

Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sôbre a espermatogênese dos hemípteros

por

G. Schreiber e J. Pellegrino *

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO:

- a) Finalidade do trabalho
- b) Estudo cariométrico do crescimento auxocitário e dos estádios meiocíticos.

II. MATERIAL E TÉCNICA:

- a) *Triatoma infestans*: técnica de criação e características citológicas.
Técnica da colchicinização: protocolos
Técnica citológica e histológica
- b) Técnica estatístico-cariométrica.

III. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS:

- a) Pesquisas citológicas.
 - 1 — bloqueio das metáfases goniais.
 - 2 — metáfases I e II e dissolução das tétrades.
 - 3 — Terceira fenda nos univalentes.
 - 4 — Restituição de núcleos espermáticos de tamanhos diferentes.
- b) Pesquisas cariométrias
 - 1 — Análise cariométrica da espermatogênese normal.
 - 2 — Observações de espermátides polimegálicas na colchicinização.

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

- a) Ação da colchicina sôbre o testículo, e o poliploidismo natural na espermatogênese.
- b) A duplicação dos genomas na espermatogênese do *Triatoma infestans*.

V. RESUMO. SUMMARY.

VI. BIBLIOGRAFIA.

VII. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.

Instituto de Biologia, Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais. Belo Horizonte.

I — INTRODUÇÃO

a) *Finalidade do trabalho*

Durante uma série de pesquisas citológicas sobre alguns hemípteros hematófagos, tivemos ocasião de observar, em certas espécies, a existência de metáfases espermatogonais com número tetraploide de cromosomas. Correspondentes profases com volume duplo do normal foram também verificadas no mesmo material. Nunca, porém, foi possível encontrar estádios mais adiantados da meiose que indicassem o destino destas espermatogônias tetraploides. Assim, nunca foram encontrados, nos indivíduos normais, espermatozoides maduros gigantes. Casos de poliploidismo na série espermatogenética dos insetos são bem conhecidos pelas pesquisas de vários autores (MICKEY [17-23], MICKEY e SAWANN [21], GREMILON [9], DARLINGTON [5], MATHER [5]). Nos vertebrados foram verificados também séries completas de espermiogênese com células de tamanho duplo do normal (SCHREIBER [31] Ofídeos) e, apesar de não terem sido contados os cromosomas, as relações quantitativas entre os volumes destas fases e as correspondentes normais permitem considerá-las como tetraplóides ou como diplóides com cromosomas díameros (HERTWIG [10]).

Com o intuito de estudar experimentalmente a formação de séries espermatogenéticas poliplóides e também a eventual fertilidade destes gametas, foram feitas pesquisas de tratamento de machos adultos de *Triatoma infestans* com solução de colchicina.

A escolha do *Triatoma infestans* foi devida ao fato de ter esta espécie uma peculiaridade nos cromosomas que a diferencia das demais espécies de Triatomídeos até agora estudadas. Como já foi por nós descrito, esta espécie apresenta dez autosomas, dos quais três são fortemente heteropicnóticos durante a diacinese inicial, o que facilita a identificação e contagem nas células poliplóides.

Os hemípteros não apresentam no cromosoma uma zona limitada responsável pela junção das fibras do fuso — o chamado centrômero ou cinetócoro — e, portanto, apresentam um particular interesse no ponto de vista da experimentação colchicínica. De fato, esse alcalóide, bloqueando a divisão do centrômero, condiciona a formação, nos cromosomas normais, das características formas em X, pela repulsão dos cromatídios. No caso dos hemípteros, admitindo-se a existência de um centrômero difuso, poder-se-ia prever a falta de formações características em X, isto é, de cromosomas divididos, mas ainda presos na região do centrômero que não se divide.

b) *Estudo cariométrico do crescimento auxocitário*

Durante estas pesquisas foram observados espermatóides de tamanho muito variável. A aplicação da análise estatística no estudo desta variabilidade demonstrou a existência de quatro categorias cujos volumes estão na relação de 1:2:4:8. Na suposição de tratar-se de formas, respectivamente, haplo-di-tetra e octoploides, e na impossibilidade de

verificar este fato pela contagem de cromosomas nesses núcleos, recorreremos à comparação dos volumes nucleares destes espermatídeos com os volumes nucleares dos elementos meióticos, cujo estudo havia sido feito por um de nós (SCHREIBER [32]). Esta comparação revelou-se bastante interessante, pois as categorias múltiplas de espermátides acima mencionadas apresentaram volumes perfeitamente correspondentes às fases sucessivas do ciclo meiótico.

O quadro comparativo destas medições forneceu-nos, de um lado, a convicção de tratar-se de formas poliplóides de espermátides derivadas da restituição nuclear das I e II metáfases colchicinizadas e, portanto, de valor poliplóide múltiplo; de outro lado, mostrou que os resultados bastante significativos e um pouco heterodoxos da pesquisa cariométrica na série normal foram confirmados com a comparação destas categorias de espermátides colchicinizadas.

* * *

A análise citológica das metáfases colchicinizadas da I e da II divisão forneceu-nos algumas imagens bem nítidas da existência da assim chamada "terceira fenda" nos univalentes, fato este, aliás, já conhecido nos hemípteros. Esta estrutura dupla dos cromosomas do complemento haplóide nos deu a chave provável para a interpretação do duplo ciclo de duplicação que havia sido revelada pela análise cariométrica das fases normais da meiose.

Podemos salientar que o estudo da ação da colchicina sobre a espermatogênese nos permitiu analisar mais profundamente a estrutura dos cromosomas do "set" haplóide, esclarecendo a provável significação da terceira fenda. A formação de categorias de espermátides com volume múltiplo, pela restituição respectiva das I e II metáfases, deu-nos mais uma prova da relação entre o número de genomas e o volume nos núcleos em repouso. Assim, esta série de núcleos com volume múltiplo das espermátides forneceu mais uma escala de medição dos valores nucleares no crescimento auxocitário.

Vários problemas se abrem em consequência desses resultados e serão focalizados mais adiante. Queremos, aqui, somente salientar mais uma aplicação do método cariométrico no estudo dos fenômenos que se relacionam com o processo da duplicação dos genomas. (ver nota no rodapé da página 427)

II — MATERIAIS E TÉCNICAS

a) *Triatoma infestans*: técnica de criação e características citológicas.

Como foi mencionado na introdução deste trabalho, usamos em nossas pesquisas o *Triatoma infestans* (KLUF, 1834) criado por um de nós (PELLEGRINO) no laboratório, e alimentado com sangue de pombo ou galinha. Os triatomas adultos foram injetados com seringa de 1 cc. dividida em décimos, na cavidade abdominal, logo em baixo do tergito,

com solução aquosa de colchicina a 0,5%. Em geral, foi feita uma só injeção de 0,025 cc. e, portanto, cada indivíduo recebeu um total de 0,1 mg. da droga. Os insetos injetados foram fixados, para o estudo citológico, em intervalos variáveis de 2 horas até 9 dias, como se vê na tabela n.º I.

TABELA I
PROTOCOLO DAS EXPERIÊNCIAS

SERIE E NÚMERO	Tempo de ação	Data
I série, número { 29..... 30..... 31..... 32..... 33..... 34.....	24 h. 24 h. 24 h. 24 h. 24 h. 24 h.	6-3-48 » » » » »
II série, número { 110..... 111..... 112..... 113..... 114..... 115..... 116..... 117..... 118..... 119..... 120..... 121..... 122.....	contrôle 2 h. 2 h. 2 h. 4 h. 4 h. 5 h. (+) 8 h. 8 h. 11 h. contrôle 12 h. contrôle	29-7-49 » » » » » » » » » » » »
III série, número { 137..... 138..... 139..... 140..... 141..... 142.....	58 h. 200 h. 230 h. 230 h. 230 h. 30 dias (+)	17-11-49 » » » » »

Os testículos foram fixados respectivamente, um, em álcool acético e, outro, em líquido de Dubosq-Brasil gelado. Para facilitar a fixação, foi usada a técnica seguinte: aberta a cavidade, o testículo era colocado sobre uma lamínula e, por meio de duas agulhas, os lóbulos eram bem espalhados sobre a superfície do líquido. Procedendo-se desta maneira foi possível encontrar fixados, lóbulos dispostos por quase todo o comprimento, no plano do corte. Esses lóbulos foram utilizados para determinação rigorosa da sucessão dos diversos estádios do crescimento do auxócito.

O testículo fixado em álcool acético foi, em seguida, esmagado em orceína acética e, depois de um exame preliminar, montado em bálsamo, após rápidas passagens em álcool acético, álcool absoluto e

xilol. Os testículos fixados em Dubosq-Brasil, depois de emparafinados e cortados com 5 *micra* foram corados com hematoxilina de EHRlich, HEIDENHEIN e FEULGEN.

b) *Técnica estatístico-cariométrica*

Para a pesquisa dos volumes nucleares foi usada a técnica previamente utilizada por um de nós (SCHREIBER) na série de "Pesquisas de citologia quantitativa". Desenhados os núcleos com aumento adequado, foram calculados geométricamente os volumes nucleares pelos diâmetros do desenho. Os diâmetros ou os volumes correspondentes, reunidos em classes de intervalo constante, foram utilizados para construir o histograma das respectivas frequências. Dêstes histogramas, foram calculados os valores modais (fórmula de ARKIN e COLTON). Êstes valores modais foram tomados como expressão do volume nuclear das diferentes categorias de células estudadas.

Em pesquisas realizadas sobre o mesmo material, com o fim de esclarecer mais rigorosamente o ritmo do crescimento do espermatócito, um de nós (SCHREIBER) usou uma técnica estatística mais completa que será relatada em trabalho sucessivo. Como foi repetidamente esclarecido nas pesquisas cariométricas precedentes, o valor modal representa o parâmetro estatístico mais simples e de maior significação biológica.

III — DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

a) *Pesquisas citológicas*

1) Bloqueio das metáfases goniais.

As figuras 1, 2a e 2b representam, respectivamente, quistos espermatogoniais normais em meta-ana e telófase e os correspondentes colchicinizados de 4 horas. Nesses últimos é evidente a falta de orientação dos cromossomas, devido à falta de formação do fuso; os cromossomas encontram-se aglutinados em uma massa central ("ball metaphases" da classificação das alterações colchicínicas de BARBER e CALLAN).

Êsse quadro é bem evidente nas primeiras horas de ação da colchicina. Nos indivíduos fixados mais tarde, estas formações são muito raras. Nas fases terminais da pesquisa (9 dias) encontram-se, às vezes, quistos goniais normais, mas raríssimos em metáfase. Nunca verificámos, nem em cortes histológicos nem nas preparações por esmagamento, forma de diplocromossomas que pudessem fazer suspeitar uma separação parcial dos cromatídios, sem separação de zona centromérica localizada.

2) Metáfases I e II.

As figuras 11 e 12 representam os desarranjos que a colchicina determina nas duas divisões meióticas em tempos sucessivos. Os desenhos figs. 3-4 e foto 5, representam as I e II metáfases normais.

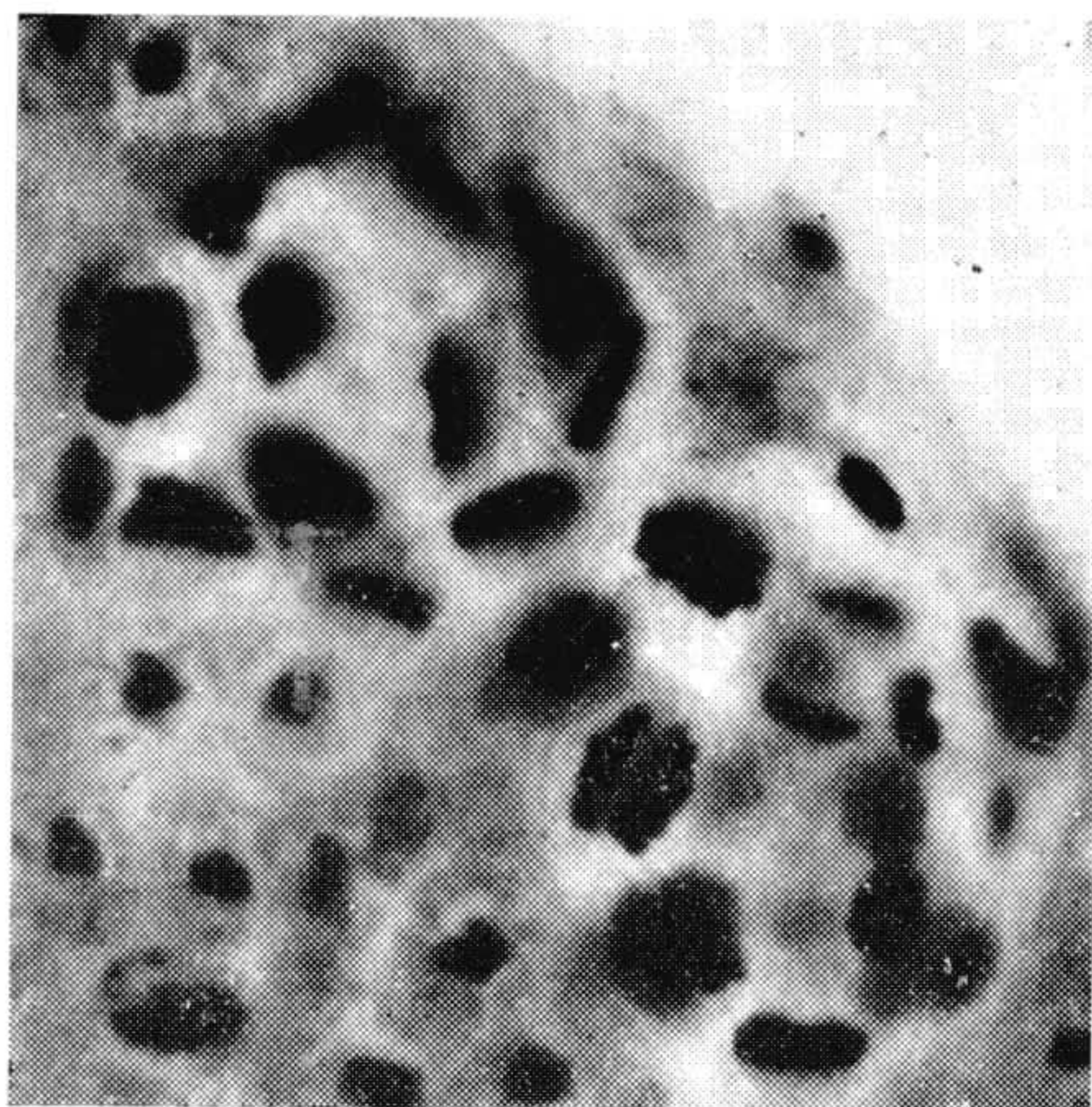


Fig. 1

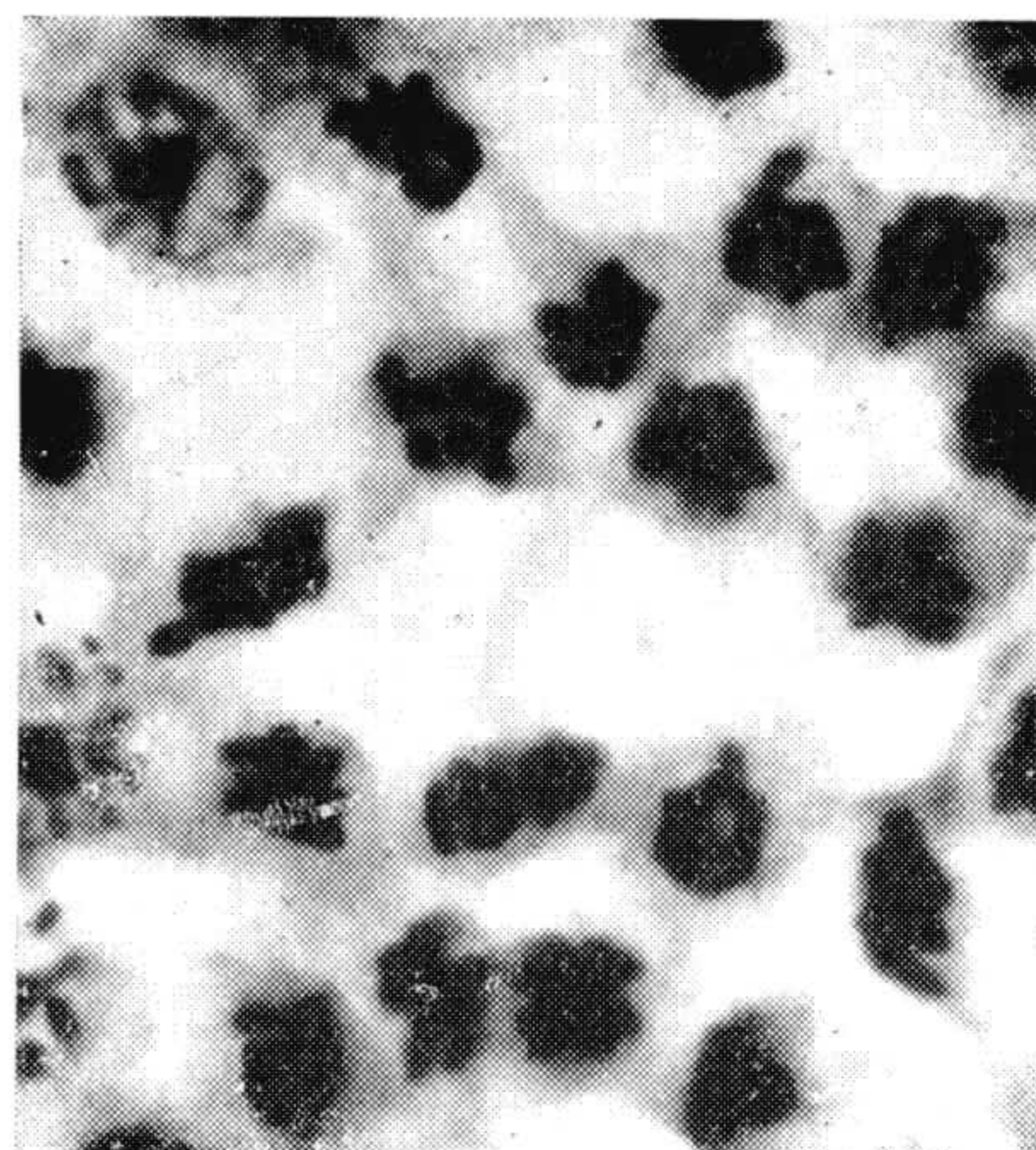


Fig. 2



Fig. 3

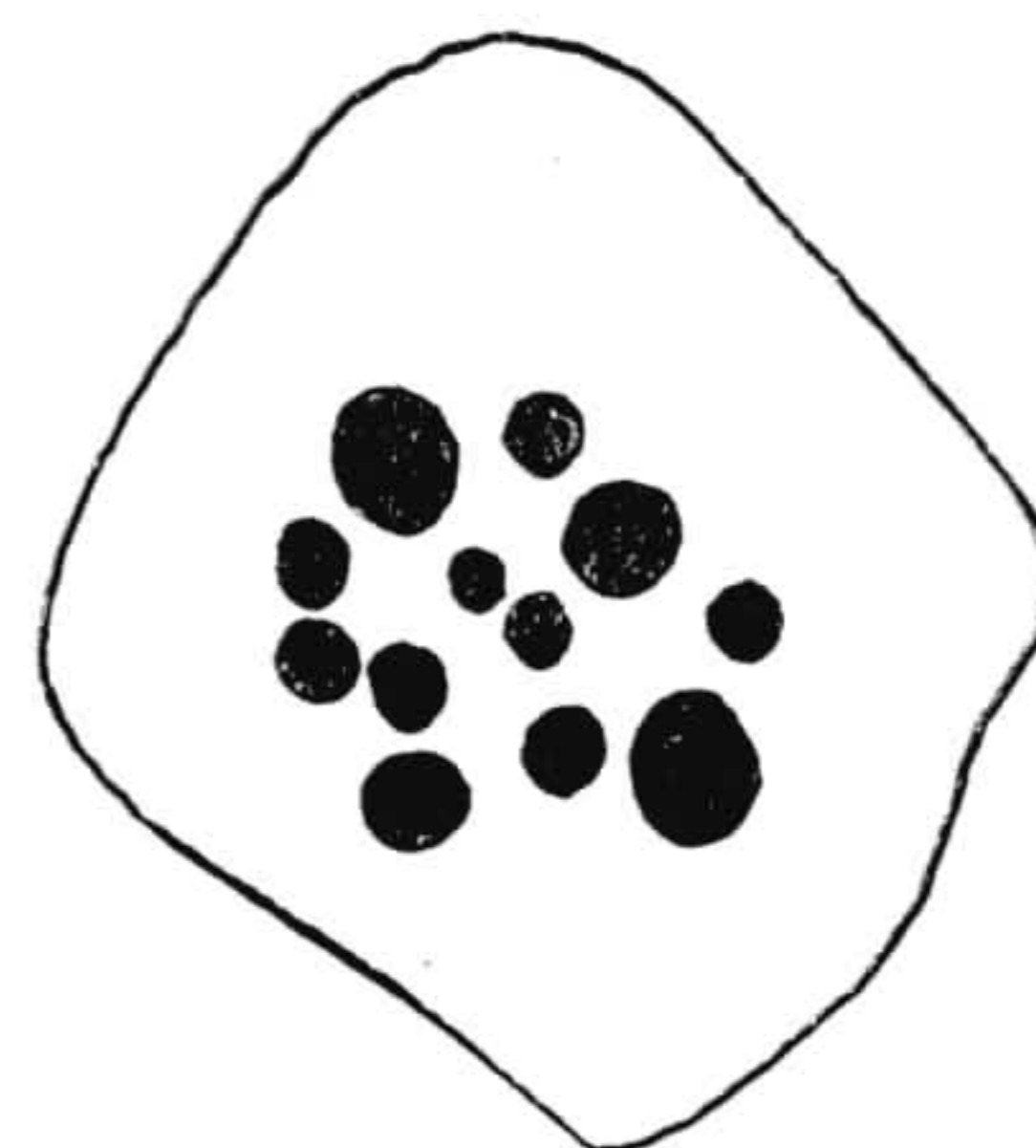


Fig. 4

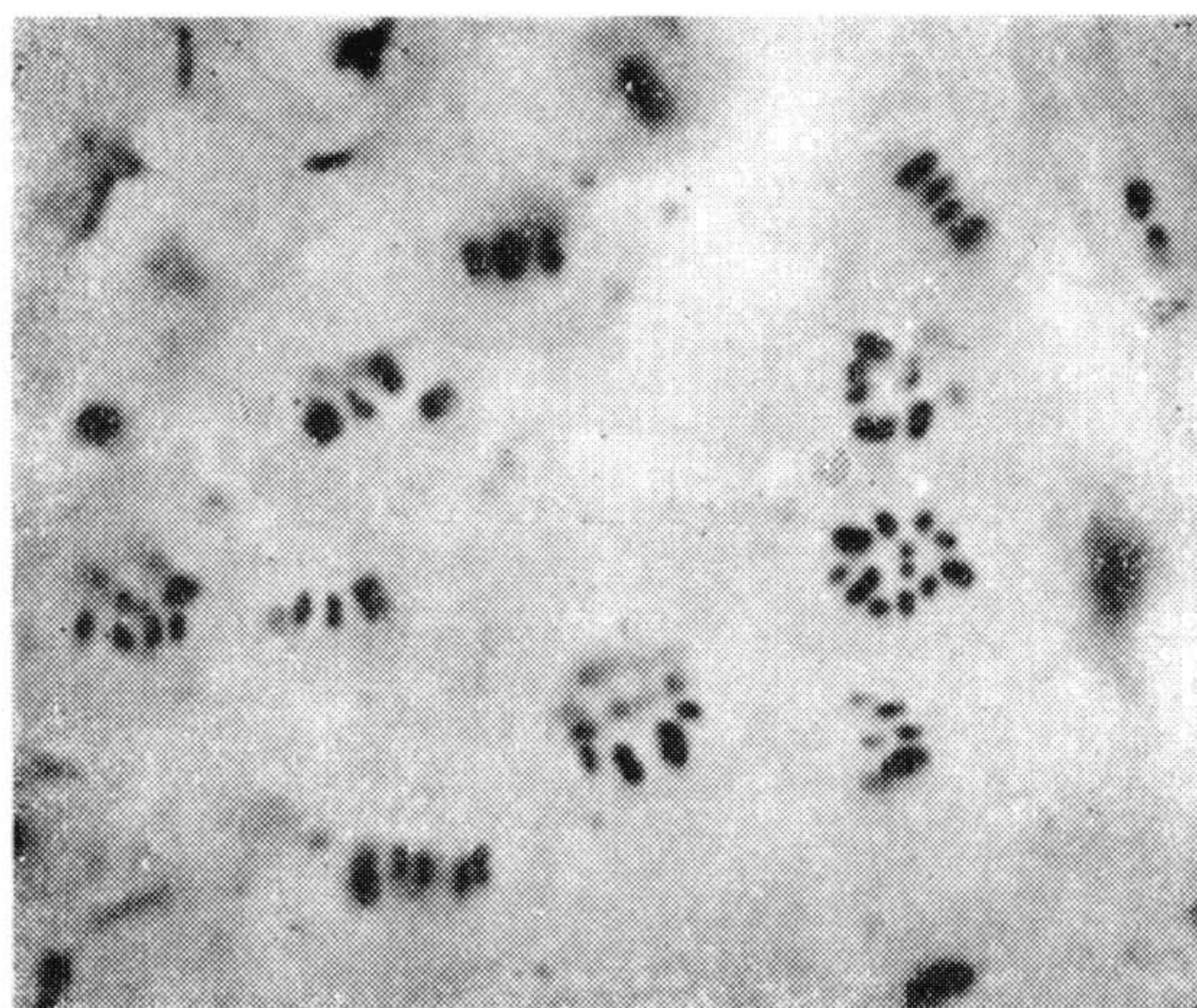


Fig. 5

São bem visíveis os três bivalentes maiores, que nos trabalhos precedentes (35-36) chamamos de A, B, C e que nesta espécie são heteropicnóticos nas últimas fases da profase meiótica. Os cromosomas sexuais estão geralmente situados ao centro da figura metafásica.

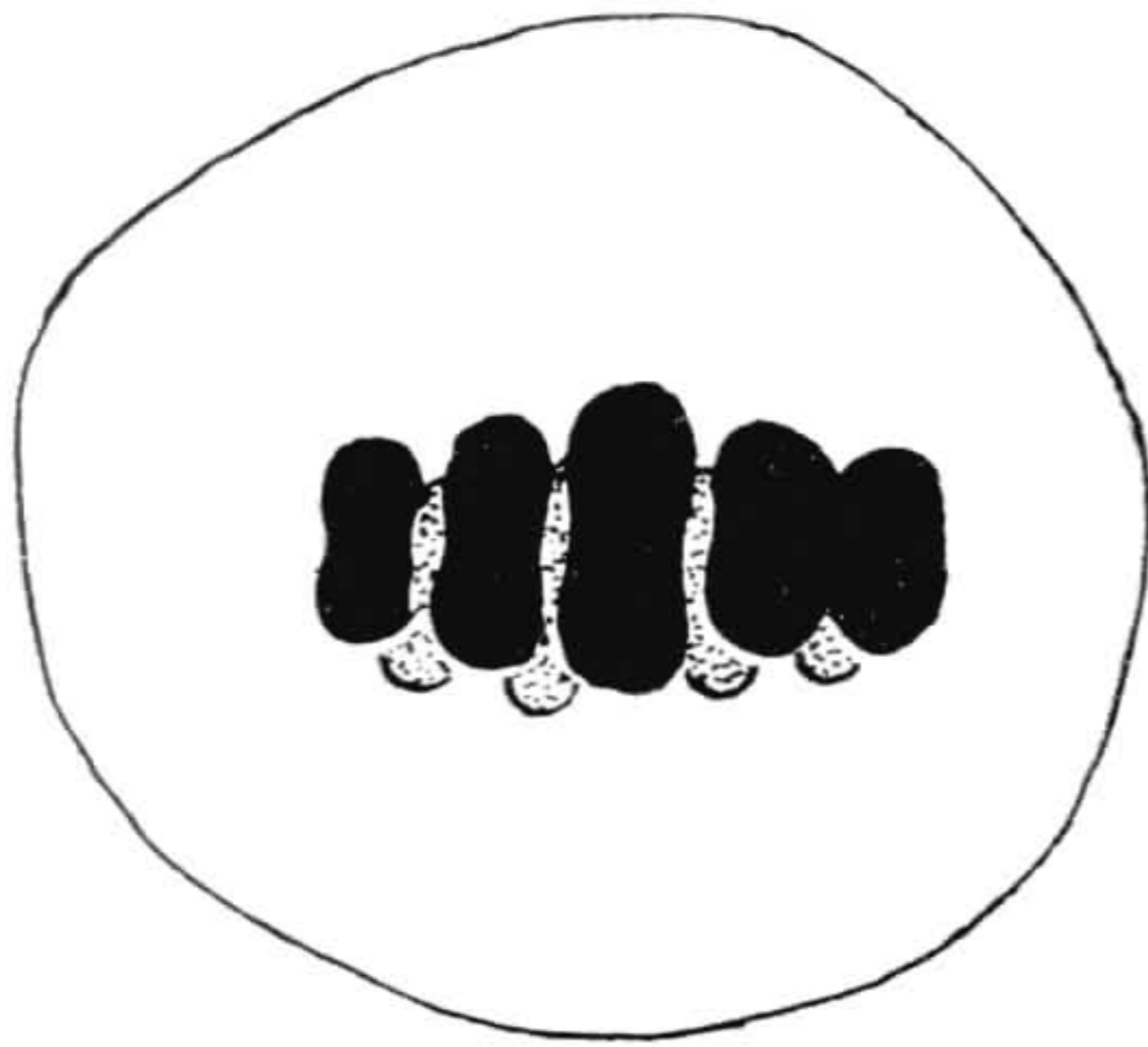


Fig. 6

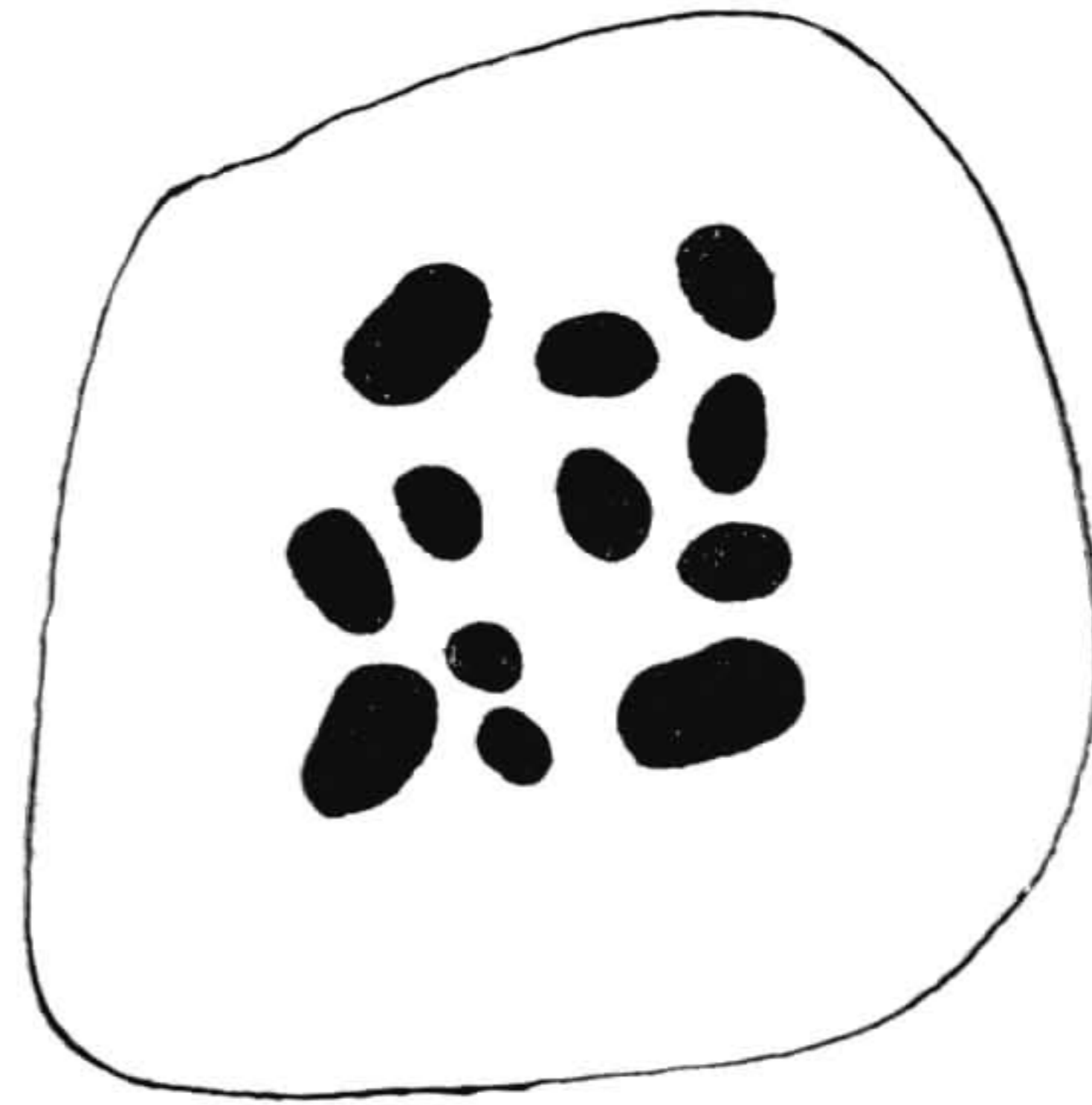


Fig. 7

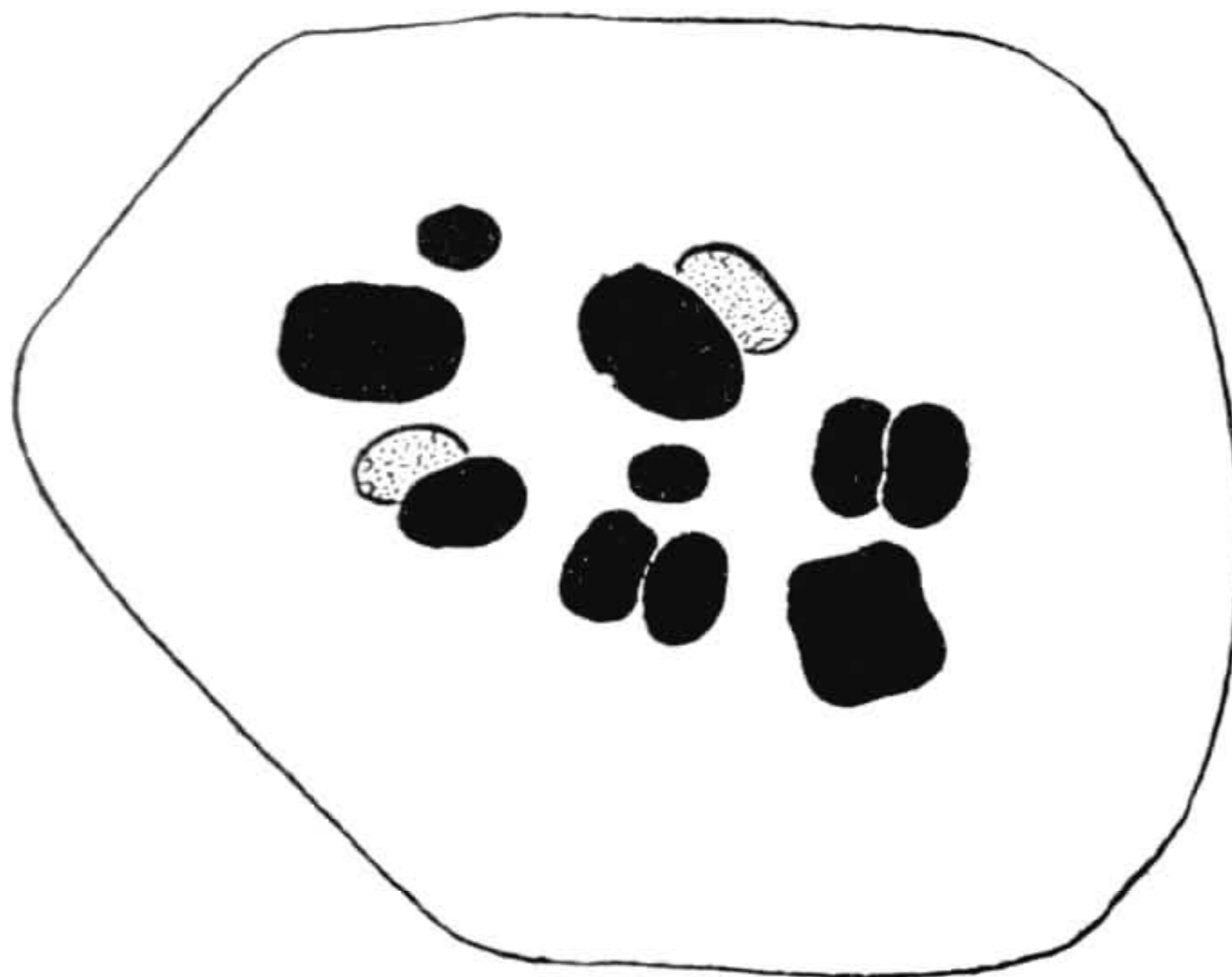


Fig. 8

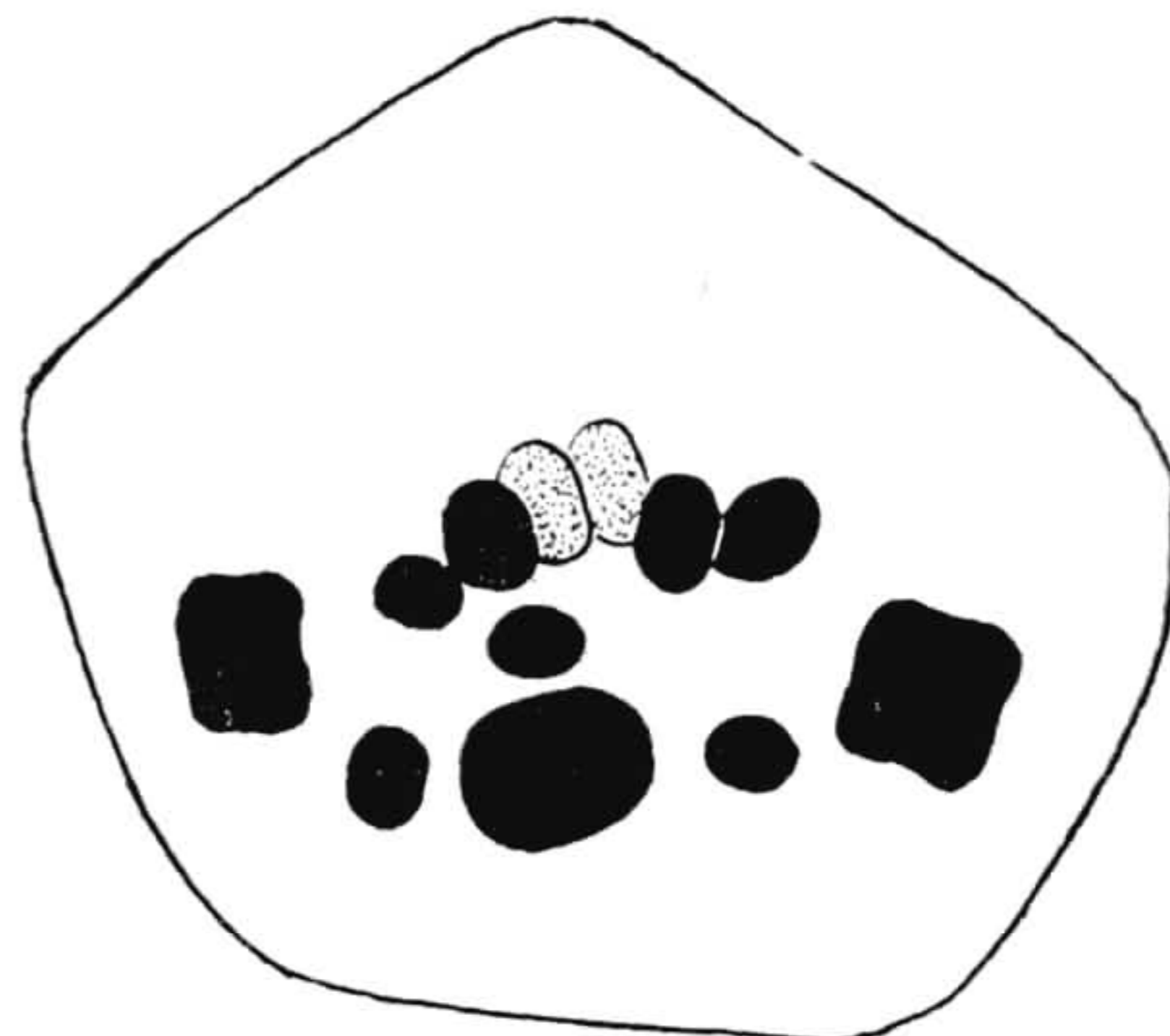


Fig. 9

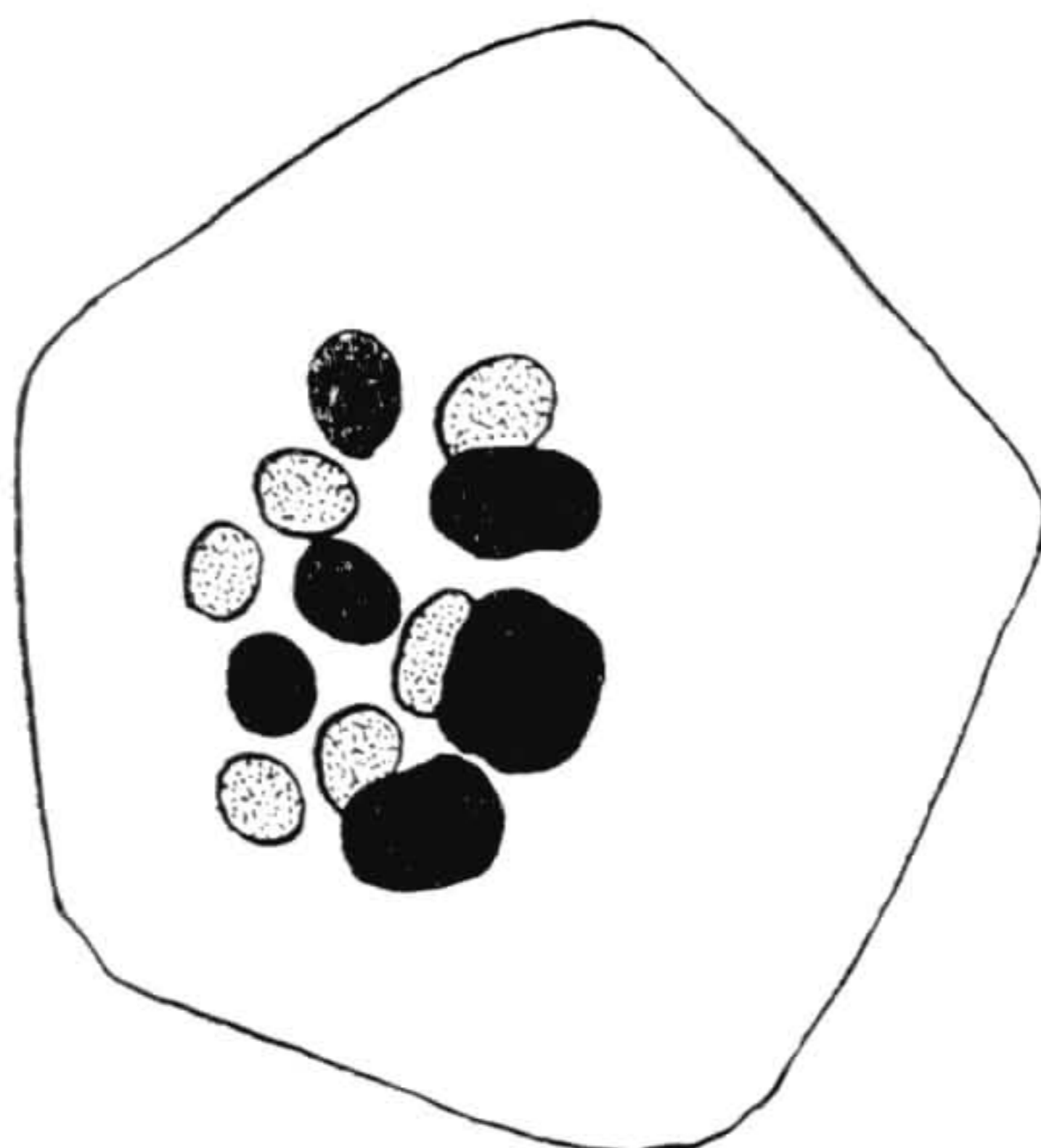


Fig. 10

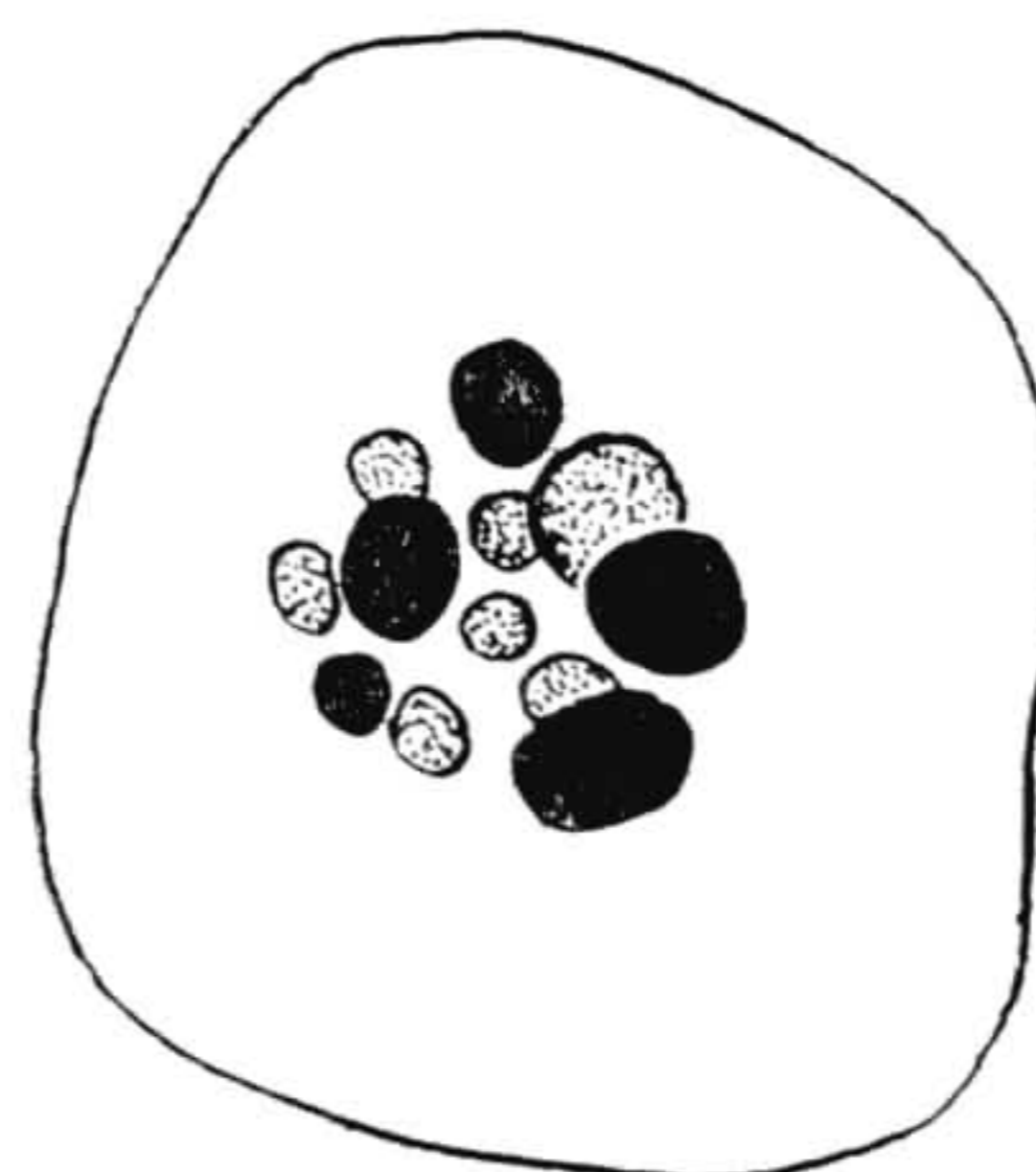


Fig. 11

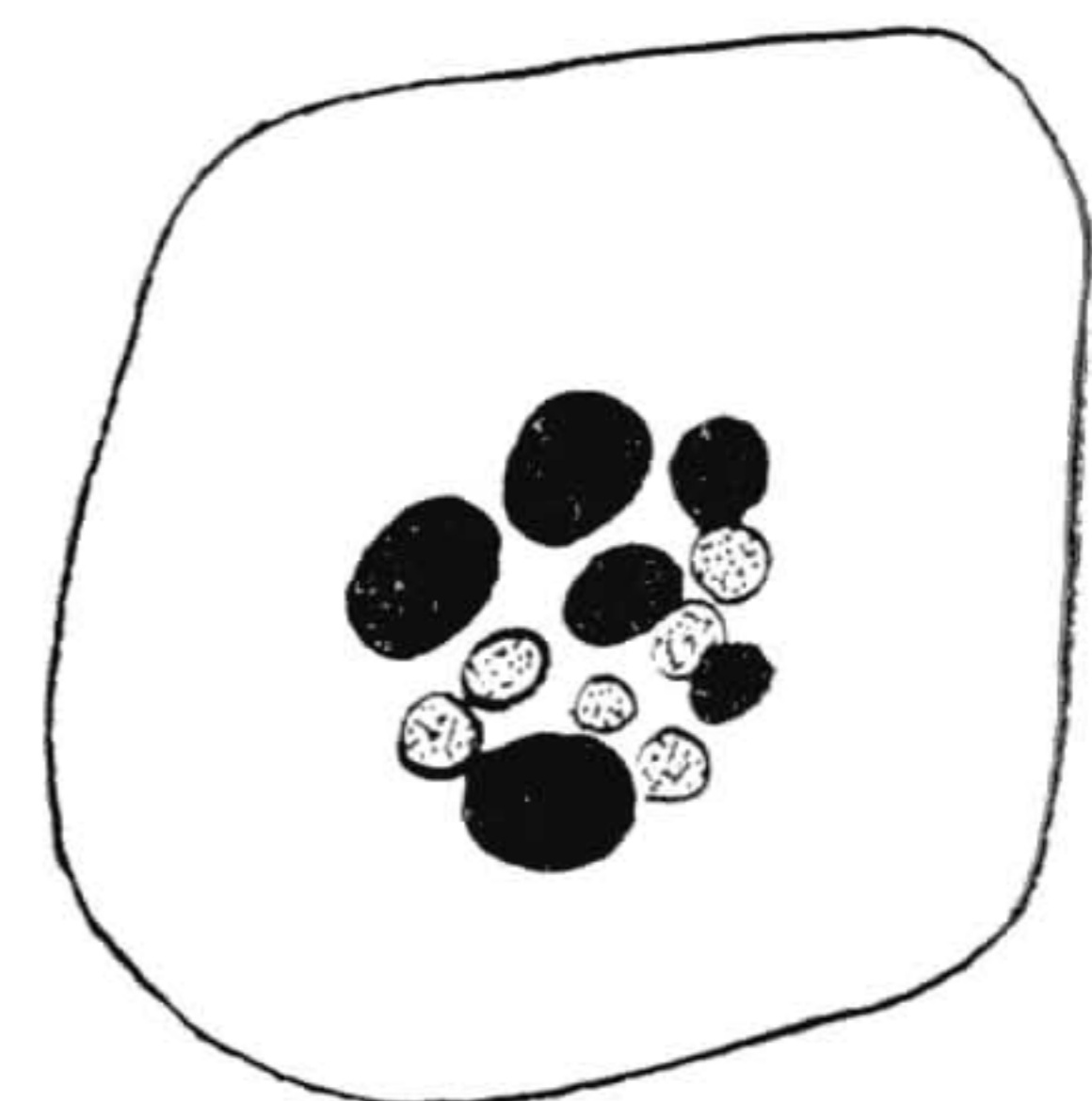


Fig. 12

As figuras 6, 7, 9, 10, 11 e 12 representam as metáfases meióticas após duas horas da ação da colchicina. Algumas metáfases são ainda

normais (fig. 6-7), com evidente orientação equatorial dos cromosomas, o que indica uma formação normal do fuso. Outras, 8, 9, 10 ainda que bastante regulares, já denotam certa deficiência na orientação equatorial; os cromosomas desenhados em pontilhado estão em planos diferentes dos desenhados em preto. O mesmo se vê na foto 13. Nesta se vê uma anáfase adiantada, na qual é evidente uma ligeira discronia nos cromosomas. Após 4 horas (figs. 14-19) da ação da colchicina,

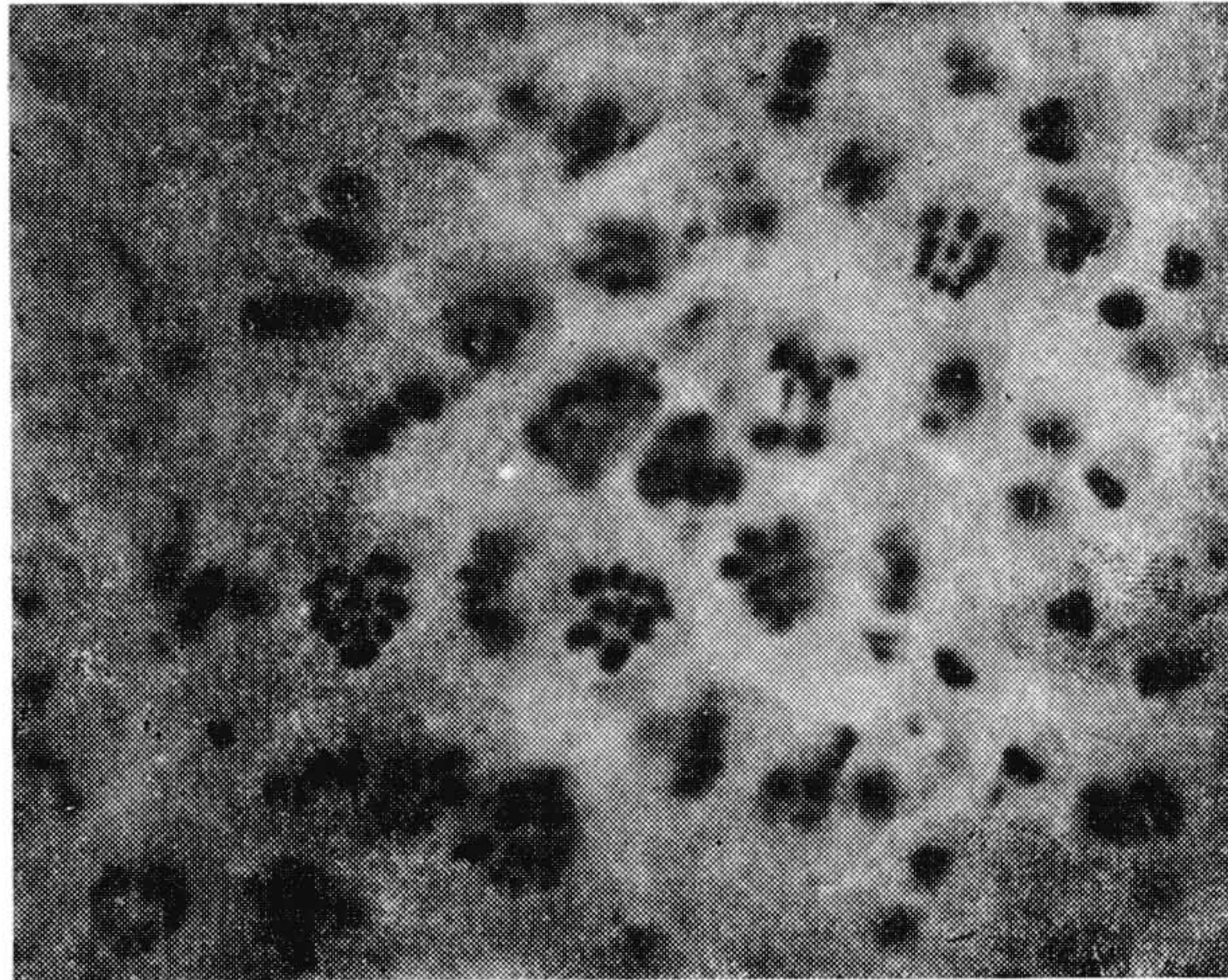


Fig. 13

as anormalidades observadas nas metáfases são bem mais acentuadas. A desorganização da figura cariocinética é mais profunda, e frequentemente os cromosomas apresentam-se aglutinados em massas de

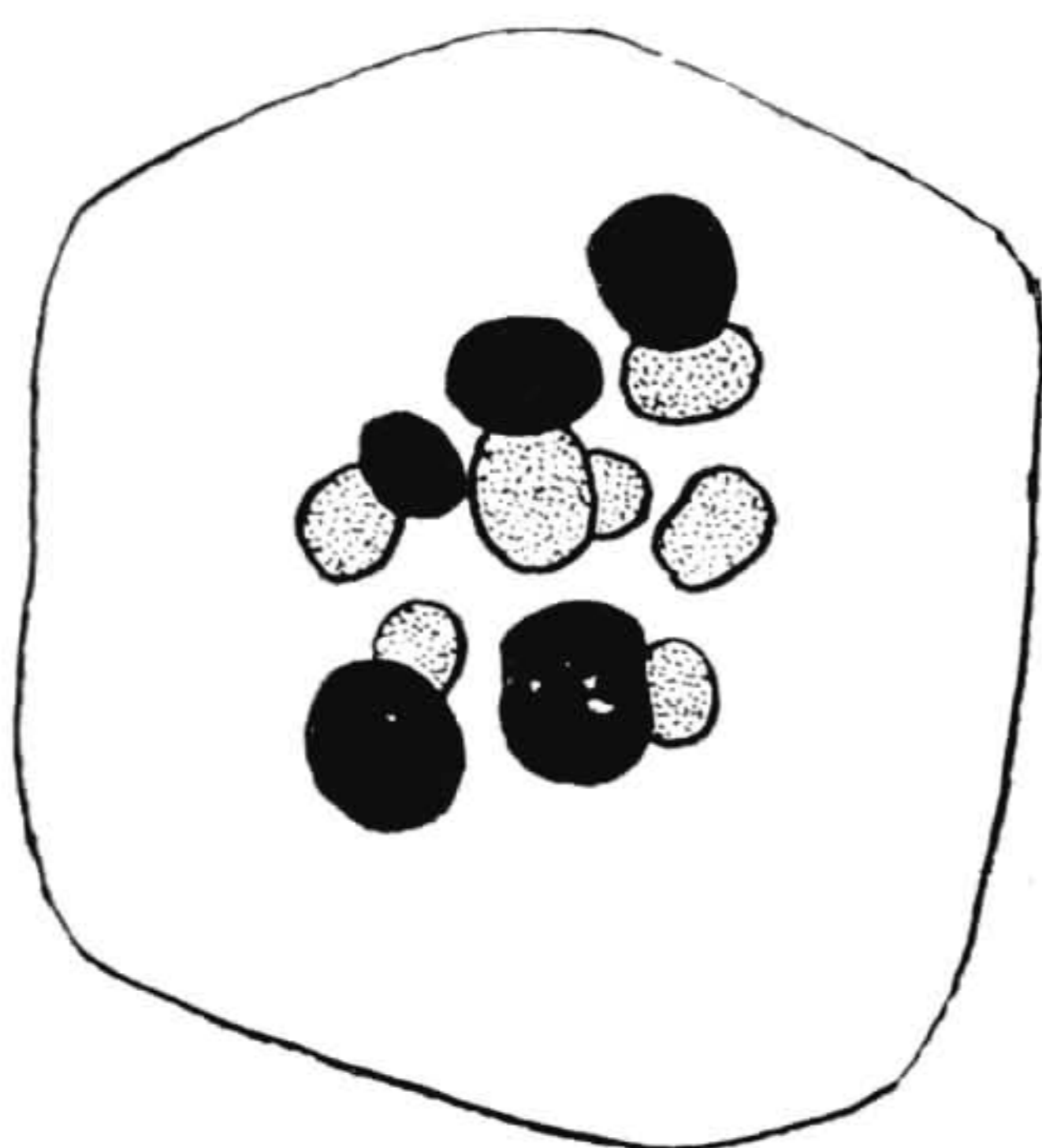


Fig. 14

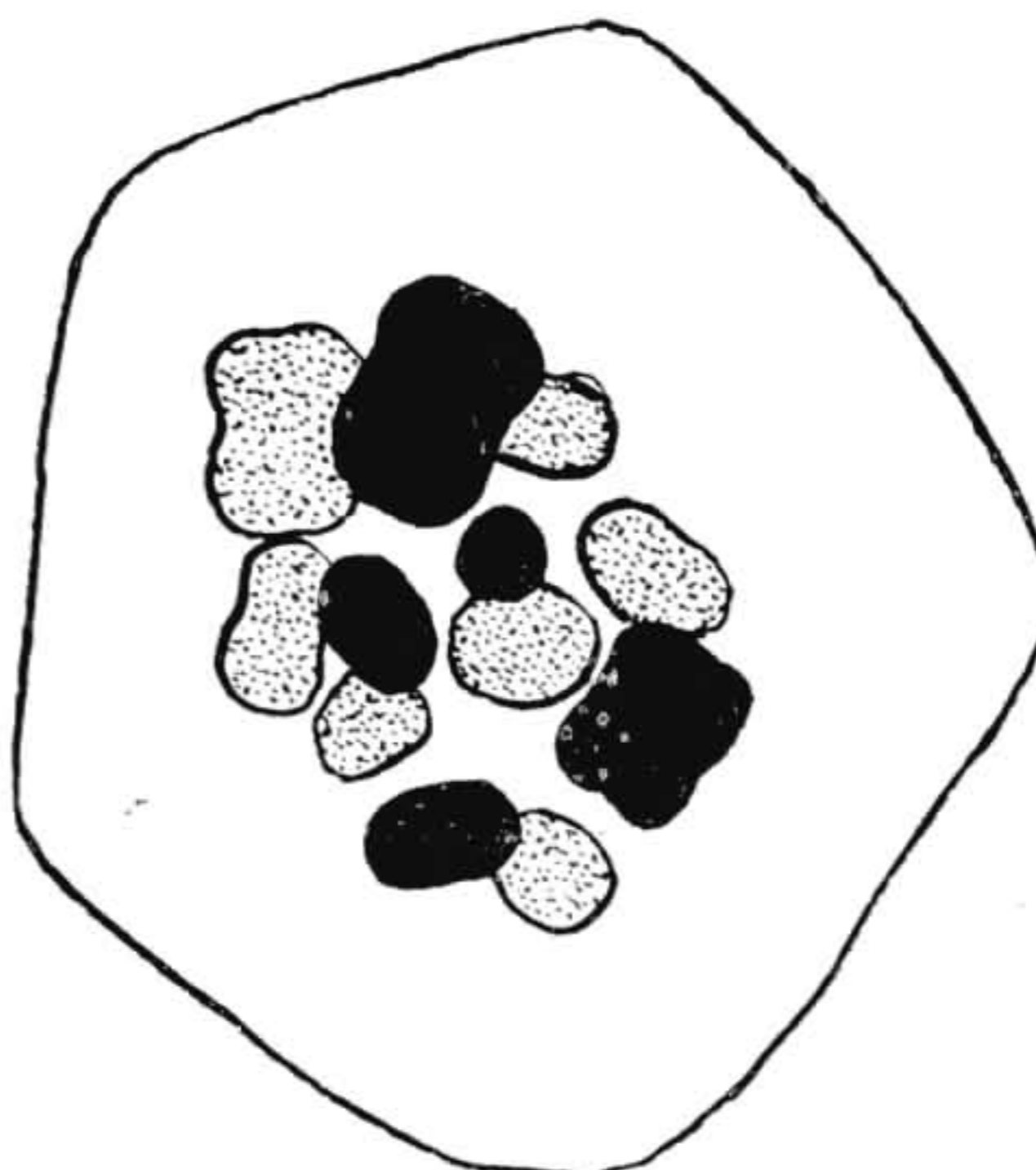


Fig. 15

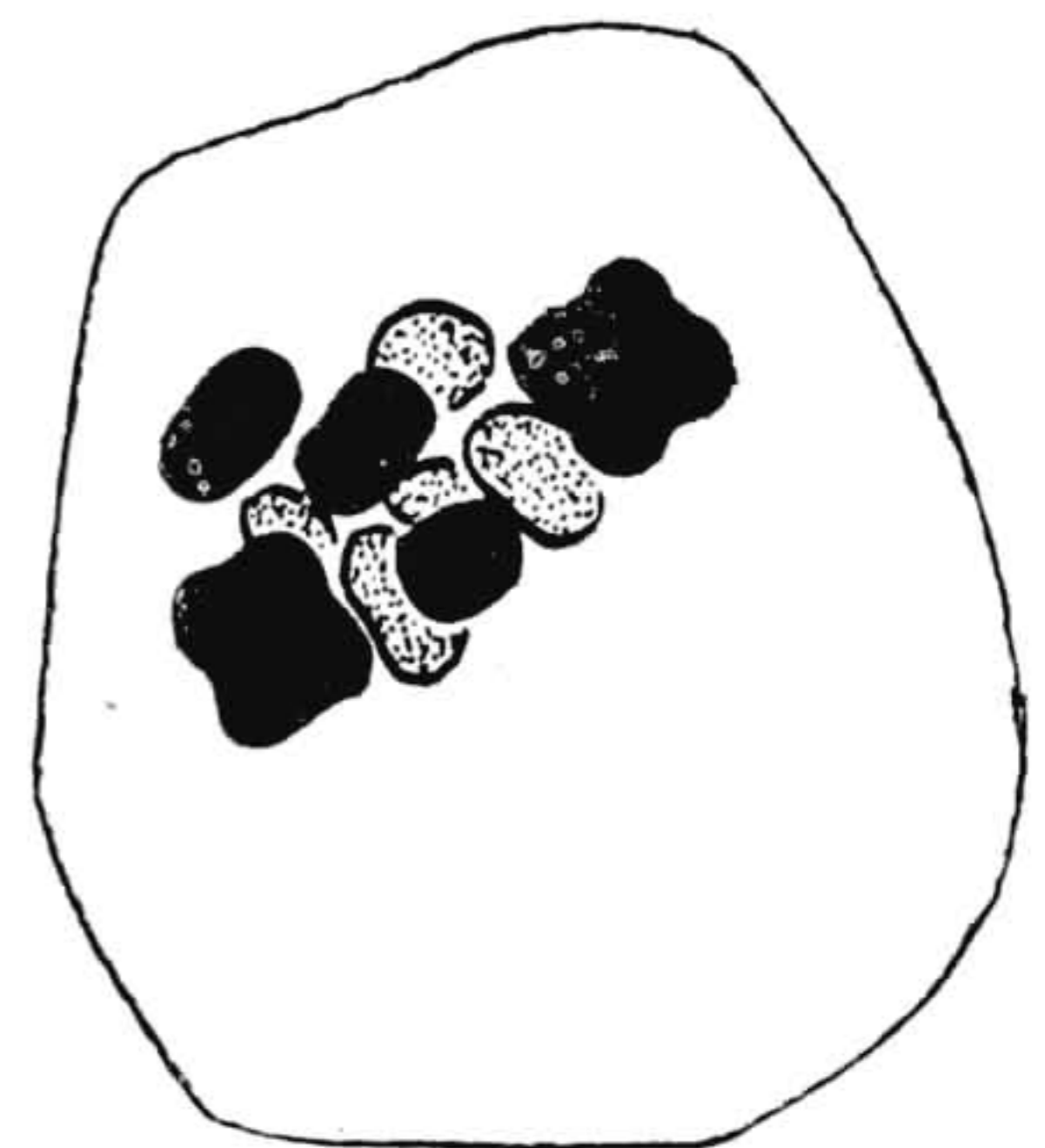


Fig. 16

tamanhos variáveis. Nos preparados por esmagamento é ainda possível distinguir as tétradas. Nas preparações por esmagamento bem forte (figs. 20 e 21), é possível observar o fenômeno da separação das tétradas, o qual torna-se bem mais evidente com 7 horas de ação da droga.

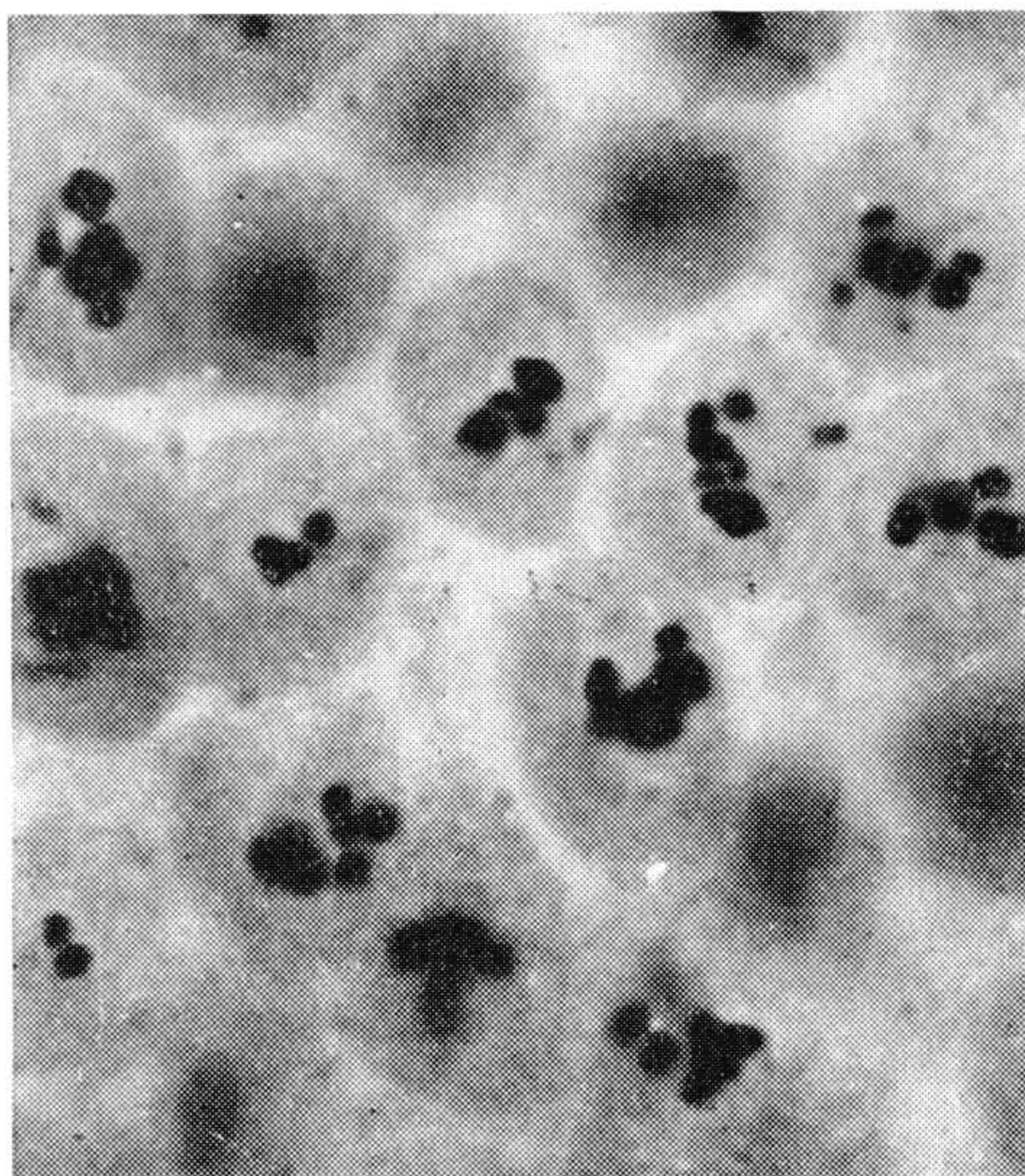


Fig. 17

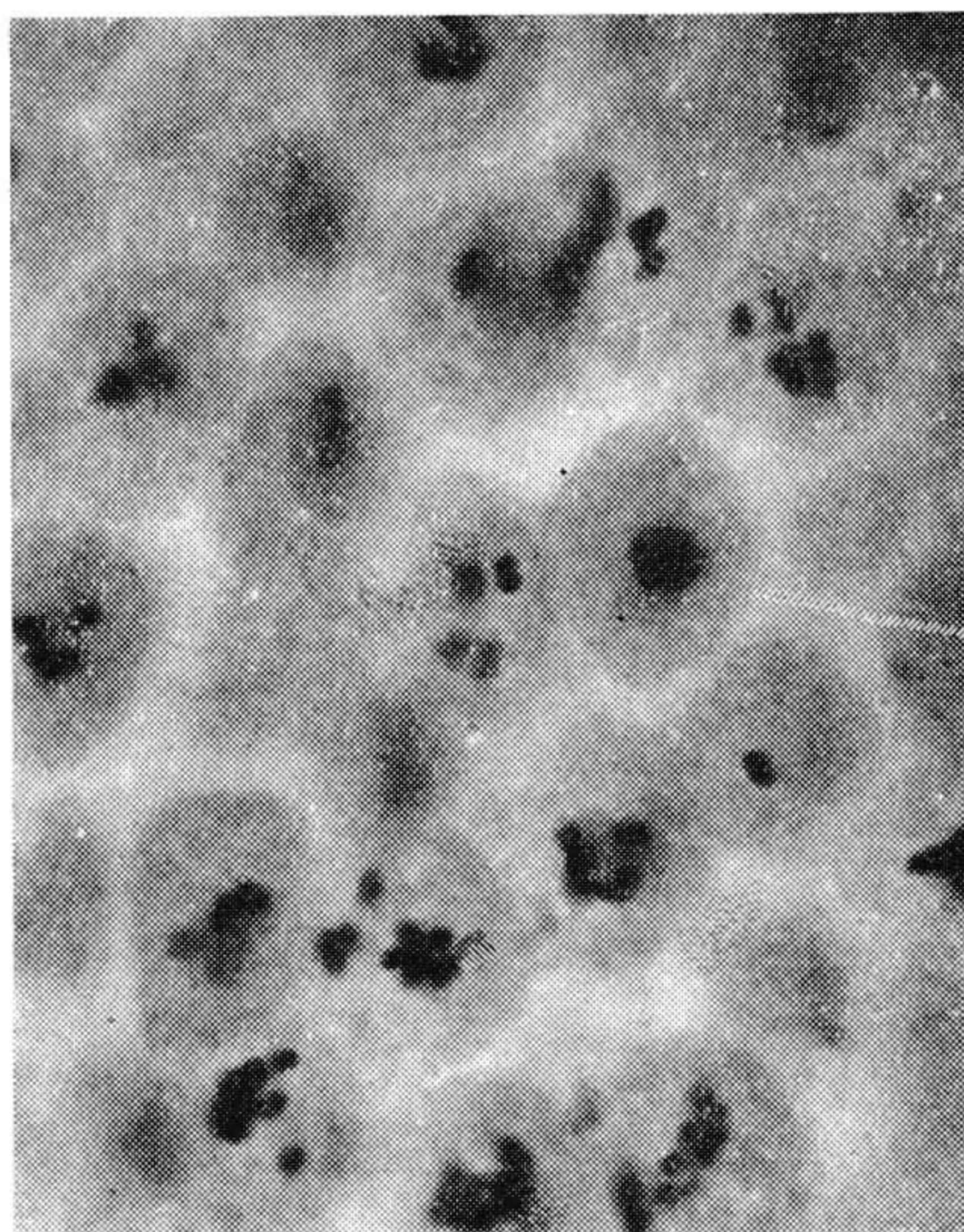


Fig. 18

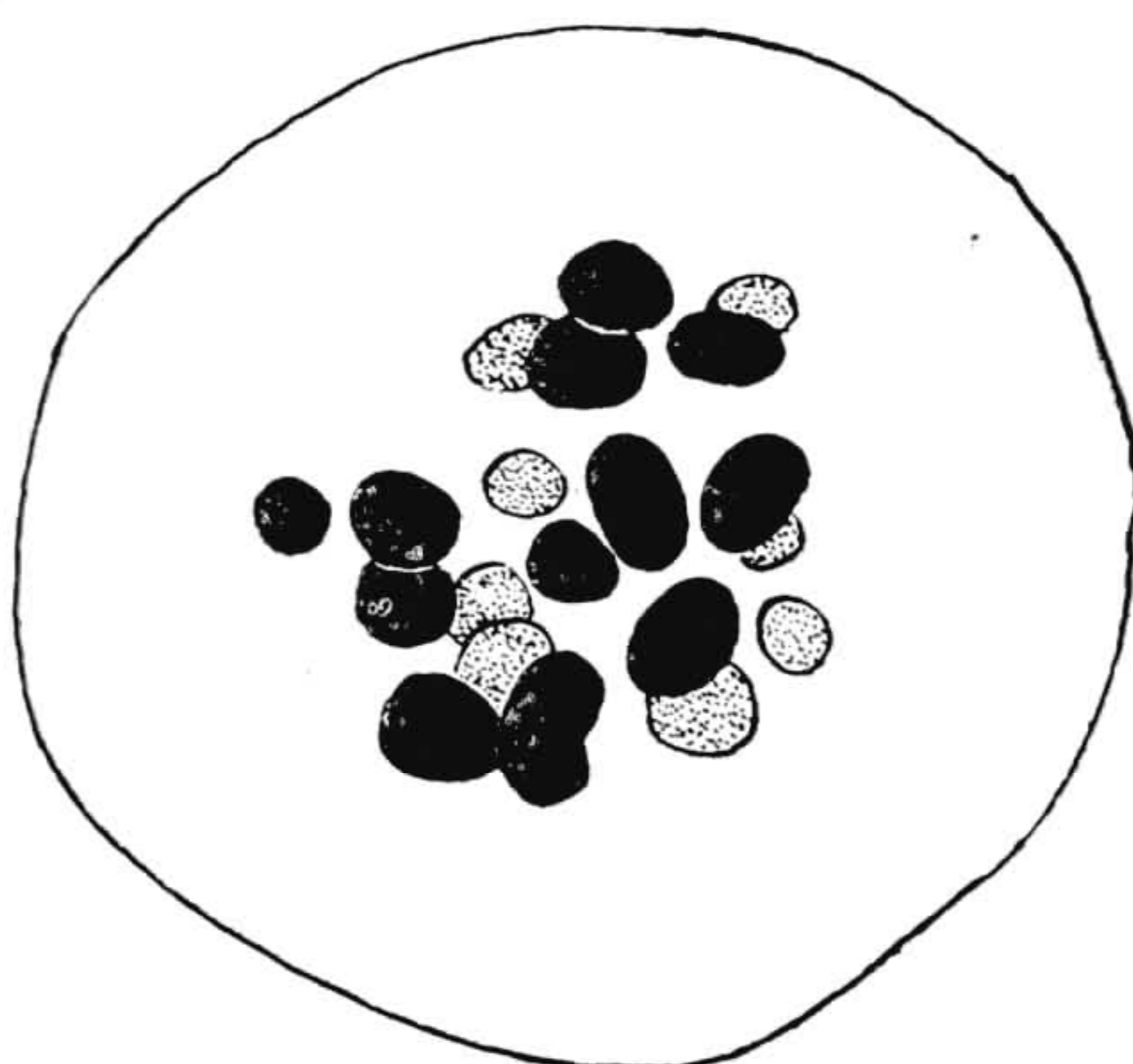


Fig. 19

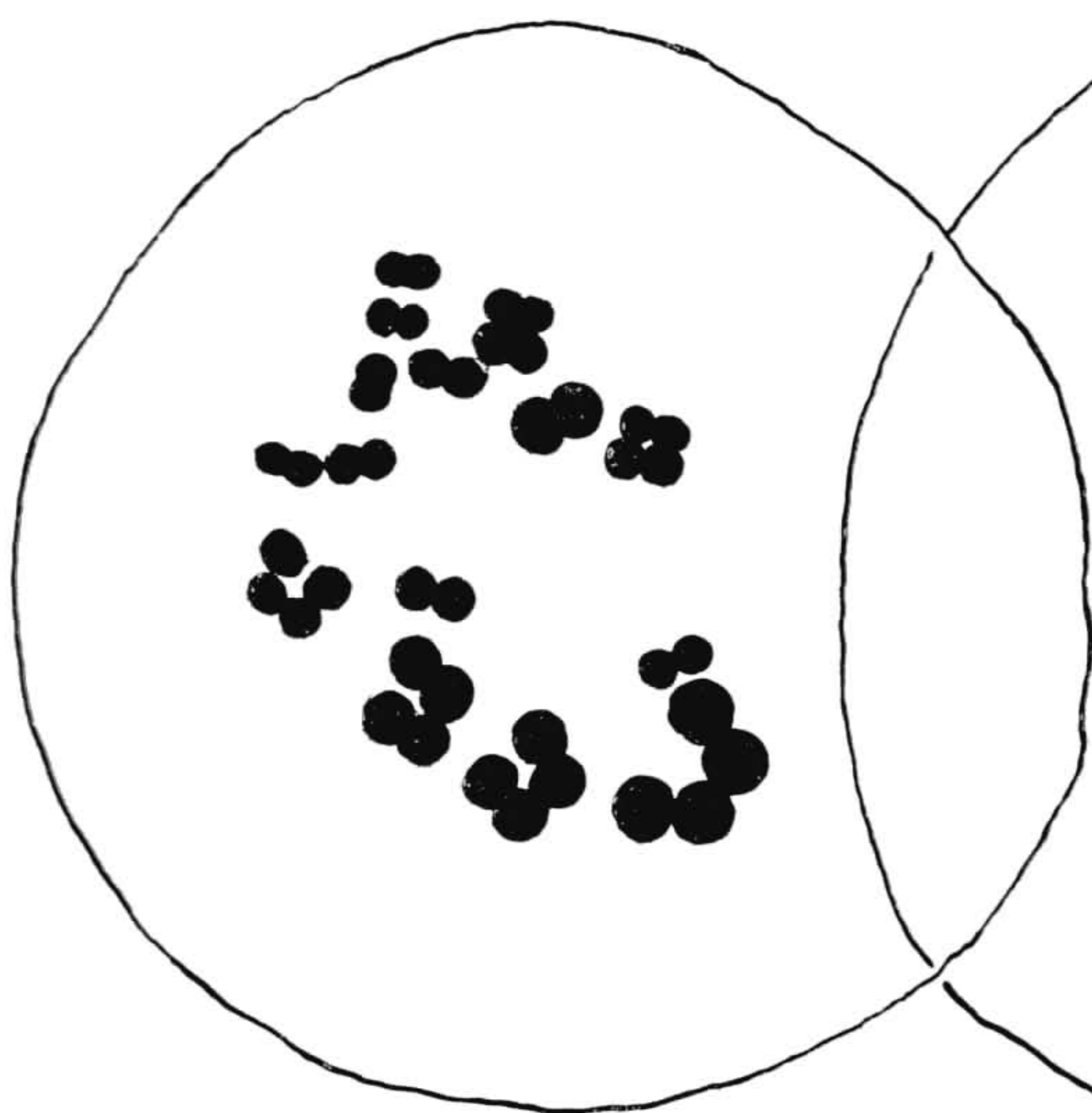


Fig. 20

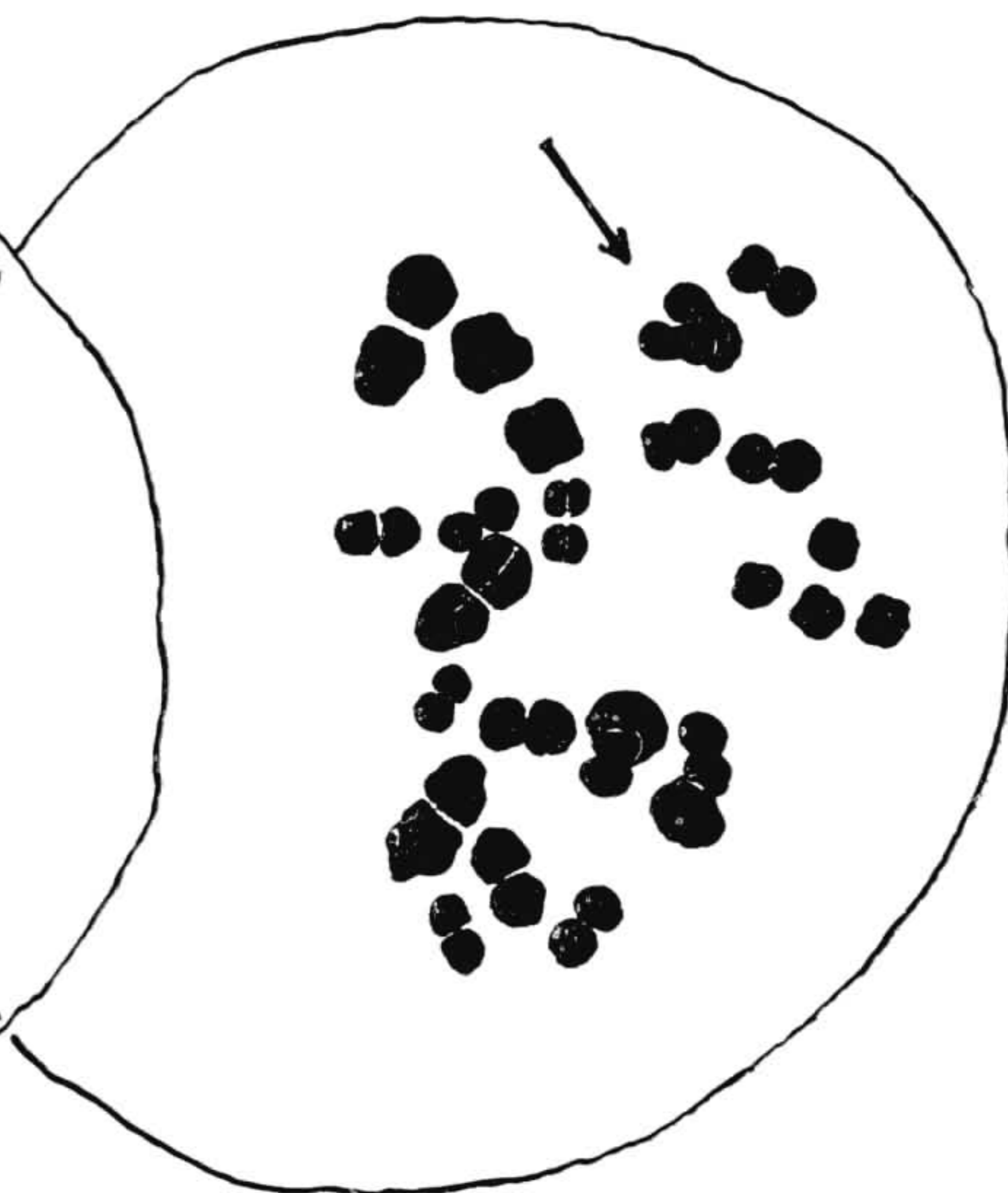


Fig. 21

mesmo em preparações histológicas. Portanto, pode-se excluir a objeção da rotura das tétradas pela própria ação do esmagamento. Na fig. 17 podem-se contar 20 elementos, alguns dos quais evidentemente duplos, indicando a separação de alguns dos bivalentes.

Este fenômeno é ainda perfeitamente visível nas figs. 20, 21, 22 e 23. Na fig. 21 é ainda possível verificar as relações recíprocas dos

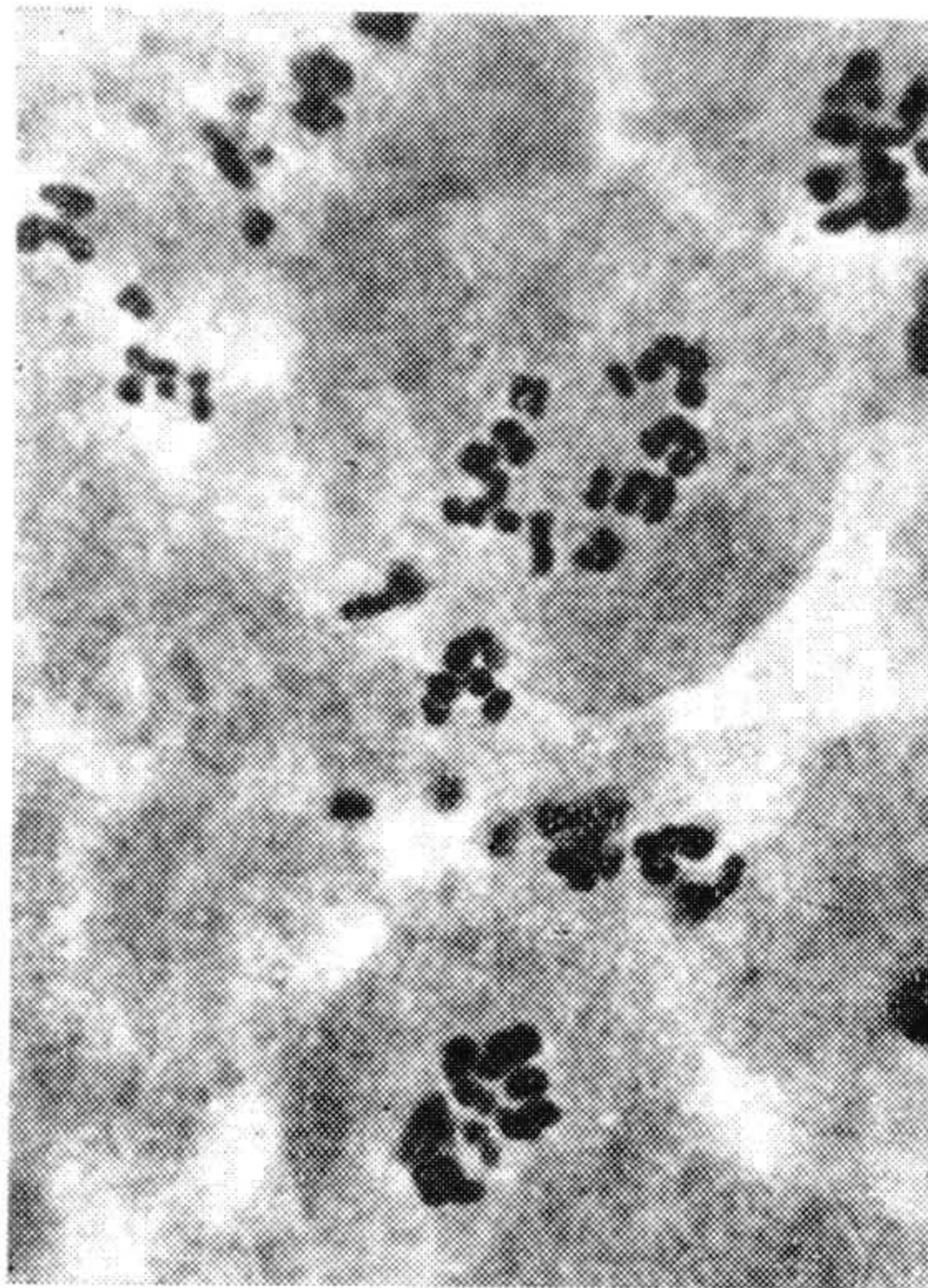


Fig. 22

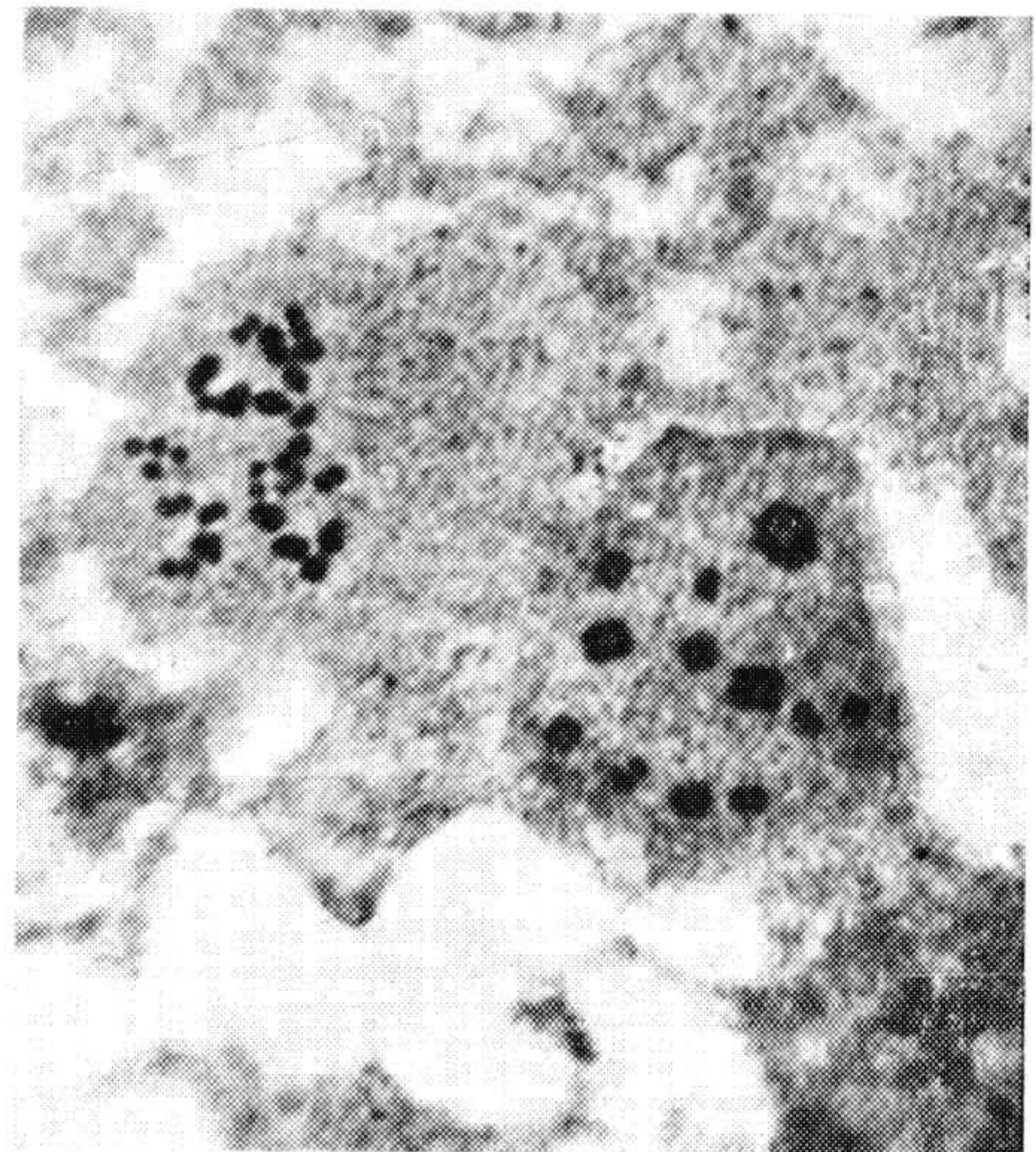


Fig. 23

univalentes, particularmente nos três cromosomas A, B, C. Os 44 elementos que se contam na fig. 20 são derivados da dissolução das 10 tétradas, mais os cromossomas X e Y. Na fig. 21 faltam alguns destes elementos unitários.

Esta dissolução das tétradas é o resultado da separação dos cromatídios, conseqüente à repulsão das zonas centroméricas correspondentes. Na colchicinização mais adiantada não é mais possível encontrar metáfases. Provavelmente há uma restituição dos núcleos interfásicos que, como será exposto mais adiante, correspondem aos núcleos gigantes das espermatídes. Grandes zonas necróticas encontram-se nos testículos colchinizados o que indica uma morte de elementos celulares em estádios não identificados.

3) A terceira fenda nos univalentes.

Na fig. 21 é claramente visível, em alguns univalentes que se encontram orientados num plano favorável, a existência de uma fenda que corresponde à assim chamada "tertiary split" descrita por HUGUES-SCHRADER em outros hemípteros, e também por outros autores em alguns ortópteros (anáfase II). A mesma fenda é bem visível nas tétradas de fases normais, como por exemplo nas figs. 24 (diacineses adiantadas), 26 e 27 (daicineses iniciais) e, na anáfase da I.^a divisão, na fig. 25.



Fig. 24 a

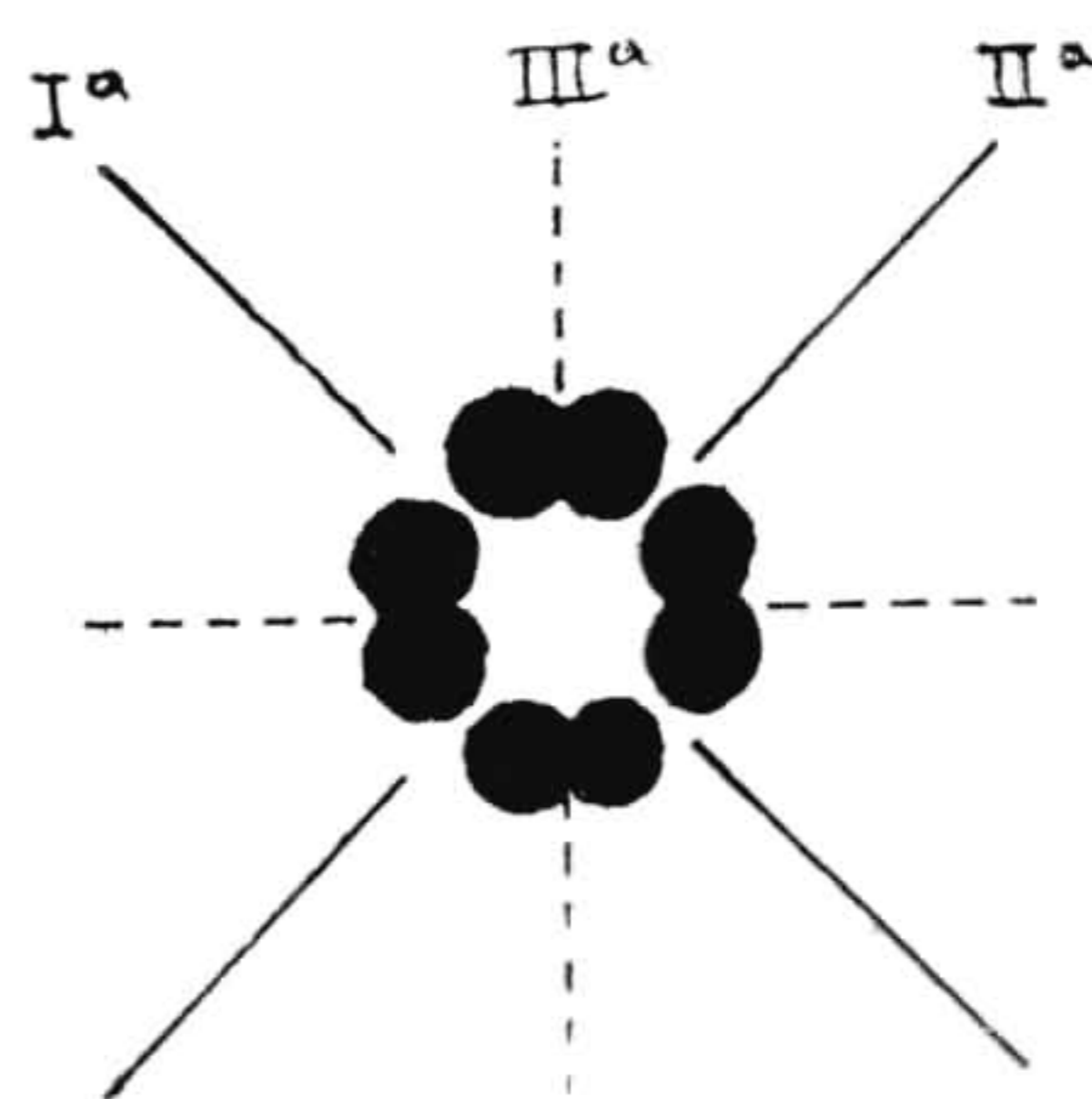


Fig. 24 b

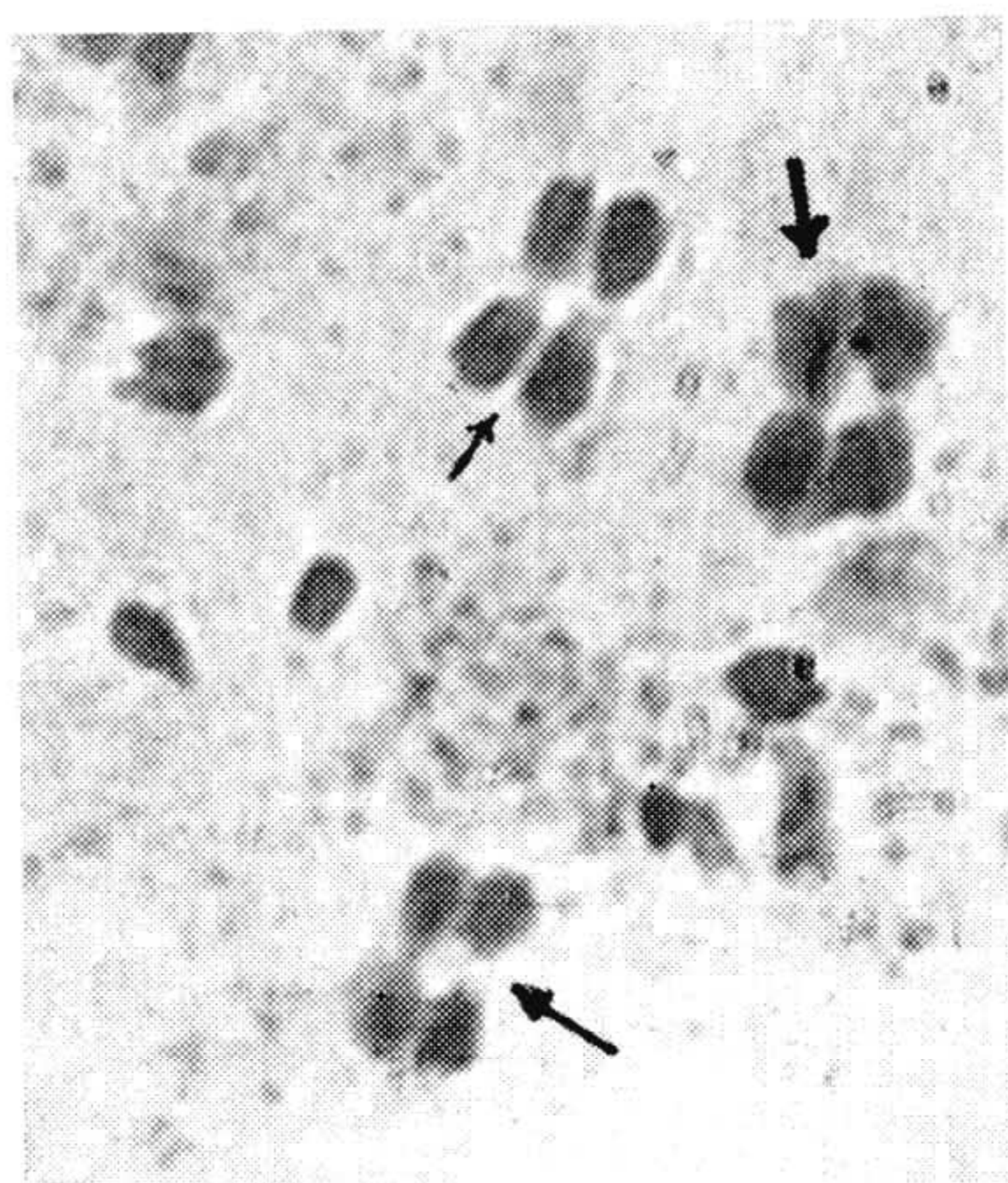


Fig. 25 a

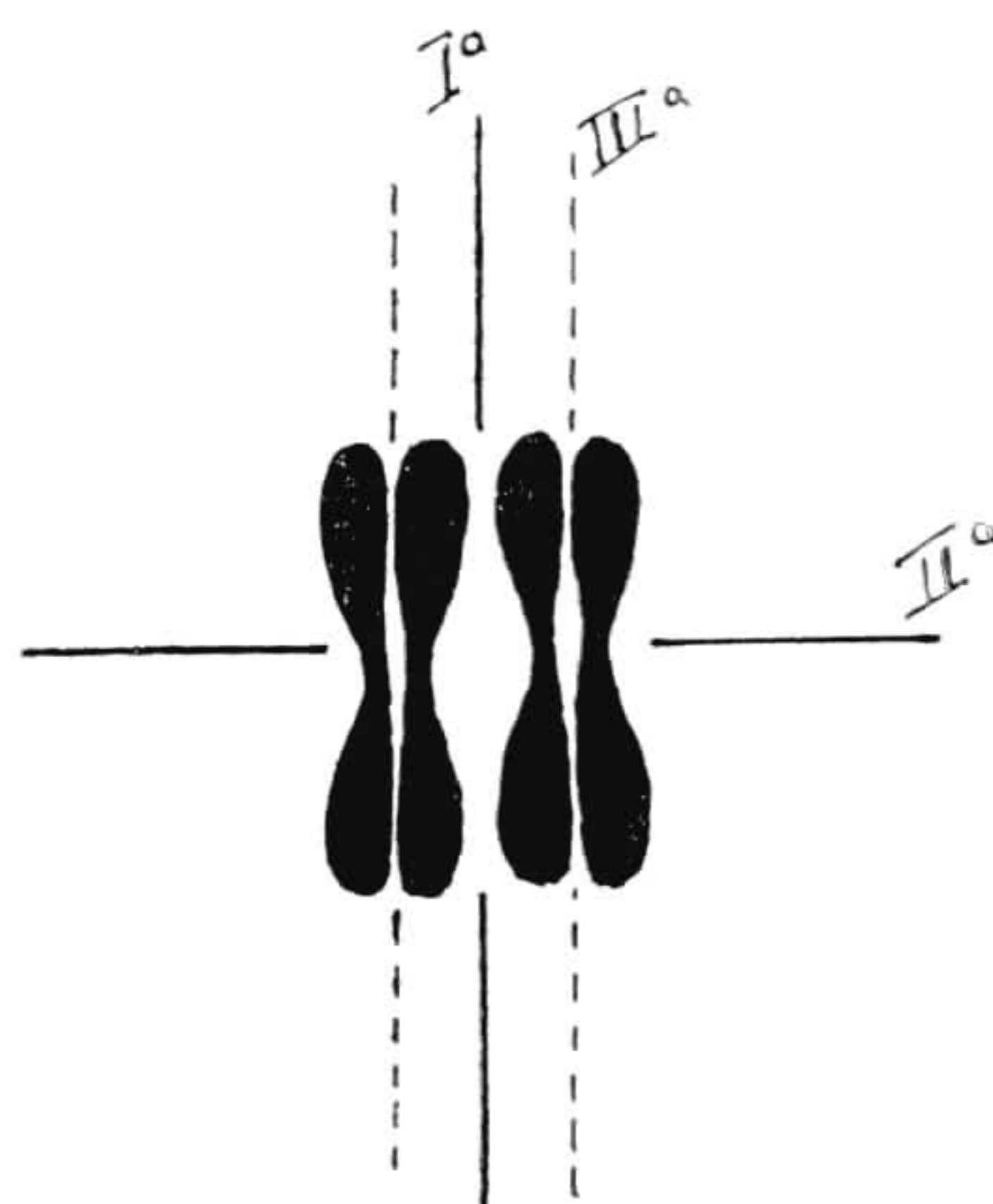


Fig. 25 b

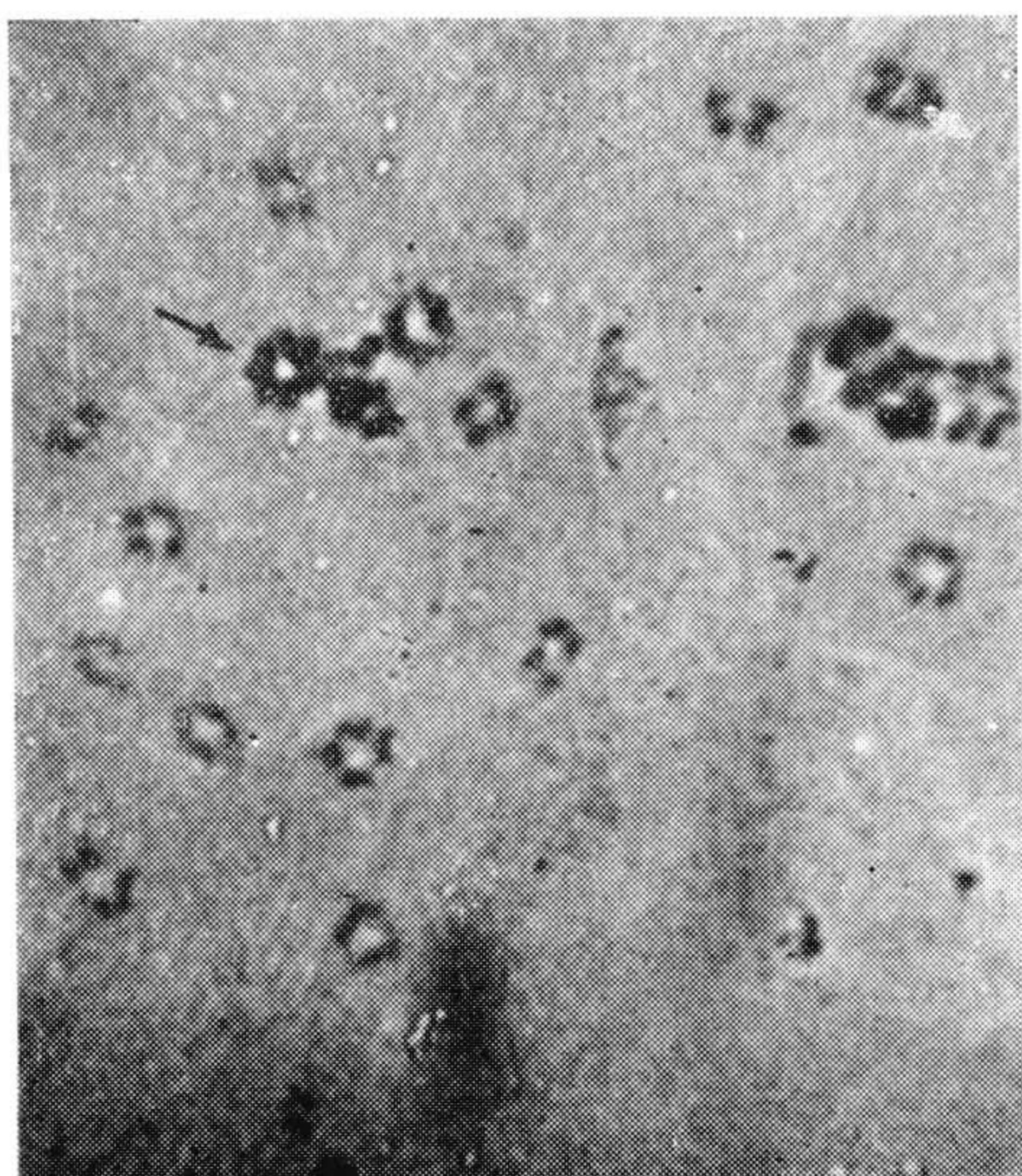


Fig. 26

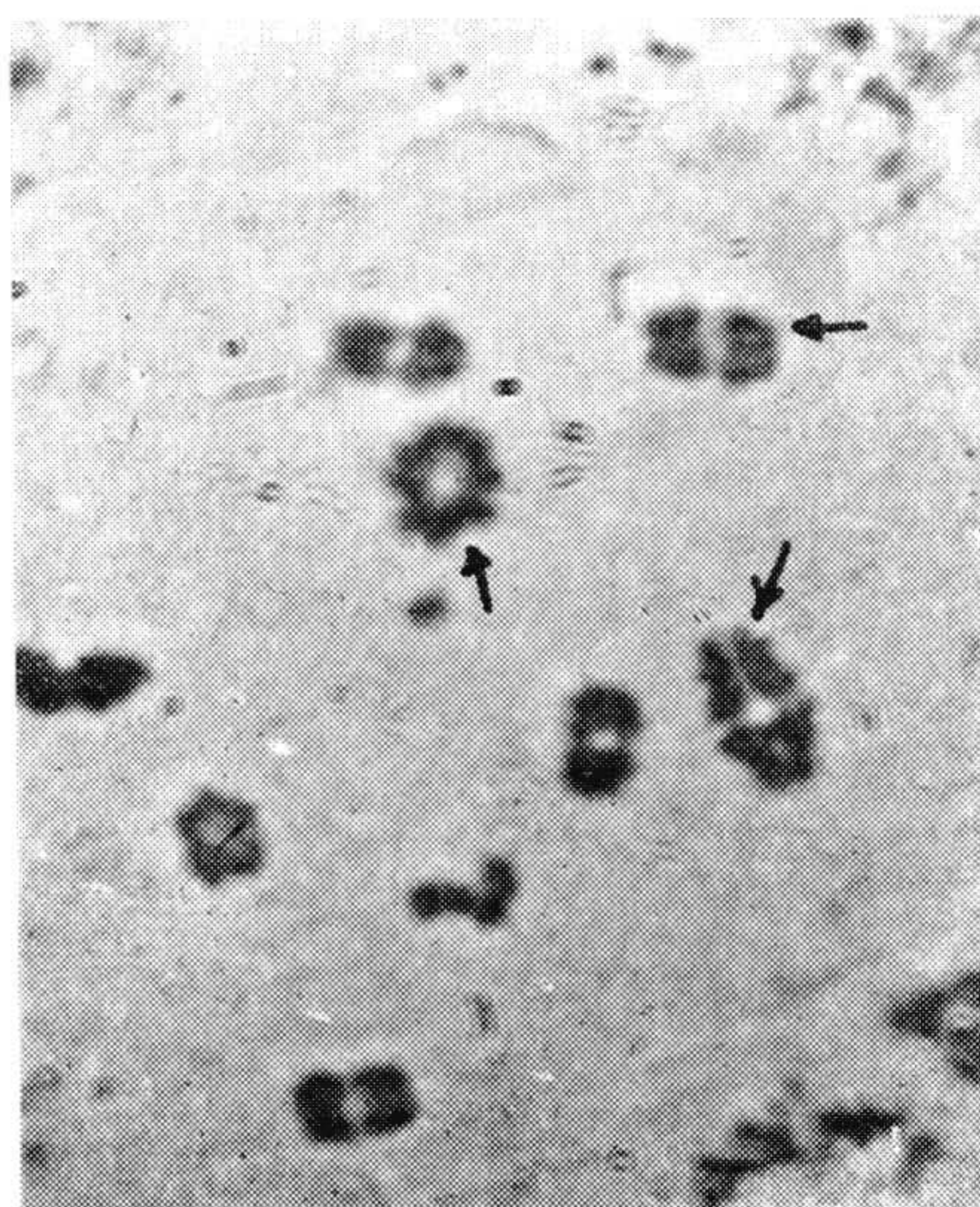


Fig. 27

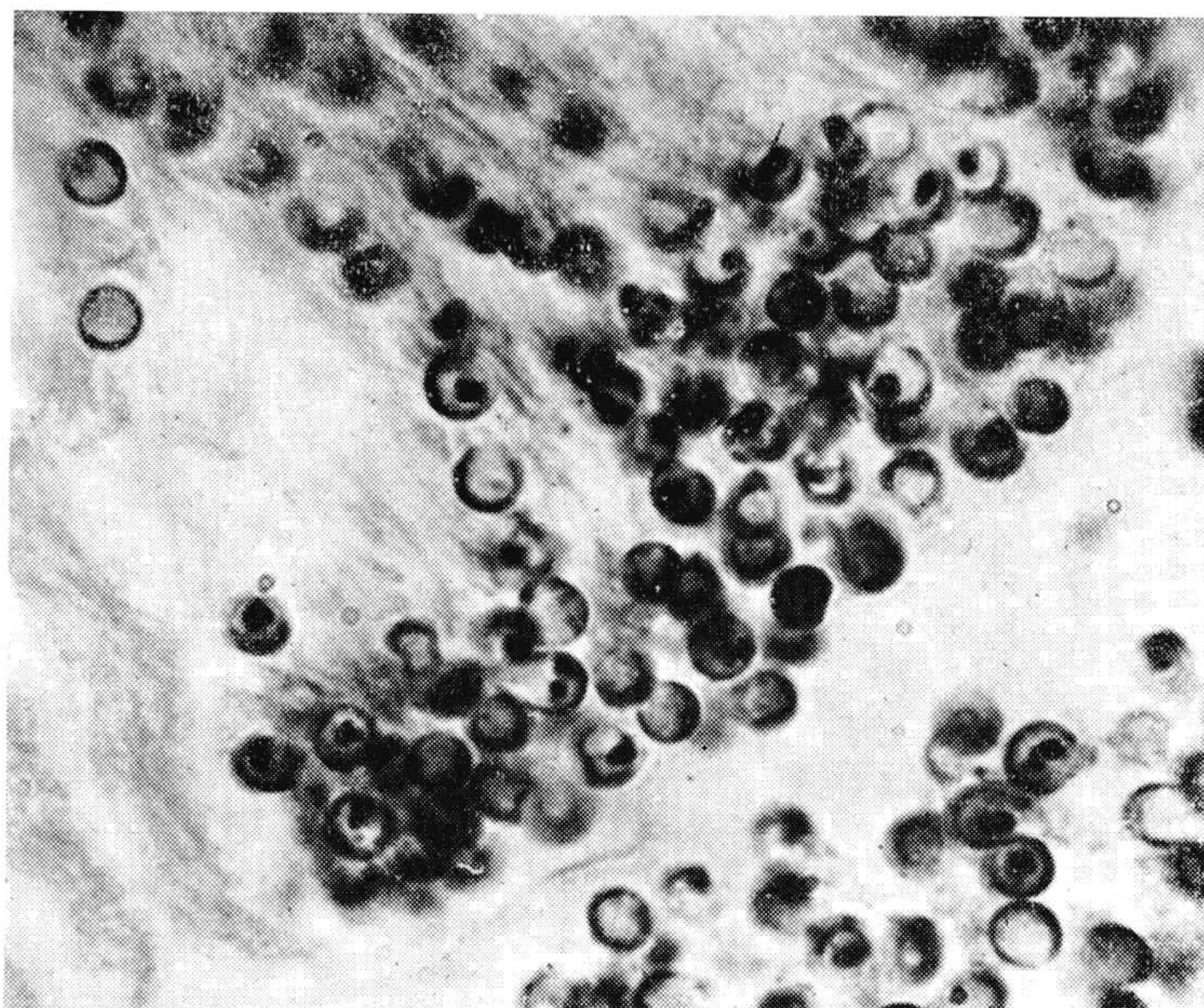


Fig. 28



Fig. 29

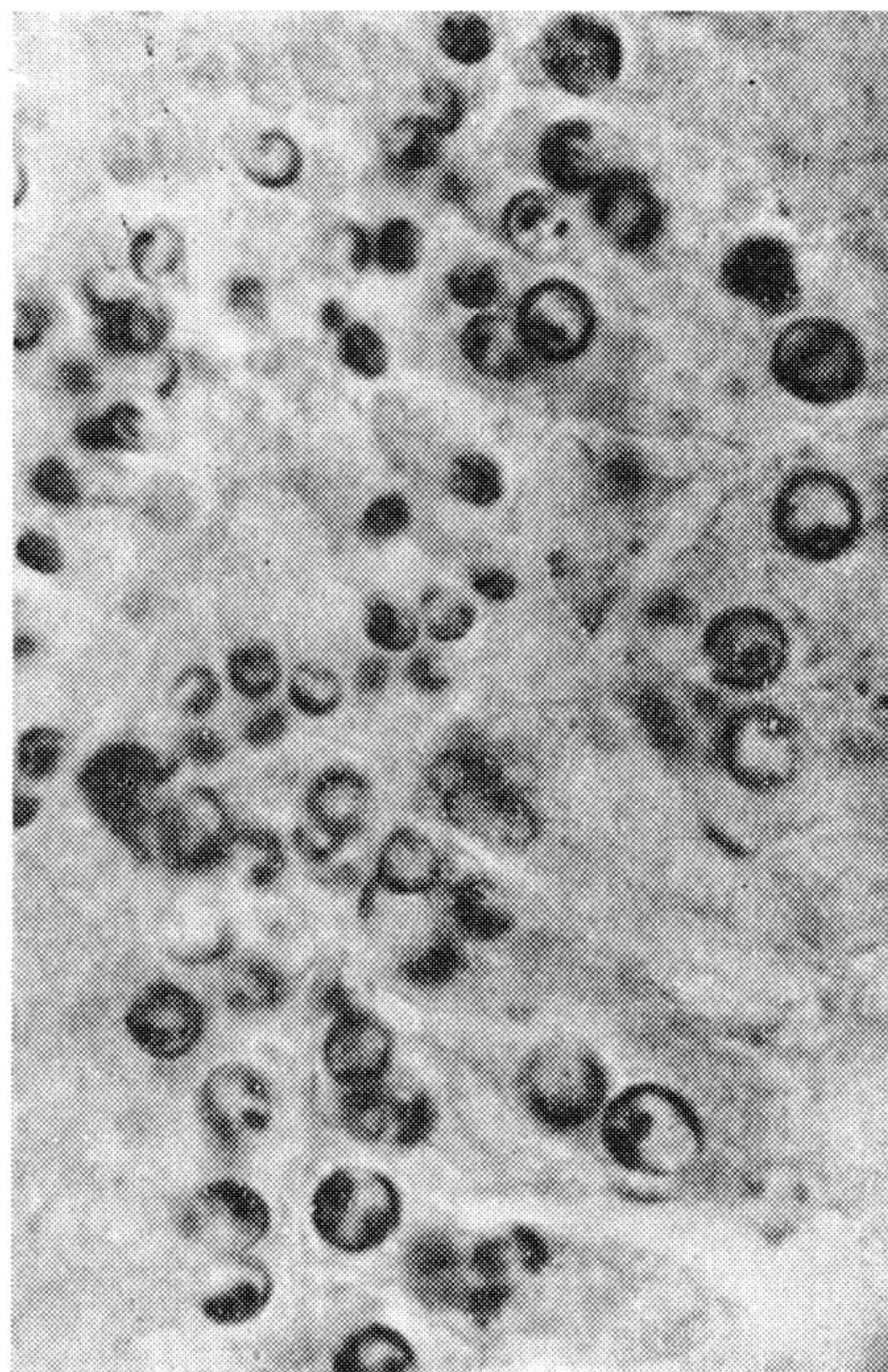


Fig. 30

Voltaremos, em seguida, sobre este fenômeno que permite estender a esta espécie o conceito da estrutura múltipla dos cromátides e que será relacionada com as fases do processo de crescimento do espermatócito I, estudadas estatisticamente.

4) Restituição de núcleos espermatídicos de tamanho diferente.

O fenômeno da espermiogênese nas primeiras fases da ação colchicínica parece não ser afetado. A fig. 28 mostra espermátides em vias de transformação após 24 horas da ação da colchicina; parecem ser perfeitamente normais. Após 9 dias de ação da droga, pelo contrário, são evidentiíssimas (figs. 29 e 30) as variações do tamanho dos núcleos das espermátides, quer dentro de um mesmo quisto, quer entre quistos diferentes.

As massas cromáticas visíveis nesses núcleos não são facilmente contáveis e pouco podem adiantar na interpretação da ploidia destas formas. É evidente que, nas formas grandes, há um maior número destas granulações que se coram fortemente com a hematoxilina férrica ("chromatin nucleolus") mas não é possível uma avaliação mais exata, devido à variabilidade do grau de fusão destas massas. Como veremos mais adiante, a análise estatística dos volumes destes núcleos pode-nos fornecer um critério mais evidente para deduzir algo sobre a origem e a significação desta variabilidade de tamanho.

b) *Pesquisas cariométricas*

I) Análise cariométrica da espermatogênese normal.

O estudo estatístico dos volumes nucleares dos espermátídios mostrou uma notável variabilidade desses volumes. Na tabela II e fig. 31 e 32 aparecem claramente dois fatos fundamentais: 1) o histograma

TABELA II

CÉLULAS	Volume modal (unidades convencionais) (*)
Espermátides Contrôle.....	375
Espermátides (Colchic. 2h.).....	446
Espermatogônias em repouso.....	446
Prófases espermatogoniais.....	849
Prófases espermatogoniais (tetraploides).....	1 670
Leptotenos.....	802
"Confused stage".....	1 763
Série de espermátides colchicinizadas	
I. ^a moda.....	414
II. ^a ».....	875
III. ^a ».....	1 592
IV. ^a ».....	3 073

* mm³ ao aumento do desenho.

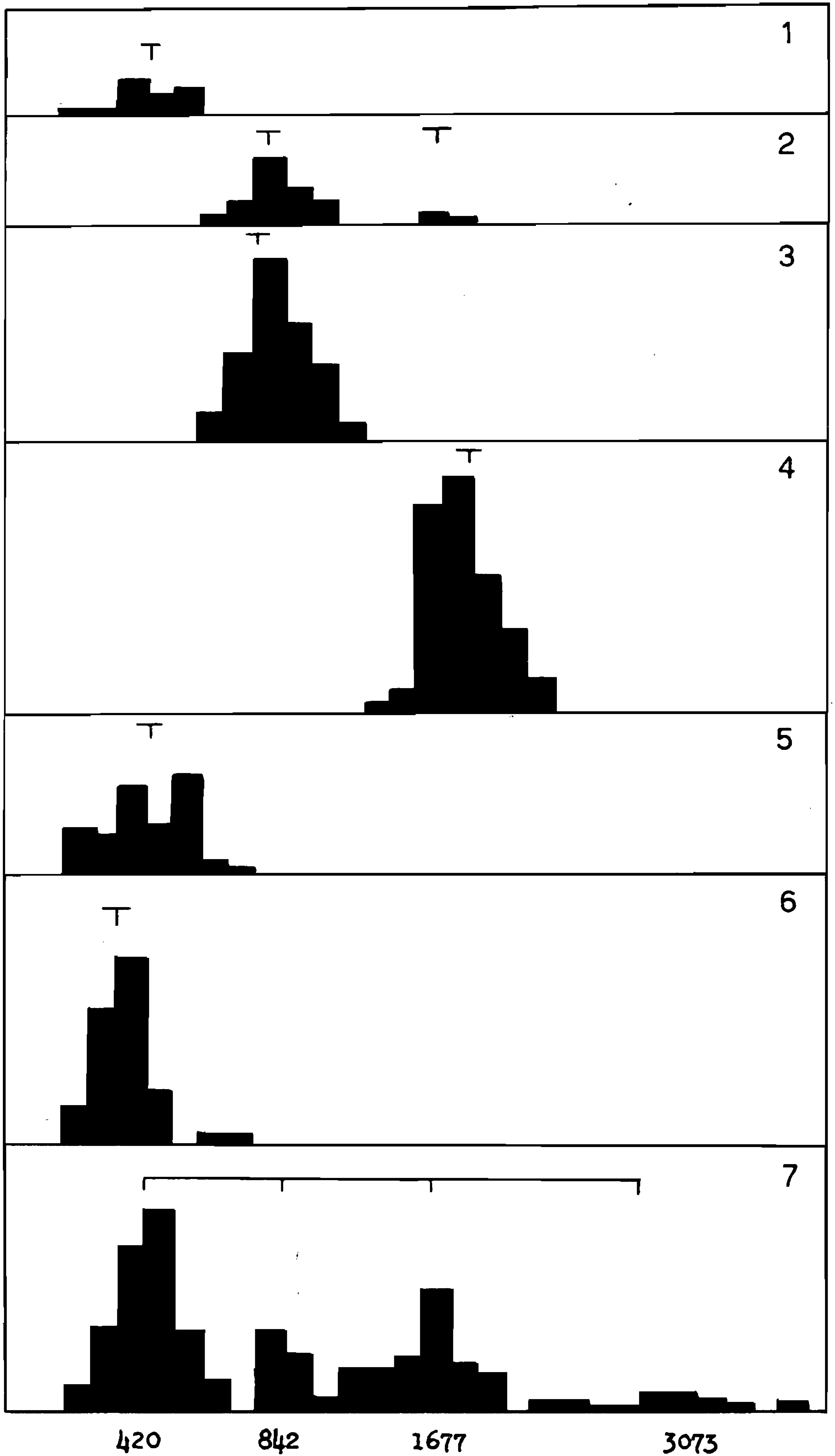


Fig. 31

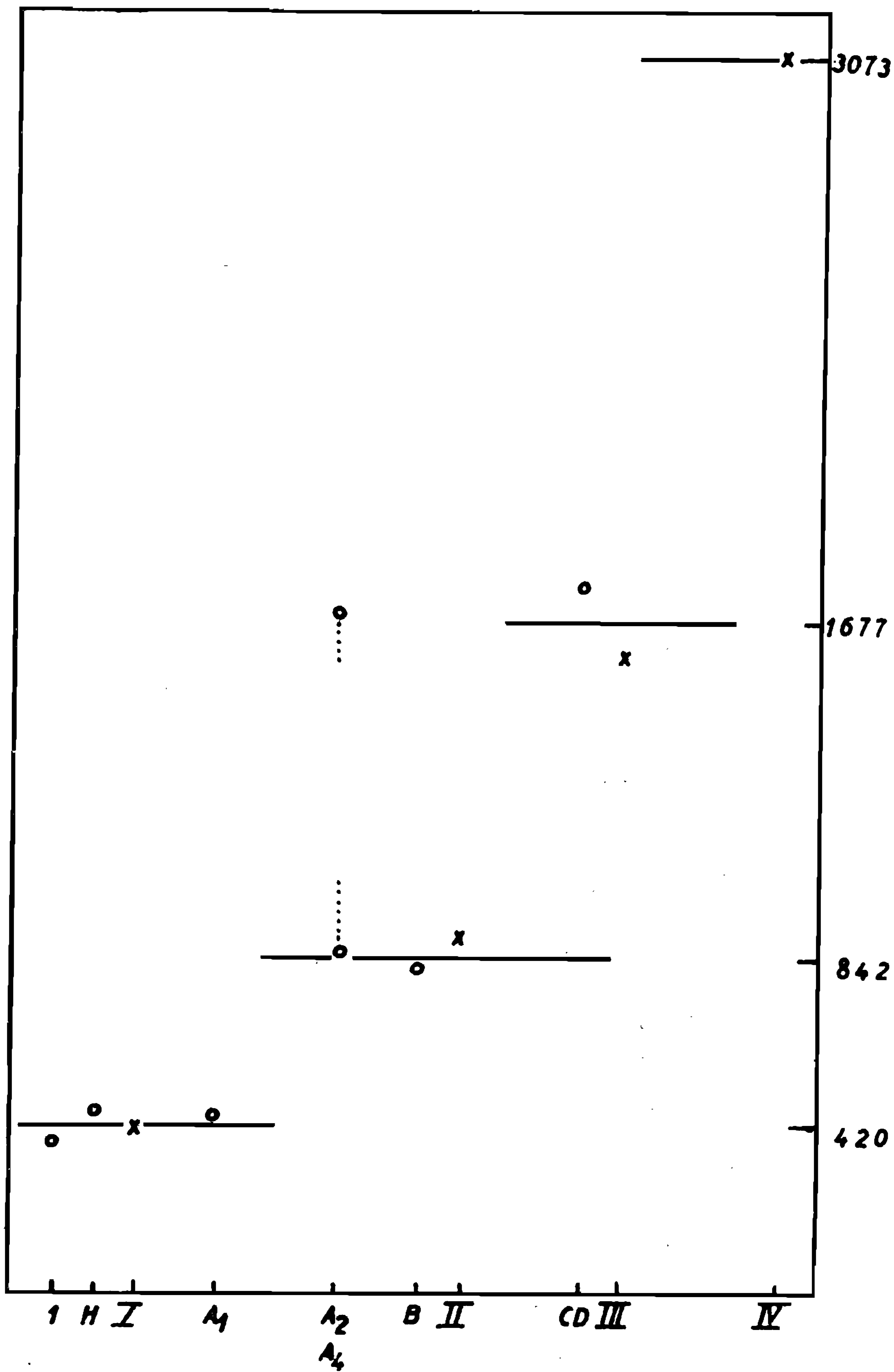


Fig. 32

dos volumes nucleares é polimodal. As modas calculadas têm os valores de 420 — 842 — 1677 e, provavelmente, 3073.* Estes algarismos estão na relação de 1:2:4:8. As modas dos histogramas, menos a última, são perfeitamente distintas e indicam, pelo menos, a existência de 4 categorias de espermátides, cujos volumes nucleares formam uma série geométrica regular.

Pelos numerosos dados obtidos em pesquisas cariométricas, sabemos que nos núcleos em repouso o volume nuclear é proporcional ao valor múltiplo do genoma. Podemos, portanto considerar que estas categorias de espermátides sejam correspondentes a valores múltiplos do genoma haplóide, ou seja, representam espermátides haplo-diplo-tétraplo e, possivelmente, octoplóides.

Na impossibilidade de verificar, pela contagem de cromosomas, o grau de ploidia nesta categoria de células que não mais se dividem, recorreremos à comparação destes volumes modais com os volumes nucleares dos demais estádios espermátogenéticos, cujo valor múltiplo do genoma está conhecido.

Não podemos aqui lembrar todo o conjunto das pesquisas cariométricas sobre a espermátogênese. Nos trabalhos precedentes de um de nós (SCHREIBER [32, 34]) encontra-se a tratada detalhada deste assunto.

Lembramos aqui, resumidamente, o seguinte: num esquema típico de meiose, como por exemplo, a que foi estudada nos ofídios, a espermátogônia em repouso tem um volume nuclear 1. Este volume aumenta durante a interfase das divisões mitóticas proliferativas das gônias, até alcançar a prófase gonial, que tem um volume 2. A divisão mitótica reintegra o volume 1 das duas gônias assim formados. Na prófase meiótica o volume nuclear aumenta também até alcançar o volume 2 no paquiteno e na diacinese inicial. A primeira divisão meiótica forma dois espermátócitos de segunda ordem cujos volumes nucleares são iguais a 1 e, portanto, igual ao volume de um núcleo diplóide. A segunda divisão meiótica forma 4 espermátídios cujo volume nuclear é igual a 0,5. Os volumes da série: — cito I — cito II — ide, estão portanto na relação 4:2:1, exatamente como o número dos respectivos genomas haplóides.** A pesquisa cariométrica da meiose no *Triatoma infestans* revelou alguns fatos novos que, de um lado, complicam ligeiramente

* mm³ ao aumento do desenho.

** Nos insetos, às vezes, o crescimento auxocitário iniciado após o estágio de leptoteno, é, em certos lóbulos do testículo, diferente do que em outros. Este fenômeno, é, às vezes, ligado a uma heteroploidia (SCHRADER 26-27) e sucessiva degenerescência dos espermátócitos naquele lóbulo. Outras vezes (SCHRADER e LEUTCHEMBERGER [29]) o crescimento auxocitário neste lóbulo diferente, forma espermátócitos em "diffused stage" 4 vezes maiores como volume nuclear e celular. SCHRADER verificou este fenômeno no pentatomídeo *Arvelius* no qual este crescimento com caráter rítmico, parece não ser relacionado com variações genômicas sendo o número e o tamanho dos cromosomas aparentemente igual ao normal. Neste mesmo caso, porém, SCHRADER e LEUTCHEMBERGER verificaram que, embora o RNA e as proteínas aumentem 4 vezes, correspondendo ao crescimento rítmico do volume nuclear, o teor do DNA, pelo contrário, fica normal. Em outros casos ainda analisados com o mesmo método de análise fotométrica dos ácidos nucleínicos (SWIFT [37]) o volume nuclear rítmico é estrita-

o esquema acima mencionado, mas são esclarecidos pelos fenômenos citológicos estudados paralelamente. O gráfico da fig. 34 dá-nos uma idéia da variação do volume nuclear durante as fases da meiose no “barbeiro”. Êstes fenômenos foram descritos em 1948 por um de nós (SCHREIBER, comunicação à Soc. Biol. M. G. [32]) e serão desenvolvidos ulteriormente com critérios estatísticos mais detalhados. Neste trabalho futuro serão dadas as tabelas completas. Queremos somente resumir aqui êstes fatos, que nos permitem reconstruir o processo de formação das diferentes categorias de espermatídeos no “barbeiro” colchicinizado e homologá-los às células de ploidia conhecida.

No *Triatoma infestans*, a espermatogônia tem um volume que chamamos de 1 (igual a 420 mm^3 no desenho) e as prófases mitóticas das gônias têm volume 2 (842 mm^3). Além dêstes, existem poucas prófases com volume duplo (1600) que, evidentemente, correspondem àquelas raras metáfases tetraplóides que tivemos ocasião de mencionar no trabalho precedente. A fig. 33 representa uma destas metáfases. As primeiras fases da prófase meiótica (lepto-zigoteno) têm o volume nuclear

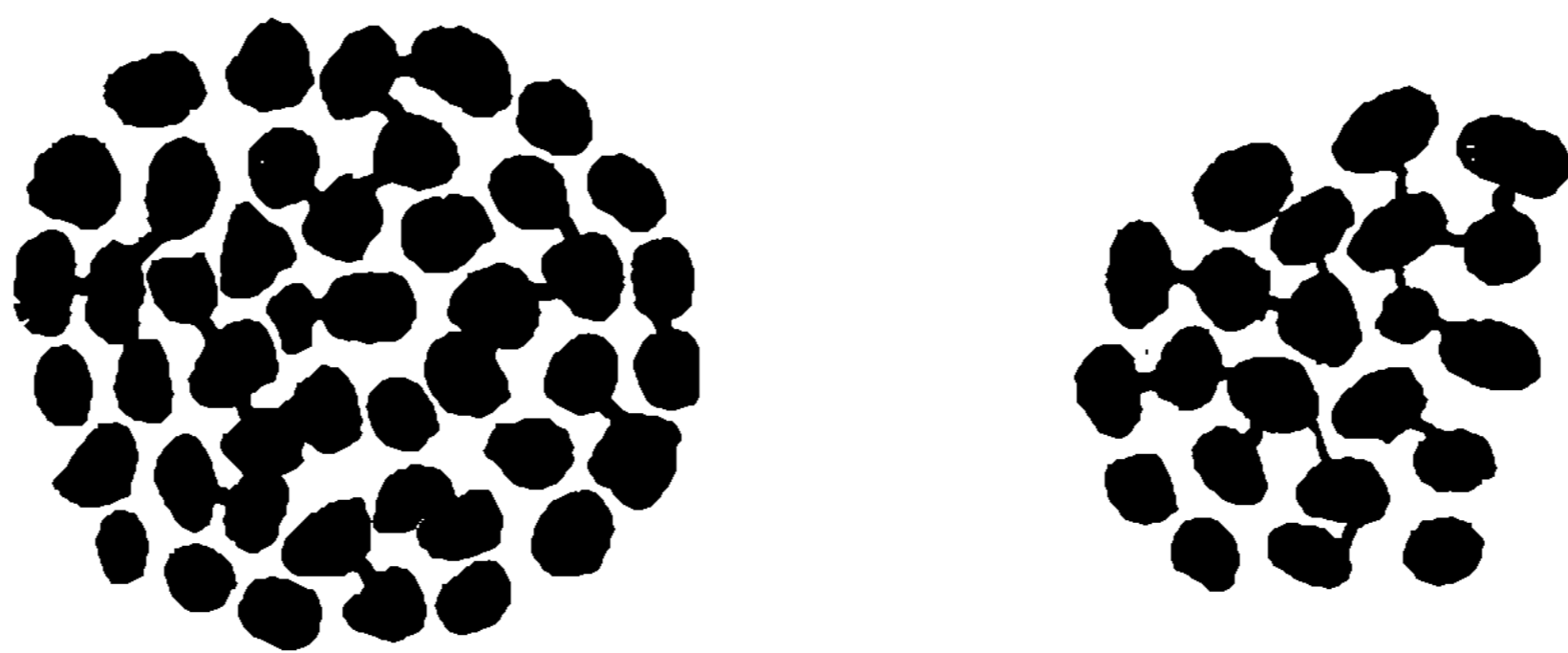


Fig. 33

exatamente igual aos das prófases mitóticas goniais (842). Isto indica, provavelmente, que se dá o início da prófase meiótica em lugar da prófase mitótica, e não como nos demais casos (vertebrados), a partir de uma espermatogônia em repouso, logo após uma divisão mitótica. Os estádios que se seguem (paquiteno) nos hemípteros, são de difícil observação citológica e foram denominados de “confused”, ou “diffused stage”. Ao se iniciar esta fase, o núcleo aumenta de volume até alcançar o duplo do estágio precedente, chegando, portanto, mais ou menos, a ser igual ao volume das prófases tetraplóides (1600).

A fase sucessiva de diacinese tem um volume nuclear bastante aumentado, com grande variabilidade e deformações.

As duas divisões meióticas que se sucedem sem restituição de núcleos interfásicos do espermatócito de II.^a ordem, dão lugar à formação de 4 núcleos de espermátide de volume 1 (420).

mente proporcional ao número de genomas (meiócitos) e mostra uma estrita correspondência com a quantidade da DNA. Como o estudo das variações rítmicas do volume nuclear durante o ciclo mitótico normal e na endoploidia normal e patológica indicam existir uma relação direta entre volume nuclear e genoma, devemos considerar os resultados anômalos das determinações de SCHRADER e LEUTCHTEMBERGER no *Arvelius* como indicantes de condições especiais, embora muito importantes, cuja significação é ainda obscura.

A situação aqui é, portanto, a seguinte: a partir da gônia em repouso, dá-se o crescimento de tipo "rítmico" com dois ciclos de duplicação; o primeiro, até o leptozigoteno, e o segundo, no "confused stage". Este crescimento auxocitário se inicia, portanto, a partir de um núcleo de tamanho correspondente ao das prófases mitóticas. Devemos pensar que, pela correspondência estabelecida entre genomas e volume nuclear, estes núcleos têm quatro genomas. No segundo ciclo de duplicação, estes passam a ser em número de oito. As divisões meióticas distribuem estes genomas em 4 espermatídeos que, apesar de terem um número haplóide de cromosomas, têm volume nuclear correspondente a uma célula diplóide. É possível, portanto, que os cromosomas do complemento haplóide do espermatídeo sejam constituídos por 2 cromonemas ou cromatídeos. Este fato novo, revelado pela análise cariométrica, será analisado nos seus aspectos citológicos representados pela "terceira fenda", característica dos cromosomas meióticos dos hemípteros.

É importante assinalar que os volumes modais: 1-2-4, respectivamente, 400-800 e 1.600 dos espermatídeos colchicinizados, correspondem perfeitamente aos volumes nucleares dos estádios meióticos respectivos: haplo-diplo e tetraplóide. Chamamos aqui de tetraplóide, para simplificar, o espermatócito de I.^a ordem que tem quatro genomas, mesmo que estes sejam distribuídos em número diplóide de cromosomas com dois cromatídeos. As pesquisas citológicas e estatísticas de BIESELE-POYNER-PAINTER (3) demonstraram, pela distribuição estatística dos organizadores dos nucléolos, que o poliploidismo e a politenia cromosômica têm o mesmo efeito sobre o volume nuclear modal.

É perfeitamente lícito pensar que as três categorias múltiplas de espermátides formadas nos testículos colchicinizados após 9 dias, sejam o resultado da restituição, sob forma de núcleos interfásicos, das células em I.^a e II.^a metáfases bloqueadas e, portanto, respectivamente, tetra e diplóides, junto com uma certa quantidade de espermátides haplóides normais derivadas da continuação do processo meiótico iniciado antes da ação da colchicina.

TABELA III

Volumes modais	Volume modal	Valor teórico
I Espermátogônias — repouso-espermátides-primeira moda	420	4
II Prófases goniais — Leptotenos espermátides—segunda moda	842	8
III "Confused stage" — espermátides—terceira moda	1 677	16
IV Espermátides—quarta moda	3 073	32

As espermátides de volume maior do que aqueles considerados como tetraplóides, são mais difíceis de serem explicadas por este mecanismo.

Podemos supor que a pequena quantidade de gônias teraplóides normalmente presentes nos testículos de hemípteros podem, pelo mesmo processo de bloqueio colchicínico, dar núcleos de restituição com volume máximo, representado nos histogramas da fig. 31, n.º 7. Não se pode porém excluir a existência de fenômenos de fusão, seja nas primeiras metáfases, seja nas diacineses, como alguns autores têm descrito (DARLINGTON [5]) e que poderiam levar aos núcleos gigantes em questão.

O resultado da ação da colchicina após 9 dias da injeção é, portanto, o bloqueio das divisões celulares das fases normais da espermatogênese com a conseqüente formação de núcleos interfásicos com conteúdo múltiplo.

IV — DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

a) Ação da colchicina sobre o testículo e o poliploidismo natural na espermatogênese.

Como foi assinalado na introdução, são conhecidos nos insetos casos de poliploidismo das células germinais e particularmente das espermatogônias. As pesquisas de MICKEY (17-23) e col. em *Romalea microp-tera* (Ortoptera) evidenciaram a série da espermatogênese derivada destas espermatogônias tetraplóides com a formação de espermatozoides gigantes com centríolos e filamentos axiais múltiplos. DARLINGTON (5) relata a existência, em gafanhotos, (*Schistocerca paranaense*, *Chromacris*, *Elasichora* e *Chrotippus*) de espermatócitos poliplóides e aneuplóides e admite a origem destas células de núcleos tetraplóides preexistentes ou de células binucleadas, fusão de estádios diacinéticos adiantados, orientação radial dos fusos nas divisões espermatogoniais e fusão conseqüente dos dois grupos anafásicos centrais (*Schistocerca*).

Verifica espermatozoides de 2x, 3x e 4x caracterizados pelo tamanho, caudas supranumerárias e cabeças divididas.

Fenômenos de aneuploidismo na espermatogênese foram descritos por SCHRADER (26) no V.º lóbulo de alguns Pentatomídeos.

O fenômeno de poliplidismo na espermatogênese, em conseqüência de tratamento experimental colchicínico, é conhecido até agora por poucas pesquisas. Assinalamos, particularmente, o trabalho de DOOLEY (7), que tratou com esta droga, em doses mais ou menos iguais àquelas por nós usadas, larvas e ninfas de Ortópteros (*Grillus* e *Melanopolus*).

O estudo das fases espermatogenéticas após tempos variáveis de 5 horas até 10 dias revelou o bloqueio das divisões, conforme o quadro clássico da colchicinização. Nas células bloqueadas os cromosomas encontram-se em massas aglutinadas ou com cromosomas distribuídos irregularmente no citoplasma. Após 72 horas encontram-se células multi-nucleadas por restituição de metáfases bloqueadas.

Em *Grillus*, DOOLEY (7) verificou a formação de espermatídeos gigantes diretamente de espermatócitos primários. Esses casos, portanto, parecem perfeitamente semelhantes aos descritos acima, em *Triatoma*.

Parece evidente de todos êstes fatos que a ação da colchicina nos elementos meióticos realiza-se com as mesmas modalidades que nas células somáticas. Os fenômenos típicos da prófase meiótica parecem não ser absolutamente afetados e as diacineses são morfologicamente normais.

Durante a ação da colchicina ficam bloqueados nas espermatogônias a divisão dos centrosomas e a formação do fuso.

Nos espermatócitos de I.^a ordem fica bloqueada a formação do fuso, ao passo que as tétrades não parecem sofrer alteração alguma. Nos períodos mais adiantados da experimentação, a separação dos cromatídeos se dá como se a célula tivesse se dividido em dois espermatócitos de II.^a ordem e as tétrades se desfizessem em díades ou em cromatídeos isolados sem migração polar. Não é excluída uma certa discronia neste fenômeno, entre os diversos cromosomas. (Fig. 20 e 21).

A divisão da célula fica bloqueada mas não o processo de restituição em núcleos poliploides, que continuam o processo de espermiogênese.

* * *

Na análise estatística dos volumes nucleares dos espermatídeos pode-se verificar a existência de ampla variabilidade, nitidamente agrupada, porém, em torno dos volumes modais múltiplos do volume do espermatídeo haplóide. A comparação com os volumes modais da série meiótica normal não deixa dúvida alguma de serem êstes valores modais constituídos por espermatídeos, respectivamente, haplo- e tetraplóides.

b) *A duplicação dos genomas na espermatogênese do Triatoma infestans.*

Como aparece no esquema da fig. 34, verifica-se um primeiro ciclo de duplicação na mitose gonial normal e a prófase meiótica se inicia a partir do volume alcançado nesta duplicação, quer dizer, a prófase

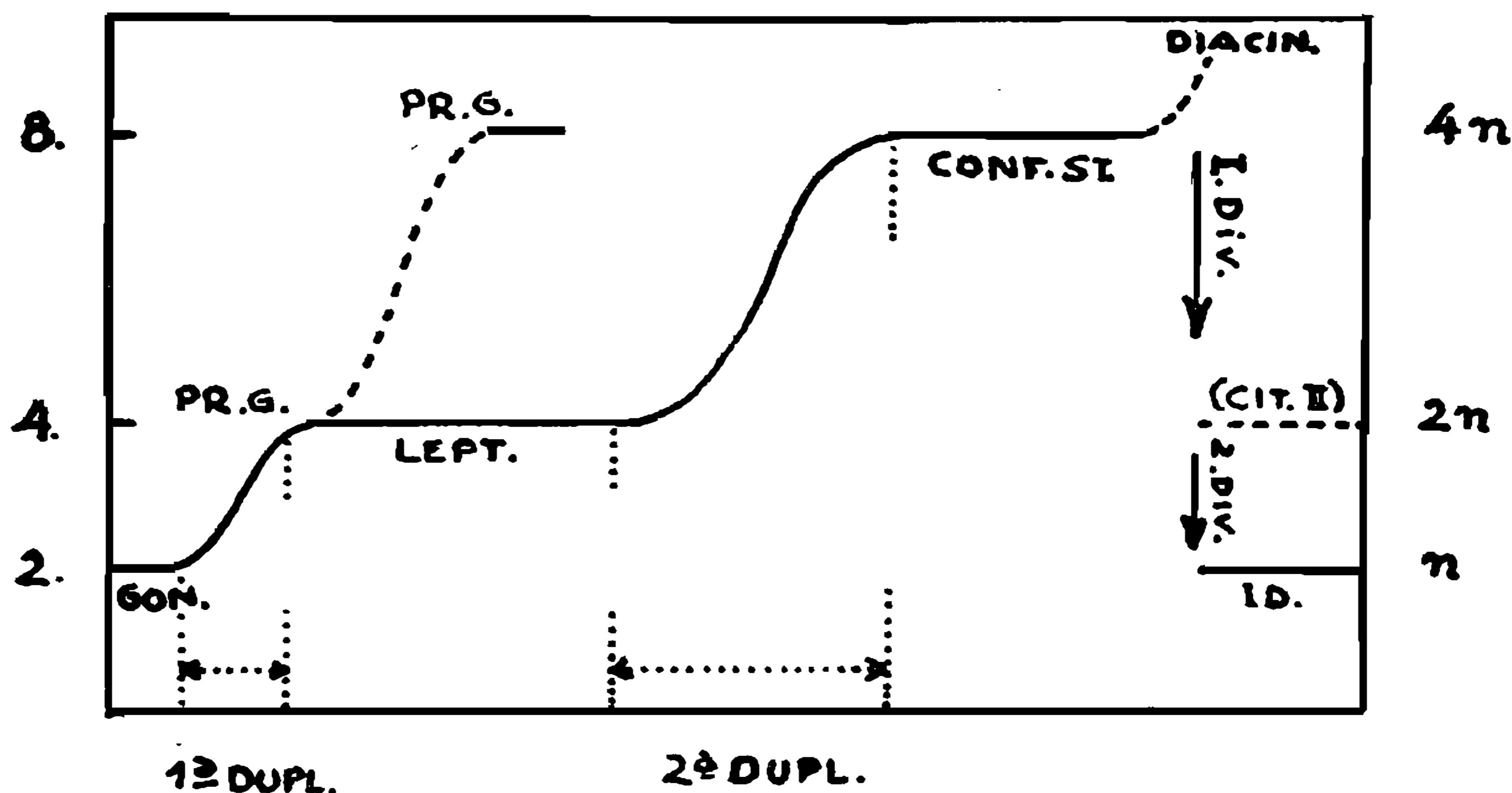


Fig. 34

meiótica substitui a prófase normal, e não se inicia após a divisão mitótica, como geralmente acontece.

Os cromosomas, portanto, devem ser em número diplóide mas de constituição dupla (2 cromatídios ou cromonemas). Durante a prófase meiótica dá-se uma ulterior duplicação (diploteno) e o volume atingido no "confused stage" é, portanto, quatro vezes o inicial.

A diacinese se apresenta anormal do ponto de vista cariométrico, provavelmente por interferência, como DARLINGTON (5) acha nos Ortópteros, de correlação entre a superfície e o número de genomas. Não podemos, porém, aceitar como definitiva esta explicação, por falta de uma mais profunda análise estatística.

A sucessão das duas divisões consecutivas forma uma espermátide cujo volume nuclear é igual ao da gônia em repouso, apesar de ser haplóide. A constituição dupla dos cromosomas da II.^a divisão, revelada citologicamente pela terceira fenda, poderia explicar este fenômeno.

O problema da terceira fenda vem adquirir, neste caso, um valor explicativo de grande interesse, concordante com os fenômenos duplicativos verificados na prova meiótica.

* * *

O fato de serem os cromosomas dos gametas constituídos pelo menos por dois cromatídeos, já salientado em vários casos nos trabalhos de S. HUGUES-SCHRADER (13), pode ser relacionado com o que G. HERTWIG (10) e SAUIZER (32) verificaram na espermatogênese dos vertebrados. A análise cariométrica da espermatogênese de alguns mamíferos revelou serem os cromosomas "dímeros", conforme a nomenclatura desse autor, e capazes, portanto, de se dividirem ulteriormente, sem necessidade de um crescimento intercinético. HERTWIG chama este tipo de divisões de "Multiplosuccedan-teilungen" e verifica que nestes animais o efeito do tratamento com estrogênios induz a uma terceira divisão pós-meiótica dos espermátídios. Um de nós (SCHREIBER [31] verificou nos Ofídios fenômenos semelhantes àqueles descritos por HERTWIG, isto é, uma terceira divisão com uma distribuição correspondente dos volumes nucleares. De fato, os espermátócitos de I.^a ordem são, neste caso, 8 vezes maiores do que as espermátides. Em um caso (*Pseudoboa*) verificou, além disso, a existência de prófases gonais de dois tamanhos, respectivamente na relação de 1:2 que revela a existência de um possível segundo ciclo de duplicação endomitótico das espermatogônias.

Os fenômenos, portanto, são confrontáveis àqueles que descrevemos nos hemípteros no presente trabalho.

* * *

Nos hemípteros, parece ser normal uma situação dímera ou bicromonêmica dos cromosomas do complemento haplóide. Deste fato se

depara a necessidade de uma extensão destes conhecimentos aos fenômenos meióticos femininos, como também às divisões somáticas e da segmentação. O poliploidismo e politenia fisiológica de inteiros territórios somáticos nos insetos, verificados por muitos autores, foram salientados por WHITE (38) como características citológicas da ontogênese nos insetos. As presentes pesquisas estendem êsses fenômenos também as células germinais. HUSKINS (14), analisando os fenômenos de poliploidismo somático (polisomathy) nos vegetais, examina profundamente o problema do ponto de vista genético, particularmente das relações quantitativas entre os alelos. Problemas novos surgem quando queremos analisar o que acontece na meiose entre os 8 cromatídios do espermatócito I, seja do ponto de vista da cronologia da divisão do centrômero, do "crossing-over", etc.

HUSKINS (14) estaria propenso a reconhecer dois tipos de individualidade dos elementos cromosômicos: os que se comportam como unitários da meiose (cromatídios) e as unidades longitudinais (lamellae) de ordem inferior que, eventualmente, compõem os cromatídeos e que teriam interesse na dosagem dos alelos do desenvolvimento.

Devemos, assim, relacionar também a situação politênica dos gametos dos insetos com o problema da constituição múltipla dos cromosomas anafásicos tão discutida nos vegetais (KAUFFMANN [16]).

As pesquisas relatadas no presente trabalho, parecem sugerir que a estrutura dupla dos cromosomas do "set" haplóide se estabelece durante o duplo ciclo de duplicação no crescimento auxocitário. Uma prova certa deste fato, porém, não existe, pois não conhecemos bem a estrutura dos cromosomas das células somáticas e das espermatogônias.

Os cromosomas anafásicos das mitoses espermatogoniais não parecem apresentar fenda alguma, mas como tôdas estas observações são feitas no limite da visibilidade microscópica, esta não constitui prova absoluta.

Pelas pesquisas recentes de SCHRADER e LEUCHTEMBERGER (vide nota à pág. 427) parece ser possível, em casos especiais, um crescimento rítmico do volume nuclear sem correspondente duplicação dos cromosomas, mas com correspondente variação rítmica do teor em proteínas e em RNA. Em *Arvelius* há de fato crescimento rítmico (até 8 vezes) dos espermatócitos primários, e as espermátides formadas pelas duas divisões são proporcionalmente maiores, tendo as proteínas e RNA aumentado correspondentemente mas tendo o DNA igual ao dos elementos dos demais lóbulos testiculares normais. O fato de as espermátides (haplóides) de *Triatoma*, serem de volume igual ao das espermatogônias (diplóides) como conseqüência de um duplo ciclo de duplicação volumétrica nuclear do espermatócito I, poderia ter uma explicação semelhante ao do *Arvelius*, no caso em que os cromosomas espermatogoniais já estejam duplos.

Devemos deixar, portanto, aberto o problema da origem da terceira fenda e sua correspondência com o volume nuclear até termos maiores conhecimentos acerca da constituição dos cromosomas somáticos e espermatogoniais em *Triatoma*.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — *Triatoma infestans*. Contrôlo. Espermatogônias em metáfase e telófase. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 1200.

Fig. 2 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. nr. 115). Espermatogônias e metáfase bloqueada. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica x 1200.

Fig. 3 — *Triatoma infestans*. Contrôlo. (Prot. nr. 10). I.^a metáfase. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 3500.

Fig. 4 — *Triatoma infestans*. Contrôlo. (Prot. nr. 10). II.^a metáfase. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica x 3500.

Fig. 5 — *Triatoma infestans*. Contrôlo. (Prot. nr. 110) metáfases I. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica x 1200.

Figs. 6 e 7 — *Triatoma infestans*. Colchicina 2 horas. (Prot. nr. 113); Metáfases I normais. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica x 3500.

Figs. 8, 9 e 10 — *Triatoma infestans*. Colchicina 2 horas. (Prot. 113). Diacinese final. Falta de orientação e parcial aglutinação. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 3500.

Figs. 11 e 12 — *Triatoma infestans*. Colchicina 2 horas. (Prot. 113) Metáfase II. Falta de orientação. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 3500.

Fig. 13 — *Triatoma infestans*. Colchicina 2 horas. (Prot. 112). Metáfases I e II. Algumas normais, outras ligeiramente aglutinadas. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 960.

Figs. 14, 15 e 16 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 115) Metáfases I. Não orientadas. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica x 3500.

Fig. 17 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 115) Metáfases I não orientadas e parcialmente aglutinadas. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 1200.

Fig. 18 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 115) Metáfases II não orientadas e parcialmente aglutinadas. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 1200.

Fig. 19 — *Triatoma infestans*. Colchicina 7 horas. (Prot. 117). Espermatócitos de I.^a ordem. Bloqueio de citocinese e metáfase completamente desorganizada. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 3500.

Fig. 20 *Triatoma infestans*. Colchicina 7 horas. (Prot. 117) Espermatócitos de I.^a ordem. Bloqueio da citocinese, bivalentes em via de separação em díades. Álcool acético e orceína por esmagamento. x 3500.

Fig. 21 — *Triatoma infestans*. Colchicina 7 horas. (Prot. 116) Espermatócito de I.^a ordem Bloqueio da citocinese. Bivalentes desfeitos completamente. Alguns cromosomas apresentam a 3.^a fenda. Álcool acético e orceína por esmagamento. x 3500.

Fig. 22 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 116) Espermatócito de I.^a ordem como fig. 20. Álcool acético e orceína por esmagamento. x 960.

Fig. 23 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 116) Como fig. 21. Espermatócito de I.^a ordem com tétrades desfeitas e diacinese adiantada. x 960.

Fig. 24 — *Triatoma infestans*. Contrôlo (Prot. 6) Diacinese adiantada. Álcool acético e orceína por esmagamento. A seta indica a 3.^a fenda num dos bivalentes grandes. Esquema conforme HUGUES-SCHRADER dos 3 planos de fenda.

Fig. 25 — *Triatomas infestans*. (Controle e Prot. 6) I análise. Álcool acético e orceína por esmagamento. As setas indicam os planos das 3.^a fendas, conforme HUGUES-SCHRADER.

Fig. 26 — *Triatoma infestans*. Diacinese inicial. Alcool acético e orceína por esmagamento. A seta indica a 3.^a fenda. x 1150.

Fig. 27 — *Panstrongylus megistus*. Diacinese adiantada. Alcool acético e orceína por esmagamento. A seta indica a 3.^a fenda.

Fig. 28 — *Triatoma infestans*. Colchicina 4 horas. (Prot. 115). Espermatídes normais. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 1150.

Figs. 29 e 30 — Colchicina 9 dias. (Prot. 141) Espermatídes de tamanho diferente. Dubosq-Brasil. Hematoxilina férrica. x 960.

Fig. 31 — Histogramas das freqüências dos volumes nucleares nas fases da espermatogênese normal e colchinizada.

- 1) Espermatogônias em repouso.
- 2) Profases goniais di e tetraplóides.
- 3) Leptotenos.
- 4) "Confused-stage".
- 5) Espermatídes
- 6) Espermatídes.
- 7) Espermatídes após 9 dias de colchicina.

(T) indica o valor modal calculado; (ARKIN e COLTON). Cfr. Tabela II.

Fig. 32 — Diagrama da distribuição dos volumes modais.

1) Espermatídes contrôle: H. Espermatídes colchicina 4 horas. I. Espermatídes 9 dias colchicina, primeira moda. A1 — Espermatogônias em repouso. A2 — e A4 Profases goniais. B. Leptotenos. II. Espermatídes 9 dias colchicina, segunda moda. C e D. "Confused stage". III. Espermatídes 9 dias colchinizada, terceira moda. IV. Espermatídes colchinizadas 9 dias, quarta moda. Cfr. Tabela III.

Fig. 33 — *Triatoma sordida*. Metáfases espermatogoniais (Prot. 54) diplóide e tetraplóide x 2100. Alcool acético e orceína por esmagamento.

Fig. 34 — Diagrama dos volumes modais em relação aos genomas na espermatogênese de *Triatoma infestans*. (adaptado de SCHREIBER, no prelo). explicação no texto.

EXPLICATION OF THE FIGURES

Fig. 1 — *Triatoma infestans*. Control. Spermatogonial meta and anaphases. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 1200.

Fig. 2 — *Triatoma infestans*. Colchicine 4 hours. (N.º 115) Blocked spermatogonial metaphases. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 1200.

Fig. 3 — *Triatoma infestans*. Control. (N.º 10). 1st metaphases. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Fig. 4 — *Triatoma infestans*. Control. (N.º 10). 2nd metaphases. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Fig. 5 — Control (N.º 110). 1st. metaphases. Dubosq-Brasil. Ferric Hematoxylin. x 1200.

Figs. 6 e 7 — *Triatoma infestans*. Colchicine. 2 hours. (N.º 113). 1st. metaphases not affected Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Figs 8, 9 e 10 — *Triatoma infestans*. Colchicine 2 hours. Late diakynesis. Bivalents not oriented., someone klumped. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Figs. 11 e 12 — *Triatoma infestans*. Colchicine 2 hours (N.º 113), 2nd metaphases. No. orientation. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Fig. 13 — *Triatoma infestans*. Colchicine. 2 hours. (No. 112) 1st and 2nd metaphases. Some normally oriented, other partially klumped. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 960.

Figs. 14, 15 e 16 — *Triatoma infestans*. Colchicine 4 hours. (N.º 115) 1st metaphases: not oriented. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Fig. 17 — *Triatoma infestans*. Colchicine 4 hours. (N.º 115). 1st metaphases, partially klumped. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 1200.

Fig. 18 — *Triatoma infestans*. Colchicine 4 hours. 2nd metaphases partially klumped. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 1200.

Fig. 19 — *Triatoma infestans*. Colchicine 7 hours. (N.º 117) 1st Spermatoocyte. Blockage of the cytokinesis and metaphase without spindle. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 3500.

Fig. 20 — *Triatoma infestans*. Colchicine 7 hours. (N.º 117). 1st spermatocyte. Blockage of the cytokinesis. Bivalents partially separated. Acetic alcohol. Acetic orcein smear. x 3500.

Fig. 21 — *Triatoma infestans*. Colchicine 7 hours. (N.º 116). 1st spermatocyte. Bivalents completely dissolved. Some chromosomes show the tertiary split. The arrow indicates the sex chromosomes. Acetic alcohol. Acetic orcein smear. x 3500.

Figs. 22 and 23. *Triatoma infestans*. Photomicrograph of the same cells respectively of the figs. 20 and 21. x 960.

Fig. 24 a and b. — *Triatoma infestans*. Control. (N.º 6). Late diakinesis. Acetic orcein smear. The arrow indicates the tertiary split in one of the three greater bivalents. Sketch of the splits after HUGUES SCHRADER.

Fig. 25 — *Triatoma infestans*. Control. (No. 6). 1st. Anaphase. Acetic orcein smear. The arrow indicates the splits after HUGUS SCHRADER.

Fig. 26 — *Triatoma infestans*. Control. Early diakinesis. Acetic alcohol. Acetic orcein smear. The arrow indicates the tertiary split in one of the heteropicnotic bivalents. x 1150.

Fig. 27 — *Panstrongylus megistus*. Late diakinesis. Alcohol acetic. Acetic orcein smear. The arrows indicate the tertiary splits.

Fig. 28 — *Triatoma infestans* — Colchicine 4 hours. Spermatids apparently normal. Dubosq-Brazil. Ferric hematoxylin. x 1150.

Figs. 29 and 30 — Colchicine 9 days. (N.º 141). Spermatids of different size. Dubosq-Brazil. Ferric Hematoxylin. x 960.

Fig. 31 — Histograms of the frequencies of nuclear size in normal and colchicized spermatogenesis.

- 1) Resting spermatogonia.
- 2) Spermatogonial prophases di and tetraploid.
- 3) Leptotens.
- 4) "Confused stage".
- 5) Spermatid (normal).
- 6) Spermatid (normal).
- 7) Spermatids. Colchicine 9 days.

The "T" indicates the modal volume. (see table II).

Fig. 32 — Distribution of the modal values of the nuclear volume.

- 1) Normal spermatid. H. Spermatid colchicine, 4 hours. I. Spermatid colchicine 9 days. (1st mode). A1 Resting spermatogonia. A2, A4 Spermatogonial prophases. B. Leptone. II. Spermatid colchicine 9 days (second mode). C.D. "Confused stage". III. Spermatid colchicine (days (3d mode). IV. Spermatid Colchicine 9 days (4th mode). (See Tab. III).

Fig. 33 — Spermatogonial metaphases. (N.º 54) *Triatoma sordida*. Diploid and tetraploid. Acetic alcohol. Acetic orcein smear. x 2100.

Fig. 34 — Diagram of the relations between modal volumes and genomes during the spermatogenesis in *Triatoma infestans*.

(Adapted from SCHREIBER in press).

Explanation in the text.

Cytologic and caryometric analysis of the action of colchicine on the spermatogenesis in hemiptera

Summary:

The action of colchicine upon the spermatogenesis of *Triatoma infestans*, (Hemipt. Heteroptera), has been studied and the different categories of giant spermatids that appear during the treatment have been compared with the nuclear volumes of the whole series of normal spermatogenic stages. The following facts have been ascertained:

1) 4 hours after the treatment the gonial mitotic metaphases, and the 1st. and 2nd. metaphases of meiosis are stopped. The prophasic stages of meiosis and diakinesis appear to be normal. After 9 days of treatment, all the tetrads are broken in the meiotic metaphases and the cells appear with 44 and 22 chromosomes respectively, scattered in the cytoplasm.

2) At 9 days, practically all spermatogenic stages have disappeared except for a few cysts of spermatogonia, and practically the whole testicle is full of cysts of spermatozoa and spermatid, with some large zones of necrosis with pycnotic nuclei.

The spermatids appear to be of different sizes and the statistical analysis of the nuclear volumes gives a polymodal histogram with 4 modes, whose volumes are in the ratio of 1:2:4:8. Ripe spermatozoa seem to have a certain volume variability, that has not been possible to analyse quantitatively.

All these facts confirm what DOOLEY found in the colchicized Orthoptera testicle.

3) The caryometric analysis conducted statistically on the normal stages of the spermatogenesis (resting spermatogonia, gonial prophase, leptotene, "confused stage", diakinesis, and spermatid) revealed the following facts:

a) Considering the volume of the resting, spermatogonia as 1, their mitotic prophase have a volume of 2. Some rare prophase appear to have a volume of 4 and probably belong to tetraploid spermatogonia normally present in the testicle of Hemiptera.

b) The first spermatocyte at the beginning of the auxocitary growth (leptotene) has a volume of 2, which is equal to that of the gonial prophase. It grows further during the "confused stage" and reduplicates, reaching thus the volume of 4. Diakinesis has a rather variable nuclear volume and it is higher than volume 4. This is probably of physico-chemical nature and not a growth increase.

c) The spermatid at the beginning of the spermiogenetic process has a volume of 1 which is very constant and homogeneous.

4) These results can be summarized concluding that the meiotic process begins from a spermatogonium at the end of his mitotic interphasic growth (vol. 2) and instead of entering into the mitotic prophase transforms itself into the leptotene spermatocyte. During the diplotene ("confused stage") the volume of the nucleus doubles once more and reaches volume 4. In consequence of the two successive meiotic divisions the spermatid, although having an haploid number of chromosomes, has a nuclear volume of 1, just like the diploid spermatogonium.

The interpretation of this strange result probably comes from the existence of the "tertiary split" in the chromosomes of the haploid set, that has been illustrated in the Hemiptera by HUGUES-SCHRADER and in Orthoptera by MICKEY and co-workers.

The tertiary split indicates that the chromosomes of the haploid set are constituted from almost two chromonemata, and this double constitution corresponds to the double cycle of reduplication that takes place during the spermatogenesis starting from the resting gonia.

In *Triatoma infestans* the tertiary split appears in the chromosomes in the 1st. and 2nd. metaphases and in the diakinesis. In the blocked metaphases at the 9th. day of colchicization some of the 44 elements scattered in the cytoplasm, show, when properly oriented, the split very clearly. Some new and strange facts revealed by SCHRADER and LEUCHTEMBERGER in *Arvelius* suggest the possibility of other interpretations of the rhythmic growth in special cases. There appears the necessity of more knowledge about the multiple or simple constitution of the chromosomes in somatic and spermatogonial mitosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARKIN H. e COLTON R. R.
1942 An outline of statistical methods. 4th. Ed., New York.
- 2 — BARBER H. N. e CALLAN H. e TH.
1943 The effects of cold and Colchicine on mitosis with the Newth.
Proc. Roy. Soc. B. 131 : 258-271.
- 3 — BIESELE J. L., POYER H. PAWLER TH.
1942 Nuclear phenomena in mouse cancer. *The University of Texas Publication*, Nr. 4243 : 1-68.
- 4 — BRAUNGART D. C. e G. E. OTT.
1942 A cytological study of the effects of colchicine on *Drosophila melanogaster* *Journ. of Hered.* 33 (5) : 163-165.
- 5 — DARLINGTON C. D.
1948 Annual report for the year 1947, *John Innes Hortic.* Ist. p. 23.
- 6 — DIAS E.
1938 Criação de Triatomídeos no laboratório, *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 33 : 407-412.
- 7 — DOOLEY, T. P.
1941 The influence of colchicine upon the germ cells of insects (Orthoptera) with special reference to the mitochondria and dictiosome, *Trans. Am. Micr. Coc.*, 60 (1) : 105-119.
- 8 — EIGSTI O. J.
1947 Colchicine bibliography. *Lloydia* 10 : 65-114.
- 9 — GREMILLON D. F.
1943 Polyploidy in the germinal tissue of *Melanopolus faemurrubrum* (De G.) (abstract). *Proc. Louisiana Acad. Sciences*, 7 : 8-81.
- 10 — HERTWIG, R.
1933 Die dritte Reifeteilung in der Spermiogenese des Menschen un der Katze, *Zeitsch. Mikr. Anat. Forsch.* 33 : 393-400.
- 11 — HUGUES - SCHRADER, S.
1941 The meiotic chromosomes of the male *Llaveiella taenechina* Morrison (Coccidea) and the question of the tertiary split, *Biol. Bull.*, 78 : 312-337.
- 12 — HUGUES - SCHRADER, S. e H. RIS.
1941 The diffuse spindle attachment of coccids, verified by mitotic behavior of induced chromosome fragments. *Jour. Exper. Zool.*, 87 (3) : 429-456.
- 13 — HUGUES - SCHRADER S.
1948 Cytology of Coccids. *Advances in genetics* II.º 127-203. *Academic Press*. New York.
- 14 — HUSKIN L. C.
1947 The subdivision of the chromosomes and their multiplication in non dividing tissues: possible interpretation in terms of gene structure and gene action, *The American Naturalist*, 21 : 401-434.

- 15 — JACOB W.
1926 Die Kerngrösse der Männlichen Geschlechtszellen beim Säugetiere in Bezug auf Wachstum und Reduktion, *Z. Anat. Entw. Gesch.* 81 (5/6 : 563.
- 16 — KAUFFMANN B. P.
1948 Chromosome structure in relation to the chromosome cycle. II. *The Botanical Review* 14 (2) : 1-57.
- 17 — MICKEY C. H.
1942 Polyploid gametes in the Louisiana lubber grasshopper (abstract), *Proc. Louisiana Acad. Sciences.* 6 : 28.
- 18 — MICKEY C. H.
1945 Additional polyploid and mixoploid tissues in nymphs of the Louisiana Lubber Grasshopper, *Romalea microptera* (Beauv.) *Proc. Louisiana Acad. Scien.* 9, 39-57.
- 19 — MICKEY C. H.
1945 Synapsis and behavior of chromosomes in polyploid male germ cells of *Romalea microptera* (Beauv.) (abstract) *Genetics.* 30 : 15.
- 20 — MICKEY C. H.
1946 The presence of multiple strands in chromosomes of *Romalea* (Orthoptera), *The American Naturalist*, 80 : 446-452.
- 21 — MICKEY G. H. e SWANN M. F.
1947 Parthenogenetic Grasshoppers and their bearing upon polyploidy and sex determination, *Proc. Louisiana Acad. Sciences.* 10 : 73-92.
- 22 — MICKEY C. H.
1947 Division cycle in grasshopper chromosomes, *Proc. Louisiana Acad. Scien.* 10 : 49-66.
- 23 — MICKEY C. H.
1947 Endomitosis in tissues of the Louisiana lubber grasshopper, *Romalea microptera* (Beauv.), *Genetics* (abstr.) 32 : 97.
- 24 — PETERS J. J.
1946 A cytological study of mitosis in the cornea of *Triturus viridescens* during recovery after colchicine treatment, *J. Exp. Zool.* 103 (1) : 33-60.
- 25 — SCHRADER, F.
1935 Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. *Cytologia*, 6 : 422-430.
- 26 — SCHRADER, F.
1945 The cytology of regular heteroploidy in the genus *Lora* (Pentatomidae — Hemiptera), *J. Morph.* 76 (3) : 157-175.
- 27 — SCHRADER, F.
1945 Regular occurrence of heteroploidy in a group of pentatomidae (Hemiptera), *Biological Bulletin*, 88 (1) : 63-70.

- 28 — SCHRADER, F.
1947 The role of the kinetochore in the chromosomes evolution of the Heteroptera and Homoptera., *Evolution* 1 (3) : 134-142.
- 29 — SCHRADER F. e LEUCHTEMBERGER C.
1950 A cytochemical analysis of the functional inter-relations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer) *Experimental Cell Research*, 9 (3) : 421-452.
- 30 — SCHREIBER G.
1946 Pesquisas de citologia quantitativa: o crescimento interfásico das espermatogônias dos Ofídios, *Rev. Brasileira Biologia*, 6 (2) : 199-209.
- 31 — SCHREIBER G.
1947 A terceira divisão e a dimegalia na espermatogênese dos Ofídios, *Gazeta Clínica* (S. Paulo) 45 (3/4) : 82.
- 32 — SCHREIBER G.
1947 O crescimento interfásico do núcleo. Pesquisas cariométricas sobre a espermatogênese dos Ofídios, *Mem. Inst. Butantã* (S. Paulo) 20 : 113-180.
- 33 — SCHREIBER G. e PELLEGRINO J.
1949 Pesquisas sobre o crescimento do espermatócito, *Soc. Biol. Minas Gerais*: out. 1948. Resumo: *Rev. Brasileira de Biologia*. 9 (4) : 519-520.
- 34 — SCHREIBER G.
1949 Statistical and physiological studies on the interphasic growth of the nucleus, *Biol. Bulletin*. 97 (2) : 187-205.
- 35 — SCHREIBER G. e PELLEGRINO J.
1949 Cytogenical studies on Brazilian Hemiptera. *Proc. Int. 8th. Congress. of Genetics. Stocholm*. "Hereditas" Suppl. Vol. 565.
- 36 — SCHREIBER G. e PELLEGRINO J.
1949 Eteropicnosi di autosomi come meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emmitteri neotropici.) "*Scientia Genetica*", III 3/4 : 215-226.
- 37 — SWIFT H. H.
1950 The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiolog. Zoology*. 23 (3) : 169-198.
- 38 — WHITE M. J. D.
1945 Animal cytology and evolution. *Cambridge University Press*.
-