



NOTAS OFIOLÓGICAS

20. *Descrição do alotipo de Dryophylax rutilus Prado, 1942*

por ALCIDES PRADO

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A presente descrição já devia ter saído há mais tempo. Motivos vários obrigaram-me a retardá-la, sem prejuízo, entretanto, de qualquer natureza, no que respeita à sistemática.

Trata-se, ao que me parece, de uma boa espécie, a qual, agora completada pelo exame do hemipenis, separa-se perfeitamente de sua afim *Dryophylax pallidus strigillis* (Thunberg, 1787). É bem verdade que na primeira publicação, seu relato firmou-se num exemplar que foi escolhido para tipo, e em quatro outros, que foram considerados como paratipos. Mesmo assim, alguns caracteres foram no presente melhor estudados, inclusive o da pupila, que é muitas vezes de difícil observação neste grupo de animais.

Dryophylax rutilus Prado

♂ — Corpo cilíndrico. Cabeça pouco distinta do pescoço. Olho moderado, com pupila elíptica-vertical. Cauda um tanto longa, com ponta afilada.

Rostral pouco mais larga do que alta, apenas visível de cima; internasais quase tão largas quanto longas, mais curtas do que as prefrontais; estas últimas também quase tão largas quanto longas; frontal quase 2 vezes tão longa quanto larga, pouco mais longa do que sua distância da extremidade do focinho, mais curta do que as parietais; loreal mais longa do que alta; 1 preocular que atinge a parte superior da cabeça; 2 postoculares; temporais 2+3; 9^o supralabiais, 5.^a e 6.^a junto ao olho; 5 infralabiais em contacto com a mental anterior, que muito mais desenvolvida do que a posterior. Escamas lisas, sem fossetas apiculares, em 19. Ventrals 134; anal dividida; subcaudais 72/72.

Recebido para publicação em 1.º de julho de 1947.

Colorido mais ou menos semelhante ao da fêmea: cinza-olivácea em cima, com manchas negras parecidas com pingos de tinta, entremeadas de outras claras; cabeça da cor geral, porém com um traço negro lateral que vai do olho atrás à comissura labial; lábios branco-amarelados, debruados de negro, e com u'a mancha vermelha, orlada de negro externamente, sobre a parte posterior da 6.^a infralabial (7.^a no tipo); partes inferiores amareladas, com uma barra avermelhada, guarnecida de pontos negros, em cada uma das margens das ventrais, além de pontilhados negros medianos, em linha.

Hemipenis simples, capitato, com cálices abundantes na porção apicilar, cerca de $\frac{1}{3}$ do órgão (os cálices ocupam a metade apicilar em *D. pallidus strigilis*); cálices arredondados, superficiais e semi-franjados (mais profundos e imperceptivelmente franjados em *D. pallidus strigilis*); sulco bifurcado; espinhos numerosos na parte não calculada, aumentados gradativamente de tamanho de cima para baixo, e esparsos na porção basilar (espinhos proporcionalmente maiores, e os da porção basilar muito grandes em *D. pallidus strigilis*).

Comprimento total 482 mm; cauda 135 mm.

Alotipo, adulto é, sob o No. 10.563, na coleção do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.

Procedência: Lauro Müller, E. F. Noroeste do Brasil, S. Paulo, com data de recebimento: 12-10-1945.

RESUMO

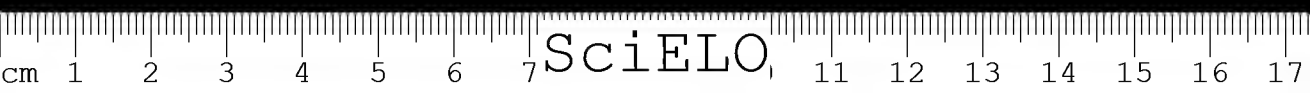
Descreve-se o alotipo de *Dryophylax rutilus* Prado, 1942, espécie que foi, na primeira publicação, considerada afim de *Dryophylax pallidus strigilis* (Thunberg, 1787), da qual parece separar-se perfeitamente.

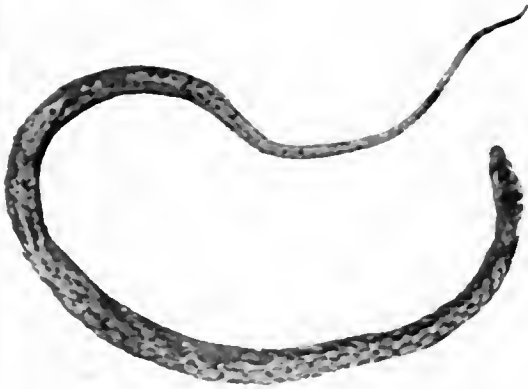
ABSTRACT

Description of the allotype of *Dryophylax rutilus* Prado, 1942, in a former paper, this species was considered german to *Dryophylax pallidus strigilis* (Thunberg, 1787) from which it can be separated perfectly.

BIBLIOGRAFIA

Prado, A. — *Ciência* (México) 3(7):204, 1942.

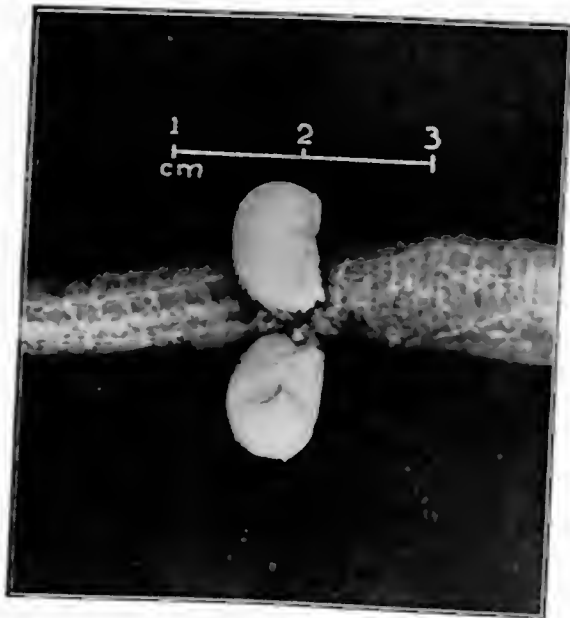




Dryophylax rutilus Prado, ♂
(face dorsal)



Dryophylax rutilus Prado, ♂
(face ventral)



Dryophylax rutilus Prado,
(hemipenis)



SciELO

NOTAS ERPETOLÓGICAS

3. *Uma nova espécie de Trimeresurus*

por A. HOGE

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Ao examinarmos um lote de cobras procedentes dos arredores de Pau Gigante, Espírito Santo, Brasil, foi a nossa atenção despertada pelo aspecto delgado e colorido diferente de alguns exemplares de *Trimeresurus*. Um exame mais minucioso indicou-nos tratar-se de uma espécie nova que dedicamos ao Dr. Alcides Prado, Chefe da Secção de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan.

MATERIAL E MÉTODOS

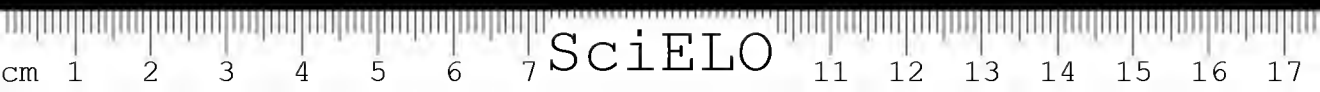
O material que serviu para descrição da nova espécie consiste em 20 exemplares todos procedentes dos arredores de Pau Gigante no Espírito Santo, Brasil.

As medidas de comprimento do corpo foram feitas por meio do metro comum, enquanto as medidas das cabeças foram executadas por meio de um calibre permitindo leituras da ordem de 0.1 mm.

O comprimento da cabeça que usamos no trabalho é dado pela distância entre a extremidade do focinho e a parte posterior da mandíbula, esta medida conforme já observou Klauber é praticamente igual ao verdadeiro comprimento da cabeça do momento que se toma esta medida com um ângulo pequeno relativo a linha mediana do corpo.

O estado de conservação dos exemplares não permitiu medidas muito exatas. Para o estudo da regressão do comprimento da cabeça sobre o comprimento do tronco *Trimeresurus pradoi* usamos o método dos mínimos quadrados e graduamos uma reta de equação $Y = 3.635 + 0.0385 X$ com erro-padrão da estimativa igual a 1,008. A propriedade desta adaptação é assegurada pelo quociente $F = 252,28$ (para $n_1 = 1$ e $n_2 = 17$) entre a variância devida à regressão e a variância residual.

Recebido para publicação em 10 7-47.



O material que serviu para comparação dos caracteres é uma amostra de *T. atrox* (L), infelizmente extremamente heterogenea, tanto quanto a procedência quanto no que concerna o estado de conservação.

Graduamos também uma reta de regressão para esta espécie; $Y = 4,2124$ $0,4354 X$. Os hemipenis foram preparados segundo a técnica corrente no Instituto ou seja, injetados com parafina quente depois de terem sido devaginados, e a base ligada.

Trimacrusurus pradoi, sp. n.

Descrição do holotipo: ♂, sob No. 10.603, na coleção do Instituto Butantan (fig. 1).

Rostral mais alta do que larga; nasal dividida; escamas da cabeça pequenas e fortemente carinadas, em 10 séries entre as supraoculares que são grandes e mais alongados do que se observa em *T. atrox* (L); duas internasais; cantais bem desenvolvidas; duas postoculares; uma subocular, separada das supralabiais por uma série de pequenas escamas; 7 supralabiais, 2.^a formando o bordo anterior da fosseta lacrimal; poro nasal ausente; infralabiais 9-10 dorsais em 25 séries fortemente carinadas (carena alta e larga); ventrais 203; anal inteira; subcaudais 63/63.

Coloração cinza-parda, com manchas escuras dispostas em forma triangular, separadas por um grupo de 10 manchas pequenas (fig. 2).

Ventrais largamente maculadas de pardo-cinza escuro (fig. 5); supralabiais e labiais fortemente manchadas de escuro. Uma estria escura do olho até o canto da boca; cabeça com um grupo de manchas apenas distintas.

Comprimento total.	1110 mm
Cauda	140 mm
Cabeça	39,3 mm

Procedência — Pau Gigante, Estado do Espírito Santo, Brasil

Recolhente — Dr. Annibal Pereira

Descrição do alotipo: ♀, No. 10.694 na coleção do Instituto Butantan.



FIG. 1
Trimeresurus pradoi, sp. n.

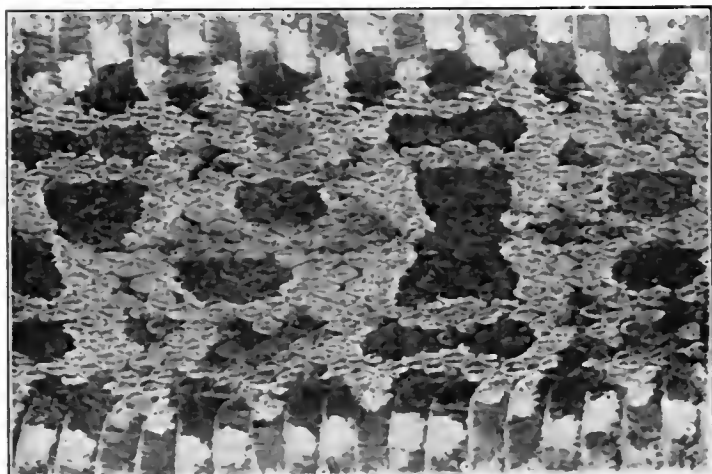


FIG. 2
Marcas dorsais dos adultos de *T. pradoi*

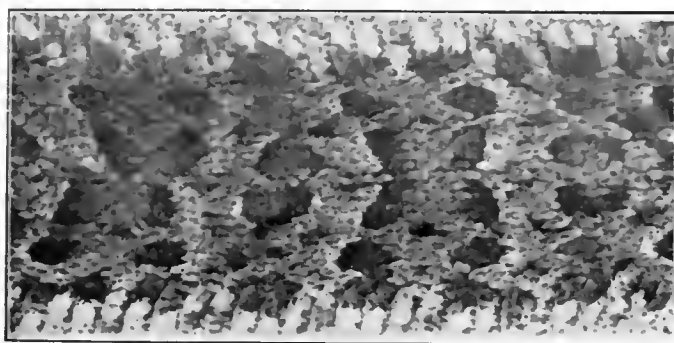


FIG. 3
Marcas dorsais dos jovens de *T. pradoi*

Dorsais em 25 séries; ventrais 203; caudais 59/59. Colorido e desenho iguais aos do holotipo porém as manchas ventrais um pouco mais claras (conservação ?).

Comprimento total. 845 mm
Cauda 110 mm
Cabeça 32,6 mm

Mesma procedencia do que o holotipo.

Paratipos. ♂♂ No. 10.602, 10.605, 10.606, 10.608, 10.609, 10.610, 10.690
10.692 e 10.693

♀♀ No. 10.599, 10.600, 10.601, 10.607, 10.611, 10.687, 10.688,
10.689 e 10.691. Todos na coleção do Instituto Butantan. Procedentes de Pau
Gigante, Espírito Santo, Brasil.

Marcas dorsais — Dividimos as marcas dorsais em dois sistemas; um principal e um acessorio (fig. 4).

Sistema principal {
marcas paraventraes (D.)
marcas laterais (A.)
marcas marginaes (B.)
marca adicional (C.)

As marcas laterais consistem em duas manchas dispostas em triângulo nos jovens (fig.3), fundindo-se nos adultos (fig.2) de maneira a formar marcas trapezoidais, fundidas ou alternadas com as do lado oposto. As marcas marginaes consistem em duas manchas colocadas na base das laterais e formando com estas uma marca triangular.

Existe uma pequena mancha entre as laterais e as marginaes (c.) que nos adultos funda-se as vezes com as duas laterais.

As paraventraes consistem em uma série de manchas que se alternam com as marginaes, ocupando a parte externa das ventrais, e a 1.ª e 2.ª série de dorsais, estendendo-se ao longo de todo o corpo.

Sistema acessorio {
marcas vertebraes (a.)
marcas paraventraes (b.)
marcas perifericas (c.)

Das marcas do sistema acessorio só duas são muito distintas, são as paraventraes, opostas ou alternadas. As outras manchas, vertebraes e perifericas circundam as paraventraes e são menos nitidas.

Colorido — O colorido geral é pardo cinzento não apresentando o aspecto aveludado que se observa em *T. atrox* (L). O ventre é largamente maculado de pardo cinzento (fig.5).

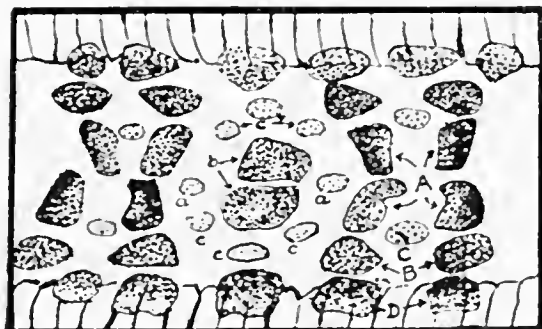


FIG. 4

Esquema das marcas dorsais em *T. pradoi*.

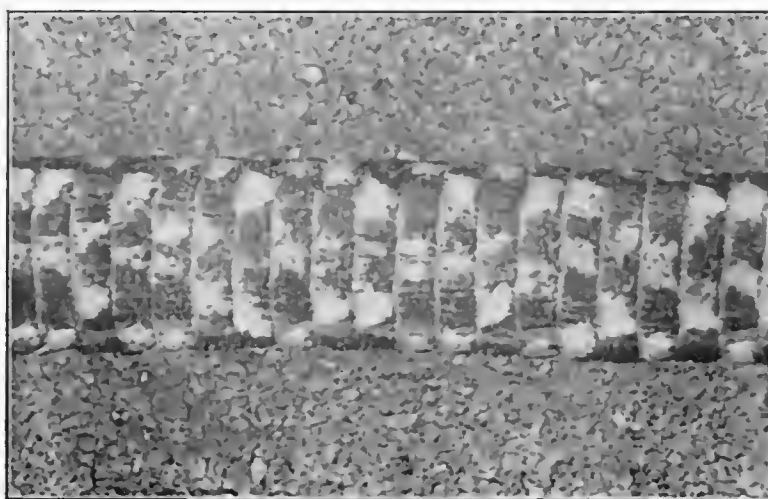


FIG. 5

Desenho ventral de *T. pradoi*

Cabeça — Estudando a regressão do comprimento da cabeça sobre o comprimento do corpo graduamos uma reta de equação $Y=3,635 + 0,0385 X$ com erro da estimativa = 1,008.

Parece-nos que *Trimercsurus pradoi* tenha cabeça menor que *Trimercsurus atrox* (graf. I); porem, infelizmente, a amostra de *T. atrox* da qual dispomos é extremamente heterogenea, tanto quanto a procedência quanto ao estado de conservação, não permitindo pois uma comparação satisfatória.

Lista dos exemplares de Trimeresurus pradoi.

Número	Sexo	Compr. total mm.	Corpo mm.	Cauda mm.	Cabeça mm.	Escamas dorsais	Escamas ventrais	Escama anal	Escamas sub-caudais	Observações
10603	♂	1110	970	140	39,3	25	203	1	63/65	holotipo
10694	♀	845	735	110	32,6	25	203	1	59/59	alotipo
10602	♂	970	830	140	35,3	23	193	1	65/65	paratipo
10605	♂	1030	880	150	38,1	25	196	1	67/67	paratipo
10606	♂	1010	875	140	36,3	25	198	1	69/69	paratipo
10608	♂	945	820	125	35,3	25	199	1	65/65	paratipo
10609	♂	790	675	115	28,7	23	194	1	66/66	paratipo
10610	♂	720	620	100	?	23	191	1	60/60	paratipo
10690	♂	985	850	135	37,3	25	195	1	70/70	paratipo
10692	♂	875	765	110	32,6	25	200	1	56/56	paratipo
10693	♂	1040	905	135	37,8	25	194	1	63/63	paratipo
10599	♀	1025	900	125	40,3	25	198	1	59/59	paratipo
10600	♀	1145	1000	145	42,3	23	201	1	60/60	paratipo
10601	♀	1190	1035	155	44,4	25	197	1	60/60	paratipo
10607	♀	1150	1010	140	42,0	25	202	1	61/61	paratipo
10611	♀	980	855	125	35,0	25	205	1	61/61	paratipo
10687	♀	860	750	110	32,5	25	205	11	60/60	paratipo
10688	♀	910	800	110	35,0	25	201	1	57/57	paratipo
10689	♀	910	800	110	36,1	25	196	1	57/57	paratipo
10691	♀	925	815	110	34,4	25	207	11	57/57	paratipo

Hemipenis (fig. 6) — Dividido; cálices arredondados, profundos e franjados. Espinhos bem desenvolvidos sendo os da parte póstero-basilar maiores.

A zona com cálices parece ser maior do que em *T. atrox* e os cálices são mais profundos mesmo perto do ápice. Porém de maneira geral não se afasta muito do hemipenis de *T. atrox*.

Escamas dorsais — Em *Trimeresurus pradoi* as escamas dorsais variam entre 23 e 25 para os machos e fêmeas, enquanto na espécie próxima *T. atrox* elas variam

entre 23 e 33 sendo geralmente 25 nos machos (excepcionalmente 23) e 27 (excepcionalmente 33) nas fêmeas. Nos 20 exemplares de *Trimeresurus pradoi* as escamas dorsais distribuíam-se da seguinte maneira: Machos; 3 indivíduos com 23 séries e 7 com 25 séries; Fêmeas; 1 indivíduo com 23 séries e 9 com 25 séries.

Isto demonstra nítida predominância para o No. 25 e um dimorfismo sexual sem significação, ao contrário do que se observa no *atrox*.

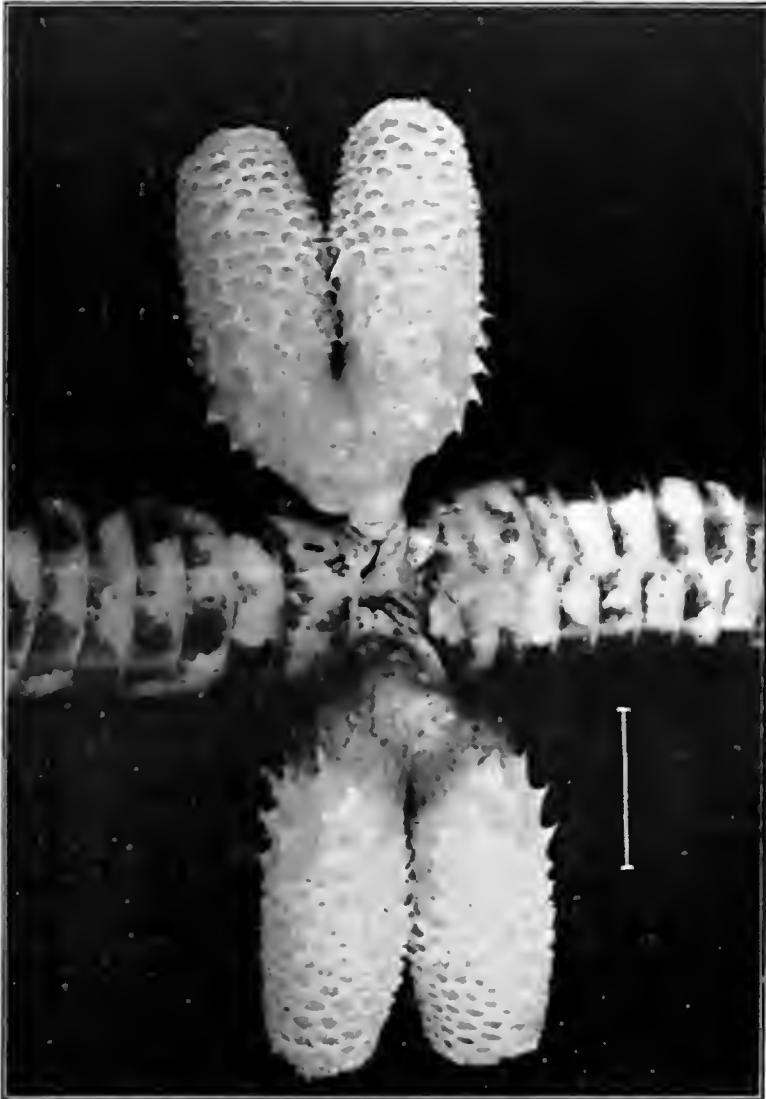
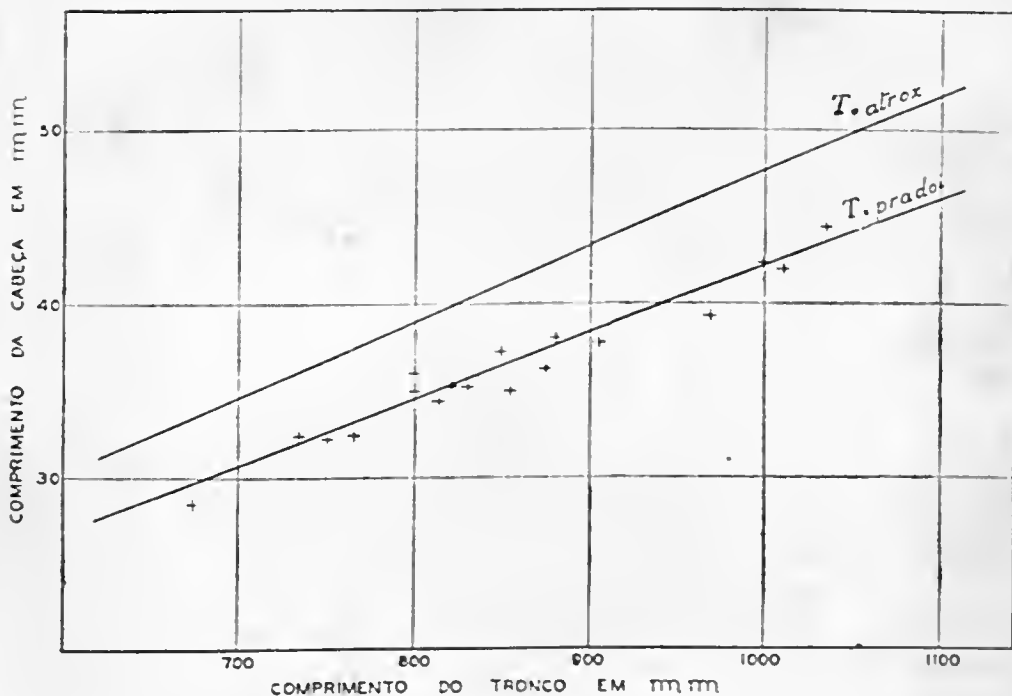


FIG. 6
Hemipenis de *T. pradoi*



Ventrals — As ventrais variam de 191 a 203 nos machos e 196 a 207 nas fêmeas.

Anal — Simples salvo no exemplar No. 10.687.

Diagnose. — Uma espécie de *Bothrops* próximo a *T. atrox* (L) do qual difere por ter uma cabeça menor, um corpo mais delgado, não apresentar dimorfismo sexual nas escamas dorsais, a placa supraocular mais alongada, pelo colorido e desenho completamente diferente.

Escamas dorsais 23-25, ventrais 191 a 207.

O colorido aproxima-se completamente do que se observa nas *T. newiedii*.

RESUMO

Uma nova espécie de *Trimeresurus*, *Trimeresurus pradoi*, oriunda dos arredores de Pau Gigante, Estado do Espírito Santo, Brasil é descrita. A nova espécie é próxima de *Trimeresurus atrox* (L) da qual se distingue por ter o corpo mais delgado; uma cabeça menor; supraocular mais alongado, ausência

de dimorfismo sexual no numero d'escamas dorsais, ventrais abundantemente maculadas, de pardo-cinzeno escuro e um colorido e desenho aproximando-se do das *T. newwedii*.

A ausência de formas intermediarias de um lado e a falta de *B. atrox* da região não permitem de resolver definitivamente si se trata de uma espécie ou de uma subespécie nova.

ABSTRACT

Description of a new species of *Trimeresurus*, "*Trimeresurus pradoi*" which originates from Pau Gigante, State of Espirito Santo, Brazil.

The new species is nearest to *Trimeresurus atrox* (L), from which it can be distinguished by a slimmer body; smaller head; the more elongated supraoculars; absence of sexual dimorphism of the dorsal scales; ventral scales largely spotted with dark; a different pattern and colour not unlike that found in *Trimeresurus newwedii* subspecies.

The missing of intermediate forms as well as the absence of *B. atrox* in that region do not permit a definite conclusion, as to whether the sample described is a new species or a new subspecies.

ZUSAMMENFASSUNG

Beschreibung einer neuen *Trimeresurus* Species "*Trimeresurus pradoi*" Fundort Umgebung von Pau Gigante, Staat Espirito Santo, Brasilien.

Die neue Species steht der *Trimeresurus atrox* nahe, von der sie sich durch folgende Merkmale unterscheidet: Kleinerer Kopf; schlankerer Rumpf; längere supraoculare Schuppen; fehlen des sexuellen Dimorphismus der Rücken-schuppen; reichliche grauschwarze Tüpfelung der Bauchseite; von ähnlicher Zeichnung wie sie bei der *Trimeresurus newwedii* zu finden ist.

Die mangelnde Beobachtung von Zwischen-formen, sowie das Fehlen von *T. atrox* der erwähnten Gegend gestattet keine entgeltliche Entscheidung ob die beschriebenen Exemplare einer neuen Species oder neuen Subspecies angehören.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, A. DO. — A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical Pit-vipers. Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. 2: 1925.
2. LINNEU. — Syst. Nat., ed. 10, 1758, v. pp. 222.
3. KLAUBER, L. M. — A statistical study of the rattlesnakes 5. *Occasional Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 4:3, 1938.

POTENCIAÇÃO DA AÇÃO VERMICIDA DO HEXYLRESORCINOL POR DETERGENTES.

EXPERIÊNCIAS *IN VITRO* COM ASCARIS DE PORCO

por F. W. EICHBAUM (*)

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

O efeito vermicida do Hexylresorcinol (Hr) é ativado em presença de detergentes aniônicos. Rogers, examinando a ação antihelmintica do Hexylresorcinol contra o *Nippostrongylus muris*, verificou um nitido efeito potenciador do oleato e laurato de sódio; a última substância era mais ativa que a primeira num pH de 6.5. Iato este que o autor relaciona à maior atividade superficial do laurato. O efeito ativante dos detergentes sobre o Hr. depende de uma concentração ótima dos sabões, sendo que pequenas doses (0.01 — 0.02%, do oleato) reforçam a atividade do Hr., doses médias (0.2-1%) inibem a sua ação e as doses acima de 1% têm já por si só um efeito vermicida. Estas observações estão de acôrdo com os achados anteriores de Trim e colaboradores que verificaram que doses baixas de oleato elevaram o grau de passagem do Hr. através da cutícula do *Ascaris lumbricoides*, enquanto que concentrações altas reduzem a permeabilidade. Estes trabalhos mostraram ainda "que o grau da penetração do Hr. está intimamente relacionado à atividade interfacial da mistura sabão - Hr. A tensão mínima da mistura Hr. - sabão é nitidamente abaixo da tensão dos seus dois componentes, o que indica a formação de um complexo na interface".

O presente trabalho trata de experiências *in vitro* sobre a ação ascaricida do Hr. em combinação com um maior número de detergentes. Incluímos entre estes também vários derivados do óleo de cajú, cujo alto valor detergente e efeito vermicida foi demonstrado nas recentes publicações de Eichbaum, Leão e Eichbaum. Uma outra parte do trabalho visava estudar o efeito de cálcio sobre o efeito ativante dos sabões. A presença deste ion no intestino conduz à formação de sabões de cálcio pouco solúveis, o que modifica nitidamente o poder ativante

(*) Estagiario.

Recebido para publicação em 10-7-47.

dos detergentes, como conseguimos demonstrar também em nossas experiências *in vitro*.

A técnica das nossas experiências *in vitro* permite uma dosagem mais variada e exata dos vários reativos, obtendo-se os resultados de numerosas experiências num tempo relativamente curto; a deficiência destes testes reside principalmente no fato que não se leva em conta a complexidade dos fatores inibidores (muco, bile) ou favorecedores que podem interferir com a ação no intestino. Os resultados obtidos *in vitro* permitem, por isso, concluir só com reserva sobre o provável efeito *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material de experiência serviram áscaris de porco (*Ascaris lumbricoides* var. *suís*). Os vermes foram recolhidos dos intestinos de porcos recém-mortos e eram reunidos imediatamente numa garrafa termos; levados uma hora após ao laboratório, os vermes eram lavados em salina fisiológica a 37° e distribuídos em béqueres de 250 cm³. Estes foram colocados em estufa a 37°, onde permaneceram durante 3, no máximo 4 dias, com mudança diária da solução de salina.

TABELA I

Influência do tempo de conservação sobre a sensibilidade dos vermes ao Hexylresorcinol (*)

Tempo de conservação dos vermes	Quantidade de Hexylresorcinol por 100 cm ³ de sol. de Tyrolo							
	50 mg		25 mg		12.5 mg		5.0 mg	
	I	+	I	+	I	+	I	+
24 horas	19'	41'	27'	55'	84'	20 h	20 h	20 h
48 horas	26'	41'	37'	48'	73'	20 h	20 h	20 h
72 horas	18'	49'	29'	71'	74'	20 h	20 h	20 h
96 horas	16'	45'	28'	73'	88'	20 h	20 h	20 h
Média	20'	44'	30'	62'	80'	20 h	20 h	20 h

(*) — Os algarismos desta Tabela representam o valor médio de 4 diferentes séries de experiências realizadas (Sobre a técnica exata destas experiências cf. abaixo.)

I — imobilidade espontânea

+ — morte

Nestas condições os vermes conservam uma boa motilidade espontânea por 72-96 horas; também a sua sensibilidade ao Hexylresorcinol fica praticamente inalterada durante todo este tempo (cf. Tab. I).

Nos testes da vermicidia *in vitro* comparava-se a atividade do Hr. em várias concentrações. 1.) com o poder vermicidia dos detergentes 2.) com a atividade de várias combinações de Hexylresorcinol + detergente.

Foram testadas as seguintes substâncias: (*)

1. Hexylresorcinol	sol. alcoólica a 5 %
2. Anacardato de sódio	sol. aquosa a 5 %
3. Fração anácida do óleo de cajú (**)	tintura alcoólica a 10%
4. Anacardol	tintura alcoólica a 10%
5. Óleo de Cajú (***)	tintura alcoólica a 10%
6. Tetrahydro-anacardato de sódio	sol. aquosa a 5%
7. Ricinoleato de sódio	sol. aquosa a 5 %
8. Oleato de sódio	sol. aquosa a 5 %
9. Linoleato de sódio	sol. aquosa a 1 e 2.5%
10. Stearato de sódio	sol. aquosa a 1%
11. Palmitato de sódio	sol. aquosa a 1%

No teste da vermicidia, 4 exemplares de áscaris de tamanho aproximadamente igual foram colocados em 100 cm³ de água fisiológica a 0.85% e solução de Tyrode, respectivamente. Os líquidos eram contidos em béqueres de 250 cm³ de volume, mergulhados num banho maria com temperatura constante a 37 (Foto 1).

(*) A quantidade, em cm³, de cada droga usada nestes testes, correspondeu ao seu teor absoluto em mg: assim usaram-se de uma

$$\left. \begin{array}{l} \text{solução a 1\% ... 5 cm}^3 \\ \text{solução a 5\% ... 1 cm}^3 \\ \text{solução a 10\% ... 0.5 cm}^3 \end{array} \right\} = 50 \text{ mg}$$

(**) Chamamos de "fração anácida" aquela parte do óleo de cajú que fica sobrando depois da precipitação do ácido anacárdico pelo hidróxido de chumbo. A fração anácida contém como componentes principais cardol e anacardol.

(***) Oleo de casca de cajú (cashew nutshell liquid).

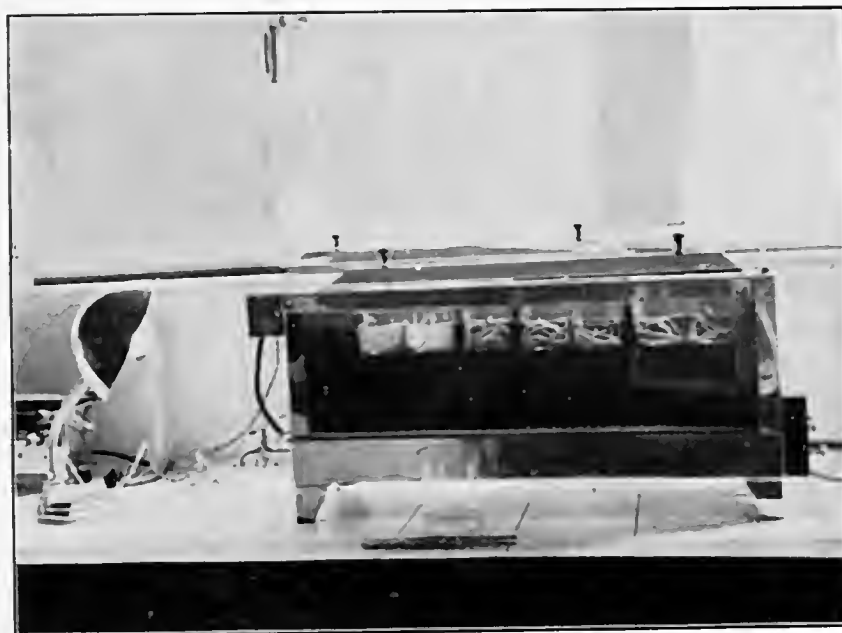


Foto 1

Banho maria com parede anterior de vidro, permitindo a observação dos vermes durante a incubação.

Após alguns minutos de permanência a 37 graus, juntavam-se aos diversos béqueres as drogas em teste.

A solução de Tyrode, como meio de suspensão foi escolhido na segunda parte de nossas experiências por causa de sua maior semelhança aos líquidos do organismo e para estudar, em particular, a influência do Ca sobre a suposta ação ativante dos detergentes.

Para avaliar a ação vermicida de diferentes substâncias e combinações foram escolhidos os seguintes critérios:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1. fim dos movimentos espontâneos = 1 | } de todos os 4 vermes contidos num vidro |
| 2. imobilidade total (morte) = + | |

Foram considerados "mortos" aqueles vermes que depois da parada dos movimentos espontâneos não recuperaram a motilidade dentro de 30", quando re-suspensos numa solução pura de água fisiológica ou de solução de Tyrode. Os vermes que recuperaram motilidade sob estas condições foram recolocados na solução vermicida e as provas da "imobilidade total" foram repetidas em intervalos de 15 em 15 minutos, no máximo. O tempo de observação contínua estendeu-se no mínimo a 4 horas. Uma segunda leitura final foi feita após 20 horas. Todos os vermes cuja morte ocorreu entre 4 e 20 horas foram registrados nas seguintes tabelas, como "mortos em 20h" os que sobreviveram mais de 20 horas como "morte ∞".

TABELA II

Ação asarizada in vitro da *Hexylresorcinol*, de detergentes e de combinações *Hexylresorcinol* + detergentes em água fisiológica a 0.85%
(Os mg indicam a quantidade total da droga adicionada a 100 cm³ de sãlina contendo 1 verme)
HEXYLRESORCINOL

Detergente	I		II		III		IV		V	
	50 mg	25 mg	12.5 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg
III.	20'	30'	54'	62'	20h(180')	20 h	20 h	20 h	—	—
Anacardato de sódio	12' 15' 20'	12' 14' 20'	14' 20' 50'	24' 28' 20'	48' 51' 110'	42' 33' 75'	62' (20h) 61' 220'	103' 20 h —	194' 20 h —	—
Fração asarizada	15' 25' 25'	15' 15' 25'	15' 40' 45'	21' 40' 35'	64' 45' 55'	30' 30' 75'	115' 135' 220'	20 h 20 h —	20 h 20 h —	—
Anacardol	20' 20' 25'	20' 20' 25'	20' 20' 25'	25' 60' 60'	55' 100' 130'	70' (20h) 195' (20h) 195'	135' (20h) 20 h 20 h	∞ ∞ —	∞ — —	∞ — —
Óleo de cajú	27' 17' 17'	35' 23' 17'	65' 63' 75'	23' 50' 53'	93' 95' 155'	53' 73' 68'	112' 208' 105' (20h)	∞ ∞ —	∞ — —	20h (212') — —
Óleo de sódio	15' 20' 20'	25' 17' 25'	71' 53' 90'	20' 20' 90'	105' 90' 105'	20 h ∞ ∞	20 h ∞ ∞	∞ — —	∞ — —	∞ — —
Linoleato de sódio	20' 15' 15'	20' 15' 25'	75' 60' 45'	20' 55' 45'	105' 85' 85'	75' 55' 85'	115' 110' 20 h	∞ — —	∞ — —	∞ — —
Resinoleato de sódio	25' 15' 20'	30' 20' 20'	55' 25' 130'	30' 52' 51'	70' 101' 85'	20 h ∞ ∞	20 h ∞ ∞	∞ ∞ —	∞ 165' —	— — —

+ = morte
I = imobilidade esgofianca



TABELA III
 Ação ascaricida in vitro de Hexylresorcinol, de detergentes e de combinações Hexylresorcinol + detergentes
 (Os mg indicam a quantidade total da droga adicionada a 100 cm³ de solução de Tyrode)
 HEXYLRESORCINOL

Detergente	I		II		III		IV		V	
	50 mg	12.5 mg	25 mg	12.5 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg	5.0 mg
III.	20'	44'	30'	61'	80'	20 h	20 h	20 h	20 h	20 h
Anacardato de sódio	17' 25 mg 15' 35' 30' 55'	33' 35' 55'	37' 50' 32'	65' 102' 80'	55' 45' 65'	127' 161' 215'	20 h 97' (20h) 135'	20 h 217' (20h) 20 h	20h (∞) — —	20h (∞) — —
Fração anácida	20' 25 mg 20' 30' 12.5 mg 30'	30' 45' 55'	20' 20' 20'	62' 62' 62'	22' 23' 25'	75' 121' 80'	56' 95' 95'	190' 20 h 20 h	20h (∞) ∞ ∞	20h (∞) ∞ ∞
Anacardol	50 mg 25 mg 25' 12.5 mg 25'	18' 25' 55'	22' 22' 22'	52' 50' 57'	26' 41' 40'	98' 131' 133'	50' (20h) 20 h 20 h	175' (20h) 20 h 20 h	20h (∞) — —	20h (∞) — —
Óleo de cajú	50 mg 25 mg 15' 12.5 mg 15'	15' 15' 55' 55'	10' 10' 30'	62' 67' 85'	45' 35' 35'	97' 117' 257'	105' 82' (20h) 85' (20h)	20 h 20 h 20 h	20h (∞) ∞ ∞	20h (∞) ∞ ∞
Ricinato de sódio	50 mg 25 mg 18' 12.5 mg 18'	16' 18' 50'	37' 20' 51'	115' 88' 121'	78' 91' 160'	20h(150) 157'(20h) 20h(215')	20h (20) 20 h 20 h	20h (200) 20h (200) 20 h	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞
Óleo de sódio	50 mg 25 mg 25' 12.5 mg 25'	25' 25' 50' 65'	30' 30' 30'	65' 65' 95'	105' 65' 60'	20 h 20 h 20 h	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞
Linolato de sódio	50 mg 25 mg 18' 12.5 mg 22'	13' 18' 57' 57'	25' 28' 30'	107' 96'(20h) 118'(20h)	55' 53' (20h) 75'	20 h 20 h 20 h	20h (175') 20 h 20h (105')	20 h 20 h 20 h	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞
Tetrahidro anacardato de sódio	50 mg 25 mg 25' 12.5 mg 25'	30' 45' 50'	32' 30' 25'	60' 70' 60'	160' 35' 55'	20 h 20 h 20 h	120' (240?) 120'	20 h ∞ ∞	∞ ∞ ∞	∞ ∞ ∞

+ = morte
 ∞ = imobilidade espontânea

Todos os testes foram executados repetidas vezes (3 até 4 e mais vezes) com vermes de 24, 48, 72, raramente de 96 horas de conservação. Em cada experiência foi incluído um controle com Hexylresorcinol (em várias concentrações) para verificar a sensibilidade dos vermes no respectivo dia. Os algarismos marcados nas Tabelas II e III, representam os valores médios das diversas experiências.

RESULTADOS

A — Ação vermífida do Hexylresorcinol, de detergentes e de combinações Hexylresorcinol + detergentes em água fisiológica a 0.85% e em Solução de Tyrode

(cf. Tab. II e III)

Não foram incluídos nestas Tabelas os controles de vermes suspensos em água fisiológica, os quais mantiveram uma boa motilidade espontânea por mais de 20 horas; um resultado igual foi obtido nos vidros, aos quais se juntaram 1 ou 2 cm³ de álcool/100 cm³ de água fisiológica, (*) para controlar uma eventual influência do álcool nas tinturas de anacardol Ol. de cajú, etc. Nem foram reproduzidos os resultados das experiências com stearato e palmitato de sódio, que em nenhuma das concentrações usadas (6.25 — 50 mg/100 cm³ NaCl) (*) mostraram qualquer atividade vermífida intrínseca ou ação potenciadora sobre o poder anti-helmíntico do hexylresorcinol. Nas tabelas, os valores em parentesis indicam resultados discordantes numa série de experiências. Todas as discordâncias foram encontradas só nas diluições mais altas do Hexylresorcinol, enquanto que nas concentrações médias e fortes os resultados foram bem regulares (**)

1. Experiências em água fisiológica (Tabela II)

O anacardato de sódio, em quantidades de 50 mg/100 cm³ NaCl fisiol. (≈ 0.5 mg/cm³) possui uma ação ascarífida intrínseca, causando uma "imobilidade espontânea" dos vermes em $\pm 100'$, a morte em cerca de 3 horas. O efeito potenciador do anacardato de sódio sobre o poder vermífida do Hexylresorcinol manifesta-se da maneira mais nítida, quando se combinam doses fracas ativas do Hr. (5, 0-12.5 mg) com várias concentrações do anacardato (cf.

(*) Ou solução de Tyrode.

(**) Quando, por exemplo, os resultados de 5 observações em dias diferentes eram os seguintes: Morte depois de 170', 190', 220' 20h, tiramos a media dos 3 primeiros valores ($\approx 193'$), juntando em parentese "(20h)"; quando as mortalidades de 20h eram mais frequentes escrevemos "20h (193')".

coluna III e IV na tabela II). Assim, por exemplo, 12,5 mg de Hexylresorcinol imobilizam os vermes em 62' e matam-os em 20 horas; quando combinados com 25 mg de Anacardato de sódio (o qual por si só imobiliza os vermes apenas depois de 20 horas) os vermes ficam imóveis já depois de 28' e morrem depois de 51'. Com as doses maiores de Hexylresorcinol (25-50 mg), altamente ativas, as diferenças no poder vermicida do Hexylresorcinol só e do Hexylresorcinol combinado com Anacardato sódico são menos impressionantes. Um aspecto semelhante oferecem também o óleo de cajú e seus derivados, a fração anácida e o anacordol. Nota-se com todos estes compostos (inclusive o anacardato de sódio) um ligeiro efeito inibidor sobre o poder vermicida do Hr., que se manifesta, aliás, unicamente quando se combinam certas concentrações dos detergentes com as doses mais altas (25-50 mg) de Hexylresorcinol. Esta inibição se refere exclusivamente à imobilidade absoluta (morte), enquanto que quase todos os valores da imobilidade espontânea indicam também nestes casos uma ação reforçada. A inibição pelo ricinoleato, oleato e linoleato de sódio fica mais nítida quando estes compostos são combinados com altas doses de Hr., verificando-se mais uma vez também com estas drogas um efeito nitidamente ativador sobre as doses baixas e pouco ativas de Hexylresorcinol (5.0-12.5 mg). Entre estas três últimas

TABELA IV

Água fisiol.	Hexylresorcinol Sol. alcool. a 5%	Detergente	pH	Poder ativador do detergente
50	—	—	6.4	—
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Ricinoleato de sódio 5%	7.1	—
		0.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Oleato de sódio 5%	7.5	++ ---
		0.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Linoleato de sódio 1%	6.8	+-
		1.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Anacardato de sódio 5%	6.75	+-
		0.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Palmitato de sódio 1%	7.9	⊖
		1.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Stearato de sódio 1%	7.5	⊖
		1.25 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Tintura de óleo de cajú 10%	5.8	+++ --- +++
		0.125 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Tintura anácida 10%	6.2	+++ --- +++
		0.125 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	Tintura de anacardol 10%	6.3	+-
		0.125 cm ³ = 12.5 mg		
50	0.25cm ³ = 12.5mg	—	6.3	—

drogas o oleato de sódio tem o efeito potenciador mais forte; ricinoleato, oleato, linoleato de sódio não têm atividade vermícida intrínseca, nas doses empregadas.

O poder ativador dos detergentes sobre a ação vermícida do Hexylresorcinol não tem relação ao pH das diferentes soluções, como resulta da Tabela IV.

2. *Experiências em solução de Tyrode (Tabela III).*

Em contraste com os resultados das experiências em água fisiológica, o anacardato de sódio em solução de Tyrode não possui mais atividade vermícida. A fração anácida, anacardol e o óleo de cajú retêm ainda uma ação vermícida muito fraca. Nota-se que o anacardato sofre uma precipitação forte no meio de Tyrode pela formação de sais de Ca e de Mg, o óleo de cajú uma precipitação ligeira, a fração anácida e o anacardol não são praticamente alterados.

O anacardato de sódio tem um efeito ligeiramente inibidor sobre doses médias de Hexylresorcinol (25 mg) e nitidamente ativador sobre doses menores 12.5, não se notando ação nítida em combinação com doses mais fracas de 5.0 mg de Hr. De maneira semelhante comportam-se o anacardol e o óleo de cajú que talvez possuam um poder ativador algo maior. O tetrahydro-anacardato de sódio, em solução de Tyrode inibe ligeiramente as altas doses de Hr., ativando-o muito pouco nas diluições maiores (*).

Uma ação potenciadora bem nítida em todas as combinações com Hr. possui a fração anácida (c.f. columnas III e IV Tabela III), notando-se também aqui, como nos demais detergentes, um aumento de todos os valores em relação aos obtidos em meio salino.

Ricinoleato, linoleato, stearato e palmitato de sódio formam em sol. de Tyrode um forte precipitado de sais de Ca e de Mg perdendo, assim, qualquer efeito ativador sobre o poder vermícida do Hexylresorcinol.

B — *Ação sinérgica do Anacardato de sódio e da fração anácida.*

Na primeira parte deste trabalho ficou demonstrado que os vários derivados do óleo de cajú (como o ácido anacárdico, anacardol, a fração anácida) têm um efeito ativador sobre a ação vermícida do Hexylresorcinol; estas substâncias possuem por si mesmas um certo efeito vermícida intrínseco que é mais pronunciado no ácido anacárdico (resp. no anacardato sódico) e no óleo de cajú, quando estas substâncias são testadas em meio isento de cálcio.

(*) Por falta de quantidades suficientes desta droga fizemos os respectivos testes só em meio de Tyrode, com omissão das provas em NaCl fisiol.

TABELA V
Ação sinérgica do Anacardato de sódio e da fração anácida
Experimento em água fisiológica (*)

Substância combinada	Na anacard. 200 mg		Na anacard. 100 mg		Na anacard. 50 mg		Na anacard. 25 mg		—
	I	+	I	+	I	+	I	+	
Nil	55'	155'	98'	273'	127'	338'	290'	∞	—
Fração anácida	200 mg	—	—	—	—	—	—	—	20 h
100 mg	—	65'	65'	270'	65'	322'	70'	285'	455'
50 mg	—	77'	77'	170'	62'	352'	85'	20 h	20 h
25 mg	—	67'	67'	155'	87'	320'(20h)	85'	20 h	20 h
Óleo de cajú	200 mg	—	—	—	—	—	—	—	190'
100 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	20 h
50 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	150'
25 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	20 h

(*) Todas as mortes que ocorreram entre 75' e 20 horas são registradas como "(+) 20 h";
I = imobilidade espontânea
+ = morte

TABELA VI

*Ação sinérgica do Amarcadato de sódio e da fração anácida
Experiência em Solução de Tyrode (*)*

Substância combinada	Na amarcad. 200 mg		Na amarcad. 100 mg		Na amarcad. 50 mg		Na amarcad. 25 mg		—
	I	+	I	+	I	+	I	+	
Nil	20 h	∞	20 h	∞	20 h	∞	20 h	∞	—
Fração anácida 200 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	20 h
100 mg	—	185*	—	20 h	—	20 h	—	20 h	20 h
50 mg	—	185*	—	20 h	200*	20 h	∞	20 h	20 h
25 mg	—	335*	—	∞	120*	20 h	20 h	∞	∞
Óleo de cajú 200 mg	—	—	—	—	235*	335*	∞	∞	∞
100 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	20 h
50 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	20 h
25 mg	—	—	—	—	—	—	—	—	∞

(*) Todas as mortes que ocorreram entre 6 $\frac{1}{2}$ e 20 horas foram marcadas como "(+) 20 h";

∞ = morte em > 20 h.

I = imobilidade espontânea

+ = morte

Interessava ainda saber si os vários componentes do óleo de cajú — que é constituído de quantidade variáveis de ácido anacárdico (50-90%) e da fração anácida (cardol + anacardol) — têm entre si mesmos um efeito sinergista.

A Tabela V, que registra os resultados obtidos em meio salino, mostra uma nítida supremacia da mistura artificial de doses equilibradas do anacardato de sódio + fração anácida, em comparação com doses correspondentes de óleo de cajú. Assim imobilizam 25 mg de Na anacardato + 25 mg da fração anácida os vermes em 85', enquanto que 50 mg de óleo de cajú produzem o mesmo efeito só depois de 150'.

A ação sinergista do anacardato de sódio + fração anácida fica ainda mais nítida em sol. de Tyrode (Tabela VI); neste meio o anacardato é desprovido de qualquer ação vermicida intrínseca, a fração anácida e o óleo de cajú possuem-na só num grau muito reduzido. A combinação de anacardato e da fração anácida, porém, revela uma atividade superior, não somente àquela de seus dois componentes, como também à do óleo de cajú.

Conclui-se disso que a mistura natural de ácido anacárdico e da fração anácida, como se encontram no óleo bruto, ainda não representa a relação ótima de seus componentes, quanto ao efeito vermicida. U'a mistura artificial de seus dois componentes em proporções equilibradas alcança um efeito nitidamente superior.

C — *Influência de muco sobre a atividade vermicida do Hexylresorcinol e de combinações Hexylresorcinol + detergentes.*

O muco exerce um nítido efeito inibidor sobre o poder anti-helmintico do Hexylresorcinol (Rogers).

Para verificarmos si a adição de um detergente ao Hexylresorcinol é capaz de vencer esta inibição, realizamos uma série de experiências em que juntamos um muco vegetal (de um Hibisco, vulgo "Quiabo"), na proporção de cerca de 0.5% à solução de Tyrode. Fora disso, a técnica destas experiências correspondeu à descrita anteriormente.

Comparava-se nestas experiências a atividade vermicida do Hexylresorcinol só com o poder antihelmintico do Hr. associado à fração anácida.

A próxima Tabela VII é uma condensação de várias experiências deste tipo, em meio de Tyrode.

TABELA VII

		I	+	
1.	Hexylresorcinol 25 mg	23'	75'	I = imobilidade espontânea + = morte
2.	Hexylresorcinol 25 mg + muco	38'	110'	
3.	Fração anácida 50 mg	20 h	∞	
4.	Fração anácida 50 mg + muco	20 h	∞	
5.	Hexylresorcinol 25 mg + Fração anácida 50 mg	20'	78'	
6.	Hexylresorcinol 25 mg + muco + fração anácida 50 mg	30'	88'	

Conclusões: a) o muco diminui a ação vermícida do Hexylresorcinol b) nas doses empregadas a fração anácida não revela efeito ativador sobre o Hexylresorcinol; c) a presença de muco pouco enfraquece a atividade das combinações Hexylresorcinol + fração anácida; a associação destas duas drogas em meio mucoso, produz um efeito mais forte do que o Hexylresorcinol em meio mucoso (Tubo 2). Resultados análogos foram obtidos nas misturas de Hexylresorcinol com tintura de óleo de cajú.

RESUMO

1.º) O presente trabalho confirma os resultados de Trim e Rogers que demonstraram uma ativação do efeito vermícida de Hexylresorcinol por detergentes. Este efeito ativador depende de certas relações quantitativas, verificando-se que a combinação de altas doses do detergente com altas doses de Hexylresorcinol causa em certos casos uma ligeira inibição do efeito anti-helmíntico (do Hexylresorcinol), enquanto que doses baixas, quase inativas desta droga são fortemente ativadas pelos detergentes em várias concentrações.

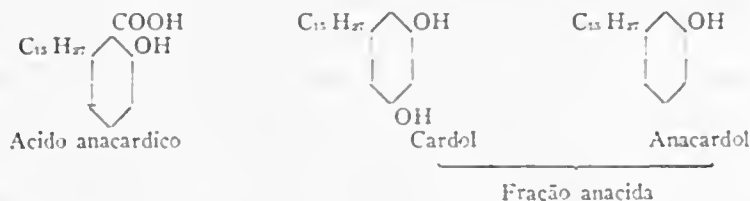
Em meio salino o óleo de cajú (sob forma de tintura), como também os seus derivados; o anacardato de sódio, o anacardol, a "fração anácida" (composta de u'a mistura cardol + anacardol) revelaram um alto efeito potenciador sobre o Hexylresorcinol. Entre todos os detergentes testados o anacardato e a fração anácida possuíram o efeito ativante mais pronunciado. A ação potenciadora do óleo de cajú e a do anacardol era aproximadamente igual a ação do oleato de sódio; o linoleato e o ricinoleato de sódio mostraram-se algo menos ativos. O palmitato e o stearato de sódio praticamente não influíram sobre a ação vermícida do Hexylresorcinol. Nota-se ainda que o anacardato e o óleo

de cajú possuem um nítido efeito vermicida intrínscio. a fração anácida e o anacardol só em grau muito diminuído.

A atividade vermicida do Hexylresorcinol em meio salino e em solução de Tyrode não mostra diferenças significantes; por outro lado o oleato, o ricinoleato e o linoleato de sódio são precipitados neste meio como sais de cálcio e magnésio e perdem com isso quase completamente a sua ação potenciadora.

Contrário a isso, o anacardato de sódio, que fica também precipitado em meio de Tyrode continua exercendo um nítido efeito potenciador, apesar do fato desta substância perder completamente o seu efeito vermicida intrínscio. A fração anácida, em meio de Tyrode, age ainda mais forte do que o anacardato; a tintura de óleo de cajú e o anacardol tem um efeito aproximadamente igual ao anacardato. O tetrahydro-anacardato de sódio tem um efeito ativador muito fraco.

Para compreender a diferença entre os sabões dos ácidos graxos, que são inativados em meio de Tyrode, e os derivados de óleo de cajú, que mantêm uma certa atividade convem lembrar das fórmulas que mostram no ácido anacárdico



2 grupos hidrofílicos (um carboxílico e um fenólico), no cardol e anacardol, dois e um grupo fenólico, respectivamente.

Aparentemente o grupo fenólico é só pouco desionizado no meio de Tyrode, garantindo desta maneira a persistência da ação potenciadora sobre o poder vermicida do Hexylresorcinol. Na fração anácida que é a mais rica em grupos fenólicos este efeito ativador (em meio de Tyrode) é melhor conservado.

2) Confirma-se a observação de Rogers relativa a ação inibidora de muco sobre o poder anti-helmintico de Hexylresorcinol. A combinação de Hexylresorcinol + detergente (fração anácida, óleo de cajú), em meio mucoso, tem uma atividade só ligeiramente diminuída.

3) A combinação de doses inativas de anacardato de sódio com doses fracamente ativas da fração anácida, em meio de Tyrode, produz um efeito sinérgico, manifestando-se por um poder vermicida mais nítido. Isso talvez indique de novo a importância dos grupos fenólicos na ativação de certos anti-helminticos.

O óleo de cajú cru, que é constituído de u'a mistura "natural" de ácido anacárdico e da fração anácida, não representa o "ótimo" possível quanto à sua atividade vermícida; u'a mistura artificial de seus dois componentes em proporções equilibradas alcança um efeito vermícida nitidamente superior.

ABSTRACT

This paper confirms the findings of Trim et al., and Rogers concerning the activating potency of anionic detergents upon the vermícidal activity of Hexylresorcinol. This activating effect depends on certain quantitative relations between detergents and Hexylresorcinol, since the combination of high dosis of Hexylresorcinol with high doses of detergents produces, in some instances, a certain inhibition of the vermícidal effect, whereas medium or small doses of Hexylresorcinol, which are practically devoid of any vermícidal power, are strongly activated in presence of detergents at various concentrations.

Tincture of Cashew nut shell oil, as well as its derivatives: sodium anacardate, anacardol and a mixture of cardol + anacardol (= "anacid fraction") display a high potentiating effect on Hexylresorcinol, when tested against *Ascaris* suspended in saline solution. Sodium anacardate and the "anacid fraction" are somewhat more active than the two other mentioned substances.

The potentiating effect of cashew nut oil and anacardol was about the same as that of sodium oleate; sodium ricinoleate and sodium linoleate were slightly less active, when combined with Hexylresorcinol in high dilutions, sodium palmitate and sodium stearate practically did not modify the vermícidal activity of Hexylresorcinol.

Sodium anacardate and cashew nut oil possess a fairly strong, intrinsic vermícidal power, anacardol and the anacid fraction only to a very limited extent.

In Tyrode's solution, which contains Calcium and Magnesium ions, the simple soaps (Na oleate, ricinoleate, linoleate) are deprived of any potentiating affect on Hexylresorcinol, due to the formation of insoluble Ca and Mg salts. On the contrary, cashew nut oil and its subproducts retain their potentiating effect, although to a lesser degree than in physiologic saline solution. Among these substances, the potentiating effect of the anacid fraction was the most pronounced; cashew nut oil, sodium anacardate have a somewhat lower activating effect on the vermícidal power of Hexylresorcinol, in a Ca containing medium.



In Tyrode's solution, sodium anacardate is practically devoid of any intrinsic vermifugal activity, whereas anacardol, the anacid fraction and cashew nut oil retain still a slight vermifugal power. The persistence of the activating influence of Na anacardate, anacardol, cashew nut oil and the anacid fraction, even in a Ca containing medium, is probably related to the presence of non-ionized free phenol groups; consequently the two substances that contain the highest number of free phenol groups sc. the anacid fraction and cashew nut oil possess the highest activating influence on Hexylresorcinol in Tyrode's solution.

2. Rogers' observation that mucus inhibits the anthelmintic activity of Hexylresorcinol is confirmed. The vermifugal power of a combination of Hexylresorcinol with detergents (anacid fraction, cashew oil) is only slightly reduced in a mucus containing medium.

3. Inactive doses of Sodium anacardate when combined with inactive doses of the anacid fraction, in Tyrode's medium, produce, by a synergistic mechanism, a distinct vermifugal effect. This points once more to the possible importance of the phenolic groups for the enhancement of the vermifugal activity.

Crude cashew nut oil which consists of a natural mixture of anacardic acid + the anacid fraction, possesses only a slight vermifugal activity in Tyrode's solution; the natural proportion of its both constituents does not represent the "possible optimum" as to the vermifugal activity; an artificial mixture of both components, in equilibrated proportions achieves a much higher vermifugal effect.

All experiments referred to in this abstract were performed on ascarids (*Is-caris lumbricoides* var. suis).

BIBLIOGRAFIA

1. Eichbaum, F. W. — Biological properties of Anacardic acid (*o*-penta decadienyl salicylic acid) and related compounds. *Mem. Inst. Butantan*, 19:69-134, 1946.
2. Leão, A. T. & Eichbaum, F. W. — Ação vermifugal do óleo de cajú e derivados (experiências em cães). *Mem. Inst. Butantan*, 1947, em publicação.
3. Rogers, W. P. — Studies on the anthelmintic activity of hexylresorcinol and tetrachlorethylene. *Parasitology*, 63:98, 1944.
4. Trim, A. R. — Experiments on the mode of action of Hexylresorcinol as an anthelmintic. *Parasitology*, 35:209, 1933.
5. Trim, A. R. & Alexander, A. E. — Effect of soaps and synthetic wetting agents upon biological activity of phenols. *Nature*, 154:177, 1944.

OVÁRIO E ADRENAL. SUAS RELAÇÕES COM A ALIMENTAÇÃO E COM O BENZOATO DE ESTRADIOL

POR L. MILLER DE PAIVA

(Do Laboratório de Endocrinologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

O ovário, como toda a glândula de secreção interna, relete o estado funcional do organismo. Já se sabe de longa data que existem distúrbios ovarianos consequentes a distúrbios gerais, como acontece nas infecções graves, nos estados caquéticos, na insuficiência supra-renal, etc.

A inter-relação das adrenais com as gônadas tem sido salientada pelos seguintes fatos: as corticoesteronas e os hormônios sexuais possuem a mesma estrutura química; os animais grávidos resistem melhor a adrenalectomia; a progesterona mantém em vida o adrenalectomizado; na gravidez a cortex aumenta de volume; o período inter-menstrual humano se encurta com a administração de desoxicorticoesterona; os extratos corticais produzem a maturidade sexual precoce; as anomalias sexuais produzidas por tumores corticais e ainda a mesma origem embrionária dessas duas glândulas acenruam as relações entre si.

Em 1928, Lyman (1) observou que a adrenalectomia, em ratas brancas, fazia suprimir o ciclo estral. Del Castillo (2) observou somente um alongamento dos ciclos (6 e 7 dias) e achou que a supressão era consequência do mau estado geral dos animais, pois quase todos eles morriam poucos dias após a operação. As ratas viviam um mês e até um ano quando apresentavam adrenais acessórias.

Em consequência desses resultados e devido aos trabalhos recentes (3, 4, 5) sobre a manança em vida de animais adrenoпрivos e sobre a re-auração da função gonadotrópica pela dieta clorçada, fomos induzidos a estudar a função ovariana em relação à adreal. É nossa intenção pois, neste trabalho, mostrar como se comporta o ciclo estral em relação com a adrenalectomia uni e bilateral, com a alimentação rica e pobre em cloratos, assim como com a sensibilização das células queratinizadas ao benzoato de estradiol, também em relação à alimentação.

Recebido para publicação em 17-7-47.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos neste trabalho 48 ratas adultas, repartidas em 4 lotes:

- A) 23 com adrenalectomia bilateral.
- B) 10 com adrenalectomia unilateral.
- C) 5 castradas-adrenalectomizadas e injetadas com Benzoato de Estradiol.
- D) 10 castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol.

Nos 3 primeiros grupos a alimentação variou periódicamente na quantidade de cloretos. Em todos os lotes fazíamos esfregaços diários pelo método clássico. Utilizávamos para isso uma pequena alça de arame fino e torcido, retirávamos o conteúdo vaginal e fazíamos um esfregaço em lâminas que era corada pela hematoxilina eosina e logo em seguida levada ao microscópio para a leitura.

As ratas eram pesadas de dois em dois dias. Ficavam em dieta rica em cloretos (+) durante 30 a 35 dias, sendo que no primeiro dia, sofriam adrenalectomia unilateral ou bilateral.

Em um segundo período, usávamos o regime para adrenoprivos (dieta pobre em cloretos) (++) e com êle permaneciam de 22 a 32 dias, para retornarem a dieta do reforço, rica em cloretos. Em 15 ratas, primeiro deixámos em dieta pobre de cloretos, depois rica e finalmente pobre em cloretos.

Em todos esses períodos os esfregaços vaginais eram feitos diariamente e as ratas pesadas de dois em dois dias. Nas ratas castradas injetávamos Benzoato de Estradiol em dose de 10 U. I. diárias. As leituras dos esfregaços e do peso corporal foram transportadas nos gráficos numerados.

(++) DIETA DE ADRENOPRIVOS
POBRE EM CLORETOS

Fubá	67%
Farinha de alfafa	10%
Farinha de carne	10%
Óleo de cação	5%
Caseína	5%
Fermento de cerveja	3%

(+) DIETA RICA EM CLORETOS

Fubá	65%
Farinha de alfafa	10%
Farinha de carne	10%
Caseína	4%
Fermento de cerveja em pó	2%
Mistura de sais (sal de cozinha 20g., lactato de cálcio 8., carbonato de magnésio 8g., cit. ferro 2g., Lugol 10g., farinha de osso 2Kg.	4%

GRAFICO I

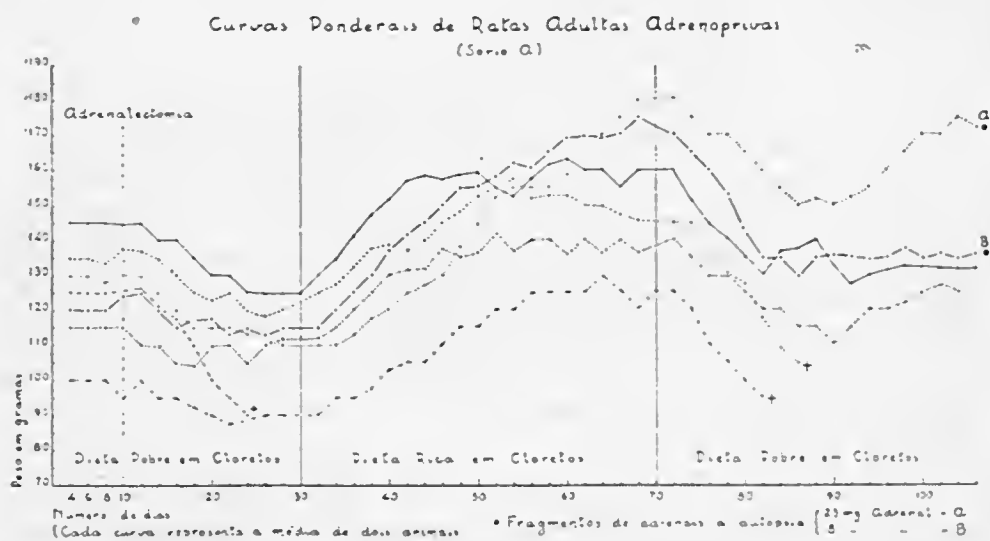


GRAFICO II

Ciclo Estral de Ratas Adrenoprivas em Relação à Alimentação Serie 3

Adrenolectomia

Ratas Nos	Normais	Dieta Rica em Cloretos	Dieta Dobre em Cloretos	Dieta Rica em Cloretos
1	• • •	• • •	• • •	• • •
2	• • •	• • •	+	• • •
3	• • •	• • •	• • •	• • •
4	• • •	• • •	+	• • •
5	• • •	• • •	• • •	• • •
6	• • •	• • •	• • •	• • •
7	• • •	• • •	• • •	• • •
8	• • •	• • •	+	• • •
9	• • •	• • •	• • •	• • •
10	• • •	• • •	+	• • •
Dias	5 10	15 20 25 30	35 40 45 50	55 60 65



GRAFICO III

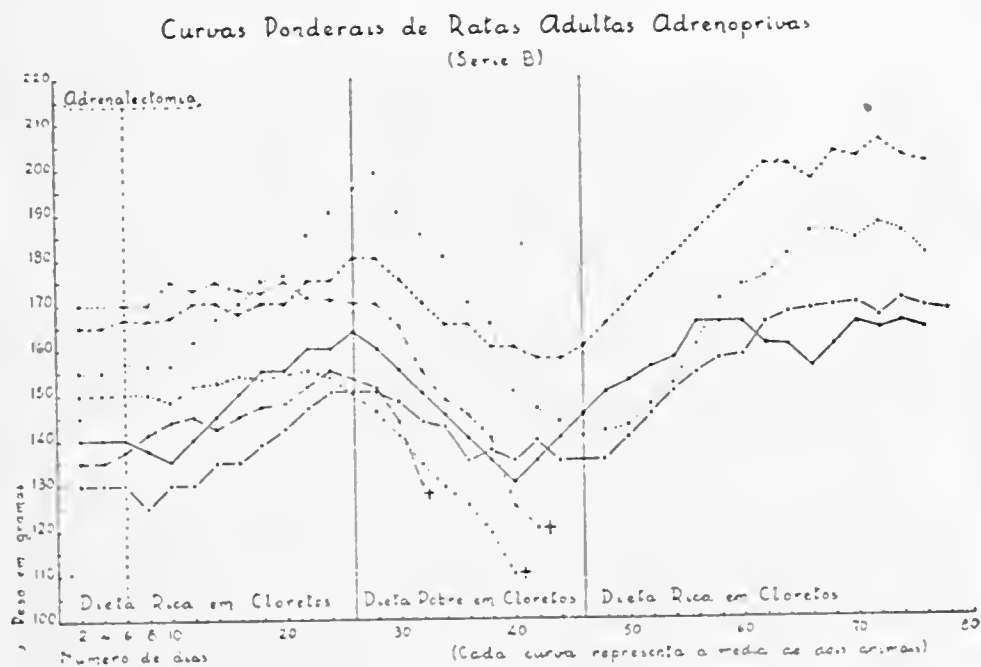


GRAFICO IV

Ciclo Estral de Ratas Adrenoprivas em Relação à Alimentação
Serie 2

Adrenalectomia.

Ratas Mes	Normais	Dieta Rica em Cloretos	Dieta Pobre em Cloretos	Autopsia									
1	• •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• 15 mg									
2	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• +									
3	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• +									
4	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• 8 mg									
5	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• 4 mg									
6	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• 22 mg									
7	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• +									
8	• • •	• • • • • • • •	• • • • • • • •	• +									
Dias	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65

Ratas	Nº de Ratas dias em observ.	Nº meio de	Nº Estros
Normais (Antes da Operação)	23	10	2
Operadas (Dieta Rica em Cl)	23	25	2,6
.. (.. Pobre -)	23	23	1,5
.. (- Rica + Pobre em Cl)	23	48	4,1

RESULTADOS

Os gráficos 1, 2, 3, e 4 nos mostram que as ratas normais apresentam peso pouco variável e estro de 4 a 6 dias. Uma vez em adrenalectomia bilateral e deixadas em dieta pobre em cloretos (Gráfico 1-3) elas perdiam o peso paulatinamente e permaneciam em diestro (a maioria delas) ou com estros espaçados. Das 48 ratas faleceram 8 nos 8 primeiros dias.

Quando operadas e deixadas em dieta de reforço (Gráfico 3 e 4), os estros espaçavam-se, porém não perdiam o peso corporal. Uma vez em dieta de adrenaoprivos a maioria definhava. As ratas que não perdiam ou perdiam pouco peso corporal e com estros periódicos pouco espaçados, apresentavam fragmentos de adrenais acessórias (Gráfico 1 e 4).

Com o retorno do regime rico em cloretos, as funções se recuperavam em parte; os estros tornavam-se cíclicos e os animais aumentavam de peso.

A diminuição ou supressão dos estros parece dar-se por intermédio da hipófise, porque segundo Martin (6), no regime acioretado, há diminuição da produção do hormônio gonadotrópico verificado pelo transplante hipofisário (a hipófise implantada não produz ovulação nem estro e suas células apresentam-se degeneradas: diminuição das granulações, do aparelho de Golgi e revertem-se para cromóforas).

Os adrenalectomizados unilateralmente não modificavam o ciclo estral tanto na dieta rica como na dieta pobre em cloretos, sendo que nesta perdiam peso discretamente.

Del Castillo (7) observou que a estrona produzia estro permanente em ratas castradas; porém, depois de certo tempo, as células vaginais causavam de responder a estrona, tornavam-se nucleadas e acompanhadas de leucócitos. Para sabermos se a alimentação cloretada tinha influência na resposta vaginal aos estrogênios, utilizamos 10 ratas castradas e injetadas com 10 U. I. diárias de Benzoato de Estradiol. Após 20 dias começamos a observar um cansaço na resposta á estrona pelo aparecimento de células nucleadas e leucócitos. A alimentação rica ou pobre em cloretos não influenciou no resultado.

Di Paola (8) (9) observou que a adrenalectomia sensibilizava a resposta á estrona. Em ratas adrenaoprivas, a estrona em pequenas doses produzia estros permanentes. Nós utilizamos 10 dessas ratas castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol que apresentavam cansaço vaginal e fizemos a adrenalectomia; o resultado foi o aparecimento da queratinização. Isso nos leva a crer,



mais uma vez, no antagonismo entre os estrogênios e os hormônios androgênicos da cortex da adrenal.

Essas mesmas ratas deixamo-las em seguida, primeiro em dieta rica e depois em dieta pobre em cloretos. Todas elas continuaram a permanecer em estro. Isso mostrou que a alimentação cloretada não influiu na resposta vaginal aos estrogênios, e, portanto, a desoxicorticoesterona não parece ser causadora do cansaço vaginal e sim outro corticóide.

CONCLUSÕES

1.º) A adrenalectomia unilateral não altera a função ovariana.

2.º) A adrenalectomia total em regime rico em cloretos faz espaçar o número de estros.

3.º) A adrenalectomia total, em regime pobre em cloretos, suspende a função ovariana ou escasseia o número de astros além de diminuir sensivelmente o peso corporal dos animais; as funções se recuperam em parte com o retorno do regime rico em cloretos.

4.) Em alguns casos de adrenoprivo o número de estros e o peso corporal pouco variaram devido a restos de adrenais ou a adrenais acessórias.

5.º) As células vaginais cansam de responder queratinizadamente as doses continuadas de Benzoato de Estradiol, porém a adrenalectomia faz retornar a queratinização contínua.

6.º) A alimentação cloretada não influiu na resposta vaginal ao Benzoato de Estradiol.

RESUMO

O autor estuda, em ratas adultas, as relações entre os ovários e as adrenais por intermédio da adrenalectomia, da ooforectomia e pela administração do Benzoato de Estradiol. Conclui que a adrenalectomia unilateral não altera a função ovariana, ao passo que a bilateral, em regime pobre em cloretos, suspende ou escasseia o número de estros e em regime rico, faz espaça-los. A adrenalectomia faz retornar a queratinização contínua em ratas castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol. Neste caso a alimentação rica ou pobre em cloretos não exerceu qualquer influência.

ABSTRACT

The relation between ovaries and adrenals was studied, in adults rats, by adrenalectomy, ooforectomy and estradiol benzoate administration.

The unilateral adrenalectomy does not bring alterations to the ovarian functions; but bilateral adrenalectomy, in rats in adrenaoprive diet, brings a stop or a decrease in the number of oestrus and in a rich chloride diet delays its frequency.

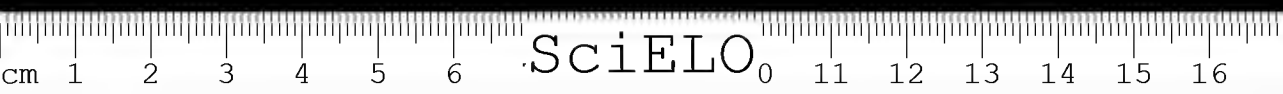
The return of the continue keratinization was observed by the adrenalectomy of the ooforectomized rats injected with estradiol; in this case the diet did not show influence.

Agradecimentos — Os nossos agradecimentos ao Prof. Dr. J. Ribeiro do Valle pelo estímulo e orientação na execução deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. *Lyman, A.* — *Am. J. of Physiology*, 85:414, 1928.
2. *Del Castillo, E. B.* — Le cyclo vaginal du rat normal et descapsulé, *Com. Rend. Soc. Biol.*, 99:1403, 1928.
3. *Clark, W. C.* — Maintenance of adrenalectomized guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46:253, 1941.
4. *Koneff, A.; Holmes, R. & Desse, J.* — Prevention of adrenalectomy changes in anterior pituitary of rat by sodium chloride administration, *Anat. Rec.*, 79:275, 1941.
5. *Ingle, D.; Gunther, G. & Nezamis, J.* — Effect of diet in on rats on adrenal weights and on survival following adrenalectomy, *Endocrinology*, 32:410, 1943.
6. *Martin, S. J. & Fazekus, J. F.* — Effect of sodium therapy on the ciclus and hipophysis of bilaterally suprarrenalectomized rats, *Proc. Soc. Biol. Med.*, 37:369, 1941.
7. *Del Castillo, E. B. & Calatroni, C.* — Cycle sexuel periodique et folliculine, *Com. Rend. Soc. Biol.*, 104:1024, 1930.
8. *Di Paola, G.* — Respuesta vaginal a la estrona continua y suprarrenalectomia, *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 15:61, 1939.
9. *Del Castillo, E. B. & Di Paola, G.* — Respuesta vaginal al estradiol y desoxicorti-coesterona, *Rev. Soc. Biol.*, 15:434, 1939.





ESTUDOS SOBRE A VACINAÇÃO ANTITÍFICA

1. *Vacinação pelo método de Felix*

POR JANDYRA P. DO AMARAL & PAULO M. G. DE LACERDA JR.

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

A clássica vacina antitífica, um dos mais antigos processos de imunização, tem sido profundamente modificada pelos trabalhos de Felix (1) que chamando a atenção para o pequeno interesse imunológico dos anticorpos flagelares, verifica o valor dos antígenos O, e muito essencialmente do antígeno Vi, nas provas de proteção contra a infecção tífica experimental. Como o antígeno Vi só é encontrado em culturas virulentas e é termolábil, Felix instituiu uma técnica de preparo de vacina com amostras virulentas de *B. tificos* mortos e preservadas pelo álcool, de maneira a reter intacto o antígeno Vi.

Em seus trabalhos éle prova ainda, (2) que empregando este tipo vacina consegue-se produzir u'a imunidade satisfatória e com o mínimo da reação, usando-se apenas duas doses de 0.25 e 0.5 ml, portanto, com um número muito menor de germens do que com a clássica vacina morta pelo calor e preservada pelo fenol, da qual eram necessárias 3 doses de 0,5-1, e 1. ml.

Sabemos que o poder protetor da vacina tífica pode ser avaliado por três métodos: —

- 1) pela imunização ativa de camundongos;
- 2) pela imunização de coelhos e provas posteriores para a verificação do aparecimento dos anticorpos O e Vi;
- 3) pela dosagem dos anticorpos O e Vi no soro de individuos vacinados.

O 1.º método citado, imunização ativa de camundongos, é o menos sensível, servindo unicamente, se negativo, como prova de seleção impugnando uma vacina.

Por qualquer um dos outros métodos, porém, é possível avaliar mais ou menos seguramente o poder protetor duma vacina tífica.

Recebido para publicação em 17-7-47.



-- No presente trabalho foram estudadas as possibilidades, em nosso meio, do emprego da vacina Vi de Felix, sendo referidos os resultados das dosagens realizadas em 213 indivíduos vacinados.

A vacina por nós usada, (*) segundo a técnica original de Felix, teve como prova preliminar de seleção a dosagem em camundongos, que, sendo inoculados com 500 milhões de germens, mostraram proteção contra 500 a 1000 D. M. L. de bacilos típicos.

Estas provas obedeceram à técnica aconselhada por Longfellow & Luipold (3).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da vacina: — A amostra usada Ty2, bastante enriquecida em antígeno Vi por várias passagens em camundongos, foi cultivada em garrafas de Roux com agar simples, sendo o crescimento de 24 horas a 37.º lavado com 20 ml de solução fisiológica. A cada 20 ml da suspensão de germens adicionaram-se 60 ml de álcool absoluto. Tal suspensão bacteriana, que continha, pois, 75% de álcool foi conservada em frascos bem arrolhados e ao abrigo da luz durante 2 a 3 dias, agitando-se diversas vezes durante este período. A seguir, foi feita a decantação do álcool sobrenadante e o volume primitivo foi recomposto com novo álcool a 75%, preparado com 60 horas de antecedência. Nesta 2.ª fase a suspensão foi conservada na geladeira. Finalmente foi feita a diluição da solução mãe dos germens com solução fisiológica adicionada de 22% de álcool para 1000 milhões de germens por ml.

Verificação da imunidade e eficiência da vacina: — Foram vacinados por via subcutânea 211 indivíduos com 2 doses da referida vacina, sendo a 1.ª de 0,25 ml e a 2.ª de 0,5 ml; o intervalo entre as 2 injeções foi de 8 dias, sendo que estas doses foram administradas indistintamente para homens e mulheres.

No intervalo entre as doses vacinantes e ainda até 10 dias após a última dose, verificou-se apenas em poucos casos ligeira reação local e raramente uma reação geral forte. Em uma média de 2% se apresentou ligeira reação térmica, dores locais e náuseas. Foi encontrado com frequência no local da inoculação da vacina ligeiro nódulo que, porém, se reabsorveu sem maiores consequências.

(*) Vacina preparada por um de nós (P. L.).

Destes 211 pacientes, 88 eram operários e estudantes e 123 doentes mentais do Hospital do Juquery, S. Paulo. No primeiro grupo, isto é, nos indivíduos não hospitalizados, não foi feita sangria preliminar para a verificação das aglutininas já existentes no sôro; cremos porém que esta prova pode ser compensada de maneira satisfatória pelos dados seguros fornecidos pelos pacientes de não terem jamais contraído febre tifoide. Nos restantes 123 indivíduos hospitalizados foi feita uma sangria preliminar que, pondo em evidência os anticorpos já existentes, supriu a falta de dados anamésicos seguros para estes doentes mentais. Em 113 pacientes deste 2.º grupo foi feita uma sangria 10 dias após a última dose de vacina, sendo o sôro separado e guardado em geladeira para se procederem às dosagens, sempre depois de 48 horas.

A dosagem do antígeno O foi executada com amostra "O 901". A incubação foi feita em banho maria a 45.º, sendo a leitura realizada 20 a 24 horas após. Para a pesquisa do antígeno Vi foi usada a amostra Bhatnagar; a leitura foi feita após incubação em banho maria a 37.º, seguida de permanência dos tubos por 20-24 horas em temperatura ambiente.

A leitura dos títulos aglutinantes foi baseada na maior diluição que apresentou aglutinação visível a olho nu.

RESULTADOS

Nossas verificações sobre os anticorpos O e Vi foram realizadas, assim para 2 grupos distintos: — um primeiro grupo para o qual não foi feita sangria preliminar e um segundo lote com sangria inicial e final.

Julgamos, porém, que poderíamos instituir para o 1.º grupo como ponto de comparação o índice médico geral de aglutininas O e Vi existentes nos indivíduos normais.

Nossas observações indicam que em 80% dos casos se encontra um título aglutinante inferior a 1/20 e que apenas em 4 casos (cerca de 5%), observou-se título superior a 1/80. Quanto as aglutininas Vi, jamais foram encontradas em título igual, ou superior a 1/20. A tabela I indica com detalhe os títulos iniciais encontrados.

Nossos resultados estão mais ou menos em relação com os de Macedo Leme e Carrijo (4) que indicaram uma porcentagem de 18,69 de indivíduos com títulos de 0 a 1/20 e de 3,34 para títulos iguais ou superiores a 1/80. Se compararmos estes títulos aos apresentados pelos pacientes do 1.º grupo 10 dias



após a vacinação, chegaremos á conclusão que, apesar de indiretamente, a comparação se torna simples pois os dados são claros e absolutamente concludentes.

TABELA I

Titulos de aglutininas 0 e Vi em individuos não vacinados.

aglutininas	$\frac{1}{<20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	Total
O	99	9	10	4	—	—	1	123
Vi	123	—	—	—	—	—	—	123

Não se pode negar o poder protetor da vacina pois os titulos finais são notavelmente superiores. É o que se pode apreciar na tabela II.

TABELA II

Titulos de aglutininas 0 e Vi nos individuos vacinados e que não sofreram sangria inicial.

aglutininas	$\frac{1}{<20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	Total
O	6	13	20	23	17	8	1	—	88
Vi	4	1	10	20	25	16	8	4	88

O anticorpo Vi que se apresentou em 100% dos pacientes com titulo abaixo de 1/20 se mostra extraordinariamente aumentado, pois sómente em (4,5% dos mesmos se comporta como na tabela I; o índice maior de aglutininas aparece acima de 1/80 e abaixo de 1/320) O mesmo se observa para as seguintes aglutininas O, onde a porcentagem de 80,4 para titulos abaixo de 1/20 é reduzida a 7.

Para o segundo grupo de pacientes, cujas comparações foram realizadas diretamente pelas sangrias inicial e final, a mesma sequênciã se verifica, havendo uma grande diminuição dos titulos negativos, com consequente aumento dos titulos mais altos, para o anticorpo O, e sempre com maior intensidade para as aglutininas Vi. É o que se pode verificar com detalhe na tabela III.

TABELA III

Título de aglutininas O e Vi nos indivíduos vacinados e que sofreram sangria inicial

aglutininas	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	Total
O	6	13	28	30	22	11	3	—	113
Vi	9	3	18	38	25	14	3	3	113

A tabela IV nos dá uma ideia da imunidade conferida pela vacina duma maneira mais nítida, isto é, pela relação entre o número de soros e o aumento de títulos entre a 1.^a e a 2.^a sangria.

TABELA IV

Relação do aumento do título para aglutininas O e Vi entre a 1.^a e a 2.^a sangria

Aglutini- ninas	Sem alteração		2X	4X	8X	10X ou +	Total	porc. de tí- tulos não alte- rados	porc. de tí- tulos pelo menos duplos aos ini- ciais
	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{20}$							
O	6	2	18	33	26	28	113	7,0	92,9
Vi	9	—	3	18	37	4	113	7,9	92,1

Nossa tabela é altamente encorajadora pois Felix em seus trabalhos (2) já computa como títulos Vi significantes depois da vacinação, aqueles que se mostraram duplamente aumentados, acrescimos portanto bem inferiores aos encontrados por nós.

De nossas observações resulta portanto a conclusão que com uma vacina Vi perfeitamente preparada já com duas doses pode-se obter um indice porcentual imunitario bastante satisfatorio contra a febre tifóide.

O temor que parece existir para alguns, sobre as fortes reações gerais ou locais em virtude da maior concentração de germens por ml. parece infundado, pois não verificamos nada mais do que sempre se esperou sobre reações vacinais: — uma certa porcentagem reduzida de indivíduos com constituição mais

sensível, apresentando reações locais ou gerais sem grande importância e que sempre desapareceram em 24-48 horas.

RESUMO E CONCLUSÕES

Foi estudado o poder protetor da vacina tífica preparada pela técnica de Felix.

Pela vacinação de 213 pacientes foi verificada a inocuidade da vacina que só produziu reações locais e gerais fortes em pequena porcentagem.

No local da inoculação quase sempre se formou um pequeno nódulo que porém se reabsorveu sem maiores consequências.

Foi verificado que duas injeções de 0,25 e 0,5 ml. respectivamente são suficientes para estimular a formação dos anticorpos O e Vi de maneira altamente satisfatória.

ABSTRACT

The protective power of a typhoid vaccine, prepared according to Felix's technique, has been studied on a total of 213 patients. Apart from local reactions and violent general reactions, in a small percentage of inoculated persons, the vaccine caused no serious harmful reactions.

In almost every case, a small nodule formed at the site of inoculation, which however disappeared completely after a few days.

It could be shown that two vaccine injections of 0.25 and 0.5 ml respectively are sufficient to stimulate the formation of O e Vi antibodies to a satisfactory height.

BIBLIOGRAFIA

1. Felix, A. — A new type of the typhoid and paratyphoid vaccine, *British Med. J.*, 1:391-395, 1941.
2. Felix, A.; Rainsford, S. G. and Stokes, E. J. — Antibody response and systemic reactions after inoculation of the new type of T. A. B. C. vaccine *British Med. J.*, 1:435, 1941.
3. Longfellow, D. & Luippold, G. F. — Typhoid vaccine studies. Vi. The production of cross — immunity between members of typhoid-paratyphoid group of microorganisms, *Journal of Immunology*, 45:249-260, 1942.
4. Leme, J. S. Macedo & Carrijo, L. N. — Nivel médio de aglutininas tíficas em S. Paulo, *Mem. Inst. Butantan*, 17:121, 1943.

ESTUDO COMPARATIVO DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GÊNERO *PAMPHOBETEUS* POCOCK, 1901 (*MYGALOMORPHAE*)

POR W. BÜCHERL

(Do Laboratório de Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Entre as *Theraphosinae* do Brasil chama mais atenção o género *Pamphobeteus* Pocock, 1901, em primeiro lugar porque pertence a este género a grande maioria das caranguejeiras, principalmente do Estado de São Paulo e depois porque os caracteres morfológicos que, separadamente ou em conjunto, foram aproveitados pelos especialistas na sistematização específica dos exemplares deste género são sujeitos a variações tão amplas, que se torna praticamente difficilimo senão impossivel, classificar com exatidão a espécie a que pertence determinado individuo deste género.

Existem, nos trabalhos realizados por especialistas nacionais e estrangeiros, algumas falhas basicas comuns que devem ser apontadas como responsáveis pela confusão sistemática dentro deste género: —

- 1) a escassez de exemplares e a consequente ausência de dados comparativos sobre o valor específico deste ou daquele caracter morfológico;
- 2) o fato de terem sido descritas espécies novas quase sempre apenas com fêmeas, ignorando os próprios autores os respectivos machos.

Assim Ausserer (1), em 1871, descreve como espécie nova a *Pamphobeteus isabellinus*, com habitat no Estado do Rio de Janeiro, baseando sua descrição apenas num único exemplar, uma fêmea.

Em 1880 foi descrita a segunda espécie brasileira, a *Pamphobeteus benedenii* (*Lasiadora benedenii*), por Bertkau (2), baseada igualmente apenas numa fêmea.

Em 1923, C. de Mello-Leitão (3), estabeleceu nada menos de 12 espécies novas, descrevendo igualmente apenas uma fêmea para cada espécie, sem referir-se a machos. São as seguintes as espécies novas do referido autor:

Recebido para publicação em 30-7-47



<i>Pamphobeteus platyomma</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus rondonienseis</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus roseus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus sorocabae</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus melanocephalus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus cesteri</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus eucullatus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus tetracanthus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus holophaeus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus exsul</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus insularis</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus anomalus</i>	sem indicação do sexo.

Finalmente, a fauna brasileira deste gênero foi enriquecida ainda com novas espécies por S. de Toledo Piza Jr. e por B.M. Soares.

O primeiro (4) descreveu como espécie nova a *Pamphobeteus piracicabensis*, baseando-se em 9 exemplares, todos fêmeas. O autor, infelizmente, não se libertou das normas costumeiras na apreciação dos caracteres morfológicos, mas como que antevendo sãbiamente o pouco valor sistemático, principalmente do tamanho, da distância e da posição dos olhos e do número e posição dos espinhos das pernas, ele termina a descrição da espécie acima, dizendo:

"Todos esses caracteres, usados também na diagnôse das outras espécies, são aqui, conforme pude constatar pelo exame de 9 exemplares, sujeitos a variação, de maneira que é possível que o número de espécies de Terafosoidéas desse e de outros gêneros venha a reduzir-se, quando se conhecer melhor a amplitude dessas variações."

Mais tarde, o mesmo autor (5) descreve como novos a *Pamphobeteus masculus* 1 macho só e a *Pamphobeteus communis* 14 machos.

Também estas descrições foram terminadas pelo autor com as seguintes palavras: "Do exame que procedi nos 13 paratipos desta espécie, muito frequente em Piracicaba, pude, mais uma vez, constatar as variações, a que estão sujeitos os caracteres, levados em conta na definição das espécies o que muito compromete a segurança do conceito de espécie relativamente à aranhas. Assim, os olhos anteriores podem ser equidistantes, como podem os médios ser muito pouco mais afastados entre si que dos laterais. O tamanho também varia, podendo-se mostrar quase iguais. Os olhos laterais anteriores e posteriores podem distar apenas um quarto de diâmetro. A fóvea torácica pode ser direita ou procurva e as sigilas externas curtas e largas. As tíbias I podem ser muito espinhosas e a apófise apical externa provida de um forte dente externo. A apófise interna pode ser destituída de dente. A tíbia dos palpos pode ser armada de 2-2-2-1-1 espinhos internos".

Em 1944 S. de Toledo Piza Jr. (6) descreveu ainda as seguintes espécies novas:

<i>Pamphobeteus mus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus cephalophoeus</i>	fêmea.

B.M. Soares (7) estabeleceu, seguindo da mesma forma os critérios apontados pelo prof. C. Mello-Leitão, as seguintes espécies novas:

<i>Pamphobeteus urbanicolus</i>	fêmea.
<i>Pamphobeteus ypirangensis</i>	3 machos.

O bem avisado e prudente autor conclui, à pagina 267: "O critério adotado deverá ser este, até quando se puder, com segurança, obter as variações possíveis dentro destas espécies, pelo exame de grande número de exemplares. Julgo que, diante dos estudos feitos pelo prof. Toledo Piza nos 13 exemplares de *P. communis* Piza e em *P. piracicabensis* Piza, todas as espécies brasileiras deste gênero virão algum dia a ser reunidas em, apenas, duas ou três".

C. Mello-Leitão tem o mérito indiscutível de ter lançado as bases sistemáticas para a especificação das migalomorfias brasileiras. Entretanto, justamente no tocante ao gênero *Pamphobeteus*, o autor certamente dispôs de material deficiente quantitativamente, a impossibilitar um estudo comparativo, mais aprofundado, das variações.

Na caracterização genérica, por exemplo, o autor diz que, nos machos os metatarsos se dobram "sobre o ápice" da apófise infero-esterna e, algumas páginas depois, lê-se ... "os metatarsos se flexionam entre as duas apófises apicais".

Ainda na descrição genérica de *Pamphobeteus* lemos: "Olhos anteriores pouco desiguais, equidistantes, em linha bem procurva.... Laterais posteriores menores que os anteriores ... Metatarsos dos dois primeiros pares de pernas com escópulas que vão ter à base do segmento; os do terceiro par com escópulas em cerca de dois terços apicais; os posteriores com pequenas escópulas apicais". "Na caracterização específica, porém, e já na chave sinótica das então 13 espécies brasileiras o mesmo autor se afasta sensivelmente do que ele mesmo diz, ser genérico, atribuindo aos olhos, às escópulas metatarsais, às dimensões das pernas, etc... importância específica.

O próprio autor, porém, ainda que tenha apenas tido fêmeas para a sua chave sinótica, chama-lhes de "muito affins".

Vejam, agora, os caracteres morfológicos que foram tomados pelos referidos autores como essenciais para a criação de espécies novas.

Consideremos, em primeiro lugar, a extensão da área ocupada pelas escópulas metatarsais dos quatro pares de pernas. Tendo realizado medições das escópulas dos metatarsos em 142 exemplares, distribuídos para 5 espécies de *Pamphobeteus*, chegamos ao seguinte resultado invariável:

- a) Metatarsos do primeiro par de pernas escopulados quase até a base;

b) Metatarsos do segundo par de pernas escopulados igualmente até a base ou, muito raras vezes, um pouco menos;

c) Metatarsos do terceiro par de pernas escopulados nos dois terços apicais (raras vezes apenas na metade apical);

d) Metatarsos do quarto par de pernas apenas com pequenas escópulas na ponta do ápice.

Em vista destes resultados conferimos as espécies novas dos citados três autores, reunindo as conclusões na seguinte tabela:

Espécie de <i>Pamphobeteus</i>	Áreas ocupadas pelas escópulas dos metatarsos das pernas			
	1.º par de pernas	2.º par de pernas	3.º par de pernas	4.º par de pernas
<i>platyomma</i> .	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>benedenii</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>ronzoniensis</i> .	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>roseus</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>sorocabae</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>melanocephalus</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>isabellinus</i> ...	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>cesteri</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>cucullatus</i> ...	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>tetracanthus</i> .	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>holophaeus</i> ...	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>ersul</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>insularis</i>	não consta			
<i>piracicabensis</i> .	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>musculus</i>	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>communis</i>	não consta	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>urbanicolus</i> ..	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais
<i>ypirangensis</i> .	não consta			
<i>anomalus</i> ...	até a base	2/3 apicais	metade	apicais
<i>mus</i>	até a base			
<i>cephalophaeus</i> .	até a base	até a base	2/3 apicais	apicais

Ressalta, pois, do esquema que estes dados se repetem em todas as espécies do género *Pamphobeteus*, não convindo, assim, às escópulas metatarsais nenhum valor específico, mas, no máximo, apenas importância genérica.

Vejam, em segundo lugar, a conformação morfológica do cômodo ocular e dos olhos.

Já S. de Toledo Piza e B. M. Soares dão a estes característicos um valor específico muito relativo, senão nulo, como já assinalamos, referindo-nos aos estudos destes dois colegas. Seja declarado aqui, desde logo, que os termos: "Olhos anteriores em fila procurva, muito procurva, pouco procurva ou ainda muito pouco procurva, de maneira que uma linha tangente à borda anterior dos médios passa pouco adiante do meio dos laterais ou no meio dos laterais ou ainda um nada atrás do meio dos laterais", são absolutamente insuficientes e provavelmente até sem valor genérico. De fato, como temos auferido de medições e comparações do número de exemplares referido, estes dados variam não sómente de espécie em espécie, mas de indivíduo para indivíduo, segundo o método de apreciação do especialista. Variam até mesmo num indivíduo, em que, muitas vezes, os olhos de um lado são de tamanho muito diferente dos do outro lado do cômodo ocular.

Para certificar-se melhor destes fatos, basta coordenar os seguintes dados:

O cômodo ocular dos *Pamphobeteus*, mais ou menos adultos, tem o comprimento médio mínimo de 1,4 mm por um comprimento médio máximo de 2,4 mm e uma largura média mínima de 2,0 mm e largura média máxima de 2,9 mm.

Para estes comprimentos e estas larguras, que, portanto, variam muitíssimo, temos a considerar ainda a existência de três planos diferentes de alturas do cômodo ocular, a saber:

- a altura da posição dos olhos laterais;
- a altura da posição dos olhos médios anteriores;
- a altura do ponto mais elevado do cômodo ocular, atrás dos olhos médios anteriores.

Estas três alturas são: para os olhos laterais de 0,2 mínimo até 0,35 máximo; para os olhos médios anteriores de 0,4 mínimo até 0,6 mm máximo; para a maior elevação do cômodo ocular de 0,7 mínimo a 1,1 mm máximo.

Portanto, nos diversos níveis de elevação há novamente uma enorme variação. Isto significa que, si o especialista, ao considerar a posição dos olhos



(da fila dos olhos anteriores) por meio de uma lupa, conservando a aranha em posição estritamente horizontal sobre a platina, obterá, ao medir a linha dos olhos, um valor completamente diferente do que, quando a aranha é ligeiramente levantada anterior ou posteriormente. Estes valores já se apresentariam diferentes, mesmo quando os olhos de cada espécie fossem rigidamente iguais entre si; mas como os olhos variam também em tamanho, esses valores resultam tão diversos que são simplesmente, como dissemos acima, "insuficientes especifica e genericamente".

Quanto ao cômodo ocular de *Pamphobeteus* há a salientar que representa uma elevação subcircular, em cujo meio há uma nova elevação, que atinge o máximo de altura atrás dos olhos médios anteriores e posteriores, com o campo visual a abranger os lados da aranha.

Os olhos médios posteriores repousam em plano horizontal (mais ou menos) da primeira elevação, tendo seu campo visual para cima e para trás.

Os olhos médios anteriores, finalmente, se encontram nas bordas da segunda elevação, com campo visual para a frente, para cima e para os lados anteriores.

Os olhos médios anteriores são sempre redondos e apresentam um tamanho mínimo de 0,4 e máximo de 0,6 mm. Os olhos laterais anteriores são ora ovais, ora quase redondos, geralmente, porém, redondos na frente e angulosos atrás e apresentam um diâmetro longitudinal médio mínimo de 0,5 e máximo de 0,8 mm e um diâmetro horizontal médio mínimo de 0,3 e máximo de 0,6 mm. Os olhos laterais posteriores apresentam, na maioria dos casos, a mesma forma dos laterais anteriores e os mesmos diâmetros, podendo, porém, ser ainda um pouco menores que os laterais anteriores. São geralmente redondos atrás e angulosos na frente. Seu diâmetro médio mínimo, na direção longitudinal, é de 0,3 mm e o médio máximo de 0,8 mm, com 0,3 a 0,6 de diâmetros horizontais mínimos e máximos respectivamente.

Os olhos médios posteriores apresentam, muitas vezes, forma irregular, podendo, no mesmo animal, variar em tamanho e forma (num lado pode haver completa fusão entre o olho médio posterior e lateral posterior e no outro lado não), até ovais, elipsoides, angulosos atrás, meio quadrados com cantos redondos ou ainda de contornos absolutamente irregulares, mas sempre com diâmetro longitudinal maior do que o horizontal (0,2 a 0,7 mm diâmetro longitudinal mínimo e máximo; 0,1 a 0,4 diâmetro em sentido atravessado).

Das medidas acima sobre o cômodo ocular e os olhos se infere:

1) que a curvatura da fila dos olhos anteriores não pode constituir caracter específico seguro, pelo menos não no gênero *Pamphobeteus*;

2) que o tamanho, a distância entre os olhos anteriores, médios e laterais e entre os laterais anteriores e posteriores e ainda o tamanho e a distância dos médios posteriores variam extremamente, não somente dentro da mesma espécie, mas até no mesmo indivíduo, sendo estas variações tão amplas que, si se quizesse atribuir importância específica a estes caracteres, qualquer exemplar de *Pamphobeteus* poderia ser posto sob qualquer espécie do mesmo gênero.

Chegamos a estas conclusões depois de termos conferido os cômodos oculares e os olhos de:

55 exemplares de <i>P. sorocabae</i>	(35 fêmeas e 19 machos);
42 exemplares de <i>P. roseus</i>	(37 fêmeas e 5 machos);
38 exemplares de <i>P. tetracanthus</i>	(25 fêmeas e 13 machos);
21 exemplares de <i>P. cesteri</i>	(13 fêmeas e 8 machos);
7 exemplares de <i>P. rondonienseis</i> (?)	(7 fêmeas)

No mesmo exemplar os olhos da direita podem ser menores do que os da esquerda como pode o olho médio posterior estar unido, num lado, ao lateral e, no outro lado, separado.

Em exemplares diferentes, mas da mesma espécie, os olhos laterais posteriores ora são iguais, ora menores ou maiores (o último caso é raro, mas existe igualmente) do que os laterais anteriores. Os olhos médios anteriores ora são maiores, ora são iguais, ora menores do que os laterais (devendo-se tomar em consideração que os médios são sempre redondos, muitas vezes, porém, circundados de um anel que facilmente é confundido com a quitina do cômodo ocular, — enquanto que os laterais nunca são completamente redondos, mas elipsoides ou angulosos no lado posterior de maneira que a apreciação objetiva da diversidade de tamanho entre estes olhos é extremamente difícil. Esta dificuldade é ainda aumentada pelo fato, já exposto, de estes olhos se encontrarem em níveis de altura e posição completamente diferentes).

Os olhos médios posteriores ora são duas e meia vezes menores do que os laterais posteriores ora são quase iguais em tamanho a estes.

O próprio cômodo ocular, na mesma espécie, varia em comprimento, largura e nas alturas podendo ora ser quase duas vezes mais largo do que longo, ora apenas um pouco mais largo do que longo. Nunca, porém, é completamente redondo.

Julgamos, pois, poder concluir com toda a segurança que a conformação morfológica do cômodo ocular e a disposição dos olhos não formam igualmente nenhum caracter morfológico específico no gênero *Pamphobeteus*.

Insistimos nestas comparações, porque nos trabalhos sistemáticos dos diferentes autores, principalmente na chave sinótica de Mello-Leitão se dá grande importância específica aos olhos e ao cômodo ocular. Aliás o próprio Mello-Leitão, quando descreve as espécies separadamente, reduz novamente esta importância específica, como vamos ver:

a) *Cômodo ocular:*

“Muito baixo, duas vezes mais largo que longo” (Mello-Leitão, p. 228)...

P. platyomma;

“... alto, duas vezes mais largo que longo...” (idem, p. 234) *P. melanocephalus* e *holophacus*;

As três espécies, portanto, apresentam as mesmas medidas da rima ocular. Mas também vimos acima que *P. sorocabae*, *rosceus*, etc.... apresentam indivíduos com as mesmas medidas. Ainda cumpre salientar, neste conjunto, que tivemos a oportunidade de reexaminar o tipo *P. platyomma* (No. 155 do Departamento de Zoologia, em São Paulo) e encontramos as seguintes medidas da rima ocular: 1,9 mm de comprimento por 2,4 mm de largura. Portanto, não é duas vezes mais larga do que longa.

Todas as outras espécies de *Pamphobeteus*, descritas pelos três autores citados, apresentam rima ocular um pouco mais larga do que longa (Ver Mello-Leitão, Toledo Piza e Soares, nas obras citadas).

b) *Olhos e disposição ocular:*

1) Uma reta tangente à borda anterior dos médios passa adiante do meio dos laterais: *P. platyomma*; *rosceus*; *sorocabae*; *isabellinus*; *cesteri*; *tetracanthus*; *anomalus*; *piracicabensis*; *ypirangensis*; *urbanicolus* — (Mello-Leitão: Toledo Piza; Soares, *opera citada*).

2) Uma reta tangente à borda anterior dos médios passa atrás do meio dos laterais: *P. benedenii* e *holophaeus* — (Bertkau; Mello-Leitão, nos trabalhos citados).

3) Uma reta tangente à borda anterior dos médios, passa no meio dos laterais: *P. rondoniensis*; *melanocephalus*; *cucullatus*; *exsul*; *insularis* — (Mello-Leitão).

Toledo Piza, nos dois trabalhos citados, ao descrever *P. masculus*, *communis*, *mus* e *cephalophocus* já relega este caracter em segundo plano, omitindo simplesmente “a reta dos olhos anteriores”.

c) *Tamanho dos olhos e distância interocular:*

Os três autores admitem as seguintes modalidades: médios anteriores menores que os laterais — *platyomma*, *sorocabae*, *melanocephalus*, *cesteri*, *holophaeus*, *exsul*, *insularis*, *cephalophaeus*, *mus*, *masculus*, *communis*, *urbanicolus*, *ypirangensis*; médios anteriores iguais aos laterais — *benedenii*, *rondoniensis*, *roseus*, *isabellinus*, *cucullatus*, *tetracanthus*, *anomalus*; laterais anteriores maiores que os posteriores — *platyomma*, *rondoniensis*, *cucullatus*, *tetracanthus*, *holophaeus*, *exsul*, *insularis*, *ypirangensis*, *urbanicolus*, *mus*, *cephalophaeus*, *communis*, *masculus*; laterais anteriores e posteriores iguais — *benedenii*, *roseus*, *sorocabae*, *melanocephalus*, *isabellinus*, *cesteri*, *anomalus*.

Deduz-se disso que não existe caracter específico como os próprios três autores deixam inferir. C. Mello-Leitão implícita e Toledo Piza e Soares explicitamente (confira os trabalhos dos dois últimos, nas paginas 121 e 7-8 e ainda 269 a 270).

A fôvea torácica transversal, direita, procurva ou recurva; o comprimento e a largura do esterno: o espaço entre a margem do esterno e a sigila posterior, são outros caracteres que, ao conferirmos os 163 exemplares adultos da coleção do Instituto Butantan, variam de tal maneira que são praticamente inaproveitáveis para a especificação de *Pamphobeteus*.

Quanto ao número e à posição dos espinhos que armam os artículos das pernas e dos palpos, há novamente uma grande variação, até mesmo num só individuo, onde os espinhos de uma perna, dum lado, não correspondem nem em número, nem na posição exata, aos da outra perna, do outro lado.

Seria temerário, pois, pretender que o número dos espinhos constitua um caracter específico fixo.

Vejamos os três citados autores e sua apreciação das medidas do esterno das 19 espécies de *Pamphobeteus*: “Esterno um pouco mais longo do que largo”



— *P. platyomma*, *benedenii*, *rondonienseis*, *sorocabae*, *melanocephalus*, *urbani-colus*, *communis*, *masculus*, *mus*, *cephalopheus*, *piracicabeusis*.

O próprio Mello-Leitão parece ter atribuído muito pouco valor a este caracter, pois, em grande número de espécies êle nem cita as medidas (*roseus*, *cesteri*, *cucullatus*, *tetracanthus*, *holophocus*, *exsul*, *insularis*), como também Soares omite a descrição do esterno em *ypirangensis*.

Para a sistematização foram, em geral, aproveitados os espinhos:

- a) das tíbias dos palpos;
- b) das tíbias dos quatro pares de pernas;
- c) dos metatarsos dos quatro pares de pernas.

Quanto à disposição "*in loco*" destes espinhos, principalmente nas tíbias e nos metatarsos das pernas, costumam distinguir-se:

- a) espinhos infero-apicais;
- b) espinhos inferiores;
- c) espinhos anteriores;
- d) espinhos posteriores.

Na prática, porém, somente raras vezes, os espinhos obedecem a uma distribuição ordenada. Pelo contrário, em geral, não se podem distinguir rigidamente espinhos inferiores, anteriores e posteriores. O próprio Soares, com acerto, abandonou esta divisão, seguindo a orientação de Toledo Piza, distinguindo apenas entre espinhos apicais, e laterais inferiores.

Quanto ao numero dos espinhos das tíbias dos palpos e das tíbias e dos metatarsos das quatro pernas, há uma certa regra, que pode ser resumida assim:

"O número de espinhos das tíbias e, mais ainda, dos metatarsos de *Pamphobeteus* aumenta progressivamente nas pernas posteriores até tornarem-se francamente "numerosos" (acima de 20) nos últimos metatarsos. Sua distribuição, porém, é bastante irregular, de maneira que, só raras vezes, podem ser computados como pertencentes a uma fila anterior, uma fila posterior e uma fila inferior. Apenas os espinhos apicais apresentam disposição certa (infero-lateral dos ápices), si bem que também costumam aumentar em número nas pernas posteriores, ou, melhor, aos dois clássicos espinhos apicais são acrescentados lateralmente mais outros espinhos, geralmente menores e, às vezes, um tanto afastados da borda lateral; em alguns casos acumulados numa área apical".

Representando este fato em números, poder-se-ia estabelecer a seguinte média de espinhos, característica talvez não sómente para o género *Pamphobeteus*, mas para todas as terafôseas:

Tíbia I — 2 espinhos apicais e 0-2 espinhos látero-inferiores;

Tíbia II — 2 espinhos apicais e 0-3 espinhos látero-inferiores;

Tíbia III — 2 espinhos apicais (e 1-1 apicais secundários) e 8 a 11 espinhos látero-inferiores;

Tíbia IV — 2 espinhos apicais (e 1-3 apicais secundários) e 8 a 14 espinhos látero-inferiores;

Metatarso I — 2 espinhos apicais;

Metatarso II — 2 espinhos apicais;

Metatarso III — 2 espinhos apicais (e 0-3 apicais secundários); muitos espinhos látero-inferiores;

Metatarso IV — 2 espinhos apicais (1-6 apicais secundários) e numerosos espinhos látero-inferiores, mais do que nas tíbias correspondentes.

Tíbias dos palpos: de 0 a 5 espinhos na face interna, sendo geralmente 3-4 apicais.

Convém, ainda, ter bem presente o fato de que são raríssimas as aranhas caranguejeiras adultas que não tenham perdido um ou outro espinho, principalmente, pelo hábito da caranguejeira defender-se contra pequenos mamíferos (camundongos, ratos, cuiças, gambás, etc...) esfregando, com as pernas trazeiras, em movimentos rápidos, o abdômen, fazendo desprender-se os finíssimos pêlos dorsais do mesmo que, levíssimos e munidos de ganchos na extremidade, envolvem o animal agressor e se encravam em suas mucosas, determinando viva irritação.

O desprendimento destes pêlos é principalmente causado pelos numerosos espinhos das tíbias e dos metatarsos das últimas pernas, sendo que, nesta operação, não poucos espinhos se desprendem igualmente pelo atrito. Verificamos este fato repetidas vezes e, ainda, esperamos ter a oportunidade de nos referir a êle, quando tratarmos dos hábitos de vida das caranguejeiras.

Ora, é extremamente difícil, na contagem dos espinhos, não omitir aqueles que faltam e cuja existência é apenas notada por pequeníssimas áreas, livres de pêlos, no ponto de sua inserção.

O comprimento total, geralmente medido pelos especialistas desde a extremidade do abdômen até a ponta da parte horizontal das quelíceras, é outro caracter muito relativo e sujeito a grandes variações mesmo já em animais vivos e, ainda mais, em animais conservados em altas concentrações alcoólicas.

Fêmeas, cheias de ovos, apresentam abdômen grande, repleto de ovos e de dimensões duas vezes maiores do que fêmeas não prenhes. Por outro lado podem as caranguejeiras ficar meses sem alimentar-se (desde que haja, porém,

água à sua disposição), notando-se o estado de fome principalmente pelo tamanho reduzido do abdomen. Tudo isto vem influir muito na medição do comprimento geral.

Resta, neste conjunto, esclarecer ainda a questão "adultos". Os autores, na aferição do comprimento total, consideram geralmente como animais adultos, todos os machos que têm órgão copulador na articulação terminal dos palpos e apófises tibiais no 1.º par de pernas e ainda um órgão estridulante (os dois últimos caracteres não existem em todos os gêneros) e todas as fêmeas com órgão estridulante (não em todos os gêneros) ou de porte avantajado. Este modo de pensar e agir é a consequência do fato de, mesmo os especialistas em sistemática de aranhas, aceitarem como realidade de que a caranguejeira, após sucessivas trocas de cutícula em diferentes períodos, cresce periodicamente até atingir a madureza sexual, caracterizada externamente pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários (apófises e órgão copulador e ainda, em alguns gêneros, aparelho estridulante, nos machos; aparelho estridulante, na maioria dos gêneros, nas fêmeas). Atingida esta última fase e iniciada a reprodução, não haveria mais muda de cutícula e, portanto, o animal não cresceria mais.

Em alguns trabalhos este conceito de "adulto" já foi posto em dúvida e pelas nossas observações em caranguejeiras, mantidas em cativeiro no Instituto Butantan, já há 4 anos, verificamos que, mesmo após procriação de filhotes, as fêmeas, quando bem alimentadas e quando colocadas em ambiente propício, continuam trocando a cutícula e aumentando de tamanho. Igualmente os machos, que, depois de terem feito a cópula com a fêmea, precisam ser separados dela, para não serem mortos e devorados, aceitam bem os alimentos e renovam a cutícula com novo crescimento.

Estes fatos foram observados não somente no gênero *Pamphobeteus*, mas também em *Lasiadora*, *Acanthoscurria* e *Grammostola*.

Nos três últimos gêneros, em que existem igualmente os chamados "aparelhos estridulantes" como expressão de uma caracterização sexual secundária, constatamos que existe uma verdadeira graduação na formação destes órgãos estridulantes. Na fase imediatamente anterior à madureza sexual, depois da 4.ª muda de cutícula, já estão presentes os pêlos estridulantes, as apófises tibiais e o órgão copulador ainda que não completamente desenvolvidos.

Em *Acanthoscurria violacea*, por exemplo, os pêlos estridulantes nos trocantes dos palpos são apenas 3 a 5 em número, mal formados, duas vezes menores do que num exemplar muito crescido e nos trocantes do primeiro par de pernas, ora não existe nenhum pêlo estridulante ora apenas são presentes 1 ou 2, ainda menores que os dos palpos.

Em animais muito crescidos, ao contrário, estes pêlos são grandes, em número acima de 10, baciliformes e com ramificações nítidas.

Estes fatos, condicionados às diversas fases evolutivas dos indivíduos, são de suma importância para a sistemática e demonstram claramente que não se pode tomar em consideração o comprimento de um determinado indivíduo como caracter específico.

Quanto à largura do cefalotorax dá-se o mesmo, como temos verificado em nossos exemplares. Acresce ainda o fato de que, no alcool, diminui a medida da largura do cefalotorax pela desidratação e conseqüente retração.

O comprimento das quatro pernas é apenas um caracter genérico ou nem mesmo isso, como já tem salientado implicitamente o próprio Mello-Leitão, não oferecendo medidas particulares em nenhuma espécie.

Em todos os indivíduos, por nós conferidos, tanto machos como fêmeas, o comprimento decresce na seguinte ordem:

- 4.º par;
- 1.º par;
- 2.º par;
- 3.º par.

Tendo, pois, demonstrado, à mão de mais de 700 exemplares de *Pamphobeteus*, entrados no Instituto Butantan durante os anos de 1944 a 1947, dos quais 168 exemplares foram exatamente medidos e comparados em todos os caracteres acima referidos, que não podem ser aproveitados como caracteres específicos:

- 1) a extensão das escópulas dos metatarsos;
 - 2) o comprimento, a largura e a altura do cômodo ocular;
 - 3) o tamanho, a posição e a distância dos olhos;
 - 4) o afastamento das últimas sigilas da margem do esterno;
 - 5) o número dos espinhos nas articulações das pernas e dos palpos;
 - 6) o comprimento total e a largura do cefalotorax;
 - 7) a curvatura da fóvea torácica, o comprimento e a largura do esterno.
- só nos restava procurar novos caracteres. Escolhemos, para isto, um caminho que só poderia ser trilhado por quem dispuzesse de grandes séries de exemplares do mesmo gênero.

Dentre os 700 exemplares de *Pamphobeteus* escolhemos os melhores, em número de 163 inicialmente (número este hoje já acima de 200 pelas chegadas contínuas de caranguejeiras ao Instituto Butantan) e procedemos à sua classi-

ficação, valendo-nos, inicialmente, da chave sinóptica de Mello-Leitão, acrescida pelas espécies novas de Toledo Piza e Soares.

Em ordem de frequência, seguindo à risca aquela chave e os trabalhos dos outros dois colegas, encontramos naquele acervo as seguintes espécies:

P. sorocabae, roseus, benedenii, cucullatus, rondonienseis, tetracanthus, holophaeus, melanocephalus, isabellinus, piracicabensis, cephalopnocus, mus, ypirangensis, urbanicolus, communis.

Cumpre, porém, acentuar que em quase nenhum indivíduo houve concordância absoluta nos caracteres apontados pelos autores, de maneira que a determinação específica era apenas provável, em face das variações já expostas anteriormente.

Os machos, não puderam ser determinados, já que eram desconhecidos os métodos de sua especificação, com exceção de *P. communis* e *masculus*, descritos como novos por Toledo Piza, e de *ypirangensis* de Soares, três espécies novas, das quais não se conheciam as fêmeas.

Começamos, pois, abstraindo da classificação provisória, acima referida, a separar do grande número de exemplares deste gênero os machos das fêmeas. Depois dispuzemos sobre uma grande mesa as fêmeas e, depois, de bem secas (as cores naturais só aparecem bem, em estado seco), procedemos à sua separação em lotes, segundo o colorido geral, de fundo, e os desenhos ornamentais e ainda a cor dos pêlos, tendo especial cuidado em examinar não somente o lado superior da caranguejeira como também o inferior.

Pudemos, desta maneira, reunir todas as fêmeas do gênero *Pamphobeteus* em cinco lotes, tendo cada lote um bom número de exemplares, alguns acima de 70.

Neste conjunto queremos acentuar, mais uma vez, que não se podem observar os desenhos ornamentais nem o colorido geral em animais submersos em álcool e, ainda menos, fora do álcool, mas ainda molhados. Obter-se-iam, assim, cores fictícias bem diferentes das reais. Já Toledo Piza, ao descrever a *P. mus* diz: "A aranha no álcool é inteiramente negra; seca é de cor murina escura". (Para a boa observação é necessário analisar as aranhas, preferivelmente, quando vivas, ou pelo menos, em estado bem seco. Uma longa permanência em álcool prejudica sempre o colorido, fazendo desaparecer o verde oliva, o vermelho vivo (da fimbria dos palpos e dos pêlos do abdomen), o marrom escuro oliváceo (do cefalotorax e das pernas), o rosa (da orla do cefalotorax e dos anéis apicais das articulações das pernas) e o amarelo vivo (dos pêlos de algumas espécies), prevalecendo em animais deste gênero, longamente conservados em álcool uma cor difusa, uniforme, amarelo cinza).

Feita a separação em lotes, procedemos à procura de caracteres morfológicos constantes, verdadeiramente específicos, pois é claro que uma separação, sómente feita pelo colorido geral, ofereceria dados sistemáticos muito frágeis e impossibilitaria a determinação de indivíduos, conservados no álcool por longo tempo.

Nesta procura de caracteres invariáveis que, ao lado do colorido, pudessem, com segurança, ser aproveitados na especificação destes lotes, tivemos em mira:

a) encontrar caracteres que não apresentassem diferenças entre uma aranha viva ou recente e uma, conservada por longo tempo em álcool:

b) encontrar caracteres, válidos não sómente para as fêmeas de *Pamphobeteus*, mas também para os machos, até hoje desconhecidos para 16 espécies do género.

Depois de muitos meses de trabalhos de medições, comparações, contagens de espinhos, aferições dos cômoros oculares, dos olhos, dos comprimentos totais e dos esternos descobrimos, de um lado, que todos estes caracteres (já anteriormente estudados detalhadamente) não tinham valor específico e, do outro lado os comprimentos do cefalotorax em relação ao comprimentos das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas constituem caracteres específicos realmente constantes, invariáveis mesmo em grandes séries e, portanto, de suma importância para a sistematização das espécies de *Pamphobeteus*.

Tanto o cefalotorax como as patelas e tíbias são revestidas de camadas quitinosas muito espessas, de maneira que uma retração em meio alcoólico é muito pouco sensível. Ainda mais, como não se trata mais de expressar estes comprimentos em números, mas sim, apenas a sua relação recíproca, está claro que mesmo após longa permanência das aranhas em meios conservadores, esta relação deveria ser sempre a mesma.

Finalmente, deveria esta relação de medidas ser constante não sómente para fêmeas, mas também para machos e, ainda, filhotes.

Encontramos, pois, na relação das medidas acima referidas caracteres específicos que permitem classificar com absoluta segurança fêmeas, machos e filhotes.

Para confirmar, de fato, a segurança destes novos caracteres, tomamos, então, o grande número de machos e os separamos inicialmente segundo o colorido (aliás muito mais uniforme do que nas fêmeas). Depois procedemos, como tínhamos feito nas fêmeas, às medições dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas, encontrando absoluta concordância nas relações destas medidas com as das fêmeas.



Finalmente, para corroborar ainda mais a firmeza destes resultados, tiramos dos viveiros os respectivos machos e as fêmeas e os juntamos, temporariamente, no mesmo viveiro, e, de fato, eles procediam ao "jogo do amor", seguido por uma ou mais cópulas. É verdade, só pelo fato de copularem, não se pode concluir que se trate de uma mesma espécie; mas, havendo concordância absoluta no colorido e nas relações das medidas biométricas e, ainda, no habitat (pois tanto uns como as outras provinham das mesmas localidades) a realização do ato sexual deve ser considerado um argumento convincente de se tratar de indivíduos da mesma espécie.

Na aferição da relação das medidas do cefalotorax e das patelas e tíbias I e IV é sempre bom medir não somente os comprimentos das pernas de um lado, mas também do outro; pois, muitas vezes, estas medidas divergem, ainda que apenas por pouco. Igualmente é bom repetir estas medidas e proceder com muita cautela, porque só se pode admitir um erro de alguns deci-milímetros, mas nunca acima de meio milímetro.

O comprimento do cefalotorax é medido na linha longitudinal mediana, isto é, a partir da frente do cômodo ocular (*tumulus oculiferus*) até a reentrância, onde nasce o abdomen.

O comprimento das patelas e tíbias I e IV é tomado em conjunto, tomando-se as medições, quando as articulações estiverem completamente esticadas (para evitar o erro no cômputo da curvatura da patela).

Pois bem, seguindo nas separações dos lotes de *Pamphobeteus* o critério do colorido, obtivemos 5 lotes, como já dissemos, lotes esses incluindo tanto os machos como as fêmeas, e que podem ser divididos assim:

- | | | | |
|----|---|---|---|
| 1. | { | Toda a aranha de colorido uniforme (ou cinza murina ou ferruginoso) | 2 |
| | { | Lado dorsal de colorido diferente do lado ventral | 3 |
| | { | Cor geral cinza murina, inclusive a das pernas — <i>P. tetraanthus</i> | |
| 2. | { | Cor geral, inclusive a das pernas, ferruginoso, ora mais para o vermelho ora mais para o ferruginoso escuro (principalmente no abdomen) — <i>P. cesteri</i> | |
| | { | Lado dorsal (cefalotorax, abdomen e pernas) da cor do monho mais claro ou mais escuro (às vezes quase preto, principalmente no cefalotorax); lado ventral (esterno, coxas das pernas e ventre) castanho cinza — <i>P. sorocabae</i> | |
| 3. | { | Lado dorsal cor de monho; lado ventral ou inteiramente concolor, escuro, quase preto ou o cefalotorax e as coxas cinza e o ventre preto | 4 |
| | { | Lado ventral (esterno, coxa e ventre) concolor, escuro, quase preto — <i>P. rosaeus</i> | |
| 4. | { | Esterno e coxa cor castanho cinza; ventre preto — <i>P. rondonienseis</i> . | |

Na presente chave sinóptica só se tomam em consideração as cores principais, i. é. as que dão na vista do espetador como sendo de franca predominância e como se pode ver bem nos desenhos coloridos, que acompanham este trabalho.

É sempre de bom aviso, principalmente neste género, em que predomina uma monotonia de colorido muito grande, não se perder em detalhes na descrição de pêlos ornamentais, principalmente nas linhas e estrias das pernas; pois, do contrário se incidiria no mesmo erro antigo da criação de muitas espécies novas, por causa de variações individuais dos coloridos.

Julgamos útil, pelo mesmo motivo, descrever aqui os coloridos das 5 espécies acima com um pouco mais de detalhe:

a) *Detalhes de coloridos e desenhos comuns às 5 espécies, machos e fêmeas:*

Fimbria dos palpos maxilares e dos lábios castanho avermelhado, ora mais para o amarelo ora mais para o vermelho;

Desenhos das pernas — fêmures com duas estrias dorsais claras, paralelas, a percorrer toda a extensão da articulação, bem visíveis em *roseus* e *sorocabae* (fêmeas) e *rondoniensis*, mal visíveis em todos os machos das 5 espécies e nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri* (razão esta porque foram feitas espécies novas, caracterizadas pela ausência destas estrias).

Patelas com duas estrias dorsais, que formam a continuação das dos fêmures e que convergem no lado apical da patela; direitas nas duas pernas anteriores; bastante recurvas nas duas pernas posteriores. São muito bem visíveis nas espécies *rosus*, *sorocabae*, *rondoniensis* e bastante mal visíveis em todos os machos e nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri*. (Em exemplares velhos estas estrias são quase completamente destituídas de pêlos e se apresentam “nuas” pelo desgaste sofrido pelo hábito de que a aranha, em estado encolhido, repousam sobre as patelas — outro fato já descrito por especialista como sendo um caracter de uma espécie nova).

Tíbias com duas estrias dorsais claras que começam um pouco distante do lado basal da articulação e se estendem até o ápice, convergindo ligeiramente no lado apical. São bem visíveis nos machos e fêmeas de *roseus*, *sorocabae* e *rondoniensis*; mais ou menos visíveis nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri* e bastante mal visíveis em seus machos.

No lado interno das estrias, contiguo a elas, existem duas faixas escuras, quase pretas que, formando um semi-anel látero-dorsal no lado basal da articulação, acompanham a direção das duas estrias claras e terminam no terço apical. Estas faixas escuras são melhor visíveis nas aranhas claras, portanto, em *cesteri*, *rondoniensis*, machos e fêmeas; depois em *sorocabae* e *roseus*, principalmente nas



duas pernas anteriores. São mal visíveis em *tetracanthus*, machos e fêmeas e nos machos de *sorocabae* e *roseus*. Em todas as cinco espécies são sempre mais nítidas nas pernas anteriores e muito menos nas posteriores.

Metatarsos no lado dorsal, na zona basal, com uma estria clara ímpar, curta, não atingindo nem a metade desta articulação. Muito bem visível em *roseus* (fêmeas) e em *rondoniensis* (fêmea), embora também nestas duas espécies esta estria esteja mal visível principalmente na última perna. Em todos os machos e nas fêmeas de *sorocabae*, *tetracanthus* e *cesteri* não existe a estria clara. O metatarso das 5 espécies de *Pamphobeteus*, tanto machos como fêmeas é percorrido por uma faixa escura dorsal, sinuosa, em forma de "S" e que principia no lado basal externo com uma mancha mais grossa e percorre em sinuosidade toda a articulação. Em *cesteri* esta faixa é marrom escuro. Tarços com uma faixa dorsal larga, da mesma cor da faixa sinuosa dos metatarsos, com forma oval, tendo no meio uma estria mais clara. Esta faixa com a estria interna é bem visível em todos os machos e fêmeas das cinco espécies.

Nas articulações dos fêmures, patelas, tíbias e metatarsos, no lado apical, há nas cinco espécies, machos e fêmeas, anéis apicais de pêlos bem mais claros do que o ambiente; cor de rosa até cor de tijolo em *sorocabae*, *roseus* e *rondoniensis*; cinza claro em *cesteri* e *tetracanthus*. Em todas as aranhas do presente gênero estes anéis são sempre mais delicados e menos desenvolvidos nos fêmures, acentuando-se progressivamente em direção às articulações terminais.

b) *Descrição do colorido específico:*

1) *Pamphobeteus sorocabae* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e fêmures no lado dorsal marrom escuro até quase preto. Pêlos da orla do cefalotorax, das pernas e do abdomen cor de rosa. Esterno, coxas, trocanteres e fêmures e ventre de cor ferruginosa. Lábio e maxilares castanhos com orla de longos pêlos cor de tijolo. Pêlos do esterno, das pernas e do ventre rosa ferrugem, portanto, um nada mais escuros do que os pêlos do lado dorsal. Patelas, tíbias, metatarsos e tarços, no lado ventral, da mesma cor como no lado dorsal, i.é. marrom escuro, com reflexos esverdeados em alguns exemplares, principalmente nas duas pernas anteriores.

Em alguns exemplares velhos o marrom escuro do cefalotorax apresenta tonalidades escuras para o verde cinza. O mesmo colorido geral apresentam *P. melanocephalus* Mello-Leitão, 1923 e *P. communis* Piza, 1939.

2) *Pamphobeteus roseus* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e pernas no lado dorsal marrom escuro até quase preto, portanto igual ao de so-

rocabae, com nuances distintivas tão pouco pronunciadas que, observando-se exemplares das duas espécies apenas do lado dorsal, não se consegue distingui-las com segurança. O cefalotorax pode apresentar a zona frontal bem mais escura do que o resto da placa (vide descrição de Piza — *P. cephalopheus*). Pêlos róseos nos anéis apicais das articulações das pernas e em volta da orla do cefalotorax. Os pêlos das pernas e do abdomen mais cor de tijolo. Esterno, coxas, trocanteres, fêmures e ventre uniformemente escuro, quase preto, com pêlos escuros também, ainda que mais claros que a cor de fundo. Patelas e tíbias (no lado ventral) com abundantes pêlos longos cor castanha clara. Escópulas dos tarsos e metatarsos esverdeadas. Lábio e maxilas castanho escuros com pêlos vermelho vinho. Pelo colorido a *P. cephalopheus* Piza, 1944 é idêntica com *roseus*. O colorido do macho de *roseus*, até agora desconhecido para a ciência, mas muito frequente na nossa coleção, também não precisa ser descrito em detalhes, porque é idêntico ao da fêmea, com exceção das estrias e faixas das pernas serem menos visíveis do que naquela, como já temos acentuado anteriormente (vide desenho colorido).

3) *Pamphobcteus rondoniensis* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e pernas no lado dorsal marron escuro. O abdomen mais escuro que o cefalotorax. Pêlos da orla do cefalotorax, das pernas e do abdomen flavos, com tonalidades para o vermelho, principalmente no abdomen (vide desenho colorido). Faixas e listras das pernas como já foi descrito acima. Esterno, coxas, trocanteres e fêmures castanhos escuro até cinza ferruginoso, muitas vezes bem parecido com as cores de *sorocabac*. Ventre marron escuro, quase preto. Lábio e maxilares como em *roseus*. Pêlos vermelho flavos. Pêlos do esterno e das pernas (ventralmente) acompanhando a cor de fundo, i.é., castanhos ou cinza ferruginosos. Os do ventre quase vermelhos, sendo de notar que na zona mediana ventral há uma área distribuída de pêlos longos. Tibias, metatarsos e tarsos com densos pêlos cinza, com reflexos verdes. Escópulas esverdeadas, escuras (vide desenho colorido).

4) *Pamphobcteus tetracanthus* — Mello-Leitão, 1923 — A aranha inteira, dorsal e ventralmente, cinza murina, escura (vide desenho colorido), inclusive os pêlos de todo o corpo e das pernas. Apenas o ventre é ainda pouco mais escuro. Lábio e maxilas castanho escuro, com orla de pêlos vermelho tijolo. Estrias e faixas como já descritas.

Com *tetracanthus* é sinônima pelo critério do colorido (e por outras medidas que veremos depois) o *P. mus* Piza, 1944. O macho, apresentado no presente

trabalho como novo para a ciência, obedece no colorido geral e dos pêlos às mesmas tonalidades da fêmea, de maneira que dispensa descrição mais detalhada.

5) *Pamphobeteus cesteri* — Mello-Leitão, 1923 (vide desenho colorido) — Toda a aranha dorsal e ventralmente, inclusive as pernas de cor castanha ou ocrácea ou ainda pardo ferrugínea. Pêlos das pernas, do cefalotorax e do abdomen castanho avermelhados ou castanho ferruginosos. Faixas e listras das pernas como já descritas, inclusive os anéis apicais das pernas. Lábio e maxilas castanhos com fimbria de pêlos vermelhos.

O abdomen, apresenta quando a aranha perdeu os pêlos longos avermelhados (pelo hábito de fazer afugentar um inimigo) uma penugem escura, marron escuro. Tem o mesmo colorido como *cesteri* e são sinônimos a ela (por outros caracteres também, — *P. cucullatus* M. L., 1923; *P. holophoeus* M. L., 1923; *P. exsul* M. L., 1923; *P. urbanicolus* Soares, 1941; *P. ypirangensis* Soares, 1941; *P. piracicabensis* Piza, 1933.

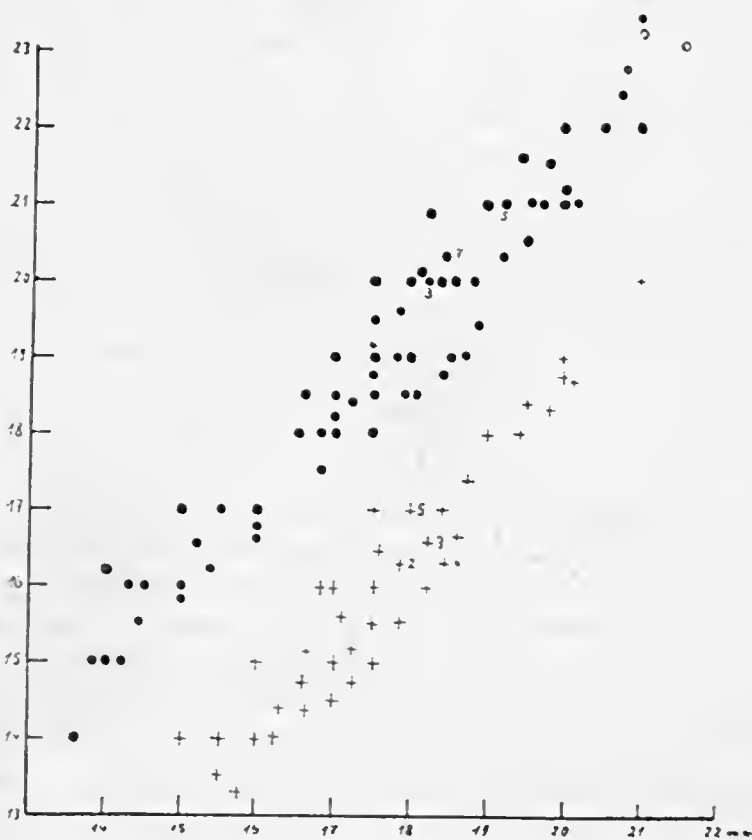
O macho de *cesteri*, muito frequente na coleção do Instituto Butantan, foi descrito em primeira mão por Piza, sob o nome de *P. piracicabensis*. Não necessita ser descrito mais uma vez aqui, porque seu colorido é igual ao da fêmea, com a diferença de que no aspecto geral prevalecem os tons cinza ferruginosos, também nos pêlos. (Temos a dúvida de que *cesteri* seja idêntica com *P. isabellinus* (Ausserer), 1871, cujo colorido foi descrito por aquele autor como sendo pardo amarelado ou ocráceo e ocráceo ferruginoso no esterno e no ventre, portanto, bastante igual ao de *cesteri*. Como não dispomos do tipo, nem sabemos onde encontrar uma descrição do mesmo, deixamos esta questão aberta, por enquanto).

Como se vê, acentuamos apenas o colorido principal, que cai na vista e permite distinguir desde logo qualquer uma das 5 espécies citadas.

Existem além do colorido para a especificação segura das espécies *Pamphobeteus*, as relações das medidas dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas. Trataremos disto agora. Primeiro, porém, devemos chamar a atenção sobre o dimorfismo sexual entre os machos e as fêmeas, dimorfismo este tão pronunciado e tão característico que não se pode fazer valer, por exemplo, a relação de comprimento entre o cefalotorax e a patela e tibia do primeiro par de pernas, para demonstração que um determinado indivíduo masculino pertença à mesma espécie como um indivíduo fêmea, ainda que ambos tenham o mesmo colorido.

Na tabela I é demonstrado este dimorfismo sexual, pertencendo tanto os machos como as fêmeas, aí enumerados, às 5 espécies, a saber: *P. rosceus*, *sorocabac*, *tetracanthus*, *cesteri* e *rondonienseis*.

TABELA I
● fêmeas + machos
Dimorfismo sexual no gênero *Pamphobeteus* POCKOCK, 1901
Relação entre os comprimentos do cefalotorax e a 1.ª patela e tibia



A tabela demonstra claramente os seguintes dois fatos:

a) Nos machos de qualquer espécie de *Pamphobeteus* as patelas e tíbias do primeiro par de pernas sempre são mais longas do que o comprimento do cefalotorax.

b) Nas fêmeas de qualquer das espécies aqui tratadas o cefalotorax sempre é maior do que as patelas e tíbias do primeiro par de pernas.

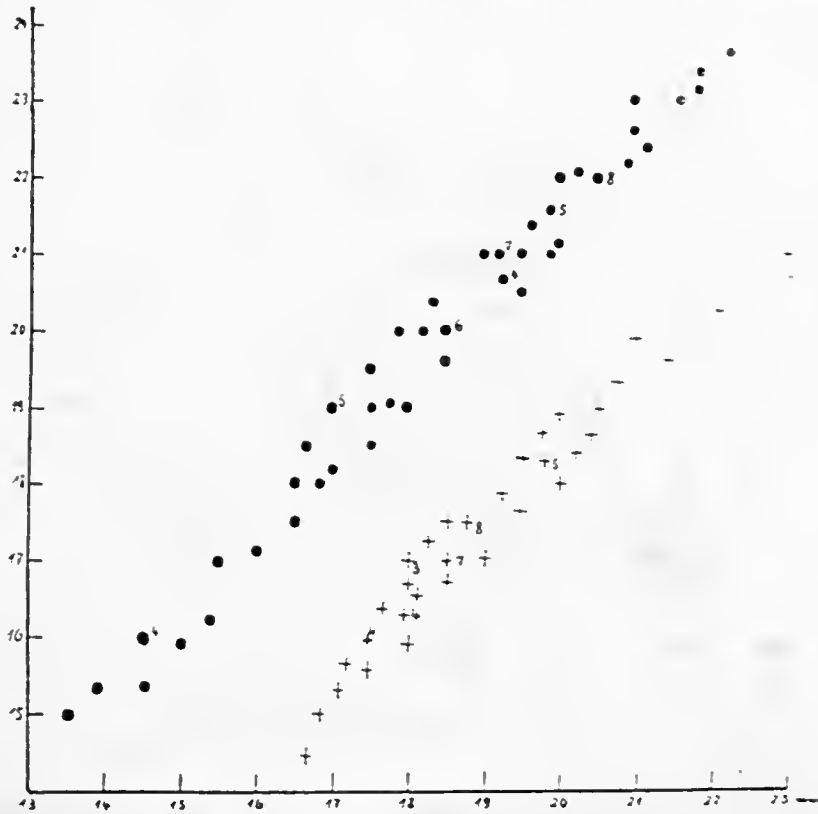
Este dimorfismo sexual é apresentado mais detalhadamente pelas tabelas II, III, IV e V, referindo-se sucessivamente aos machos e às fêmeas de *P. sorocabae* (II), *roseus* (III) *tetracanthus* (IV e *cesteri* (V).

Infelizmente, não nos foi possível obter, até hoje, mais de um macho de *P. rondonienseis*, mas também nesta espécie existe o mesmo dimorfismo sexual. Nesta espécie, aliás temos muito poucas fêmeas, vindas do Mato Grosso.

TABELA II

Pamphobeteus sorocabae ● fêmeas + machos

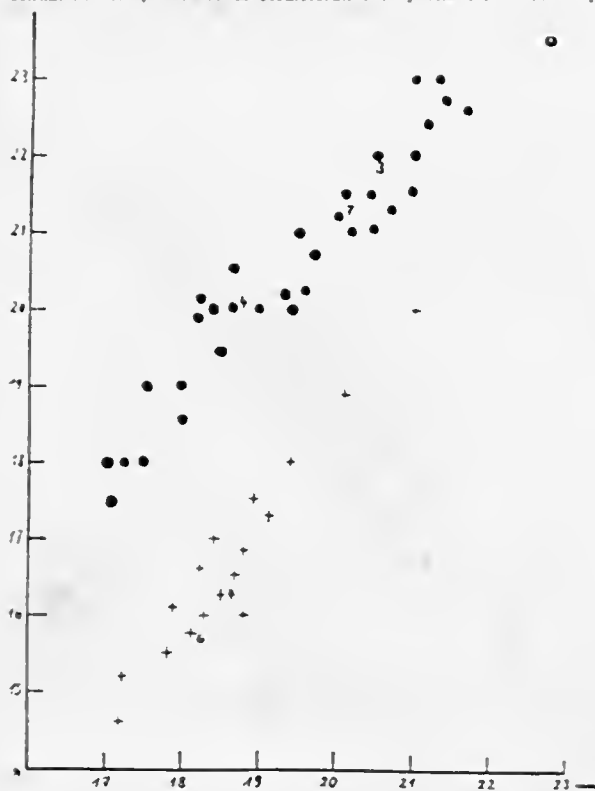
Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia do 1.º par de pernas



Comparando as tabelas, compreende-se como os especialistas, em face da grande divergência nas medidas do cefalotorax e das patelas e tibias I, não souberam colocar os machos na devida espécie, mas estabeleceram-nos como espécies novas, com fêmeas desconhecidas (*P. ypirangensis* Soares e *P. communis* Piza).

Si, ao contrário, o especialista toma o colorido geral da aranha (aranha viva ou cloroformizada) como ponto de saída, seguindo as normas acima apontadas, então ele já consegue reunir os machos e as fêmeas e especifica-los. Adotando, em seguida, como caracter específico constante a relação do comprimento entre as patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas, então ele vê confirmado o caracter do colorido, pelo menos nas fêmeas (também nos machos, só que nestes últimos as cores são menos nítidas).

TABELA III
Pamphobeteus roseus ● fêmeas + machos
Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia do 1.º par de pernas



A relação do comprimento das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas forma uma perfeita curva, incluindo tanto os machos como as fêmeas, curva esta diferente para cada espécie, como se pode inferir da comparação das medidas da tabela VI.

Nesta tabela as espécies *P. roseus*, *sorocabae* e *rondonienseis* aparecem:

- nitidamente distintas umas das outras,
- os machos uniformes às fêmeas da mesma espécie.

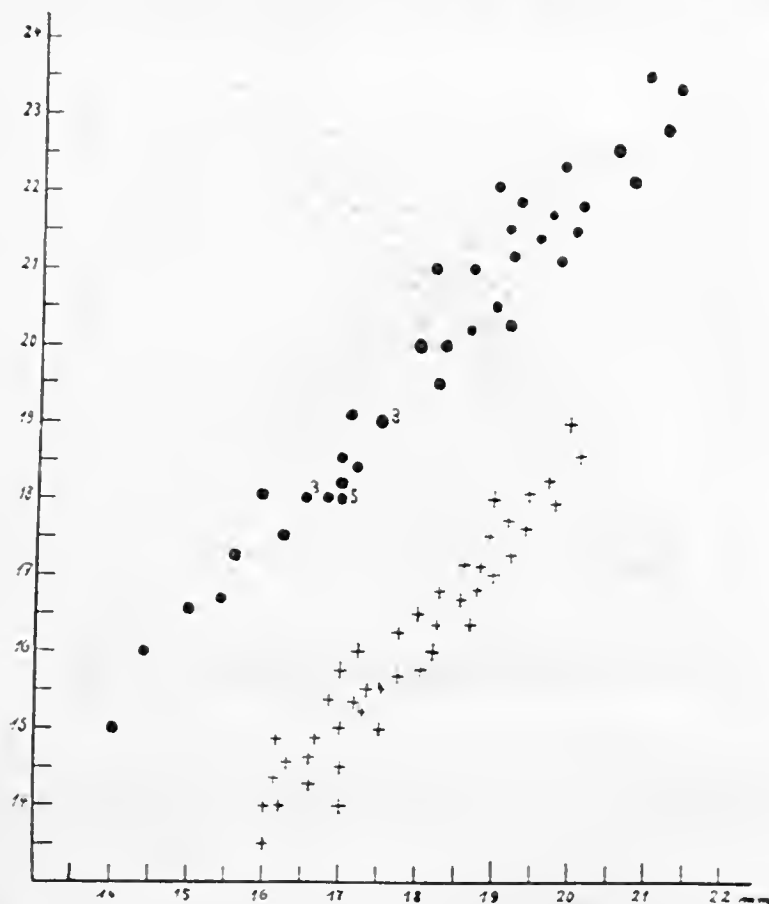
As espécies *P. tetracanthus* e *cesteri* caíriam, segundo este critério, dentro da curva de *sorocabae*. Uma confusão, porém, não é possível devido à diversidade absoluta do colorido das três espécies.

Ademais *P. cesteri* é muito menor, de maneira que um exemplar bem adulto no máximo vem a atingir o tamanho de um exemplar médio de *sorocabae*, como se pode ver bem comparando as espécies na tabela VII.



TABELA IV

Pamphobeteus tetracanthus ● fêmeas + machos
Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias do 1.º par de pernas.



Além dos dois caracteres, o do colorido e do tamanho, há ainda um terceiro caracter específico para *cesteri* e que consiste na pouca diferença de relação entre o comprimento do cefalotorax e o da patela e tibia do primeiro e do quarto par de pernas (vide tabela VII). Em *cesteri*, comparando-se estas medidas numa grande série, tanto de machos como de fêmeas, nas últimas principalmente, observa-se comprimento igual entre o cefalotorax e as patelas e tibias das pernas (conf. medidas de *piracicabensis* Piza).

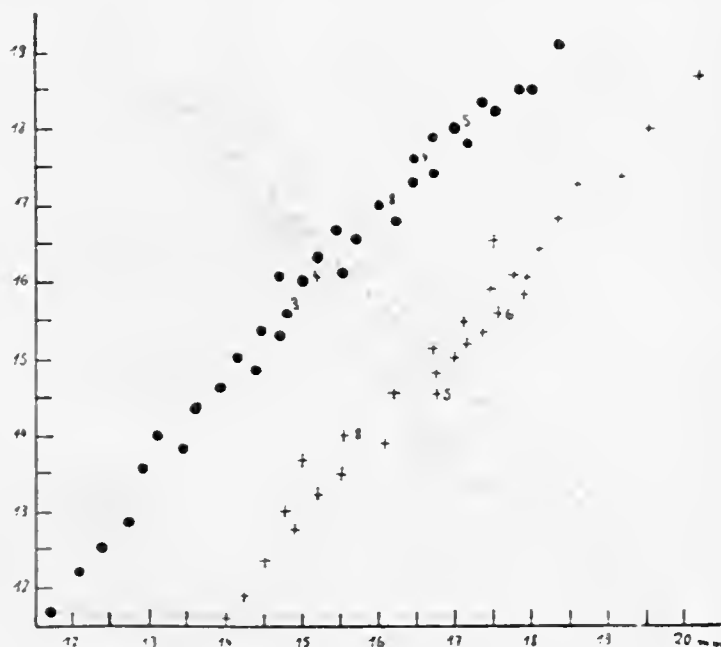
Para *tetracanthus*, entretanto, só conseguimos, seguindo o mesmo critério, apontar nitidamente o dimorfismo sexual (tabela IV) expresso na relação e a.

TABELA V

Pamphobeteus cesteri ● fêmeas + machos

Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tíbias do 1.º par de pernas

20



concordância específica dos machos e das fêmeas no tocante à relação das medidas dos comprimentos das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas (vide tabela VII). Mas isto é o suficiente, uma vez que o colorido desta espécie (cinza murino) a destaca nitidamente e sem dúvida de confusão, tanto de *sorocabae* com de *cesteri*, enquanto que de *rosceus* e de *rondonienseis* ela se distingue relações bem diversas dos comprimentos entre o cefalotorax e as patelas e tíbias das pernas.

Tomando por base, além do colorido, as relações de medidas, expressas graficamente nas tabelas anteriores e procedendo à revisão dos tipos, das novas espécies, chegamos novamente à conclusão de que *P. melanocephalus* Mello-Leitão, 1923 e *P. communis* Piza, 1939 são sinônimas de *P. sorocabae* Mello-Leitão, 1923.

P. cephalophus Piza, 1944 é sinônima de *P. rosceus* Mello-Leitão, 1923.

P. n. us Piza, 1944 é sinônima de *P. tetracanthus* Mello-Leitão, 1923.

P. cucullatus Mello-Leitão, 1923,

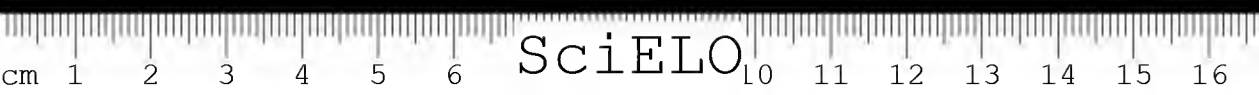
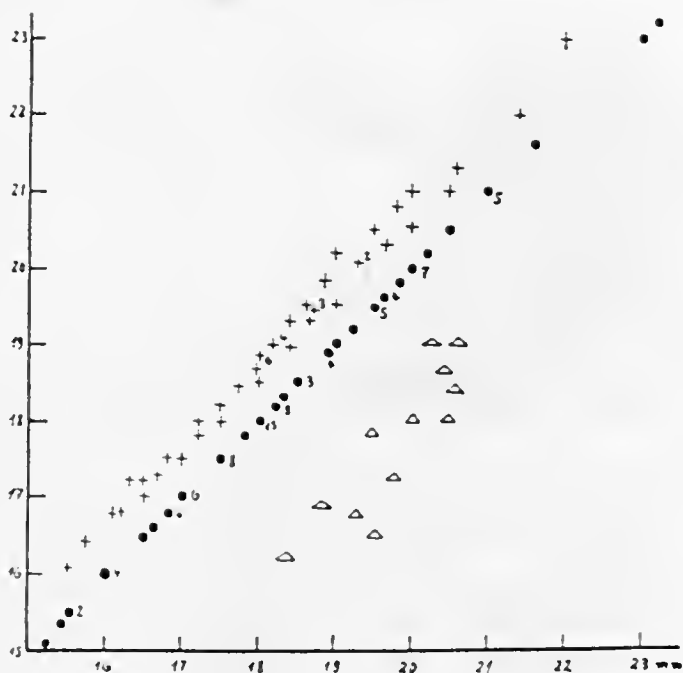


TABELA VI

+ *Pamphobeteus roseus* ● *P. sorocabae* △ *P. rondonienseis*
 Relação das medidas de comprimento entre as patelas e tibiás do 1.º e do 4.º par de pernas



P. exsul Mello-Leitão, 1923,

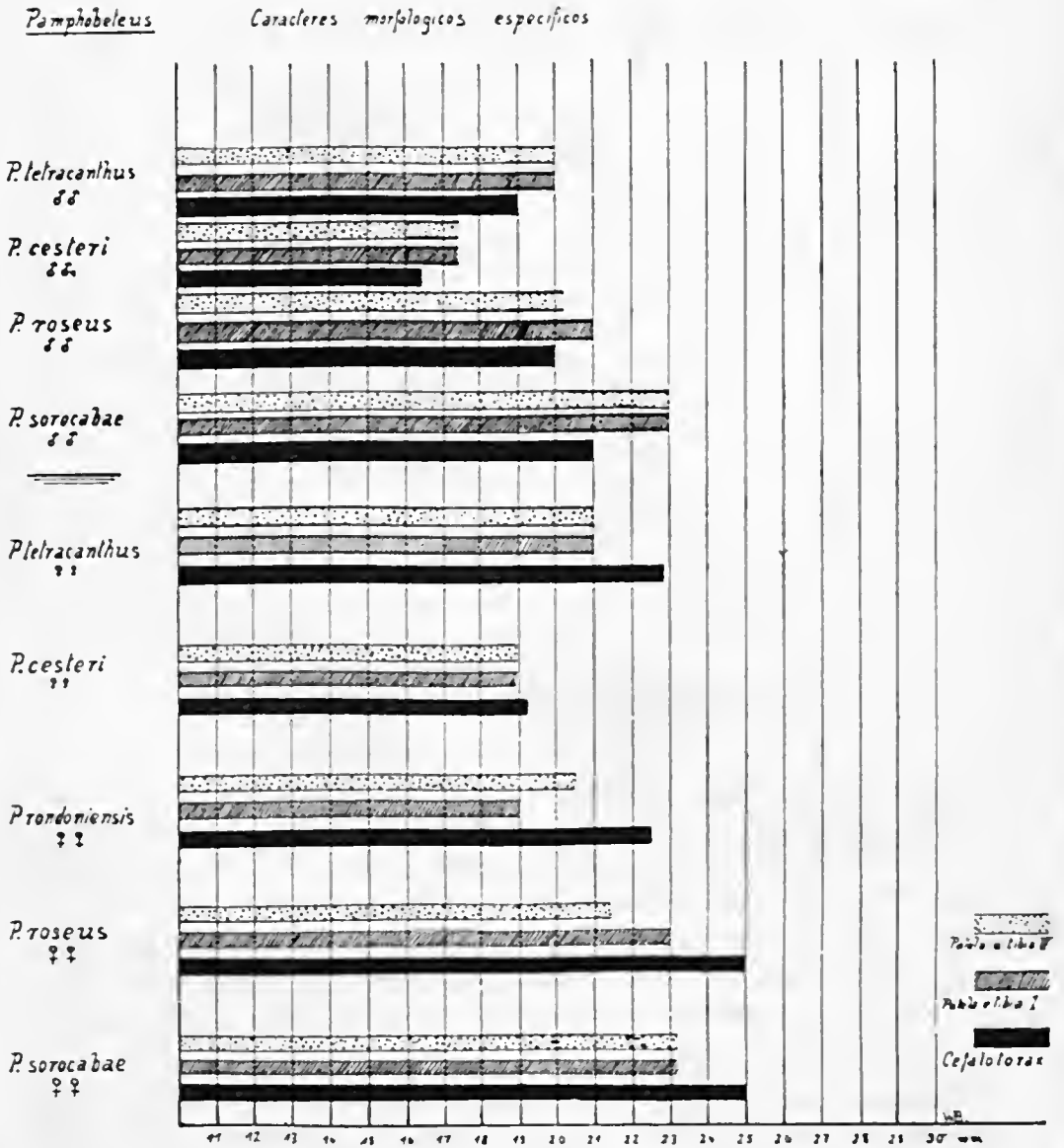
P. holophaeus Mello-Leitão, 1923,

P. piracicabensis Piza, 1933,

P. urbanaeolus Soares, 1941 e *P. ypirangensis* Soares, 1941 são sinônimas de *P. eesteri* Mello-Leitão, 1923 (deixando, por ora aberta a questão, si *P. eesteri* não é por seu turno sinônima de *P. isabellinus* (Ausserer), 1871 o que nos parece muito provável).

Assim das espécies brasileiras do gênero *Pamphobeteus* restam apenas, além das cinco espécies boas, a *P. platyouma*, *P. insularis* e *P. anomalus* Mello-Leitão, 1923; *P. benedenii* Bertkau, 1880 e *P. maseulus* Piza, 1939. *P. benedenii* Bertkau não nos parece ser *Pamphobeteus*, pois apresenta medidas absolutamente anormais para as espécies deste gênero, coincidindo, porém, estas medidas com o gênero *Lasiadora*. De fato, Bertkau chamou sua espécie de *Lasiadora benedenii*. A questão só poderia ser resolvida satisfatoriamente, si se pudesse obter o tipo.

TABELA VII



Pamphobeteus platyomma Mello-Leitão, 1923, foi mal caracterizada pelo autor, pois em sua chave sinóptica das espécies deste gênero o autor insiste principalmente no fato da diversidade do comprimento e da largura do cômodo ocular. "Rima ocular muito baixa, duas vezes mais larga do que longa-*platyomma*."



Reverendo o tipo existente na coleção no Departamento de Zoologia em São Paulo, sob o N.º 155, encontramos apenas as seguintes medidas do cômodo ocular: 1,9 mm de comprimento por 2,4 mm de largura no exemplar maior e 1,5 mm de comprimento por 1,9 mm de largura no menor, portanto, a rima ocular também nesta espécie é apenas um pouco mais larga que longa, como nas outras espécies do gênero. Já por este motivo, dada a grande ênfase, atribuída pelo autor a este caracter, a espécie não pode ser considerada boa. Quanto à relação das medidas do comprimento do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas, anunciadas por Mello-Leitão como sendo 18 para o cefalotorax, 16,5 para a patela e tibia I e 18 para a patela e tibia IV, verificamos, de fato, concordância nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia IV, sendo a patela e tibia I um pouco menor.

Pamphobeteus insularis Mello-Leitão, 1923 pela remedição dos comprimentos do cefalotorax, das patelas e tíbias I e IV, apresenta praticamente a mesma relação de medidas como *platyomma*.

É interessante, neste conjunto, constatar que Piza, em 1939, descreveu primeiro um macho, denominando-o *P. masculus*, que vem a concordar, nas citadas medidas, com as duas espécies acima, isto é, que apresenta também as patelas e tíbias do primeiro par de pernas menores do que as do quarto par de pernas. O comprimento menor do cefalotorax de *masculus* é a expressão do dimorfismo sexual, como já vimos.

Quanto ao colorido geral das três espécies há igualmente uma grande concordância. *Platyomma*, *insularis*, *masculus* apresentam cefalotorax negro, com orla de longos pêlos róseo-cinza ou fulvo escuros. Abdomen castanho negro, com pêlos flavos avermelhados. Esterno e ancas das pernas pardo-escuro, quase cor de monho, inclusive o ventre, ornados de pêlos flavos.

Finalmente, existe uma relativa concordância no habitat, pois *platyomma* provém da Ilha de São Sebastião, *masculus* da Ilha dos Alcatrazes e *insularis* da Ilha da Queimada Grande.

As três espécies seriam, portanto, também reunidas numa só, que deve ser denominada de *P. platyomma* Mello-Leitão. A nossa suspeita da grande afinidade destas três espécies, baseada nas medidas e no colorido geral, é confirmada pelo fato de ter sido encontrado um exemplar, intelizmente muitíssimo mutilado, ainda que reconhecível, na Ilha da Queima Grande, numa excursão organizada pelo Instituto Butantan em fevereiro de 1947. Finalmente, recebemos três exemplares, machos, iguais ao descrito por Piza, com habitat na Praia Grande e em Santos (Estado de São Paulo). Assim, torna-se bem

provável a hipótese de que as três espécies representam uma só, com habitat no litoral do Estado de São Paulo e do Rio, inclusive as Ilhas praianas.

Os caracteres morfológicos constantes destas três espécies, reunidas sob o nome de *P. platyomma*, seriam: patela e tibia do primeiro par de pernas menores do que os do quarto par de pernas (nos machos e nas fêmeas). Cefalotorax igual às patelas e tibias do quarto par de pernas, nas fêmeas e maior do que as patelas e tibias do primeiro par de pernas; nos machos o cefalotorax menor do que as patelas e tibias do primeiro par de pernas.

Entretanto, para ver plenamente confirmada a nossa suspeita, aliás bem fundada, será necessário obter ainda maior número de exemplares, o que esperamos conseguir em futuro próximo.

Quanto a *Pamphobeteus anomalus* Mello-Leitão, 1923, cremos tratar-se realmente de uma boa espécie, tanto pelo colorido negro uniforme em todo o corpo como pelas medidas do cefalotorax e das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas, cuja relação é a seguinte: 22,2:24,5:26, mm. Mas como não conseguimos encontrar o tipo, existente, segundo Mello-Leitão, no Departamento de Zoologia em São Paulo, nada de positivo, por ora, se poderá resolver, ainda mais por não existirem outros exemplares.

Chave sinóptica das espécies mais comuns do gênero *Pamphobeteus*:

A. Chave das fêmeas

- | | | | |
|----|---|--|---|
| | { | Cefalotorax bem maior (pelo menos 1 mm) do que as patelas e tibias do 1.º e 4.º par de pernas | 2 |
| 1. | { | Cefalotorax igual ou apenas pouco maior (menos 1 mm) do que as patelas e tibias do 1.º e do 4.º par de pernas. Colorido geral uniforme, ocráceo ferruginoso, com abdomen muitas vezes mais escuro — <i>P. cesteri</i> . | |
| 2. | { | Patela e tibia I maior do que a patela e tibia 4 | 4 |
| | { | Patela e tibia I do mesmo comprimento do que a patela e tibia 4 | 3 |
| 3. | { | Colorido do corpo inteiro (lado dorsal e ventral) uniforme, cinza murino ou cinza ferruginoso, no abdomen com tons brilhantes — <i>P. tetraanthus</i> Mello-Leitão. | |
| | { | Colorido superior (cefalotorax, pernas, abdomen) cor de monho escuro, às vezes quase preto; esterno, coxa e ventre cinza ferrugem; o ventre às vezes mais ferruginoso — <i>P. sorocabae</i> Mello-Leitão. | |
| 4. | { | Patela e tibia I menor do que a patela e tibia IV; colorido no lado dorsal igual ao de <i>P. sorocabae</i> ; esterno, ancas e ventre enegrecidos — <i>P. rosens</i> Mello-Leitão. | |
| | { | Patela e tibia I menor do que a patela e tibia 4, colorido no lado dorsal igual ao de <i>P. sorocabae</i> ; esterno e coxas ferruginosos ou cinzentos; ventre castanho escuro até enegrecido — <i>P. rondoniense</i> Mello-Leitão. | |

B. Chave dos machos

- | | | | |
|----|---|---|--|
| 1. | { | Patela e tibia I maior ou menor do que patela e tibia IV 2 | |
| | { | Patela e tibia I igual à IV 3 | |
| 2. | { | Patela e tibia I maior do que IV. Colorido igual ao de <i>P. roseus</i> fêmea. | |
| | { | Esterno, coxas e ventre menos enegrecidos, às vezes, do que nas fêmeas — <i>P. roseus</i> . | |
| | { | Patela e tibia I menor que a IV. Colorido igual ao da fêmea — <i>P. rondoniensis</i> . | |
| 3. | { | Colorido uniforme cinza murino ou marrom ocráceo 4 | |
| | { | Colorido dorsal diferente do ventral 5 | |
| 4. | { | Toda a aranha cinza murina uniforme — <i>P. tetracanthus</i> . | |
| | { | Toda a aranha marrom ocrácea, com o abdomen, às vezes, mais escuro — <i>P. cesteri</i> . | |
| 5. | { | Cefalotorax, abdomen e pernas cor de monho, quase preto; esterno, coxa e ventre cinza — <i>P. sorocabae</i> . | |

Como se vê, repousa a chave sinóptica sobre a relação das medidas do comprimento do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas e sobre o colorido geral. Estes critérios têm demonstrado serem certos, porque foram estabelecidos à mão de centenas de exemplares.

Desta maneira, das 19 espécies, até agora conhecidas, só restam cinco espécies, realmente boas e facilmente distinguíveis, já à vista desarmada e sem auxílio da lupa. Apenas a espécie *P. rondoniensis*, ainda que esteja já muito bem definida, e com um habitat restrito a uma zona geográfica peculiar (Mato Grosso), necessitaria ainda de maior número de exemplares (temos apenas 1 macho e uma dezena de fêmeas, mais ou menos). Sobre o grupo *platyomma*, *insularis* e *masculus* ainda não estamos aptos a proferir algo de definitivo e ainda menos sobre *anomalus*.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O género *Pamphobeteus* encontra-se em todo o Estado de São Paulo e nos Estados vizinhos. A relativa raridade nos outros Estados, parece-nos ser apenas o resultado destas zonas serem menos exploradas, isto é, de não existirem lá fornecedores do Instituto Butantan, de maneira que é de supor que, com o correr dos anos encontrar-se-ão também nos outros Estados exemplares deste género.

No Estado de São Paulo, em ordem de frequência das capturas e pela distribuição geográfica dos locais das capturas, pode-se concluir que *P. sorocabae* existe em todo o Estado, sendo rara, entretanto, no litoral; *P. roseus* existe igualmente em todo o Estado, inclusive no litoral; *P. tetracanthus* já é mais rara do

que as duas anteriores, mas existe até na Capital de São Paulo; *P. cesteri* tem o mesmo habitat de *tetracanthus*, sendo, entretanto, ainda mais rara do que esta; *P. rondoniucensis* já foi encontrada: um exemplar em Piracicaba, um outro em Artemis e todos os outros em Taunay (Mato Grosso), sendo o macho de Terenos, do mesmo Estado.

RESUMO

O presente trabalho representa uma revisão crítica e sistemática das espécies brasileiras do género *Pamphobeteus* Pocock. Tendo por base um grande número de exemplares deste género, são apresentados como falhos e inaproveitáveis para a boa sistematização das espécies os seguintes caracteres, até agora aproveitados pelos especialistas: dimensões dos cômoros oculares; posição e tamanho dos olhos; comprimento total e das pernas; largura do cefalotorax e do esterno; posição e forma da fôvea torácica e das últimas sigilas; número e posição dos espinhos das pernas.

Igualmente, à mão do mesmo material, estudado comparativamente, foram reconhecidos como tendo grande valor sistemático específico, o colorido geral juntamente com a relação das medidas dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas. Segundo estes característicos foram reestudados os tipos descritos pelos autores, drs. Mello-Leitão, S. T. Piza e B. M. Soares, chegando-se à conclusão de que entre as 19 espécies até agora descritas para o Brasil, apenas 5 são realmente validas permanecendo uma VIa. e uma VIIa. por enquanto duvidosas.

São as seguintes as espécies validas com as respectivas sinônimias:

- | | | |
|--|------------|---|
| 1) <i>P. rosceus</i> Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | <i>P. cephalophceus</i> Piza, 1944. |
| 2) <i>P. sorocabae</i> Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | <i>P. melanoccephalus</i> Mello-Leitão, 1923 e
<i>P. communis</i> Piza, 1939. |
| 3) <i>P. cesteri</i> Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | <i>P. cucullatus</i> Mello-Leitão, 1923;
<i>P. holophaeus</i> Mello-Leitão, 1923;
<i>P. exsul</i> Mello-Leitão, 1923;
<i>P. urbanicolus</i> Soares, 1941.
<i>P. ypirangensis</i> Soares, 1941
<i>P. piracicabensis</i> Piza, 1933
<i>P. mus</i> Piza, 1944. |
| 4) <i>P. rondoniucensis</i> Mello-Leitão, 1923 | | |
| 5) <i>P. tetracanthus</i> Mello-Leitão, 1923 | Sinonima: | |

A espécie ainda mal definida, por falta de maior número de exemplares é a que reúne a *P. platyonma* e *insularis* Mello-Leitão, 1923 e *P. masculus* Piza, 1939 sob o nome de *P. platyonma* Mello-Leitão, 1923.

P. anomalus Mello-Leitão, 1923 carece ainda de ulterior confirmação à mão de novo material. *P. benedenii* Bertkau parece ser uma *Lasiadora*. *P. isabellinus* Ausserer, 1871, é reconhecida como sendo espécie válida, dada a sua prioridade absoluta dentro das espécies deste género. É quase certo que com ela é sinónima a *P. cesteri*. Mas a questão só poderá ser resolvida definitivamente, quando se tiver conhecimento do paradeiro do tipo.

ZUSAMMENFASSUNG

In obiger Arbeit wird eine kritische Revision der brasilianischen Arten des Genus *Pamphobetus* Pocock, an Hand von zahlreichen Exemplaren, dargelegt. Die bisher von den Spezialisten angewandten Merkmale, wie der Augenhügel; die Stellung und Grösse und Abstände der Augen; die totale Länge und die Länge der Beine; die Breite des Cephalothorax und des Sternums; die Lage und die Form der Thoraxgrube; die Zahl und Lage der Dornen an den Beinen werden vergleichend kritisch untersucht und es wird bewiesen, dass sie keine spezifischen Merkmale darstellen, wenigstens nicht im Genus *Pamphobetus*, weil sie zu grossen individuellen Variationen unterworfen sind.

Positiv wird dabei festgestellt, dass gerade die allgemeine Färbung ein sehr wichtiges spezifisches Merkmal darstellt, das, zusammen mit den Beziehungen der Längensmasse des Cephalonoxax und der Patellen und Tibien der ersten und letzten Beinpaare, zur spezifischen Unterscheidung der Arten unbedingt zuverlässig ist.

An Hand der neuen Merkmale werden die 19 Arten des Genus *Pamphobetus*, mit Hilfe von mehr als 600 Exemplaren, neu bestimmt und auf folgende 5 Arten reduziert:

- 1) *P. roseus* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. cephalophus* Piza, 1944.
- 2) *P. sorocabae* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. melanocephalus* Mello-Leitão und *communis* Piza;
- 3) *P. cesteri* Mello-Leitão — Syn.: *cucullatus, holophaeus, exsul* Mello-Leitão; *urbanicolus, ypirangensis* Soares; *piracicabensis* Piza.
- 4) *P. rondoniensis* Mello-Leitão, 1923
- 5) *P. tetracanthus* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. mus* Piza.

Zwischen *platyomma*, *insularis* und *masculus* wird eine weitgehende Übereinstimmung in Farbe, Massen und habitat gefunden und der gut begründete Verdacht ausgesprochen, dass es sich bei diesen drei Arten nur um eine Art handelt, die den Namen *P. platyomma* Mello-Leitão, 1923 führt.

Ebenso wird der Verdacht ausgesprochen, dass *P. cesteri* sehr wahrscheinlich synonym sein wird mit *P. isabellinus* Ausserer. *P. anomalus* Mello-Leitão, 1923 scheint zwar eine gute Art zu sein, konnte aber leider hier nicht naeher behandelt werden, einerseits weil der Typ nicht mehr aufgefunden wurde und andererseits, weil nur ein einziges Exemplar, ein Weibchen, beschrieben wurde. *P. benedenii* Bertkau konnte nicht revidiert werden, weil, wie bei *isabellinus*, weder der Typ noch eine originelle Beschreibung dieser Art zu haben war.

In gegenwaertiger Arbeit werden auch die Maennchen, soweit sie bisher unbekannt waren, neu beschrieben und der sexuelle Geschlechtsunterschied zwischen Maennchen und Weibchen wird hier zum ersten Male dargelegt. Ausserdem bringt dieser systematische Beitrag neue Schluessel zur sicheren Bestimmung der Arten des Genus *Pamphobeteus*, geltend fuer Maennchen und Weibchen, womit der synoptische Schluessel von Mello-Leitão ersetzt wird.

ABSTRACT

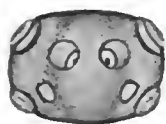
The 19 species of the genus *Pamphobeteus* Pocock are studied and reduced to only 5 good species.

Agradecimentos — Agradecemos à Srta. Margarethe Fuerst, os gráficos; à Sra. Thereza Sarli, os desenhos coloridos e ao Snr. J. Talarico, as fotografias.

BIBLIOGRAFIA

1. Ausserer, *Verh. zool. bot. Ges. Wien*, 21:194, 1781.
2. Bertkau, *Verz. d. Brasil. Arachn.*, :34, 1880.
3. Mello-Leitão, C., *Rev. Mus. Paulista*, 13:226, 1923.
4. Piza S. T. (Jr.), *Rev. Agric. Piracicaba*, 8(3,4):119, 1933.
5. Piza S. T. (Jr.), *Rev. Agric. Piracicaba*, 14:339, 1939.
6. Piza, S. T. (Jr.), *Rev. Agric. Piracicaba*, 19:263, 1944.
7. Soares, B. M., *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, 1:255, 1941.





P. sorocabae ♀





Pamphobetes rosens ♀







P. rondonensis ♀







P. tetraacanthus ♀

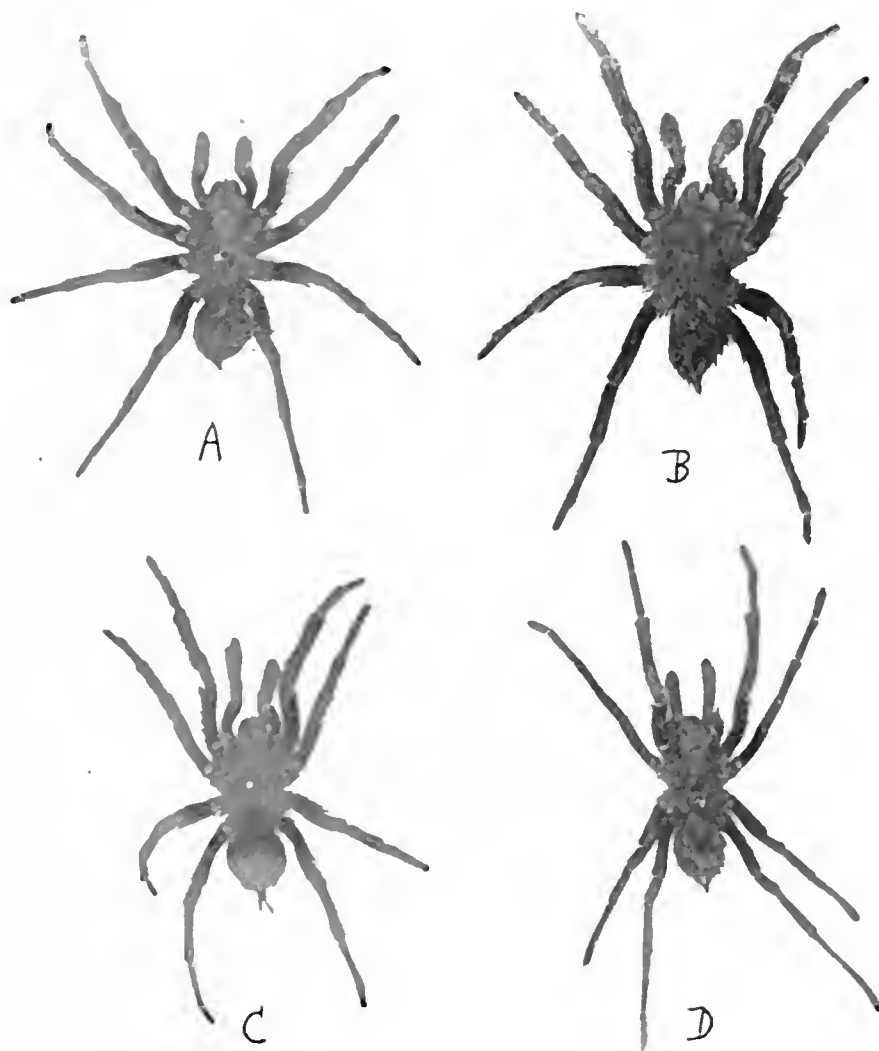




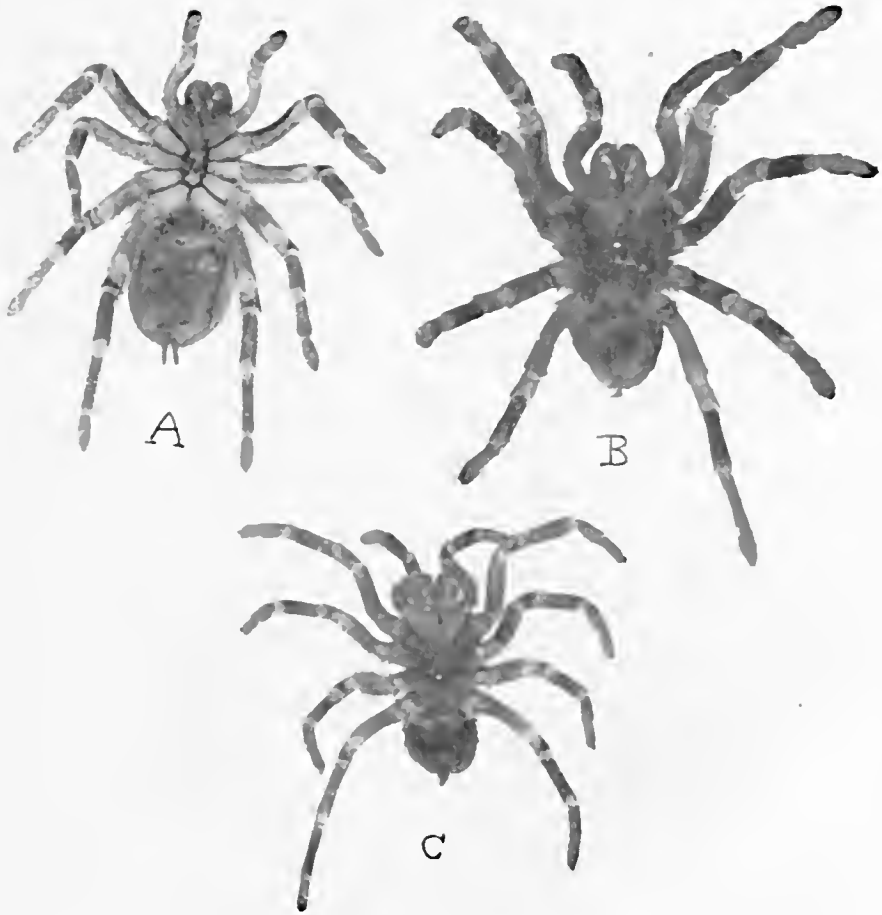
P. cesteri ♀



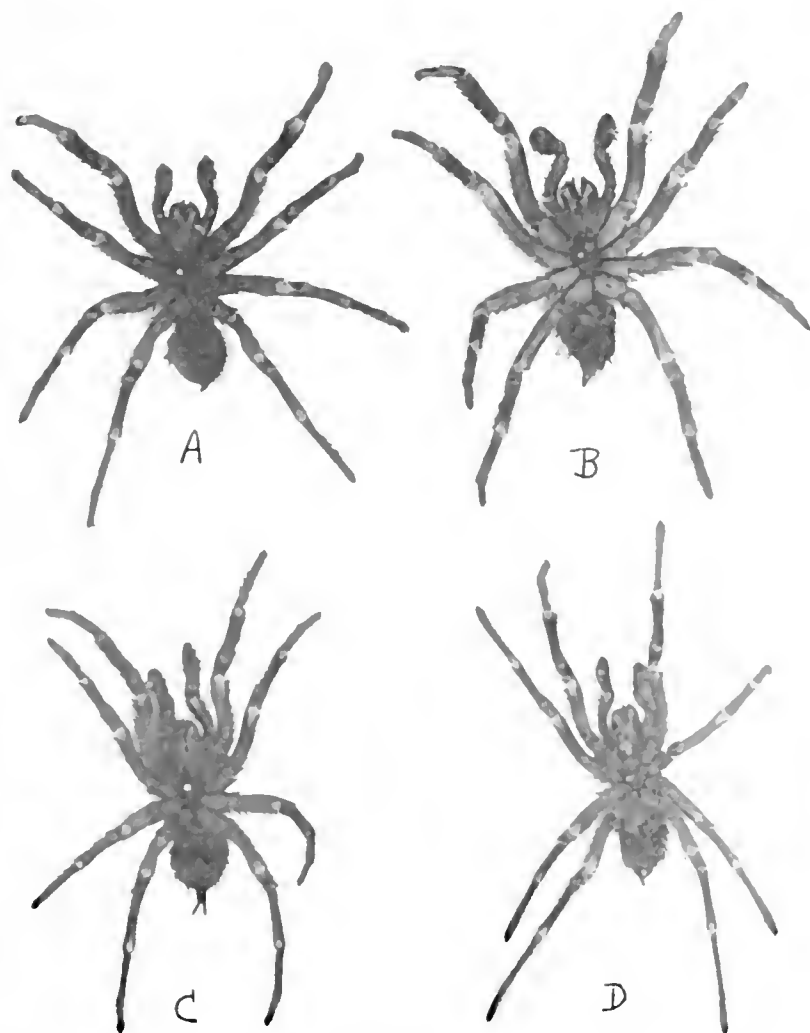




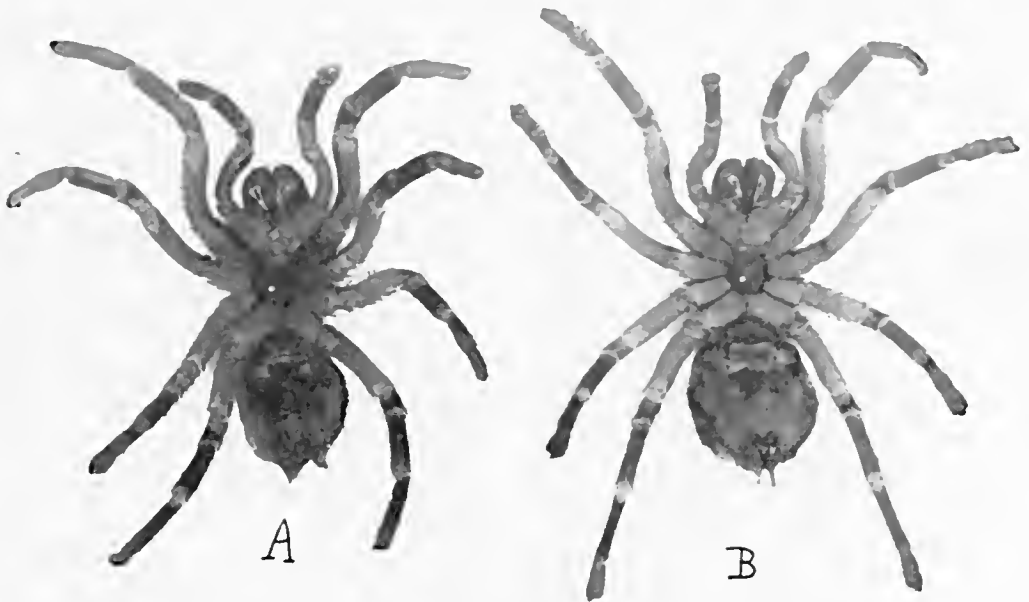
- A. *Pamphobeteus roseus* ♂
B. *Pamphobeteus sorocobae* ♂
C. *Pamphobeteus tetracanthus* ♂
D. *Pamphobeteus cesteri* ♂



- A. *Pamphobeteus sorocobae* ♀
B. *Pamphobeteus roseus* ♀
C. *Pamphobeteus rondoniensis* ♀



A. *Pamphobeteus roseus* ♂
B. *Pamphobeteus sorocobae* ♂
C. *Pamphobeteus tetracanthus* ♂
D. *Pamphobeteus cesteri* ♂



A. *Pamphobeteus tetracanthus* ♀
B. *Pamphobeteus cesteri* ♀



Pamphobeteus cesteri ♀



Pamphobeteus roseus ♀



Pamphobeteus rondoniense ♀



Pamphobeteus sorocobae ♀



Pamphobeteus tetracanthus ♀



NOTAS OFIOLÓGICAS

21. *Observações sobre serpentes do Perú*

POR ALCIDES PRADO & ALPHONSE R. HOGE

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Estas observações são o resultado do exame de um lote de serpentes que nos foi enviado pelo prof. Carlos Morales Macedo, director do Museu de História Natural Javier Prado, de Lima, Perú.

Desse lote uma parte é agora estudada e relatada, ficando a parte restante para ser divulgada mais tarde, em publicação subsequente.

Da importância de um trabalho desta natureza nada é preciso dizer, porquanto ele se relaciona não só com a sistemática, como também com a distribuição geográfica de um determinado grupo de animais. Disto resulta um maior conhecimento em ambos os sentidos e da descoberta de formas porventura novas à ciência.

Todo o material examinado pertence à coleção do museu acima citado.

FAM. BOIDAE

Subfam. Boinae

Gén. *Epicrates* Wagler, 1830

Epicrates cenchria cenchria (L., 1758)

No. 31, jovem ♂, procedente de Colonia del Perené, Junin, com data de captura: junho de 1920.

E. 45; V. 266; A. 1; Subc. 59.

Spl. 13 (7a. e 8a. junto ao olho).

Recebido para publicação em 1-8-1947.

Loreal muito alongada, em contacto com a 2a. spl. pardo-clara em cima, com anéis pardo-escuros; lateralmente com uma série de ocelos e outra de manchas arredondadas pardo-escuras; cabeça com 5 listras pardo-escuras, longitudinais.

Compr. total 596 mm; cauda 70 mm.

Espécie de larga distribuição na America do Sul, especialmente na parte setentrional.

Gén. *Constrictor* Laurenti, 1768

Constrictor constrictor ortonii Cope, 1877

No. 38, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 65; V. 244; A. 1; Subc. 57

Orbitais 18/19; Spl. 19. Cor muito semelhante à de *Constrictor constrictor imperator* (Daudin), com cerca de 29 faixas transversais sobre o corpo.

Compr. total 565 mm; cauda 60 mm.

Há, como no tipo descrito por Cope, nítida separação entre as orbitais e as supralabiais, por meio de uma fileira de escamas, em cada um dos lados da cabeça.

Gén. *Boa* L., 1758

Boa hortulana cookii (Gray, 1842)

No. 37, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 43; V. 287; A. 1; Subc. 117

Rostral quase tão larga quanto alta; 9 escamas de olho a olho, na frente, e 10 ao redor; 2 grandes loreais e 2 grandes preoculares; 11 spl. fortemente escavadas, especialmente as que se encontram debaixo e atrás do olho. Parda-escura em cima, com 2 séries alternadas de desenhos romboidais pardo-negros; parte superior da cabeça marmorada de negro; uma listra pardo-negra, de cada lado, atrás do olho; ventre amarelado, manchado de pardo-negro.

Compr. total 800 mm; cauda 148 mm.

É esta forma pela 1.^a vez registada no Perú.



FAM. ANILIDAE

Gén. *Anilins* Oken, 1816

Anilins scytale (L., 1758)

No. 8, adulto ♂, procedente de Huánuco, com data de captura: maio de 1946.

E. 21; V. 247; A. 1; Subc. 13

Vermelha, revestida de estreitos anéis negros mais ou menos completos. Compr. total 606 mm; cauda 20 mm.

Espécie da parte equatorial da América do Sul. Habita os lugares húmidos, vivendo também nas raízes dos velhos troncos.

FAM. COLUBRIDAE

Sbíam. Colubrinae

Gén. *Chironius* Fitzinger, 1826

Chironius carinatus (L., 1758)

No. 18, adulto ♂, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 12; V. 147; A. 1/1; Subc. 119/119

Spl. 9 (4a., 5a. e 6a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior. Apresenta-se com 2 séries vertebrais de escamas fortemente carinadas. Cor oliva em cima, com escamas caudais bordadas de negro; cabeça da cor geral; ventre oliva-claro.

Compr. total 1525 mm; cauda 430 mm.

No. 3, adulto ♀, procedente de Satipo, Junin, com data de captura: julho de 1940.

E. 12; V. 153; A. 1/1; Subc. 134/134

Spl. 10/10 (4a., 5a. e 6a. e 5a. e 6a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Escamas dorsais todas lisas. Colorido mais ou menos idêntico ao do exemplar anterior; ventre oliva-escuro.

Compr. total 1160 mm; cauda 400 mm.



Gén. *Leptophis* Wagler, 1830

Leptophis occidentalis nigromarginatus (Günther, 1866)

No. 20, adulto ♀, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 15; V. 149; A. 1/1; Subc. 147/147

Spl. 8/9 (4a. e 5a. e 6a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Escamas fracamente carinadas, sendo estas escuras. Verde-azulada em cima, com escamas marginadas de negro; cabeça da cor geral, com placas igualmente marginadas de negro, sendo que as supraoculares e as parietais exibem manchas da mesma cor.

Compr. total 875 mm; cauda 340 mm.

Leptophis occidentalis ortonii Cope, 1876

No. 39, jovem ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 15; V. 158; A. 1/1; Subc. 147/147

Spl. 8 (9 no tipo; 4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Temporais 1+1 (1+2 no tipo), ambas muito grandes, sendo a 2a. mais larga. Cor azul em cima e azul-clara em baixo (material conservado).

Compr. total 796 mm; cauda 304 mm.

Esta forma é afim da anterior, da qual se distingue especialmente por possuir todas as escamas lisas e as ventrais não angulosas.

Gén. *Lcimadophis* Fitzinger, 1843

Lcimadophis albiventris (Jan., 1863)

No. 40, adulto ♂, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: junho de 1918.

E. 17; V. 145; A. 1/1; Subc. 64/64

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); T. 1+2; 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Verde-olivácea em cima; cabeça da mesma cor, com uma barra negra lateral através dos olhos; corpo com uma raia negra lateral, mais visível na porção posterior; ventre branco.

Compr. total 512 mm; cauda 126 mm.

Leimadophis typhlus (L., 1758)

No. 14, jovem ♀, procedente de Marcapata, Cuzco, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 155; A. 1/1; Subc. 53/53

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Temporais 1+2. Verde-oliva em cima, com pequenas manchas negras disseminadas; ventre branco uniforme.

Compr. total 306 mm; cauda 50 mm.

Gén. *Liophis* Wagler, 1830

Liophis cobella (L., 1758)

No. 6, adulto ♂, procedente de Satipo, com data de captura: julho de 1940.

E. 17; V. 155; A. 1/1; Subc. 61/61

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Parda em cima, não se deixando perceber faixas transversais, devido ao mau estado de conservação em que se encontra o exemplar; ventre branco-amarelado, com estrias transversais.

Compr. total 681 mm; cauda 150 mm.

Esta espécie foi, por Beebe, encontrada na Guiana Inglesa e Venezuela, nas touceiras de bambús, alimentando-se de rãs ou de pequenos lagartos.

Gén. *Xenodon* Günther, 1863

Xenodon severus (L., 1758)

No. 15, jovem ♀, procedente de Marcapata, Cuzco, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 21; V. 138; A. 1/1; Subc. 40/40

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 6 infl. em contacto com a mental anterior.



Apresenta-se com faixas transversais pardo-negras, separadas por estreitos espaços esbranquiçados; cabeça com uma faixa pardo-negra em forma de U invertido, e outra de olho a olho sobre a fronte; ventre negro, maculado de branco, lateralmente.

Compr. total 230 mm; cauda 23 mm.

Esta forma tem sido registada no Perú, por vários autores.

Gén. *Sibynomorphus* Fitzinger, 1843

Sibynomorphus catesbyi (Seitz. 1796)

No. 1, adulto ♀, procedente de Satipó, com data de captura: julho de 1940.

E. 13; V. 180; A. 1; Subc. 88/88

Ligeiramente parda-avermelhada em cima, com largas manchas arredondadas pardo-escuras, alternadas, sobre o corpo; cabeça negra, com um colar branco nugal; ventre manchado de pardo.

Compr. total 515 mm; cauda 126 mm.

Subfam. Boiginae

Gén. *Rhinobothryum* Wagler, 1830

Rhinobothryum lentiginosum (Scopoli, 1785)

No. 9, adulto ♀, procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 264; A. 1/1; Subc. 114/114

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 inf. em contacto com a mental anterior.

Loreal mais alta do que longa. Temporais 2+2. Escamas carinadas no dorso e lisas lateralmente. Mostra-se com largos anéis pardo-negros, em número de 25, separados de outros mais estreitos, esbranquiçados e pontilhados de pardo-negro; cabeça com placas pardo-negras, tarjadas de branco.

Compr. total 1185 mm; cauda 250 mm.

Serpente rara, porém já registada no Perú.



Gén. *Leptodeira* Fitzinger, 1843

Leptodeira annulata annulata (L., 1858)

No. 12. adulto ♀, procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 188; A. 1/1; Subc. 101/101

Parda em cima, com uma série dorsal de grandes manchas negras, fusionadas, parcialmente, em ziguezague; cabeça parda-escura, com uma faixa pardo-negra, de cada lado da cabeça, do olho à comissura labial.

Compr. total 730 mm; cauda 185 mm.

Foi encontrada no estomago uma *Hyla* sp.

Gén. *Pseudoboa* Schneider, 1801

Pseudoboa bitorquata (Günther, 1872)

No. 21. adulto ♀, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 19; 203; A. 1; Subc. 76/76.

Avermelhada em cima, com escamas bordadas de negro; cabeça negra em cima, com duas faixas da mesma cor, nucais; partes inferiores amareladas.

Compr. total 640 mm; cauda 130 mm.

Forma compreendida na fauna do Perú, por alguns autores já assinalada.

No. 36. adulto ♂, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 19; V. 203; A. 1; Subc. 87/87

Colorido idêntico ao da forma acima.

Compr. total 761 mm; cauda 174 mm.

Pseudoboa trigemina (D. & B., 1854)

No. 26. adulto ♂, procedente de Montaña, com data de captura: 1935.

E. 19; V. 195; A. 1; Subc. 83/83

Vermelha, com faixas negras transversais em tríade, bastante regulares.

Compr. total 702 mm; cauda 169 mm.

No. 27. adulto ♀, com a mesma procedência e a mesma data de captura.

E. 19; V. 203; A. 1; Subc. 79/79.

Colorido também igual ao da forma anterior.

Compr. total 977 mm; cauda 189 mm.



Gén. *Philodryas* Wagler, 1830

Philodryas olfersii (Licht., 1823)

No. 35, adulto ♂, procedente de Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 19; V. 183; A. 1/1; Subc. incompletas

Spl. 8 (4.^a e 5.^a junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior

Uniformemente verde em cima, sem listra negra postocular.

Philodryas viridissimus (L., 1758)

No. 22, adulto ♂, procedente de Pucallpa, com data de captura: março de 1947.

E. 19; V. 210; A. 1/1; Subc. 114/114

Spl. 8 (4.^a e 5.^a junto ao olho); infl. em contacto com a mental anterior.

Verde em cima e branca-amarelada em baixo.

Compr. total 760 mm; cauda 210 mm.

Espécie arborícola já mencionada no Perú.

Gén. *Oxybelis* Wagler, 1830

Oxybelis acuminatus (Wied, 1822)

No. 19, adulto ♀, procedente de Pucallpa, com data de captura: janeiro de 1947.

E. 17; V. 1930; A. 1/1; Subc. 179/179

Spl. 8 (4.^a, 5.^a e 6.^a junto ao olho); 3/4 infl. em contacto com a mental anterior.

Uniformemente cinza, manchada de pardo e com leves pontuações negras; cabeça da cor geral, com uma listra negra lateral, através do olho.

Compr. total 1187; cauda 468 mm.

Forma arborícola e muito alongada.

Gén. *Erythrolamprus* Wagler, 1830

Erythrolamprus aesculapii (L., 1758)

No. 16, adulto ♀, procedente de Pucallpa, com data de captura: 1947.

E. 15; V. 189; A. 1/1; Subc. 44/44

Spl. 7 (3a. e 4a. junto ao olho); 4/5 infl. em contacto com a mental anterior. Vermelha, com anéis negros duplos, em séries; cabeça da cor geral, com uma faixa negra na frente.

Compr. total 760; cauda 95 mm .

No. 29, adulto ♀, procedente de Montaña, com data de captura: 1935.

E. 15; V. 188; A. 1/1; Subc. 45/45

Vermelha, com anéis negros, duplos, agrupados; cabeça e nuca negras, com um colar claro nugal; algumas manchas negras sobre as parietais.

Compr. total 630 mm ; cauda 80 mm .

Fam. ELAPIDAE

Subfam. Elapinae

Gén. *Micrurus* Wagler, 1824

Micrurus spixii obscura Jan, 1872.

No. 13, adulto ♂, procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 15; V. 217; A. 1/1; Subc. 5-15/15-2

Vermelha com anéis negros em tríades largas; anel negro sobre o pescoço.

Compr. total 1150 mm; cauda 57 mm.

Em perfeita concordância com Schmidt & Walker, reconhecemos tratar-se da subespécie em questão.

Fam. CROTALIDAE

Subfam. Lachesinae

Gén. *Bothrops* Wagler, 1824

Bothrops microphthalmus Cope, 1876

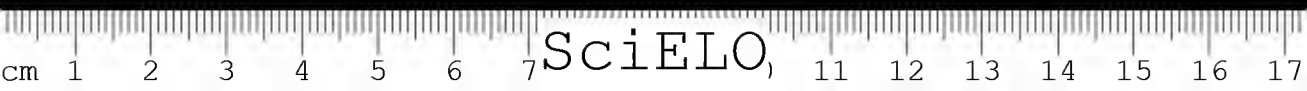
No. 30, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1920.

E. 25; V. 149; A. 1; Subc. 52/52

Pardo-cinza em cima, com manchas pardo-negras triangulares, laterais; ventre pardo-claro na parte anterior e pardo-escuro na posterior.

Compr. total 425 mm ; cauda 62 mm .

Cumpre-nos assinalar aqui a presença do poro nasal, facto que se prestou a Maslin para fazer a separação entre *Bothrops* e *Trimercsurus*. No estomago, encontramos restos de um *Tciú* e de uma *Perereca*.



Bothrops pictus (Tschudi, 1849)

No. 33, adulto ♂, procedente de Montaña del Perené, com data de captura: 1920.

E. 23; V. 169; A. 1; Subc. 52/52

Pardo-pálida em cima, com uma série dorsal de manchas pardo-negras, por vèzes confluentes, em ziguezague; pequenas manchas negras laterais; cabeça manchada de pardo-negro no alto; lateralmente, com uma listra pardo-escura atrás do olho, e outra, vertical, abaixo do olho.

Compr. total 370 mm ; cauda 52 mm .

Trata-se de uma pequena forma da fauna peruana. |

RESUMO

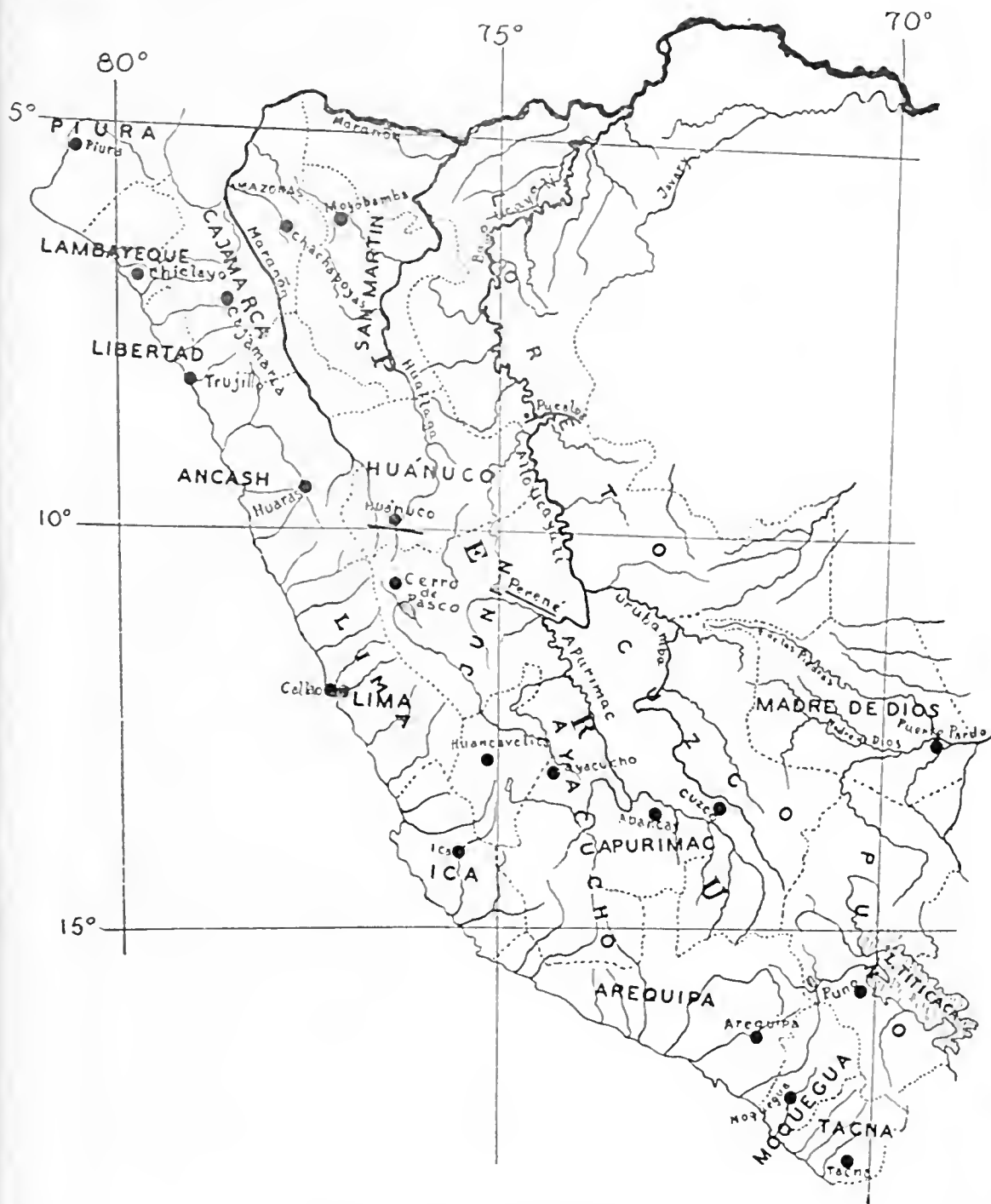
Relata-se neste trabalho o resultado do exame procedido em parte de um lote de ofídios enviado do Perú. O valor de um estudo desta natureza está em que ele se prende a questões de sistemática e de distribuição geográfica de um importante grupo zoológico.

ABSTRACT

This paper deals with the study of a small collection of Peruvian snakes from the Javier Prado Museum of Lima, Perú.

BIBLIOGRAFIA

1. *Beebe, W.* Zool., (1) :18, 1942.
2. *Boutenger, G. A.*, Cat. Sn. Brit. Mus., 1-3, 1893-96.
3. *Cope, E. D.*, J. Acad. Phil., (2) 8:159, 1876.
4. *Cope, E. D.*, Proc. Ame. Phil. Soc., 17:35, 1877.
5. *Maslin, T. P.*, Copeia, (1) :18, 1942.
6. *Schmidt, K. & Walker, W.*, Zool. Ser. Field Mus. of Nat Hist., 24 (26-27) :279 et 297, 143.



Mapa do Perú, com as áreas mencionadas no texto.



Rhinobothryum lentiginosum (Scopoli, 1785)



Rhinobothryum lentiginosum (Scopoli, 1785)





DUAS NOVAS ESPECIES DO GENERO *EUPALAESTRUS*
POCOCK, 1901.

POR W. BÜCHERL

(Do Laboratorio de Zoologia Medica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

O genero *Eupalaestrus* Pocock, 1901, pertence à ordem *Araneae*, subordem *Mygalomorphae* (caranguejeiras), família *Theraphosidae*, subfamília *Theraphosinae*.

A duas novas especies são, portanto, caranguejeiras, cujos tarsos estão providos de densos tufos subungueais e de duas garras terminais; com quelíceras desprovidas de rastelo; com numerosos espinhos nos metatarsos das pernas posteriores; com abundantes pelos curtos, sedosos, no lado interno dos fêmures do ultimo par de pernas; sem "aparelho estridulante"; com o quarto par de pernas muito mais comprido do que o primeiro e com as tibias e, principalmente, os metatarsos muito espessos em todas as especies conhecidas, normais, entretanto, numa das duas novas especies.

O genero *Eupalaestrus* é, até hoje, representado apenas por tres especies, baseadas unicamente em fêmeas, por tres autores diferentes, ignorando os proprios autores os respectivos machos (Simon, Pocock e Mello-Leitão).

Eupalaestrus campestratus foi descrito por Simon, em 1891, assinalando aquele autor o Paraguay como habitat desta caranguejeira.

Eupalaestrus pugilator foi descrito em primeira mão por Pocock, em 1901, com habitat na Argentina.

A unica especie conhecida no Brasil é *Eupalaestrus spinosissimus*, descrito por C. de Mello-Leitão, em 1923, e capturado em Pinheiro, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Pelo grande espaço de tempo decorrido entre as diversas descrições das especies acima e das nossas e pelo pequeno numero de exemplares, pois alem do exemplar tipo dos respectivos autores não são conhecidos outros especimens,

Entregue para publicação em 10 de setembro de 1947.



nem mesmo os respectivos machos, pode-se inferir que se deve tratar de uma caranguejeira muito rara.

Como não se conhecem outras espécies no Brasil e como as duas espécies novas, que passamos a descrever agora, são muito diferentes entre si e de *spinosissimus* de maneira a excluir qualquer dúvida, não hesitamos em proceder à descrição, ainda que tenhamos apenas um exemplar de *Eupalaestrus tarsicrassus*, sp. nov. (uma fêmea). *Eupalaestrus tenuitarsus*, sp. nov., entretanto, está baseada em seis fêmeas e dois machos, sendo os dois machos os primeiros a serem descritos para todo o gênero.

Eupalaestrus tarsicrassus sp. nov.

A nossa descrição é forçosamente apenas morfológica, a estabelecer simplesmente o que o presente exemplar tem de particular, sem podermos inferir possíveis variações deste ou daquele caráter. Naturalmente sempre está a presente espécie nova em confronto com *spinosissimus*, da qual difere fundamentalmente.

Medidas:

Comprimento total	55 mm;
Cefalotorax	17 por 15 mm;
Pernas	47 — 42 — 40 — 55 mm;
Patela e tibia I	16,2 mm; IV — 18 mm;
Cômoro ocular	2,7 por 2,1 mm;
Esterno	7,2 por 6 mm;
Espessura do femur IV — na base ...	2,5 mm; no apice — 3,5 mm;
Espessura da tibia IV — na base ...	3 mm; no apice — 4 mm;
Espessura do metatarso IV — na base	3,3 mm; no meio — 3,8 mm; no apice — 2,7 mm

Colorido (vide prancha colorida e fotografias):

Cefalotorax cinza escuro, quase preto, com pubescência olivácea negra. Quelíceras de pubescência cinza esbranquiçada, com cerdas escuras na base e avermelhadas nas pontas. Abdomen oliváceo, com cerdas longas, deitadas, vermelhas nas pontas e hastes e oliváceas na base. Pernas, no lado dorsal, cinzentas. Fêmures marrom escuro, destacando-se por esta cor das outras articulações. As últimas pernas inteiramente marrom escuras. Fêmures, patelas e tibias com 2 faixas dorsais, longitudinais, não muito nítidas, cobertas de curtos pêlos cinzentos nos fêmures: “nuas” e um tanto sinuosas e de cor marrom escuro nas patelas; cor de cinza novamente nas tibias (quase imperceptíveis no quarto par

de pernas). Tibias, contiguo às faixas, no lado interno, com 2 listras escuras formando um semi-anel basal (invisíveis no quarto par de pernas). Metatarsos com listra mediana, escura, sinuosa. Tarsos com listra escura, oval, larga. Cordas das pernas anteriores curtas, crescendo em comprimento e intensidade do colorido e aumentando em numero nas ultimas pernas, onde são semi-eretas. Sempre com base escura e haste e pontas avermelhadas, até ao vermelho vivo nas ultimas pernas. Fêmures, patelas, tibias e metatarsos, nos apices, com filas transversais de pêlos curtos, cinzentos, a formar uma especie de anel.

Esterno, labio, ancas dos palpos e coxas das pernas moreno escuros. Ventre igualmente moreno escuro, abruptamente destacado no colorido dos lados do ventre, que são cinza amarelos. Fimbria dos palpos e do labio vermelha. Cerdas ventrais curtas e esparsas, vermelho arroxeadas.

Olhos: Olhos médios anteriores duas vezes maiores do que os laterais anteriores, separados entre si e dos laterais menos de meio diametro. Laterais anteriores e posteriores iguais, separados menos de um diametro. Médios posteriores muito pequenos, duas vezes menores do que os laterais posteriores e pelo menos tres vezes menores do que os medios anteriores. Contiguos aos laterais posteriores e bastante afastados dos medios anteriores.

Esterno: Pouco mais longo do que largo, com tres pares de sigilas quase ovais e todas equidistantes da margem.

Labio e ancas dos palpos com cuspulas numerosas, irregulares, submarginais.

Queliceras com bainha armada de 11 a 12 dentes enfileirados, que apresentam os seguintes tamanhos: primeiro veem dois dentes menores, depois tres bem maiores, depois novamente tres menores e no fim tres a quatro grandes. No fundo da fileira de dentes, ao lado, existem mais de 15 denticulos, de posição irregular e de tamanho diferente.

Ultimas pernas com tibias e metatarsos muito espessos, a tibia principalmente no lado apical e os metatarsos no lado basal e no meio, sendo a ponta apical novamente de espessura normal.

Distribuição dos espinhos nas pernas:

	<i>Tibias</i>	<i>Metatarsos</i>
I	— 2 ventro-apicais	0 ventro-apicais
II	— 2 ventro-apicais 2 anteriores	1 ventro-apical mediano
III	— 2 ventro-apicais 2 anteriores 3 posteriores	3 ventro-apicais 2 anteriores 2 ventro-medianos
IV	— 3 ventro-apicais 2 ventro-medianos 4 anteriores 5 posteriores	muitos e irregularmente distribuidos



Os quatro prefemures sem espinho algum.

Ancas dos palpos, na face posterior, sem espinhos; mas somente com algumas cerdas escuras. Trocanteres do primeiro par de pernas, na face anterior, também sem espinhos, mas somente com pequenas cerdas. Ancas do primeiro par de pernas, na face anterior, acima da sutura, com numerosos espinhos pequenos, irregulares. Os mesmos espinhos escuros, curvos, longos (lembrando cerdas) estão presentes também nas ancas, na face anterior, das três pernas seguintes, aumentando em número e tamanho no quarto par de pernas. Face posterior das ancas do segundo e do terceiro par de pernas com numerosos espinhos pretos, bem menos numerosos no segundo par.

Confronto morfológico entre

<i>E. spinosissimus</i> M. L., 1923 e <i>E. tarsicrassus</i> sp. nov.		
Comprim. total	55 mm	55 mm
Pat. e tibia I	18 mm	16 mm
Pat. e tibia IV	20 mm	18 mm
Cefalotorax	20 mm	17 mm

Relação diferencial:

Cefalotorax igual à patela e tibia IV e bem mais longo do que a patela e tibia I (2 cm) — *E. spinosissimus*;

Cefalotorax menor do que a patela e tibia IV e apenas pouco maior (1,2 cm) do que a patela e tibia I — *E. tarsicrassus* sp. nov.

Cefalotorax vermelho escuro com pubescência pardo chocolate;	C. cinza escuro, quase preto com pubescência oliváceo negra.
Cerdas das queliceras pardas;	Escuras na base, avermelhadas nas pontas.
Pernas com linhas longitudinais "nuas";	Linhas das pernas "nuas" apenas nas patelas e com 2 listras escuras nas tibias e 1 listra sinuosa nos metatarsos.
Articulações das pernas sem anéis apicais de pelos;	Todas as articulações, no lado apical, com pelos cinzentos, formando anel.
Ventre cor de chocolate;	Murino escuro, com lados amarelos.
Rima ocular duas vezes mais larga do que longa;	Apenas muito pouco mais larga do que longa.
Olhos m. p. a igual distância do m. a. e dos l. p.;	M. p. contíguos aos l. p. e afastados dos m. a. mais de dois diâmetros.

Número de espinhos nas tibias e nos metatarsos bastante diferente nas duas espécies.

Tipo: Fêmea No. 593 da coleção aracnológica do Instituto Butantan.

Local-tipo: São José dos Campos, Estado de São Paulo, Brasil.

Data de captura: 6-8-47.

Eupalaestrus tenuitarsus, sp. nov.

Dimensões :

No.	Sexo	Compr. total	Cefalot.	Pat. e tib. I	IV
86	fêmea	47 mm	21 mm	19 mm	20,5 mm
90	fêmea	37 mm	17 mm	15 mm	16,4 mm
91	fêmea	50 mm	22 mm	19 mm	20,4 mm
110	fêmea	55 mm	22 mm	18,6 mm	20,3 mm
502	macho	37 mm	16 mm	18,2 mm	20,4 mm
607	macho	38 mm	16,2 mm	18,2 mm	20,8 mm
612	fêmea	55 mm	21,6 mm	17,6 mm	19,7 mm
653	fêmea	46 mm	21 mm	17,5 mm	19,0 mm

Colorido: (vide prancha colorida e fotografias):

Cefalotorax com densa pubescência cinza escura. Orla do cefalotorax e dos pelinhos das queliceras cinza claro. Abdomen com densa pubescência sedosa, olivacea, e com longos pelos vermelhos, semi-erectos, dirigidos para traz, ocupando toda a parte superior e ambos os lados do abdomen. Esterno, coxas, trocanteres e femures com pubescência cinza e com longos pelos avermelhados nas pontas e com haste preta. O numero destes pelos é maior nas ultimas pernas, principalmente nos trocanteres e femures, onde chegam a atingir o comprimento de 1 cm. Ventre e lado ventral das fiandeiras pretos, como tambem o lado ventral da patela, tibia, do metatarso e tarso do quarto par de pernas. Labio e ancas dos palpos vermelhos. Cuspulas do labio numerosas; as dos palpos maiores e menos numerosas. Fimbria dos labios e das ancas dos palpos vermelho tijolo.

Lado dorsal das pernas com pubescência cinza clara, menos nos femures que apresentam tonalidades de um cinza olivaceo. Pernas com desenhos ornamentais, que consistem em duas faixas e em listras e que se apresentam tão nitidas como se vê raras vezes em qualquer outra caranguejeira.

As duas faixas são cinza claro e as listras escuras, quase pretas. Fêmures com duas faixas, longitudinais, paralelas, muito delicadas; patelas com as duas faixas bem mais largas, às vezes tripartidas, convergindo apicalmente a formar quasi uma ponta. Tibias novamente com faixas paralelas. Metatarsos apenas com uma faixa cinzenta, mediana, na metade basal, mais fraca nos metatarsos das ultimas pernas. Tibias no lado interno das faixas e contiguo a estas, duas listras pretas, estreitas, longitudinais, a começar na base desta articulação com um semi-anel basal e a terminar um pouco adiante da metade da articulação.



Metatarsos com listra preta, sinuosa, a percorrer em forma de "S" a articulação toda. Tarsos com listra preta, oval, tendo no meio uma faixa marrom nitida.

Cefalotorax muito mais longo do que a patela e tibia do primeiro par de pernas e ainda mais longo do que a patela e tibia do quarto par de pernas. Patela e tibia IVª, mais longa do que a Iª.

Rima ocular quase circular, isto é, apenas muito pouco mais larga do que longa nas fêmeas; nos machos é quase inteiramente circular.

Os quatro olhos anteriores iguais em tamanho, sendo, entretanto, os medios absolutamente redondos e os laterais ovais; separados entre si um pouco menos de um diametro. Equidistantes. Médios posteriores um pouco menores do que os laterais posteriores e contiguos a estes; separados dos medios anteriores mais de um diametro. Os olhos dos outros exemplares conferidos variam um pouco em distancia e tamanho, mas obedecem, contudo, sempre ao esquema acima, como também os olhos dos machos. Fovea toracica direita nas fêmeas, levemente procurva nos machos.

Sigilas do esterno separadas da margem mais de dois diametros, quase invisíveis, por serem inteiramente encobertos pela pubescencia do esterno. Pernas com escopulas, distribuidas da seguinte maneira:

Nas fêmeas os metatarsos são escopulados até a base no primerio e no segundo par de pernas, havendo logo abaixo das escopulas pelos longos, amarelos, que formam um anel basal no lado ventral.

Metatarsos do terceiro par de pernas escopulados nos dois terços apicais e no quarto par de pernas ha escopulas apenas no ultimo quarto apical. Nos machos existem escopulas no primeiro par de pernas apenas na metade apical; no segundo par apenas numa area pouco maior do que o terço apical; no terceiro par as escopulas apenas ocupam um quinto apical e no ultimo par de pernas já não mais existem escopulas, sendo toda a area ventral ocupada por cerdas e numerosos espinhos.

Pernas posteriores pelo menos 6 cm. mais compridos do que as anteriores, sendo a relação do comprimento a seguinte:

Ultimo par; primeiro par; segundo e, finalmente, o terceiro par. Esta ordem prevalece igualmente nos machos.

Espessura das articulações das ultimas pernas (no lado dorsal):

Femures	— 4,5 a 5 mm no lado basal —	4,5 a 5 mm no lado apical;
Patelas	— 3,9 a 4,5 mm no lado basal —	3,9 a 4,5 mm no lado apical;
Tibias	— 3,9 a 5 mm no lado basal —	3,9 a 5,0 mm no lado apical a 4,5 a 6mm no meio da articulação.

Metatarsos — 2,5 mm no lado basal e 2 mm no lado apical. Os metatarsos são, portanto, absolutamente normais, isto é, são iguais aos dos outros generos, em opposição ao *Enfalacstrus tarsicrassus*, sp. nov. e às demais especies deste genero, em que justamente os metatarsos são muito mais espessos, do que as tibias. Tarsos completamente normais nas medidas.

Machos:

Femures — 3,8 mm no lado basal — 3,8 mm no lado apical;
 Patelas — 3,5 mm no lado basal — 3,6 mm no lado apical;
 Tibias — 4,1 mm no lado basal — 4,6 no meio — 4,1 mm no lado apical.

Metatarsos novamente normais, como nas fêmeas.

As patelas, tibias e os metatarsos, tanto dos machos como das fêmeas, de todas as pernas ostentam pelos hirsutos, abundantíssimos, principalmente nas ultimas pernas. Entretanto, não existem nesta especie nova os pequenos espinhos negros de *spinossimus*.

Numero de espinhos nas pernas:

	<i>Fêmeas</i>	<i>Machos</i>
Metatarso I	— 2 a 3 ventro-apicais	3 ventro-apicais 2 anteriores 3 posteriores
Metatarso II	— 2 a 3 ventro-apicais 0 a 1 ventral	4 ventro-apicais 2 a 3 anteriores 2 a 3 posteriores
Metatarso III	— 4 a 5 ventro-apicais 1 a 3 anteriores 1 a 3 posteriores	4 ventro-apicais 3 a 4 anteriores 3 a 4 posteriores
Metatarso IV	— 15 a 26 espinhos ao todo —	22 a 25 espinhos ao todo
Tibia I	— 1 ventro-apical	1 ventro-apical e 6 no resto
Tibia II	— 1 ventro-apical	2 ventro-apicais e 4 no resto
Tibia III	— 2 ventro-apicais 3 a 5 anteriores 1 a 3 posteriores	4 ventro-apicais 2 a 3 anteriores 2 a 3 posteriores
Tibia IV	— 2 ventro-apicais 1 a 2 anteriores 0 a 1 posterior	3 ventro-apicais 2 anteriores 2 posteriores

Fileira de dentes nas queliceras dos machos constituida de 12 a 13 dentes enfileirados, sendo os tres primeiros os maiores, seguindo-se então, 4 a 5 dentes menores e novamente 5 a 6 maiores. No lado interno dos dois ultimos existem



alguns denticulos muito pequenos, incolores, bem menores do que os de *tarsicrassus*, sp. nov.

Nas fêmeas de *tennuitarsus*, sp. nov., os dentes das queliceras são em numero de 9 a 11. geralmente, porém, de 10, equidistantes e do mesmo tamanho, tendo no fundo, na area dos tres ultimos dentes, 13 a 17 denticulos, pequenos, maiores, entretanto, do que os dos machos.

Ancas, na face anterior, acima da sutura, dos quatro pares de pernas, nas fêmeas, com espinhos curvos numerosos nas ancas posteriores. Trocanteres dos primeiros dois pares de pernas, igualmente na face anterior, com alguns espinhos, mais longos e curvos do que os das ancas. Face posterior das ancas dos palpos e dos primeiros tres pares de pernas com pequenos espinhos curtos e ponteagudos, muito poucos em numero nos palpos, aumentando seu numero gradativamente nas pernas seguintes até atingir o maior numero no terceiro par. Últimas pernas sem estes espinhos.

Primeiro par de pernas do machos com apofise tibial (vide prancha colorida) dupla, recurva em forma de anel, sendo a inferior duas ezes maior do que a interna. Flexionamento dos metatarsos no lado esterno da inferior (maior). Orgão copulador com um corpo quase redondo e bem volumoso e com apofise retorcida apenas em meia volta e relativamente curta (vide prancha).

Tipo: Fêmea sob N°. 612 da coleção do Instituto Butantan.

Local-tipo: Tounay, Estado do Mato Grosso, Brasil.

Remetente: Julio de Oliveira.

Paratipos: 5 fêmeas, procedentes do mesmo local: Nos. 86, 90, 91, 110, 653;
2 machos, do mesmo local: Nos. 502 e 607, todos na coleção aracnológica do Instituto Butantan.

Procedendo a um confronto morfológico, dentro dos limites do numero restrito de exemplares das tres especies brasileiras, pode-se estabelecer a seguinte chave sinetica:

Fêmeas:

a) Cefalotorax igual à patela mais a tibia IV e maior do que a patela mais a tibia I — *E. spinosissimus*, M.L. (Estado do Rio de Janeiro).

b) Cefalotorax menor do que a patela e tibia IV e apenas pouco maior do que a patela mais a tibia I — *E. tarsicrassus*, sp. nov. (Estado de São Paulo).

c) Cefalotorax bem maior do que a patela mais a tibia IV e muito maior do que a patela e tibia I — *E. tennuitarsus*, sp. nov. (Mato Grosso) —

Alem destes caracteres que, como já acentuamos num trabalho morfológico comparativo sobre as especies brasileiras do genero *Pamphobeteus*, são absolutamente seguros e invariaveis, ha a assinalar, como segundo caracter diferencial

entre as tres especies: — o colorido diferente, igualmente de grande valor sistematico:

a) Ancas das pernas e ventre cõr de chocolate; cefalotorax pardo-chocolate; abdomen castanho esverdeado — *E. spinosissimus*.

b) Ancas das pernas, esterno e ventre inurino escuros; cefalotorax olivaceo negro-*E. tarsicrassus*, sp. nov.

c) Ancas das pernas e esterno cinza; ventre preto; cefalotorax cinza escuro; abdomen olivaceo-*E. tenuitarsus*, sp. nov.

Em *Eupalaestrus tenuitarsus*, sp. nova, ha igualmente um dimorfismo sexual nas medidas de comprimento do cefalotorax em relação aos comprimentos das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas e que é o seguinte:

Machos: Cefalotorax sempre menor do que a patela e a tibia I e muito menor ainda do que a patela e tibia IV.

Fêmeas: Cefalotorax muito mais longo do que a patela mais a tibia I e maior ainda do que a patela mais a tibia IV.

Quanto à relação de comprimento entre as patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas tanto os machos como as fêmeas apresentam novamente intimo parentesco, isto é, em ambos os sexos as patelas e as tibias do quarto par de pernas sempre são maiores do que as do primeiro par, de maneira que não é possível confundir os machos desta especie com os que, no futuro, serão descobertos como pertencentes às outras duas especies.

RESUMO

No presente trabalho são descritas duas especies novas do genero *Eupalaestrus* Pocock, a saber: *Eupalaestrus tarsicrassus*, sp. nov. e *E. tenuitarsus*, sp. nov., que se distinguem entre si e da terceira especie brasileira, *E. spinosissimus* M.L.:

- 1º. Pelo colorido diferente de cada especie;
- 2º. Pela relação das medidas de comprimento do cefalotorax e das patelas mais tibias do primeiro e do quarto par de pernas e que são as seguintes:
 - a) Cefalotorax igual à patela mais tibia IV-*E. spinosissimus* M.L.
 - b) Cefalotorax menor do que a patela e tibia IV-*E. tarsicrassus*, sp. nova.
 - c) Cefalotorax maior do que a patela mais a tibia IV-*E. tenuitarsus*, sp. nova.



3°. Por um habitat diferente:

spinosissimus provêm de Pinheiro, Estado do Rio de Janeiro;

tarsicrassus de São José dos Campos, Estado de São Paulo;

tennitarisus de Tounay, Estado do Mato Grosso.

As duas novas espécies se distinguem entre si igualmente pelo colorido, característico para cada uma e inconfundível; pelas medidas de comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibiias I e IV e ainda porque, em *tarsicrassus*, sp. nov., os últimos metatarsos são espessados, bastando conferir as medidas correspondentes, enquanto que em *tennitarisus*, sp. nov., os últimos metatarsos são de espessura normal, sendo os últimos femures, as patelas e principalmente as tibiias muito espessados.

Tendo em consideração justamente estes característicos diferenciais, demos às duas espécies novas os seus nomes característicos, que procuram expressar esta diferença.

Finalmente é descrito ainda o macho de *E. tennitarisus*, sp. nov., sendo esta descrição tanto mais interessante, quanto vem a preencher uma grande lacuna, pois até agora não se conheciam os machos de nenhuma espécie deste genero.

ABSTRACT

Eupalaestrus tarsicrassus and *E. tennitarisus* are described as new species of the genus *Eupalaestrus* Pocock. The new species can be easily distinguished for herself and for the third species of this genus, *E. spinosissimus* Mello-Leitão, 1923, as follow:

a) All three have a different habitat. *spinosissimus* is from Pinheiro, Estado do Rio de Janeiro; *tarsicrassus*, sp. nov., is from São José dos Campos, Estado de São Paulo and *tennitarisus*, sp. nov., is from Tounay, Estado de Mato Grosso, Brasil.

b) The three species have a proper specific color, expressed chiefly on the cephalotorax, on the ventral side of abdomen, sternum and coxae.

c) The three species have a characteristic and strictly specific relation between the length of cephalotorax and patellae and tibiae IV:

1. Cephalotorax as long as the patellae and tibiae IV—*spinosissimus*;
2. Cephalothorax longer than the patellae and tibiae IV—*tennitarisus*, sp. nov.;
3. Patellae and tibiae IV longer than the cephalotorax—*tarsicrassus*, sp. nov. In this paper also is described the first male of the Brazilian species of this genus.

ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender systematischer Arbeit werden zwei neue Arten der Gattung *Eupalaestrus* Pocock beschrieben: *E. tarsicrassus*, sp. nov., aus São José dos Campos, Estado de São Paulo und *E. tenuitarsus*, sp. nov., aus Tounay, Estado de Mato Grosso, Brasilien. Die beiden neuen Arten unterscheiden sich voneinander und von der, von Mello Leitão, in Jahre 1923, beschriebenen Art. *E. spinosissimus*, aus Rio de Janeiro, wie folgt:

a) Durch die verschiedene, charakteristische Färbung, hauptsächlich des Cephalothoraxes, des Sternums, der Beinhüften und der ventralen Bauchseite:

b) Durch ein verschiedenes Habitat:

c) Durch eine jeweils verschiedene, durchaus charakteristische und arttägige Beziehung der Laengenmasse des Cephalothoraxes in Beziehung mit den Laengenmassen der Patellen und Tibien des ersten und des vierten Beinpaars und die folgendermassen in einem Artenschlüssel ausgedrückt werden können:

1. Cepht. gleich lang wie die Patellen und Tibien IV-*spinosissimus*
3. Cepht. länger als die Patellen und Tibien IV-*tenuitarsus*, sp. nov..
2. Cept. kürzer als die Patellen und Tibien IV-*tarsicrassus*, sp. nov..

Ausserdem unterscheiden sich die beiden neuen Arten durch die morphologische Beschaffenheit des letzten Beinpaars. Bei *tarsicrassus* sind hauptsächlich die letzten Metatarsen sehr verdickt, während bei *tenuitarsus* die Femures, Patellen und Tibien verdickt sind und die Metatarsen wieder normale Dicke aufweisen.

Schliesslich wird in dieser Arbeit auch das erste Männchen der ganzen Gattung beschrieben.

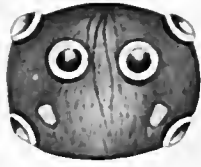
A Dona Theresa Sarli e ao Snr. J. Talarico, da Secção de Fotografia, do Instituto Butantan, os nossos agradecimentos pelos desenhos coloridos e pelas fotografias.

BIBLIOGRAFIA

1. Simon, E., *Ann. Soc. Entom. Belgique*, 60:311, 1891.
2. Pocock, *Ann. Mag. Nat. Hist. ser. 7*, 8:546, 1901.
3. Mello Leitão, C. de *Rev. Mus. Paulista*, 13: 221, 1923.







Eupalaestrus tarsicrassus ♀







1. *Eupalaestrus tenuitarsus* sp. nova ♀
2. *Eupalaestrus tenuitarsus* ♂ — apófise da tibia
3. *Eupalaestrus tenuitarsus* ♂ — órgão copulador





Eupalaestrus tennuitarsus ♀



Eupalaestrus tennuitarsus ♀



Eupalaestrus tennuitarsus ♂



Eupalaestrus tennuitarsus ♂



Eupalaestrus tarsicrassus ♂



Eupalaestrus tarsicrassus ♀

METODO RAPIDO DE COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS DE SANGUE.
NOÇÕES PRATICAS SOBRE CORANTES PANCROMICOS
E ESTUDO DE DIVERSOS FATORES.

POR G. ROSENFELD

(Do Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A coloração de esfregaços pelos metodos pancromicos apresenta quase sempre variações nas mãos do mesmo tecnico. e especialmente quando executados por pessoas com pouca experiencia nessas colorações. No entanto trata-se de um trabalho elementar e simples em que não devem existir esses inconvenientes, que provavelmente são acentuados pela falta de exatidão das tecnicas como são usualmente descritas.

É frequente ver-se recomendado o uso de quantidades medidas em gotas, estas variam bastante de volume com os conta-gotas ou as pipetas com que são contadas, acarretando sempre variações na relação entre agua e corante, o que é importante na coloração.

Em algumas tecnicas aconselham o uso de numero igual de gotas de corante e de agua, outros interpretando esses dados erroneamente recomendam quantidades iguais medidas em cm³. Ora é muito grande a diferença entre os dois metodos, os corantes sendo usualmente dissolvidos em metanol dão gotas com cerca da metade do volume das de agua, de modo que enquanto no primeiro metodo a quantidade de agua é cerca do dobro da de corante, no segundo elas são realmente iguais. Isso sem contar a variação do volume das gotas condicionadas pelas circunstancias anteriormente mencionadas.

No presente trabalho estudamos os diversos fatores que têm influencia na coloração, assim como metodos de conservação das preparações coradas, com o intuito de fixar todos os dados para uma tecnica de coloração rapida e simples, o mais regular e independente possivel do fator pessoal, afim de eliminar o fator virtuosidade até agora importante nessas colorações. O resultado foi um metodo de coloração simples e muito proximo dos metodos usuais de coloração rapida em que, porém, estão determinados os fatores de variação e sua influencia. Os dados obtidos serviram-nos de base para a preparação de um corante que propuzemos em outro trabalho (3), porém o metodo de coloração pode ser aplicado á maioria dos corantes usuais.

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.



MATERIAL E METODOS

Os esfregaços de sangue eram feitos de modo usual em lamina, e datando no maximo 24 horas, pois, que, quanto mais velhos dão colorações um pouco peores e portanto não bem comparaveis.

Corantes — Usamos diversos: Leishman, Wright, Giemsa e o corante por nós proposto (3). De fabricação "Grübler" e "Harleco" os 3 primeiros e "Corm" os quatro.

As soluções de corantes que devem sempre ser conservadas em vidros secos e bem fechados foram preparadas das seguintes maneiras:

Soluções metilicas — 0.15 gr. % de corante em metanol sintético, neutro ao tornesol. Essa solução é agitada algumas vezes, conservada á temperatura ambiente e, no dia seguinte filtrada, depois do que está pronta para usar. Foram tambem preparadas, diluindo 1 parte de solução glicerinada com 4 partes de metanol, porém não com resultados tão bons quanto com a solução metilica pura.

Soluções glicerinadas tipo Giemsa — 0.75 gr. % de corante numa mistura de partes iguais de metanol e glicerina pura com d-1.26. Essa solução é agitada diversas vezes e conservada 2 a 6 horas a 60°, ou cerca de 12 horas a 37°. No dia seguinte é filtrada e está pronta para usar.

Solução tampão — Foi preparada com fósforo monopotássico anidro (K_2HPO_4), e fósforo disódico anidro (Na_2HPO_4). Foram feitas soluções a 10% com cada um desses sais. A mistura correspondente ao p 6.95 e a uma concentração M/1.5 foi preparada adicionando 54.468 ml. da solução de fósforo monopotássico a 107.0 ml. da solução de fósforo disódico. Essa solução stock com uma concentração de 10.7645 gr % para ser usada era diluida a 10% em agua destilada.

O pH foi sempre determinado com potenciometro.

Secagem — A secagem das lamina depois de coradas e lavadas, era feita com um dessecador de ar quente, do modelo corrente para secagem de cabelo, instalado sob a mesa com a boca voltada para cima e adaptada a um orificio do mesmo diametro feito no tampo da mesa. Esse metodo de secagem economiza muito tempo e quando o volume do trabalho de rotina justifica essa despesa é o mais aconselhavel. Tem as vantagens de ser rapido, evita arranhar o esfregaço e o tempo exigido para secar é suficientemente curto para evitar que a lamina descure irregularmente como acontece quando se deixa a lamina em posição vertical para escorrer e secar.

RESULTADOS

Coloração

1) *Coloração na fase de fixação* — Essa verificação foi feita, cobrindo no microscópio esfregaços não fixados com corante em solução metilica, que eram imediatamente recobertos com lamínula. Após alguns segundos notava-se que os nucleos ficavam corados em azul violaceo, sem grande intensidade porém com notavel delicadeza de estrutura. Depois coravam-se as hemacias em rosa palido, as plaquetas com o cromomero em violaceo, e, finalmente, as granulações e o citoplasma dos leucocitos. Essa coloração atingia o maximo no fim de 1 minuto ou pouco mais.

2) *Diluição do corante sobre o esfregaço* — Dois lotes de laminas foram tratados das seguintes maneiras:

a) Os esfregaços foram fixados com metanol durante 1 minuto, depois de secados foram corados durante 10 minutos com uma diluição feita no momento num provete, de 1 ml de corante com 2 ml de agua distilada.

b) Os esfregaços foram fixados cobrindo com 1 ml de corante, depois de 1 minuto juntou-se 2 ml de agua distilada e depois de misturado deixou-se corar durante 10 minutos.

As laminas do lote B mostravam nucleos com estrutura mais delicada e detalhes citoplasmaticos mais nitidos.

3) *Volume do corante* — Foram experimentadas diversas quantidades de corante, desde 0.1 até 2.0 ml. A quantidade que recobria bem os esfregaços, era suficientemente para uma boa fixação e cuja evaporação dentro do tempo de fixação escolhido não foi prejudicial à coloração, foi de 0.5 ml.

4) *Tempo de fixação* — Foram fixadas preparações pelo metanol, com tempos que variavam de 1 minuto, desde 1 até 10 minutos. Essas laminas foram depois coradas de igual modo com uma mesma solução aquosa de corante. Foi verificado que estavam todas bem fixadas e coradas igualmente, portanto o tempo de 1 minuto é o melhor, pois o mais curto dos tempos suficientes é o que permite menor evaporação com as variações das condições do ambiente, como a temperatura e ventilação.

Usando esfregaços muito recentes, de alguns minutos apenas, a fixação de 1 minuto falhava às vezes, porém era perfeitamente suficiente si prolongada para 1 1/2 a 2 minutos. Também foi possível corrigir essa falha secando muito bem o esfregaço antes de fixa-lo, agitando muito bem e vigorosamente a lamina ou melhor ainda, submetendo durante alguns minutos à corrente de ar do dessecador.

5) *Segunda fase ou tempo de coloração* — O tempo de coloração dependia principalmente da concentração do corante já que o volume estava determinado.



Em virtude disso achamos preferível escolher a priori um tempo mais comodo que economizasse tempo e não fosse excessivamente curto, de modo que variações moderadas não acarretassem modificações sensíveis da coloração. Esse tempo foi arbitrado em 5 minutos e depois experimentamos diferentes concentrações até achar a melhor.

6) *Volume da agua* — Foram coradas laminas com diferentes volumes de agua, desde 0,5 ml até 2,5ml, com variações de 0,5 ml. Foi observado que 1 ml de agua com 0,5 ml de corante resulta numa quantidade de solução corante que recobre bem a lamina e permite misturar perfeitamente sem transbordar o liquido.

7) *Relação entre volume de corante e agua* — Depois de experimentadas diversas proporções entre corante e agua, a relação de 1:2 foi a que deu coloração mais eficiente dentro do tempo de 5 minutos. Havia uma precipitação de corante muito pequena, evitando-se assim o risco de inutilizar pelo deposito de precipitado de corante, o que se dava quando se aumentava a proporção de agua. Diminuindo-a a coloração era pouco intensa devido à precipitação e dissolução insuficientes das substancias corantes na agua.

8) *Condições da agua distilada* — A agua distilada recente dá muito boas colorações e tem um pH muito proximo da neutralidade. Quando a agua não é recente, em geral com mais de 1 semana e especialmente si ficou exposta ao ar, já não dá boas colorações e o seu pH baixa. Porém essa mesma agua ou mesmo mais velha, submetida á ebulição durante 10 minutos torna a um pH novamente neutro e dá boas colorações.

Pertanto é o contato com o ar que inutiliza a agua para a coloração tornando-a acida. Isso é devido ao CO_2 , esta verificação foi feita borbulhando ar por meio de vacuo, em agua distilada e em solução diluida de hidrato de bario. Com 15 minutos de passagem de ar já havia precipitação de carbonato de bario. Esse mecanismo pode ser verificado nas tabelas 1 e 2, onde está demonstrado como o borbulhamento de ar ou de CO_2 acidificam a agua.

TABELA I

	Tempo minutos	H_2O		Sol. Tampão 1%	
		pH	coloração	pH	coloração
Antes	—	6,95	boa	7,05	boa
Depois de borbulhar o ar .	90'	6,6	sofrivel	7,0	regular
Depois de ferver	5'	6,9	regular	7,1	boa
Depois de ferver	10'	7,0	boa	7,15	boa

Essa acidez devida ao CO_2 é eliminada pela abulição dentro de 10 minutos, isso tambem está demonstrado na mesma tabela. Tambem foi verificado pela ebulição de agua distilada velha ou borbulhada com ar, em que o vapor expellido do balão passava noutro com uma solução de hidrato de bario. Nos primeiros minutos já aparecia um precipitado de carbonato de bario, no fim de 10 minutos foi substituido o balão com bario por outro com solução nova, este segundo balão não mostrou nenhuma passagem de CO_2 nos 10 minutos subseqüentes de fervura a que continuamos a submeter a agua.

O mais pratico é portanto utilizar agua distilada recente e no fim de uma semana substitui-la por outra. Desde que se submeta a agua á ebulição durante 10 minutos antes de po-la em uso, o que é o mais recomendavel, não é necessario usar agua recentemente distilada.

9) *Concentração de sais na solução tampão* — Utilizamos uma mistura de fosfato monopotassico e de fosfato disodico com pH 6,95. Na concentração M/1,5 ou seja 10,76 gr % de sal, a solução tampão demonstrou uma ação impediante sobre a coloração. Numa concentração 10 vezes menor, esse efeito não se faz notar a não ser em grau muito ligeiro. A solução stock diluida á 1% em agua distilada, com a concentração de 0,1076 gr. % deu bons resultados.

O envelhecimento estraga a solução tampão diluida, do mesmo modo que a agua distilada, porém não tão rapidamente. Esses sais não tem ação tampão contra o CO_2 , ou é muito pequena como em geral para todos os acidos organicos fracos. O mecanismo da alteração da solução tampão é o mesmo que o da agua distilada como pode ser observado pelos dados das tabelas 1 e 2.

TABELA II

	Tempo minutos	H_2O		Sol. Tampão 1 %	
		pH	coloração	pH	coloração
Antes	—	6,95	boa	7,05	boa
Depois de borbulhar CO_2 .	5'	4,2	má	5,5	má
Depois de ferver	5'	6,3	má	7,0	regular
Depois de ferver	10'	6,95	regular	7,05	boa

10) *pH* — Usamos soluções tampão com diversos pH, desde 6.0 até 8.0. As melhores colorações para fins usuais de hematologia e citologia clinica foram obtidas com soluções neutras ou quase neutras. Soluções mais alcalinas com pH 7.2 ou 7.4 são mais indicadas para o estudo de parasitas; soluções acidas com pH 6.4 ou menos, para o estudo de granações e modificações citoplasmaticas.

11) *Lavagem* — Coramos laminas com a mesma agua e algumas foram lavadas com agua distilada já velha e acida, outras com agua corrente alcalina, e finalmente outras com a mesma agua que tinha servido para a coloração e que tinha pH 6.95. O primeiro grupo apresentava uma coloração muito avermelhada, o segundo muito azulada e o terceiro estava bem corado.

Frequentemente as laminas são coradas com agua distilada ou solução tampão com todos os requisitos exigíveis, e depois são lavadas ou com agua distilada velha geralmente acida, ou com agua corrente em geral alcalina (num laboratorio na nossa cidade, chega a atingir pH 8,8). No primeiro caso a coloração torna-se avermelhada e muito descorada e no segundo, azulada e menos diferenciada. Isso se dá porque a coloração é fácil e rapidamente influenciada pelas variações do pH. Devido a esse fato é logico que deve ser usada para a lavagem a mesma agua ou solução tampão empregada para a coloração.

Durante a lavagem faz-se a diferenciação da coloração, e quanto mais tempo a lamina permanecer molhada, maior será, podendo ficar muito descorada si for excessivamente demorada.

Conservação

É sabido que as colorações pancromicas são as mais dificeis de ser conservadas, pois têm tendencia a se descorar e são muito influenciadas por emanações acidas de qualquer natureza. Foram experimentados varios metodos depois de retirar todo o oleo de cedro com xilol.

1) *Balsamo do Canadá* — Fechando a preparação com balsamo do Canadá e laminula, mesmo que seja da melhor proveniencia e esteja em boas condições, a coloração é prejudicada e destruida em prazo relativamente curto pela oxidação e consequente acidificação da resina.

2) *Oleo de cedro* — Tem os mesmos inconvenientes do balsamo, apenas as alterações se dão num prazo um pouco mais longo.

3) *Parafina liquida* — Cobre-se simplesmente o esfregaço com uma ligeira camada espalhada com o dedo. Com o tempo a lamina fica praticamente seca e ha tendencia a aglomerar detritos que ficam aderentes ao esfregaço. Ao ser retirada a parafina com xilol os detritos continuam aderentes ou arranham a superficie da preparação ao se tentar tira-los.

4) *Parafina solida* — Funde-se um pouco de parafina solida (ponto de fusão 55°), de boa qualidade, como a usada para inclusões. Pinga-se 2 ou 3 gotas sobre o esfregaço, passa-se a lamina sobre uma chama até que a parafina derreta e espalha-se sobre todo o esfregaço com um bastão de vidro ligeiramente aquecido ou com o dedo. Melhor ainda será deixar espalhar a parafina colocando a lamina numa estufa a 60° (de inclusão). A temperatura de 60° não altera a coloração. Para examinar retira-se a parafina com xilol. Esse processo é um pouco incomodo para reexaminar as laminas.

5) *Alcool polivinilico* — Utilizamos uma solução aquosa a 20%, bem viscosa. Deu pessimos resultados, dissolve o corante descorando rapidamente a lamina.

6) "*Euparal*" — Esse meio de montagem é de fabricação "Grübler". Laminas com ele montadas foram expostas ao ambiente durante 6 anos. Já comunicamos os resultados após um prazo de 21 meses (2). No fim de 6 anos a parte central das preparações ainda conserva-se em boas condições, porém, nos bordos tinha havido oxidação do conservador e destruição da coloração.

7) "*Encê*" (1) — É um meio de montagem semelhante ao "Euparal" (*). Laminas foram montadas e submetidas pelo mesmo tempo às mesmas condições que o "Euparal". Resultados, provisórios também já foram por nós relatados (2). No fim de 6 anos, manteve a coloração em boas condições, apenas nos bordos havia desaparecimento da basofilia do citoplasma dos mononucleares, porém mesmo nessa zona da preparação as outras tonalidades e detalhes estavam bons.

8) *Sem conservador* — No nosso clima as laminas não se conservam muito bem, a duração da coloração em boas condições varia com diversas circunstancias. Precisam ser conservadas em caixas bem fechadas. Porém si consegue-se manter algumas, outras estragam-se perdendo os tons azulados e violetas, o que é de regra nas laminas alteradas com qualquer conservador.

COMENTARIOS

O que foi observado quanto ao que se passa na 1a. fase chamada de fixação, está em desacordo com o conceito classico, de que não ha coloração nessa fase. Consequencia dessa coloração previa é o fato de se obter uma maior delicadeza e detalhe da estrutura quando se usa o corante para a fixação, em lugar de fixar com metanol e corar com solução aquosa de corante. Esse resultado é pro-

(*) O "Encê" é composto de colônia, goma copal, alcool, canjora, terebentina e eucaliptol. Agradecemos ao Prof. J. Lane que nos cedeu o "Encê" que havia sido preparado pelo próprio autor desse meio de montagem.

vavelmente devido a que o corante em solução metilica impregna as células enquanto coagula as proteínas, desse modo a penetração é mais rápida e perfeita. Depois, na 2a. fase, a água dissolvendo e precipitando as substâncias corantes na intimidade da estrutura celular, daria como consequência a diferença notada entre os dois métodos de coloração.

Está de acordo com essa nossa observação a justificativa dada por Schiling (6) para o emprego do Giemsa rápido. Afirma que o Giemsa usado desse modo (diluído com metanol), cora as granulações, estrutura nuclear, plaquetas, etc., melhor do que pelo método clássico. Beck (5) já indicou o uso da solução de Giemsa diluído com metanol em proporções iguais à que aconselhamos.

Todos os corantes pancromicos á base de eosinato de azul de metileno, como o Leishman, Wright, Giemsa, a mistura por nós proposta (3), etc., podem ser usados segundo verificamos, de duas maneiras:

Soluções glicerinadas tipo Giemsa — Soluções desse tipo são usadas com as técnicas clássicas na coloração em cubas, para cortes histológicos ou para a coloração simultânea de muitos esfregaços, ou ainda para gotas espessas.

Soluções metilicas para coloração rápida — Os corantes preparados desta maneira podem ser utilizados com a técnica que recomendamos, que nos parece a mais prática e é baseada nos resultados relatados.

No derroter de preparações do azul de metileno, de eosinatos de azul de metileno, das combinações e soluções dos corantes, tivemos ocasião de verificar que no que se refere á qualidade das anilinas e solventes e técnica de preparo das soluções ha muitos conceitos que não são validos, transmitidos pelos livros e não baseados na prática ou em experimentação. Quase todos os que se referem a esses detalhes insistem sobre a necessidade do emprego de anilinas desta ou daquela afamada marca. Já relatamos (3) que os resultados na preparação das substâncias corantes independem das marcas de anilinas usadas.

O metanol sintético para uso industrial nos deu resultados tão bons quanto os "pro analyse". Parece-nos que a recomendação insistente de muitos autores sobre a necessidade de empregar metanol purissimo de Merck ou similares, é devido aos conselhos de outras épocas, quando o metanol não era sintético e sim proveniente da destilação da madeira, podia então conter frequentemente impurezas que prejudicavam. Atualmente com o uso quase exclusivo de metanol sintético não é mais preciso escolher com tanto cuidado. O metanol quando absolutamente incolor sempre nos deu bons resultados. Mesmo usando metanol ligeiramente ácido ao tornesol não houve modificação do corante. Por precaução neutralizamos, varias vezes com carbonato de calcio em pó, e depois, de preferencia, pondo fragmentos de marmore bem lavado e seco, que eram conservados dentro do metanol. Essa neutralização é feita depois de alguns dias ou semanas e não nos parece indispensavel.



Quanto ao preparo das soluções de corantes, inclusive do Giemsa, não apresenta dificuldades, desde que se use vasilhame bem vedado e seco, glicerina branca $d=1.26$ que não tenha sido exposta ao ar, e metanol incolor. O que é preciso é nunca deixar esses corantes em vidros abertos ou mal arrolhados pois que absorvem humidade o que os prejudica, também é necessário não introduzir no corante pipetas húmidas ou sujas.

A maioria das recomendações do uso de soluções tampão, ou de adição de alcalinizantes á agua destilada, têm a finalidade de corrigir alcalinizando uma agua inicialmente não apropriada para a coloração. Já demonstramos que a ebulição por 10 minutos torna aproveitavel a agua destilada, o que é mais vantajoso do que o uso de solução tampão ou de alcalinizantes.

As soluções tampão usualmente recomendadas assim como a agua destilada adicionada de carbonato de sodio não apresentam vantagens sobre a agua destilada quanto á conservação. Todas elas estragam-se da mesma maneira quando expostas ao contato do ar devido ao gaz carbonico que as acidifica e, os corantes pancromicos são sensiveis ao acido carbonico.

Si bem que os corantes pancromicos para dar o maximo de resultado exijam um pH 7.0 ou muito proximo, pois são corantes neutros e como tais muito sensiveis a acidos e alcalis, ás vezes para fins especiais necessita-se corar com um pH acido ou alcalino. Nesses casos é conveniente que se empreguem soluções tampão para regularidade e melhor reprodução das colorações, é então aconselhavel usar misturas de fosfatos de sodio e potassio, observando concentrações de sal dentro dos limites que referimos ao tratar do assunto. A solução tampão aconselhada por Lacorte (4) tem um pH 7.4 que é o mais conveniente para a coloração de parasitos.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos chegamos á conclusão que é mais aconselhavel o uso de corantes em solução metilica que devem ser utilizados para a fixação e, a diluição do corante deve ser feita sobre o esfregaço. O uso de solução tampão ou agua alcalinizada é desnecessario a não ser para fins especiais, a agua destilada recente ou recentemente fervida durante 10 minutos, dentro de prazo de 1 semana dá boas colorações para o uso corrente.

Método de coloração

A tecnica de coloração rapida que parece ser a mais pratica e pode ser usada com todos os corantes em solução metilica é a seguinte:

- 1) Cobrir o esfregaço com 0.5 ml. de corante. Deixar 1 a 2 minutos.



2) Juntar ás gotas. 1 ml. de agua. misturar bem. deixar 5 a 7 minutos. Para hematozoários, outros parasitos ou laminas muito ricas em células nucleadas (leucemias, medula ossea. etc.), deixar corando mais tempo. cerca de 10 minutos.

3) Não despejar o corante. Lavar com um jato de agua. da mesma que foi utilizada para a coloração, escorrer e secar rapidamente em papel de filtro, mata-borrão ou secador de ar quente.

Dados praticos sobre colorações

Modo de misturar o corante — Um bom metodo para misturar o corante com a agua, no momento da diluição, é o seguinte: toma-se um bastão de vidro que se coloca paralelamente sobre a lamina e toca-se a superficie do liquido, com o liquido aderido ao bastão por capilaridade (fig. 1), agita-se varias vezes de um lado para o outro (fig 2), destacando o bastão da superficie. Repete-se essa manobra cerca de 5 vezes consecutivas. O bastão não precisa ser lavado, desde que usado só para esse fim.



FIG. 1



FIG. 2

Lavagem da lamina — A agua distilada ou a solução tampão para a lavagem deve de preferencia ficar num frasco ou balão lavador de cerca de 500 ml, (fig. 3). Lavar despejando um jato firme que se vai fazendo correr sobre toda a superficie da lamina rapidamente. Para isto gasta-se cerca de 20 ml. de agua. Deste modo evita-se o deposito de precipitados sobre o esfregaço. A lavagem ao mesmo tempo diferencia a lamina e é um dos tempos mais delicados de uma boa coloração. Deve em geral durar cerca de 10 segundos.



FIG. 3

Diferenciação — Caso a diferenciação não tenha sido suficiente, o que se reconhece pelo tom carregado das hemácias, limpar o oleo de cedro e tornar a diferenciar recobrando com a agua distilada ou solução tampão, deixando cerca de 20 a 30 segundos.

Medição do corante e da agua para coloração — Sendo os corantes pancromicos muito delicados, alterando-se facilmente com acidos, alcalis, humidade, exposição ao ar, etc., é conveniente não mergulhar pipetas sujas ou humidas no vidro de corante. A fim de evitar esses riscos é aconselhavel o seguinte metodo que nos têm dado bons resultados ha cerca de uma dezena de anos:

Guardar o corante e a agua ou solução tampão para diluição, em frascos contagotas de vidro de boa qualidade. Para o corante, contar o numero de gotas necessarias para encher 5 cm³ de um pequeno provete de 5 ou 10 cm³ bem graduado. Dividindo-se por 10 obtem-se o numero de gotas que corresponde a 0,5 ml de corante, numero esse que é marcado definitivamente no rotulo do vidro. Vidro contagotas com rolha pipeta facilita ainda mais o trabalho por evitar a contagem de gotas de cada vez. Para esses procede-se do seguinte modo: retira-se o bulbo de borracha, fecha-se a extremidade inferior com o dedo e pelo orificio superior, com uma pipeta fina põe-se 0,5 ml de metanol ou alcool, que facilitam a operação. Marca-se o nivel de liquido com um diamante e depois aprofunda-se bem a marca para que fique bem visivel. Desse modo de cada vez que se vai corar com o vidro contagotas basta despejar o numero exato de gotas ou, com o segundo vidro, encher a pipeta, esvasia-la no vidro até a marca e, depois, despejar a quantidade medida sobre a lamina a corar. Procede-se da mesma maneira para a agua empregada na diluição.

Correção de erros de coloração — Laminas hipercoloradas — Diferenciar como foi explicado anteriormente. Quando se quizer verificar melhor a policromasia, pontilhado basofilo ou outras modificações das hemácias, proceder do mesmo modo.

Laminas hipocoradas — Si possivel, corar outro esfregaço, sinão, cobrir com metanol, deixar 1/2 minuto, despejar e repetir. Secar a lamina. Corar novamente desde o primeiro tempo.

Laminas precipitadas — Proceder do mesmo modo que no caso anterior.

Idade dos esfregaços — Os esfregaços não corados devem ser guardados não fixados. Até 2 ou 3 dias dão colorações muito boas, porém no mesmo dia obtem-se resultados melhores. Quanto mais velhos peor será a coloração, chegando a não se corar quando muito velhos.

Conservação de laminas coradas — Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é retirar bem o oleo de cedro logo depois de examinar e guardar o mais possivel abrigado do ar e de emanações acidas ou alcalinas, o que se pode fazer em caixas ou gavetas bem fechadas.



Caso se queira fazer demonstrações repetidas é preferível montar com "Ene-cê" e laminula. Para tentar conservar por prazos muito longos pode ser usada a parafina solida.

RESUMO

Foram estudados varios fatores que têm influencia nas colorações pancromicas, na preparação de soluções corantes e na conservação das laminas coradas. Foram obtidas as seguintes conclusões:

Todos os corantes pancromicos usuais podem ser usados em soluções glicerinadas tipo Giemsa ou soluções metilicas. O seu preparo é facil e ao alcance de qualquer laboratorio.

Os corantes em solução metilica, na 1a. fase, chamada de fixação, não agem somente fixando, na realidade nessa fase inicia-se a coloração.

Diluindo o corante sobre a lamina obtem-se uma coloração com estrutura nuclear e citoplasmatica mais fina e delicada do que fixando previamente os esfregaços com metanol e corando com corante diluido aparte. Os corantes metilicos são os mais aconselháveis.

O volume de corante mais conveniente para a fixação e coloração de um esfregaço é de 0.5 ml.

O melhor tempo para a primeira fase, chamada de fixação, é de 1 minuto, e de 2 minutos para laminas muito recentes.

O melhor volume de agua que recobre bem a lamina e permite uma boa mistura é de 1.0 ml.

A melhor relação entre volume de corante metilico e de agua é de 1/2.

A agua destilada recente ou recentemente fervida, dentro do prazo de 1 semana, dá boa coloração, não sendo necessario usar soluções tampão, agua alcalinizada com carbonato de sodio ou outros meios. Somente são necessarias soluções tampão para fins especiais.

A concentração de sais nas soluções tampão tem importância na coloração e devem ser de preferencia menor do que 1%.

A lamina deve ser lavada com a mesma agua ou solução tampão utilizada na coloração.

Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é guardar o esfregaço bem limpo, sem oleo de cedro, em caixas ao abrigo do ar e de emanações acidas ou alcalinas. Caso necessario pode ser usada a parafina solida ou o "Ene-cê".

ABSTRACT

Various factors which influence panchromatic staining were studied in the preparations of stains solutions and in the conservations of stained smears. The following conclusions were reached:

All common panchromatic stains may be used in solutions with glycerine of the Giemsa type, or in methylic solutions. Their preparation is simple and within the reach of any laboratory.

The stains, when used in a methylic solution in the first stage, which is called fixation, do not act by fixing exclusively, but in reality staining begins during this phase.

By diluting the stain on the smear, a finer and more delicate nuclear and cytoplasmatic structure is obtained than when methanol was used previously to fix the smear, and after were colored with stain diluted separately. The methylic stains are the most advisable.

The most convenient volume of the stain, to be used for fixation and coloration of a smear is 0.5 ml.

The best time for the first phase (fixation) is 1 minute, and 2 minutes for very recent smears.

The best volume of water to be employed for dilution over the slide and which permits a good mixture, is 1.0 ml.

The best relation between the volume of methylic stain and water is 1/2.

Water, recently distilled or recently boiled, within a period of 1 week, gives a good stain. It is not necessary to use buffer solutions, water alkalisied with soda carbonate or other means. Buffer are necessary only for special purposes.

The concentration of salts in buffer solutions are important in staining and should preferably be less than 1%.

The smear should be washed with the same water or buffer solution used in staining.

For the conservation of slides it is advisable to keep the stained smear very clean, without cedar oil, in air-proof boxes to avoid acid or alkaline emanations. If necessary, solid paraffin or "Eneçê" may be used.

BIBLIOGRAFIA

1. *Cerqueira, M. L.* — Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâminas, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 39:37, 1943.
2. *Rosenfeld, G.* — Nota sobre a experiência de conservação de lâminas de sangue com Eneçê, *Rev. Paul. de Med.*, 23:43, 1944.



3. *Rosenfeld, G.* — Corante pancromico para hematologia e citologia clinica; nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido, *Mem. Inst. Butantan*, 20:329, 1947.
4. *Lacorte, J. G.* — Influência do pH sobre as colorações do Giemsa, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Suplemento 1:9, 1928.
5. *Beck, R. G.* — Laboratory manual of hematologic technic, Philadelphia, Saunder Co., 1938, pp. 145.
6. *Schilling, V.* — El cuadro hematico y su interpretacion clinica, ed. 3, trad. da ed. 10 alemã, Barcelona, Editorial Labor., 1936, pp. 18-19.

CORANTE PANCROMICO PARA HEMATOLOGIA E CITOLOGIA CLINICA. NOVA COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DO MAY-GRÜNWARD E DO GIEMSA NUM SÓ CORANTE DE EMPREGO RAPIDO

POR G. ROSENFELD

(Do Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

A preferência pelos corantes de Wright e Leishman é devida a simplicidade de sua tecnica e pouco tempo exigido na coloração, apesar de seus resultados serem reconhecidamente inferiores aos da coloração combinada de May-Grünwald e Giemsa ou metodo de Pappenheim; que segundo a opinião da maioria dos hematologistas é o mais rico em detalhes.

Apesar de vantagens incontestaveis o metodo de Pappenheim não é o mais usado nem o mais recomendavel devido a sua tecnica um pouco complicada e muito demorada para um trabalho massiço de rotina. Exige atenção pois são necessarias diversas manipulações, e variações destas têm como consequencia irregularidade nos resultados. O Giemsa isolado é de tecnica mais simples, porém exige um tempo relativamente demorado e seus resultados são inferiores aos do metodo de Pappenheim. A evidencia desses inconvenientes é demonstrada pela tendencia a utilizar cada vez mais o Wright e o Leishman, e também pelas tentativas de simplificar o Pappenheim.

Varios autores já indicaram simplificações afim de diminuir as manipulações da tecnica e encurtar o tempo. Nazim (2) em 1920 propôz uma mistura de 2 partes de solução de May-Grünwald e 1 de solução de Giemsa, o esfregado é fixado cobrindo com o corante durante 1 minuto e corado, juntando igual volume de agua que se deixa permancecer durante 1 a 2 minutos. Não obtivemos bons resultados com esse metodo. A concentração que esse autor indica para a solução de May-Grünwald é de 1%, portanto 4 vezes maior do que a usual, usando esse corante com a concentração normal, 0,25%, obtivemos resultados melhores porém chegamos á conclusão que esse metodo tem o grave inconveniente de usar tempo demasiadamente curto o que ocasiona variações muito grande nas colorações. Strumia (4) em 1936 recomenda uma mistura de Giemsa e May-Grünwald em pó, dissolvidos segundo tecnica especial em glicerina, metanol e acetona. O corante corresponde mais ou menos a uma proporção final de 170 ml. de solução

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.



de Giemsa, mais 60 ml. da solução de May-Grünwald, com 460 ml. de acetona e 310 ml. de metanol. Cora usando 1 ml. do corante que fixa durante 2 minutos, e juntando depois 1 ml. de agua alcalinizada que permanece 3 minutos. O corante conserva-se durante 18 meses.

Como os melhores resultados para verificação de detalhes morfológicos de importancia no trabalho corrente, segundo o consenso quase unanime é dado pela coloração combinada do May-Grünwald e Giemsa, foi estudada uma combinação desses corantes que permitisse uma coloração com essas vantagens associadas a um metodo de coloração facil e rapido. Noutro trabalho (3) foram determinados os requisitos ideais que deve apresentar o metodo de coloração para esfregaços de sangue. O corante foi preparado após numerosas tentativas, até que se encontraram concentrações e proporções otimas, para ser utilizado dentro das condições do metodo deduzido como o melhor no trabalho citado.

MATERIAL E METODOS

Na preparação dos corantes usamos azul de metileno para uso medicinal, eosina amarelada (tetrabromo-fluoresceina sodica), eosina azulada (dibromodinitro-fluoresceina sodica) e metanol sintetico. Empregamos essas substancias de diversas procedencias, com bons resultados.

O azul de metileno, azul A de Kehrmann, foi preparado pelo metodo de Mac Neal utilizado por Meyer (1).

As colorações foram sempre feitas em esfregaços usuais não fixados, de sangue humano, do dia ou no maximo do dia anterior.

O metodo de coloração empregado foi o recomendado em outro trabalho (3) e deve se submeter ás seguintes condições:

1) A fixação do esfregaço deve ser feita pelo proprio corante que deve estar em solução metilica. Essa fixação deve durar 1 minuto usualmente e 2 minutos para esfregaços muito recentes (alguns minutos depois de preparado).

2) O volume de corante a empregar nessa primeira fase deve ser de 0.5 ml.

3) O segundo tempo deve ser feito com agua destilada previamente fervida durante 10 minutos e utilizada até 1 semana depois. Pode ser empregada uma solução tampão diluida, com pH bem proximo da neutralidade. Esse segundo tempo deve durar 5 minutos ou um pouco mais. Para hematozoários, outros parasitos ou laminas muito ricas em celulas: medula, ganglio, leucemia, etc., deve-se prolongar o tempo para 10 minutos. Para laminas muito pobres em celulas: anemias muito intensas, agranulocitose, etc., a duração deve ser reduzida para cerca de 3 minutos. De um modo geral esses tempos não precisam ser ne-

cessariamente observados com rigor, pequenas flutuações não têm grande influencia.

4) No segundo tempo o volume do diluente a empregar deve ser de 1.0 ml ou seja, o dobro do volume do corante.

5) A lavagem da lamina deve ser feita com agua distilada ou solução tampão, porém a mesma que se usou para a coloração. Despeja-se um jato franco primeiramente num dos extremos e depois passa-se pelo resto da lamina. Toma-se a lamina por um dos extremos, despeja-se o liquido e imediatamente enxuga-se em papel de filtro ou de preferência, si o volume de trabalho justificar, emprega-se a corrente de ar quente de um dessecador de cabelo, instalado sob a mesa, com a abertura voltada para cima justaposta a um orificio feito na mesa. Quanto mais tempo a lamina permanecer molhada nessa fase de lavagem mais descorada ficará.

RESULTADOS

Dentro dos detalhes da tecnica previamente fixada e das condições exigidas, partindo de dados arbitrarios fomos variando a concentração de componente por componente, enquanto os outros eram mantidos fixos. Chegamos, após mais de uma centena de tentativas, ás seguintes proporções que nos deram as melhores colorações:

Formula A

Azur A	0,342	gr
Eosina amarelada	0,342	gr
Azul de metileno	0,286	gr
Eosinato de azul de metileno	0,530	gr
Metanol q. s.	1.000,0	ml

O mesmo corante pode ser obtido utilizando Giemsa e May-Grünwald em pó, nas seguintes proporções:

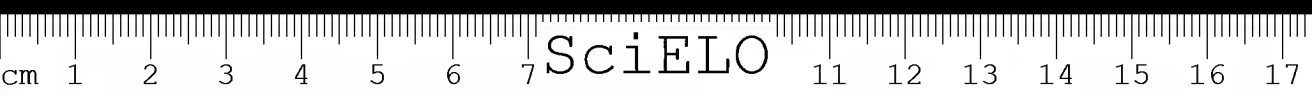
Formula B

Giemsa em pó	0,97	gr
May-Grünwald em pó	0,53	gr
Metanol	1.000,0	ml

Tambem podem ser utilizadas soluções de Giemsa e de May-Grünwald para chegar ao mesmo corante:

Formula C

Giemsa em solução	125	ml
May-Grünwald em solução	215	ml
Metanol	660	ml



O corante em pó era preparado misturando os corantes das formulas A ou B, e juntando cerca de 200 ml de metanol para 10 gr de corante; assim de dissolver depois de evaporado era triturado.

Para fazer a solução metilica usual o corante em pó era dissolvido na proporção de 0,15 g % em metanol. Agitava-se diversas vezes enquanto se conservava ao ambiente em vidro bem arrolhado durante 24 horas. Filtrava-se e o corante ficava pronto para usar. Essa solução metilica tambem pode ser preparada a partir da solução glicerinada, diluindo 1 parte desta ultima com 4 partes de metanol.

A solução glicerinada tipo Giemsa para coloração pelas tecnicas classicas, de cortes histologicos ou de muitas laminas simultaneamente em cubas, é preparada da seguinte maneira: 0,75 g % de corante numa mistura em partes iguais de metanol e glicerina pura com $d = 1,26$. Agita-se diversas vezes enquanto se conserva 2 a 6 horas a 60°, ou cerca de 12 horas a 37°. Cerca de 24 horas depois filtra-se e está pronta para usar.

O corante em pó e as soluções guardadas bem fechadas conservaram-se bem até cerca de 8 anos, periodo em que tivemos ocasião de observar. Temos usado continuamente o corante durante todo esse tempo com muito bons resultados, para esfregaços de sangue, medula, baço, ganglio, tumores, pús, sedimentos de derrames e todo o genero de exames citologicos clinicos.

COMENTARIOS

O corante obtido reúne todos os componentes do Giemsa e do May-Grünwald dando quase os mesmos resultados e os mesmos valores que os obtidos com o metodo de coloração combinada desses dois corantes, ou metodo de Pappenheim. As principais vantagens que apresenta são: exigir pouco tempo de coloração, tecnica muito simplificada e resultados muito regulares mesmo em mãos inexperientes, desde que sejam seguidas á risca todas as indicações.

A diferença que apresenta na coloração em relação ao metodo de Pappenheim é que as celulas mostram uma estrutura nuclear e citoplasmatica muito mais fina e delicada, o que tem muito valor para avaliar o estadio de maturação da celula e para o diagnostico diferencial de celulas patológicas o que é de grande importancia em certos diagnosticos, como na mononucleose, leucemias agudas, etc. Essa vantagem é principalmente devida a que as substancias corantes em lugar de agir sob a forma de solução aquosa em celulas já fixadas, agem já na primeira fase, a de fixação, enquanto ainda em solução metilica, o que como já demonstramos (3), apresenta grandes vantagens.

A unica inferioridade do metodo dentro do tempo e metodo padrão, é no que se refere á coloração de hematozoarios. Os *P. vivax*, *falciparum* e *malariae* em todos os estadios evolutivos ficam corados e perfeitamente diagnosticaveis, o

mesmo pode-se dizer quanto á demonstração dos pigmentos, porém a coloração não atinge a intensidade dada por outros corantes como o Giemsa, o Leishman e o Wright. Para que nesses casos se obtenha coloração igual, é preciso prolongar o tempo de coloração para 10 minutos, tempo mais recomendavel para todos os parasitos. Para esse fim também é mais indicado o emprego de solução tampão pH 7.2 ou 7.4 o que aliás se estende ao uso de todos os corantes desse genero.

Na preparação dos corantes usamos anilinas de muitas proveniências, tanto de marcas alemãs como americanas, umas para fins de laboratorio, outras para uso farmaceutico e eosina amarelada para uso industrial. Os resultados foram sempre bons, as pequenas variações encontradas entre uma partida e outra resultavam sempre da preparação do azur de metileno ou do eosinato de azul de metileno, que apresenta quase sempre pequenas variações de partida para partida, porém de uma intensidade que não altera os resultados praticos. Os resultados obtidos com eosina amarelada e eosina azulada foram identicos, e não ha vantagem em empregar esta ultima, em geral mais difficil de ser obtida do que a primeira.

RESUMO

É apresentada uma nova combinação corante pancromica com os componentes do May-Grünwald e Giemsa, para esfregaços de sangue, exames citologicos clinicos e cortes histologicos. Ao lado, sobre as colorações de Wright e Leishman apresenta as qualidades da coloração combinada de May-Grünwald e do Giemsa, ou metodo de Pappenheim, e sobre este ultimo tem vantagens. O seu metodo de emprego é mais rapido e simples e mostra uma estrutura nuclear e citoplasmatica mais delicada. É de facil preparo e durante anos não foi observada nenhuma alteração das suas propriedades.

ABSTRACT

A new pancromic stain made with the components of May-Grünwald and Giemsa, is presented for staining blood smears, histological slides and smears for clinical cytologic examinations. When compared with the Wright and Leishman stains, it has the qualities of the Pappenheim method (May-Grunwald and Giemsa combined staining), and has over the later many advantages. Its application is more rapid and simpler to used, and it shows a more delicate nuclear and cytoplasmatic structure. It is easily prepared and no alteration of its properties was observed during a period of many years.



BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, J. P. — Noções práticas sobre a preparação e emprego de um corante semelhante à mistura de Giemsa (Azul-Azul-Eosina), *Arch. Instituto Biológico*, 6:97, 1935.
2. Nazim, E. — Modification de la methode de Pappenheim, *Presse Medicale*, n. 23: 424, 1920.
3. Rosenfeld, G. — Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores, *Mem. Inst. Butantan*, 20: 315, 1947.
4. Strumia, M. — A rapid universal blood stain; May-Grüwald Giemsa in one solution, *Jour. Lab. & Clin. Med.*, 21: 930, 1936.



PESQUISAS DE CITOLOGIA QUANTITATIVA. V: ESTUDO CARIO- MÉTRICO DAS CÉLULAS FOLICULARES E LUTEÍNICAS

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

(Do Laboratório de Citogenética, do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

a) Plano de Trabalho

Em prosseguimento às pesquisas cariométricas sobre tecidos em ativa reprodução e, com o intuito de investigar o crescimento nuclear durante a interfase iniciadas por um de nós (Schreiber), foi estudado o volume do núcleo das células da granulosa do folículo de Graaf nas suas diferentes fases evolutivas desde o estádio do folículo primordial até a rutura e sua transformação em célula lutea.

Estas pesquisas fazem parte das que vem sendo executadas neste laboratório há alguns anos, utilizando-se para o estudo da interfase as modificações induzidas num determinado tecido por fatores fisiológicos específicos, quando estas modificações atuam por meio da multiplicação dos elementos específicos do tecido.

O estudo do ciclo fisiológico de um órgão em consequência da ação de diferentes hormônios ou de diferentes limiares de concentração de um mesmo hormônio, a sua colocação em repouso consequente da ablação do órgão endócrino correspondente, como também, a substituição em doses maciças administradas do mesmo hormônio nestes animais privados da glândula, constituem os meios que o citologista pode utilizar para obter as células nas diferentes condições reprodutivas.

Como foi demonstrado nas pesquisas precedentes, as células uterinas respondem a estimulação hormonal com fenômenos de proliferação e de paradas desta proliferação, que podem ser controladas pelo pesquisador conforme as condições fisiológicas experimentalmente alteradas. Com estas pesquisas foi possível demonstrar que o crescimento "ritmico" dos núcleos é uma manifestação do crescimento interfásico, como também estabelecer os limites quantitativos do crescimento interfásico dos núcleos.

Recebido para publicação em 10-11-1947.

(*) Da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo.

(**) Do Instituto Butantan (Laboratório de Citogenética).



Os intensos fenômenos multiplicativos das células granulosas e o aumento do tamanho das células luteínicas na sua origem e durante o crescimento do corpo amarelo na prenhez, nos induziram a tentar a aplicação das pesquisas cariométricas neste material, esperando também trazer uma contribuição ao problema da origem de célula lutea (*).

b) *O problema da formação do corpo amarelo.*

A formação do corpo luteo é assunto ainda não perfeitamente estabelecido, porquanto, segundo a opinião de um grupo de autores (4, 5, 9 e outros), essa glândula deriva das células da granulosa e, segundo outros (4) das células da teca interna.

Pelas recentes pesquisas, parece porém, não haver dúvida de que o corpo amarelo deriva pela maior parte das células da granulosa, através da hipertrofia dessas células.

Experimentalmente, com a utilização do método da colchicina, numerosos autores, entre os quais Allen (1) e Hoffman (8), encontraram diversas mitoses nas células da granulosa principalmente no período pré-ovulatório e, mesmo após a ruptura do folículo, dando a impressão de existir grande hiperplasia durante a formação do corpo amarelo. Porém, Schmidt (18) refere que a proliferação endotelial é a maior responsável pelas mitoses encontradas durante a formação do corpo luteo e, a grande maioria dos autores (1, 11, 10 e outros), afirmam que além das células luteas derivarem das células da granulosa, o aumento do corpo amarelo é consequente à hipertrofia celular.

Por conseguinte, parece estar demonstrado que sob a ação do hormônio hipofisário luteinizante, as células da granulosa se transformam em luteas e, que provavelmente as células foliculares que ainda entram em mitoses sejam aquelas que ainda estão sob a ação do hormônio gonado-estimulante folicular. Existiria portanto, uma verdadeira transformação celular tanto sob o aspecto morfológico como fisiológico. Assim, as células da granulosa que segundo vários autores secretam estrogênios, após essa transformação começam também a secretar outro hormônio, a progesterona.

Achamos interessante relatar detalhadamente esta situação do problema da origem das células luteas, pois as relações quantitativas entre os volumes nucleares das células luteas e as da granulosa nos indicam uma provável relação de origem entre estas duas categorias de células. A demonstração certa desta relação nos seria fornecida pelo estudo comparativo das células da teca, isto é, células de

(*) Devemos aqui assinalar o trabalho de E. Hintsche (Monatschr. Geburtsh. u. Gynaek. 120:200, 1945) sobre o tamanho nuclear das células foliculares e luteínicas humanas, que não nos foi possível consultar até esta data. Pesquisas atualmente em curso por um de nós (Salvatore) sobre o mesmo assunto parecem revelar que os mesmos fenômenos encontrados na rata se verificam também na mulher.



aspecto luteínico que se encontram no conjuntivo da teca interna do folículo de Graf. e que como relatamos acima, alguns autores consideram, ao menos em parte, como as células progenitoras das células luteas.

O estudo destas células apresenta maiores dificuldades do que o das outras categorias de células ovarianas, pela relativa raridade pelo menos na rata. Apesar do interesse embriológico e endocrinológico deste estudo comparativo, no presente trabalho deixamos de lado este problema que será relatado em trabalho sucessivo. Da mesma forma, deixamos para outro trabalho o problema do volume nuclear das células intersticiais que num ensaio preliminar revelou fenômenos interessantes de variações cíclicas que merecem uma apresentação mais detalhada.

MATERIAL E MÉTODOS

a) *Material*

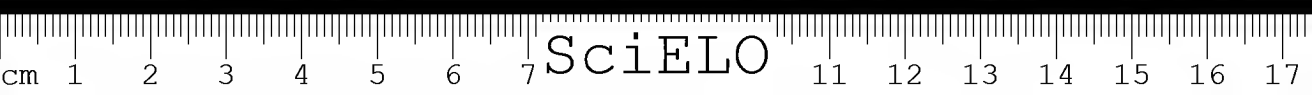
Foram estudados os ovários de ratas da raça Wistar criadas no Instituto Butantan que foram contemporaneamente utilizadas para as pesquisas cariométricas dos tecidos uterinos (13). Em total foram estudados 14 casos (Tabela 1) nas diferentes fases fisiológicas que agrupamos da seguinte forma:

- 1) Folículos primordiais: dois grupos pertencentes a ovários diferentes.
- 2) Folículos em pleno desenvolvimento.
- 3) Folículos em transformação lutea.
- 4) Corpos amarelos transitórios.
- 5) Corpos amarelos gravídicos.

b) *Métodos*

Os ovários foram colhidos sempre com narcose pelo eter e fixados em Bouin alcoólico (Duboscq-Brasil) preparados em parafina e corados em Hematoxilina de Harris ou Heidenhain e eosina em cortes de 10 microns.

As medidas foram executadas com os mesmos princípios usados nos trabalhos precedentes (17,13), os quais resumimos brevemente. O núcleo (100-300) desenhado com a câmara lúcida a uma ampliação de 1890 diâmetros são medidos no desenho com um papel milimetrado transparente. Os núcleos são considerados esféricos o que em realidade se dá no corpo amarelo, ao passo que os núcleos da granulosa são frequentemente elipsoidicos. Pelo fato de não serem absolu-



tamente orientados, a medição deve ser feita como esfera de diâmetro médio entre os dois diâmetros (maior e menor) do núcleo desenhado.

Agrupados os valores em classes de 0,5mm foram construídos os histogramas das frequências e calculados os valores modais, com (1) Arkin e Colton (2) e o valor modal dos diâmetros transformado em volume da esfera correspondente ($V = d^3 : 1,91$). A Tabela 1 indica juntamente com os valores das frequências dos diâmetros, também os valores modais dos volumes calculados.

O critério teórico que preside a escolha deste procedimento já foi discutido minuciosamente nos trabalhos antecedentes. Lembramos somente que numa massa homogênea de núcleos em ativo crescimento interfásico, os núcleos que apresentam uma diminuta velocidade deste crescimento ou uma parada, aparecem no estudo cariométrico-estatístico como classes de máxima frequência. Portanto, os volumes modais representam os volumes nucleares nos quais os núcleos param depois de acabado um período de crescimento. Este tipo de crescimento com diferentes velocidades alternadas com paradas é chamado "crescimento rítmico" ou "periódico" e, a sua significação causal já foi discutida nos trabalhos citados.

Nos folículos onde se encontram mitoses, foi calculado o *index mitotico* ou seja o número de mitoses em 100 núcleos medidos. Este valor também está na Tabela 1.

Nos folículos em que as mitoses aparecem com maior frequência, foi possível também medir algumas profases. O volume deste estágio do ciclo nuclear foi por nós considerado em trabalhos anteriores com particular atenção, pois constitui uma etapa fixa do ciclo nuclear e praticamente delimita o fim de um ciclo de crescimento interfásico e contemporaneamente permite deduzir a natureza interfásica das variações volumétricas cíclicas observadas.

Com os dados da Tabela 1, foram construídos os histogramas da Fig. 1.

Com os valores modais foi construído o gráfico da Fig. 2 que indica claramente as relações quantitativas entre estes valores.

A pesar de que o exame de cada histograma isolado poderia sugerir dúvidas em sentido puramente estatístico sobre a realidade das modas que nelas aparecem, o exame comparativo do conjunto de todos os histogramas revela uma perfeita correspondência entre estes valores modais nos diferentes casos estudados e, como será evidenciado mais adiante, às vezes uma moda que é secundária num estágio, torna-se moda principal num outro estágio, evidenciando assim a realidade biológica deste valor consequente ao tipo de crescimento rítmico do material estudado.

RESULTADOS

a) *Foliculos primordiais* (Prot. 1 e 8):

Designamos como *foliculos primordiais* e revestimento de uma só camada de células foliculares ao redor do ovócito. Como cada foliculo é composto de um número reduzido de células, reunimos os dados das medidas de mais ou menos uma dezena de foliculos primordiais dos ovários pertencentes a um mesmo animal.

Os dois animais sobre os quais as medidas foram feitas estavam ambos em diestro. Os histogramas possuem um único máximo ao valor da classe de diâmetro 11 — 11.5. Num caso existe uma ligeira tendência a uma moda na classe 13. Em nenhum caso foi encontrado mitoses. Estes dados são representados na Fig. 1.

b) *Foliculo em desenvolvimento* (Prot. 4, 7, 13a e 13b):

O foliculo em fase de desenvolvimento representa um tecido homogêneo em grande atividade mitótica e fornece um campo de pesquisa de grande interesse. Os histogramas (Fig. 1) ilustram o quadro cariométrico desta fase que provem de dois animais respectivamente em proestro (n. 7) e estro (n. 13b). De cada foliculo foram medidos aproximadamente 200 núcleos. Todos apresentam três distintos valores modais respectivamente nas classes de diâmetro de vol. modais aproximados: 11 — 12.5 — 14 (vol. 700, 1050, 1400). Em dois casos (n. 13a-b) aparece um valor modal ao diâmetro 10. Não podemos dar a este valor modal uma significação precisa por ser somente ligeiramente acentuada e não na totalidade dos casos estudados. Não podemos excluir que estes núcleos pequenos sejam telofásicos, porém, numa pesquisa que será objeto de um trabalho sucessivo sobre as células intersticiais do ovário, encontramos este valor modal na classe 10 como moda principal desta categoria de células.

Nos foliculos em desenvolvimento se encontram numerosas mitoses. As profases medidas isoladamente tem um valor modal na classe 14 (vol. 1400), isto é, coincide perfeitamente com o terceiro valor modal dos núcleos interfásicos.

A frequência das mitoses, nestes foliculos, por nós encontrada é mais ou menos de 6 a 10%, algarismo este que coincide satisfatoriamente com os dados conhecidos na literatura (Micr. Fig. 4).

TABELA II
Diâmetro Nuclear

N. do protocolo	Foliculo em transformação lutea	Valor Modal (volume)		10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	15,5	16	N. de núcleos	índice mitótico
		715	998	1406	2	4	11	10	9	21	8	3	4	2				
13	Zona central (B)			1436			2	1	3	4	5	20	6	2	2	2	51	—

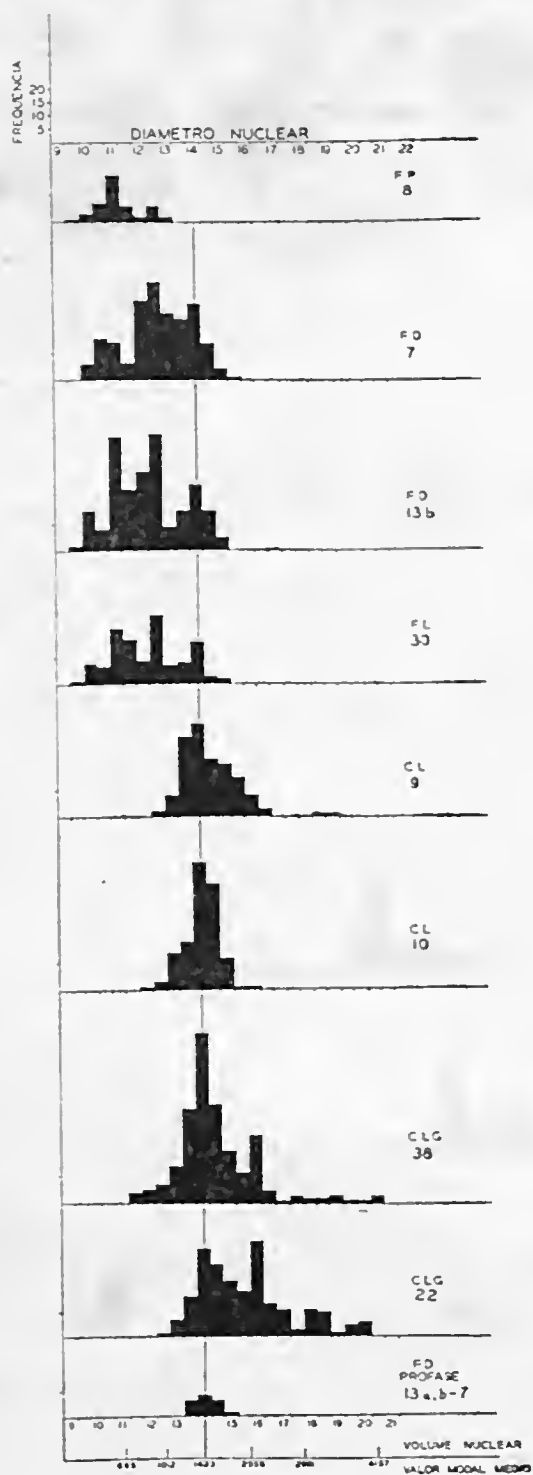


FIG. 1 — Histogramas dos diâmetros nucleares das células foliculínicas e luteínicas. FP — Folículo primordial. FD — Folículo em desenvolvimento. FL — Folículo em transformação lutea. CL — Corpo Amarelo transitório. CLG — Corpo Amarelo gravídico. Os números correspondem a indicações de protocolo da Tabela I.

c) *Folículo em transformação lútea* (Prot. 13a e 30(:

Os dois casos representados na Tab. 1 respectivamente no fim do estro (30- e estro (13a), apresentam também os três valores modais iguais aqueles do folículo em desenvolvimento. Porém, devido a possibilidade, as vezes bastante clara, de diferenciar as células já lúteas das foliculares seja pela morfologia do núcleo, seja pelo citoplasma basófilo que é rico em granulações nas células lúteas, tentamos fazer uma medição diferencial das duas categorias de células contemporaneamente presentes nesta fase do folículo. Precisamos esclarecer que as células lúteas começam a aparecer depois da ruptura do folículo na zona mais periférica deste, ao passo que a zona central é ainda constituída por células da granulosa residuais. Portanto, indicamos na Tab. 2 as duas medições com a notação "zona central" e "zona periférica".

O gráfico da Fig. 2 representa histogramas separados destas duas partes do folículo em transformação.

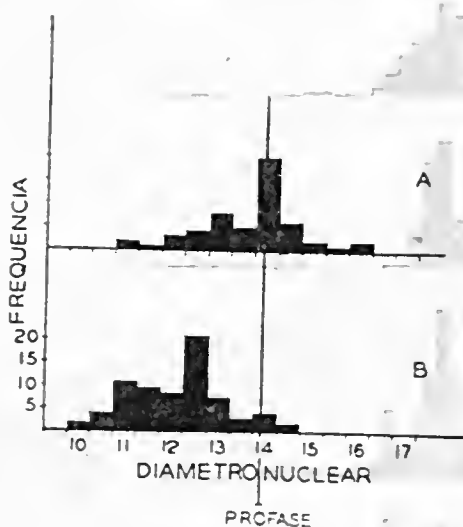


Fig. 2 — Histograma dos diâmetros nucleares das células do folículo em transformação lútea.

A) Zona periférica, predominantemente de células já lúteas.

B) Zona central, predominantemente de células foliculares.

A linha vertical indica o diâmetro da classe das prófases foliculares. Vide Tabela II.

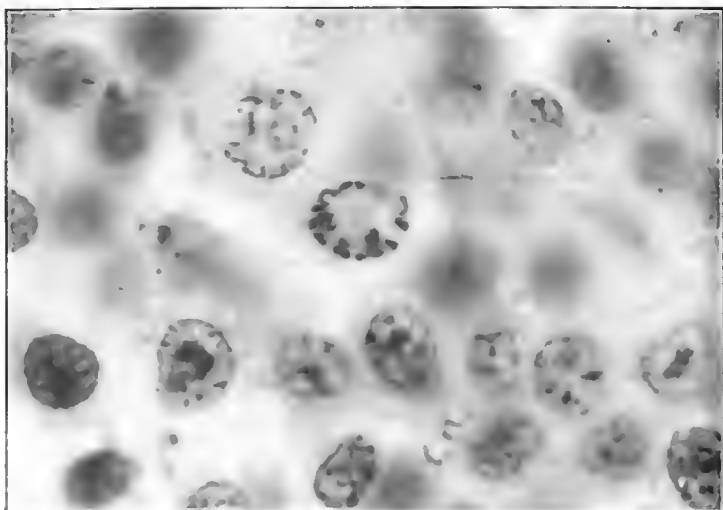


FIG. 3 — (Microfotografia)
Células foliculínicas com duas
profases,
× 1.480

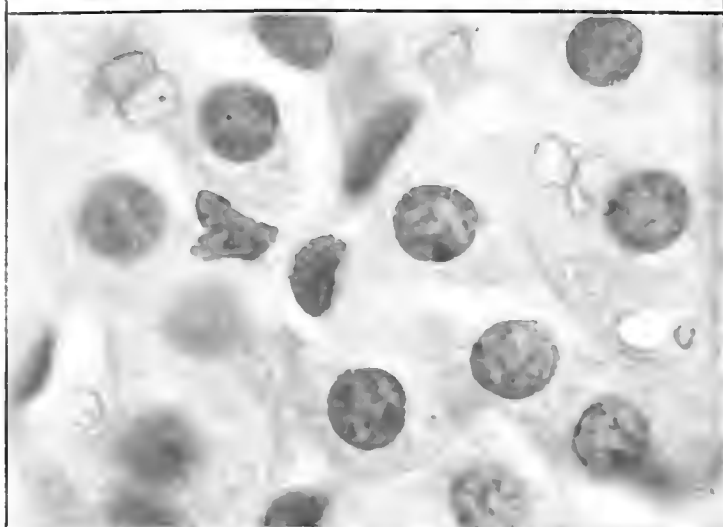


FIG. 4 — (Microfotografia)
Células luteínicas de corpo
amarelo transi-
tório, × 1.480

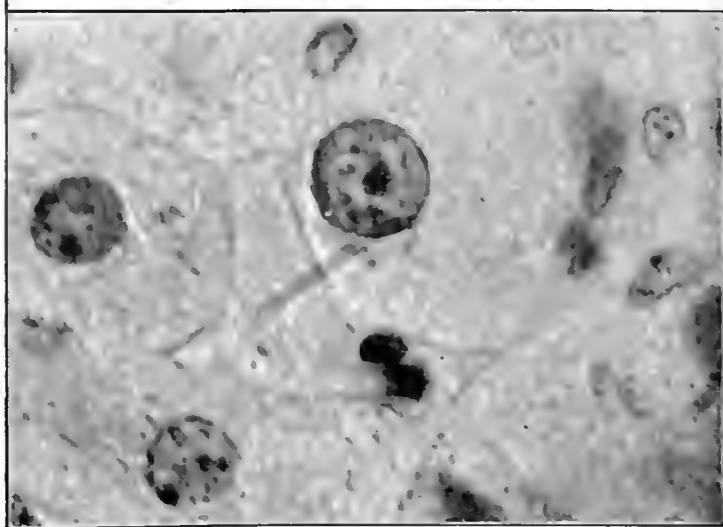


FIG. 5 — (Microfotografia)
Células luteínicas de corpo
amarelo grávi-
dico × 1.480

As células foliculares tem valores volumétricos modais iguais aos das células do folículo em desenvolvimento, isto é, diâmetros 11 — 12,5 — 14 (vol. 700, 1050, 1400) ao passo que as células luteas estão predominantemente na moda 14 (vol. 1400). Devido ao fato de ter-se fases intermediárias da célula da granulosa na transformação lutea, fases nas quais a morfologia celular não permite as vezes uma clara classificação da célula, as curvas de frequência da Fig. 3 não devem ser consideradas como absolutamente puras. O resultado da medição do corpo amarelo, como será indicado adiante confirma o valor modal da classe 14 para as células luteas, e, exclue as classes inferiores para esta categoria de células pelo menos no corpo amarelo perfeitamente constituído.

d) *Corpo amarelo transitório* (Prot. 8, 9, 10 e 26):

Os quadros casos estudados encontram-se em metaestro (N.º 9, 10, 16) e diestro (N.º 8). Os histogramas são todos unimodais com moda na classe de diâmetro 14 (vol. 1400), geralmente bem regulares, excetuando o do N.º 9 que apresenta um pequeno número de células muito grandes. Devemos salientar a absoluta ausência de mitoses.

O aspecto morfológico do núcleo das células luteas é particularmente diferente do das células foliculares, e muito homogêneo. Observam-se poucas e diminutas granulações cromatínicas e nucleólo fortemente basófilo muito regular como demonstra as microfotografias (Fig. 3, 4, 5).

e) *Corpo Amarelo gravídico* (Prot. 38 e 22):

O corpo amarelo No. 38 pertence a um animal sacrificado no 14.º dia de prenhez e o N.º 22 ao 20.º dia.

O histograma nos dois casos apresenta uma moda principal perfeitamente coincidente com a IIIa. moda do folículo (diâmetro 14: vol. 1400) e, uma segunda moda perfeitamente distinta na classe de diâmetro de 16 (vol. 2058). Além disso os dois casos apresentam valores nucleares maiores. Para definir com maior exatidão estes valores, foram escolhidos estes nucleos grandes, medidos isoladamente e unidos depois estes valores aos demais do histograma. Esta maneira de proceder é justificada no caso em que interessa exclusivamente o valor modal e não a porcentagem das diferentes frequências de células no total.

As modas que assim aparecem tem aproximadamente valores de diâmetro nas classes 16,5 e 18,5 (respectivamente volumes 3000 e 4000). Também nos corpos amarelos gravídicos faltam por completo as mitoses.



DISCUSSÃO

Representamos em forma sintética no Gráfico da Fig. 7 os resultados acima analisados. Destes resalta em primeiro lugar uma diferença fundamental entre a célula da granulosa e a célula lutea no que se refere ao mecanismo de aumento e reprodução. O folículo apresenta uma variação de volume nuclear que abrange o intervalo desde o valor da moda I até a III, e este intervalo constitui uma duplicação do volume nuclear. Os valores das profases indicam que a moda III representa o valor terminal deste ciclo.

O corpo amarelo transitório tem uma constituição nuclear absolutamente homogênea com o volume modal (1400) igual ao volume máximo da célula granulosa interfásica e ao volume da profase da granulosa.

O corpo amarelo gravídico além destes volumes, apresenta uma segunda moda perfeitamente distinta, de volume 1,5 maior do que a moda 1400, além de uma pequena, pouco distinta que representa núcleos de volume maior ainda. Devido ao pequeno número destes núcleos e a maior variabilidade dos núcleos grandes, é bastante difícil estabelecer com exatidão o valor destas modas superiores.

O folículo tem um mecanismo de multiplicação celular por mitose e o quadro cariométrico praticamente é o mesmo que foi verificado por um de nós durante as mitoses espermatogoniais. (Schreiber, 15,17). Os núcleos duplicam o seu volume e dividem-se em seguida, dando dois núcleos que, depois da reconstrução telofásica tem cada um o volume exatamente metade do da profase. Durante este crescimento, cuja natureza interfásica vem sendo demonstrada justamente pelo limite representado pela profase, os núcleos param a um volume intermediário de mais ou menos 1,5 vezes o volume inicial. Esta parada, nos trabalhos anteriores foi repetidamente verificada nos demais núcleos interfásicos e chamada "sesqui-fase" por Schreiber (14-15-16-17). Este valor corresponde as assim chamadas "Zwischenklassen" encontradas em pesquisas cariométricas por vários autores. (Brummelkamp (3) e Hertwig (7). (*)

Ao contrário, o corpo amarelo, nunca apresenta mitoses, mas pelo crescimento tipicamente "rímico" dos seus núcleos devemos deduzir que apresenta um crescimento com duplicação do volume o que indica ser o crescimento nuclear um processo endomitótico, excluindo portanto, fenômenos de simples embebição. Precisamos esclarecer que usamos este termo de endomitose, no sentido mais amplo, para indicar o processo de duplicação do conteúdo gênico nuclear indiferentemente do fato de se separar os produtos da multiplicação dos genomas em cro-

(*) Nos trabalhos de Schreiber (14, 15, 16, 17) está tratada a discussão sobre a significação desta fase, como também aquela do crescimento "rímico" dos núcleos.



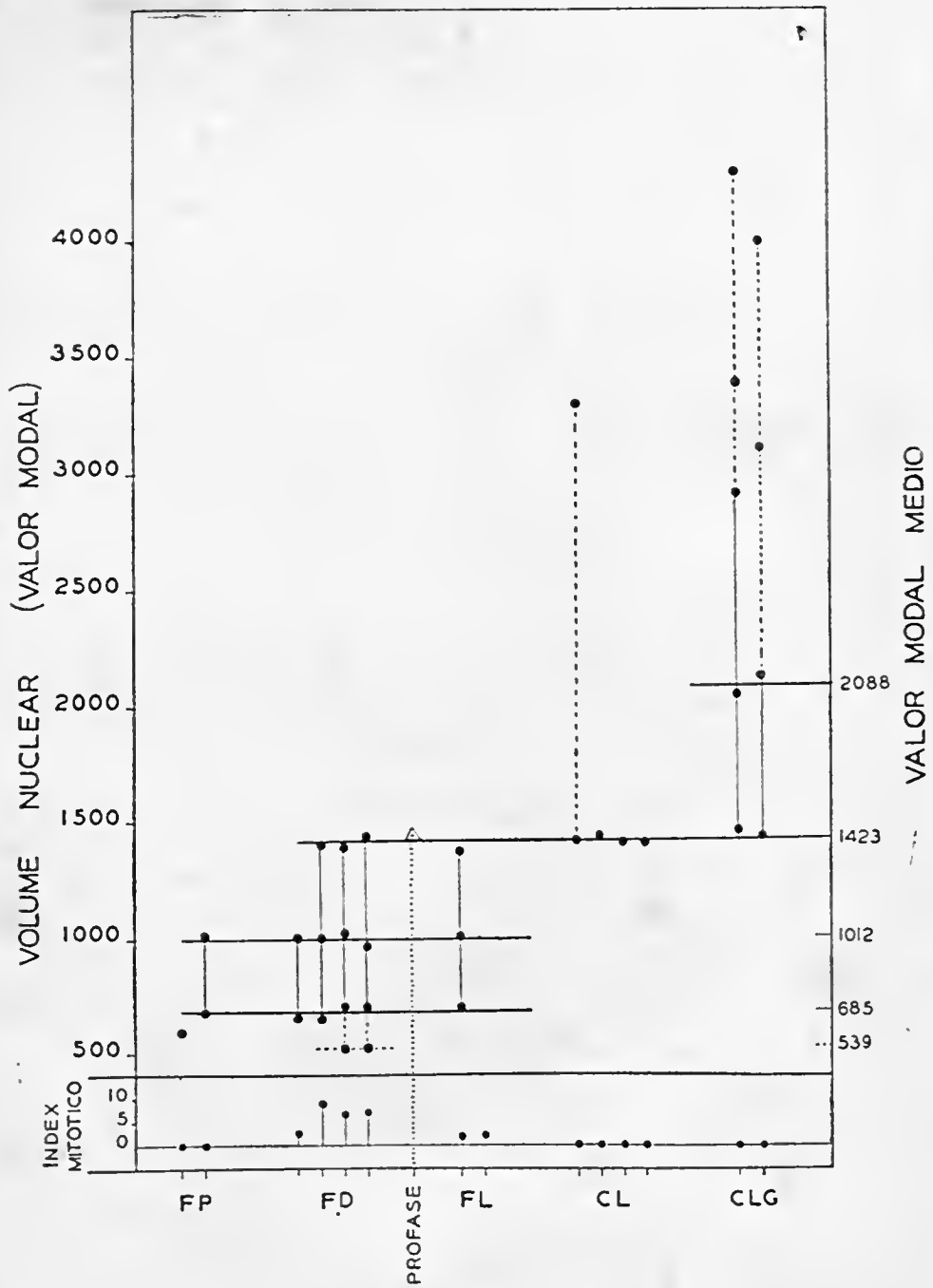


FIG. 6 - Diagrama dos valores modais dos histogramas da Fig. 1 e do Index Mitótico. Mesmas indicações como na Fig. 1. — Ordenadas a direita: médias dos valores modais.



mosomas, em número poliploide ou ficar reunidos em cromosomas politenicos. Além disso, este processo pode manifestar fenômenos de fa-es morfológicas endomitóticas como as descritas por Geitler como também pode faltar qualquer manifestação de natureza cromatinica, como seja nas células do ileum dos mosquitos. De fato, nos núcleos do corpo amarelo nunca tivemos, pelo menos na rata, ocasião de observar modificações da morfolgia do núcleo que fica sempre claro com nucléolo fortemente basófilo bem evidente e de volume maior nas células maiores.

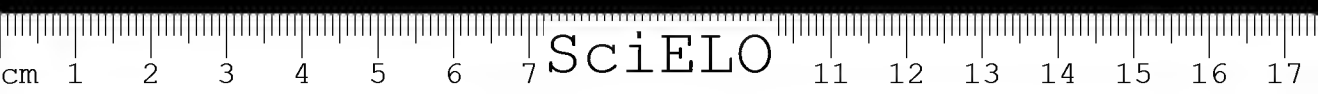
Como foi indicado mais acima é geralmente aceito que pelo menos a maioria das células luteas se originam por transformação da granulosa, ficando aberto o problema da origem, significação e participação das tecais, na formação do corpo amarelo.

Podemos, por conseguinte, admitir que a transformação da célula da granulosa em célula luteica atinge o mecanismo de reprodução celular. Ao se transformar em célula lutea a célula granulosa perde a capacidade de dividir-se mitoticamente continuando porém, o processo de multiplicação interna que a leva a volumes nucleares de valor múltiplo superior.

É geralmente admitido que o corpo amarelo cresce por hipertrofia das células e não por hiperplasia. Portanto, se considerarmos o crescimento ritmico, como uma forma de reprodução "interna" do material nuclear, sem divisão do núcleo e da célula que é o processo fundamental do crescimento do corpo amarelo, na realidade o crescimento nuclear permanece sempre o mesmo: *multiplicação do genoma nuclear*.

Nesta altura achamos interessante ligar estas conclusões com as idéias de Painter (12) acerca da participação do núcleo nos fenômenos secretórios das células. Estudando três tipos diferentes de células glandulares dos insetos, Painter esclarece que todas as vezes que a célula necessita de ácidos nucleínicos para a síntese das proteínas do citoplasma, o núcleo participa da sua formação com a multiplicação dos seus genomas que representam o mecanismo fundamental da síntese das nucleínas, ulteriormente elaboradas e fornecidas ao citoplasma por meio da heterocromatina e do nucléolo. Esta multiplicação dos genomas se dá em certas células através de repetidos ciclos mitóticos que levam a um desenvolvimento hiperplástico da glândula, e em outras, pelo contrário, se estabelecem núcleos fortemente poliploides ou politenicos gigantes característicos de muitas glândulas.

Painter (12) relaciona estes fenômenos nucleares com a elaboração de proteínas citoplasmáticas mesmo reconhecendo que ainda não é bem conhecida a natureza da secreção salivar do, Dipteros e admitindo que a "gordura" das células adiposas dos insetos seja relacionada com fosfolípidos eventualmente ligados com nucleoproteínas.



Por conseguinte, podemos levantar o problema se também os fenômenos nucleares de natureza "interfásica" evidenciados nas células foliculínicas e luteínicas possuem a mesma significação dos esclarecidos por Painter mesmo que, pelo menos na última fase da elaboração da secreção, esta não seja de natureza proteica.

É importante frisar, que paralelamente à substituição dos mecanismos reprodutivos das células acima indicado, se dão profundas modificações do quimismo.

Ainda não está perfeitamente esclarecido se a célula lutea é ainda capaz de produzir foliculina, mas está bem demonstrado que ela assume a nova capacidade de secretar progesterona. Se a formação do novo hormônio é consequência da situação múltipla do genôma nuclear da célula lutea, é assunto que não é aqui o caso de indagar: podemos somente lembrar que a poliploidização ou o estado politênico dos cromossomas das células traz como consequência, as vezes modificações do seu metabolismo como foi estudado no vegetal e como salienta Frankhauser (6), analisando os casos de poliploidismo nos anfíbios.

CONCLUSÕES

1) A célula da granulosa folicular se multiplica por mitose apresentando o seu núcleo um crescimento interfásico limitado a um intervalo de duplicação de volume nuclear, com uma etapa intermediária de 1.5 vezes o volume inicial e limitado superiormente pelo volume da prófase (700, 1050 e 1400).

2) A célula lutea tem no corpo amarelo transitório um volume nuclear exatamente igual ao das profases foliculares (1400) e no corpo amarelo gravídico este volume cresce ulteriormente com ciclos de crescimentos rítmicos (1400), 2100 e 2800).

3) O conjunto dos volumes modais das células foliculares e luteas forma uma série única que corresponde perfeitamente àquela previamente evidenciada nas células uterinas, isto é, uma sucessão de ciclos de duplicação com etapas intermediárias a 1.5 o valor inicial de cada ciclo (sesqui-fásica): 700, 1050, 1400, 2100, 2800 ou seja 1: 1.5; 2: 3; 4: 6; etc.

4) O fato dos valores rítmicos do crescimento da célula lutea constituírem múltiplos superiores dos volumes rítmicos da célula da granulosa, embora não constitua a prova definitiva, pode ser argumento favorável para apoiar a idéia da transformação lutea da célula granulosa.

RESUMO

Foram estudados com método estatístico-cariométrico os volumes nucleares das células foliculares e luteínicas da rata albina (Wistar). Estas pesquisas continuam a série de investigações sobre o crescimento interfásico em tecidos em atividade reprodutiva com o intuito de esclarecer os fenômenos de

"crescimento rítmico" dos núcleos aproveitando de condições fisiológicas dos tecidos que favorecem o estudo da multiplicação celular.

Os fenômenos encontrados são os seguintes: As células foliculares tem um ciclo de proliferação no qual o volume nuclear cresce a partir de um volume básico (700) até atingir o duplo e depois entram na prófa-e dividindo-se em seguida. Durante este crescimento os núcleos apresentam uma parada transitória depois de alcançado o volume 1.5 vezes aquele inicial ($\pm 10\%$). Este ritmo de crescimento coincide perfeitamente com aquele evidenciado por Schreiber nas espermatogonias de ofídeos.

Os núcleos das células luteínicas no corpo amarelo transitório são toda, de um volume igual aquele da prófase das células foliculares (1400). No corpo amarelo gravídico dá-se um ulterior crescimento sem divisão, de tipo "rítmico", isto é, com valores descontínuos e proporcionais ao valor básico. A série formada por estes valores continua perfeitamente aquela dos núcleos da célula folicular e constituem uma série de ciclos de duplicação nos quais existe uma etapa intermediária de um volume 1.5 vezes o valor inicial de cada ciclo. Esta etapa em trabalhos anteriores de Schreiber foi chamada de "sesquitas" e foi verificada também no crescimento rítmico dos núcleos das células uterinas.

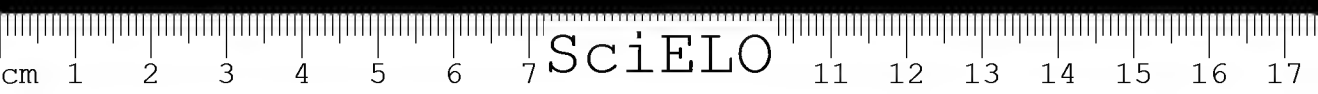
E discutido o problema da origem das células luteínicas, e o fato de estas células iniciar seu crescimento com um volume nuclear correspondente ao máximo existente nas células foliculares e continuar com valores múltiplos deste volume é apontado como uma possível comprovação da teoria da origem folicular das células luteínicas.

ABSTRACT

The nuclear volumes of the follicular and luteal cells of the female albino rat Wistar were studied by means of the statistical-cariometric method. These investigations follow up a series of studies on the interphasic growth in tissues in reproductive activity in order to make clear the phenomenon of "rhythmic growth" of nuclei, making use of the physiological conditions of tissues which favor the study of cellular multiplication.

The following phenomena were found: The follicular cells show a mitotic cycle of proliferation in which nuclear volume grows from a basic value until it doubles in volume. They then enter the prophase and finally divide. During this growth, the nuclei show a transitory stop after reaching a volume of 1.5 times that shown at the beginning. This rhythm of growth coincides perfectly with that shown by Schreiber in the spermatogonia of snakes.

The nuclei in luteinical cells of the transitory corpus luteum are all of the same volume as in the prophase of follicular cells. In the corpus luteum of pregnancy, an ulterior growth without division is observed. This is of the "rhythmic" type, that is, with discontinued values and proportional to the basic value. The series formed by these values continues perfectly that of the nuclei



of the follicular cell and constitutes a series of duplicate cycles in which exists an intermediate stage of volume 1.5 times the initial value of each cycle. In previous works of Schreiber, this step was called "sesquiphase" and was also verified in the rhythmic growth of the nuclei of uterine cells.

The problem of the origin of luteal cells is discussed. The fact that these cells begin their growth with a nuclear volume corresponding to the maximum existing in the follicular cells and continuing with multiple values of this volume is pointed out as possible proof of the theory of the follicular origin of luteal cells.

RIASSUNTO

I volumi nucleari delle cellule della granulosa follicolare e del corpo luteo di Ratta albina (Wistar) vennero studiati col metodo "statistico-cariometrico" già usato dagli AA in pubblicazioni precedenti. Queste ricerche continuano una serie di indagini sul ritmo dell'accrescimento del nucleo interfaseico nei tessuti in attività mitotica nei quali possibile controllare questa attività durante le differenti condizioni fisiologiche specifiche del tessuto.

I fenomeni verificati durante queste ricerche furono i seguenti:

La cellula follicolare presenta un ciclo di proliferazione mitotica durante il quale il suo nucleo cresce a partire da un volume basico fino a raggiungere il duplo di questo volume iniziale e successivamente si divide. I nuclei profaseici si trovano tutti al volume doppio del basico. Durante questo accrescimento interfaseico i nuclei presentano un tappa intermediaria ad un volume 1.5 volte quello basico iniziale. Questo ritmo di accrescimento interfaseico corrisponde perfettamente con quello previamente descritto da Schreiber negli spermatogoni di Oidi.

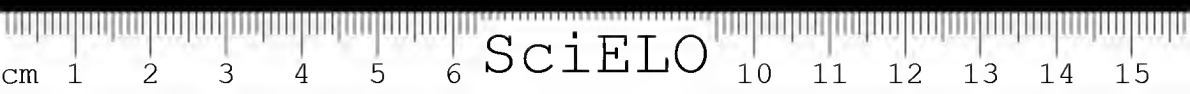
I nuclei delle cellule del corpo luteo transitorio sono tutti ad un volume eguale a quello delle profasi follicolar cioè duplo del volume basico follicolare. Nel corpo luteo gravidico si ha un accrescimento ulteriore del nucleo senza divisione. Questo accrescimento è di tipo "ritmico" cioè con una successione di periodi di accrescimento e di pause, essendo i volumi raggiunti in queste pause multipli del volume iniziale. La serie di questi valori continua perfettamente quella dei volumi del ciclo della cellula follicolare e costituisce una successione di cicli di duplicazione dentro al quali esiste la tappa intermedia di 1.5 volte il volume iniziale di ogni ciclo. Questa fase intermedia venne analizzata da Schreiber in pubblicazioni precedente denominata, "sesquifase". Essa venne verificata dagli AA anche nel ciclo di accrescimento interfaseico delle cellule uterine.

Viene anche discusso il problema dell'origine delle cellule luteiniche e viene messo in evidenza il fatto che i nuclei di queste cellule iniziano il loro accrescimento ad un volume corrispondente al volume massimo raggiunto nella interfase delle cellule follicolar, e suggeriscono questo fatto come una possibile conferma della teoria dell'origine follicolare delle cellule luteiniche.

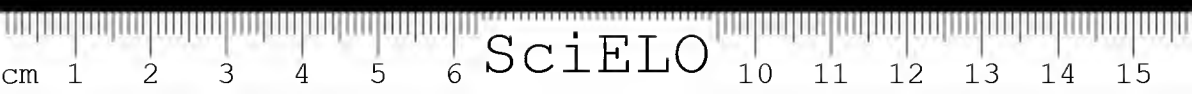
BIBLIOGRAFIA

1. Allen, E. — Sex and internal secretions, William & Wilkins, Philadelphia, pp. 457, 1939.
2. Arkin, H. & Colton, R. R. — An outline of statistical methods, 4th Ed., Barros & Noble, New York, pp. 23, 1942.
3. Brummelkamp, R. — Das Sprungweise Wachstum des Kernmasse, *Acta Neerlandica Morphologiae*, 2:177, 1939.
4. Chiarugi, G. — Trattato di Embriologia, Soc. Ed. Libreria Milano, pp. 142, 1939.
5. Corner, G. — Cyclec changes in the ovaries and uterus of the sow and their relation to mechanism of implatation, *Cont. to Embriology*, 13:13, 1939.
6. Fankhauser, G. — The effects of changes in chromosome number on amphibian development, *Quart. Rev. Biol.*, 20:20, 1945.
7. Hertwig, G. — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung, *Anat. Anzeiger*, 87:65, 1938-1939.
8. Hoffman, F. — Female Endocrinology, W. B. Samders, Philadelphia, pp. 8-12, 1944
9. Meyer, R. — Uber das Stadium proliferationis hyperaemicum sowie uber dem Begriff und die Abgrenzung des Blutestadiums des Corpus luteum beim Menschen, *Arch. Gynak.*, 142:315, 1932.
10. Mossman, H. W. — The thecal gland and its relation to the reproductive cycle, *Am. J. Anat.*, 61:289, 1937.
11. Nozak, E. — The Corpus Luteum. Its life cycle and its role in menstrual disorders, *J. A. M. A.*, 67:1285, 1916.
12. Painter, T. S. — Nuclear phenomena associated with secretion in certain gland cells with special reference to the origin of cytoplasmic nucleic acid, *J. Exp. Zool.*, 100:523, 1945.
13. Salvatore, C. A. & Schreiber, G. — Pesquisas de citologia quantitativa. IV: Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravídico, *Memórias do Instituto Butantan*, 20, 39, 1947.
14. Schreiber, G. — O volume do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e a interfase, *Revista de Agricultura* (Semana da Genética-Piracicaba, Brasil), 18:453, 1943.
15. Schreiber, G. — Pesquisas de citologia quantitativa. O crescimento interfásico da espermatogonia nos oídeos, *Rev. Bras. Biol.*, 6:199, 1946.
16. Schreiber, G. — Pesquisas de citologia quantitativa. II: A terceira divisão e a dimegalia na espermatogênese dos oídeos, *Comunicação à 1.ª Reunião Conjunta das Soc. Bras. Biol.*, S. Paulo, 1946.
17. Schreiber, G. — O crescimento interfásico do núcleo. Pesquisas cariométricas na espermatogênese dos oídeos, *Memórias do Instituto Butantan*, 20:111, 1947.
18. Schmidt, J. S. — Mitotic proliferation in the ovary of the normal mature guineapig treated with colchicine, *Am. J. Anat.*, 71:245, 1942.









SciELO

INSTITUTO BUTANTAN

Examinado por - Zelma
Doação feita por - Leila

