

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

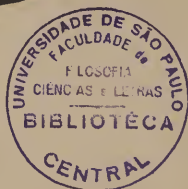
BOLETINS DA FACULDADE DE PHILOSOFIA, SCIENCIAS E LETRAS

III

Biologia Geral n.º 1



1937



André Dreyfus

“Contribuição para o estudo
do cyclo chromosomico e da
determinação do sexo de
Rabdías Fülleborni Trav. 1926”

*

1937

Empreza Graphica da “Revista dos Tribunaes”
Rua Xavier de Toledo, 72 — São Paulo

PREFACIO

Toda obra scientifica resulta do esforço conjugado de varias gerações de pesquisadores de diversos paizes. Não fossem os trabalhos de Theodor Boveri e Waldemar Schleip sobre o cyclo chromosomico de *Rhabdias bufonis* (= *Angiostomum nigrovenosum*) e provavelmente não teriamos podido levar a bom termo as pesquisas que empreendemos sobre o cyclo chromosomico de *Rhabdias Fülleborni*. Boveri e Schleip por sua vez dependeram de outros trabalhos e assim successivamente. Em se tratando de um trabalho de pesquisa scientifica nos devemos reconhecer devedores não apenas aos nossos predecessores, mas ainda aos que nos cercam. Limitar-nos-emos a citar aqui o nome das pessoas que contribuíram mais poderosamente para que pudéssemos realizar nossas pesquisas. O material, representado por rãs e principalmente por sapos, veio quasi todo de Instituto de Butantan. Aos Drs. Afranio Amaral, Paulo Artigas e Flavio da Fonseca muito agradecemos este auxilio. Os fundamentos helminthologicos de que necessitamos nos foram dados pelos reputados especialistas Dr. Clemente Pereira e Prof. Zeferino Vaz, a quem somos profundamente gratos. Auxilios bibliographicos valiosos nos foram proporcionados pela Bibliotheca de Prof.

Bresslau, em boa hora adquirida pelo Governo de São Paulo e pela modelar bibliotheca de Manguinhos. Graças á boa vontade de Prof. Lauro Travassos foi possível conseguir copias photographicas de trabalhos inexistentes em São Paulo. O Prof. Ernst Marcus, além de auxilios bibliographicos poz á nossa disposição as installações de seu laboratorio, onde pudemos realizar as ampliações das referidas copias photographicas. A' Sra. Barroso do Amaral nossos agradecimentos pelo auxilio que nos prestou na parte dactylographica do trabalho e nesse sentido tambem desejamos agradecer a boa vontade com que collaborou conosco a Sta. C. Bresslau, secretaria do laboratorio. Finalmente, "the last but not the least" nossos mais sinceros agradecimentos á technica do laboratorio de Biologia dá Faculdade de Sciencias e da Escola Paulista, Sra. Martha Breuer, a cuja competencia, capacidade de trabalho e habilidade artistica deve-se muito do que de bom contiver nosso trabalho.

Não nos foi possível completar todos os pontos relativos ao cyclo chromosomico e á questão da determinação do sexo, a elle estreitamente ligada, em *Rhabdias fülleborni*. O presente trabalho é o fructo de um anno de pesquisas quotidianas, prazo que todavia se revelou insufficiente. A necessidade de apresentar esta these em data, impôz-nos a suspensão de pesquisas em curso. Esperamos mais tarde poder terminar algumas das questões que não tivemos tempo de analysar convenientemente, questões que indicaremos no decurso do trabalho.

I N D I C E

Prefacio	III
1.º CAPITULO	
Historico e considerações geraes sobre o cyclo chromosomico e determinação do sexo no nematoide <i>Rhabdias bufonis</i>	1
2.º CAPITULO	
O cyclo chromosomico de <i>Rhabdias fülleborni</i>	29
1.ª PARTE: <i>O hermaphrodita</i>	29
I — Material e technica para o estudo do hermaphrodita ..	29
II — A ovogenese	31
III — Espermatogenese	38
IV — Fecundação e desenvolvimento embryonario.....	51
2.ª PARTE: <i>A geração de vida livre</i>	55
I — Material e technica para o estudo da geração bisexuada	55
II — Espermatogenese	58
III — Ovogenese e outros phenomenos observados nas formas de vida livre	64
3.ª PARTE: <i>Alguns problemas especiaes</i>	67
I — Hermaphroditismo proterandrico ou proterogynico? ..	67
II — Inexistencia de machos na geração parasita	94
III — Algumas considerações finaes sobre o cyclo chromosomico e o sexo nos Rhabdiasidae	103
4.ª PARTE:	
I — Conclusões	111
II — Bibliographia	119
III — Legenda das figuras	127
IV — Abstract	133

1.º CAPITULO

CONSIDERAÇÕES GERAES SOBRE O CYCLO CHROMOSOMICO E DETERMINAÇÃO DO SEXO NO NEMATÓIDE *RHABDIAS BUFONIS* (SCHRANK, 1788) STILES E HASSAL, 1905

- Syn.: *Ascaris bufonis* Schrank, 1788.
Ascaris nigrovenosa Goeze in Zeder, 1800.
Ascaris nigrovenosum Leidy, 1851.
Leptodera nigrovenosa Schneider, 1866.
Rhabdonema nigrovenosum Leuckart, 1879.
Angiostomum nigrovenosum v. Linstow, 1882.
Rhabditis nigrovenosa, auct.

O problema da determinação do sexo se apresenta particularmente interessante em certos nematoides da familia *Rhabdiasidae*, como por ex. *Rhabdias bufonis*. Desde muito tempo tinha-se observado que este parasito muito frequentemente encontrado nos pulmões de rãs e sapos europeus, é constituído exclusivamente por femeas. Este animal apresenta um cyclo curiosissimo estudado por M e t c h n i k o f f (I) e por L e u c k a r t (II), os quaes mostraram que dessas femeas nasce uma geração de vida livre bi-sexuada da qual provêm as larvas infestantes que penetram no hospedeiro em cujo pulmão se alojam e assim recomeça o cyclo.

Schneider (III) foi o primeiro autor que mostrou serem as fêmeas parasitas, fêmeas apenas na apparencia, pois em seu ovario se formam espermatozoides: portanto o animal deve ser tido como um hermaphrodita.

A analyse do cyclo chromosomico deste animal foi iniciada por McDowell (IV) que estudou nelle a formação das cellulas germinativas femininas. Trata-se de um trabalho muito curto relativo apenas á maturação do ovulo. A seguir Boveri (V) e Schleip VI, VII) estudaram o assumpto e é razoavel que cytologistas de valor se tenham interessado por tão curioso animal. Nelle, ora encontramos os sexos separados, ora os encontramos unidos.

Frequentes são em sciencia os exemplos em que justamente os casos mais complexos são os que uma melhor analyse do problema permittem, principalmente quando, como occorre aqui, certas descobertas fundamentais num determinado dominio já foram realisadas. Os casos excepcionaes e complicados vêm mostrar a intervenção de factores que não entram em jogo, ou só o fazem de modo apagado nos casos simples.

Vejamos por ex. o succedido com o problema dos chromosomas sexuaes, assumpto directamente ligado a nossa these. Numerosos trabalhos haviam demonstrado uma differença chromosomica entre o sexo masculino e o feminino e isso em um material variadissimo.

O primeiro autor a salientar com clareza o parallelismo entre a existencia de 2 classes de espermatozoides, distinguiveis por apresentarem um numero differente de chromosomas (uma dellas tendo 1 chromosoma mais

que a outra) e o sexo foi Mac Clung, seguindo as pégadas de varios pesquisadores: Henking, Paulmier, Montgomery, de Sinety, Sutton, etc. A idéa de ligar a determinação do sexo a chromosomas particulares só se tornou estabelecida de modo definitivo, porem, graças aos trabalhos de Wilson e Miss Stevens, os espermatozoides com o accrescimento de um chromosoma dando o sexo feminino (XX), sendo o masculino designado XO. Verificada a determinação do sexo segundo o esquema XX-XO, segue-se a observação do typo XX - XY, devida especialmente a Montgomery, Wilson e Stevens. No fundo este novo typo reduz-se ao primeiro, pois os espermatozoides O, isto é sem chromosoma X, correspondem aos espermatozoides Y, uns e outros sendo factores de machos. Encontramos agora as verificações relativas aos lepidopteros e aves estudadas por Seiler, Doncaster, etc., mostrando uma inversão do typo já referido, isto é um digame-tismo feminino, o sexo dependendo aqui do ovulo e não como nos casos anteriores do espermatozoide. Verificou-se mais tarde que a) o numero de chromosomas sexuaes pode ser maior (Grooss, Goodrich) do que nos casos simples já citados, b) se podem distinguir por colorabilidade diversa, (Mac Clung), c) podem estar ligados aos autosomas nas cellulas sexuaes e separados delles nas somaticas (Seiler); d) podem ser eguaes nos 2 sexos, distinguindo-se então dos autosomas por seu comportamento, passando antes ou depois delles para os polos da figura mitotica da 1.^a mitose de maturação (Wilson), etc., etc.

Confirmação interessante da doutrina é fornecida pelo estudo dos gynandromorphos isto é seres com areas masculinas e outras femininas, tão bem estudados no bicho da seda por G o l d s c h m i d t e na *Drosophila* por M o r g a n . As zonas masculinas tendo nestes seres a formula cromosomica do sexo masculino e isso, seja por causa de uma dupla fecundação no ovulo binucleado (bicho de seda), seja por perda de um chromosoma, numa das mitoses da segmentação do ovo (*Drosophila*). Descoberta a intersexualidade, isto é a possibilidade de um ser que havia começado sua existencia como macho (ou femea), passar a partir de um certo momento (ponto de viragem), a evoluir como femea (ou macho), tornou-se evidente que a explicação chromosomica não bastava, pois os intersexuados possuem a formula chromosomica de um sexo e apresentam caracteres (todos aquelles que foram adquiridos depois do ponto de viragem) do sexo opposto. De seus notaveis estudos sobre a intersexualidade da *Lymantria*, G o l d s c h m i d t ponde chegar á uma theoria segundo a qual o sexo depende da relação entre a força (ou fraqueza) dos factores de masculinidade e a força (ou fraqueza) dos da feminilidade. No caso da borboleta os factores de masculinidade estariam nos chromosomas sexuaes, os do sexo feminino nos autosomas. Ora, nos casos habituaes, de cruzamentos entre borboletas pertencentes a uma mesma raça (ou forte ou fraca) os factores para o sexo feminino são constantes nos dois sexos, differindo apenas os de masculinidade, que existem em dóse singela na femea e dupla no macho. Isto significa que a theoria chromosomica representava apenas uma primeira approximação valida para o caso

em que os factores de um dos sexos se mantem constante. Póde-se pois desprezar este factor constante e considerar nesses casos (que representam a sexualidade normal e são portanto muitissimo mais frequentes do que os de intersexualidade) o sexo como dependendo apenas do numero dos chromosomas, que varia segundo o sexo. Foi necessario a analyse de um caso complexo, onde um dos factores decisivos na determinação do sexo, passou de constante a variavel, para que se pudesse demonstrar que realmente o factor em questão é da maxima importancia. Brillhante confirmação da theoria de Goldschmidt nos deu Bridges pelo estudo das *Drosophilas* tripoides e onde o sexo depende da relação entre o numero de autosomas e o de chromosomas sexuaes [na *Drosophila*, ao contrario do que ocorre nas borboletas, o factor (ou factores) constante nos 2 sexos é o determinante da feminilidade]. Foi possivel estabelecer a escala: 3 autosomas: 1 chromosoma X = 3, supermachos; 2 autosomas : 1 X = 2, macho; 3 autosomas: 2 X = 1,5, intersexuado; 2 autosomas: 2 X = 1, femea; 1 a.: 3 X = 0,67, superfemea. Em conclusão podemos dzer, repetindo o que se lê em trabalho nosso (VIII):

“A intersexualidade da *Lymantria*, á luz da interpretação que della deu Goldschmidt em nada affecta a theoria chromosmica da determinação do sexo. Esta theoria, numa primeira phase, havia estabelecido que o sexo, como acima dissemos, dependia da existencia em dóse dupla ou singéla de um certo chromosoma. Tal theoria foi capaz de explicar a sexualidade normal, bem como os phenomenos de gynandromorphismo.

Descoberta a intersexualidade, viu-se que a determinação do sexo não dependia apenas do numero absoluto dos chromosomas sexuaes, mas sim, da relação entre elles e os autosomas (*Drosophila*) ou melhor da relação entre as quantidades de substancias masculinas e femininas presentes em cada individuo (*Drosophila* e *Lymantria*). Como nas condições normaes o numero de autosomas (ou seja a quantidade da substancia que existe em igual dóse nos 2 sexos) se mantem constante nos 2 sexos, podemos, na analyse do problema, desprezar este factor. Os intersexuados nos mostram, pela transformação desta constante em variavel, que tal grandeza é tambem capital na determinação do sexo. Torna-se então, para explicar a determinação do sexo, indispensavel levar tambem em conta dita grandeza.

Temos aqui um bello exemplo do modo pelo qual se constituem e se succedem, aperfeiçoando-se, as theorias scientificas, uma nova theoria levando em conta os elementos da antiga, mas introduzindo outros, de tal maneira que a nova theoria possa dar conta não só dos factos anteriormente explicados pela theoria primitiva, mas ainda dos novos, incompreensiveis na theoria antiga”.

Vemos pois como um caso complicado (intersexualidade na *Lymantria* e *Drosophila*) pode fazer luz sobre o mecanismo da sexualidade normal. Não deixa portanto de causar estranheza que, apesar dos resultados discordantes em varios pontos e das lacunas deixados pelos dois cytologistas que em 1912 publicaram os resultados de suas pesquisas sobre *Rhabdias bufonis*, nunca mais se tenha retomado este estudo, a não ser o trabalho de S c h a a k e , que não se preocupou com

os chromosomas e não é trabalho cytologico. Estra-
nheza tanto mais justificada quando o trabalho do no-
tavel Th. Boveri tem as características de um traba-
lho previo que, por motivos que não conhecemos, seu
illustre autor nunca completou. Não podemos deixar
de lamentar não só a secura do texto e a falta de qual-
quer indicação sobre a technica para a obtenção dos
preparados, como principalmente a ausencia de boas
figuras, pois em verdade no trabalho de Boveri só
se encontram eschemas que guardam com as figuras
reaes uma relação nem sempre facil de ser estabelecida,
difficultando a comparação entre os achados de Bo-
veri, os de Schleip e os nossos. Vemos assim que
o unico trabalho desenvolvido, até hoje feito sobre o cy-
clo chromosomico de tão curioso animal foi o de
Schleip. Schleip, porem não se preocupou com
uma das phases do cyclo chromosomico do *Rhabdias*,
já que limitou seu trabalho ao hermaphrodita e aos
ovos larvados nelle contidos. Schleip não estudou
portanto as formas de vida livre, das quaes nascerão as
larvas infestantes encarregadas de dar os futuros her-
maphroditas. E' possivel que as difficuldades technicas
salientadas por Schleip e tambem encontrados por
nós expliquem, até certo ponto, por que motivo nunca
mais foi o *Rhabdias* objecto de estudo cytologico cuida-
doso. A importancia dos trabalhos de Boveri e
Schleip é para nós de tal monta que entendemos de-
dicar o presente capitulo a uma exposição succinta dos
resultados a que chegaram, citando aqui e alli outros tra-
balhos necessarios a clareza da exposição. Do grande
trabalho de Schacke só nos interessam alguns pe-

quenos commentarios sobre o rachis e a zona de transição, a que fazemos referencias no 2.º capitulo, respectivamente ao estudarmos a ovogenese do hermaphrodita e a espermatogenese tambem no hermaphrodita, e principalmente as observações que fez sobre a primeira diferenciação do testiculo, assumpto que analysaremos a proposito do typo hermaphrodito do *Rhabdias*.

Synthese do trabalho de Boveri — Estudou as formas de vida livre bem como a forma parasita. Poude contar (como é tambem possivel em outros nematoides) os chromosomas nos espermatozoides do parasita e viu que em alguns ha 5 e em outros 6 chromosomas. Nos ovocytos e nos fusos de maturação encontrava sempre 6. Logo, explicam-se os machos e as femeas da vida livre; os primeiros resultariam da fecundação do ovulo (contendo sempre 6 chromosomas) por um espermatozoide com 5 e as segundas da fecundação por um espermatozoide com 6.

Nos ovocytos de 1ª ordem da vida livre ha sempre 6 tetrades, ao passo que nos espermatoctyos de 1ª ordem ha 5 chromosomas maiores, bivalentes e 1 univalente. O chromosoma X, isto é o univalente, na 1ª mitose de maturação passa todo para um dos dois espermatoctyos de 2ª ordem e na 2ª mitose de maturação separa-se em seus dois componentes, um para cada espermátide. Ha pois espermatozoides com 5 chromosomas e outros com 6, numeros que tambem podem ser contados nos espermatozoides maduros. Acredita que os espermatozoides com 5 chromosomas não sejam funcioaes, possuindo acção fecundante apenas os espermatozoides com 6 chromosomas; todos os descendentes seriam fe-

meas (os futuros hermaphroditas). Chama a atenção para o facto de que isso não se pode demonstrar directamente, pois não viu aspectos degenerativos nos spermatocytos com 5 chromosomas, os quaes, como os com 6 chromosomas, penetram no corpo da femea. Só uma vez poudo ver os 2 pronucleos num ovulo fecundado e cada um delles tinha 6 chromosomas.

Passa a estudar o hermaphrodita: Nelle as ovogonias tem 12 chromosomas, dos quaes 2 seriam um pouco differentes: menores, mais compactos e situados aos lados do nucleolo pallido; os outros estão espalhados sem ordem, dentro do nucleo. Como explicar que de cellulas com 12 chromosomas possam nascer espermatozoides com 5 ou 6 chromosomas? Problema tão difficil que chegou a crer na existencia de machos e femeas no pulmão, podendo até dar-se o caso de, havendo machos, serem as ultimas divisões para a formação dos espermatozoides realizadas no corpo da femea. Nunca, porem encontrou machos, e ninguem jamais os encontrou.

Mais tarde, estudando parasitas bem jovens convinceu-se de que *Schneider* tinha razão e que o animal é realmente um hermaphrodita. O estadio mais jovem da espermatogenese é representado pelos spermatocytos de 1ª ordem (não ha portanto espermatogonias, as ovogonias podendo seguir o caminho da ovogenese ou o da espermatogenese). Os spermatocytos se distinguem dos ovocytos por serem menores e principalmente pelo aspecto apresentado pela chromatina: nos ovocytos de 1ª ordem ha sempre 6 elementos bivalentes, ao passo que nos spermatocytos de 1.ª ordem ha 5 elementos bivalentes e 2 univalentes (uma unica vez encontrou em

alguns spermatocytos de um individuo 4 bivalentes e 4 univalentes, o que interpreta como anomalia). A origem dos 2 chromosomas X do spermatocyto deve estar nos 2 chromosomas menores e mais compactos que viu flanquearem o nucleolo, e, desaparecido este, ficam isoladamente um perto do outro. Nos spermatocytos de 1.^a ordem os chromosomas communs se apresentam como tetrades, enquanto que os chromosomas X mostram uma fenda longitudinal.

Nos ovocytos é claro que uma das 6 tetrades deve ser constituida pelos 2 chromosomas X. Na vesicula germinativa dos ovocytos de 1.^a ordem já crescidos, vemos as 6 tetrades, uma das quaes fica caracteristicamente perto do nucleolo, sendo portanto a X-tetrade, as outras 5 estando irregularmente dispostas; a seguir, dissolvido o nucleolo não se pôde mais reconhecer a X-tetrade, todas as 6 tetrades são pois eguaes, muito embora, como já vimos, na ovogonia, se possam distinguir chromosomas de tamanho differente.

Realisada a 2.^a mitose de maturação temos, no caso da ovogenese, 6 chromosomas (dyades) no ovocyto de 2.^a ordem e 6 no 1.^o globulo polar, ao passo que cada um dos 2 spermatocytos de 2.^a ordem apresentará 7 chromosomas dos quaes 5 dyades e 2 constituidos por um unico granulo. Na 2.^a mitose de maturação passam 6 chromosomas para o 2.^o globulo polar e 6 permanecem no ovulo. E' claro que agora são todos chromosomas univalentes, isto é, o ovulo recebe, como de costume, 1 unico elemento dentre os quatro que compunham cada uma das 6 tetrades do ovocyto de 1.^a ordem. Os phenomenos relativos á maturação na ovogenese são pois abso-

lutamente eguaes aqui aos que se observam em qualquer outro animal. Na espermatogenese cada spermatocyto de 2.^a ordem tinha, como vimos 7 chromosomas, dos quaes 5 dyades e 2 isolados. Succede então o seguinte: ao se dividir cada spermatocyto de 2.^a ordem em 2 spermatides, as dyades têm seus 2 componentes separados e portanto 5 passam para uma das futuras cellulas filhas e 5 para a outra.

E os 2 elementos formados por 1 só granulo que constituem o X-chromosoma: como se comportarão? Vemol-os se atrazarem muito em relação ás dyades. Estas já subiram para os pólos e aquelles ainda permanecem no equador do fuso. Boveri admite então que se poderiam dar duas possibilidades: ou passam os dois chromosomas para a mesma cellula-filha ou passa 1 para cada futura spermatide. No 1.^o caso teremos uma cellula com 7 chromosomas e outra com 5, no 2.^o caso, cada uma das cellulas-filhas receberá 6 chromosomas. Boveri viu bem o 2.^o modo (passar 1 chromosoma para cada lado), o 1.^o não viu. Teve muito pouco material da 2.^a mitose de maturação e como as cellulas são muito pequenas, teve poucos aspectos bem claros. Declara ter matado a seguir, mais de 100 rãs, para esclarecer melhor o assumpto, mas nunca mais viu um estadio favoravel. O unico aspecto que encontrou, favoravel a sua 1.^a hypothese (destinada a explicar o apparecimento de espermatozoides com 5 chromosomas) foi uma spermatide; na qual havia 7 chromosomas. Todavia não viu sua irmã que deveria conter os outros 5. Crê que os dois processos são normaes, pois encontrou nos jovens nucleos das spermatides 5, ou 6 ou 7 chromosomas.

Que irá succeder aos espermatozoides com 7 chromosomas? Só pode dizer que viu muitas espermatides em degeneração, mas não pode affirmar que tenham sido as espermatides com 7 chromosomas, as que tenham degenerado. Como, porem, nunca viu espermatozoides com 7 chromosomas acredita que as espermatides que degeneraram sejam precisamente essas.

Achou em um tubo germinativo, duas espermatides proximas e nas quaes não pode contar os chromosomas, mas no ponto de união havia uma pequena gotta de cytoplasma com 2 granulosinhos que se coravam intensamente. Se fossem chromosomas, teriamos então a formação de 2 espermatozoides com 5 chromosomas, ambos sem chromosomas X.

Seguem-se algumas considerações theoricas mostrando que

a) não ha razão para que só existam femeas no pulmão.

b) que o caso de *Rhabdias* pode ser aproximado do dos *Aphidae*, constatação actualmente sem interesse depois de novos trabalhos de Morgan.

c) Ignoramos completamente por que motivo ha um comportamento differente dos chromosomas X nas zonas masculinas e femininas. Vimos que nos espermatozytos os 2 chromosomas X não conjugam, ao passo que nos ovocytyos se unem para formar uma tetrade. Por que isso? Séde diversa dos ovocytyos e espermatozytyos, época do anno ou processo causado por, na gonada jovem, já se ter iniciado uma divisão cytoplasmatica desigual conduzindo á conjugação ou não conjugação

dos chromosomas X? Outras tantas incognitas para as quaes Boveri não dá resposta.

d) finalmente considera razoavel que o hermaprodita se origine de uma femea, pois aqui o sexo feminino tem 1 chromosoma a mais do que o masculino e é mais facil perder um chromosoma do que ganhal-o.

Synthese das pesquisas de Schleip — Começa declarando que estudou a formação das cellulas germinativas (“Keimzellen”) da geração hermaprodita, fecundação e começo do desenvolvimento da geração gonochorica. Sobre a geração de vida livre diz: “Leider konnte ich nicht gleich die Untersuchung des ganzen Chromatincyklus beenden; die Beobachtung der Chromosomen der freilebenden Generation ist recht schwierig und zeitraubend und andere Arbeiten drängen zu einem vorläufigen Abschluss”. Como a confirmar sua opinião sobre a difficuldade de trabalhar com a vida livre, está o facto de que não publicou o annuciado estudo sobre ella. O trabalho visa particularmente o estudo da chromatina.

Fixou os vermes em Gilson-Petrunkewitsch e controlou com Flemming forte. Os cortes de 7,5 e 15 μ foram corados pela hematoxylina Delafield e picrocarmin ou hematoxylina ferrica com vermelho Bordeaux, orange ou verde luz.

As formas parasitas são femeas em tudo, excepto na gonada. Cada uma dellas tem 2 gonadas e em cada gonada reconhece as seguintes zonas: 1) zona germinativa, 2) zona de synapsis, 3) zona de crescimento, 4) *receptaculum seminis*, 5) utero. Alem dessas zonas temos a considerar as zonas de espermatogenese, de que adeante falaremos.

1) *Zona germinativa*: Aqui se encontram cellulas em constante divisão; são ovogonias, nome que lhes cabe, muito embora tambem possam dar origem a cellulas masculinas. No inicio desta zona germinativa encontra-se uma cellula com nucleo grande que provavelmente nada tem que ver com as ovogonias e nunca se mostra em divisão. Os ovogonias no começo do tubo são cellulas bem individualizadas e presas a um suporte, o rachis, em cujo centro cora-se por vezes fortemente pela hematoxylina ferrica, um filamento (visivel tambem em outras partes). A presença deste filamento permite identificar o rachis. Mais abaixo as ovogonias se fundem, formando um syncycio.

São frequentes as divisões nas ovogonias e podemos contar sempre 12 chromosomas. Ha geralmente 4 chromosomas pequenos e 8 grandes, mas este facto nem sempre é nitido. As vezes (raramente) ha 1 ou 2 chromosomas que estão afastados dos demais no plano equatorial. Talvez haja uma relação qualquer entre este facto e um afastamento chromosomico nos espermato-cytos, que adeante descreverá.

O nucleolo, fortemente coravel pelas cores basicas quando em repouso, desaparece completamente na prophase, para reaparecer na telophase; vemos assim que o nucleolo nada tem com os chromosomas.

2) *Zona de synapsis*: Terminadas as mitoses da zona germinativa os jovens ovocytos apresentam como é de regra um aspecto synaptico. O novello synaptico é quasi sempre central (contra a regra, portanto) e o grande nucleolo é visinho delle. A regularidade do aspecto synaptico exclue a hypothese de um artefacto.

3) *Zona de crescimento*: No fim da zona germinativa e na de synpasis não vemos limites cellulares nem rachis. No começo da muito longa zona de crescimento, os nucleos caminham para a parede do tubo ovariano e se dispõem em volta do rachis; os limites cellulares se tornam titidos graças ao apparecimento de sulcos. No fim da zona de crescimento os ovocytos se individualizam cada vez mais, separam-se do rachis, ficam ellipsoides e se isolam primeiramente 2 a 2 e depois individualmente até chegarem ao *receptaculum seminis*.

Fala só rapidamente sobre as modificações da chromatina durante o periodo de crescimento, por pouco se poder ver a respeito em *Rhabdias*.

No fim da zona de crescimento tornam-se muito evidentes, dentro do nucleo, os chromosomas, e graças a seu encurtamento prophasico acabamos vendo com clareza 6 chromosomas. No começo têm a forma de bastonetes curvos e angulosos, mas depois apresentam formas variaveis. São chromosomas duplos e por vezes mostram um corte que os torna quadruplos.

Neste passo cita a opinião de Mac D o w e l l que affirma ter visto no começo 12 chromosomas bem separados, os quaes depois se juntam 2 a 2. No começo S c h l e i p vê sempre 6, embóra mais tarde possamos contar com mais ou menos nitidez 12. Concorda todavia com M a c D o w e l l, em que na placa equatorial, haja sempre 6.

Viu 2 vezes muitos chromosomas numa placa equatorial por occasião da expulsão do 1.º globulo polar. Talvez fossem 12. Como em *Rhabdias* ha 2 vezes mais chromosomas nas cellulas somaticas do que nas sexuaes

(por fragmentação dos chromosomas de cellulas derivadas do zygoto), é possível que em taes casos a duplicação que se deveria dar mais tarde já se tivesse processado, hypothese tanto mais provavel, quando nestes dois casos os chromosomas eram menores.

4) *Mitoses de maturação*: Depois de entrados no *receptaculum seminis* os chromosomas do ovocyto formam uma placa equatorial no 1.º fuso de maturação e o espermatozoides penetra no ovocyto. Aqui tambem, como é de regra nos nematoides, a penetração precede a expulsão dos globulos polares. Chegado o ovo ao utero assistimos ás 2 mitoses de maturação que se dão de modo absolutamente typico. Excepto nos 2 casos já citados, viu sempre 6 chromosomas na placa equatorial da 1.ª mitose de maturação. Todos os chromosomas se comportam da mesma maneira, nenhum delles apresentando atrazo; 6 chromosomas passam para o 1.º globulo polar e 6 ficam no ovocyto de 2.ª ordem. Os chromosomas do ovocyto novamente se dividem, permanecendo 6 no ovulo e passando os outros 6 para o 2º globulo polar, que nunca se separa do ovulo.

5) *Espermatogenese*: *Schleip* divide a espermatogenese de *Rhabdias* em 2 periodos; Iº — Aparecimento dos espermatocytos de 1.ª ordem, II.º — Mitoses de maturação e espermiogenese.

I — Aparecimento dos espermatocytos de 1.ª ordem:

a) *Generalidades sobre a procedencia da zona testicular*. Affirma ter encontrado, na maioria dos animaes que estudou, em geral nos 2 ovarios, mais raramente em um unico, um segmento curto, raramente com mais de

200 a 250 μ onde nascem os espermatozoides. Póde conter apenas spermatocytos de 1^a ordem ou tambem estadios seguintes da espermatogenese ou espermatozoides maduros. Chama tal zona de testiculo "Hoden zone" ou "Samenbildunggszone". Sua séde póde variar. Uma só vez achou-a logo abaixo da zona de synapsis. Em todos os outros casos estava situada mais abaixo e em varios niveis. As zonas mais altas só continham spermatocytos, as medias as outras formas e as mais inferiores só espermatozoides.

Nunca achou em um tubo mais do que uma zona testicular, mas crê que em varios casos falta em um ou nos dois tubos.

b) *Primeiro esboço da zona de formação dos espermatozoides.* Uma só vez como já disse, encontrou este esboço e estava situado logo abaixo da zona de synapsis. Viam-se neste primeiro esboço do testiculo nucleos que não cresceram quasi, conservando o tamanho dos nucleos synapticos, mas onde o bôlo synaptico se dissolveu e os filamentos de chromatina se apresentam pouco corados, mas vêm-se bem 1 ou 2 chromosomas que se apresentam muito corados. São os heterochromosomas. Os caracteres destas cellulas, que permitem distinguil-as das da serie ovular e consideral-as como spermatocytos são, alem do já citado aspecto da chromatina: o cytoplasma muito pouco coravel pelos corantes comuns, ficando avermelhado pela hematoxylina-picrocarmin que cora o cytoplasma dos ovocytos em azul violeta.

c) *Zona testicular completamente formada* ("Ausgebildete Hodenzone"). O esboço testicular enche toda a

largura do tubo gonadial e alem de apresentar espermatocytos só com os heterochromosomas individualisados, mostra outros com todos os chromosomas já formados. Na parte superior desta zona encontram-se nucleos que não se póde dizer se são de espermatocytos ou de ovocytos (“Uebergangszone”). Uma zona de transição menos nitida, vê-se as vezes no limite inferior da zona testicular. Podemos observar na zona de transição nucleos envolvidos por plasma mais claro de um lado e mais escuro do outro.

d) *Zona testicular mais velha* (“Aeltere Hodenzone”). Vemos cada vez melhor a diferença de tamanho entre os nucleos dos ovocytos, progressivamente maiores, e os pequenos nucleos do espermatocytos. Os chromosomas dos espermatocytos são cada vez mais evidentes. A zona de transição superior torna-se cada vez mais nitida, de sorte que passamos directamente dos ovocytos aos espermatocytos. Ao contrario, no limite inferior vemos surgir uma zona de transição onde ha elementos muito numerosos, a tal ponto que se torna mais longa do que a propria zona testicular. Chama-a de zona de degeneração. Releva notar que podemos encontrar na parte mais alta desta zona, espermatocytos onde apenas divisamos a individualisação dos heterochromosomas. Ora, dissemos que n’uma zona testicular completamente formada (anterior a esta) podemos ter cellulas com todos os chromosomas já individualisados. Concluiremos que os espermatocytos se desenvolvem ora mais depressa ora mais devagar. Alem do aspecto descripto, que é o mais jovem que póde apresentar uma “aeltere Hodenzone” podemos encontrar em outras “aelteren

Hodenzonen” as 2 mitoses de maturação, bem como a espermiogênese. Também aqui encontramos uma zona de degeneração ligando o limite inferior da zona testicular ao resto do ovario e também aqui as células que se nos oferecem como em via de degeneração apresentam o aspecto de ovocytos.

e) *Zona testicular a mais velha* (“Aelteste Hodenzone”). N’uma zona testicular muito próxima do receptáculo os espermatocytos já se transformaram em espermatozoides e entre elles ha corpos residuaes, pois aqui também se observa que a espermatide ao se transformar em espermatozoide (espermiogênese) perde certos de seus constituintes, especialmente pedaços do cytoplasma. Segue-se uma columna de ovocytos normaes. Esta zona (“Aelteste”) é muito curta, entre outras causas, porque os espermatozoides e elementos degenerados se insinuam entre os ovocytos.

Na região do tubo onde os ovocytos já se separaram do rachis e se isolaram dois a dois ou um a um, não encontrou mais a zona testicular, pois todos os espermatozoides se insinuam entre os ovocytos e entram no receptáculo.

f) *Cellulas degeneradas* Taes células nunca se observam em zonas testiculares jovens, mas outras só na chamada zona de degeneração. Na ultima zona testicular todas as células situadas entre os espermatocytos e os ovocytos mostram degeneração. Seu numero vaé diminuindo em virtude de duas causas: dissolução e reabsorção.

g) *Resumo e generalidades sobre a formação dos ovocytos e espermatocytos no ducto germinal.* Os espermato-

cytos de 1.^a ordem provêm de cellulas que apresentaram synapsis, crescem pouco e mostram precocemente individualizados os heterochromosomas. Muito embora só tenha visto uma vez este primeiro esboço do testiculo considera o facto como definitivamente assentado. Acredita que ha cerca de 4 vezes mais ovocytos do que espermatocytos, todavia os espermatozoides são mais do que sufficientes pois numerosos ovocytos degeneram. Não poude, porem estabelecer com segurança a relação numerica entre ovocytos e espermatocytos. Salienta que não é possivel explicar a significação das zonas de transição e degeneração acima citadas. Tenta, porem analysar a significação da zona de degeneração, fazendo hypotheses que não nos interessam.

II — Formação de espermatozoides maduros, a partir de espermatocytos de 1.^a ordem:

a) *desenvolvimento dos chromosomas nos espermatocytos.* Lembra que nos ovocytos ha sempre 6 chromosomas duplos e que não se pode provar que algum delles tenha apparecido antes do que qualquer outro. Nos espermatocytos o cytoplasma é inicialmente um syncyio, porem ás vezes vemos bem, limites cellulares; a seguir as cellulas ficam esfericas e se separam deixando espaços entre si.

Nos espermatocytos jovens ha um nucleolo, não muito grande, que se córa intensamente pela hematoxylina ferrica e pouco pela hematoxylina Delafield.

Quanto á chromatina, apresenta-se no começo constituida por cordas de forma irregular, sinuosas, as quaes mais cedo ou mais tarde apresentam uma ordenação

polar não muito clara. O numero de filamentos não pôde ser contado.

Surgem a seguir os primeiros chromosomas: uma dessas cordas se encurta, engrossa, toma habitualmente a forma de um bastonete e se córa em mais escuro. Mais tarde vemos, em geral, dois chromosomas já individualizados. Considera o apparecimento destes 2 chromosomas (heterochromosomas) como um indicio que estas cellulas são espermatocytos de 1.^a ordem. Lembra que, especialmente nos insectos, o heterochromosoma se espessa precocemente e permanece muito espessado durante todo o periodo de crescimento. Embora certos autores tenham mostrado que este heterochromosoma fica situado n'um plasmosoma, em *Rhabdias* não se dá isso. Os heterochromosomas podem-se encontrar em qualquer lugar, mas mais frequentemente junto á membrana nuclear. Muito significativo é o facto de nunca encontrarmos nelles signaes de divisão, quer longitudinal, quer transversal.

Surgem agora os demais chromosomas, tambem oriundos do encurtamento e engrossamento dos fios, mas sempre duplos, o que os distingue dos heterochromosomas. Ao se encurtarem mostram varias formas: duplas espheras, cubos, bastonetes encurvados ou com o centro mais delgado, anneis ou cruces estes ultimos parecidos com os chromosomas dos ovocytos.

Podemos agora contar os chromosomas e vemos que são 7 (5 bivalentes e 2 univalentes). Mais tarde, ao se tornarem mais densos os chromosomas, já é mais difficil distinguir os bi e os univalentes. Na placa equatorial é muito facil ver os 7 chromosomas, mas a

distincção entre os bi e os univalentes é quasi impossivel em vista polar, mais facil em vista lateral.

Com surpresa, declara ter as vezes encontrado apenas 6 chromosomas. Em um individuo todas as cellulas tinham 6, porem todos eram bivalentes, mas um exame cuidadoso mostrou que em algumas cellulas um dos chromosomas era um pouco diferente, correspondendo certamente aos 2 heterochromosomas. Em outros casos achou em quasi todas as cellulas 7 chromosomas e em muito poucas, 6. N'uma dellas havia alem dos 6 chromosomas um nucleolo. Uma explicação para taes casos seria que os heterochromosomas tambem pódem conjugar, mas depois se separam, separação que nestes casos excepcionaes tardou ou não se deu. Insiste em que suas observações não permitem concluir se a conjugação dos chromosomas é ponta a ponta ou parallela.

Faz a seguir a pergunta: Havendo 7 chromosomas, um delles não será o nucleolo? Distingue o nucleolo alem do facto de se corar mais fracamente do que os chromosomas pela hematoxylina ferrica, por sua evolução: quando os heterochromosomas apparecem o nucleolo diminue de tamanho e de colorabilidade (embóra mais tarde se possa corar fortemente pela hematoxylina ferrica) e, depois que apparecem os outros chromosomas, o nucleolo em geral desaparece mas em certos casos permanece, podendo-se então quebrar em alguns pedaços. A distincção mais segura, seria então a coloração pela hematoxylina Delafield.

b) *Miôses de maturação na espermatogenese*: Sallienta que, embora os pequenos chromosomas da 2ª mitose de maturação se vejam melhor com a hematoxylina

ferrica, tem este processo o inconveniente de corar granações confundíveis com chromosomas ou centriolos. Preferiu por isso a coloração com hematoxylina Delafield. Salieta ainda que as fibras fusoriaes se vêm mal, ao contrario do que occorre com os ovocytos e os ovulos fecundados.

Primeira mitose de maturação: Os 2 heterochromosomas apresentam-se na placa equatorial, ora proximos, ora afastados. Não viu sua divisão, mas o numero de chromosomas que se encontra nos espermatocytos de 2.^a ordem mostra que cada um delles se dividiu.

A observação da anaphase da 1.^a mitose mostra com clareza que ha, de cada lado, 2 chromosomas atrazados, e por analogia com outros casos já conhecidos, crê que devem ser os heterochromosomas. Frequentemente 1 delles está mais atrazado do que o outro. Será acaso ou effeito da differenciação mais precoce de um dos heterochromosomas? Mais tarde todos os chromosomas se juntam nos pólos. A seguir podemos vêr um fio de cytoplasma escuro indo de um grupo de chromosomas ao outro, (resto do fuso), e finalmente a divisão cytoplasmatica se completa.

Segunda mitose de maturação: Não ha repouso intercinetico, iniciando-se immediatamente a 2.^a mitose. Na prophase os chromosomas novamente se separam. Podemos contal-os e observamos que são 7, dos quaes 5 duplos e 2 não subdivididos, os quaes como na mitose anterior, podem estar em varios logares da placa equatorial. As vezes os 5 duplos separam os seus constituintes precocemente, d'onde vemos dentro da cellula 12 chromosomas. A seguir podem ser observados em cada polo

da cellula, os dois grupos chromosomicos com 6 chromosomas em cada grupo. Uma unica vez achou em 1 grupo 5 chromosomas e no outro 7, porem neste ultimo, 1 dos chromosomas estava proximo do plano equatorial. Seria um caso em que os 2 heterochromosomas passaram para uma só das cellulas filhas. Em conclusão, mostra que os heterochromosomas soffrem redução na 2.^a mitose. Observando agora em vista lateral as 2 cellulas-filhas que se estão formando veremos que aqui ha tambem chromosomas atrazados. São em numero de 2, um de cada lado, mas de um lado os 6 chromosomas, isto é, os 5 mais o atrazado se agrupam em um todo para dar o futuro nucleo da espermatide, ao passo que no outro apenas 5 chromosomas se unem para o mesmo fim, o 6.^o permanecendo muito atrazado, proximo ao plano de separação das cellulas-filhas. No começo vemos um fio (resto do fuso) ligando o chromosoma permanecido junto ao plano de separação das espermatides a seus 5 companheiros.

Formação dos espermatozoides: As espermatides-irmãs permanecem algum tempo proximas uma da outra, o que facilita a interpretação do que se vae seguir: o cytoplasma claro separa-se do escuro; este se accumula na região de reunião das cellulas, de sorte que o cytoplasma claro fica distal. Taes mudanças nem sempre são synchronicas nas duas cellulas. A seguir, o cytoplasma claro e o nucleo nelle formado separam-se do cytoplasma escuro, que vae formar corpos residuaes, tal como succede em outros nematoides.

Extremamente importante é o comportamento do heterochromosoma que ficou perto do plano de separa-

ção das espermatides: permanece no plasma escuro e vae ser encontrado no corpo residual, depois que este plasma escuro se separou do resto da espermatide. Ha pois, para cada 2 corpos residuaes, um com 1 chromosoma eliminado.

O tamanho dos espermatozoides é bastante variavel e não, como se poderia esperar do facto de haver espermatozoides com 5 e outros com 6 chromosomas, apenas de dois tamanhos. Acredita que as variações de tamanho devem derivar do cytoplasma: separação mais ou menos completa do plasma escuro. Tamanhos diversos de espermatozoides em outros nematoides já foram vistos por outros autores.

III — Os chromosomas no desenvolvimento embryonario da geração de vida livre.

O ovulo fecundado terá 12 ou 11 chromosomas segundo tiver sido penetrado por um espermatozoide com 6 ou 5 chromosomas. Aqui como em outros nematoides o numero de chromosomas das cellulas somaticas é maior do que o das cellulas germinativas e isso se deve a fragmentação dos chromosomas (tal como ocorre em outros casos: phenomeno da “diminuição” descripto por Boveri). Todavia em *Rhabdias* ha apenas duplicação e não augmento muito grande como em *Parascaris equorum* (= *Ascaris megalcephala*), do numero de chromosomas nas cellulas somaticas. Conta os chromosomas não só no ovo, mas ainda nos blastomeros. Não pode demonstrar que os machos são os que têm 11 e 22 chromosomas, as femeas 12 e 24, por só ter trabalhado com os ovos em segmentação contidos no corpo do

hermaphrodita e não com os machos e femeas adultos de vida livre derivados desses ovos. Insiste ainda na constancia numerica dos chromosomas dos blastomeros, no facto de não ter encontrado differenças de tamanho entre os chromosomas das cellulas do embryão, nem atrazo de chromosomas nessas mitoses.

* * *

Expostos, tão minuciosamente quanto nos pareceu necessario, os trabalhos fundamenates de *Boveri* e de *Schleip* deveremos acrescentar que cada um dos referidos autores, durante a publicação de seu trabalho, teve communicação do trabalho do outro, de sorte que a cada uma das monographias segue-se um “addendum”: *Boveri* declara no seu que nunca viu o aspecto da perda de um chromosoma descripto por *Schleip*; apenas em um caso por elle descripto e acima já referido achou um resto cytoplasmatico na zona de união de 2 espermátides e ahi estavam 2 chromosomas, e não 1 com exigiria a concepção de *Schleip*. Por outro lado, nunca viu os heterochromosomas andarem mais depressa no espermatoocyto de 1.^a ordem. Por isso crê que o typo descripto por *Schleip* deva ser excepcional. Observou ainda no inverno uma parada da espermatogenese e começo de um processo degenerativo, o que talvez explique as figuras de *Schleip*.

Schleip por sua vez, começa assignalando que em traços largos seus achados coincidem com os de *Boveri*; em relação á passagem dos 2 heterochromo-

somas para uma mesma espermatide, lembra que uma só vez observou tal cousa e por isso não considera tal aspecto como habitual. Salieta que nunca viu degeneração de espermatides ou espermatozoides (ou talvez só em pouquissimas cellulas). Faltando os estadios de formação do corpo residual, só se vêem os restos eliminados pela espermatide, podendo-se então pensar em espermatozoides degenerados.

2.º CAPITULO:

O CYCLO CHROMOSOMICO DE *RHABDIAS FULLEBORNI*

1.ª PARTE:

O HERMAPHRODITA

I

Material e technica para o estudo do hermaphrodita

O animal com que trabalhamos foi o nematoide *Rhabdias fülleborni* Trav., 1926. Sua posição systematica é a seguinte:

- Phylum: *Nemathelminthes* Vogt (*fide* Carus, 1863).
- Classe: *Nematoda* Rudolphi, 1808, *emend.* Diesing, 1861.
- Sub-classe: *Eunematoda* Ward, 1916.
- Ordem: *Myosyringata* Ward, 1917.
- Sub-ordem: *Rhabdiasata* Cram, 1927.
- Super-familia: *Rhabdiasoidea* Railliet, 1916.
- Familia: *Rhabdiasidae* Railliet, 1915.
- Sub-familia: *Rhabdiasinae* Travassos, 1930.
- Genero: *Rhabdias* Stiles et Hassal, 1905.
- Especie: *Rhabdias fülleborni* Travassos, 1926.

Não nos preocupamos aqui com o estudo do ponto de vista helminthologico, os dados a respeito se encontrando em Travassos (IX, X).

A obtenção dos animaes é muito facil. Basta agitar o pulmão do amphibio em agua physiologica para que os parasitas fiquem soltos no meio. Convem deixar o pulmão dilacerado um certo tempo na agua physiologica, para onde os parasitas acabam sahindo, principalmente se auxiliarmos a sahida pela agitação. E' interessante assignalar que em geral, quando o pulmão continha formas muito jovens, o que só occorreu muito poucas vezes, não continha formas adultas.

Como fixador usamos os seguintes liquidos:

Bouin-Allen, Carothers, Gilson-Petrunkewitsch, Zenker, Krallinger, Helly, Flemming forte, sublimado acetico seg. Romeis (XI). Os fixadores mais usados foram: Gilson-Petrunkewitsch, Allen, Carothers, sublimado e ainda Flemming.

As inclusões foram feitas pelo processo mixto, celdoidina-paraffina segundo Peterfi. Cortes de 5 a 15 μ .

Como methodos de coloração usamos principalmente a hematoxylina ferrica de Heidenhain e o methodo de Feulgen. Varias technicas de hematoxylina foram empregadas. Mais geralmente deixavamos 12 a 16 horas no mordente e 1 a 2 horas no corante, geralmente a frio. O methodo de Feulgen foi feito de accordo com a technica descripta em Romeis § 983. Quanto á hematoxylina ferrica, é importante assignalar que só com material fixado em Gilson-Petrunkewitsch pudemos estudar os ovos em segmentação, pois o vitello é dissolvido. Com os demais fixadores os ovos ficam, por este methodo, opacos. E' claro que, em todos os fixadores indicados, a hematoxylina ferrica permite o estudo da espermatogenese e da ovogenese. Se se usar o methodo de Feul-

gen o fixador preferível será o liquido de Bouin-Allen e como só a **chromatina** fica colorida, taes preparações tambem permitem o estudo dos **chromosomas** nos ovos (maturação, fecundação, segmentação), pois o vitello não se córa.

Fizemos algumas preparações totaes pelo carmim de Sémichon. O porte do animal não permite um exame cytologico satisfactorio, a menos que, por compressão façamos sahir a gonada. Foi assim que vimos bem a cellula inicial do tubo gonadial. Afóra esta observação nada, de interessante nos foi dado vêr por este methodo.

* * *

Devemos ainda acrescentar que nossos estudos foram feitos entre Outubro de 1936 e Julho de 1937 e que os aspectos encontrados nos hermaphroditas foram sempre approximadamente os mesmos. Esta constatação precisava ser feita já que Boveri diz ter visto em *Rhabdias bufonis*, no inverno, parada da espermatogenese e começo de degeneração, o que é aliás negado por Sch e i p.

II

A ovogenese

O estudo da ovogenese pode ser feito com facilidade, pois o processo se dá ao longo dos tubos ovaricos para terminar no receptaculo e inicio do utero; aqui, como em outros nematoides, a expulsão dos globulos polares se dá após a penetração do espermatozoide, o que acontece no receptaculo seminal.

A evolução geral do processo ovogenetico se dá em *Rhabdias fülleborni* de modo semelhante ao que foi observado em *Rhabdias bufonis*, pelo que é razoavel, conservemos para o seu estudo a orientação proposta por Sch e i p para a ovogenese deste ultimo animal. Ha a considerar além da gonada o *receptaculum seminis* e o utero. Na gonada encontram-se 3 zonas:

A — zona germinativa (“Keimzone”)

B — zona de synapsis (“Synapsiszone”)

C — zona de crescimento (“Wachstumzone”)

às quaes acrescentaremos ainda uma 4ª zona:

D — zona de maturação.

A — Zona germinativa: O ovario começa por uma cellula provida de cytoplasma claro e vacuolado, certamente da parede ovariana e com nucleo grande, bem distincto dos nucleos das ovogonias. A fig. 1, proveniente de um animal fixado e corado “in-totum” pelo carmim de Sémichon e esmagado em seguida, afim de se obter a eventração das visceras, mostra bem o aspecto do referido nucleo. Apesar de Schneider ter affirmado não ser facil a eventração, verificamos ser ella possivel, bastando para tanto esmagar o animal, fazendo-se uma pressão sobre a laminula.

A essa cellula inicial seguem-se as ovogonias. Só as podemos distinguir umas das outras (fig. 2) com difficuldade pois as cellulas estão estreitamente juxtapostas para depois se fundirem em syncytio. Na preparação de que a fig. 2 é uma microphotographia, via-se ao microscopio, antes do 1.º nucleo ovogonico (situado á direita), com grande clareza, o nucleo da cellula inicial,

identico ao da fig. 1. Como porem se encontra em outro plano, na photographia só vemos a sombra por elle deixada. Sch le i p, em *Rhabdias bufonis*, diz que no começo do tubo ovarico é sempre possivel reconhecer as ovogonias prezas ao rachis e que só mais tarde se fundem em syncytio. O exame da fig. 2 mostra que isto não se dá em *Rhabdias fülleborni* com a mesma nitidez, pois só muito mais em baixo (fig. 3) vamos ver surgir o rachison pelo menos o filamento hematoxylinophilo que Sch le i p descreveu dentro delle. Notemos que na fig. 3 o estamos vendo em uma zona (transição das ovogonias para a synapsis), onde as cellulas não estão individualizadas; lógo, tal individualisação não parece ser condição indispensavel para a sua existencia. Convem assignalar a observação de Sch a a k e, que se deteve na questão do rachis e diz o seguinte: “Quanto a mim não pude identificar um rachis na gonada jovem, nem na zona germinativa, nem na de synapsis” (*), admite porem que se possa formar mais tarde, o que está de accordo com o que observamos.

São frequentes as mitoses nestas espermatogonias (fig. 4, I, II, III) e é perfeitamente possivel contar os chromosomas que são sempre em n.º de 12. Segundo Sch le i p haveria em geral 4 maiores em *Rhabdias bufonis*. Não observamos isto em *Rhabdias fülleborni* (fig. 4). Segundo B o v e r i em *Rhabdias bufonis* ha sempre 2 chromosomas menores, mais compactos, situados junto ao nucleolo (cujo contorno se vê em nossas figuras em pontilhado), que seriam futuramente os hete-

(*) “Dagegen konnte ich weder in der Keim- noch in der Synapsiszone der jungen Gonade eine Rhachis feststellen”, pg. 634,

rochromosomas. Nunca observamos em *Rhabdias fülleborni* cousa semelhante.

B — Zona de Synapsis: Não é possível na ovogenese da forma hermaphrodita de *Rhabdias fülleborni* (e o mesmo ocorre em *Rhabdias bufonis*), observar-se todas as modificações complexas da chromatina tão frequentemente encontradas em outros casos, na prophase da primeira mitose de maturação. Às ultimas ovogonias seguem-se nucleos que entram logo em synapsis (fig. 5). Continuamos a observar aqui um synctio e o novello synptico se condensa no centro da area nuclear, tendo no seu interior o nucleolo (fig. 6). E' interessante de se notar que aqui a synapsis assume o aspecto de um blóco compacto (synizésis — M a c C l u n g) emquanto que na espermatogenese no macho da vida livre se observa o typo de synapsis dito "en bouquet" (E i s e n) ou "amphitene" (J a n s s e n s) (figs. 70, 71a).

C — Zona de crescimento: Ao novello synptico segue-se agora um aspecto muito typico que se pode ver na fig. 7. E' o aspecto pachytено bem caracteristico, com fios de chromatina apresentando chromomeros, fios que a um exame cuidadoso se revelam duplos. Observamos por vezes neste inicio de crescimento entre os nucleos normaes, alguns com o aspecto pycnotico, isto é em degeneração (fig. 92). Esta occurencia de nucleos em degeneração em pleno tecido ovariano, não foi referida ainda em *Rhabdias*; seu interesse apparecerá mais tarde, quando então voltaremos a falar nelle. Vemos já na fig. 3 os nucleos começarem a se dirigir para a superficie do tubo ovariano e, á proporção que vamos descen-

do no ovario assistimos não só a esta approximação dos nucleos em direcção á parede ovariana, como tambem ao isolamento progressivo dos ovocytos, pois surgem a partir da superficie do ovario septos que se dirigem verticalmente para o centro do tubo e separam de modo nitido as cellulas sexuaes uma das outras. A fig. 8 mostra com clareza este procésso. Nella se vêem de um lado as fendas que separam nitidamente os ovocytos e do outro lado o mesmo processo um pouco mais atrazado. Facil se torna comprehender como, pelo progredir das fendas, o isolamento dos ovocytos se completa. O exame da fig. 9 mostra um aspecto de conjuncto observado com fraco augmento, que nos permite avaliar com facilidade o modo pelo qual se dá este isolamento progressivo dos ovocytos. Em *Rhabdias bufonis*, Schleich affirma ter observado que o isolamento dos ovocytos começa por ser 2 a 2 e finalmente 1 a 1. Em *Rhabdias fülleborni* absolutamente não vimos isso pois, como a figura o demonstra os ovocytos se isolam desde logo 1 a 1.

Notavel é o augmento de volume que agora se observa nos ovocytos, tanto em seu cytoplasma quanto no nucleo. As figs. 10 e 11 mostram-nos ovocytos já muito crescidos e onde podemos ver os aspectos complicados que a chromatina reveste, formando cordas (fig. 10) que exhibem com grande nitidez uma estrutura dupla como se vê na fig. 11.

D — Zona de maturação: Assistimos agora á individualisação dos chromosomas, o que se dá aqui com sempre, pelo encurtamento dos fios de chromatina. Concordamos com Schleich e Boveri, contra

Mac Dowell, em que o numero de chromosomas reconhecivel desde logo seja 6, o que se comprehende perfeitamente, pois estamos aqui deante dos chromosomas bivalentes (tetrades) que se observam sempre na metaphase da 1ª mitose de maturação. A fig. 12 mostra as tetrades em formação e as figs. 13 e 14 as tetadres já constituídas. No desenho 13, onde só se viam 5 tetrades (a ultima se encontra em outro corte), 2 dellas estão em relação estreita com o nucleolo. Tal relação não é, porém obrigatoria, pois falta na fig. 14 onde estão presentes as 6 tetrades. O aspecto quadripartido pode ser observado, mas onde o vimos com uma nitidez surpreendente foi em preparados fixados pelo Carothers. Ter-se-á uma idéa de como é claro este aspecto pela fig. 15, que mostra uma das 6 tetrades observaveis no fuso da 1ª mitose de maturação, onde o aspecto em cruz é impressionante. As outras 5, situados em planos outros e por isso não alcançadas pela photographia, eram todas tão nitidas como a que estamos vendo na figura. A maturação proségue no receptaculo onde se vae dar a penetração do espermatozoide. A fig. 16 mostranos de modo claro o fuso da 1ª mitose com 6 tetrades, das quaes 4 se encontram quadripartidas e 2 bipartidas e, na parte inferior, o espermatozoide com 5 chromosomas e 1 centriolo.

A expulsão do 1º globulo polar e depois do 2º se dá de modo semelhante ao que observamos nos outros animaes. O fuso, inicialmente central (fig. 15), se desloca para a superficie do ovocyto; os 4 elementos de cada tetrade se condensam (fig. 17) mas o aspecto quadripartido continúa a ser perfeitamente nitido. A fig. 18 mostra uma nitida anaphase da 1ª mitose de maturação, na

qual vemos 4 chromosomas do lado do ovocyto (dyade) e 4 do lado do glóbulo polar (os outros 2 presentes no corte não estavam no plano focalizado). Da divisão das tetrades resulta que 6 dyades passam para o 1° glóbulo polar e 6 ficam no ovocyto de 2ª ordem. A' expulsão do 1° glóbulo polar segue-se a do 2°, ficando 6 chromosomas no óvulo, os outros 6 passando para o 2° glóbulo polar. E' o que se vê perfeitamente nas figs. 19, 20 e 21. A fig. 19 nos mostra o 1° glóbulo polar já eliminado e, ao lado delle, o 2° fuso de maturação com os 6 dyades. A fig. 20 é uma anaphase da 2ª mitose de maturação, com 6 chromosomas univalentes passando para o 2° glóbulo polar e 6 permanecendo no ovulo. Quanto á fig. 21, nos mostra os chromosomas univalentes que ficaram no ovulo. O estudo das tetrades mostra, tal como foi visto em *Rhabdias bufonis*, que não é possível aqui distinguir os chromosomas uns dos outros, pois não vemos diferenças morphologicas ou physiologicas que permittam reconhecer a X-tetrade.

A fig. 22 corresponde a um caso em que podiamos contar no fuso da eliminação do 1.º globulo polar 24 chromosomas, aspecto perfeitamente comprehensivel se admittirmos que cada elemento da tetrade que se devia separar de seus companheiros mais tarde (no decurso das 2 mitoses maturativas, isolou-se precocemente. Devemos approximar esta constatação do achado de Schleip que, por vezes, viu na phase equatorial do 1° glóbulo polar, cellulas com muitos chromosomas (talvez 12). Finalmente a figura 23 nos mostra um fuso do 1° glóbulo polar no qual uma das tetrades está muito afastada das outras 5 (das quaes s 2 apanhadas pela microphotographia).

III.

Espermatogenese

O primeiro problema a resolver diz respeito á séde das zonas testiculares. A este respeito comporta-se *Rhabdias fülleborni* exactamente como foi visto por Sch le i p em *Rhabdias bufonis*. As zonas testiculares mais jovens que encontramos estavam situadas logo abaixo da zona de synapsis. A fig. 24 mostra uma zona muito jovem encravada no inicio da zona de crescimento. Não insistiremos portanto sobre este problema pois nada de novo teriamos a acrescentar ás descrições de Sch le i p.

O numero de vezes que um ovario poderá dar zonas testiculares não foi determinado com precisão. Nunca encontramos mais de uma zona testicular por ovario e frequentemente nenhuma foi encontrada. A titulo apenas de informação geral, diremos que em 33 hermaphroditas onde examinamos os cortes em serie para contar o numero de areas testiculares, encontramos apenas 19 areas, e, em um só animal 2 areas testiculares, isto é 1 para cada ovario.

E' evidente que existindo em pleno ovario uma zona testicular em formação, e no *receptaculum seminis* correspondente, espermatozoides, isto significa que houve anteriormente outra zona testicular que os formou. Ora, como sempre encontramos espermatozoides nos *receptaculi* podemos affirmar que houve, pelo menos, uma zona testicular em relação com cada ovario. Evidente é tambem que, existindo uma zona testicular em evolução no ovario e espermatozoides no

receptaculum, um tal ovario foi a séde do desenvolvimento de ao menos 2 zonas testiculares. Quantas vezes se poderá repetir este phenomeno? Nada impede que elle se possa dar uma terceira vez ou mesmo um numero maior de vezes. Não nos tendo detido particularmente neste assumpto nada concluiremos, pois só um estudo especialmente destinado a resolver o problema permittirá fornecer os dados definitivos.

Muito mais interessante do que a séde das zonas testiculares, é o estudo da espermatogenese. As primeiras cellulas da linhagem seminal são espermatocytos; aqui, como em *Rhabdias bufonis*, são inexistentes as espermagonias, ou melhor, as ovogonias podem seguir 2 caminhos: ou dão ovocytos ou se transformam em espermatocytos, sendo ainda de notar-se que ovocytos podem provavelmente dar espermatocytos.

A espermatogenese dá-se aqui, em traços longos, como em *Rhabdias bufonis*. Por analogia com a classificação adoptada universalmente para o estudo do assumpto, não havendo periodo de multiplicação, que corresponderia ás espermatogonias, podemos admittir um periodo de crescimento, outro de maturação, e finalmente a espermiogenese.

I. Aparecimento dos espermatocytos e periodo de crescimento. A fig. 24 mostra-nos o primeiro symptoma que permite identificar as cellulas da linhagem seminal. Aqui, como em *Rhabdias bufonis*, vemos diminuição de tamanho de cellulas e principalmente diminuição da capacidade do cytoplasma em fixar corantes. Uma zona testicular encravada no ovario, chama logo nossa attenção mesmo ao exame com pequeno augmento, por

este aspecto claro, como se pôde vêr optimamente na fig. 26. Além disso e mais notavel ainda é o apparecimento de um ou dois chromosomas, que desde logo se destacam do resto da chromatina pelo seu aspecto compacto. As figs. 24 e 26, das quaes a ultima corresponde a um augmento maior da primeira, mostram muito bem este facto. Os chromosomas assim precocemente individualisados estão geralmente situados junto á membrana nuclear. Como se sabe, é frequente esta localisação e individualisação precoce dos chromosomas sexuaes particularmente nitida nos orthopteros, tão bem estudados por M a c C l u n g (XII). Diz Schleip ter encontrado uma só vez este aspecto, isto é, uma zona testicular formada exclusivamente por espermatocytos jovens, onde só se viam individualisados os chromosomas sexuaes; acreditamos ser uma tal occurencia mais frequente em *Rhabdias fülleborni*, onde por varias vezes observamos o aspecto em questão. Devemos tambem salientar que o chromosoma que se individualisa precocemente pode estar contido em um plasmosoma (fig. 26,a), o que é negado por Schleip para *Rhabdias bufonis*, facto porem que é commum em outros animaes, como já ha muito foi mostrado por Miss Stevens (XIII) nos Coleopteros e Payne (XIV) nos hemipteros. E' digno de nota o grande nucléolo, fortemente coravel pela hematoxylina ferrica e que se pode vêr no interior do nucleo.

Como se sabe, o periodo de crescimento da espermatogenese é essencialmente caracterizado pela prophase da primeira mitose de maturação, pois o crescimento cellular propriamente dito é aqui de pequena monta. Não é possivel aqui a observação de todas as

phases complicadas que se vêm com tanta clareza em tantos outros casos, todavia alguns aspectos podem ser facilmente reconhecidos. O resultado dessa evolução é aqui como em todos os outros casos a formação dos chromosomas bivalentes (tetrades). Individualizados os heterochromosomas, vemos a chromatina passar do aspecto pachyteno, (fig. 27,a) ao aspecto diploteno (27,b) assumindo os chromosomas aspectos em anel, cruz, Y, bastonetes fendidos, etc. A fig. 28 mostra-nos com particular nitidez um chromosoma no qual se podia vêr perfeitamente a zona de fixação ao fuso (contricção primaria ou região de inserção) correspondendo a uma fixação mediana do chromosoma (chromosoma isobranchial de Sarokin). A fig. 29 mostra ainda alguns aspectos particularmente nitidos de chromosomas (tetrades) em forma de cruz. A observação da fig. 30, proveniente de material fixado em Allen e corado pelo Feulgen, mostra-nos de modo particularmente claro o aspecto quadripartido dos chromosomas metaphasicos, da primeira mitose de maturação. Usando outros fixadores e a hematoxylina férrica como corante, jamais vimos este aspecto quadripartido, o que talvez explique por que motivo não é elle encontrado entre as excellentes figuras do trabalho de Schleip.

II. *Periodo de maturação.* Assistimos agora ás 2 mitoses de maturação, isto é, ao fim da 1ª cuja prophase já descrevemos, a ella seguindo-se immediatamente a 2ª. Se contarmos os chromosomas metaphasicos da 1ª mitose de maturação de *Rhabdias fülleborni*, iremos encontrar o mesmo numero observado por Boveri e por Schleip em *Rhabdias bufonis*, a saber, 7 chromosomas.

Quando Boveri e Schleip fizeram seus trabalhos não existia um methodo que permittisse distinguir com precisão os chromosomas dos nucleolos; por isso era permittido emittir duvidas, já que um nucléolo podia ser confundido em certos casos difficeis com um chromosoma. Graças aos aperfeiçoamentos da technica cytologica, dispomos hoje de methodo de Feulgen que nos permite distinguir nitidamente chromosomas e nucléolos. Tendo usado longamente esse methodo podemos com segurança confirmar as observações de Schleip e Boveri sobre o numero de chromosomas no espermatocyto de 1ª ordem dos Rhabdias. Estes 7 chromosomas se vêem de modo absolutamente nitido na fig. 31, onde podemos reconhecer 5 chromosomas grandes (tetrades) e 2 centraes pequenos (X- chromosomas). Observando as figs. 32 e 33, notaremos ainda o mesmo numero, sendo particularmente nitida a fig. 33, onde os 2 chromosomas X situados um ao lado do outro no alto da figura, distinguem-se perfeitamente das grossas tetrades que os acompanham. A fig. 34 corresponde ainda a um espermatocyto de 1ª ordem com os 7 chromosomas dispostos em 2 fileiras. A significação desses 7 chromosomas é facil de ser dada. Os 2 heterochromosomas não se associaram, constituindo os 2 chromosomas menores; ao contrario, os 10 autosomas uniram-se 2 a 2, formando 5 chromosomas grossos. Na 1ª mitóse, cada heterochromosoma deve dividir-se em 2, de sorte a receber cada cellula-filha 5 dyades provenientes da divisão das 5 tetrades e 2 heterochromosomas, oriundos da divisão equacional dos X chromosomas, isto porque ha tambem nos espermatocytos de 2ª ordem, 7 chromosomas. A evolução geral da 1ª mitóse é em *Rhabdias bufonis* seme-

lhante ao que observamos em *Rhabdias fülleborni*; todavia, Schleip afirma ter visto os heterochromosomas andarem atrasados em relação aos autosomas, e ilustra sua afirmação com 2 figuras, ao passo que Boveri diz não ter visto atrazo na 1ª mitóse de maturação. Podemos afirmar que nenhum atrazo ocorre em *Rhabdias fülleborni*. O exame de numerosas anaphases da 1ª mitose de maturação, mostrou-nos sempre aspectos semelhantes ao que podemos vêr na fig. 35, não sendo observavel portanto, o referido atrazo. Encontrámos apenas 2 vezes atrazos chromosomicos na 1ª mitose de maturação (figs. 36 e 37); não ha porém semelhança alguma entre os 2 aspectos que acabamos de referir e que por sua raridade consideramos como anomalias, e as figuras de Schleip já citadas. Antes de passar á 2ª mitóse de maturação queremos referir uma ultima anomalia que vimos tambem uma unica vez (fig. 38) e na qual se observa numa metaphase de 1ª mitose de maturação, alem de as 5 tetrades no equador do fuso, 2 pequenos chromosomas já afastados do equador e passando juntos para uma das cellulas filhas (espermato-cyto de 2ª ordem).

Passemos á 2ª mitóse de maturação na espermatogênese do hermaphrodito, assumpto dos mais interessantes no cyclo evolutivo da chromatina do genero *Rhabdias*, e sobre o qual já publicámos uma nota (XV). As observações de Boveri como já vimos no 1º capitulo, differem das de Schleip. Para Boveri, estes 2 chromosomas atrasados podem se comportar de 2 formas: a) ser repuchados ambos para uma das cellulas-filhas, de sorte que estas tenham respectivamente 7 e 5 chromosomas; b) passar um para cada uma das

cellulas-filhas, que se apresentarão assim ambas em 6 chromosomas. Dessa maneira explica B o v e r i o aparecimento dos espermatozoides com 5 chromosomas (factores dos machos da geração de vida livre) e 6 chromosomas (factores das femeas da referida geração). Quanto aos espermatozoides com 7 chromosomas não se formariam por degenerarem as espermatides que nelles se deveriam transformar. B o v e r i accrescenta que nunca viu na mitose de spermatocytos de 2^a ordem, os chromosomas em numero de 5, tendo visto uma cellula com 7 chromosomas. Assegura porém ter visto muito bem espermatides jovens com 5, 6 ou 7 chromosomas. Quanto aos espermatozoides, tambem nunca os viu com 7 chromosomas, e sim com 5 ou 6. Acredita que as espermatides com 7 chromosomas devem degenerar, e a este respeito informa ter observado na zona das espermatides muitos nucleos degenerados onde não pode contar chromosomas. S c h l e i p dá interpretação muito differente aos elementos degenerados que podemos encontrar no limite inferior do testiculo de *Rhabdias*. Conforme as observações que adiante referiremos ao tratar da zona de degeneração, chegamos á conclusão de que a razão, está com S c h l e i p. Para S c h l e i p como tambem foi dito, os 2 chromosomas atrasados passam sempre, um para cada uma das cellulas-filhas, porem, numa dellas o chromosoma sexual sobe até a região onde se encontram os autosomas, associando-se a elles para dar a espermatide e, futuramente, o espermatozoide com 6 chromosomas. O outro chromosoma sexual distribuido á segunda espermatide, fica proximo do plano de separação dessas cellulas, sendo assim retido pelo cytoplasma escuro

desta região, cytoplasma que se vae destacar da cellula constituindo um corpo residual provido de 1 chromosoma. E' claro que o corpo residual da espermatide irmã não apresenta chromosoma algum. A espermatide que desprende o corpo residual com chromosoma dará então o espermatozoide com 5 chromosomas. Nossos estudos em *Rhabdias fülleborni*, afim a *Rhabdias bufonis*, levaram-nos a concluir que realmente o par de chromosomas sexuaes caminha sempre atrazado em relação aos autosomas (figs. 38 e 39) e que tanto o mecanismo descrito por Schleip como o typo b de Boveri podem ser observados. E' o que resulta claramente do exame das figuras 41 a 43. As figuras 41 e 42 mostram a divisão de spermatocytos de segunda ordem em espermatides. Vemos os 2 chromosomas sexuaes atrazados em relação aos autosomas mas muito proximo delles (mecanismo b de Boveri). A fig. 43 mostra outra divisão de spermatocytos de segunda ordem, onde se vê em cima o chromosoma sexual ao lado dos autosomas, e embaixo o outro chromosoma sexual na região de separação das 2 espermatides irmãs, região que logo a seguir será desprezada.

Verificamos em nossas pesquisas que o mecanismo de Schleip é muito mais frequente do que o b de Boveri. Finalmente encontramos um terceiro mecanismo mais raro ainda do que os precedentes. Os dois chromosomas sexuaes passam um para cada cellula-filha, permanecendo porem ambos nas proximidades da placa equatorial, isto é, na zona de cytoplasma que será desprezada na espermatogenese, d'onde resulta que os espermatozoides nascidos dessas espermatides, deverão ter ambos 5 chromosomas. O exame da fig. 44 mostra

melhor do que o faria qualquer descrição este 3º modo por nós observado, como também que tal aspecto nada tem de commum com a descrição de B o v e r i quando diz ter uma unica vez encontrado entre as 2 espermatides que estavam se separando uma gotticula de plasma, com 2 bolinhas intensamente coradas (chromosomas?) (*).

O mecanismo *a* de B o v e r i nunca foi por nós observado, bem como também nunca vimos as espermatides com 7 chromosomas, que deveriam ser encontrados caso tal mecanismo existisse no *Rhabdias* por nós estudado.

III. Espermio-genese. Duas palavras bastarão sobre a espermiogenese que, nos nematoides, dada a relativa singleza da estructura do espermatozoide, consiste quasi somente na expulsão de uma certa quantidade do cytoplasma da espermatide (corpo residual). Evidentemente toda vez que se tiver realizado o mecanismo “Schleip” para a formação das espermatides, dos 2 corpos residuaes eliminados por cada 2 espermatides-irmãs, um apresentará o chromosoma que ficou retido no plano equatorial. Dando-se o mecanismo por nós descripto, em cada corpo residual haverá 1 chromosoma eliminado.

A fig. 45 mostra-nos 2 corpos residuaes cada um delles com 1 chromosoma, d’onde podemos concluir

(*) Ich habe in einer Eiröhre zwei noch zusammenhängende Spermatiden mit nicht genau feststehbarer Chromosomenzahl gesehen, an deren schmaler Verbindungsbrücke ein scheinbar in Abschnürung begriffenes Plasmatröpfchen aufsass, das zwei intensiv färbbare Kügelchen (Chromosomen?) enthielt”. pag. 93.

terem elles se originado pelo nosso mecanismo. Accrescentaremos de accordo com Boveri que em casos favoraveis (fixação em Allen, mas especialmente em Flemming) tornou-se possivel contar chromosomas nos espermatozoides, o que não parece ter sido realizado por Schleip. A fig. 46 mostra-nos 1 espermatozoide com 6 chromosomas (a) e outro com 5 (b).

Será interessante fazer uma estatistica afim de se determinar a frequencia com que occorrem os 2 typos de espermatozoides. Não tivemos tempo levar a cabo essa empreza, todavia a titulo de informação para inicio de pesquisa transcreveremos o seguinte resultado a que chegamos:

Espermatozoides com 6 chromosomas — 44

Espermatozoides com 5 chromosomas — 52

Como se vê ha sensivelmente o mesmo numero de espermatozoides dos 2 typos.

Interessante tambem seria determinarmos a percentagem de machos e femeas na geração de vida livre, afim de estabelecermos uma vez conhecida a percentagem dos 2 typos de espermatozoides, se possuem ambos egual capacidade para a fecundação. Tambem a titulo meramente informativo transcreveremos os seguintes dados numericos:

Femeas — 69

Machos — 67

Vemos que ha proximamente egualdade numerica para os 2 sexos. E' interessante observarmos que á proporção que a cultura envelhece as femeas augmentam em relação aos machos. Nas culturas jovens ha maior numero de machos, nas velhas maior numero de femeas.

Perguntar-se-á, onde ficam estas femeas nas culturas jovens? Ao que se poderá responder que é possível que os machos se diferenciem mais precocemente sendo assim mais depressa identificaveis, pois é certo que nas culturas ha muitas larvas cujo sexo não determinamos, ou ainda, talvez haja com a morte mais precoce dos machos, augmento apparente das femeas. E' possível que os 2 mecanismos estejam em jogo, parecendo porem incontestavel que os machos morrem mais depressa, acabando por não ser mais encontrado macho algum (cultura de 6 dias) quando as femeas são ainda bem evidentes.

Devemos ainda assinalar que o tamanho dos espermatozoides da forma parasita parece ser sensivelmente constante como se vê dos contornos dos mesmos, desenhados na fig. 47. Não ha pois aqui a variação de tamanho encontrada em *Rhabdias bufonis* por Schlei p. Antes de dar por encerrado o estudo da espermatogênese na geração parasita de *Rhabdias fülleborni* queremos referir dois achados illustrados pelas figuras 48 e 49. Na fig. 48 vemos em corte muito delgado, a 2ª mitóse de maturação se processando em 2 cellulas. Em a, contam-se 6 chromosomas na placa equatorial vista de face (e não 7 como seria de se esperar) ao passo que em b, onde se vê uma mitose semelhante de perfil, observam-se 2 autosomas (os unicos attingidos pelo corte) no equador da cellula e 1 chromosoma em situação anormal, já ao nivel do centriolo (ver o outro centriolo da mesma cellula na parte inferior da figura). Provavelmente a cellula com os 6 chromosomas na placa apresentára esta mesma anomalia e por isso o 7º chromosoma já deslocado não foi alcançado pelo corte. A fig. 49 mostra-nos uma area

testicular com a particularidade interessante de conter um ovocyto já bastante crescido (a). A este respeito devemos lembrar o que foi observado por S c h a a k e. De suas observações em infestações experimentaes de rãs com *Rhabdias bufonis* chegou a concluir de que ás vezes há cellulas que começam sua evolução ovocytaria, mas depois de terem crescido um pouco param. Não sabe se mais tarde taes cellulas poderão dar ovocytos normaes ou se irão degenerar. Acha pouco provovel que possam dar espermatocytos; muito verosimilmente o ovocyto por nós encontrado na fig. 49 pertence á essa categoria descripta por S c h a a k e.

* * *

Assumpto interessante é o estudo das regiões que separam o testiculo do ovario, estudo no qual se deteve longamente S c h l e i p e de que tambem se occupou S c h a a k e. S c h l e i p chama o limite superior entre aera testicular e o ovario, zona de transição ao passo que ao limite inferior dá a denominação de zona de degeneração. Segundo S c h l e i p a zona de transição que só se vê nitidamente nas zonas testiculares jovens é constituída por cellulas que representam um typo intermediario entre ovocytos e espermatocytos. Como não existe nas zonas testiculares mais velhas devemos admittir que se transformaram, quer em ovocytos, quer em espermatocytos. As cellulas da zona de transição nasceriam provavelmente dos ovocytos mais ou menos crescidos, por um processo de diminuição. Por outro lado não acha impossivel que espermatocytos jovens se transformem em ovocytos, entrando para isso num pe-

riodo de crescimento. Schaa ke estudou bem a zona de transição em formas extremamente jovens, obtidas por infestação experimental de rãs e verificou claramente a diminuição de tamanho dos ovocytos, para dar os spermatocytos. Assim sendo a chamada zona de transição de Schleip pertence á zona de formação de spermatocytos (*). Não tivemos oportunidade de encontrar em *Rhabdias fülleborni* nenhuma particularidade digna de nota em relação á zona de transição.

Quanto ao limite inferior, é a chamada zona de degeneração de Schleip, zona não descripta por Boveri, que talvez tenha sido levado a confundil-a com aquella a que considerou como constituida pelos productos de degeneração na espermatogenese (spermatides com 7 chromosomas). Schleip se detem longamente na analyse desta região, cuja verdadeira significação não pode interpretar e por isso não nos preocuparemos com as hypotheses que apresentou sobre a mesma. Limitar-nos-emos a declarar que em *Rhabdias fülleborni* tal zona pode ser nitida e facilmente observada (figs. 25 e 50), sendo digno de nota que o seu comprimento nunca attinge as grandes dimensões descriptas por Schleip em *Rhabdias bufonis*. Tambem em *Rhabdias fülleborni* é possível verificar, depois que a zona testicular se transforma completamente em es-

(*) "Auf die Eibildungszone (Wachstumszone) folgt bei dem jugendlichen Geschlechtsorgan eine lange Samenbildungszone. Aber die entwickelten Spermatocyten stossen nicht unmittelbar an die typischen, grossen Ovocyten, wie es beiden alteren Hodenzonen des ausgewachsenen Genitalorgans der Fall ist. Der Übergang ist vielmehr ein ganz allmählicher... Diese Region die auch die jüngeren Hodenzonen alterer Zwitter auszeichnet, wird von Schleip als "Uebergangszone" bezeichnet. pag. 635.

permatozoides, o desaparecimento da zona de degeneração, desaparecimento que, com Schleip, não sabemos explicar. Os espermatozoides insinuam-se então entre os grandes ovocytos, pois já estamos proximo ao *receptaculum seminis*, como que acelerando sua chegada nelle (fig. 91). Voltaremos adiante a discutir esta questão.

Notemos finalmente, na fig. 92, uma zona ovariana (início da zona de crescimento) salpicada de ovocytos de aspecto semelhante ao que se observou na zona de degeneração (a). Não sabemos como interpretar este aspecto que pudemos observar com relativa frequencia.

Evidentemente um estudo mais cuidadoso das zonas de transição e de degeneração se impõe, estudo, que talvez contribua para esclarecer os motivos que levam uma região do ovario a se transformar em testiculo.

IV.

Fecundação e desenvolvimento embryonario.

Trataremos brevemente deste assumpto, onde nada de particularmente notavel para nosso estudo se encontra.

Como já dissemos, a penetração dos espermatozoides dá-se, aqui como em tantos outros nematoides, antes da expulsão dos globulos polares e isso no *receptaculum seminis*. A fig. 16, já nossa conhecida mostra-nos um ovocyto no receptaculo contendo um espermatozoide com 5 chromosomas e um centriolo. Vemos tambem o fuso da 1ª mitose de maturação com as 6 tetrades. A

copulação dos pronucleos dá-se aqui como em *Rhabdias bufonis* em um dos polos da cellula (fig. 51), sendo os dois do mesmo tamanho. E' possível a contagem dos chromosomas e então podemos ter como nos mostra a fig. 52, um dos pronucleos com 5 chromosomas (evidentemente o pronucleo macho) e o outro com 6; ao todo, 11 chromosomas ou então, caso a fecundação tenha sido realisada por um espermatozoide com 6 chromosomas, total, 12 chromosomas. E' o que se pôde vêr na figura 53, onde as membranas dos pronucleos já desapareceram. Já sabemos que no 1.º caso o producto será um macho da geração bisexuada, no 2º uma femea. A fig 54 mostra-nos um ovulo fecundado onde tambem as membranas dos pronucleos desapareceram e que ostenta 11 chromosomas. Segue-se a 1.ª mitose que é verdadeiramente deslumbrante (fig. 55). Dada a facilidade com que podem ser obtidos sapos ou rãs infestados e a facilidade tambem com que se pode, seccionando um *Rhabdias* e examinando entre lamina e laminula os ovos que sahem do corpo do animal, ovos que podem ser observados vivos, corados vitalmente ou sub-vitalmente analysar as mitoses de segmentação de que são séde, aconselhamos vivamente este material para demonstrações didacticas, mesmo para quem só dispõe de laboratorios com installação rudimentar.

Não acompanharemos a evolução da segmentação, nem a formação progressiva do embryão, assumpto que foi especialmente estudado no genero *Rhabdias* por Goette (XVII), Nedkoff (XVIII), Neuhaus (XIX) e mais recentemente, as phases finaes por Schacke. Todavia queremos referir que tambem em *Rhabdias fülleborni* constatamos que os chromosomas só

se mantem inteiros nos blastomeros destinados a dar as cellulas sexuaes (P). Nos outros blastomeros ha fragmentação dos chromosomas de tal maneira que seu numero fica duplicado, tal como foi perfeitamente observado por Schleip em *Rhabdias bufonis*. Não é bem o phenomeno da “diminuição” descripta por Boveri em *Parascaris equorum* (= *Ascaris megalocephala*) pois em *Rhabdias* não ha dissolução das extremidades dos grandes chromosomas de *Parascaris*, mas apenas fragmentação de cada chromosoma em 2, em vez de sua pulverisação em numerosos chromosomas. A fig. 56 mostra-nos um blastomero com 11 chromosomas ao passo que na figura 57 vemos dois, cada um delles com 12 chromosomas. Por causa disso acreditamos que aqui, como foi visto por Schleip em *Rhabdias bufonis* a fragmentação dos chromosomas provavelmente só começa na 3ª mitose de segmentação e não na 2ª como succede em *Parascaris equorum*. A fig. 58 mostra-nos 2 blastomeros somaticos cada um delles com 24 chromosomas, ao passo que na fig. 59 vemos um blastomero com 22 chromosomas.

Evidentemente 11 e 22 chromosomas se encontram nos futuros machos, ao passo que 12 e 24 nas futuras femeas. Devemos ainda assignalar que tambem em *Rhabdias fülleborni*, como Schleip viu em *Rhabdias bufonis*, não encontramos atrazo, nem differenças sensiveis de tamanho dos chromosomas nas mitoses de segmentação.

2.ª PARTE:

A GERAÇÃO DE VIDA LIVRE

I.

Material e technica para o estudo da geração bisexuada

a) *obtenção das culturas da geração de vida livre.* — Numerosas tentativas foram feitas antes de se conseguir um processo que fornecesse com facilidade, material abundante. Como fonte do material partimos inicialmente de culturas de fézes do sapo *Bufo marinus*. Abandonamos logo este methodo, a) por conterem as fézes areia, difficil de ser removida e que perturbava caso fosse usada a technica das inclusões, a realização dos cortes, b) principalmente pela possibilidade de existirem nas fézes outras especies de nematoides, d'onde difficuldades de identificação, nos cortes, da especie com que se estava trabalhando. Fomos assim levados a preferir sempre como fonte de material as culturas a partir das formas hermaphroditas do pulmão. Tentamos então varios meios de cultura: meios solidos (agar) ou então agar recoberto de um film liquido (agua), semi-solidos (agar, gelatina), liquidos: agua commum, agua barrenta, solução physiologica e tambem agua physio-

logica com 1 fragmento de viscera (fígado ou pulmão) ou sangue (raspagem do pulmão). Depois de numerosas tentativas chegamos á conclusão de ser o melhor meio a agua physiologica. Os hermaphroditas eram levados do pulmão para um fundo de placa de Petri de cerca de 5 cm. de diametro, com a solução physiologica. Esta placa se achava dentro de outra placa de Petri maior (12 cm.), contendo um pouco d'agua. Em alguns casos a solução physiologica ia sendo retirada diariamente e substituida por agua commum. Quanto á agua deixou-se, por vezes a mesma até o fim da cultura. Ambos os processos deram sempre culturas ricas e onde era facil obter material abundante para os estudos. Os hermaphroditas continuavam vivos algum tempo (em geral 2 a 5 dias) e iam pondo numerosos ovos larvados, dos quaes provinham os abundantes machos e femeas da cultura. Em geral do 2º até o 6º dia a partir do inicio da cultura era ella rica em formas utilisaveis para o presente estudo. As larvas infestantes appareciam em 8 dias. As culturas foram sempre obtidas na temperatura do laboratorio.

b) *Technica utilizada para o estudo da espermato-gnese na geração de vida livre.* — Dois processos foram utilizados: exames totaes e cortes.

Exame do animal total: Dada a pequenez dos animaes e a sua transparencia ou facilidade com que os podemos tornar taes, depois de corados, foi este o methodo de escolha. Os processos empregados foram os seguintes: a) carmim de Sémichon: processo extremamente commodo, pois basta transportar com uma pipeta Pasteur, porções da cultura para tubos de hemolyse contendo o car-

mim que fixa e córa. Para evitar a super-coloração, decanta-se o material depois de sufficientemente corado para a glicerina aquosa. As preparações já se apresentam perfeitamente coloridas no fim de algumas horas. Em geral esperamos 24 horas e examinamos entre lamina e laminula. Lutando o preparado conserva-se elle bastante tempo, apresentando porem o inconveniente de ficar frequentemente supercorado. Esta technica foi por nós muito usada sempre com bons resultados.

b) Fixação da cultura, transportada tambem com uma pipeta, para Gilson Petrunkevitch, 1/2 hora, centrifugação, substituição do fixador por alcool fraco 1/2 hora para lavagem, centrifugação, coloração como acima com carmin de Sémichon. Exame como acima. Foi este o processo que nos deu melhores resultados, para o exame in-toto.

c) tentamos utilizar o methodo de Boveri, com carmin de Grenacher, não tendo porem colhido resultados favoraveis para o estudo da espermatogenese.

Processo dos cortes: Utilizamos tambem esta technica. Os fixadores usados foram: Gilson, Petrunkevitch, Allen, Flemming forte. Para incluir tivemos que vencer algumas difficuldades. A extrema pequenez dos animaes aggravada com a sua transparencia que acaba sendo total quando chegamos ao benzol, torna extremamente difficil a obtenção de blocos ricos em material. Afim de augmentar a visibilidade dos pequenos nematoides, utilizamos a coloração prévia in-toto (carmin); tal processò nos não deu bons resultados. Tambem não foram bons os que colhemos esperando que, em cada banho, o material se depositasse sob a influencia

da gravidade e a seguir se decantassem os liquidos successivamente usados. Depois de numerosas tentativas obtivemos os melhores resultados com o processo de Caullery e Chapellier. Usamos um pedaço de tubo de vidro para pipetas Pasteur, fechado em uma de suas extremidades com "Müllergaze," com a qual, no entanto sempre se perdiam alguns animaes (pois não tinhamos o numero bastante fino de gaze), que passavam atravez della. O material aspirado com uma pipeta era levado para dentro do citado tubo e transportado sem se tocar mais nelle para os diversos banhos necessarios á inclusão.

Como technica de inclusão, utilizamos a inclusão mixta em celloidina-paraffina com celloidina dissolvida em benzoato de methyla, segundo Peterfi. Inclusão feita no proprio tubo. Para obter o bloco basta retirar a Müllergaze ou a fazenda empregada, aquecer ligeiramente e empurrar o bloco para fora com um bastão fino. Cortes seriados de 5, 10 e 15 μ e corados com hematoxylina ferrica ou pelo methodo de Feulgen.

II.

Espermatogenese

Já anteriormente publicamos uma nota sobre a espermatogenese na geração bisexuada de *Rhabdias fülleborni* (XX). Daremos agora uma descrição mais minuciosa do assumpto. Foi difficil vêr o periodo de multiplicação, pois as formas bem jovens das culturas já mostram uma gonada formada apenas por spermatocy-

tos (fig. 60a). Para vêr as espermatogonias seria necessario um estudo cuidadoso das larvas em formação no corpo do hermaphrodita, estudo que não tivemos tempo de fazer convenientemente. A partir dos espermatocytos jovens pode-se acompanhar com absoluta segurança a evolução da espermatogenese. O material mais adequado não só pela facilidade de sua obtenção, mas principalmente pela segurança na interpretação dos aspectos observados, foi fornecido pelo exame in-toto de preparações obtidas pela technica já indicada. O methodo dos cortes seriados, util para esclarecer minucias cytologicas foi também empregado. Todavia, as formas de vida livre, sendo transparentes, pequenas e facéis de observar em preparações totaes, prestam-se como já dissemos admiravelmente para o estudo da espermatogenese. Accresce que nas preparações in-toto não ha perigo de se deixar de observar algum chromosoma que tenha, no método de cortes, ficado em outro corte ou ainda, que um chromosoma cortado seja contado duas vezes, por se encontrar em dois cortes successivos. Eis porque os factos fundamentaes relativos á espermatogenese foram determinados em preparações totaes. A partir dos espermatocytos jovens foi possivel acompanhar perfeitamente a espermatogenese.

A fig. 61 mostra o testiculo em sua quasi totalidade (só não foi desenhada a parte final). As primeiras células (a), situadas na proximidade da extremidade fechada em fundo do sacco que marca o inicio do testiculo, são espermatocytos jovens, contendo um volumoso nucleolo. A' proporção que avançamos dentro do organo vamos assistindo á prophase da primeira mitose de ma-

turação. Nesse material, examinado in-toto, não é possível a verificação de todos os complicados estadios que em tantos outros casos foi notado, e de que alguns exemplos encontraremos d'aqui a pouco nos cortes. Vemos, porem com perfeita clareza o aspecto filamentososo que a chromatina assume, a individualisação dos filamentos (b) e seu encurtamento para constituir as tetrades perfeitamente nitidas. Especialmente a cellula (c) nos mostra 5 tetrades e um chromosoma muito menor, representado por um granulo. E' digno de nota o aspecto dos chromosomas nos espermatocytos que se seguem. Vemol-os formarem uma pilha (d), aspecto que encontramos com bastante regularidade.

Na fig. 62 vemos com clareza 2 espermatocytos de 1.^a ordem, cada um com 5 tetrades e 1 chromosoma menor, o qual na cellula situada na extremidade do desenho se deixa claramente resolver em 2 granulos. Ha 1 espermatocyto no qual só se distingue 1 tetrade. Como se trata de uma preparação in-toto que foi perfeitamente explorada em todos os seus planos, e nenhum outro chromosoma havia, quer nos parecer que a interpretação mais razoavel é que nos encontramos deante de uma cellula em degeneração.

Estes achados estão perfeitamente de accordo com as previsões que podiam ser feitas sobre o numero de chromosomas do macho, que segundo Schleip e Boveri em *Rhabdias bufonis* e nossas pesquisas em *Rhabdias fülleborni* Trav. deve ser 11, pois os machos vão derivar da fecundação de um ovulo (com 6 chromosomas) por um espermatozoide com 5 chromosomas. O

macho é pois do typo X O, possuindo 11 autosomas e 1 unico chromosoma sexual.

A fig. 63 mostra-nos uma metaphase da 1.^a mitose de maturação. Na parte inferior da figura foram cuidadosamente desenhados os chromosomas. Vemos que existem 5 tetrades e 1 chromosoma sem parceiro. As figs. 64 e 65 mostram 2 anaphases pelas quaes se vê que o chromosoma X passa todo para um dos espermatocytos de 2.^a ordem, caminhando atrazado em relação aos autosomas. Evidentemente na fig. 65 o espermatocyto que se iria formar em cima teria 6 chromosomas, o de baixo apenas 5. A fig. 66 mostra-nos os 2 typos de espermatocytos de 2.^a ordem, respectivamente com 5 e 6 chromosomas. E' muito difficil a observação dos espermatocytos de 2.^a ordem, por serem os mesmos muito raros, provavelmente porque assim que formados entram em divisão para dar os espermátides.

A fig. 67 mostra um espermatocyto de 1.^a ordem (a) no qual se pode vêr de um modo particularmente claro as 5 tetrades, formadas cada uma dellas por 4 elementos, e o chromosoma sexual bipartido. Ao lado delle 2 espermatocytos de 2.^a ordem, um delles (b) com 5 dyades bipartidas, outro (b') com 6 dyades. Vêm-se ainda 2 cellulas: c, é uma espermatide com 5 chromosomas e na qual ha uma extensa zona de plasma escuro que não se vê mais na cellula d, que já é um espermatozoide, tambem com 5 chromosomas. A explicação desse facto é simples: a espermatide ao se transformar em espermatozoide expulsa como é de regra uma certa quantidade de plasma (espermiogenese); a cellula de baixo já é pois, um espermatozoide. A separação entre os 2 plasmas

começa em geral a se processar muito precocemente, pois já nas figs. 61, 62, 67 vemos-a se iniciar nos espermatocytos de 1.^a ordem. A fig. 68 mostra-nos uma grande cellula (espermatocyto de 1.^a ordem) e ao lado della 3 cellulas menores. A cellula escura com 6 chromosomas é uma espermatide que ainda não expulsou o plasma escuro. Nella não notamos com a mesma clareza que na fig. 67 a separação dos 2 plasmas. Realmente nem sempre essa separação pode ser vista com a mesma nitidez nas diversas cellulas. Em torno dessa espermatide vemos alguns blocos escuros que nada mais são do que restos do cytoplasma de espermatides, que foram eliminados, e ainda 2 espermatozoides, ambos com 5 chromosomas. Todas as figuras a que acabamos de nos referir são desenhadas de animaes in-toto.

Observemos agora os aspectos que nos são fornecidos pelo exame de cortes. A fig. 69 mostra uma gonada jovem. Nella vemos muito bem os espermatocytos onde o chromosoma X já se acha perfeitamente individualizado e situado junta á membrana nuclear, emquanto que os autosomas se apresentam na phase leptonema. Na preparação era possível a verificação da duplicidade de cada um dos filamentos, cousa que como se sabe, nem sempre é observavel com clareza na meiose dos diversos seres vivos. A microphotographia não permite, como é comprehensivel, uma demonstração nitida da duplicidade em questão; todavia na preparação a cousa é perfeitamente nitida.

A fig. 70 permite verificar com perfeita clareza que o pareamento dos chromosomas parceiros já se deu e que os chromosomas duplos (pachynema) estão orientados

(centrotaxia ou phase “en bouquet”) em direcção a um ponto particular da superficie do nucleo. Não nos foi possível vêr o centriolo que, de habito, fica no cytoplasma, precisamente no ponto para onde convergem os chromosomas. A fig. 71 mostra em (a), os filamentos espessos semelhantes aos da fig. 70 (a) e além disso, (b) um aspecto synaptico bem avançado, onde já se vê nitidamente estensa area nuclear vasia de chromosomas. Em 72 observamos perfeitamente o aspecto diplonema (a), bem como tetrades bem condesadas (b,c), promptas para entrar na diakinese. Finalmente, para terminar com esta descripção da prophase da 1.^a mitose de maturação da espermatogenese, podemos observar a fig. 73, onde um nucleo particularmente nitido foi cuidadosamente desenhado. Vemos nelle o X-chromosoma encostado á membrana nuclear (a) e 5 tetrades, em cada uma das quaes a condição quadripartida era de uma nitidez impressionante.

As microphotographias 74 e 75 mostram 2 espermatozoides, em 74 com 5 chromosomas, em 75 com 6. Tentamos determinar a relação entre o numero de espermatozoides com 5 e com 6 chromosomas. Um inicio de estatistica deu-nos:

Espermatozoides com 5 chromosomas : 32
Espermatozoides com 6 chromosomas : 40

* * *

A fig. 76 representa uma mitose (prophase) em cellula somatica de um macho de vida livre. Vemos ahi 22 chromosomas, o que realmente prova que os machos da vida livre provêm dos embryões com 11 e 22 chromosomas.

III

Ovogenese e outros phenomenos observados nas formas de vida livre

Não nos foi infelizmente possível estudar convenientemente a ovogenese nas formas de vida livre. A technica dos exames in-toto que tão bons resultados forneceu para o estudo da espermatogenese, não permitiu o estudo da ovogenese. Os ovulos á proporção que adquirem vitello e se vão tornando maiores, ficam cada vez mais opacos, não nos tendo sido possível vêr a expulsão dos globulos polares e muito menos o comportamento da chromatina nas mitoses de maturação. Pelo mesmo motivo não pudemos vêr nos preparados in-toto a fecundação e acompanhar em suas minucias cytologicas o desenvolvimento do ovo. O estudo desses problemas seria possível em cortes, mas exigiria um tempo de que não dispuzemos. Esperamos poder brevemente completar estas lacunas no que respeita ao cyclo chromosomico da geração de vida livre.

Limitar-nos-emos por agora a mostrar as figs. 77, 78 e 79. A fig. 77, proveniente de uma femea muito jovem, mostra com clareza 12 chromosomas (dos quaes 2 bi-partidos) numa ovogonia, o que prova que o numero de chromosomas que havia sido previsto para o sexo feminino é realmente o observado.

A fig. 78 mostra dentro da femea, ao lado de um ovocyto (a) o receptaculo seminal (b) cheio de espermatozoides, nos quaes a contagem de chromosomas é impossível. Finalmente, a fig. 79 corresponde a um

ovulo fecundado, onde foi possível contar 18 chromosomas. E' provavel que se trata de dispermia, por espermatozoides ambos com 6 chromosomas.

* * *

Ainda em relação ao comportamento da geração de vida livre, queremos descrever o modo pelo qual se conduzem dentro do corpo de sua mãe, os ovulos que foram fecundados. Pelos motivos já indicados não pudemos seguir minuciosamente a segmentação do ovo e a formação do embrião; o que vimos com clareza, e é cousa facil de ser observada, é que nas culturas velhas onde a fecundação já se havia dado e as larvas podido se formar, culturas das quaes os machos já haviam desapparecido, as larvas eclodem do ovo dentro do corpo de sua mãe e se movem dentro della, alimentando-se á custa della e dos ovos mais atrasados, isto é, daquelles que foram fecundados por ultimo. Somos levados pois a concluir que essas larvas, tal como occorre em outros nematoides, são fraticidas e matricidas. Com effeito, se observamos uma femea adulta, podemos notar dentro della um numero bastante consideravel de ovos em divisão além de muito outros mais atrasados (fig. 80). Ora, observando agora culturas mais velhas, nas quaes as larvas já eclodiram, notamos que o numero de larvas contidos n'uma femea nunca ultrapassa 3 (fig. 81), sendo o numero mais frequente 2 (fig. 82) e havendo ainda casos em que uma só larva é encontrada (fig. 83). Como nunca vimos sahirem os ovos larvados de dentro das femeas da geração de vida livre (cousa facil de ser observada com a forma hermaphrodita do pulmão) e

nem larvas jovens, somos levado a crêr que só após terem destruido o organismo materno e transformado o corpo de sua mãe em um sacco de chitina completamente vazio é que as larvas rompem este sacco e vão para o mundo exterior. Ora, como o numero de ovos contidos numa femea, numero que não determinamos com precisão, é muito superior a 3, somos obrigados a concluir que as primeiras larvas nascem, começam por destruir os ovos que ficam para traz e em seguida o organismo materno. Assim se comprehende, por que motivo o numero mais commumente observado é de 2 larvas em cada femea, pois havendo 2 ovarios, cada uma dellas corresponde ao primeiro ovo que deu nascimento a uma larva. Quando estas primeiras larvas, depois de terem destruido tudo quanto encontraram do lado do corpo em que nasceram, tiverem attingido o outro lado, lá já encontrarão cada uma dellas, sua irmã, egualmente desenvolvida e apta portanto a não se deixar destruir. A existencia de femeas com uma unica larva se deveria talvez a um desenvolvimento mais precoce de um ovario, permitindo que o primeiro producto delle nascido pudesse attingir o outro lado do corpo antes deste ter dado nascimento a uma larva livre ou, já o tendo feito, mas a larva livre sendo menor e podendo ser vencida. Emfim, hypotheses outras podem ser feitas para explicar esta unicidade e o melhor é esperarmos que a observação dos factos nos explique o phenomeno. Considerações semelhantes podem ser feitas para explicar o caso de 3 larvas (2 ovos eclodindo num ovario, quasi simultaneamente, etc., etc.).

3.^a PARTE

ALGUNS PROBLEMAS ESPECIAES

I

Hermaphroditismo proterandrico ou proterogynico?

Se ha problema de caracter geral digno de merecer nossa atençaõ, é certamente esse de saber se o hermaphroditismo de *Rhabdias* é proterandrico ou proterogynico, pois é provavel que a soluçaõ encontrada para os *Rhabdiasidae* deva valer para os demais nematoides hermaphroditas.

E' evidente que nos animaes adultos onde existem zonas testiculares e ovarianas, não se pode saber com segurança qual dos dois typos foi formado em 1.^o lugar.

Tivemos ensejo, trabalhando em *Rhabdias fülleborni*, de observar um animal bastante jovem, cujos uteros continham apenas poucos ovos em segmentação. Basta comparar a fig. 84, que é um aspecto de conjuncto do animal em questãõ, com a fig. 85, que mostra um *Rhabdias* commum do pulmão, para se poder avaliar com facilidade da juventude de nosso exemplar. Estudando uma zona testicular admiravelmente nitida apresentada

por este animal (fig. 86) (para se vêr a sua séde vêr a fig. a), tivemos nossa attenção chamada para uma particularidade que a distingue das zonas testiculares encontradas facilmente nas formas crescidas.

Para que a possamos comprehender convem que nos detenhamos um pouco na analyse da zona testicular desse *Rhabdias* jovem. Olhemos para a fig. 87, que nos mostra o limite superior da zona testicular em questão. Veremos ahi um ovocyto e abaixo delle 2 espermatocytos de 2.^a ordem enchendo toda a largura da zona espermatica. Só este facto já é um indicio claro de que esta zona testicular é muito jovem, pois se a compararmos com o limite superior de zonas testiculares de *Rhabdias* adultos, (figs. 25, 27, 39, 50) veremos que aqui o numero de espermatocytos que occupam a largura da zona testicular é sempre muito superior a 2. Essa região superior da zona testicular, zona de transição de Schleip, nada de particular apresenta, alem de sua estreitez.

O mesmo não occorre se nos detivermos no exame da zona inferior. Emquanto que numa zona testicular correspondente (“Aeltere Hodenzone”) de *Rhabdias* adulto vemos um aspecto muito caracteristico, bem estudado por Schleip que lhe deu o nome de zona de degeneração, aspecto que se pode ver muito bem em nossa figura 50 (a), o mesmo não aconteceu com a forma testicular jovem. E’ assim que se a examinarmos, veremos os espermatozoides (fig. 88a) em contacto com um ovocyto de aspecto absolutamente normal, onde nenhum signal de degeneração poderá ser observado apesar de se tratar de zona testicular evolvida, isto é, já tendo elaborado espermatozoides. Foi tão notavel particula-

ridade que nos levou a examinar com o maximo cuidado os cortes seriados na região em questão. O exame da fig. 89 mostra-nos que pouco abaixo da zona testicular que estamos estudando se pode ver o *receptaculum seminis* (b) e nelle numerosos espermatozoides. E' o que se pode observar com clareza na fig. 90, onde foi cuidadosamente desenhada a zona testicular e abaixo della o *receptaculum seminis*. Infelizmente uma dobra do tracto genital fez que em nosso corte faltasse uma parte do tubo ovariano, que vae do ovocyto que fecha a zona testicular (90 I b) até o receptaculo (a), vendo-se nessa região, onde foi cortado o utero, dois ovos em desenvolvimento. Os cortes seriados mostram-nos porem, que nenhum phenomeno degenerativo, como éra de se esperar pelo estado do ovocyto (a), existia no presente caso.

Como explicar tão curiosa differença entre as zonas testiculares de um animal adulto (existencia da zona de degeneração) e de um animal jovem (ausencia dessa mesma zona)? Repetiremos o que em trabalho (XXI) recentemente publicado escrevemos:

“O exame dos cortes seguintes, do qual o mais instructivo (que, no preparado era o immediato ao figurado em 1) está desenhado em II, responde á nossa interrogação. Vemos ahi os espermatozoides (90 II c) contornarem o ovocyto que fecha a zona testicular e passarem entre os ovocytos para o *receptaculum seminis* (II a). Somos assim levado á conclusão de que taes espermatozoides vão ser encarregados de fecundar os primeiros ovocytos que, embóra nascidos antes delles só amadurecerão quando já existirem espermatozoides. A necessidade de se explicar como se dava a fecundação destes primeiros

ovocytos éra um dos argumentos em favor da idéa de que a elaboração dos espermatozoides devesse preceder a dos ovulos. O nosso achado explica perfeitamente como se pode ter dado tal fecundação.

A opinião segundo a qual os espermatozoides contidos no receptaculo seminal desse *Rhabdias* jovem puderam ter sido elaborados por uma zona testicular formada anteriormente a que estamos estudando não nos parece sustentavel a) por não haver explicação para a existencia da zona de degeneração na zona testicular jovem por nós estudada, b) pelo facto de serem pouco numerosas as zonas testiculares que se formam n'um ovario de *Rhabdias*. E' assim que durante toda a vida do animal em geral só encontramos uma zona testicular por ovario. Tal zona provem de cellulas ovogonicas que em vez de seguirem a evolução ovogenetica transformando-se em ovocytos, evoluem diferentemente dando espermatoctos. Isto se passa em nivel alto do ovario (zona de synnasis) e á proporção que a zona testicular evolue, desce, até que finalmente alcança o receptaculo seminal, onde ficam depositados os espermatozoides. Estes espermatozoides fecundarão os ovocytos que forem successivamente amadurecendo. Como Schleip encontrou em geral uma zona testicular em evolução e espermatozoides (evidentemente formados por uma zona testicular mais antiga) no receptaculo seminal, acreditou que o numero de zonas testiculares deveria ser pelo menos de 2 por ovario. Em animaes muito grandes encontrou uma zona testicular jovem e por isso admittiu que talvez o numero dellas pudesse ser de 3. Nossos achados em *Rhabdias fülleborni* são concordes com os de

Schleip em *Rhabdias bufonis*. Ora será razovel que, n'um animal tão jovem como o que estudamos e onde ha uma zona testicular tão reduzida de tamanho (2 células para toda a largura do testiculo) em relação á mesma zona no adulto, já se tenha anteriormente formado outra zona testicular, quando acabamos de ver que durante toda a vida do adulto, onde são postos ovos em numero enorme (ver fig. 85) uma unica ou no maximo 2 zonas testiculares serão formadas?

Do exposto pensamos poder chegar á seguinte conclusão: A zona testicular jovem por nós encontrada deve ser muito provavelmente a 1.^a zona testicular formada nesse *Rhabdias*. Antes de sua formação o ovario deu nascimento a ovulos cujas fecundações foram asseguradas pelo facto dos primeiros espermatozoides formados depois delles na zona testicular inicial, se terem insinuado entre os ovocytos, situados abaixo e em via de crescimento, e chegados ao *receptaculum seminis*, nelles terem penetrado.

Assim se explica porque motivo falta nesta primeira zona testicular a zona de degeneração. Ao se formar mais tarde uma nova zona testicular, contendo ainda o receptaculo seminal os espermatozoides formados pela primeira zona, permanecem os espermatozoides da 2.^a zona no local de sua formação, descendo ao longo do ovario, simplesmente em consequencia da descida da zona testicular onde se encontram". (pag. 4).

Convem recordar que Schleip já viu em *Rhabdias bufonis* que nas zonas testiculares mais velhas ("Aelteste Hodenzone"), onde só ha espermatozoides, reabsorvida ou desaparecida por outro mecanismo qualquer a zona

de degeneração, podem os espermatozoides insinuar-se entre os ovocytos, a caminho do receptaculo, antecipando assim sua chegada nelle. Facto semelhante foi tambem visto por nós (fig. 91). Todavia aqui, no nosso *Rhabdias* jovem, tal não é o caso, pois as figuras mostram perfeitamente que a zona testicular por nós encontrada possui, não apenas espermatozoides, mas sim toda a linhagem seminal a partir dos espermatoctos. Ha pois alem da ausencia da zona de degeneração na zona testicular que, em um *Rhabdias* adulto a apresentaria nítida, uma insinuação de espermatozoides muito mais precoce do que a que se pode observar nos *Rhabdias* adultos.

Foi só depois de publicada a nota á qual acabamos de nos referir, que pudemos conseguir o extenso trabalho de Sch a a k e , a quem devemos um estudo minucioso das primeirissimas phases da evolução das larvas infestantes do *Rhabdias bufonis* no corpo da rã, o que conseguiu por infestação experimental. As conclusões a que chegou differem d'aquellas a que havíamos sido conduzidos no citado trabalho. Considerando que Sch a a k e fez um trabalho experimental exhaustivo, tendo observado numerosos exemplares, ao passo que só tivemos occasião de estudar uma forma, e esta mesma já relativamente evoluída quando comparada ás formas extremamente jovens estudadas por Sch a a k e , não pretendemos sobrepor nossa hypothese ás observações de Sch a a k e . Todavia o assumpto merece uma consideração especial, pois o nosso achado (inexistencia da zona de degeneração) continúa inexplicado, como inexplicado fica que um animal tão jovem como o que estu-

damos (fig. 84) já esteja, de accordo com a these de Sc ha a ke, formando uma 2.^a zona testicular, quando vimos ser bastante pequeno o numero de zonas testiculares formadas durante toda a sua vida por um *Rhabdias* normal.

Afim de resolver o nosso problema começaremos estudando o que foi dito por alguns autores que estudaram as formas jovens e hermaphroditas de *Rhabdias bufonis*. Podemos deixar de lado Neuh aus que nada disse que nos interesse e Boveri que não tratou das formas jovens. Vejamos o que nos informam Schneider, Nedkoff, Schleip e finalmente Schaake.

Schneider diz textualmente o seguinte: “Infelizmente tambem é mais difficil do que nos hermaphroditas de vida livre, ter a certeza, de que o ovario no estadio mais jovem fornece esperma, porque os órgãos sexuaes de *Ascaris nigrovenosa* não se deixam eventrar facilmente, mas ficam ligados solidamente com a parede do abdomen. Consegui porem encontrar um exemplar que ainda não continha ovos, e sim espermatozoides em estado ainda não desenvolvido, de fórma granulosa e situado na parte superior das tubas” (*).

(*) “Leider ist es auch schwerer als bei den freilebenden Zwitter sich direkt zu überzeugen, dass der Eierstock in einem früheren Stadium den Samen bereitet, da die Geschlechtsorgane der *Ascaris nigrovenosa* sich nicht leicht herausdrücken lassen, sondern fest mit der Leibeswand zusammenhängen. Indess ist es mir doch gelungen ein Exemplar zu finden, welches noch keine Eier enthielt, wohl aber Samen in dem noch unentwickelten Stadium als körnige Kugeln, und zwar am Hinterende der Tuben”. pag. 317.

Parece-nos, se levarmos em conta a precariedade da technica usada por Schneider (trabalho não cytologico), a descripção insufficiente que nos dá e falta de figuras elucidativas, não podermos dar grande valor á sua opinião. Nedkoff admite hypothese semelhante á de Schneider e pensa como elle, que n'um primeiro periodo se formaria um testiculo, mais tarde um ovario. Sem entrar na analyse mais minuciosa desse trabalho, de que se encontrará um estudo critico aprofundado em Schaake, bastará que assignalemos ter Schaake mostrado que Nedkoff não trabalhou com formas jovens e sim com typos adultos que tinham passado por um repouso hybernal. Salientaremos ainda que nem Schneider nem Nedkoff viram o phenomeno capital tão bem analysado por Schleip, da formação alternada varias vezes de ovulos e espermatozoides no ovario de *Rhabias bufonis*.

Passemos então a analysar o trabalho já agora muito bem conduzido de Schleip. Diz elle: “No animal mais jovem que me foi dado ver não encontrei espermatozoides maduros nos receptaculos seminaes e sim uma zona testicular em cada canal germinativo. N'uma dellas existem ovos (na direcção do orificio sexual) que se encontram em nitida degeneração. Na outra ha dois ovos em segmentação, de aspecto normal. Como ha espermatozoides maduros em ambos os testiculos é possivel que alguns delles tenham alcançado os ovos.

E' pena que exactamente este preparado estivesse um pouco alterado. Por este motivo não desejaria dar por estabelecido que, conforme se deprehenderia desta obser-

vação isolada, se formam de facto no canal germinativo, primeiro ovocytos e depois spermatocytos, mesmo porque isto estaria em opposição á opinião de Schneider acima referida. Espero alcançar resultados definitivos quando se consiga obter estados jovens da geração hermaphrodita por infestação experimental das rãs" (*). E Schleip acrescenta: "Os individuos da geração parasita não merecem portanto o nome de hermaphroditas proterandricos, mesmo abstractando do facto de se formarem primeiro ovos, a julgar por uma única observação. Pelo contrario elles são, expressão resumida, "hermaphroditos alternantes" que produzem primeiro espermatozoides, depois ovos, em seguida novamente espermatozoides, e finalmente ainda uma vez ovos. Os ovos formados depois das primeiras cellulas seminaes são fecundados por estas, e quando deste modo os espermatozoides chegam quasi a serem consumidos inteiramente, avança o 2.º contingente de cellulas seminaes entrementes formadas acima e tornam a

(*) "In dem jüngsten mir zu Gesicht gekommenen Tier fand ich keine fertigen Spermien in den beiden Samenbehältern, wohl aber eine Hodentzote in jeder Keimröhre. In der einem liegen unterhalb (gegen die Geschlechtsöffnung hin) Eier, die sich deutlich in Degeneration befinden, in den anderen zwei sich furchende Eier von normalem Aussehen. Da in den beiden Hodenregionen sich schon fertige Spermien befinden, so ist es möglich, dass einige von diesen zu den Eiern gelangten und diese befruchteten. Leider ist gerade dieses Präparat etwas verletzt. So möchte ich es daher noch nicht für festgestellte ansehen, dass, wie aus dieser einan Beobachtung würde, tatsächlich in der Keimröhre zuerst Ovocyten und dann Spermatocyten gebildet werden; es würdedies auch der oben angeführten Beobachtung von Schneider widersprechen. Endgültige Ergebnisse hoffe ich zu erlangen, wenn es gelungen ist, jugendliche Stadien der zwitterigen Generation durch künstliche Infektion der Frösche heranzuziehen". pag. 98.

encher o receptaculo, permittindo assim tambem a fecundação dos ovos situados acima da zona testicular. Não posso dizer com segurança quantas vezes se repete esta formação alternada das duas modalidades de cellulas sexuaes, nem se ha uma 3.^a formação de espermatozoides, o que dependerá da quantidade de ovulos produzidos por um animal” (*). Fizemos essa longa citação para mostrar as duvidas de S c h l e i p sobre o assumpto que estamos estudando: começa descrevendo uma forma jovem por elle achada e onde se teriam formado primeiro ovulos, chegando a dizer: “é possível que alguns delles (espermatozoides) tenha alcançado os ovulos e os fecundado”. E’ exactamente o nosso ponto de vista. Depois parece aceitar o ponto de vista de S c h n e i d e r, declarando que se formam primeiro espermatozoides depois ovulos, depois espermatozoides e “finalmente” ainda uma vez ovulos. E depois de ter assim fixado o numero de vezes em que se dá a formação das cellulas sexuaes, diz que não sabe quantas vezes se dá esta alter-nancia.

(*) “Die Individuen der parasitischen Generation verdienen also den Namen proterandrische Zwitter nicht, auch wenn wir davon absehen, dass nach einer Beobachtung zu schliessen, überhaupt zuerst Eier gebildet werden; sondern sie ist kurz ausgedrückt, “alternierende Zwitter”, welche zuerst Spermien, dann Eier, dann darauf wieder Spermien und schliesslich nochmals Eier erzeugen. Die nach den ersten Samenzellen gebildeten Eier werden von ersteren befruchtet, und wenn allmählich dadurch die Spermien nahezu aufgebraucht sind, ist der unterdessen oben entstandene zweite Satz von Samenzellen nachgerückt und füllt das Receptaculum wieder auf, damit auch die oberhalb der Hodenzone liegenden Eier befruchtet werden können. Wie oft diese abwechselnde Bildung der beiden Geschlechtszellen sich wiederholt, ob sich überhaupt ein drittes Mal Spermien bilden, kann ich nicht sicher sagen. Es wird das von der Menge der Eier abhängen, welche von einem Tier erzeugt werden”. pg. 99.

Analysamos agora o trabalho fundamental de Sch a a k e . Utilizando como já foi dito, as infestações experimentaes, pode acompanhar passo a passo a formação da gonada, a evolução dentro della das cellulas sexuaes primordiaes e dos elementos somaticos gonadiaes, e estudar tambem a formação dos ductos genitaes.

A constatação para nós importante por elle feita, diz respeito ao apparecimento em 1.º lugar, das cellulas sexuaes masculinas. Viu que da zona de synapsis provêm ovocytos jovens que após uma diminuição de tamanho se transformam em espermatocytos. Esses evolvirão até dar espermatozoides. Só depois disso formar-se-ão os primeiros ovocytos crescidos de 1.ª ordem, que serão portanto fecundados pelos espermatozoides formados antes delles. Afóra taes constatações importantissimas, podemos deixar de lado as demais partes do trabalho de Sch a a k e que, segundo elle mesmo informa, não visou fins cytologicos.

Antes de passar á discussão geral do typo de hermafroditismo encontrado nos *Rhabdiasidae*, procuremos explicar o aspecto por nós observado e que segundo as observações de Sch a a k e parece incomprehensivel.

No proprio Sch a a k e encontramos a desejada explicação. Diz elle a proposito da observação de Sch leip acima referida: “O autor (Schleip) julga provavel que no canal germinativo do hermaphrodita jovem, são formados primeiramente ovocytos e mais tarde espermatocytos, porque P o t t s (1910) tambem pode constatar que nos hermaphroditas alternantes de *Rhabditis guerneyi*, algumas vezes são formados primeiramente ovulos e depois espermatozoides. Tam-

bem me foi possível fazer uma vez uma observação semelhante. Creio porem que este phenomeno representa uma anomalia muito rara, pois nos numerosos hermaphroditas por mim examinados, vi sempre em primeiro logar a zona testicular constituída exclusivamente de cellulas germinativas masculinas” (*).

O nosso caso, como o de Schleip, corresponderia pois ao typo menos frequente, que começa sua evolução pela formação de ovocytos e não de espermatocytos, facto da mesma ordem, como já vimos, que o observado por Potts (XXII) em um nematoide de vida livre. Demos pois de barato, que as primeiras cellulas maduras formadas por *Rhabdias*, sejam habitualmente espermatozoides. Será isso razão bastante para o considerarmos como hermaphrodita proterandrico? E’ o que desejamos agora discutir.

Começaremos por assignalar que não nos parece perfeitamente claro o conceito habitual de hermaphroditismo proterandrico e proterogynico, sendo frequentes os autores que se utilizam dessas expressões sem as definir.

(*) “Der Autor hält es daher für wahrscheinlich, dass in dem Keimrohr des jungen Zwitteres zunächst Ovocyten und erst später Spermatoocyten gebildet werden, zumal auch Potts (1910) nachweisen konnte, dass bei dem alternierenden Hermaphroditen *Rhabdias gurneyi* zuweilen zuerst Eier und erst nachträglich Spermien erzeugt werden. Auch ich habe einmal eine ähnliche Beobachtung gemacht. Dennoch glaube ich, dass es sich bei dieser Erscheinung um eine ziemlich seltene Anormalität handelt. Denn bei den zahlreichen von mir untersuchten jungen Zwitter wurde zuerst immer eine Hodenzone angelegt, die ausschliesslich aus männlichen Keimzellen bestand”. pg. 638.

No “Zoologisches Wörterbuch” de Ziegler e Breslau (XXIII) encontra-se como característico do hermaphroditismo proterandrico o facto de amadurecerem primeiramente os productos masculinos (*). Já para outros autores o hermaphrodita proterandrico é aquelle onde começa por ser encontrado o sexo masculino (o que está de accordo com a ethymologia). E’ assim que no livro de R. Goldschmidt “The mechanism and physiology of sex determination” (XXIV) lemos: *Estas formas (gasteropodos) começam sem excepção a apresentar a condição denominada hermaphroditismo proterandrico. Cada indivíduo é primeiramente um macho tanto funcionalmente quanto estruturalmente; a seguir os organs masculinos soffrem um reirogressão enquanto os orgãos femininos se desenvolvem de sorte a ser attingida uma especie de condição hermaphrodita*”. (**).

Pensamos ser mais claro considerar com Goldschmidt o hermaphroditismo proterandrico como um estado onde o ser começa por possuir os attributos do sexo masculino (testiculo, ou pelo menos espermatogonias na gonada, soma masculino, etc.) e não o ser que primeiramente “amadurece” productos masculinos. Da mesma maneira será um hermaphrodita preterogynico aquelle que começou por possuir ovario (ou ovogonias na gonada) e soma

(*) Proterandrie nennt man in der Zoologie die Erscheinung, dass bei vielen hermaphroditischen Tieren wie Würmern, Lungenschnecken (Pulmonaten) usw, die männlichen Geschlechtsprodukte früher als die weiblichen reif werden”. pg. 580.

(**) “These forms appear without exception to present condition termed protandric hermaphroditism. Every individual is first a male both functionally and structurally, then the male organs suffer a retrogression whilst the female organs develop so that a kind of hermaphrodite condition arises”. pg. 184.

feminino. Vejamos então, á luz desta concepção o que devemos pensar dos *Rhabdias*, bem como dos tantos outros nematoides que tem sido descriptos como hermaphroditas proterogynicos.

Uma primeira duvida deve ter ocorrido ao espirito daquelles que se dedicaram ao estudo desse assumpto. Como é sabido, o aspecto da forma parasita de *Rhabdias* é de uma femea absolutamente *typica* e como tal foi descripta por todos os autores que a estudaram. Tendo os nematoides deste grupo um dimorphismo sexual muito nitido, a distincção entre os dois sexos (machos: espiculos, cloaca, uma unica gonada, extremidade do corpo, nas preparações fixadas, recurvada; femea: ausencia de espiculos, orificios genitales e digestivos independentes, 2 gonadas, corpo rectilineo mesmo nas preparações fixadas) é das mais faceis. Ora, não pode deixar de causar extranheza que um animal que foi levado tanto pela sua formula chromosomica, como por suas secreções internas ou outros factores determinantes do sexo, a adquirir um phenotypo perfeitamente feminino, fosse um hermaphrodita proterandrico.

Por outras palavras, é incomprehensivel que um ser que foi conduzido por todos os factores determinantes do sexo para o sexo feminino, tivesse sido levado por *esses mesmos factores* a adquirir um testiculo e não um ovario. Pois bem, se *Rhabdias* é inicialmente provido de um ovario, no qual só mais tarde se differencia uma zona testicular, tudo se esclarece. Quando, factores que ainda não puderam ser determinados, conduzirem uma certa parte da gonada feminina para a evolução testicular, não só essas causas mas ainda a secreção interna desse testiculo, não poderão mais realizar alterações phenotypicas do soma no sentido masculino, pela simples razão que o soma já está differenciado,

com seus órgãos perfeitamente constituídos, não sendo mais possível uma transformação delles no sentido masculino. E' bem sabido por observações e experiencias em varios animaes, que uma inversão sexual da gonada só produz alterações n'aquelles caracteres sexuaes secundarios que ainda são sufficientemente plasticos (órgãos em crescimento, órgãos periodicamente substituidos, etc.) para poderem soffrer uma influencia modelante evidenciavel ao observador. Não sendo este o caso no que se refere aos caracteres sexuaes que nos nematoides separam o macho da femea, não admira pois que o phenotypo do hermaphrodita conserve o aspecto feminino.

Difficuldades semelhantes existem em certos nematoides de vida livre, que apresentam hermaphroditismo e onde ha uma unica producção de espermatozoides, seguida de uma unica producção de ovulos. Nelles não ha hermaphroditismo alternante, como em *Rhabdias*, e sim producção primeiramente de espermatozoides e depois de ovulos. Ora, havendo primeiramente producção de espermatozoides, a gonada seria masculina e o soma feminino. Resolvemos então verificar quaes teriam sido as observações que conduziram os antigos autores a considerar o hermaphroditismo de taes seres como proterandrico. Acreditamos que o melhor processo para esclarecer convenientemente o assumpto consiste em transcrever a opinião de alguns autores que se occuparam do problema.

Já S c h n e i d e r escreve a proposito da forma parasita hermaphrodita de *Rhabdias bufonis* (= *Ascaris nigrovenosa*): “Encontram-se sómente femeas (*)” “Os pulmões de batrachios examinados cuidadosamente muitas vezes por

(*) “Man findet nur ♀”. pg. 317.

muitos observadores e também por mim, nunca continham um macho, que por isso é uma suposição razoável dizer-se que *Ascaris nigrovenosa* é um hermaphrodita” (*). E’ classico o trabalho de M a u p a s sobre modos e formas de reprodução dos nematoides. Nelle encontramos as seguintes afirmações:

a) Falando de nematoides bi-sexuados, hermaphroditas e parthenogeneticos: “Todos se apresentam com o aspecto geral e conformação ordinaria das femeas.

Só os distinguimos das especies vizinhas pelas tonalidades especificas ordinarias e é só pelo estudo minucioso do seu aparelho genital e sobretudo de seu funcionamento que chegamos a reconhecer seu regimen ovogenetico particular. O hermaphroditismo e a parthenogenese não affectam de nenhum modo particular os caracteres geraes e especificos desses seres. Só o aparelho genital foi modificado e essas modificações dizem antes respeito ao seu funcionamento que á disposição e estructura do proprio aparelho”. (**).

(*) “Da die Lungen der Batrachier von so vielen Beobachtern, auch von mir selbst, unzählige Male auf das Sorgfältigste untersucht worden sind, ohne ein ♂ zu finden, so ist die Vermutung wohl gerechtfertigt, dass *Ascaris nigrovenosa* ein Zwitter ist”. pg. 317.

(**) “Tous se présentent avec l’aspect général et la conformation ordinaire des femelles. On ne les distingue des espèces voisines que par les nuances spécifiques ordinaires, et c’est seulement par l’étude minutieuse de leur appareil génital et surtout de son fonctionnement qu’on arrive à reconnaître leur régime ovogénétique particulier. L’hermaphroditisme et la parthenogénèse n’ont donc affecté d’aucune façon particulière les caractères généraux et spécifiques de ces êtres. Seul l’appareil génital a été modifié; encore ces modifications portent-elles bien plus sur le fonctionnement que sur la disposition et la structure de l’appareil lui-même. pg. 583.

b) “temos o direito de affirmar que o parthenogene- se e o hermaphroditismo, ao se desenvolverem nestes nema- toides, só exerceram influencia modificadora nos productos do aparelho genital. Todo o resto do organismo fica abso- lutamente invariavel.” (*).

c) “Nas femeas hermaphroditas, como o constatamos para cada uma das especies descriptas, o orgão genital, che- gando á maturidade começa a funcionar como testiculo e produz uma certa quantidade de esperma. Neste momento pode-se ver (pl. XXI pg. 7-a) as jovens cellulas germina- tivas da região do ovario (**) que tinham começado a cres- cer. Mais tarde, com o desenvolvimento mais completo do animal e a maturidade mais avançada do organ genital (pl. XXI fig. 7-a), as cellulas germinativas da região ante- rior do ovario continuam a crescer, accumulam uma forte provisão de vitello nutritivo em seu cytoplasma e se trans- formam em grandes ovulos promptos para a fecundação” (*) (pgs. 584-585).

d) “Uma cousa é perfeitamente evidente nos nossos nematoides, é que o hermaphroditismo se desenvolveu exclu- sivamente sobre a forma feminina das especies” (*) (pg. 598).

e) Finalmente citaremos o achado de M a u p a s em *Rhabditis marionis* que nos vae mostrar femeas ainda in- completamente transformadas em hermaphroditas (herma- phroditismo parcial). “Não havia pois a menor duvida:

(*) “On est donc en droit d'affirmer que la parthenogénèse et l'hermaphroditisme, en se développant chez ces Nématodes, n'ont exercé d'influence modificatrice que sur les produits de l'appareil génital. Tout le reste de l'organisme est resté absolument invariable. pg. 584.

(**) O grypho é nosso.

tratava-se de uma fêmea da qual um dos ovários tinha funcionado segundo o modo hermaphrodita, produzindo primeiramente espermatozoides, e depois ovulos, enquanto que seu outro ovário tinha funcionado segundo o modo monoico, produzindo apenas ovulos”. (pg. 510). Foi assim que M a u p a s explicou porque nesta espécie havia cerca de metade dos ovulos que degeneravam depois de saídos do corpo do animal. Eram os ovulos postos pelo ovário no qual não se havia formado a zona testicular .

B o v e r i sobre o *Rhabdias bufonis* (= *Angiostomum nigrovenosum*) diz apenas o seguinte: “Como é sabido existem no pulmão da rã apenas indivíduos com estrutura feminina” (*).

S c h l e i p além do que já transcrevemos atrás, ainda a propósito de *Rhabdias bufonis* nos informa que: “Destes dois trabalhos (M a u p a s e S c h n e i d e r) naturalmente não feitos com um ponto de vista cytológico, já resulta com certeza, que nos hermaphroditas de nematoides da mesma maneira do que nos pulmonados se originam ovos e espermatozoides na mesma glandula geminativa, e que provavelmente aqui *cellulas primitivamente* ovulares se transformam em *cellulas seminaes*.” (**).

(*) Benkanntlich werden in der Froschlunge nur Individuen von weiblichem Bau gefunden”. pg. 84.

(**) “Aus diesen beiden Untersuchungen, welche natürlich nicht von cytologischen Gesichtspunkten aus angestellt wurden, geht schon mit Sicherheit hervor, dass bei den Nematodenzwittern ebenso wie bei den zwittrigen Pulmonaten Eier und Samenzellen in der gleichen Keindrüse entstehen, und dass hier wahrscheinlich ursprüngliche Eizellen zu Samenzellen werden. pg. 97.

“Os individuos da geração hermaphrodita de *Angiostomum* têm em tudo uma estrutura igual a das femeas dos nematoides bisexuados, deixando de lado o conteúdo dos canaes germinativos. (*).

Na “Keimzone” descreve: “A região germinativa contem cellulas em divisão intensa que devem ser chamadas ovogonias se bem que tambem dellas se possam originar cellulas seminaes”. (**)

“Por isso podem-se considerar as cellulas das zonas germinativa e de synapsis como cellulas indiferentes, que se differenciam sómente depois da synapsis em cellulas masculinas e femininas. Podem-se tambem considerar as cellulas da região germinativa como ovogonias e as da região de synapsis e da immediatamente seguinte como ovocytos jovens da 1.^a ordem, suppondo que as cellulas germinativas num estadio precoce são capazes de se transformar em cellulas masculinas. Bem que não queira negar razão a essa primeira opinião, todavia defendendo a segunda a respeito do nome a ser dado, e isso pelas causas seguintes: Os individuos hermaphroditos de *Angiostomum* são typicamente femeas segundo a estrutura do soma; o *facto de se formarem tambem espermato-*

(*) “Die Individuen der zwittrigen Generation von *Angiostomum* sind, wenn man von dem Inhalt in den Keimröhren absieht, im wesentlichen gerade gebaut, wie die Weibchen getrenntgeschlechtlicher Nematoden.” pg. 91.

(**) “Die Keimregion enthält in lebhafter Vermehrung begriffene Zellen welche mit dem Namen Ovogonien bezeichnet werden sollen, obwohl aus ihnen auch die Samenzellen hervorgehen”. pg. 91.

zoides além de ovos nos seus canaes germinativos, é secundario. (O grypho é nosso) (*).

“Finalmente, creio que a origem de todas as cellulas é feminina, porque todas as ovogonias possuem um numero de chromosomas, que pode ser considerado como typico para o sexo feminino” (O grypho é nosso) (**). Tratando por fim da comparação entre hermaphroditismo de *Rhabdias* e dos molluscos escreve: “*Hélix* é um verdadeiro hermaphrodita que não sómente desenvolve as duas especies de cellulas sexuaes, mas possui tambem ductos genitae, tanto masculinos quanto femininos. M a u p a s tem pois razão em considerar os hermaphroditas de nematoides como originados por individuos femininos puros. Como M a u p a s mostrou, os machos desapareceram nestas especies, ou só ha em

(*) Daher kann man die Zellen der Keim- und der Synapsiszone als indifferente Keimzellen ansehen, welche sich erst nach der Synapsis in männliche oder in weibliche differenzieren. Man kann aber auch die Zellen der Keimregion und die der Synapsisregion, sowie die unmittelbar darauffolgenden als junge Ovocyten erster Ordnung auffassen, indem man annimmt, dass die weiblichen Keimzellen aus einem frühen Stadium sich in männliche umdifferenzieren können. Obwohl ich die Berechtigung der ersten Auffassung nicht bestreiten will habe ich doch bei der Namengebung die 2. vertreten und zwar aus folgenden Gründen: Die hermaphroditischen Individuen von *Angiostomum* sind nach dem Bau ihres Somas durchaus Weibchen; dass sie in ihren Keimröhren neben Eiern auch Spermien bilden, erscheint als etwas ganz Sekundäres”. pg. 107/8.

(**) Schliesslich glaube ich deshalb den Ursprung aller Keimzellen der zwitterigen Generation von weiblichen Zellen annehmen zu wollen, weil alle Ovogonien eine Chromosomenzahl besitzen, welche für das weibliche Geschlecht als typisch angesehen werden muss”. pg. 108.

numero muito pequeno nas diferentes especies (machos complementares. (*).

Eva Krüger, estudando *Rhabditis aberrans*, onde ha formação uma só vez de espermatozoides e depois de ovulos, informa que, depois que a larva viveu 10 a 12 dias, começa a espermatogenese e então se encontra na parte dorsal de cada canal germinativo “uma zona de cellulas pequenas muito proximas uma das outras e que se assemelham completamente a ovogonias” (**), e accrescenta: “Só no periodo de crescimento é possível ver-se uma differença entre espermatose e a ovogenese, pois o crescimento é menor quando se trata da espermatogenese”. Diz ainda: “Se eu chamo as cellulas da zona germinativa e da zona de synapsis, bem como do inicio do crescimento de ovogonias e ovocytos e não espermatogonias e espermatocytos, é porque o animal que produz estas cellulas germinativas é, segundo a sua estructura exterior uma *femea* (gripho nosso), e essas

(*) “Hélix p. ist sozusagen ein vollkommener Hermaphrodit, welcher nicht nur beide Geschlechtszellenarten in seiner Keimdrüse hervorbringt, sondern auch sowohl männliche wie weibliche Ausführwege der Genitalorgane besitzt. Ich möchte mich der Anschauung Maupas anschliessen, nach welcher die hermaphroditischen Nematoden aus rein weiblichen Individuen entstanden sind. Wie Maupas gezeigt hat, sind bei diesen Arten die Männchen offenbar verschwunden, oder kommen vielmehr bei den verschiedenen Arten in verschiedener aber stets sehr geringer Anzahl als sogenannte Komplementärmännchen vor. pg. 112.

(**) “. . . eine Zone kleiner, dichtgedrängter Zellen, die den Ovogonien vollkommen gleichen”. loc. cit. pg. 106.

cellulas não differem das correspondentes nos individuos mais velhos (*).

R a u t h e r que escreveu o capitulo Nematoides no Handbuch der Zoologie de Kükenthal (XXVII) diz: “Os possuidores dessa capacidade de procreação (nematoides autogamicos) são normalmente, segundo indicações certas, sempre *animaes de organização somatica feminina bem definida* (grypho nosso). Trata-se de hermafroditismo physiologico, de sorte que a gonada feminina produz alem de ovulos, esperatozoides que os fecundam. Estes espermatozoides se originam sempre da mesma zona germinativa, quer antes dos ovos, (Proterandia) ou mais raramente alternativamente com os ovos (*Rhabdias bufonis*) quer permanentemente, (*Rhabditis guerneyi*, Potts), ou ainda o canal genital anterior produz os ovulos, e o posterior produz espermatozoides: *Rhabditis duthiersi*, M a u p a s (**) e falando de *Rhabdias bufonis* diz: “Herma-

(*) “Erst während der Wachstumsperiode macht sich ein Unterschied zwischen Spermato- und Ovogenese geltend, denn das Wachstum der Ovocyten geht jetzt fange nicht so weit als bei der Eintwicklung.” — “Wenn ich die Zellen der Keim- und der Synapsiszone und der jüngsten Wachstumsperiode als Ovogonien und Ovocyten, nicht aber als Spermogonien und Spermocyten bezeichne, so geschieht das, weil das Tier, das diese Keimzellen produziert, seinem äusseren Bau nach ein Weibchen ist, und weil die Zellen selbst in nichts von den entsprechenden Stadien älterer Individuen abweichen.” pg. 107.

(**) “Träger dieses Zeugungsvermögens sind normalerweise soweit zuverlässige Angaben vorliegen stets Tiere von entschieden weiblicher somatischer Organisation. Es bekundet sich meitis als ein physiologischer Hermaphroditismus, in dem die weibliche Gonade ausser den Eiern Spermien erzeugt, die dann jene befruchten. Und zwar entstehen die Spermien von der gleichen Keimzone aus entweder zeitlich vor den Eiern (Proterandrie), seltener mehrmals abwech-

phrodita proterandrico de organização feminina” (grypho nosso).

V a n d e l (XXVIII) num livro recente e bem documentado, tratando da parthenogenese nos nematoides escreve: “Varias especies de *Rhabditis* e generos vizinhos, offerecem condições sexuaes muito interessantes. Varias dellas são representadas quasi exclusivamente por individuos hermaproditas, que são *femeas modificadas* (grypho nosso) (*).

Vejamos finalmente o que diz S c h a k e : “Em contraste á exposição de N e d k o f f sobre as ultimas phases do desenvolvimento das gonadas quero pôr o accento no facto que o aparelho genital já *possue um asprcto especifico feminino num tempo em que se acham ainda só poucas cellulas indifferentes nas duas extremidades dos dois canaes germinativos. . . e antes que os esperatozoides tenham attingido o receptaculum seminis o aparelho genital se apresenta como orgão sexual feminino* (grypho nosso) completamente desenvolvido (**). Diz ainda: “Isto tambem é valido para

selnd mit den Eiern wie bei *Rhabdias bufonis*, oder dauernd (*Rhabdias Guerneyi* Potts); oder endlich es bringt der vordere Genitalschlauch Eier, der hintere Samen hervor (*Rhabditis Duthiersi* Maupas) pg. 322 (4).

(*) “Plusieurs espèces de *Rhabditis* et genres voisins offrent des conditions sexuelles fort intéressantes. Plusieurs d’entre elles sont représentées, à peu près exclusivement par des individus hermaphrodites qui sont des femelles modifiées. pg. 164.

(**) “Im Gegensatz zu der Nedkoffschen Darstellung der letzten Entwicklungsphasen der Gonade sei nocheinmal betont, dass der Geschlechtsapparat schon zu einer Zeit, in der sich in den oberen Enden der beiden Keimröhren erst wenige indifferente Keimzellen befinden, ein durchaus weibliches Gepräge besitzt, indem bereits sämtliche Abschnitte, die ausgebildeten Organe auszeichnen, angelegt und zum Teil schon in einem weitgehenden Masse entwickelt sind.” pg. 630.

as cellulas que estão situadas acima da gonada testicular jovem. Trata-se provavelmente de elementos ainda indifferentes, dos quaes se differenciarão mais tarde cellulas masculinas e femininas. Respeitando o caracter especifico feminino do soma de nossos vermes, pode-se tambem considerar as cellulas da região germinativa como ovogonias e as da zona de synapsis e da zona seguinte, como ovocytos de 1.^a ordem que entram geralmente n'um periodo muito extenso de crescimento" (*).

Afóra a denominação impropria, "cellulas indifferentes", pois são elementos com o numero feminino de chromosomas e logo adiante chamados pelo mesmo Sch a a k e ovogonias, vemos que tambem para este autor se trata em *Rhabdias* de uma gonada que é no seu primeiro aspecto um ovario.

A leitura das opiniões precedentes, permittiu que ficasse perfeitamente claro em nosso espirito o problema do hermaphroditismo de *Rhabdias* e outros nematoides. Trata-se de um typo todo especial, no qual o hermaphroditismo se reduz sempre ao facto de só uma certa parte da gonada funcionar, uma ou mais vezes, um tempo mais ou menos longo como fonte de espermatozoides.

(*) "Dasselbe trifft auch für die am weitesten nach oben gelegenen Zellen der jungen Hodenzone zu. Es handelt sich daher wahrscheinlich bei diesen Zellen noch um indifferente Elemente, aus denen sich später männliche und weibliche Keimzellen differenzieren. Man kann aber auch mit Rücksicht auf den durchaus weiblichen Charakter des Somas unseres Wurmes die Zellen der Keimregion als Ovogonien und die der Synapsiszone, sowie die unmittelbar darauf folgenden als junge Ovocyten erster Ordnung betrachten, die normalerweise in eine langandauernde Wachstumsperiode eintreten." pg. 637/638.

Não são hermaphroditas verdadeiros ou totaes, se assim me posso exprimir, comparados a tantos exemplos onde o hermaphroditismo affecta não apenas a gonada, mas os ductos sexuaes e o resto do organismo. Eis porque são taes nematoides chamados: femeas hermaphroditas (Maupas), femeas transformadas em hermaphroditas (Schleip), hermaphroditas physiologicos (Rauther) etc. E' tambem o pensameno de Schleip quando comparando *Rhabdias* aos outros hermaphroditas, escreve: como já vimos *Helix* é um verdadeiro hermaphrodito que não sómente desenvolve as duas especies de cellulas sexuaes, mas possui tambem quer ductos sexuaes masculinos, quer femininos dos organs sexuaes". Vemos assim que todos esses nematoides são, como *Rhabdias*, phenotypicamente femeas, (*) e o nome

(*) Devemos fazer aqui a seguinte ressalva: *Maupas* encontrou em *Rhabditis elegans*, além de femeas transformadas em hermaphroditas, machos que elaboravam ovulos. Diz elle: "Não é que o hermaphroditismo do typo masculino seja impossivel em si mesmo. Observamos, com effeito, e descrevemos (pg. 491) casos muito curiosos em nosso *Rhabditis elegans*. Varios machos desta especie... perfeitamente constituídos e organizados como machos mostram-nos testiculos com hermaphroditismo nitidamente proterandrico como o órgão genital de suas irmãs. Os ovulos produzidos por estes testiculos tinham em todos os detalhes de sua estructura e de sua organização um aspecto perfeitamente normal, identico ao dos ovulos formados pelas femeas" (pg. 600) e ainda "O testiculo nada apresentou de particular em sua composição geral e o reservatorio sem: nial continha numerosos espermatozoides, empilhados uns sobre os outros como em todos os outros machos observados até aqui. Nenhuma duvida éra possivel, eu tinha debaixo dos olhos um testiculo hermaphrodita proterandrico, como os ovarios das irmãs deste macho" (pg. 491). Notemos que esse interessante achado de *Maupas* não foi confirmado numa segunda serie de culturas por elle feitas, nem confirmado, até onde pudemos verificar a bibliographia

de hermaphroditas proterandricos parece ter-lhes-sido dado pela razão de serem espermatozoides, os primeiros productos sexuaes maduros que se formam em suas gonadas. Todavia se procuramos analysar o que pensam dessa gonada os diversos autores que a estuda-

por outros autores. Fôsse elle acceito, em nada invalidaria o nosso ponto de vista sobre o hermaphroditismo dos nematoides. E' sempre um hermaphroditismo incompleto, dizendo respeito apenas a uma certa parte da gonada, sem affectar os ductos genitales ou o resto do soma.

Notemos ainda que *Maupas* não viu no futuro macho hermaphrodita os ovulos serem fecundados ou se desenvolverem. São suas as seguintes palavras: Seriam estes ovulos de origem masculina, aptos para a fecundação e capazes de desenvolvimento? E' o de que infelizmente não me pude assegurar. Todavia, estou muito disposto a acceitar tal possibilidade. Pareciam tão bem constituídos quanto os ovulos de origem feminina. Não se vê pois, porque motivo não teriam gozado das mesmas propriedades evolutivas que estes ultimos, nascidos como elles de uma glandula genital, funcionando inicialmente como testiculo. A identidade morphologica e a identidade de origem, parece-me dever conduzir a uma identidade de facultade" (*). Queremos chamar a attenção aqui para o facto de não ser rara a occurencia accidental de ovulos no interior de testiculos, sem que isso conduza a um hermaphroditismo funcional, isto é os ovocytos encontrados no testiculo degeneram, e desaparecem sem deixar signal na gonada, o animal jamais funcionando como femea. Nós mesmos (XXXVI) encontramos por duas vezes em testiculos do sapo *Bufo marinus* ovocytos na massa testicular, e em um dos casos (XXXVII) verificamos a destruição desses ovocytos se dando ou pela penetração de espermatozoides e outras cellulas de linhagem seminal que invadem o ovocyto, ou então por uma fragmentação do

(*) «Ces ovules d'origine masculine auraient-ils été aptes à la fécondation et capables de développement? C'est donc je n'ai malheureusement pas pu m'assurer. Mais je suis très disposé à en admettre la possibilité. Ils paraissent tout aussi bien constitués que les ovules d'origine féminine. On ne voit pas dès lors pourquoi ils n'auraient pas joui des mêmes propriétés évolutives que ces derniers, nés comme testicule. L'identité morphologique et l'identité d'origine me semblent devoir en traîner l'identité de faculté». Loc. cit., pg. 600.

ram, vamos ver que mesmo os que não fizeram estudos cytologicos, a consideram como um ovario. E' assim que *Maupas* a chama expressamente. *Schleip* considera, como vimos, as cellulas iniciaes como ovogonias, com o numero de chromosomas que caracteriza o sexo feminino, e admite que estas cellulas até o fim do periodo de synapis continuam a ser ovogonias, que depois mudam de sexo. O mesmo em relação a *Eva Krüger* bem como *Schake*. Vemos portanto, que se procurarmos determinar qual o typo de hermaphroditismo dos nematoides, caracterizal-os pela construcção de uma gonada inicialmente feminina, na qual mais tarde se diferenciaraõ cellulas masculinas phenomeno que se poderá repetir uma ou mais vezes. Se se tratasse de um verdadeiro hermaphrodita proterandrico, deveria começar por formar espermatogonias e não ovogonias.

Parece-nos portanto, que *Rhabdias* é como os outros nematoides a que fizemos allusão, salvo o caso excepcional e não confirmado de alguns exemplares de *Rhabditis elegans*) um *hermaphrodita proterogynico*, por possuir um soma fe-

cytoplasma do ovocyto, hernia do nucleo, ruptura da membrana nuclear, etc. Seria facil citar nos batracios, quer em simples observações: *Spengel* (XIX) *Hofmann* (XXX), *Friedmann* (XXXI), *Cerutti* (XXXII), *Miss King* (XXXIII), quer em consequencia de experiencias varias, feitas por *Champy* (XXXIV), *Guyénot e Mlle. Ponse* (XXXV), etc., etc.; bem como em muitos outros animaes, exemplos do mesmo genero. A simples presença de ovocytos no testiculo não permite, pensamos, as conclusões de *Maupas*, de que taes ovocytos possam funcionar normalmente. Enquanto não se tiver dado a prova portanto, de que os ovocytos achados numa só cultura por *Maupas* no testiculo de *Rhabditis elegans* podem ser fecundados e se desenvolver pedimos licença para suspender nosso juizo.

minino e um ovario, no qual as primeiras células que se diferenciam são ovogonias, e além disso um *hermaphrodita alternante* por formar diversas vezes sucessivamente ovulos e espermatozoides. Em conclusão, um *hermaphrodita proterogynico alternante*.

II

Inexistencia de machos na geração parasita

Notavel é o facto, confirmado por quantos trabalharam em *Rhabdias*, da não existencia de machos na geração parasita. Nossas verificações em *Rhabdias fullerboni* con-

Transcrevemos aqui as citações tiradas de M a u p a s e referidas na pag. 91:

a — “Ce n'est pas que l'hermaphrodisme du type mâle soit impossible en lui-même. Nous en avons, en effet, observé et décrit (pg. 491) des cas fort curieux chez notre *Rhabditis elegans*. Plusieurs mâles de cette espèce, parfaitement constitués et organisés en tant que mâles, nous ont montré des testicules à hermaphrodisme nettement protérandrique, comme l'organe génital de leurs soeurs. Les ovules produits par ces testicules avaient dans tout les détails de leur structure et de leur organisation un aspect parfaitement normal, identique à celui des ovules formés par les femelles.” loc. cit. pg. 600.

b — Le testicule ne présentait rien de particulier dans sa conformation générale et le réservoir séminal contenait de nombreux spermatozoides, entassés les uns sur les autres, comme chez tous les mâles observés jusqu'ici. Aucun doute n'était possible, j'avais sous les yeux un testicule hermaphrodite protérandrique, comme l'ovaire des soeurs de ce mâle”. loc. cit. pg. 492.

firmam as observações dos autores que nos precederam. Apesar de termos examinado os pulmões de mais de 200 animais (sapos e rãs) nos quaes sempre encontramos parasitas e muitas vezes um numero muito grande delles (mais de 100) nunca deparamos com outra forma que não fosse a fema phenotypica, com hermaphroditismo gonadial.

Cabe lembrar a proposito desse assumpto, as observações feitas no genero *Stroglyoides*. Durante muito tempo foi a forma parasita destes nematoides considerada como parthenogenetica. Só se conheciam nessa geração parasita femeas, cujos ovos se desenvolveriam sem fecundação. Ora Cobb (XXXVIII) em *Plectus cirratus*, onde Maupas, em seu classico trabalho não havia encontrado espermatozoides, considerando por isto esta especie como parthenogenetica, verificou a existencia delles extremamente pequenos e sómente visiveis quando o exame é feito em condições favoraveis. Sandground (XXIX) retomou, inspirado em taes factos o estudo de *Strongyloides* e concluiu, baseado no exame cytologico da gonada, pela presença de espermatozoides e portanto não se trataria de parthenogenese. O *Strongyloides* seria assim um hermaphrodita com cyclo semelhante ao do *Rhabdias*. As figuras de Sandground todavia, não nos parecem mostrar isso com clareza, pois ainda quando accettassemos como espermatozoides as cellulas do ovario que lhe pareceram taes, restaria a pergunta: Como são formados esses espermatozoides, já que nenhuma imagem de espermatogenese foi encontrada? Poderia muito bem ter succedido que machos precoces houvessem fecundado as femeas, explicando-se assim a presença em seu corpo das cellulas sexuaes masculinas.

E' agora o momento de referirmos o que foi visto por K r e i s (XXXX) e particularmente por F a u s t (XLI). K r e i s, estudando uma raça de Nova Orleans de *Strongyloides stercoralis* (parasita do cão e do homem), verificou apenas desenvolvimento directo, isto é, sem machos nem femeas de vida livre. Diz elle: "*Em nenhum caso poudeser encontrada uma geração sexuada rhabditiforme. E' significativo todavia, que o macho parasita foi encontrado no decurso do desenvolvimento* (isto é nas culturas que fazia partindo das fezes). *Como femeas rhabditiformes não foram vistas no material* (culturas) *parece razoavel supôr que o macho descoberto no material do homem e cão pertence á phase parasita* (que teria sido eliminado nas fézes). *Por esta razão a femea parasita é considerada como monogenetica. Aparece em numero enorme* (no intestino), *emquanto o macho é muito raro*" (*). Em resumo, o ovo daria larvas rhabditoides que se transformariam em larvas infestantes, as quaes dariam machos e femeas parasitas. E' digno de nota que, segundo K r e i s, o macho parasita tem a mesma estructura que os machos de *Strongyloides* com geração sexuada de vida livre (**). O Dr. C l e m e n t e P e r e i r a em 1930 encontrou (communicação verbal ainda

(*) In no case could a rhabditiform sex generation be found. It was significant, however, that the parasitic male was found in the course of developpment. As rhabditiform females were not seen in the material, it seems reasonable to suppose that the male, discovered in the material of man and dog, belongs to the parasitic phase. Hence the parasitic female is believed to be monogenetic. It appears in enormous numbers, while the male is very rare". pg. 475.

(**) "The parasitic male does not show many conspicuous differences from the rhabditiforme free-living". pg. 470.

não publicada) no intestino do porco, um unico macho semelhante ao de vida livre e ficou em duvida sobre sua exacta interpretação. Achado semelhante foi feita pelo Prof. Z e f e r i n o V a z tambem communição verbal).

F a u s t a quem se deve um trabalho muito cuidadoso sobre o assumpto chegou ás seguintes conclusões: Infestou 40 cães com material de origem diversa (*Strongyloides stercoralis*) primatas, cão, homem, material que se comportou de modo tão homogeneo que se pode admittir que a especie seja uma unica. Analysou os estadios successivos de desenvolvimento de phase parasita: larvas filariformes, post-filariformes, macho e femeas preadolescentes, machos e femeas adultos, ovos, larvas rhabditiformes e filariformes. Acompanhou sua migração da pelle ao pulmão e dahi ao estomago e niveis mais baixos do tracto digestivo. Notou que a migração do pulmão para o tubo digestivo ocorre primariamente durante o estadio adolescente; todavia numa consideravel proporção de casos, machos e femeas adultos ficam no pulmão onde dão descendentes. E' assim que poude na maioria dos animaes experimentados encontrar machos parasitas. A presença dos machos no pulmão intestino e canal cystico (livres) suggere que funcionam fecundando femeas adolescentes, antes que se tenham entrado na mucosa intestinal, ou mesmo antes que tenham migrado dos pulmões. Admitte que os ovos fecundados dão desenvolvimento indirecto, mas quando a reserva de espermatozoides se exgotta, os ovos se desenvolvem parthenogeneticamente, dando então desenvolvimento directo. Dahi a tendencia das amostras que permaneceram muito tempo no hospedador, de passar de typo indirecto ao directo. Desses estudos se explicaria a contradicção entre o achado

de K r e i s na raça de Nova Orleans (só desenvolvimento directo) e tantas outras observações anteriores (desenvolvimento indirecto). Vemos assim desabarem as theorias que admittiam que o desenvolvimento indirecto se dava nos tropicos e o desenvolvimento directo nas zonas temperadas (L e i c h t e n s t e r n (XLII). Explicar-se-iam tambem os machos raramente observados por K r e i s nas culturas: seriam realmente machos da geração parasita que perduraram e foram eliminados. E' ainda perfeitamente comprehensivel o achado de S a n d g r o u n d (espermatozoides no corpo de femeas parasitas). Em trabalho em collaboração com K a g y (XLIII), publicando no mesmo anno, nada se encontra que interesse, ao nosso estudo. Em trabalho recente M o r g a n (XLIV) diz ter encontrado um nematoide deste typo parasita do intestino de toupeira (*Talpa*) e de musaranho (*Sorex*), onde eram facilmente encontrados machos e femeas, pelo que propôs para tal nematoide um novo genero: *Parastrongyloides*. Não fez estudos cytologicos, nem culturas. As longas referencias que fizemos ao cyclo de *Strongyloides*, genero proximo do que estudamos, levamos á conclusão de que o processo de reproducção é radicalmente diverso nos 2 generos. Tal conclusão não nos deve causar surpresa pois é sabido desde muito tempo e particularmente a partir do trabalho notavel de M a u p a s que os mais diversos modos de reproducção podem ser observados em nematoides proximos uns dos outros. Numerosas especies são dioicas (*Ascaris lumbricoides* etc. etc.). Outros mostram hermaphroditismo incompleto: assim em *Rhabditis dutheiersi* M a u p a s achou um pequeno numero de femeas que só eram hermaphroditas em 1 ovario, o outro só elaborava ovulos; em *Rhabditis marionis* M a u p a s ,

além de vêr individuos hermaphroditos unilateraes encontrou um que era femea não hermaphrodita nos 2 ovarios; em *Rhabditis viguieri* M a u p a s ainda observou que o numero de hermaphroditas unilateraes e de femeas typicas era bem maior, encontrando-se 1 a 2 femeas, em media, para cada 10 individuos examinados. É notavel que os machos de *Rhabditis duhnersi* eram muito inertes, mais ardentes em *Rhabditis marionis* e finalmente todos aptos á fecundação em *Rhabditis viguieri*. Diversas outras especies ha, (*Diplogaster robustus*, estudado por M a u p a s) onde os machos quasi sempre rarissimos, embora absolutamente normaes não exercem mais a fecundação (machos atavicos), Já conhecemos nematoides, onde na geração parasita absolutamente não ha machos (genero *Rhabdias*). Ha especies onde se vê um esboço de parthenogenese (*Diplogaster minor*, tambem estudado por M a u p a s) e onde os ovos não fecundados chegam até o estadio de morula. Outras especies são parthenogeneticas typicas, como já fôra visto por S c h n e i d e r e por B ü t s c h l i (XLV) (*Rhabditis schneideri* etc.). Todavia ainda não terminamos com os typos possiveis de reproducção nestes animaes. E v a K r ü g e r mostrou em *Rhabditis aberrans* que o espermatozoide penetra no ovulo, determina sua activação, mas em seguida degenera sem topar parte no desenvolvimento. Factos semelhantes foram vistos em nematoides hermaphroditas como *Rhabditis anomala* ou bisexuados como *Rhabditis pellio*, *Rhabditis pelodera*, *Rhabditis longicauda*, por Paula Herwig (XLVI). Mais notavel ainda foi o achado de Belar em *Rhabditis menohystera*, onde esta pseudo-fecundação (tambem chamada pseudogamia por Focke (XLVIII), merospermia por Belar e gynogenese por Wilson (XLIX), coexiste com a fecundação normal e conduz ao

sexo feminino, enquanto que nos casos onde o espermatozoide forma um pronucleo masculino que se une ao feminino, isto é onde o espermatozoide funciona como nos casos habituaes, o sexo do descendente é o masculino. É notavel que nos casos, onde a penetração do espermatozoide é necessaria ao desenvolvimento do ovulo (merospermia) os ovulos não fecundados, degeneram.

Paula Hertwing pôde observar em *Rhabditis pellio* o nascimento a partir da raça bisexuada normal, de uma linhagem nascida por mutação e constituida somente por femeas. Não se tratava de uma raça parthenogenetica pois os ovulos não fecundados degeneram. Para conserval-as foi preciso pol-as em contacto com machos normaes. Então, em vez de fecundação completa, como na raça inicial, os espermatozoides agiam aqui apenas como excitadores do desenvolvimento (merospermia). Ficou pois demonstrado que em *Rhabditis pellio* a raça merospermica deriva da bisexuada. Não foi ainda constatada a mutação seguinte, cujo apparecimento se podia talvez prophetisar sem exagero: a raça parthenogenetica, provavelmente derivada de uma nova mutação partida da linhagem merospermica. Finalmente já foram vistos intersexuados entre os nematoides. Dizem Wülker e Schuurmans Steekhoven (L) "Onde se descreveu hermophroditismo em nematoides de vida livre marinhos, trata-se provavelmente, não de hermaphroditas verdadeiras, com as funcções de ambos os órgãos sexuaes, mas de um hermaphrodita pathologico, isto é intersexualidade" (*). Veja-se tambem Steiner (LI) os

(*) "Wo für freilebende Meeresnematoden Zwitterigkeit beschrieben wurde, handelt es sich anscheinend nicht um echten Hermaphroditismus mit Funktionen beider Geschlechtsanlagen, sondern um pathologische Zwitter, bzw. Intersexe". pg. 46/47.

intersexuados que observou em *Mermithidae* e outros nematoides de vida livre marinhos e terrestres.

Não é intenção nossa continuar esta analyse da reprodução nos nematoides; quizemos apenas mostrar a complexidade que este problema assume aqui e a necessidade de analysar cada caso isoladamente, pois typos proximos como *Rhabdias* e *Strongyloides* podem se comportar de modo absolutamente diverso quanto á reprodução.

Em conclusão: jamais foram vistos machos no genero *Rhabdias* e é provavel que não existam, pois a occurrencia de uma espermatogenese perfeita já demonstrada por B o v e r i e S c h l e i p em *Rhabdias bufonis* e agora por nós em *Rhabdias füllerboni*, permite comprehender que taes machos não sejam necessarios. Devemos ainda referir o achado de C h u (LII) em *Rhabdias fuscovenosa catanensis*, parasita da cobra e onde pensa ter descripto pela primeira vez no genero *Rhabdias* a occurrencia simultanea do typo directo e do indirecto nas formas da vida livre. Predominara o typo directo e só com elle obteve infestações. Nunca achou entre os parasitas macho algum, d'onde conclue que os achados de K r e i s e de F a u s t em *Strongyloides* não devem ser exactos. Considera que o macho no genero *Rhabdias* deve ser tido como superfluo, pois verificou que tanto o typo directo quanto o indirecto das formas livres, provinham de ovos de geração parasita, podendo pois (no typo directo) ser dispensado; suggere que o estudo cytologico seja feito. Ora devemos notar que G o o d e y (XVIII) já havia estudado *Rhabdias fuscovenosa* e *Rhabdias ophidia*, ambos parasitas da cobra. Na especie *fuscovenosa* não poude obter as gerações de vida livre, nem fez estudos cytologicos, mas admittiu que se dêsse neste animal factio semelhante ao observado por S c h l e i p em *Rhabdias*

bufonis. Em *Rhabdias ophidia* não houve geração sexuada de vida livre, as culturas cresceram mal, tendo obtido apenas larvas infestantes Clemente Pereira em *Rhabdias labiata* (LIV) e *Rhabdias vellardi* (LV), ambos parasitas de cobra, observou sempre desenvolvimento indirecto. Não seguiremos Chu em suas conclusões partindo do observado no genero *Rhabdias* para resolver sobre o que deve succeder no genero *Strongyloides*, e isso pelos motivos acima mencionados. Vemos porem que se admittiu até o trabalho de Chu que no genero *Rhabdias* as especies ou davam desenvolvimento indirecto (*Rhabdias bufonis* e *Rhabdias fullerboni*) ou directo *Rhabdias ophidia*) mas não os dois simultaneamente. Chu em seu trabalho cita uma observação de Chitwood que teria visto em *Rhabdias fullerboni* simultaneamente desenvolvimento directo e indirecto. Não nos foi dado observar semelhante cousa em nossas culturas. Verdade é que não seguimos para a obtenção das mesmas a technica aconselhada por Chu e utilizada tambem por Chitwood.

Acreditamos porem ser do mais alto interesse estudar a cytologia e especialmente a espermatogenese na forma hermaphrodita, dos *Rhabdias* de desenvolvimento directo ou mixto, afim de tentar esclarecer o problema da origem dos 2 typos de espermatozoides que se formam na espermatogenese da forma hermaphrodita de *Rhabdias bufonis* e *Rhabdias fullerborni*. Começamos a examinar *Rhabdias* de cobras e obtivemos algumas culturas de vida livre, culturas onde só encontramos formas infestantes: infelizmente a especie não foi identificada. As preparações de forma hermaphrodita, parasita do pulmão, examinadas rapidamente, mostraram-nos aspectos muito differentes dos que encontramos em *Rhabdias fullerboni*; tão differentes que exigem

estudo cuidadoso que não tivemos tempo de empregar, mas que pensamos levar a cabo num proximo trabalho.

III

Algumas considerações finais sobre o cyclo chromosomico e o sexo nos Rhabdiasidae

No decurso de nossa exposição, tivemos oportunidade de discutir diversos dos problemas ligados ao estudo do cyclo chromosomico dos *Rhabdiasidae* e mais particularmente os seguintes: mecanismo de formação dos ovulos no hermaphrodita, formação dos espermatozoides no hermaphrodita, numero de chromosomas nos 2 sexos e processo pelo qual a dualidade dos chromosomas necessaria á producção dos machos e femeas de vida livre fica assegurada; reproducção e ontogenia dos ovos do hermaphrodita; espermato-genese na geração de vida livre; discussão em torno do typo de hermaphroditismo de *Rhabdias* e dos outros nematoides; discussão a respeito do problema da inexistencia dos machos na geração hermaphrodita; algumas considerações sobre a formação das larvas infestantes, o que nos levou a examinar os processos de reproducção dos nematoides.

Desejariamos agora antes de dar por encerrado nosso trabalho chamar a attenção para outras questões cujo interesse nos parece, biologicamente falando, dos mais consideraveis. Evidentemente o problema maximo será descobrirmos qual a significação da alternancia das gerações; porque a uma geração bi-sexuada vivendo no meio exterior, se ha de seguir uma outra, onde os machos

não existem e as femeas phenotypicas mostram em seu ovario zonas de espermatogenese. Problema extremamente complicado, para o qual não vemos no momento resposta, cuja solução se acha aliás na dependencia de outros ainda não resolvidos.

Assim o primeiro delles é: que papel representam os espermatozoides com 5 chromosomas, encontrados por Boveri, nos machos de geração bi-sexuada de *Rhabdias bufonis* e por mim em *Rhabdias füllerbongi*? Impõe-se aqui a comparação que já havia sido feita por Boveri com o succedido nos *Aphidae*, tão bem estudados por von Baehr (LVI, LVII) e Morgan, (LIXV) confirmado por Stevens e Honda (LVIII).

Sabemos que nestes animaes ha egualmente uma geração bi-sexuada alternando com outra parthenogenetica. Os machos são tambem aqui provenientes da perda de chromosomas especiaes, processo que se dá na maturação de certos óvulos e que é perfeitamente comparavel áquelle que em *Rhabdias* conduz ao sexo masculino, muito embóra aqui se dê no decorrer da espermatogenese do hermaphrodita. Ora, quando os machos dos *Aphidae* vão formar o seus espermatozoides, os chromosomas sexuaes passam para um unico spermatocyto de 2.^a ordem, o outro recebendo apenas autosomas. Este ultimo degenera, de sorte que só o 1.^o se divide dando 2 espermatides e portanto 2 espermatozoides, ambos transportando chromosomas sexuaes, e portanto aptos à engendrar as femeas parthenogeneticas seguintes. Pode mesmo acontecer, como foi visto por Honda n'um pulgão japonéz (*Stomaphis yanois*) que todas as

espermatides se fôrmem. Todavia as que não receberam chromosomas sexuaes mostram um começo de evolução em espermatozoides, mas a seguir degeneram. B o v e r i que já havia visto os espermatozoides com 5 chromosomas perfeitamente constituídos da geração bissexuada, admittiu que, devessem ser espermatozoides não funcionaes, e que a degeneração que se observa precocemente nos *Aphidae*, dar-se-ia mais tarde em *Rhabdias*. Esta opinião é tanto mais razoavel quanto, como acabamos de ver, foi verificado depois do trabalho de B o v e r i, que podemos ter um typo no qual a evolução (*Stomaphis yanois*) vae até espermatides. *Rhabdias* seria assim o ponto terminal de uma evolução que começou digamos, em *Phylloxera*, passando por *Stomaphis*. Achamos entretanto que o melhor será esperar que novas verificações ou experiencias permittam uma resposta satisfactória á pergunta: que significam os espermatozoides com 5 chromosomas da geração de vida livre? Ainda não sabemos se taes espermatozoides são incapazes de exercer a fecundação, ou se os ovulos por elles fecundados é que irão degenerar ou soffrer alguma outra transformação. Conhecemos tantos exemplos onde interpretações que pareciam logicas foram desmentidas pela natureza, que o melhor em taes casos parece nos suspendermos o nosso juizo até segunda ordem.

Contribuição notavel para esclarecimento do assumpto, virá certamente da analyse do mecanismo pelo qual nas especies de *Rhabdias* onde não ha desenvolvimento indirecto, se dá a espermatogenese no hermaphrodita e evidentemente mais ainda, quando se observa a occurrencia de larvas infestantes e formas bi-

sexuadas. Como já foi dito, este assumpto até hoje ainda não foi estudado. Esperamos poder nos dedicar brevemente á analyse cytologica em questão em *Rhabdias* de ophideos, que certamente nos hão de reservar surpresas interessantes.

Depois de tudo isso continúa intacto o problema do hermaphroditismo. O dia em que se tiver esclarecido porque motivo se dá, ou falta a geração bi-sexuada, e ainda porque não existem machos nas gerações oriundas das larvas infestantes, terão os biologistas que enfrentar o problema da analyse dos motivos que levam um animal chromosomicamente e phenotypicamente feminino a differenciar em seu ovario areas testiculares.

E' em summa o problema do hermaphroditismo n'um caso que parece ser indicado para sua solução, já que aqui o hermaphroditismo é incompleto, localisado a certas zonas da gonada e sem influencia sobre o soma do individuo.

Sabemos que o sexo, como a côr dos olhos, a estatura, ou qualquer outro character evidenciado por um ser vivo, depende de certos factores hereditarios agindo num certo meio. Sabemos ainda que ha caracteres que dependem tão fortemente de certos gens que o meio pouco influencia tem sobre elles. Uma cobaya, por exemplo, terá tal ou qual coloração, em funcção apenas dos gens que transporta independentemente do meio no qual se tiver formado. Outros caracteres porém, dependem não só dos gens, mas ainda do meio que encontram no periodo em que agiram sobre o ser determinando o apparecimento de seus caracteres. Assim, na *Drosophila melanogaster* hybrida para os factores de abdomen nor-

mal e anormal, o phenotypo será tanto mais anormal, quanto mais rica a cultura em alimento e humidade e tanto mais normal quanto mais pobre, como foi perfeitamente mostrado por Morgan. O sexo pode tambem se apresentar com um caracter tão fortemente influenciado pelos gens que o sêr seja obrigatoriamente um macho ou uma femea, qualquer o meio onde se tenha formado. Sabemos porém que ha seres nos quaes o sexo é um caracter que não tem a rigidez com que habitualmente é observado, pois seres que começam a sua vida como machos (ou feemas), terminam-na como femeas (ou machos). E' o phenomeno da intersexualidade causado já por equilibrios particulares entre a força dos factores masculinos e a força dos factores femininos, (Goldschmidt (LX) em *Lymantria dispar*), já por ter attingido determinado valor a relação entre o numero de chromosomas sexuaes e o dos autosomas; (Bridges em *Drosophila melanogaster* (LXI) já finalmente, por ter o meio: temperatura nas rãs, Witschi (LXII), alimentação na *Bonellia*, Baltzer (LXIII), etc., etc. — feito pender a balança para um certo lado, determinando que o animal genotypicamente pertencente a um sexo, passe de um certo momento em deante, a adquirir os carateres e se conduzir como um animal do sexo opposto. Sem querer insistir neste assumpto, já por nós rapidamente abordado no 1.º Capitulo, lembramos ainda que outro interessante exemplo da influencia do meio sobre o sexo foi-nos fornecido por Brumpt (LXIV) em *Strongyloides papillosus*, parasita do intestino do carneiro. Cerca de 95 a 98% dos ovulos soffrem evolução directa que todavia pode baixar para

10%. Foi visto que a percentagem de ovulos que evoluem segundo o typo directo não dependem das condições externas e sim dos factores hereditarios. O que nos interessa é a proporção dos sexos. *Brumpt* só encontrou na geração livre 1 macho para 2.000 femeas, d'onde resulta a quasi completa esterilidade dessa geração livre, não havendo machos bastante para assegurar a fecundação de todas as femeas. Ora, *Brumpt* verificou que o *Strongyloides papillosus* pode experimentalmente infestar o coelho e então verificou 237 machos para 409 femeas. Portanto foram as novas condições do meio, representadas pela vida no organismo do coelho, que determinaram tão notavel accrescimo da percentagem dos machos.

Modificações ainda mais notaveis foram observadas por *Sandground* no *Strongyloides fülleborni*, parasito de macacos (primatas da sub-ordem Catharrineos) que se desenvolve sempre por um cyclo heterogenetico e que pode ser levado a infestar cães, dando então desenvolvimento directo. Evidentemente, por estas e pelas razões já anteriormente indicadas, um estudo cuidadoso no cyclo chromosomico no genero *Strongyloides*, se impõe.

Quaes serão os factores em causa no *Rhabdias*, capazes de determinar que certas zonas de uma gonada genotypicamente feminina, evoluam para um testiculo? Já sabemos desde os trabalhos de *Ancel* (LXIV) em *Hélix*, que a alimentação mais ou menos abundante pode (evidentemente encontrando cellulas onde seja possivel a flexão do sexo) conduzir a uma diferenciação para o sexo feminino (alimentação abundante) ou masculino

(alimentação escassa). Todavia não vemos como, em *Rhabdias* isso seria possível, já que as zonas ovarianas que seguem evolução ovogenética são contiguas ás que dão uma evolução espermatogenética, e tanto quanto nos foi possível observar, não vimos a menor diferença na ambiencia que cerca essas 2 zonas. Schleip pergunta se realmente nos spermatocytos recémformados de *Rhabdias* existe o numero de chromosomas do sexo feminino (12), pois um dos heterochromosomas (admitte que é o que vae ser eliminado) se apresenta muito cedo distincto e por isso seria muito cedo inactivo, de sorte que só ficariam activos em taes cellulas, 11 chromosomas (*).

Todavia, perguntamos nós, mesmo abstrahindo de criticar as hypotheses não demonstradas incluídas na theoria acima (será o chromosoma que primeiramente apparece o que vae ser eliminado, etc., etc.), que causa levou este chromosoma a tornar-se inactivo, separando-se assim physiologicamente de seus companheiros?

Como já dissemos, estamos aqui deante de um problema capital para a Biologia geral. Preferimos não fazer hypotheses e esperar que a observação e a experiencia o venham a resolver algum dia.

(*) “Man kam sich aber auch fragen, ob in den Spermato-cyten wirklich hoch die weibliche Chromosomenzahl vorhanden ist; denn das zuerst erscheinende Heterochromosom, welches auch dasjenige sein dürfte, das später ausgestossen wird, könnte durch seine frühzeitig eintretende Verdichtung anzeigen, dass es inaktiv ist. Dann sind nur noch 11 Chromosomen wie in den Männchen wirksam”. pg. 7.

4.ª PARTE

CONCLUSÕES

I — O cyclo chromosomico de *Rhabdias fülleborni* em sua forma hermaphrodita se dá do seguinte modo:

A — Ovogenese

Na ovogenese podemos distinguir 4 zonas:

1 — *Zona germinativa*: Nella se encontram ovogonias em constante divisão; 12 chromosomas de tamanho approximadamente igual, são então observaveis. Não é possivel portanto a identificação de chromosomas especiaes. Muito precocemente formam as ovogonias um syncycio.

2 — *Zona de synapsis*: Os nucleos, sem apresentar com clareza todos os numerosos aspectos que podem ser encontrados em outros casos na prophase da 1.ª mitose de maturação, mostram sua chromatina constituindo um bloco compacto (*Synezizezis*) em cujo centro se vê um nucleolo. A seguir o nó synaptico se resolve em cordas duplas de chromatina (aspecto *pachyteno*). Vemos por vezes nesta phase uma rachis no centro do tubo ovarico.

3 — *Zona de crescimento*: A partir da parede do tubo ovarico sulcos se aprofundam, que progressivamente indi-

vidualisam os ovocytos. Estes crescem e adquirem vitello, ao mesmo tempo que sua chromatina apresenta aspectos complicados com espessas cordas duplas.

4 — *Zona de maturação*: Assistimos agora á individualisação dos chromosomas. Surgem desde logo em numero 6; são pois chromosomas bivalentes (tetrades). Não guardam relação definida com o nucleolo e apresentam aspectos variaveis: cruz, anel, etc., mostrando geralmente de modo nitido uma condição quadripartida. Antes da expulsão dos globulos polares assistimos á penetração do espermatozoide, que no entanto só irá formar o pronucleo macho após a expulsão do 2.º globulo polar.

B — Espermatogenese

As zonas testiculares são encontradas em niveis diversos do ovario, a partir da zona de synapsis. Seu primeiro esboço consiste em células (ex-ovocytos) que se apresentam menores e com cytoplasma menos chromophilo do que o das cellulas visinhas; além disso mostram individualisação precoce do chromosoma X, que pode estar dentro de um plasmosoma; o numero de zonas testiculares que podem ser encontradas em cada ovario é discutido.

Individualisados os chromosomas sexuaes, surgem agora os demais. A chromatina passa do estado pachyteno ao diploteno, assumido os chromosomas (tetrades), as formas habituaes de anel, Y, cruz, etc. Aqui também, como na ovogenese, nem todos os aspectos complicados da prophase da 1.ª mitose de maturação podem ser observados. A seguir condensam-se as tetrades, sendo então particularmente nitido seu aspecto quadripartido. Contadas as tetrades, verificamos existirem 5; ha além

disso, 2 elementos menores que não se uniram e que devem ser considerados como os heterochromosomas.

Na primeira mitose de maturação cada tetrade se resolve em 2 dyades, uma para cada uma das cellulas filhas; os 2 chromosomas sexuaes dividem-se equacionalmente, e se distribuem aos 2 spermatocytos de 2.^a ordem, que terão portanto, 5 dyades e 2 heterochromosomas cada um. Não notamos atrazo de chromosomas nesta 1.^a mitose de maturação.

A segunda mitose de maturação é extremamente interessante. Os autosomas (dyades) resolvem-se cada um em seus dois constituintes, ao passo que os 2 allosomas se distribuem, um a cada cellula filha, passando atrazados em relação aos primeiros. Podem então se dar 3 possibilidades; a) embora atrazados, alcançam seus companheiros, de tal maneira que as spermatides e depois os spermatozoides apresentarão 6 chromosomas: b) um delles se atraza mais do que o outro, ficando retido na região de separação das cellulas filhas e mais tarde, ao se transformar cada spermatide em spermatozoide, havendo a eliminação da zona em questão, com ella vae o chromosoma desgarrado. Resultarão assim spermatozoides com 6 ou 5 chromosomas; c) ficam os 2 chromosomas sexuaes retidos na região de separação das cellulas filhas, em consequencia de que se perderão ambos ao se dar a spermiogenese. Teremos assim spermatozoides com 5 chromosomas.

Graças aos 3 mecanismos descriptos, dos quaes o 2.^o é o mais frequente e o 3.^o o mais raro, formar-se-ão 2 typos de spermatozoides com 5 ou 6 chromosomas. Serão respectivamente os factores dos machos e das femeas da geração seguinte.

A espermiogenese nada de especial apresenta. Consiste simplesmente na expulsão de um plasma escuro que se encontra na região pela qual se dividiu o spermatocyto de 2.^a ordem em spermatides. Os corpos residuaes assim formados podem apresentar com frequencia um chromosoma cuja origem foi acima assignalada. O tamanho dos espermatozoides é approximadamente constante.

Estatisticas em inicio mostram que ha approximadamente o mesmo numero de espermatozoides com 5 ou 6 chromosomas e que a frequencia dos machos da geração de vida livre é egual á das femeas dessa mesma geração.

Separando as zonas testiculares, do ovario, encontram-se zonas especiaes (de transição e de degeneração) sobre as quaes são feitas considerações diversas.

C — Fecundação e desenvolvimento embryonario

Já falamos a respeito da penetração do espermatozoide. Eliminados os 2 globulos polares, transforma-se o espermatozoide em pronucleo macho. Os 2 pronucleos que têm o mesmo tamanho, encontram-se em dois polos do ovulo. Podemos contar ora 6 + 5, ora 6 + 6 chromosomas. Sua origem e significação foram dadas acima.

Um breve estudo da segmentação mostrou que, nas cellulas somaticas, fragmentaram-se os chromosomas, cada um em 2, havendo pois ovos, cujas cellulas apresentam 22 chromosomas e outros nas quaes existem 24, correspondentes respectivamente aos futuros machos e femeas da geração bisexuada.

II — A geração de vida livre

E' fornecida uma technica para a obtenção das culturas e exame do material.

A — Espermatogenese

Não foi possível vêr as espermatogonias; as outras phases foram observados com nitidez. Partindo dos spermatocytos jovens, vê-se com nitidez a formação progressiva das tetrades, naturalmente em numero de 5, + 1 chromosoma X, pois os machos derivam dos ovos com 11 chromosomas. A prophase da 1.^a mitose de maturação mostra aqui, melhor do que no hermaphrodita, aspectos da chromatina como os observados em outros casos mais favoraveis. O chromosoma sexual se individualisa precocemente e é encontrado junto á membrana nuclear. A synapsis é do typo "centrotaxica", differente portanto da observada na forma hermaphrodita. Na 1.^a mitose de maturação, as 5 tetrades, cuja condição quadripartida é extremamente nitida se resolvem em dyades, o chromosoma X passa indiviso para um dos spermatocytos de 2.^a ordem, dos quaes ha portanto 2 variedades, com 5 ou 6 chromosomas. A 2.^a mitose de maturação que se segue immediatamente dá espermatides tambem desses mesmos typos. Por expulsão de um plasma escuro, tranformam-se elles em espermatozoides. A significação dos espermatozoides com 5 chromosomas permanece obscura, pois na geração seguinte só encontramos individuos com 12 chromosomas, que serão somaticamente femeas e quanto á gonada hermaphroditas.

Nas cellulas somaticas do macho de vida livre é possível contar 22 chromosomas, o que prova serem realmente os espermatozoides com 5 chromosomas do hermaphrodita os responsaveis por sua origem.

B — Ovogenese e outros phenomenos observados nas formas de vida livre

O estudo da ovogenese foi apenas iniciado, devendo seu desenvolvido ser feito em outro trabalho. Estudou-se o modo pelo qual surgem, nas culturas, as larvas infestantes. Estas devoram o organismo materno, onde se formaram e só depois de transformada a femea em um sacco de chitina, sahem para o meio exterior. O numero de larvas infestantes para cada femea varia de 1 a 3, sendo mais frequentes os casos em que se formam 2 larvas.

III — Alguns problemas especiaes

A — Hermaphroditismo proterandrico ou proterogynico?

Baseado no estudo de uma forma parasita muito jovem, discute-se longamente a natureza do hermaphroditismo, encontrado em *Rhabdias*. A forma em questão parecia ser a de um animal que havia primeiramente formado ovulos. Sch le i p em *Rhabdias bufonis* tambem observou um caso analogo. Todavia, em trabalho experimental recente, S c h a a k e concluiu que primeiramente se formam espermatozoides em *Rhabdias bufonis*. Faz-se um estudo comparativo do typo de hermaphroditismo encontrado por numerosos autores em diversos nematoides e chega-se á conclusão de que muito embora se possam formar primeiramente cellulas maduras do sexo masculino, a gonada é inicial-

mente tanto por sua morphologia e séde no corpo do animal, quanto pelo aspecto das cellulas nella contidas, bem como numero de chromosomas encontrados nessas cellulas iniciaes (ovogonias) um ovario.

Chama-se a attenção para o facto de que seria extranhavel que um animal que foi conduzido por sua formula chromosomica e por outros factores a adquirir um soma feminino, pois os nematoides hermaphroditas são phenotypicamente femeas typicas, tivesse começado por possuir uma gonada masculina.

Discute-se a definição de hermaphroditismo proterandrico e proterogynico concludindo-se por um hermaphroditismo proterogynico em *Rhabdias*, como na generalidade dos nematoides (animaes possuindo inicialmente ovario e ovogonias).

B — Inexistencia de machos na geração parasita

E' discutida a inexistencia de machos na forma parasita do genero *Rhabdias* e analysada comparativamente esta situação com a dos generos proximos, especialmente *Strongyloides*.

C — Algumas considerações finaes sobre o cyclo chromosomico e o sexo nos Rhabdiasidaeae

E' discutido o problema dos chromosomas e do sexo normal ou alterado em *Rhabdias*, comparativamente com outros animaes, onde phenomenos da mesma ordem são encontrados.

BIBLIOGRAPHIA

- I — Metschnikoff, E. — 1865 — Über die Entwicklung von *Ascaris nigrovenosa*, Arch. f. Anat. u. Physiol. Jahrg.
- II — Leuckart, R. — 1865 — Helminthologische Experimentaluntersuchungen, 4. Reihe, Gött, Nachrichten, N. 8.
- III — Schneider, A. — 1866 — Monographie der Nematoden. G. Reimer, Berlin.
- IV — McDowell, S. A. — 1906 — A preliminary note on the mitotic phenomem in the eggs of the hermaphrodite "*Angiostomum nigrovenosum*", (*Ascaris nigrovenosa*) Proc. Cambridge Phil. Soc., Vol. XIII.
- V — Boveri, Th. — 1911 — Über das Verhalten der Geschlechtschromosomen bei Hermaphroditismus. Beobachtungen an *Rhabditis nigrovenosa*, Verhandl. d. phys. — med. Gesellschaft, Würzburg, N. F. Bd. XLI.
- VI — Schleip, W. — 1911 — Über die Chromatinverhältnisse bei *Angiostomum* (*Rhabdonema*) *nigrovenosum*. Berichte d. naturf. Gesellsch., Freiburg, i. Br., Bd. XIX, Heft, 1.
- VII — Schleip, W. — 1911 — Das Verhalten des Chromatins bei *Angiostomum* (*Rhabdonema*) *nigrovenosum*, Ein Beitrag z. Kenntnis der Beziehungen zwischen Chromatin u. Geschlechtsbestimmung. Archiv f. Zellforschung, 7. Bd. 1. Heft.

- VIII — Schaa ke, M. — 1931 — Infektionsmodus und Infektionsweg der *Rhabdias bufonis* Schrank (*Angiostomum nigrovenosum*) und die Metamorphose des Genitalapparates der hermaphroditischen Generation, Zeitsch. I. Wiss. Biol. Abt. F. Zeitschr. Parasitenk. 3 (4).
- IX — Travassos, L. — 1926 — Entwicklung des *Rhabdias fülleborni*, n. sp. Arch. f. Schiffs — u. Trop. Hyg., 30.
- X — Travassos, L. — 1930 — Pesquisas helmintológicas realizadas em Hamburgo — VII. Notas sobre os Rhabdiasoidea Raillet, 1916 (nematoda). Mem. Inst. Osw. Cruz, 24.
- XI — Romeis, B. — 1932 — Taschenbuch der mikroskopischen Technik, München u. Berlin, R. Oldenburg.
- XII — Mac Clung, C. E. — 1924 — The Chromosome theory of heredity, General Gytology, by Cowdry, Univ. Chicago Press.
- XIII — Stevens, N. M. — 1906 — Studies in Spermatogenesis. Part. II. Carnegie Inst. of Washington, Publ. N.º 3.
- XIV — Payne, F. — 1910 — The Chromosoms of *Acholla multispinosa*, Biol. Bull., Vol. XVIII.
- XV — Dreyfus, A. — 1937 — Sobre o mecanismo de formação dos espermatozoides nas zonas testiculares da forma parasita de *Rhabdias fülleborni* Trav. — Rev. d. Biologia e Hygiene, 8 (1).
- XVI — Dreyfus, A. — 1937 — Chromosomas e Sexo, Rev. Medicina Cirurgia Pharmacia N.º 20 e 21.
- XVII — Goette, A. — 1882 — Entwicklungsgeschichte der *Rhabditis nigovenosa*, Abhandl. zur Entwicklungsgesch. d. Tiere, 1. Heft.

- XVIII — Nedkoff — 1897 — Über die Metamorphose des Geschlechtsapparates bei *Ascaris nigrovenosa*, Inaug. Diss. Leipz.
- XIX — Neuhaus, C. — 1903 — Die postembryonale Entwicklung von *Rhabditis nigrovenosa* (Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. Bd. 37.
- XX — Dreyfus, A. — 1937 — A Espermatogenese nos machos da geração de vida livre de *Rhabdias fülleborni* Trav.. Rev. Biol. e Hyg. 8 (1).
- XXI — Dreyfus, A. — 1937 — Hermaphroditismo alternante proterogynico em *Rhabdias fülleborni* Trav.. Mem. do Inst. Butantan, Vol. XI.
- XXII — Potts, F. A. — 1910 — Notes on the free-living Nematodes I. The hermaphrodite species, Quarterly Journ. of Microscopical Science, (2), Vol. 55.
- XXIII — Ziegler, E. Bresslau, E. — 1925-27 — Zoologisches Wörterbuch 2 Vols. G. Fischer, Jena.
- XXIV — Goldschmidt, R. — 1923 — The Mechanism and Physiology of Sex Determination, Methuen & Coe, London, transl. by W. J. Dakin.
- XXV — Maupas, E. — 1900 — Modes et formes de reproduction des Nematodes, Arch. de Zoologie experim. et génér. Série 3, T. 8.
- XXVI — Krüger, E. — 1913 — Fortpflanzung und Keimzellenbildung von *Rhabditis aberrans*, nov. sp., Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. CV, Heft. 1.
- XXVII — Rauter, M. — 1928-33 — Nematoden, Handbuch der Zoologie v. W. Kükenthal, II Bd. 1. Hälfte: Vermes Amara, 4 Berlin, Leipzig, W. de Gruyter.
- XXVIII — Vandel, A. — 1930 — La Parthénogénèse. Encyclopédie Scientif. Bibl. de Biologie générale, G. Doin, Paris.

- XXIX — Spengel, J. W. — 1870 — Das Urogenitalsystem der Amphibien, Arbeit d. zool. zootom. Inst. Würzburg III.
- XXX — Hoffmann, C. K. — 1886 — Entwicklungsgeschichte der Urogenitalorgane bei den Anamisia, Zeitschr. f. wiss. Zool, XLIV.
- XXXI — Friedmann, F. — 1898 — Rudimentäre Eier in Hoden von *Rana viridis*, Arch. mikr. Anat. LII.
- XXXII — Cerutti, A. — 1907 — Sopra due casi di anomalia dell'apparato riproduttore nel *Bufo vulgaris*, Lam. Anat. Anz. XXX.
- XXXIII — King, H. D. — 1910 — Some anomalies in the genital organs of *Bufo lentiginosus* and their probable significance, Am. Journ. of Anat. X.
- XXXIV — Champy, Ch. — 1924 — Caractères sexuels et Hormone, Doin, Paris.
- XXXV — Guyénot, E. et Ponse, K. — 1923 — Inversion expérimentale du type sexuel dans la gonade du crapaud, C. R. Soc. Biol. Vol. LXXXIX.
- XXXVI — Dreyfus, A. — 1937 — Sobre a occurencia de ovocytos no testiculo do sapo *Bufo marinus*, Rev. Biol. e Hyg. 8 (1).
- XXXVII — Dreyfus, A. — 1937 — Sobre a evolução de ovocytos contidos no testiculo do sapo. Mem. d. Inst. Butantan, Vol. XI.
- XXXVIII — Cobb, N. A. — 1918 — Nematodes of the sump and filterbeds of the American cities, with notes on hermaphroditis and parthenogenesis; Nematology, 7
- XXXIX — Satndground, J. H. — 1926 — Biological Studies on the life-cycle in the genus *Strongyloides*, Grassi, 1879. Amer. Journ. of Hygiene — V. N.º 3.

- XL — Kreis, H. — 1932 — Studies on the genus *Strongyloides* (nematodes) Amer. Journ. of Hygiene, Vol. XVI.
- XLI — Faust, E. O. — 1933 — Experimental Studies on Human and Primate Species of *Strongyloides*. II. The Development of *Strongyloides* in the Experimental Host. Am. Journ. of Hygiene, Vol. XVIII, N.º 1.
- XLII — Leichtenstern, O. — 1905 — Studien über *Strongyloides stercoralis* (Bavay) nebst Bemerkungen, etc. Arbeit a. d. Kais. Gesundheitsamt, 22.
- XLIII — Faust, E. C. & Kagy, E. S. — 1933 — Experimental studies on human and primate species of *Strongyloides*, I. The Amer. Journ. Trop. Med., Vol. 13, pp. 47-65.
- XLIV — Morgan, D. C. — 1928 — *Parastrongyloides winchese* gen. et sp. nov. A remarkable new Nematode Parasite of the Mole and the Shrew. Journ. of Helminth. Vol. 6 pg. 79
- XLV — Bütschli, O. — 1873 — Beiträge zur Kenntnis der freilebenden Nematoden. Nova Acta K. Leop. Carol. Deutsch. Akad. Naturf. XXXVI.
- XLVI — Hertwig, P. — 1920 — Abweichende Form der Parthnogenese bei einer Mutation von *Rhabditis pellio*. Eine experimentell cytol. Untersuchung, Arch. mikr. Anat. XCIV.
- XLVII — Belar, K. — 1924 — Die Cytologie der Merospermie bei freilebenden *Rhabditis*arten, Zeitschr. f. wiss. Biol. Abt. B, (Zellen u. Gewebelehre), Bd. 1).
- XLVIII — Focke, W. O. — 1881 — Die Pflanzenmischlinge, Berlin.
- XLIX — Wilson, E. B. — 1925 — The Cell in Development and Heredity New York.

- XLX — Wülker e Schuurman Steckhoven, J. H. — 1933 — Nematoda, Die Tierwelt der Nord- und Ostsee, Lieferung 25, Teil V. hrsg. v. Grimpe.
- LI — Steiner, G. — 1923 — Intersexes in *Nematodes*, Journ. of Heredity Vol. XIV, N.º 4, Washington.
- LII — Chu, T. C. — 1936 — Studies on the life history of *Rhabdias fuscovenosa catenensis* (Riggo 1932). Journ. of Parasit. Vol. 22, pg. 140-160.
- LIII — Goodev, T. — 1924 — Two new species of the nematode genus *Rhabdias*, Journ of Helminth. Vol. 2, N.º 5, pg. 203-8.
- LIV — Pereira, Clemente — 1927 — Fauna helminthologica des Ophideos Brasileiros, Bol. Biologico, fasc. 10, 179-85.
- LIV — Pereira, Clemente — 1928 — Fauna helminthologica dos Ophideos Brasileiros, II., Bol. Biol. fasc. II, 13-22.
- LV — Baehr, v. W. B. — 1908 — Ueber die Bildung der Sexualzellen bei Aphididae. Zool. Anz. XXXIII.
- LVI — Baehr, v. W. B. — 1909 — Die oogenese bei einigen viviparen Aphididen un Spermatogenese von *Aphis saliceti*, mit besonderer Berücksichtigung der Chromatinverhältnisse. Arch. f. Zellforsch, III.
- LVII — Honda, H. — 1925 — Experimental and cytological studies on bi-sexual and free-living *Nematodes*. Journ. of. Morphology, Vol. 40.
- LVIII — Morgan, T. H. — 1909 — A biological and Cytological Study of Sex Determination in Phylloxerans and Aphids. Journ. Exp. Zool. VII.
- LIX — Goldschmidt, R. — 1931 — Die sexuellen Zwischenstufen, Berlin.

- LX — Bridges, C. B. — 1922 — Sex in relation to chromosomes and genes. *Americ. Nat.* 59.
- LXI — Witschi, E. — 1929-30 — Studies on sex-differentiation and sex-determination in Amphibians, I — III, *Journ of Exp. Zool.* 52, 54 e 56.
- LXII — Baltzer, F. — 1914 — Die Bestimmung des Geschlechtsdimorphismas bei *Bonellia*. *Mitt. Zool. Stat. Neapel*, 22.
- LXIII — Brumpt, E. — 1921 — Recherches sur le déterminisme des sexes et de l'évolution des Anguillules parasites C. R. Soc. Biol. 85, pg. 249-252.
- LXIV — AnceI, P. — 1903 — Histogénèse et Structure de la glande hermaphrodite d'*Hélix Pomatia* (Linor.) *Arch. d. Biol.* Tome XIX.
- LXVI — Stevens, N. M. — 1909 — An unpaired heterochromosome in the Aphids. *Journ. Exp. Zool.* VI.
- LXVII — Goodev, T. — 1924 — The Anatomy and life-history of the nematodes *Rhabdias fuscovenosa* (Raillet) from the grass snake *Tropidonotus natrix*, *Journ of Himinth.* 2, N° 2, pg. 51-64.

LEGENDA DAS FIGURAS

Todas as figuras, excepto a de N.º 58 que provem de um parasita de rã (*Leptodactylus ocellatus*), foram obtidos de parasitas do sapo *Bufo marinus*. As figuras das formas de vida livre provêm de culturas a partir de parasitas do pulmão do sapo *Bufo Marinus*. Todas as figuras que não trazem a menção — desenho — são microphotographias.

A — *Ovogenese no hermafrodita*

- FIG. 1 — Desenho de preparado obtido com compressão do animal previamente fixado e corado pelo carmim de Sémichon. Vemos em *a* cellula inicial da gonada com o cytoplasma apresentando alveolos.
- FIG. 2 — Carothers. *H. ferrica*. — Posição inicial do ovario, mostrando ovogonias. Não se vê rachis e o contorno celular é pouco nitido.
- FIG. 3 — Gilson, Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Início da zona de synapsis. Syncycio. Rachis em *a*.
- FIG. 4 — Gilson, Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de 3 nucleos dos ovogonias, mostrando os 12 chromosomas. Nucleolar em partilhado.
- FIG. 5 e 6 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — 2 aspectos da zona de synapsis.
- FIG. 7 — Gilson, Petrunkevitch. *H. ferrica*-eosina. — Ovocyto com aspecto pachyteno da chromatina.
- FIG. 8 — Gilson, Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Ovocyto em crescimento cujos nucleos se approximaram da parede da gonada. Vemos bem, em *a* baixo, os sulcos que progressivamente isolam as cellulas umas das outras.
- FIG. 9 — Carothers. *H. ferrica* — Aspecto de conjuncto de um ovario mostrando como se dá o isolamento dos ovocyto, a partir do syncycio. Em *a* syncycio, em *b* apparecem as fendas, em *c* ovocyto já individualizados.
- FIG. 10 e 11 — Carothers. *H. ferrica*. — Ovocyto crescidos, mostrando grossas cordas de chromatina no interior dos nucleos.
- FIG. 12 — Gilson, Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Individualização das tetra-des que ainda mostram um contorno espinhoso.

- FIG. 13 — Allen Feulgen. Desenho de nucleo de ovocyto mostrando 5 das 6 tetrades, já com o aspecto diploteno. 2 delles em contacto com o nucleolo.
- FIG. 14 — Allen-Feulgen. Desenho de nucleo de ovocyto com as 6 tetrades na phase diplotena, nenhum delles em relação com o nucleolo.
- FIG. 15 — Carothers. *H. ferrica*. — Metaphase da 1.^a mitose de maturação; o fuso ainda não se deslocou. As 6 tetrades mostraram o aspecto em cruz, formada por 4 elementos, só 1 delles poude ser attingido.
- FIG. 16 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de ovocyto na 1.^a mitose de maturação, mostrando em *b* um espermatozoide com 5 chromosomas e 1 centriolo e em *a* o 1.^o fuso de maturação onde podemos ver 4 tetrades formadas, cada uma, por quatro elementos e 2 bipartidos.
- FIG. 17 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Expulsão do 1.^o globulo polar. Vemos o fuso se desbrando para a superficie da cellula e nelle as 6 tetrades.
- FIG. 18 — Carothers. *H. ferrica*. — Expulsão do 1.^o globulo polar. As 2 tetrades que faltam estão em outro plano do preparado.
- FIG. 19 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de ovocyto na 2.^a mitose de maturação. Vemos em *a* o 2.^o fuso de maturação com as 6 dyades metaphoricas e em *b* o 1.^o globulo polar.
- FIG. 20 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de anaphase da 2.^a mitose de maturação, mostrando os 2 grupos de 6 chromosomas, um delles destinado ao ovulo e o outro ao 2.^o globulo polar.
- FIG. 21 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Ovulo com os 6 chromosomas.
- FIG. 22 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho do 1.^o fuso de maturação no qual foi possivel contar 24 chromosomas.
- FIG. 23 — Flemming. *H. ferrica*. — 1.^a mitose de maturação mostrando 1 das tetrades muito apertada das outras 5 (das quaes 2 situadas no plano localizado).

B — *Espermatogenese no hermaphrodita.*

- FIG. 24 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Vemos em *a* o 1.^o esboço de uma zona testicular, com os nucleos menores e cytoplasma menor chromophilo do que os dos ovocytos circumjacentes.
- FIG. 25 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Aspecto de conjunto de uma zona testicular que se caracteriza desde logo por seu aspecto claro (chromophilia pouco intensa). *a* = zona de degeneração, *b* = espermatoctos na prophase da 1.^a mitose de maturação, *c* = espermatoctos muito jovens, semelhantes aos que se vêem na fig. 25, *d* = zona de transição.
- FIG. 26 — Vista parcial, mais augmentada, da fig. 24, mostrando em *a* individualisação precoce do chromosoma X, o qual está contido em um plasmosoma.
- FIG. 27 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Zona testicular mostrando em *a* espermatoctos pachytenos e em *b* espermatoctos diplotenos.

- FIG. 28 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Zona testicular onde se vê em *a* um chromosoma de espermatocyto da 1.^a ordem, mostrando a zona de fixação ao fuso (constricção primaria).
- FIG. 29 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Zona testicular com espermatocytos de 1.^a ordem mostrando o aspecto diploteno da chromatina.
- FIG. 30 — Allen-Feulgen. — Metaphase dos espermatocytos de 1.^a ordem, mostrando as tetrades constituídas por 4 elementos cada uma.
- FIG. 31 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Metaphase, vista de frente, de espermatocytos de 1.^a ordem, mostrando 5 chromosomas grandes (tetrades — autosomas) e no centro os 2 chromosomas sexuaes isolados.
- FIG. 32 — Allen-Feulgen. — Aspecto semelhante ao da fig. 31.
- FIG. 33 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Aspecto semelhante ao da fig. 31, onde porém os chromosomas sexuaes estão do lado direito e são facilmente distinguíveis das 5 grandes tetrades.
- FIG. 34 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Espermatocytos de 1.^a ordem, mostrando ainda os 7 chromosomas como nas figuras anteriores.
- FIG. 35 — Allen-Feulgen. — Anaphase da 1.^a mitose de maturação. Vemos os 2 grupos de chromosomas, sem que existam chromosomas atrazados.
- FIG. 36 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Anaphase da 1.^a mitose de maturação. Em *a*, 1 chromosoma atrazado.
- FIG. 37 — Carothers. *H. ferrica*. — Anaphase da 1.^a mitose de maturação. Ha 1 chromosoma ao nivel do plano de separação das cellulas-filhas.
- FIG. 38 — Allen-Feulgen. — Metaphase da 1.^a mitose de maturação. Em *a* 2 pequenos chromosomas juxtapostos em precessão sobre os outros chromosomas.
- FIG. 39 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — 2.^a mitose de maturação na espermatogenese. Vêm-se os 2 heterochromosomas passando atrazados para as 2 espermatides.
- FIG. 40 — Allen-Feulgen. — Como fig. 39.
- FIG. 41 — Carothers. *H. ferrica*. — 2.^a mitose de maturação. Vemos os 2 chromosomas que passaram atrazados, já encortados aos autosomas.
- FIG. 42 — Allen-Feulgen. — Como fig. 41.
- FIG. 43 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — 2.^a mitose de maturação. Vemos 1 dos chromosomas sexuaes (o de cima) encortado aos autosomas, o outro chromosoma X está situado no plano de separação das cellulas-filhas, muito longe dos autosomas observaveis na parte inferior do rectangulo que limita o espermatocyto de 2.^a ordem.
- FIG. 44 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — 2.^a mitose de maturação. Os 2 chromosomas sexuaes ficaram na proximidade do plano de separação das 2 cellulas filhas.
- FIG. 45 — Allen-Feulgen. — A setta indica 2 corpos residuaes cada um delles com 1 chromosoma.
- FIG. 46 — Allen-Feulgen. — Em *a* espermatozoide com 6 chromosomas, em *b* espermatozoide com 5 chromosomas.

- FIG. 47 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho do contorno de 22 espermatozoides.
- FIG. 48 — Carothers. *H. ferrica*-eosina. — Em *b* espermatozoto de 2.^a ordem com 6 chromosomas, em *a* 3 autosomas no equador do fuso e 1 chromosoma na extremidade inferior do mesmo.
- FIG. 49 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Em *a* ovocito encravado em uma area testicular.
- FIG. 50 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Em *a* zona de degeneração. Em *b* zona de transição. O espaço compreendido entre *a* e *b* é uma area testicular.

C — *Fecundação e desenvolvimento embryonario no hermaphrodita*

- FIG. 51 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Ovulo fecundado, mas tendo os 2 pronucleos juxtapostos em um dos polos do ovulo.
- FIG. 52 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de ovulo fecundado mostrando os 2 pronucleos, 1 delles com 5, outro com 6 chromosomas.
- FIG. 53 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de ovulo fecundado. As membranas dos pronucleos já desapareceram. Podemos contar 12 chromosomas.
- FIG. 54 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de ovulo fecundado com 11 chromosomas.
- FIG. 55 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Metaphase da 1.^a mitose de segmentação. Chamam a atenção os centriolos gigantes.
- FIG. 56 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de blastomero com 11 chromosomas.
- FIG. 57 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Desenho de 2 blastomeros, ambos com 12 chromosomas.
- FIG. 58 — Rã. — Allen-Feulgen. — 2 blastomeros, ambos com 24 chromosomas.
- FIG. 59 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — 1 blastomero com 22 chromosomas.

D — *Espermatogenese nas formas de vida livre*

- FIG. 60 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Em *a* testiculo de uma forma jovem de vida livre, no qual só existem espermatozotos.
- FIG. 61 — Carmim de Sémichon. — Desenho abrangendo a quasi totalidade do testiculo de um macho de vida livre. Em *a* espermatozotos jovens com grande nucleolo. Em *b* individualização dos chromosomas. Em *c* espermatozotos onde é facil vêr 5 tetrades e 1 chromosoma menor (chromosoma X). Em *d* formação de uma pilha resultante da juxtaposição dos chromosomas. Em 1.^a mitose de maturação preparado do animal total.
- FIG. 62 — Carmim de Sémichon. — Desenho mostrando 3 espermatozotos grandes, dos quaes um mostra uma tetrad apenas. Nos outros 2 vemos bem o inicio da separação entre o plasma claro (peripherico) e escuro e num delles as 5 tetrades e o chromosoma X constituido por 2 granulos. Preparado total.

- FIG. 63 — Carmim de Sémichon. — Desenho de metaphase de espermatocyto de 1.^a ordem. Na parte inferior da figura foram desenhados os chromosomas. Vemos ahi 5 tetrades (autosomas) e 1 chromosoma sem parceiro (chromosoma X). Preparado total.
- FIG. 64 — Carmim de Sémichon. — Desenho de anaphase da 1.^a mitose de maturação, o chromosoma X formado por 2 granulos está ainda situado no equador da cellula. Preparado total.
- FIG. 65 — Desenho de anaphase mais avançada que a da fig. 4. O chromosoma X já passou para uma das cellulas-filhas. Preparado total.
- FIG. 66 — Carmim de Sémichon. — Desenho mostrando 2 espermatocytos de 2.^a ordem e 1 espermatide. Um dos espermatocytos tem 5 e o outro 6 chromosomas (dyades). Preparado total.
- FIG. 67 — Gilson Petrunkevitch. Carmim de Sémichon. — Desenho onde vemos 1 espermatocyto de 1.^a ordem, 2 de 2.^a ordem, 1 espermatide e 1 espermatozoide (d). No espermatocyto de 1.^a ordem (a) é facil contar 5 tetrades formadas cada uma por 4 granulos e 1 chromosoma bivalente (chromosoma X). Nos espermatocytos de 2.^a ordem (b) e (b') vemos os chromosomas todos bivalentes; em um delles 5 (b), no outro em numero de 6 (b'). A espermatide (c) mostra bem a separação entre o plasma claro e o escuro. Preparado total.
- FIG. 68 — Carmim de Sémichon — Desenho que mostra 1 espermatocyto de 1.^a ordem, 1 espermatide com 6 chromosomas. onde ainda não se vê a separação entre os 2 plasmas (claro e escuro), 2 espermatozoides, ambos com 5 chromosomas e varios residuos de plasma escuro. Preparado total.
- FIG. 69 — Allen Feulgen. — Espermatocytos no inicio da prophase da 1.^a mitose de maturação. Em a o X-chromosoma já individualizada junto à membrana nuclear o resto da chromatina com o aspecto leptonema.
- FIG. 70 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica* — Em a espermatocyto mostrando a centrotokia.
- FIG. 71 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Em a pachynema, em b synapsis.
- FIG. 72 — Allen Feulgen — Em a diplonema, b e c — tetrades.
- FIG. 73 — Allen Feulgen — Desenho de espermatocyto mostrando em a o X-chromosoma encortado á membrana nuclear e no interior do nucleo as 5 tetrades, cada uma das quaes é constituida por 4 granulos.
- FIG. 74 — Allen Feulgen — Mostra um espermatozoide com 5 chromosomas.
- FIG. 75 — Allen Feulgen — Mostra um espermatozoide com 6 chromosomas.

E — *Alguns outros phenomenos observaveis na geração de vida livre*

- FIG. 76 — Allen Feulgen — Desenho de prophase de mitose somatica em um macho de vida livre mostrando 22 chromosomas.
- FIG. 77 — Gilson Petrunkevitch. Carmim Sémichon. — Desenho de um preparado total de uma femea de vida livre. Vemos uma cellula com 12 chromosomas (2 bipartidos).

- FIG. 78 — Allen Feulgen — Desenho mostrando em *a* ovocyto, em *b* espermatozoides no corpo da femea.
- FIG. 79 — Gilson Petrunkevitch. Carmim de Sémichon. — Preparado total. Desenho de ovulo (contido no corpo de uma femea) apresentando 18 chromosomas.
- FIG. 80 — Preparado a fresco — Femea contendo numerosos ovulos.
- FIG. 81 — Preparado a fresco — Femea reduzida ao revestimento de chitina e contendo 3 larvas.
- FIG. 82 — Como 81 — Femea com 2 larvas.
- FIG. 83 — Como 81 — Femea com 1 larva.

F — *Estudo de um hermaphrodita jovem*

- FIG. 84 — Allen. *H. ferrica*. — Aspecto geral de um hermaphrodita jovem mostrando em *a* a zona testicular, em *b* o receptaculo seminal, em *c* e *d* os 2 uteros cada um dos quaes contem apenas alguns ovos.
- FIG. 85 — Allen. *H. ferrica*. — Aspecto geral de uma forma adulta de *Rhabdias*, mostrando o grande numero de ovos em evolução no utero.
- FIG. 86 — Allen. *H. ferrica*. — Zona testicular de *R. jovem* encravada entre 2 ovocytos. Em *a*, parte superior do testiculo (espermatozytos).
- FIG. 87 — Allen. *H. ferrica*. — Limite superior da zona testicular da fig. 86. Vêem-se, debaixo do ovocyto, 2 espermatozytos de 1.^a ordem (phase diplotena), enchendo toda a largura do tubo espermatico.
- FIG. 88 — Allen. *H. ferrica*. — Limite inferior da zona testicular da fig. 86. Em *a*, espermatozoides ao contacto de um ovocyto de aspecto normal (semelhante ao que forma o limite superior da zona testicular (Vide fig. 87).
- FIG. 89 — Allen. *H. ferrica*. — Zona testicular (*a*) e receptaculum seminis (*b*), situados na extremidade posterior do corpo da *Rhabdias*.
- FIG. 90 — Allen. *H. ferrica*. — Desenho mostrando em I. zona testicular e receptaculo seminal (*a*) cheio de espermatozoides. Na zona testicular vêem-se bem: ovocyto que limita inferiormente a zona testicular (*b*), espermatozoides (*c*), espermátides (*d*), espermatozyto de 2.^a ordem em mitose (*e*), espermatozyto de 1.^a ordem em mitose (*f*) (visto de face), espermatozytos na prophase da 1.^a mitose de maturação (*g*), ovocyto que limita em cima a zona testicular (*h*). Em II. foi desenhada toda a extremidade inferior do animal. Legendada como em I. intestino contendo sangue digerido (*g*).

G — *Ainda ovogenese e a espermatogenese no hermaphrodita*

- FIG. 91 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Forma hermaphrodita adulta mostrando insinuação de espermatozoides entre os ovocytos.
- FIG. 92 — Gilson Petrunkevitch. *H. ferrica*. — Forma hermaphrodita adulta mostrando ovocytos jovens e entre elles 2 (dos quaes 1 indicado em *a* com nucleo pycnotico e semelhantes aos que se vêem nas zonas de degeneração (fig. 50 e 25).

A B S T R A C T

The A. studies the chromosomal cycle and the sex determination of the Nematode *Rhabdias fülleborni* Trav., 1926, a species close to *Rhabdias bufonis* (Schrank, 1788) Stiles and Hassal, 1905, in which the chromosomal cycle has been studied by Boveri and by Schleip and whose results differ in some points. Schleip, the only one who carried out a minutely cytological work, just dealt with the parasitic form.

The 1st. Chapter is a synthesis of what has been seen by those two Authors, references being also made to Schaake's work, which was not a cytological one.

The 2nd. Chapter exposes the statements made by the A. and includes 4 parts.

In the *first part* is studied the hermaphroditical form. The biological cycle of *R. fülleborni*, studied by Travassos, is quite superposable to that of *R. bufonis*, studied by Leuckart and Metschnikoff: In the lungs of the batracians there are only female-looking animals, in whose gonads however there are zones where spermatozoids are formed. The larvae emigrate to the exterior medium where they furnish males and females.

The infesting larvae issued from these then penetrate in the host in whose lungs they fix themselves and re-start the cycle. In this first part the following questions are successively studied:

I) *Material and technique for the study of the hermaphrodite*: The animals living in the lungs of the toad (*Bufo marinus*) and of the frog (*Leptodactylus ocellatus*) are obtained by simple shaking of the lung in physiological water. Fixing has been made in several fixatives, specially in Gilson-Petrunkewitch, Bouin-Allen, Carothers and strong Flemming. Inclusion by mixed procedure, celloidin-paraffin, according to Peterfi, sections of 5 to 15 μ . Staining by ferric-hematoxylin or Feulgen. Fixing-staining in toto by Sémichon carmine has also been used.

II) *Ovogenesis*: We can distinguish 4 zones in the ovary:

A) The *germinative zone*. Fig. 1 shows the initial cell of the gonad, with its vacuolated cytoplasm, probably a cell of the wall of the ovary. Then we find the ovogonia (Fig. 2), whose limits are seen with difficulty, after which the cells dissolve into a syncytium. We can see on Fig 3 the transition of the germinative zone into that of synapsis and still observe the syncytium and in its center the rachis, which, according to Schleip, could already be seen in the beginning of the gonad. The ovogonia show quite a number of mitosis in the germinative zone. There are 12 chromosomes and no constant size differences can be established between them, nor any definite relation to the nucleolus.

B — *Synapsis zone*. — The prophase of the first maturation mitosis does not show here the complicated aspects so often shown by the chromatine in other cases. Fig. 5 and 6 show nuclei already in synapsis and in its interior we can see quite well the nucleolus and the synapsed thread condensing in the center of the nucleolus. The synapsis is in this case of the synzesis type (compact mass).

C — *Growing zone*. — Fig. 7 shows the pachytene aspect of the chromatine (double filaments). Sometimes we find between those nuclei others with a pycnotical appearance (Fig. 92), probably degenerating. On Fig. 8 we observe the appearance of septa which, starting from the wall of the ovarian tube, progressively individualise the ovocytes and on Fig. 9 we have a conjunct view of this progressive separation: under *a* the syncytium, under *b* there appear the sulci, under *c* the ovocytes are already individualised. Thus we see that here individualisation of ovocytes is not primarily 2 by 2 as it has been described by Schleip. In the following the ovocytes increase their volume, both of the nucleus and of the cytoplasm. Fig. 10 and 11 show the complicated aspect assumed by the chromatine (strings which in some places show a double structure).

D — *Maturation zone*. — We assist now at the individualisation of the chromosomes (Fig. 12), 6 in number. On Fig. 13 and 14 we see the already formed tetrads. On Fig. 13 five tetrads have been reached by the section; two of them are close to the nucleolus, on Fig. 14, where the 6 are seen, not one stands into relation with the nucleolus. Fig. 15 represents a preparation where it was quite clearly seen that every tetrad is formed by 4 elements. Fig. 16 shows under *a* the spindle of the first mitosis and under *b* the spermatozoid with 5 chromosomes. The extrusion of the polar globules does not present anything particular. The initially central spindle (Fig. 15) dislocates itself progressively (Fig. 17) towards the surface of the ovocyte. The 4 elements of each tetrad become condensed (Fig. 17). Fig. 18 shows the anaphase of the first maturation mitosis. The extrusion

of the first polar globule is followed by that of the second. Fig. 19 shows under *a* the spindle of the 2nd. maturation mitosis and under *b* the first polar globule. Fig. 20 is an anaphase of the 2nd. maturation mitosis and Fig. 21 show the 6 univalent chromosomes which remain in the ovule.

In one case (Fig. 22) 24 chromosomes could be counted in the spindle of the first maturation mitosis. (The 4 elements of each tetrad being precociously separated.) Fig. 23 shows another case where one of the 6 tetrads was far away from the other 5.

III. — *Spermatogenesis*. — The testicular zones have been found under the synapsis zone. It has not been possible to determine exactly how often one ovary forms testicular zones. Never more than one testicular zone has been found for one ovary and very often none. In 33 hermaphrodites, cut in series for the special purpose of counting the testicular zones, only 19 testicular areas were found and only once 2 areas for the same animal (1 in each ovary). Obviously, if in the ovary there is a testicular zone being formed and if there are spermatozooids in the corresponding seminal receptaculum, we may admit that formerly another testicular zone existed in said ovary, afterwards transformed into the spermatozooids of the receptaculum. It is therefore certain that 1 ovary can furnish 2 testicular zones. It may even furnish more? We are not able to affirm it.

Now about spermatogenesis: There are no spermatogonia, the first cells of the seminal lineage which appear being spermatocytes, issued from ovogonia which instead of growing into oocytes grow less and furnish spermatocytes. Since there is no multiplication period in the spermatogenesis, we may distinguish in that study: (1st.) growing period; (2nd.) maturation period; (3rd.) spermiogenesis.

A) *The appearing of the spermatocytes and the growing period*. On Fig. 24 we see the first sketch of a testicular zone, smaller cells than those which surround them, less chromophile cytoplasm; therefore, even with a feeble magnification we distinguish at once the clearer looking testicular zone (Fig. 25). On Fig. 26, which is a strong magnification of Fig. 24, we distinguish sharply another symptom which allows easily to identify the spermatocytes; the presence of 1 or 2 chromosomes very soon individualised; we see under *a* that such a chromosome is contained in a plasmosome, which does not occur in *R. bufonis* (Schleip). Even if the prophase of the first maturation mitosis is not so rich in this case as regards to complicated appearances of the chromatine as it happens in other cases, some interesting aspects may nevertheless be seen: The chromatine passes from the pachytene aspect (27a) to the diplotene (27b). The chromosomes are seen, in form of a ring, of a cross, of an Y, of chinked small rods, etc. (Fig. 29). On Fig. 28 we see in 1 chromosome the zone of spindle-atta-

chment (primary constriction), corresponding to a median attachment. On Fig. 30 (Allen-Feulgen) we see very clear, on the metaphasic chromosomes, the quadripartite condition, invisible in this phase by other methods.

B) — *Maturation*. — The number of chromosomes existing at the end of the prophase of the first maturation mitosis is the same as in *R. bufonis* (Schleip, Boveri), i. e. 7. We made a lot of preparations by the Feulgen method, so that we are sure not to confound chromosomes with nucleoli. Fig. 31 to 34 show this quite clearly. On Fig. 31 we recognise 5 big chromosomes (tetrads) and 2 small ones placed on the center (X-chromosomes). The cause of the existence of those 7 chromosomes is simply the following: the autosomes, as it happens commonly, united themselves in order to form bivalent chromosomes (tetrads), the same thing not happening to the X-chromosomes, which remained isolated. Fig. 35 shows the anaphase of the first maturation mitosis, it being noticeable that there was no retardment of chromosomes, contrarily to what has been observed by Schleip and accordingly to what has been described by Boveri on account of *R. bufonis*. Only twice, among numerous observations, we saw a chromosomal retardment at this first mitosis (Fig. 36 and 37). Nevertheless, there is no likeness at all between such a retardment, which seems to be an accident in the distribution of chromosomes, and the images furnished by Schleip. Only once we observed an anomaly, visible on Fig. 38. It happens to be the metaphase I, where there are 2 small chromosomes displaced and going together to one of the daughter-cells.

The second maturation mitosis is exceedingly interesting, because as already observed by Schleip and Boveri the formation of two sorts of spermatozoids is due to it, with 5 or 6 chromosomes, respective factors of the males and females of the next generation. It is not necessary to describe the behaviour of the autosomes, as it is all alike that we may observe on any other spermatogenesis. The same thing does not happen with the sexual chromosomes. Boveri and Schleip agree that in this division the X-chromosomes — contrarily to what they have done during the first mitosis — do not divide themselves and pass retarded, as regards the autosomes, to the 2 daughter-cells. According to Boveri they can act in two ways: a) they pass both to one of the daughter-cells, giving spermatids with 5 and 7 chromosomes, these being doomed to degenerate; b) they pass each one to one daughter-cell, furnishing spermatids with 6 chromosomes. According to Schleip the behaviour of the hetero-chromosomes is completely different: one of them, though being retarded, reaches the companions, giving one spermatid with 6 chromosomes, while

the other stays in the region which will be eliminated during the spermiogenesis and therefore the corresponding spermatozoid shall have 5 chromosomes only. Our studies on *R. fülleborni* showed us that on this animal there is also a retardment of the hetero-chromosomes (Fig. 39 and 40) and that on account of the ulterior behaviour of these chromosomes we may observe 3 alternatives: a) Boveri's *b* type, (Figs. 41 and 42); b) the type described by Schleip (Fig. 43) and c) a third type, the rarest one (the Schleip type being the most frequent), represented on Fig. 44 and in which the 2 X-chromosomes remain in the separation zone of the daughter-cells giving 2 spermatozoids, both with 5 chromosomes. We never found Boveri's *a* type.

C) *Spermiogenesis*. — Here, as it generally happens to *Nematodes*, the phenomenon is quite simple, merely consisting in the extrusion of a certain amount of cytoplasm of the spermatid ("Restkörper"). Whenever the mechanism of Schleip is observed, one of the two residual bodies will have 1 chromosome and however in the mechanism described by us there will be 1 chromosome in each one of the two residual bodies. That is what is seen on Fig. 45. The counting of the chromosomes in the spermatozoids, which Schleip has not done and which was done by Boveri, has been possible in favorable cases (fix. in Allen and specially Fleming). On Fig. 46 (Allen-Feulgen) we see under *a* a spermatozoid with 6 chromosomes and under *b* with 5.

We suppose that the number of spermatozoids of the 2 types is nearly the same, in accordance to the fact that in the free life cultures nearly the same number of males and females has been found (statistics on page 47). The size of the spermatozoids is nearly the same. Fig. 47 shows the outlines of 22 spermatozoids.

Fig. 48 *b* shows a spermatocyte of first order with 6 chromosomes (and not 7) and under *a* we see 3 autosomes plus 1 chromosome displaced, near to the centriole. Probably the cell with 6 chromosomes presented the same anomaly and therefore the 7th. chromosome was out of sight on the equatorial plane.

Fig. 49 shows a testicular area and under *a* an adult ovocyte. Fig. 25 *a* and 50 *a* show the so-called zone of degeneration, so minutely described by Schleip, we never see it as extensive as it was described by Schleip.

Fig. 91 shows the spermatozoids formed by a testicular zone, entirely transformed in themselves, wandering between the ovocytes towards the seminal receptaculum.

IV. *Fecundation and embryony development.* — Nothing special has been observed about that matter on *R. fülleborni*. The copulation of the pronuclei happens in one of the poles of the cell (Fig. 51). Chromosomes can be counted, there being eggs with 12 chromosomes (Fig. 53) and others with 11 (Fig. 52 and 54). Fig. 55 shows the first segmentation mitosis. The chromosomes remain entire in the blastomeres which will furnish the sexual cells while in the others each one is broken into 2. Fig. 56 shows a blastomere with 11 chromosomes. On Fig. 57 there are 2 blastomeres, both with 12 chromosomes. Due to this image we thought that here as well as with *R. bufonis*, fragmentation of chromosomes in the somatic cells only starts during the third segmentation mitosis and not during the second, as it happens with *Parascaris equorum*. Fig. 58 shows 2 somatic blastomeres, each one with 24 chromosomes, while on Fig. 59, 22 chromosomes can be counted in a mitotic blastomere.

11 and 22 chromosomes are counted in the future males, while 12 and 24 in the future females.

We never saw chromosomal retardment nor notorious differences in their size in the segmentation mitosis.

2nd. Part. — *The free-life generation.* — In this part the following questions are studied:

I. — *Material and technique for the study of the bisexual generation.*

a) Obtaining of the free-life generation cultures. — Several techniques have been tried out. It is not advisable to start from faeces, because besides containing sand, which difficultates the following operations, they may contain other Nematodes, thus rendering uneasy the interpretation of preparations, specially of sections. For that reason we always started from the pulmonary forms. Several mediums have been tried solids: agar, or agar covered by a liquid-film of water; half-solids: agar, gelatin, liquids: water, physiological water, with a fragment of the viscera or blood. Finally we simply preferred the physiological water, placed in Petri's dishes where the hermaphrodits were removed to. The whole was placed in a bigger dish containing a bit of water and covered by a lid. Sometimes a little bit of the physiological water was substituted daily by plain water. As a rule the culture became very rich of free-life forms between the 2nd. and the 6th. day. The infesting larvae appeared around the 8th. day.

The material has been studied on the way of two methods: a) *Examinations in-toto.* Very easy process. All you have to do is to remove some culture portions with a Pasteur's pipet into he-

molysis tubes containing Sémichon's carmine. You can also fix it previously in Gilson-Petrunkewitsch for half an hour, centrifugate, wash in dilute alcohol and stain with Sémichon's carmine. — b) *Sections*. The fixatives used were Gilson-Petrunkewitsch, Allen, Flemming. For the inclusion we used the process of Caullery and Chapellier, the material to be fixed removed into a glass tube closed by Müllergaze.

The inclusion was made following the mixed celloidin-paraffine process of Peterfi, in the glass tube itself. Serial sections from 5 to 15 μ . Staining with ferric-hematoxylin or Feulgen.

II. — *Spermatogenesis*. — The multiplication period could not be observed as the quite young forms already present a gonad constituted by spermatocytes (Fig. 60 a). For the study of the general evolution of the spermatogenesis we used the preparations in-toto. The sections were only used to clear some cytological trifles. The free-life forms are small and well transparent, even after being stained with carmine (specially the males).

Fig. 61 shows nearly the whole testicle (only the final portion has not been included in the drawing). Under *a* we see young spermatocytes, with a voluminous nucleolus, under *b* one can observe the progressive individuation of the chromosomes which afterwards will go on shortening in order to constitute the tetrads. The *c* cell shows 5 tetrads and 1 much smaller chromosome, formed as a granulation. Under *d* the chromosomes present themselves piled up. This piled-up form has been observed frequently. Under *e* division of a first class spermatocyte into 2 second class ones. Fig. 62 shows 2 first class spermatocytes, each one with 5 tetrads and a smaller chromosome. There is 1 spermatocyte where only 1 tetrad is seen (degenerating cell?).

All the above stated is in accordance with the already emphasized fact that there are 11 chromosomes in the free-life male, i.e., 5 pairs of autosomes and 1 X-chromosome.

Fig. 63 represents a metaphase of the first maturation mitosis. The chromosomes have been drawn below. We see the 5 tetrads and 1 unpaired chromosome. Fig. 64 and 65 are anaphases of the first maturation mitosis and they show that the X-chromosome passes retarded into only one of the 2 second class spermatocytes. Fig 66 shows the 2 types of second class spermatocytes (with 5 and 6 chromosomes), as well as 1 spermatid. On Fig. 67 we see 1 second class spermatocyte (a) in which each one of the 5 tetrads is constituted by 4 elements and the sexual chromosome is formed by 2 granules only; under *b* and *b'* there are 2 second class spermatocytes, respectively with 5 and 6 chromosomes, all bipartite (dyads); *c* is a sperm-

atid with 5 chromosomes and an extensive dunkelplasma zone and *d* is a spermatozoid with 5 chromosomes. To be noticed on Fig. 61, 62 and 67 that the individualisation of the dunkelplasma begins already in the first class spermatocyte. Fig. 68 shows a big cell (first class spermatocyte); a dark cell with 6 chromosomes which is a spermatid still with the dunkelplasma (here the separation of the dunkelplasma did not yet happen and therefore said separation is a phenomenon which may occur sooner or later); there are besides 2 spermatozoids with 5 chromosomes and rests of the cytoplasm of the spermatid eliminated during the spermiogenesis (dunkelplasma).

Up to this point we just analysed in-toto preparations. Some sections may now follow: Fig. 69 shows young spermatocytes where the X-chromosome presents itself already individuated and placed close to the nuclear membrane, while the autosomes are in the leptomena phase. On the preparation one could see that the filaments were double, what did not appear clearly on the microphotography. Fig. 70 shows the pachynema aspect with centrotaxy (invisible centriole). On Fig. 71 *a* still the pachynema and under *b* already advanced synapsis with nuclear area empty of chromosomes. On Fig. 72 *a* diplonema, under *b* and *c* already condensed tetrads, ready for the diakinesis. Fig. 73 is a drawing of spermatocyte I with the X-chromosome (*a*) close to the nuclear membrane and the 5 tetrads, each one formed by 4 elements. The microphotographs 74 and 75 show 2 spermatozoids with 5 and 6 chromosomes. In order to find out the proportion between the 2 types of spermatozoids we were able to observe 32 times 5 chromosomes and 40 times 6 chromosomes. Fig. 76 shows a prophase in a somatic mitosis of a free-life male, in which we could record 22 chromosomes, what surely shows that the beings issued from eggs containing 11 and 22 chromosomes, are males.

III. — *Ovogenesis and other phenomena observed in the free-life forms.* — Unfortunately free-life ovogenesis could not be studied properly. The technique of the in-toto examinations, so easy and adequate for the study of the spermatogenesis is not fit for the study of the ovogenesis. The eggs become quite opaque and for that same reason said technique is not the proper one to study fecundation and segmentation. We hope to clear said questions later on, using the section method. Let us just analyse some figures: Fig. 77, representing a very young female, shows 12 chromosomes (2 of which bipartite) in 1 ovogonium, and that means that the eggs with 12 chromosomes transform themselves into females. Fig. 78 shows inside a female, next to the oocyte (*a*) the seminal receptaculum containing spermatozoids in which the chromosomes could not be counted. Fig.

79 shows a fecundated egg in which 18 chromosomes could be counted (dispermy?)

Be it next emphasized that the larvae leave the egg inside their mothers body, move in it and nourish themselves at its expense and at the expense of the other eggs existing in its interior, because Fig. 81, 82 and 83 show females from which only the chitinous membrane is left and containing respectively 3, 2 and 1 infesting larvae. Now, as on Fig. 80 we see that in a female there are lots of eggs, the conclusion is that they are devoured by the first born larvae. These are therefore matricide and fratricide larvae. The number most frequently found was that of 2 larvae in each female, what is easy to understand as each of them represents the first larva born in each ovary. Females with a single larva may be explained by a more precocious development of one of the ovaries, while 3 larvae are probably due to the fact that in one of the ovaries 2 larvae left the eggs more or less at the same time. Yet only direct observations may really explain the phenomenon.

3rd. Part. — Some special problems. — I. Proterandric or proterogynic hermaphroditism? — In the adults in which testicle and ovary co-exist one cannot know which one appeared first. The A. had the opportunity to observe a quite young pulmonar from (Fig. 84), what can be clearly seen by comparing the number of eggs contained in the wombs of said form with the quantity existing in those of an adult one (Fig. 85). Fig. 86 shows with great cleanness a testicular zone of said young form. The seat of this testicular zone can be well seen on Fig. 84 *a* and 89 *a*. Said testicular zone presented a peculiarity worth mentioning and which distinguishes her from the testicular zones found in the adult forms. Fig. 87, which is a bigger magnification of 86 *a*, shows the beginning of the testicle and above it an ovocyte. One sees that 2 spermatocytes fill the whole breadth of the testicular zone and this is another proof that the testicular zone is that of a very young animal, as the testicular zones of the adult forms nearly always present a much greater number of spermatocytes (Fig. 50, 25 and 27). This upper zone presents nothing special, besides its narrowness. The same thing does not happen with the lower zone (86 *b* and 88, which is this lower zone, seen with a bigger magnification). Here is omitted the degeneration zone which should exist, as it is a testicular zone where there are already spermatozoids (88 *a*), comparable for example to those of Fig. 50 and 25. Why is omitted that degeneration zone, so well described by Schleip on account of *R. bufonis*? The A. analyses carefully the serial sections; the 2 more interesting ones have been drawn on Fig. 90 in which 90 I is the section the micropho-

tographs of which we just described. There was a fold, so that the gonad fragment, included between 90 I *b*, the lower limit of the testicular zone [showing one ovocyte (*b*) and spermatozooids (*c*)], and the seminal receptaculum (*a*) full of spermatozooids was not contained in the section. However, the serial sections showed that there was no degenerative symptom, what can already be found out in view of the absolutely normal aspect of the ovocyte *b*. The examination of the following section (90 II) show, on the other hand, some spermatozooids (*c*) surrounding the ovocyte and which most probably went to the seminal receptaculum situated below. The A. is therefore led to formulate the following hypothesis: Said spermatozooids shall fecundate the first ovocytes which, although born before them, will mature only after the spermatozooids mentioned may already exist. The necessity of explaining how the fecundation of the first ovocytes may happen was one of the arguments on behalf of the presumption that spermatozooids might be formed before the ovules. One could also suppose that the spermatozooids contained in the receptaculum of said young form might have issued from a testicular zone constituted before them, which is seen in our figures. This does not seem to make sense as — a) the nonexistence of the degenerative zone in the young testicular zone found by us could not be explained; b) the testicular zones formed during its whole life by a parasite are quite few, as we have seen. Schleip thinks that there are no more than 3 testicular zones for each ovary and our observations are in accordance with such a supposition. Therefore it is not natural that in so young an animal as the one we found, another testicular zone could have existed before the already existing one. Thus the spermatozooids formed by this first testicular zone would go down between the ovocytes placed below them and would fecundate them at their arrival at the receptaculum and for that reason there is no degeneration zone here. When later on a new testicular zone is formed, the spermatozooids formed by the first zone shall fecundate all the ovules formed on this side of the second zone, which will just have to assure the fecundation of the following ovules, and that is why in this second testicular zone there is the degeneration zone which separates said spermatozooids from the rest of the gonad placed below. This does not hinder that later on, after the degeneration zone having disappeared by means of an unknown mechanism, we may be able to see the spermatozooids of an adult *Rhabdias* insinuate themselves between the ovocytes and go forward to the receptaculum (Fig. 91). However, there is a difference between this insinuation of spermatozooids of a testicular area already completely transformed into spermatozooids, and that what we found

on the young *Rhabdias*; for in this one the testicular zone presents all the cells of the seminal lineage and not only spermatozooids.

The opinions of Schneider, Nedkoff, Schleip and Schaake about the nature of the hermaphroditism of *Rhabdias* are than recalled. The most interesting opinions are those of Schleip who did not state positively, if in *Rhabdias* spermatozooids are formed earlier than ovules or not. Said A. describes a young form found by him in which he believed to observe a fact similar to the one just exposed above, therefore admitting that ovules are formed first, but immediately after said statement he says that *Rabdias* is a case of alternant hermaphroditism with previous production of spermatozooids (!). Schaake did an extensive experimental work and from the infestations he obtained he concluded that previously are formed male cells and only secondarily ovocytes. Schaake admits, however, that exceptionally ovocytes can be formed first. If we admit this opinion we may agree that the case we found corresponds to one of Schaake's exceptions.

On the following the A. argues if even admitting Schaake's point of view, the hermaphroditism of *Rhabdias* and other Nematodes may be called a proterandric one. He remembers the definitions of proterandric and proterogynic hermaphroditism given by Ziegler and Bresslau ("Zoologisches Wörterbuch") and by Goldschmidt ("The mechanism and physiology of sex determination") and concludes that we shall call a proterandric hermaphrodit the being in which the gonad begins by having spermatogonia and whose soma has a male aspect. Now this absolutely does not happen with *Rhabdias*, whose soma is admitted by all Authors as being a female one and whose first gonad cells are called by them ovogonia.

The A. emphasizes that it is very strange for an animal which as well by its chromosomical formule as by its internal secretions or other sex determining factors has been induced to acquire an absolutely female phenotype, to be led by these same factors to acquire a male gonad and only later on a female one, being thus a proterandric hermaphrodite.

He analyses next other Nematodes, also generally considered, as it occurs with *Rhabdias*, as proterandric hermaphrodites, but in which only spermatozooids are formed once, followed by a single formation of ovules (*Rhabditis aberrans*, for example) and in which Eva Krüger considers the first cells which are in the gonad as being ovogonia (about this question see the references in the text — Ziegler and Bresslau, Goldschmidt, Schneider, Maupas, Boveri, Eva Krüger, Rauther, Vandell, Schaake, — pags. 79 to 90).

The conclusion of the A. is the following: "Therefore it seems to us that *Rhabdias* is, like the other Nematodes we mentioned (exception made of the unusual and non-confirmed case of some exemplars of *Rhabditis elegans*), a *proterogynic hermaphrodite*, as it possesses a female soma and a gonad in which the first differentiating cells are ovogonia, and besides an *alternant hermaphrodite* as it forms several times successively ovules and spermatozoids. In short: an *alternant proterogynic hermaphrodite*".

II. — *Non-existence of males in the parasite generation.* — He confirms what has been observed on *R. bufonis* about the non-existence of males in the parasite generation. He examined more than 200 animals and never found a single male.

He analyses next the case of the close genus, *Strongyloides*, and shows the differences between both cases. Some references to the possible kinds of reproductions as regards Nematodes are made. He remembers that on other *Rhabdias*, parasites of snakes, males never have been found either. Here, however, a direct or mixed development has been observed in some cases, what never occurs with *R. bufonis* or *fülleborni*, parasites of amphibia. He insists upon the necessity of studying the spermatogenesis on *R* snake parasites, in order to try to clear up the problem of the origin of the 2 types of spermatozoids formed during the parasite generation, as one of them must be absent or at least not functional when development is direct. He mentions that he already started the study of said spermatogenesis, destined for a future work.

III. — *Some final considerations about the chromosomical cycle and the sex of the Rhabdiasidae.* — He shows that in the present work there have been studied: The mechanism of the formation of ovules and spermatozoids in the hermaphrodite; the number of chromosomes in both sexes; the reproduction of the hermaphrodite; the spermatogenesis in the free-life generation; the nature of the hermaphroditism of *Rhabdias* and other Nematodes; indication of the non-existence of males in the parasite generation; the formation of the infesting larvae and the analysis of the kinds of reproduction of the Nematodes.

He analyses now the alternancy of the generations, the part played by the spermatozoids with 5 chromosomes of the bisexual generation, the origin of the incomplete hermaphroditism (only gonadial) in a phenotypically female animal, all questions about which very few sure statements can be made at present.

4th. Part — *Conclusions.*

ERROS IMPORTANTES

	<i>onde está</i>	<i>leia-se</i>
pg. 30 l. 2	depois de amphibio acrescentar :	(Sapos — Bufo marinus, rãs — Leptodactylus ocellatus)
pg. 33 l. 9	rachison	rachis ou
pg. 33 l. 21	espermatogonias	ovogonias
pg. 39 l. 17	longos	largos
pg. 40 l. 2	fig. 26	fig. 25
pg. 42 l. 18	alto	lado direito
pg. 43 l. 6	que	que, de regra
pg. 45 l. 10	figs. 38 e 39	fig. 39
pg. 48 l. 22	Em a	Em b
pg. 48 l. 24	em b	em a
pg. 48 l. 25	2	3
pg. 68 l. 2	fig. a	fig. 84 e fig. 89-a
pg. 68 l. 10	de 2. ^a ordem	de 1. ^a ordem
pg. 68 l. 14	figs. 25, 27, 39, 50	figs. 25, 27, 50
pg. 69 l. 15	(a)	(90 I b)
pg. 70 l. 10	existencia	não existencia
pg. 71 l. 8	no maximo	no maximo (referimos aos casos comuns)
pg. 80 l. 4	proterogynicos	proterandricos
pg. 93 l. 34	e descendentes	e se desenvolver
pg. 97 l. 24	entrado	entranhado
pg. 99 l. 24	topar	tomar
pg. 111 l. 16	(Synezizezis)	(Synizezis)

Outros erros menos graves serão facilmente corrigidos pelo leitor

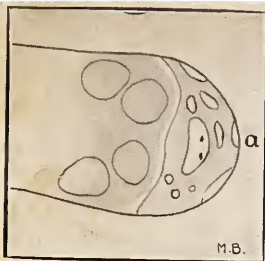


Fig. 1

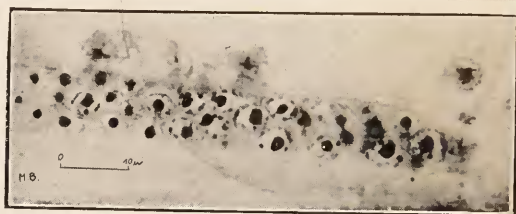


Fig. 2

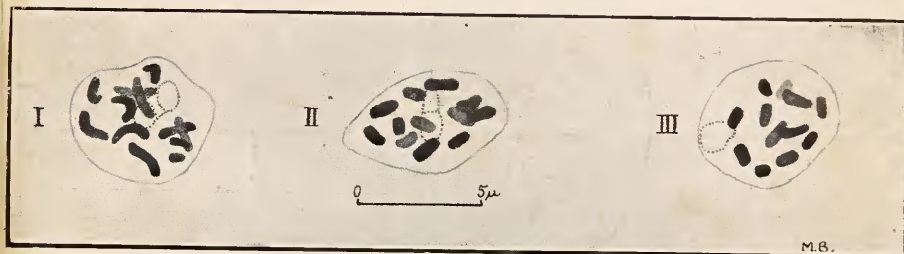


Fig. 4

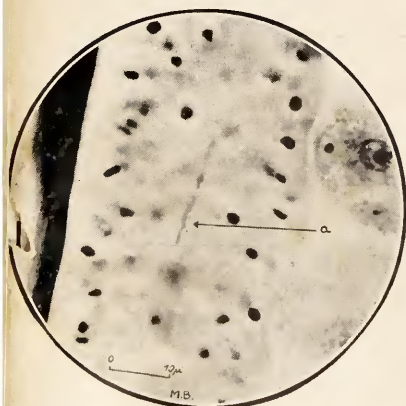


Fig. 3

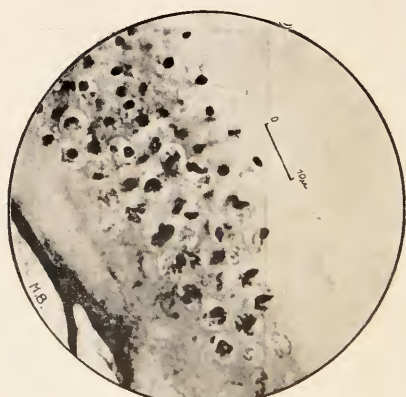


Fig. 5

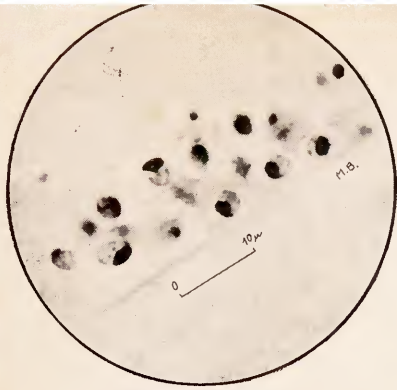


Fig. 6

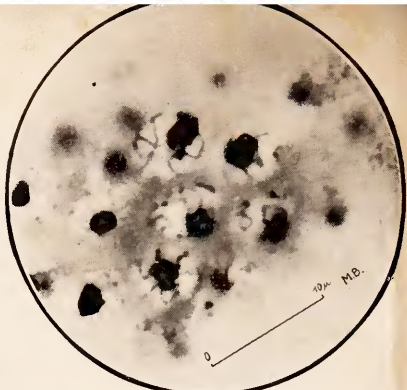


Fig. 7

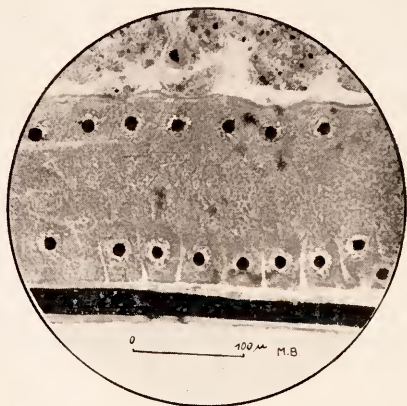


Fig. 8



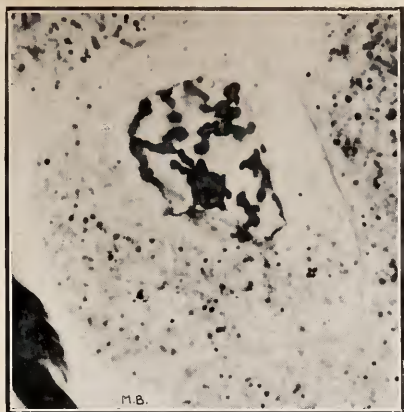


Fig. 10

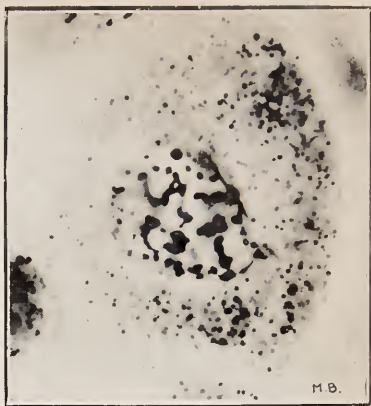


Fig. 11

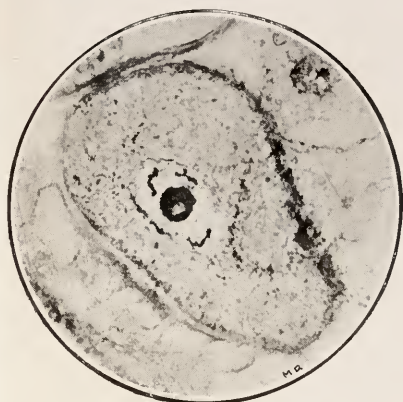


Fig. 12

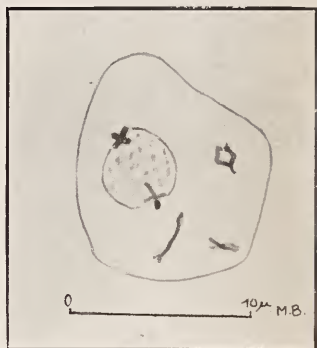


Fig. 13

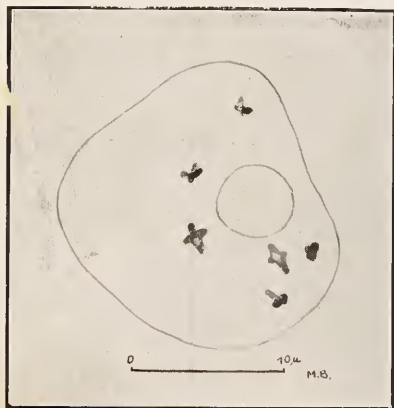


Fig. 14

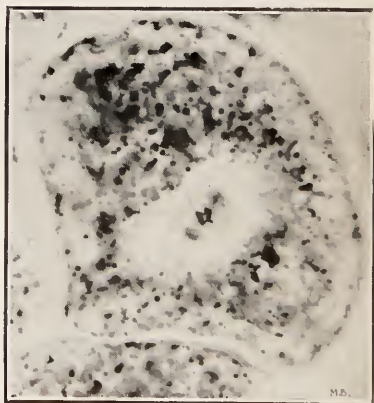


Fig. 15

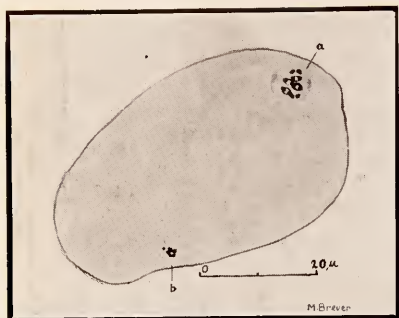


Fig. 16



Fig. 17

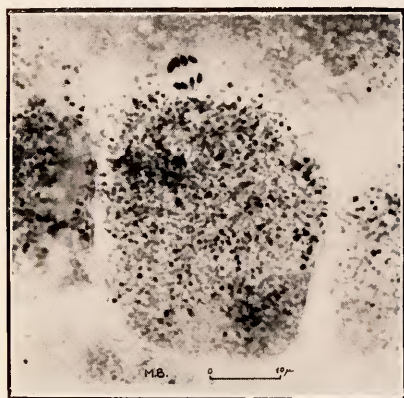


Fig. 18

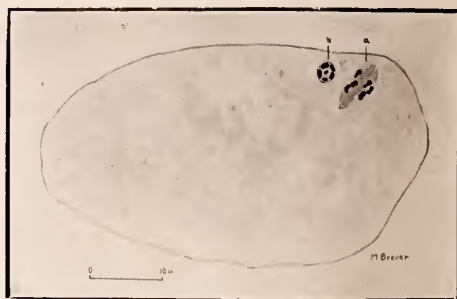


Fig. 19

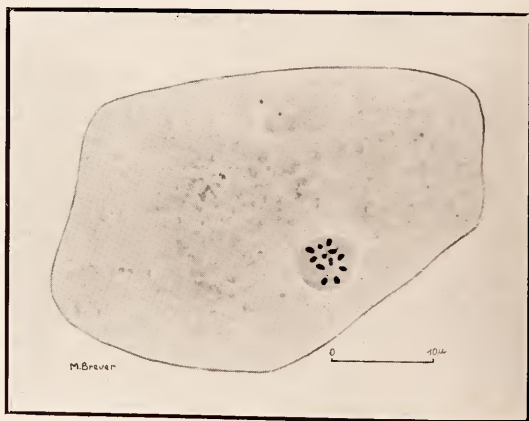


Fig. 20

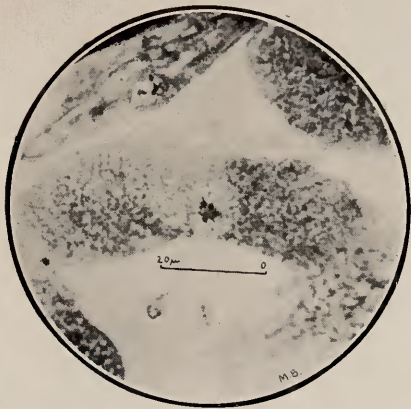


Fig. 21

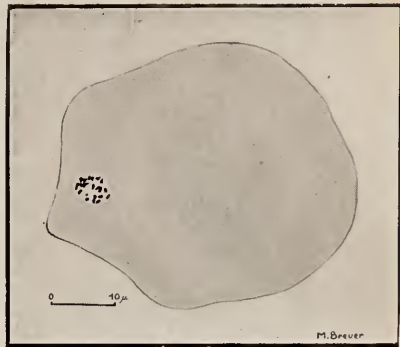


Fig. 22



Fig. 23

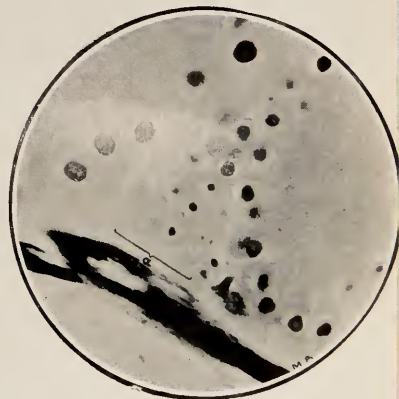


Fig. 24



Fig. 25

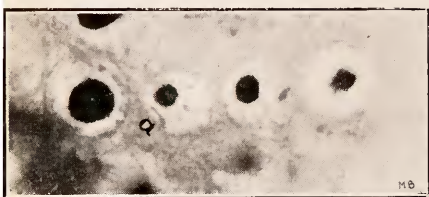


Fig. 26

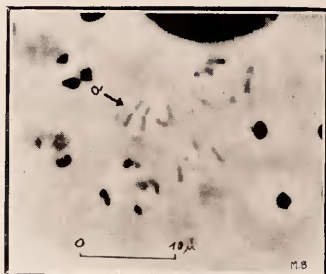


Fig. 28

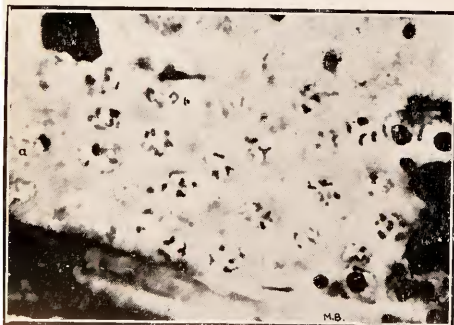


Fig. 27

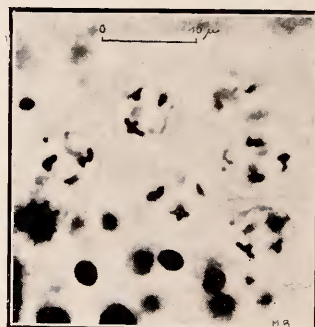


Fig. 29

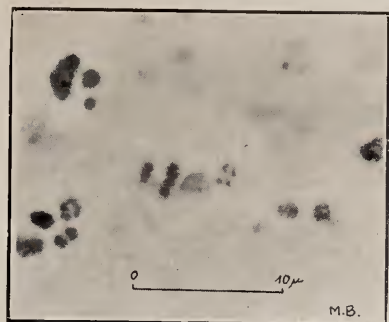


Fig. 30

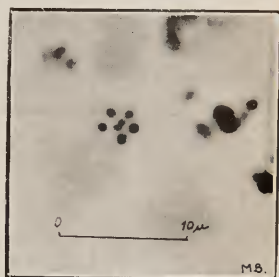


Fig. 31



Fig. 32

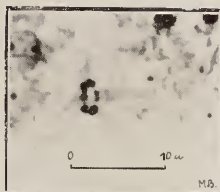


Fig. 33

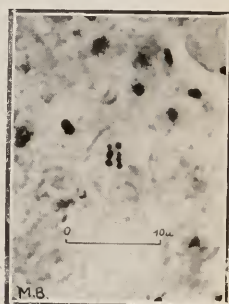


Fig. 34

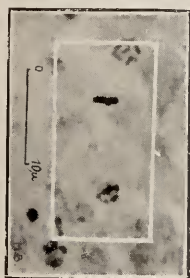


Fig. 35

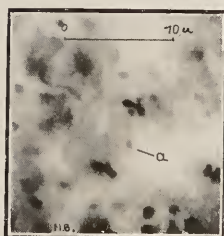


Fig. 36



Fig. 37

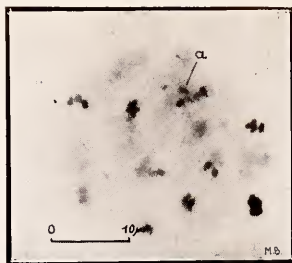


Fig. 38

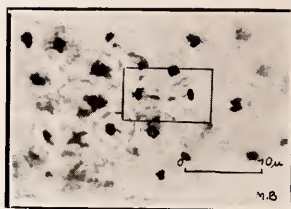


Fig. 39

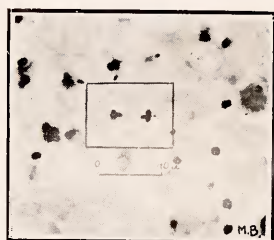


Fig. 41

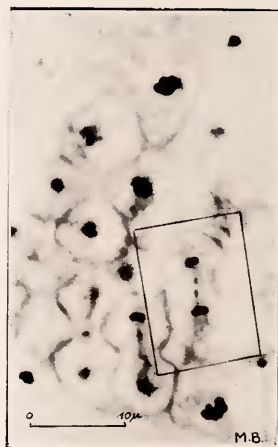


Fig. 40

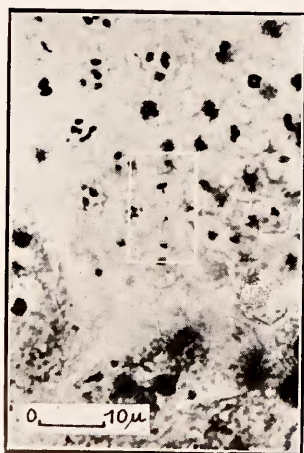


Fig. 43

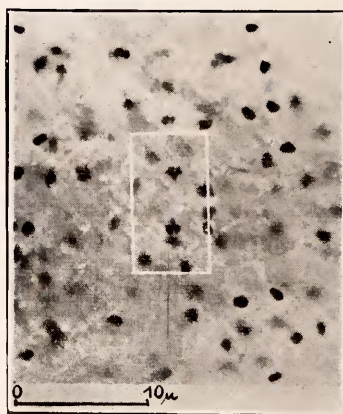


Fig. 42



Fig. 44

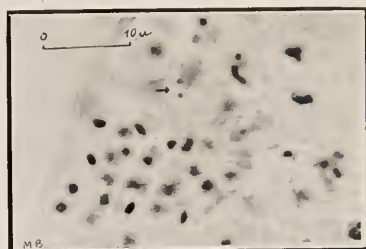


Fig. 45

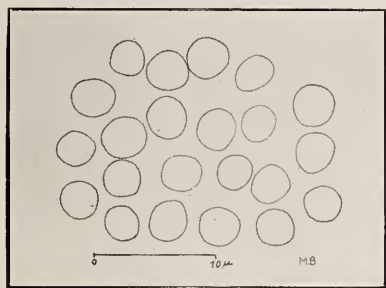


Fig. 47

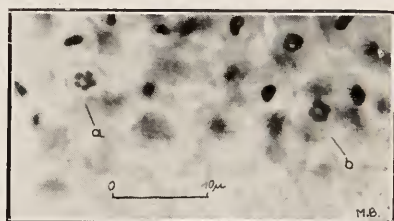


Fig. 46

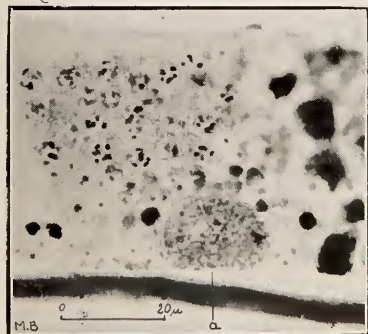


Fig. 49

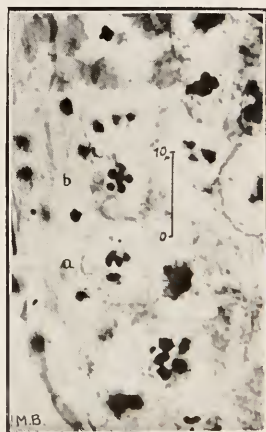


Fig. 48

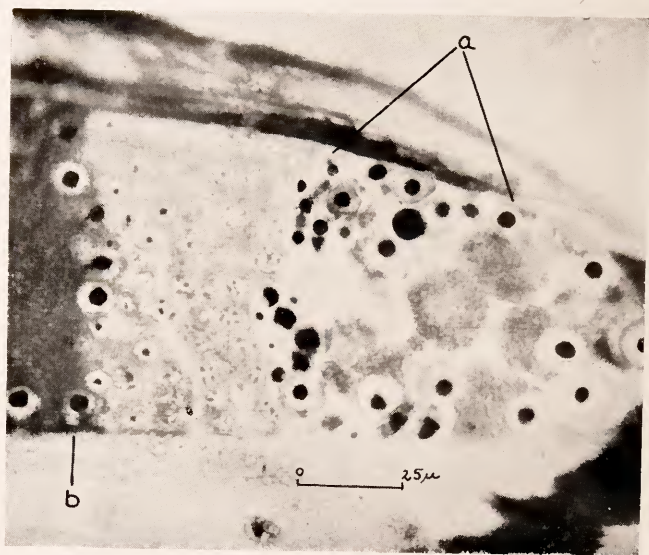


Fig. 50

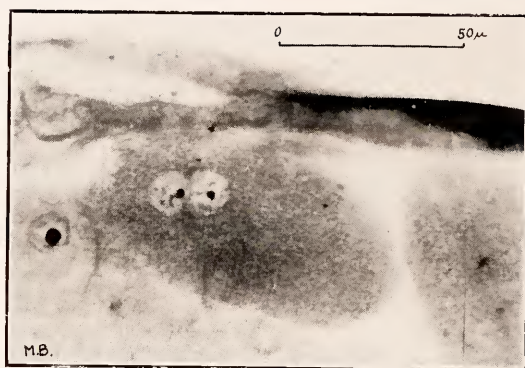


Fig. 51

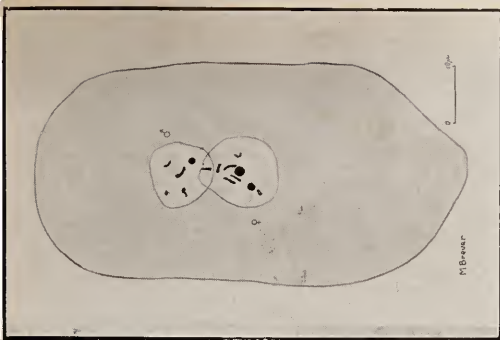


Fig. 52



Fig. 53

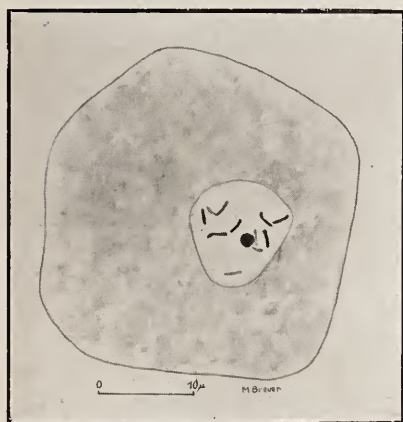


Fig. 56

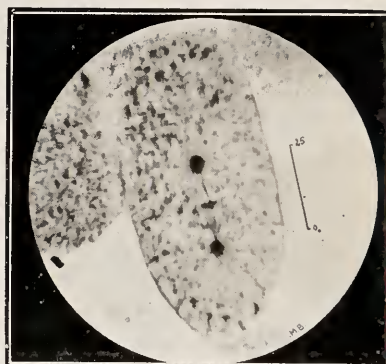


Fig. 55

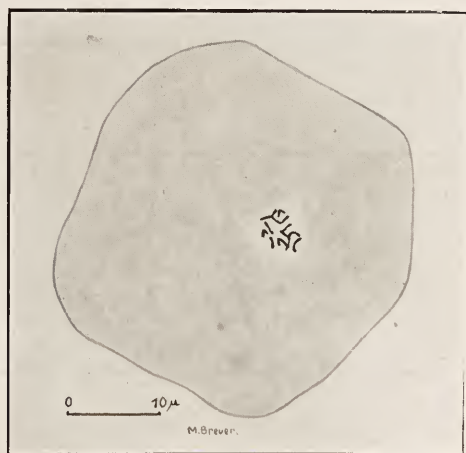


Fig. 54

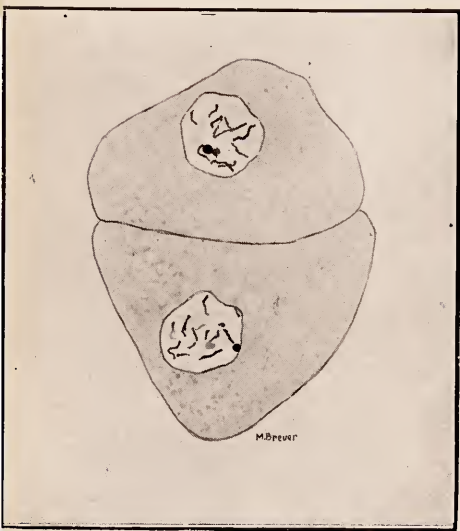


Fig. 57

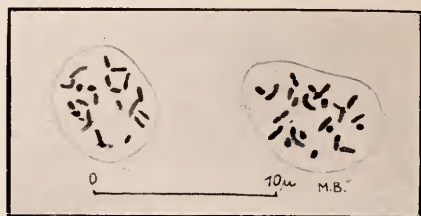


Fig. 58

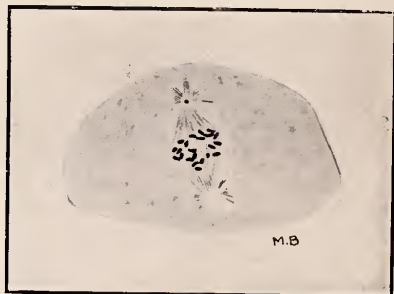


Fig. 59

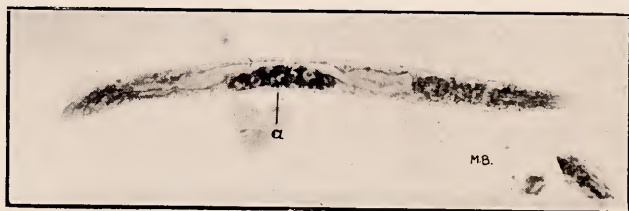


Fig. 60

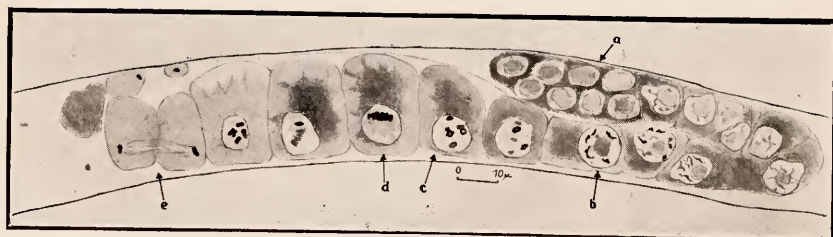


Fig. 61

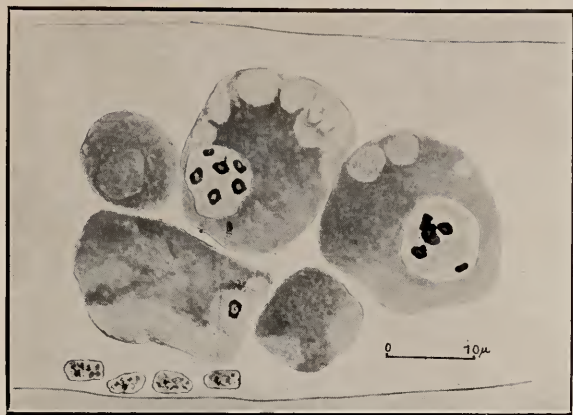


Fig. 62

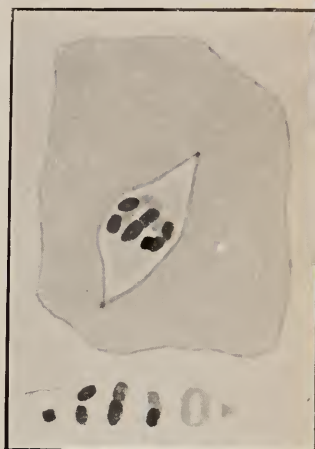


Fig. 63

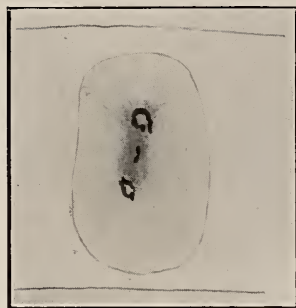


Fig. 64



Fig. 65

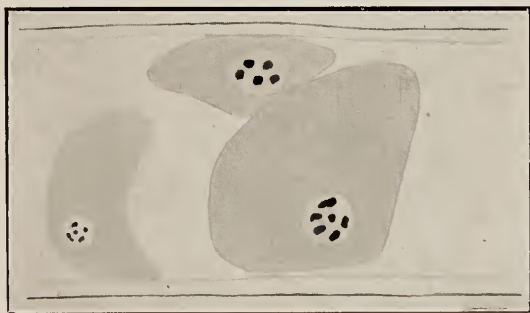


Fig. 66

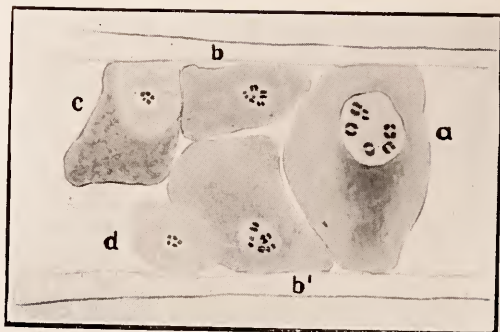


Fig. 67

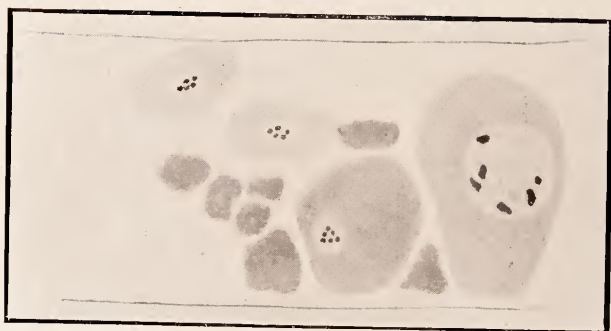


Fig. 68

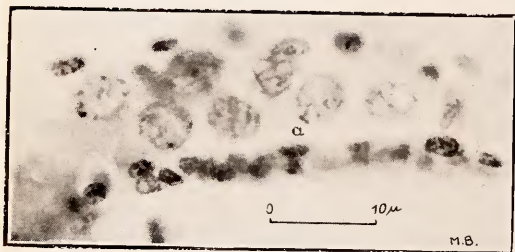


Fig. 69

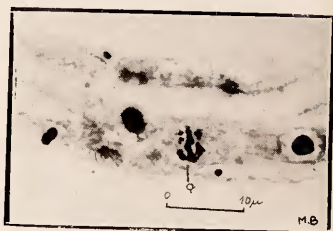


Fig. 70

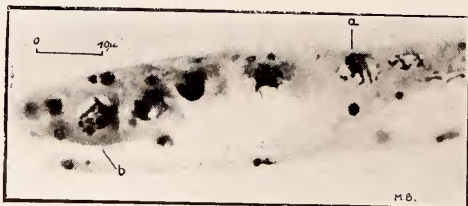


Fig. 71

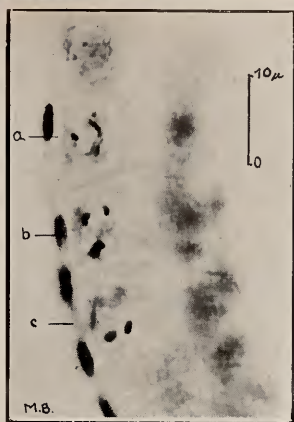


Fig. 72

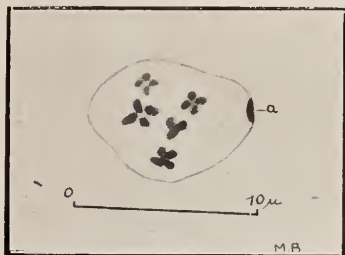


Fig. 73



Fig. 74

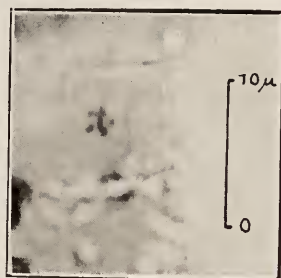


Fig. 75

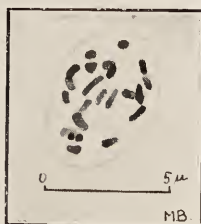


Fig. 76

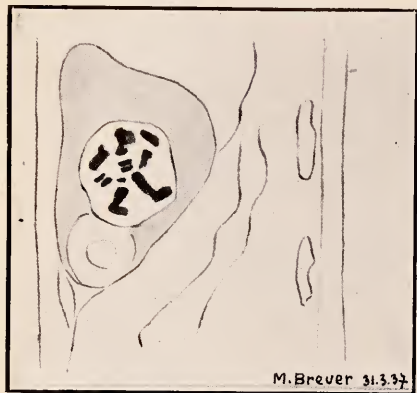


Fig. 77

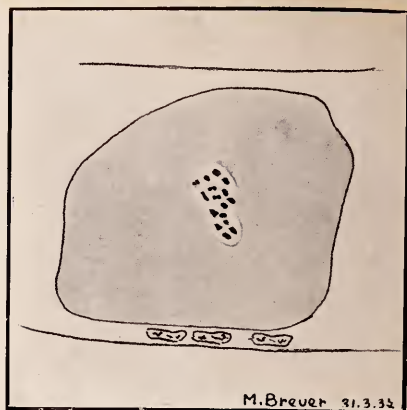


Fig. 79

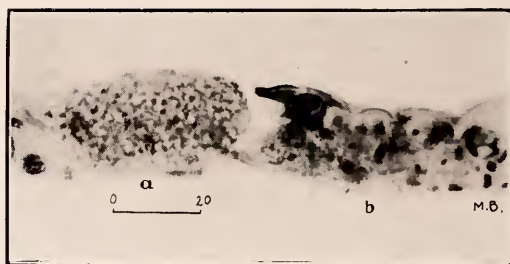


Fig. 78



Fig. 80

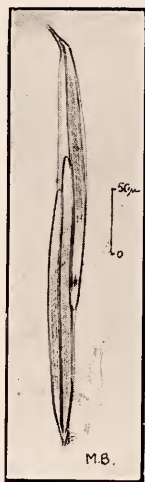


Fig. 81

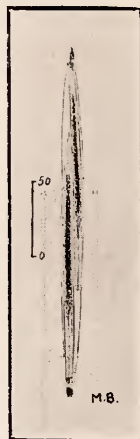


Fig. 82

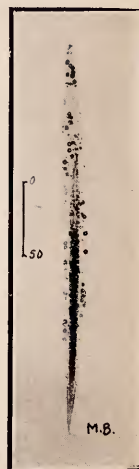


Fig. 83



Fig. 84

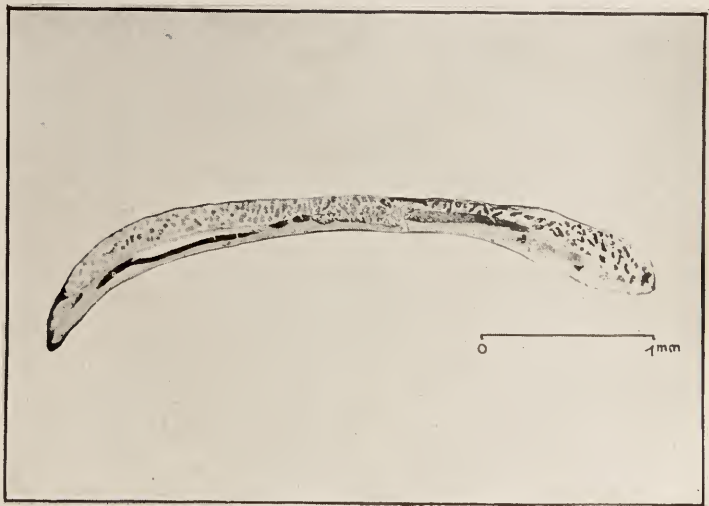


Fig. 85

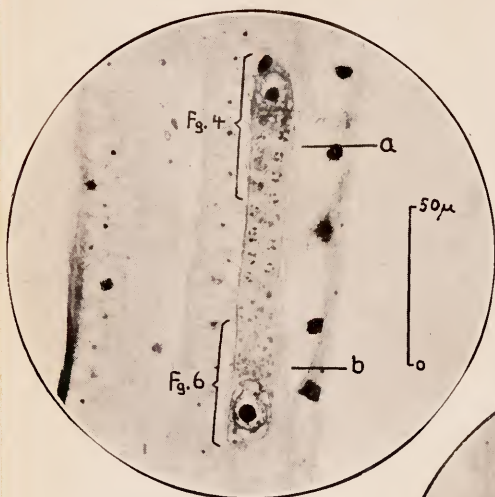


Fig. 86



Fig. 87

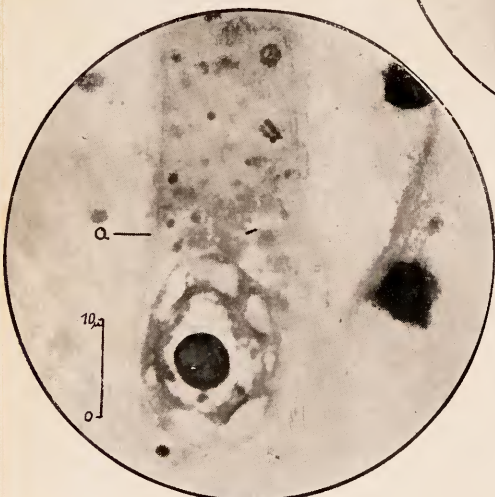


Fig. 88



Fig. 89

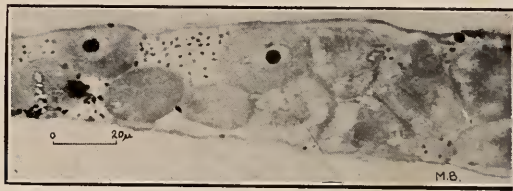


Fig. 91

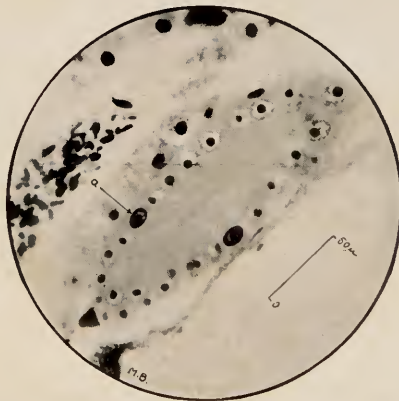


Fig. 92

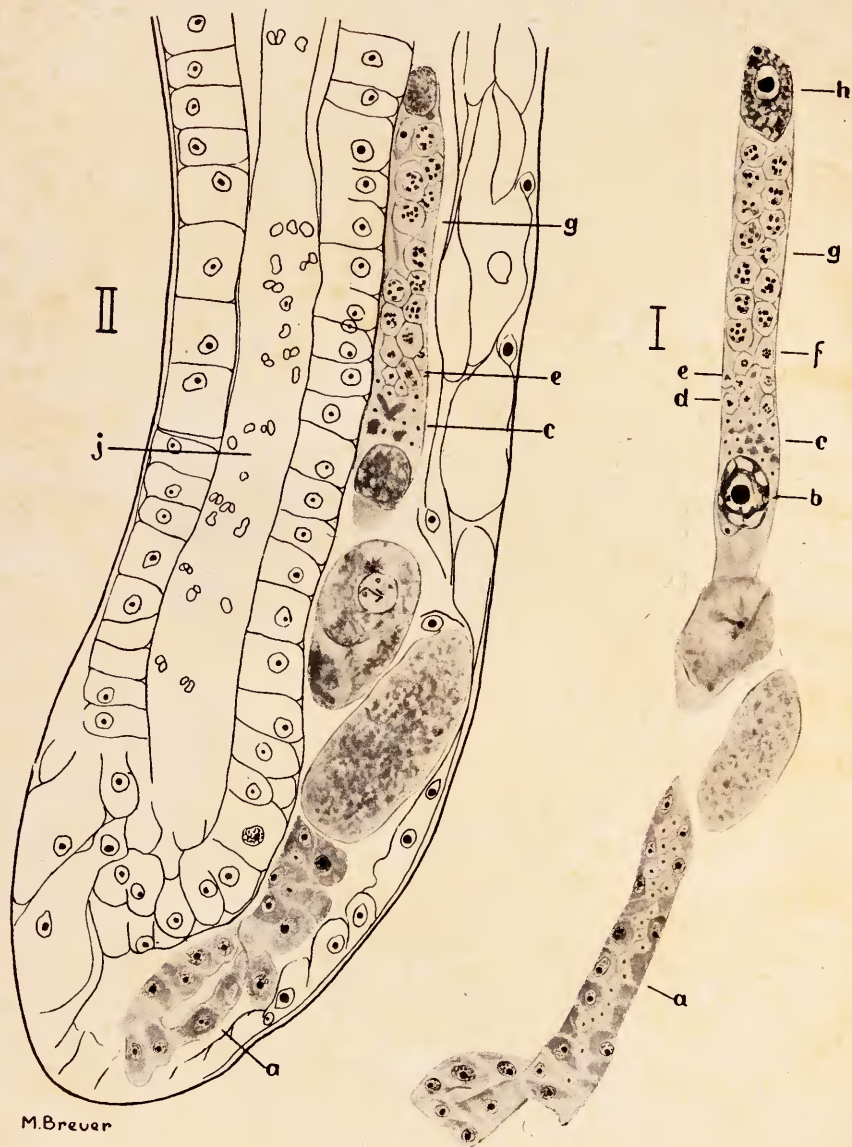


Fig. 90

