

DR. FRANCISCO DE CASTILHOS MARQUES **PEREIRA**
Docente de HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA GERAL



DA HISTOFISIOLOGIA DO CONDRIOMA ANIMAL

(CONTRIBUIÇÃO AO SEU ESTUDO)



Tese apresentada para
o concurso à catedra
de Histologia e Em-
briologia Geral da Fa-
culdade de Medicina da
Universidade de Porto
Alegre.

1944

PORTO ALEGRE

DR. FRANCISCO DE CASTILHOS MARQUES PEREIRA
Docente de HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA GERAL

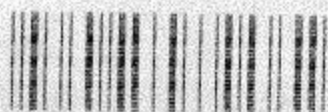
DA HISTOFISIOLOGIA DO CONDRIOMA ANIMAL

(CONTRIBUIÇÃO AO SEU ESTUDO)

Tese apresentada para
o concurso à catedra
de Histologia e Em-
briologia Geral da Fa-
culdade de Medicina da
Universidade de Porto
Alegre.

1944

PORTO ALEGRE



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-0716

Da histofisiologia do condriom

PREFÁCIO



Entre os assuntos que empolgam a histofisiologia moderna, alinham-se em primeiro plano os de ordem citológica que, representados pelo condrioma e aparelho de GOLGI, atraem a atenção dos Biologistas contemporâneos.

Destes dois aparelhos que parecem querer traduzir o reflexo celular em quasi toda a sua plenitude, escolhemos o primeiro, por nos parecêr menos investigado e talvez mais eloquente em relação aos processos metabólicos e secretórios.

Para tal, orientamos o nosso trabalho no sentido da investigação do aparelho mitocondrial, no que diz respeito ao histórico, às questões de ordem geral e particular, técnicas e métodos, reservando-nos para a parte experimental a contribuição ao estudo dos condriomas hepático e renal.

Assim é, com satisfação, que o apresentamos à critica serena e inteligente, daqueles que o deverão julgar.

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DO CONDRIOMA

Desde a sua descoberta até os nossos dias e quiçá para o futuro tem sido a célula objeto de estudo, pesquisas e divergências. Escolas que se defrontam, apoiadas em dados concretos, fruto das investigações reais, enquanto que outras, aproveitando em partes estes mesmos elementos e de outra parte a imaginação de que quasi sempre é fértil a mente humana, criam teorias hipotéticas, que no entanto não deixam de impressionar os cientistas e micrografos de todas as épocas.

Assim, esta minúscula porção biológica capaz de crescer e multiplicar-se, assimilando as substâncias nutritivas do meio exterior, representa um organismo ápto a viver independentemente (protistas), mas, associando-se, vai constituir os organismos mais complexos (metazoários).

Significa pois a célula, constituída de três partes distintas: citoplasma, núcleo e membrana, o centro energético dos fenômenos vitais.

Para o estudo da célula vários métodos foram idealizados, as técnicas mais sensíveis e delicadas foram e são aplicadas conforme o objetivo visado em sua estrutura. Dizemos estrutura porque, em rigor, na histologia temos a textura, modo como se dispõem os

elementos; a estrutura, no que se refere à forma e constituição dos mesmos.

Dos elementos componentes da célula ocuparemos do condrioma, verdadeiro aparelho alojado em plena massa citoplásmica, cujo estudo pormenorizado faremos mais adiante. Porém, antes, necessário se torna, estabelecermos considerações de ordem geral acerca da constituição do protoplasma, uma vez que estas estão de certo modo ligadas ao aparelho mitocondrial.

O citoplasma é o protoplasma celular. Êste vocábulo criado por PURKINJE para designar a primeira substância que se forma nos embriões, foi introduzido em anatomia por MÖHL.

Em realidade êle não representa mais o que a princípio significava, mas o uso o consagrou e os histologistas o aplicaram para denominar a massa transparente, granulosa, semi-sólida que se interpõe entre o núcleo e membrana celular.

Ao protoplasma, substância fundamental da vida, foram atribuídas várias teorias que procuram explicar a sua estrutura e cujas conseqüências se estendem até que de maneira cabal se possa estabelecer, com os progressos da técnica moderna (exames em vida, a fresco, cultura de tecidos, histo química, microcirurgia, histoé spectrografia, etc.) a sua definitiva forma e constituição.

Representando o protoplasma a quase totalidade da célula é dêle que se preocupam os biólogos, tan-

to que os teorias impostas a ela são tôdas calcadas em sua estrutura.

Assim, em desfile rápido, citemos os estudos de DUJARDIN, achando o citoplasma como constituido por uma substância homogênea em cujo seio estariam esparsas partículas figuradas e diversas inclusões; os de FROHMANN, HEITZMANN, VAN BENEDEN, KLEIN, LEYDIG, CARNOY e outros que descobriram no citoplasma granulações e filamentos (paraplasma ou metaplasma', denominando microsomas às granulações. Dêste modo os filamentos formariam uma rede cujos nós seriam representados pelas granulações. Estabelecia-se assim a teoria do retículo.

Para ALTMANN o citoplasma é constituido de pequenos grânulos, esparsos ou aglutinados, alojados em massa anista. Teoria granular de ALTMANN.

Com FLEMMING vemos o citoplasma formado de filamentos isolados (mitomas ou matéria filamentosa) que se acham imersos em uma substância amorfa (paramitoma ou matéria inter-filamentosa) Teoria filamentosa de FLEMMING.

A esta doutrina associaram-se SCHNEIDER, PGLÜGER, DALLOWITZ e outros.

Segundo BÜTSCHLI o citoplasma é constituido de alvéolos formados por lâminas delgadas e anastomosadas, cheios de uma substância mais ou menos líquida (enquilema). Teoria alveolar de BÜTSCHLI.

Vê-se, dêste modo, que cada pesquisador descreve para o citoplasma uma estrutura particular mas, o que realmente parece, é que tôdas estas disposições por êles encontradas poderão, de fato, aparecer ao microscópio, fruto unicamente da diversidade de técnicas empregadas.

FISCHER acha que algumas destas estruturas poderão surgir como artefatos de preparação.

As teorias acima expostas, em verdade, assentam sob um mesmo aspeto, isto é, consideram o citoplasma formado por duas substâncias: uma não figurada (hialoplasma) e outra figurada (morfoloplasma), assumindo, conforme os autores, a forma de grãos, filamentos ou rede. O que parece porém, é que os filamentos nada mais são do que a associação dos grânulos que receberam as mais variadas denominações: ALTMANN os chamou de bioblastos; FROHMANN, HEITZMANN, van BENEDEM, KLEIN, LEYDIG e outros de microsomas; ARNOLD de plasmomas e, atualmente a maioria dos autores consideram não só as denominações anteriores mas ainda o mitoma de FLEMMING e as lâminas de BÜTSCHLI como sendo formações idênticas às do atual aparelho mitocondrial ou, em outras palavras, empregadas como sinônimo do referido aparelho pelos vários cientistas em épocas diferentes.

Além das teorias anteriormente expostas, surgiram estudos interessantes e, principalmente neste último meio século, acharam os biólogos que a célula

é um elemento complexo para ser considerada como unidade elementar anatômica e fisiológica e consideraram-na como sendo a resultante da associação de unidades inferiores oriundas talvez de grupos moleculares. Lendo-se a propósito a excelente obra de PIERANTONI, verifica-se a diversidade de opiniões existentes entre os investigadores a respeito da complexidade celular.

Surgiram os estudos de DARWIN, chamando de *gêmulas* às unidades fisiológicas elementares, portadoras dos caracteres hereditários e capazes de passarem de uma célula para outra, circulando livremente no organismo. Estas unidades fisiológicas foram igualmente admitidas por SPENCER.

DE VRIES denominou de *pangenos* os componentes elementares do citoplasma; WEISSMANN de *biofóros*; ERLSBERGER e HÉCKEL de *plastídulos*; NAEGELI de *micelas*; HAACKEZ de *gemas*; HERTWIG de *idioblastos* e etc.

Em 1868 MAGGI descreveu em suas lições de "Morfologia e Protistologia", que a célula é formada pela associação de elementos que designou de *citodos* (corpo celular, núcleo e nucléolo) diferenciados em relação às diversas funções que desempenham. Resulta o citodo por sua vez da associação de *plastídios* de grau inferior — *plastídulos*. Dêste modo a célula transforma-se em um verdadeiro tecido citodular e o citodo em um tecido plastidular.

Os plastídulos representam assim as granulações do protoplasma (plason, citoplasma e carioplasma) devendo-se nêles repetir-se tôdas as funções do citodo e, portanto, da célula. Estabelece-se, desta forma, estreita correlação entre plastídulo e célula e desta com o organismo do metazoário ou metáfito. Entende ainda MAGGI que os plastídulos procedem da individualização de substância mais simples, a *glia*. Esta seria a substância formada primòrdialmente no curso da evolução biológica.

Ignorando as teorias de MAGGI, chegou ALTMANN, em 1890, a conclusões semelhantes, achando que o citoplasma não se apresenta homogêneo e sim constituído de granulações, elementos morfològicamente parecidos com as bactérias, que denominou, como já vimos, *bioblastos*. ALTMANN considera o bioblasto como a unidade morfológica visível do citoplasma vivo, capaz de viver livremente (autoblasto) ou associado em colônias (citoblasto). Para êle os autoblastos e os citoblastos podem adotar a forma de monoblastos ou de nematoblastos. Os citoblastos, conforme pertençam ao núcleo ou ao citoplasma, distinguem-se em: carioblastos e somatoblastos.

Séria então a célula, em sua origem, uma colônia de bioblastos organizados em *moneras*, de que por sua vez à custa de diferenciações internas resultariam as *metamoneras*, moneras com esboço de núcleo e finalmente destas derivariam as células.

Quanto à origem dos bioblastos diz ALTMANN que um procede sempre da divisão de outro: OMNE CRANULUM EX GRANULO.

Outra concepção da vida celular é atribuída a GIGLIO TOS, que considera como funções essenciais dos organismos vivos a assimilação e a multiplicação. Assim, este biologista se estende em considerações relativas à organização da matéria viva e conclue, de acôrdo com outros autores, que o citoplasma efetivamente é constituído pela reunião de moléculas vivas, dando por sua vez origem a partículas correspondentes, de um modo geral aos plastídulos de MAGGI e aos grânulos de ALTMANN, às quais denomina de *biômoros*, que pela sua reunião, dariam sistemas simbióticos chamados *biomonadas*. A célula seria nessas condições uma *biomonada*.

Os biômoros teriam vida própria e seriam formados por sistemas simbióticos de moléculas (biomoléculas) capazes de viverem isoladamente desde que o meio lhes fornecessem condições fisico-químicas indispensáveis à assimilação.

Na biomonada constituída pela célula, os biômoros estariam representados por todos os corpúsculos que se acham no citoplasma (centríolos, mitocôndrios, etc.) e no carioplasma (corpúsculos de cromatina).

Teríamos, desta forma, o organismo pluricelular formado por células vivas que constituiriam um complicado sistema simbiótico, porém destinadas a perece-

rem caso se separassem da comunidade celular, porque lhes faltariam as substâncias nutritivas necessárias à vida; os biômoros poderiam subsistir sómente em condições de associados simbioticamente, constituindo a célula. Em resumo, a célula possuiria características comparáveis às dos seres pluricelulares.

Diz PIERANTONI que, quando não é possível observar diretamente a participação das biomoléculas nos diversos fenômenos vitais, os biômoros de GIGLIOTOS são visíveis freqüentemente, podendo se observar seu comportamento e sobretudo seu desdobramento. A este desdobramento seria devido o fenômeno da citodierese ou divisão celular; as figuras cariocinéticas seriam uma consequência da fragmentação das partículas ou biômoros pre-existentes e da orientação dos biômoros resultantes nas duas regiões polares da célula, ao redor dos centrosomas, os quais por sua vez, procedem da divisão do centrosoma da célula mãe e são os primeiros a se orientarem. GIGLIOTOS toma em consideração os fatores de forças extrínsecas, especialmente a gravidade, ~~na gravidade~~, na interpretação dos fenômenos celulares (divisão, fecundação, segmentação, etc.) e também dos processos de ontogênese no que diz respeito às direções dos planos de segmentação e de todos os eixos relacionados com a estrutura do ovo.

Vê-se pelas hipóteses apresentadas que alguns



biologistas admitem a simbiose como constituindo o fundamento dos fenômenos vitais, concluindo que só assim é possível a vida.

Desta forma estas concepções se chocam com as que modernamente interpretam essas granulações citoplasmáticas como elementos ativos das diversas funções celulares.

Observa-se, como é natural, o exagêro com que certos biologists interpretam as teorias expostas acima; vemos igualmente em tôdas elas o citoplasma constituído novamente por duas porções distintas: uma amorfa e outra granulosa.

Segundo RETZIUS, todo o protoplasma é constituído por três elementos essenciais: o hialoplasma (paramitoma ou massa interfibrilar) uma rede de filamentos ramificados, flexuosos, porém anastomosados (mitoma de FLEMMING) correspondentes aos plastocontos de MEVES e alguns grânulos dispostos em série e alojados na espessura do mitoma (microsomas, correspondentes aos grânulos de ALTMANN ou plastosomas de MEVE).

ARNOLD é de opinião que, todos os filamentos de FLEMMING como as paredes dos alvéolos de BÜTSCHLI, sejam formados pela reunião de grânulos que designa de plasmosomas e que o condrioma é representado por plasmosomas específicos.

Diz LAGUESSE que o protoplasma é uma mas-



sa de estrutura microscópica inicialmente homogênea e de estrutura ultramicroscópica finamente granulosa, como os colóides.

BÜTSCHLI foi o primeiro que considerou o protoplasma como um colóide.

RHUMBLER, em 1914, comparou-o às soluções coloidais.

Do ponto de vista coloidal, o protoplasma é considerado atualmente como um "gel" e segundo BOTTAZZI o citoplasma indiferenciado ou *gliode* é um "hidrosol".

Sabe-se que o protoplasma vivo é extremamente lábil tanto assim que as tentativas de investigação por meios físicos e químicos, mais ou menos agressivos, alteram o equilíbrio complexo e conduzem a formações variadas de imagens citoplasmáticas que não correspondem em realidade às condições estruturais pre-existentes.

BERTHOLD, SCHWARZ, FISCHER, HARDY e o próprio BÜTSCHLI esclarecerm com nitidez estas transformações produzidas pela morte em face dos reativos fixadores.

Desta forma FISCHER obteve numa mesma solução albuminosa e com reativos fixadores diferentes, tipos de coagulação: granulosa, filamentosa, vacuolar, etc.

Das considerações recém expostas, adveio, em

técnica histológica, e principalmente em citologia, a observação do protoplasma vivo. Livre, dêste modo, das mutações estruturais verificou-se que o citoplasma vivo é de fato uma massa homogênea, apresentando a transparência do vidro e tendo em suspensão partículas pequenas e delicadas que constituem partes vivas e fundamentais, diferenciadas, umas pela maior refração, como o condrioma, e outras representadas pelas substâncias de elaboração: gorduras, glicogênio, etc.

Tornou-se tão importante a verificação do protoplasma vivo que toda a citologia moderna utiliza-se dela, seja para a identificação de elementos sob cuja existência pairavam dúvida ou seja para servir de controle às preparações fixadas e coradas. Infelizmente este novo campo de observação histológico ainda é restrito mas, no entanto, já tem fornecido resultados concretos em técnica citológica.

Em síntese, temos o protoplasma constituído por duas porções distintas; uma amorfa, anista não figurada — hialoplasma e outra figurada — morfoplasma, plasma estruturado, protoplasma morfológicamente diferenciado, correspondendo a diversas funções visíveis em estado vivo ou sob a ação dos reativos.

Entre estas formações e constituindo os protoplasmas funcionais gerais temos o condrioma, o centro celular e o vacuoma.

Das porções figuradas do citoplasma, a que

existe em maior abundância e que apresenta maior polimorfismo é, sem dúvida, o condrioma.

Vem sendo o condrioma, designado sob as mais variadas denominações, o elemento constante e funcional do protoplasma celular.



DO CONDRIOMA EM GERAL



HISTÓRICO

Das hipóteses, teorias e suposições expostas anteriormente, depreende-se a ligação íntima existente entre a história do protoplasma em geral e a do condrioma em particular, chegando mesmo a se confundirem sob alguns aspetos.

Do ponto de vista histórico entre muitos cientistas eminentes ressaltam as figuras de ALTMANN, BENDA e NEVES que assinalam, como verdadeiros marcos, as etapas mais precisas da história do condrioma.

Tomando como ponto de reparo os trabalhos dos referidos pesquisadores, podemos dividir o histórico do condrioma em três épocas diferentes e sucessivas: época de ALTMANN, época de BENDA e época de MEVES.

ÉPOCA DE ALTMANN

Inicia-se com os estudos de von BRÜNN em 1884 descrevendo granulações especiais nas células sexuais do rato com o nome de "protoplasmakörner".

Em 1886 surgem as observações de LA VALLETE SAINT GEORGES realizadas nas células se-

xuais dos insetos, constatando a presença de granulações que denominou de "citomicrosomas".

Em 1890 ALTMANN, com o auxílio de métodos próprios, tendo por base essencial a fixação em mistura cromo ósmica e coloração pela fucsina ácido anilina diferenciada pelo ácido picrico, verificou, no seio do citoplasma, formações que descreveu como grãos e filamentos chamando-as de "bioblastos", que considerou como partes elementares e verdadeiramente vivas do citoplasma. Como já dissemos atrás, a célula para ALTMANN nada mais era do que uma colônia de bioblastos.

Com êstes trabalhos firmou-se definitivamente a concepção de que êsses grânulos (bioblastos) representavam, na célula, elementos dignos de investigação.

Aparecem, após os trabalhos de ALTMANN, grande número de biólogos interessados em tais pesquisas, sem que contudo tenham trazido grandes esclarecimentos.

ÉPOCA DE BENDA

Em 1898 BENDA, após os seus estudos nas células sexuais masculinas (espermatozóides) dos mamíferos em que encontrou elementos granulares dispostos em série ou em corôa, estabeleceu, a princípio, o nome genérico de "mitocôndrios" aos referidos elementos e aos quais ainda lhes atribuiu estarem em relação com as funções motoras das células.

Mais adiante encontrou formações em forma de filamentos de aspeto granuloso que denominou de "condriocontos".

De posse destes elementos, lançou BENDA a hipótese de que essas formações se reuniriam no espermatozóide para formar o filamento espiral da porção intermediária entre o colo e a cauda.

BENDA empregou para tal fim novos corantes os quais lhe permitiu a evidenciação do aparelho mitocondrial.

Vê-se, na técnica aconselhada por este biólogo, a alizarina e o cristal violêta empregados pela primeira vez para o condrioma.

A descoberta de BENDA parece não ter sido novidade em citologia mas sim veio reforçar e dar corpo às pesquisas realizadas anteriormente.

A êste respeito PENSA se expressa da seguinte forma: "BENDA não fez sinão valorizar êstes elementos celulares que adquiriram bem cedo parte relevante em citologia."

Entre outros investigadores, van der STRICHT confirmou os trabalhos de BENDA, encontrando mitocôndrios e condriocontos nos óvulos de diversas espécies de animais.

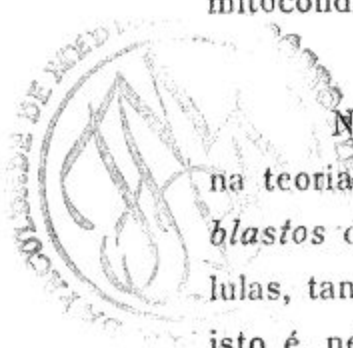
ÉPOCA DE MEVES

Durante alguns anos, após os estudos de BENDA, nada se escreveu de importante sôbre o condrioma.

Sòmente em 1908 novos estudos amparados em técnicas e métodos minudentes conduziram MEVES ao exame do protoplasma de células embrionárias, onde verificou o condrioma e estabeleceu ainda, que o mesmo era elemento constante e normal do citoplasma.

Em 1911 procede idênticas pesquisas em células diferenciadas do indivíduo adulto, constatando, em algumas delas, a presença do referido aparelho.

Após estas constatações, MEVES propõe novas designações para os elementos do condrioma; assim, chama de plastosomas e plastocontos aos condriosomas, denominados, respectivamente, por BENDA de mitocôndrios e condriocontos.



No período de 1917 a 1919 PORTIER, baseado na teoria dos *microcimas* de BÉCHAMP e na dos *bioblastos* de ALTMANN, sustenta a tese de que as células, tanto animal como vegetal, são elementos duplos, isto é, nelas se encontram o protoplasma propriamente dito e alguns micróbios que denominou de *simbiotes*. Para ele, os referidos simbiotes viveriam em íntima associação com os elementos essenciais da célula e colaborando com esta em todos os momentos necessários. Compara-as desta forma, com as simbioses dos fungos e das algas que dão origem aos líquens.

Os simbiotes representariam, assim os únicos elementos simples da célula e, uma vez esta destruída,



êles recuperariam liberdade, emancipando-se da colônia intracelular.

As ousadas especulações de PORTIER, dizem S. RAMÓN y CAJAL e J. F. TELLO y MUÑOZ, se apoiam nos seguintes fatos :

- 1.º — da existência no protoplasma de formas granulares e filamentosas, suscetíveis de multiplicação e crescimento (mitocôndrios, granulações glandulares, etc.);
- 2.º — da presença nas nodosidades das leguminosas e na dos tecidos de muitas larvas de insetos, assim como em diversos invertebrados, de indiscutíveis formas microbianas associadas ao protoplasma celular;
- 3.º — do fato, bem conhecido, de que a semeadura dos órgãos animais e vegetais provoca, as vezes, a aparição de colônias microbianas;
- 4.º — do fenómeno, chamado *avitaminosis*, que succede quando os animais se alimentam com sementes descorticadas ou pastos absolutamente asséticos, desenvolvendo-se, assim, graves transtornos nutritivos que podem conduzir à morte. O escorbuto e o beribéri do homem se derivam, precisamente, do uso de conservas asséticas. Esta miséria fisiológica, a que os autores atribuem a destruição de certas substancias, as vitaminas, existentes na epiderme das sementes, frutos e em outros alimentos, obedeceria, segundo PORTIER, à eliminação, por antiseptia ou assepsia, de suas bactérias simbióticas.

Em opposição, os bacteriólogos afirmam que os órgãos dos animais e das plantas se encontram em con-

dições fisiológicas perfeitamente asséticas, assunto recentemente corroborado pelos trabalhos de A. LUMIÈRE que efetuou análise experimental de todas as pretensas provas alegadas por PORTIER. REGAUD, em 1919, LAGUESSE e GUILLERMOND, em 1919, demonstraram que não é possível identificar bactérias com mitocôndrios, pequenos órgãos celulares, refratários à coloração pelos métodos tintoriais microbianos e incapazes de se emanciparem para constituir vida extra-orgânica.

Concluindo, acusam os referidos autores, que a obra de PORTIER se alicerça em grave erro de lógica científica, pois, para êle, os fatos negativos são sistematicamente desprezados e sacrificados ante a excepcional aparição de tal ou qual fato positivo, arbitrariamente interpretado.

Nêstes últimos anos, os discípulos de BENDA e MEVES descobrem o condrioma em quase todos os elementos histológicos.

NAGEOTTE, os encontra nos neurônios e nas células da neuróglia.

DUESBERG, HOWEN, REGAUD, LEVI, PENSA e muitos outros descreveram igualmente o condrioma em um grande número de células.

ACHUCARRO, DEL RIO HORTEGA e RAMON y CAJAL confirmaram igualmente a presença dos condriosomas em departamentos anatômicos onde até então era duvidosa a sua existência.

Esses cientistas utilizaram-se de métodos e técnicas novas.

Além dos nomes já citados, encontramos grande número de biólogos que se têm preocupado com a investigação do condrioma e cujos estudos mencionaremos a cada instante.

Infelizmente não possuímos em nosso fichário autores nacionais sobre o tema que ora nos interessa.

**DEFINIÇÃO - SINONIMIA - MORFOLOGIA -
DISTRIBUIÇÃO - QUANTIDADE - EVOLUÇÃO
DO CONDRIOMA**

Representa o condrioma um conjunto de corpos em formas de grãos ou bastonetes denominados genericamente de condriosomas.

Os condriosomas podem se apresentar sob três tipos diferentes: em grãos, mitocôndrios de BENDA ou plastosomas de MEVES; em bastonetes retos ou flexuosos, condriocontos de BENDA ou plastocontos de MEVES e em grãos dispostos em linhas como as contas do rosário, condriomitos, forma encontrada raramente e cuja designação é atribuída a MEVES.

O condrioma é denominado ainda, por alguns autores, de aparelho mitocondrial.

Vê-se também os mitocôndrios receberem, pelos autores ingleses e americanos, a designação de esferocôndrios, assim como a de pseudo-cromosomas, dada aos condriocontos pelos mesmos autores.

A designação antiga de bioblastos de ALTMANN caiu quase que completamente de uso encontrando se raramente entre os autores modernos.

Os mitocôndrios podem-se encontrar isolados ou agrupados e desta última formação GIGLIO-TOS e GRANATA encontraram nas células sexuais do "Pamphagos marmoratus" verdadeiras condensações mitocondriais que chamaram de "agrupamentos mitocondriais."

O condrioma pode-se apresentar, segundo a espécie animal e no mesmo tipo celular, seja sob a forma de mitocôndrios, de condriocontos ou condriomitos ou, ainda, conforme alguns autores, podem assumir os condriosomas o aspeto reticular.

Estas disposições são suscetíveis de mutações que estão em relação com a idade e função da célula.

PENSA constatou que todas as variedades de condriosomas estão representadas nas células da cartilagem hialina.

DEBEYRE verificou também que os condriosomas se apresentam algumas vezes com aspeto idêntico no mesmo órgão; assim como no caso das células das glândulas salivares do rato, do asno e do homem cujo condrioma é representado por condriocontos e nas glândulas salivares do coelho com o tipo de mitocôndrios.

Como vemos, a distribuição dos condriosomas nas células é variável.

A este respeito devemos observá-lo tomando em consideração o tipo da célula cuja polaridade seja fixa ou não.

As células quanto à polaridade se dividem em três tipos.

- I tipo — Células de polaridade fixa (células secretoras das glândulas salivares, pâncreas, tubos contornados do rim etc.)
- II tipo — Células de dupla polaridade (células intestinais)
- III tipo — Células sem polaridade definida (célula hepática)

No primeiro tipo — Células de polaridade fixa — o condrioma se localiza no polo basal da célula, longe portanto do polo apical ou polo de excreção.

No segundo tipo — Células de dupla polaridade — reparte-se o condrioma nas duas porções: basal e apical.

No terceiro tipo — Células sem polaridade definida — vê-se o condrioma uniformemente distribuído em toda a área citoplásmica.

Em outras células o condrioma é perinuclear e os condriomas se distribuem radicalmente em relação ao centro celular.

Veza há em que o condrioma não apresenta posição estável, assim por exemplo, nas células vivas, os condriosomas não são fixos e podem-se movimen-

tar em relação aos diferentes estados funcionais, como no curso dos fenómenos de vitelogênese no seio do ovocito.

Quanto ás dimensões, os condriossomas são mais ou menos uniformes; os mitocondrios medem aproximadamente de 0,5 a 1 micron de diâmetro e os condriocentos de 1 a 3 micra de comprimento.

COWDRY e LECOMTE DU NOUY conseguiram avaliar a superfície total do condrioma em quinze vezes maior do que a do núcleo, servindo-se para tal fim das cifras obtidas em relação ao comprimento, diâmetro, volume e superfície de cada elemento isoladamente.

O condrioma é séde de transformações quer no transcurso de alterações patológicas como nas provocadas experimentalmente.

O aparelho mitocondrial sofre, em tais casos, modificações que se podem sintetizar em quatro fases sucessivas :

I fase — Fragmentação dos filamentos em grânulos.

II fase — Dispersão ou, ao contrário, aglutinação dos grânulos.

III fase — Transformação dos grânulos em esféras, vacuolares.

IV fase — Aumento da colorabilidade pelo ácido ósmico, o que está em relação com o aumento de sua carga em ácido gorduroso. (oléico).

Nas preparações a fresco percebe-se igualmente as alterações sofridas pelos condriosomas, bastando para isso, como no caso do condrioma hepático, que a observação seja feita de 5 a 20 minutos após a morte do animal, operando-se desta forma a chamada vesiculação do condrioma (Roberto Noël, Fauré - Fremiet).

Os mitocôndrios e os condricontos se apresentam respectivamente sob a forma de vesículas arredondadas ou fusiformes.

Êste aspeto vesicular constitui realmente alterações do aparelho mitocondrial e parece servir de índice das primeiras manifestações sofridas pela autólise celular.

Tais modificações podem-se reproduzir quando se substitui, durante a observação do citoplasma vivo, o sôro de Locke por água destilada.

Os meios hipotônicos imprimem ao condrioma modificações idênticas às descritas acima.

A êste respeito FAURÉ FREMIET, CIACCIO, LEWIS, COWDRY, LEWITSKY, BANG, SJÖVALL, GUILLERMOND e outros verificaram que as soluções hipotônicas provocam alterações imediatas cujo término é a morte da célula.

Destas alterações as mais evidentes são aquelas que se efetuam no seio dos condriosomas que a princípio se entumescem, aumentando de volume, mostrando então, em sua parte central, uma região mais

clara, hialina, enquanto que a parte periférica conserva aspeto e densidade normais.

Em seguida esta turgescência se acentua mais e os condriosomas se transformam em vesículas.

POLICARD, LEWYS e COWDRY demonstraram que o fenómeno da vesiculação dos elementos do condrioma pode igualmente se efetuar por simples mudança de temperatura.

PENSA constatou profundas alterações na forma, dimensões e número dos condriosomas no decurso do processo fisiológico de ossificação.

O condrioma é encontrado em todas as células do organismo, mas nem todas o tem em igual quantidade, assim, é quasi nulo ou chega mesmo a faltar nos elementos degradados como as hemátias ou naqueles cuja atividade fisiológica é muito reduzida.

Em grande número de células (células glandulares), verifica-se um verdadeiro estado de equilíbrio entre a quantidade de condrioma e a dos produtos de elaboração celular.

Assim, nas células cuja função proeminente seja a de secretar, observa-se que, quanto maior se torna o armazenamento de substâncias elaboradas, tanto menor se apresenta o condrioma e geralmente colocado em situação oposta a estas.

O condrioma existe, pois, na célula, sempre na razão inversa dos produtos elaborados.

A este respeito, podemos citar a clássica experiência de Altmann, realizada nas células glandulares da parótida que encerram inclusões especiais, grãos de secreção na porção apical e mais ou menos ricas em condriocentos na porção basal.

Para reproduzi-la, procede-se do seguinte modo: intoxica-se um animal de laboratório pela pilocarpina e espera-se alguns minutos, ao fim dos quais, sacrifica-se o animal e se faz, o mais rapidamente possível, a observação microscópica das referidas células.

ALTMANN estudou como se processa a regeneração do aparelho mitocondrial, tendo como base as várias atitudes celulares representadas ora, pelo aumento dos grãos de secreção ora, pelo aumento ou diminuição do condrioma em relação aos mesmos.

Nestas condições as células mostravam umas, excretando os referidos grãos, enquanto que o aparelho mitocondrial se apresentava reduzido e outras, a parte de produtos elaborados diminuída, enquanto que o condrioma assumia o aspeto de atividade representada pelos condriocentos que de início aumentam de volume para, em seguida, surgirem grãos localizados em suas extremidades.

Tão logo estes grãos se libertam dos filamentos, aumentando em número, para imediatamente, os condriocentos voltarem ao estado primitivo e diminuir em número, dando a impressão de que estes nada mais representam do que produtos por eles elaborados.

Nêste sentido foram descritas em muitas células formações de grânulos, ou de diversas outras substâncias, cuja origem parece depender do condrioma de maneira direta ou de forma indireta da atmosfera citoplasmática que o cerca, mas sempre se efetuando por processos cujo mecanismo íntimo se assemelham aos observados por Altmann em sua experiência.

O fato do condrioma se apresentar sob várias formas numa mesma célula, levou os histologista e biologists a verificarem qual dos aspetos morfológicos apresentados pelos seus elementos seria o inicial.

Orientado por êste espirito, PRENANT lançou-se em pesquisas, tendo como ponto de reparo o aspeto morfológico do condrioma nas células em repouso e em franca atividade fisiológica.

Após uma série de exames praticados conforme o critério acima exposto, chegou êsse cientista às seguintes conclusões:

- I — O condrioconto parece representar a forma inicial do condrioma, fato constatado em um grande número de células em estado de repouso;
- II — O condriomito sucede imediatamente a forma anterior;
- III — O mitocondrio se origina por dissociação dos grãos que constituem o condriomito, verificação esta procedida em células em atividade.



Pelos estudos do professor PRENANT, deduz-se a existência de um ciclo de mutações entre os elementos do condrioma; no entanto, na opinião abalisada do histólogo PENSA, constata-se que o mesmo não crê nestas transformações, dizendo que nunca observou passagens de um tipo morfológico em outro.

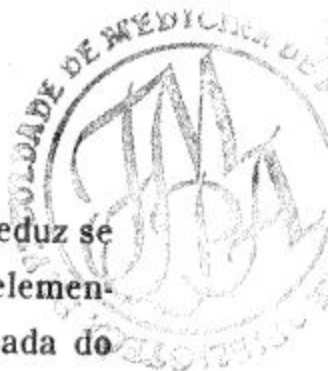
O referido pesquisador nega, igualmente, a transformação dos condriosomas em produtos de elaboração, como sejam: grãos de secreção, de zimogêneo etc.

Dizem ainda os autores que o número de condriosomas, existentes nas células ou em cada célula em particular e pertencentes ao mesmo órgão e à mesma espécie animal, não é fixo, tanto que é suscetível de variações na mesma célula, no mesmo órgão e no mesmo animal.

Concluem dizendo que a quantidade destes elementos depende das atitudes fisiológicas assumidas pelo citoplasma, tendendo para aumento ou diminuição conforme já dissemos anteriormente.

CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E CARACTÉRES FÍSICO QUÍMICOS DO CONDRIOMA

REGAUD, FAURÉ-FREMIET, MAYER, SCHAEFFER, RATHERY, POLICARD e outros admitem que o condrioma seja constituído por fosfátidas (combinações da glicerina, com ácidos graxos, ácido fosfórico e uma base orgânica, frequentemente a colina), com pequenas quantidades de preteínas.



Considera-se, desta forma, o condrioma como um complexo lipo-proteico, altamente rico em lipídios.

Estas conclusões foram o fruto de investigações de ordem físico-químicas dirigidas aos elementos do condrioma por meios de reativos comuns às substâncias graxas e proteicas.

Os condriosomas são evidenciados *in vivo* por apresentarem índice de refração ligeiramente superior ao do citoplasma em geral, assim como em relação à viscosidade.

Estas duas propriedades características do condrioma são devidas à sua constituição de colóide muito mais viscoso do que a parte fundamental do citoplasma, que, entretanto, tem muitas vezes caráter de hidrosol enquanto que os condriosomas são sempre hidrogéis muito viscosos.

Nestas condições, os componentes do aparelho mitocondrial apresentam forma própria e constante que, com a luz transmitida, se evidenciam pela maior refração do que a do meio em que estão em suspensão, do qual se destacam como partículas luminosas no campo escuro, fenômeno de Tyndall, próprio a todas as soluções coloidais cujo índice de refração não seja muito próximo ao do meio intermicelar, (ultramicroscópio e fundo negro por condensadores parabolóides ou tipo cardióide).

Da viscosidade do condrioma depende precisa

mente a considerável consistência que o citoplasma possui quando contém grande número de condriossomas, apesar de ser sua porção anista muito fluída; exemplo desta relação nos oferece os ovocitos de anfíbios e reptis (Levi).

Coram-se por processos vitais de modo lento, difícil e exclusivamente por alguns corantes, de preferência e de maneira quase que específica pelo verde Janus, negro Janus, azul Janus, violeta dália, azul pirrol e azul tripan, sendo que, na opinião de Levi, estes dois últimos corantes podem alterar a morfologia dos condriossomas o que, no entanto, não verificámos em nossas pesquisas.

Não reduzem o ácido ósmico que, no entanto, os fixa bem. Tingem-se de amarelo pelo Lugol, sem apresentarem alterações morfológicas, fato este que deu margem a que SCHIFF, em seus estudos sobre o protoplasma celular, denominasse de amido animal a determinados grânulos que, em sua época, não eram conhecidos e que, provavelmente, poderiam ser alguns dos componentes do condrioma.

São muitos sensíveis, como já vimos, às influências osmóticas e em meio hipotônico entumescem-se, transformando-se em vesículas: fenômeno da vesiculação descrito por Fauré-Fremiet e Roberto Noël.

LEVI diz que a quantidade d'água combinada aos condriomas não é suscetível de variações, por

grande que seja a embebição celular, a transparência dos condriosomas não aumenta e não se modificam nem mesmo nas células cultivadas em plasma hipotônico, mas em compensação, segundo Guillermond, são sensíveis às variações da pressão osmótica.

Ressalta, desta forma, a necessidade imperiosa das mutações osmóticas, para que se verifique a transformação vesicular dos elementos do condrioma.

Os fixadores como álcool, éter, ácido acético etc. assim como os dissolventes das graxas: xilol, toluol, benzol, clorofórmio, etc. os destróem.

Fixam-se e se conservam bem somente nas soluções aquosas de sublimado corrosivo e de ácido pícrico e principalmente pelos métodos ditos mitocondriais que têm como base as misturas fixadoras cromoféricas e cromo-óslicas.

Esta afinidade pelas misturas recém citadas vem demonstrar o quanto os condriosomas são ricos em lípidios pois, estes em presença de oxidantes, como os sais de cromo e o tetróxido de ósmio, conferem aos referidos elementos a propriedade de se fixarem, conservando inalterada a forma e de resistirem ao tratamento ulterior pelos seus dissolventes e de não perderem igualmente a propriedade de absorver as substâncias corantes.

Fixadas por estes processos, coram-se com nitidez pela hematoxilina férrica (método de HEIDENHAIN,

de REGAUD, etc.), pelo cristal violeta (método de BENDA) e pela fucsina ácida anilinada (método de ALTMANN).

Os elementos do condrioma deixam se impregnar pelos sais metálicos principalmente pelos de prata (método de ACHUCARRO, de DEL RIO HORTEGA e variantes).

O frio e o calor conduzem os condriosomas a alterações profundas (MAYER, SCHAEFFER, RATHERY, POLICARD e COWDRY)

Oportuno torna-se esclarecer que a congelação, acarretando floculação violenta do citoplasma, destrói por completo os condriosomas; isto se verifica em técnica quando se opera os cortes por congelação sem que tenham previamente as peças sido fixadas por um fixador químico.

Lembre-se aqui que, além dos fixadores já mencionados pode-se usar o formol isotônico com sucesso.

O caso do aparelho mitocondrial não reduzir o ácido ósmico demonstra sua carência em oleína, lipídio não saturado e portador de liga dupla.

GIROUD e LEBLOND dizem que o fato dos condriosomas reduzirem os sais metálicos parece indicar a existência do ácido ascórbico, vitamina de capital importância nos processos de oxidação e redução.

Segundo MARINESCO, existe relação entre o condrioma e as oxidases.

WATRIN identificou a presença de oxidases no condrioma dos plexos coróides.

PRENANT constatou a presença de peroxidases no condrioma de diversas espécies celulares.

Também o glututião foi encontrado por JOYET-LAVERGNE nos elementos do condrioma, o que é contestado por PARAT.

Se real a presença dêste tripeptídio, estaria explicado a sua interferência no fenômeno da respiração celular e sua ação como ativador de enzimas.

LEVI considera o condrioma como o componente menos disperso dum sistema coloidal complexo, fundamentalmente constituído por uma fase de maior dispersão, o hialoplasma, e uma de menor, os condriosomas. Diz ainda que entre ambas as fases se produzem trocas de substâncias, como já foi comprovado em células cultivadas *in vitro*, observando-se dissolução de alguns condriosomas e, ao contrário, formação de outros novos no seio do hialoplasma. Constituiria, pois, o condrioma um perfeito sistema coloidal reversível.

Da intercorrelação condrioma e a porção anista do citoplasma e do grau de resistência dos condriosomas nas diferentes células, falam as experiências de PÉTERFI, OLIVO e CHAMBERS.

Péterfi e Olivo observaram que, quando se pratica uma leve punção em uma célula cultivada *in vitro* mediante a agulha do micromanipulador, na região le-

Diferenciação entre mitocôndrios e graxas (especialmente misturas de oleina, estearina e palmitina)

| MÉTODOS EMPREGADOS | Tecidos frescos corados no vermelho escarlate de HERXHEIMER ou no SUDAN IV | Fixados no FLEMING com ac. acético e examinados em cortes não corados | KOPSCH ou MANN-KOPSCH | Fixados no REGAUD ou Formolína, hematoxilina ferrica | Tecidos fresco corado em verde JANUS a 1:10.000 |
|--------------------|--|---|---|---|---|
| MITOCÔNDRIOS | Não se coram nitidamente, dissolvendo-se no geral | Não os evidencia dissolvendo-os, geralmente, excepto em certos casos, de mitocôndrios ácido acético resistentes | Amarelo ou negro: se negros — dificilmente descoram pela terebentina; se amarelos — são corados na fucsina ácida de ALTMANN | Enegrecem | Verde |
| GRAXAS | Coram-se esplendidamente (observamos entretanto que embora o melhor esc. de HERXHEIMER não core os mitocôndrios pôde corar outros lipóides que não graxas verdadeiras) | Enegrecem | Enegrecem e, facilmente, descoram após algumas horas quando tratadas pela terebentina | Não são coradas, pois foram dissolvidas pelo reagentes de clarificação (xilol ou clorofórmio, não pelos vegetais) | Não se coram |

sada, sobrevém uma modificação nos caracteres da porção anista do citoplasma e dos condriosomas. Esta modificação se verifica simultaneamente nas duas porções, o que não sucederia se êstes dois componentes citoplasmáticos fôsem independentes entre si. Dêste modo houve rutura do equilibrio do sistema coloidal porém sómente em uma região limitada do citoplasma.

Os condriosomas tomam aparência granular e os grânulos de graxa e lipoides apresentam com frequência movimentos brownianos, enquanto que a porção anista se torna mais refringente do que nas regiões contíguas, surgindo ainda esférulas hialinas, muito transparentes e cuja presença indica que no colóide homogêneo se produziu uma separação de fases. Ao cabo de alguns minutos, todos êstes sinais de alteração desaparecem chegando ao ponto das células não se diferenciarem em nada das que as cercam, tendo portanto o sistema coloidal recuperado completamente o primitivo estado de equilibrio.

CHAMBERS constatou que, ao contrário, o condrioma dos espermatocitos são mais resistentes. Segundo as suas investigações, isolando-se um espermatocito em divisão mediante uma finissima agulha de vidro, os condriosomas se agrupam em massa gelatinosa, conservando, porém, por algum tempo, sua individualidade morfológica. Destruindo-se uma célula filha

no transcurso da telófase mitótica, verifica-se que, da célula que permanece íntegra, pende um grupo de filamentos constituído por condriocentos, os quais, durante a telófase, estavam aderentes ao fuso. Esta diversidade de comportamento do condrioma em relação ao trauma, é verdadeiramente devida a sua consistência, que não deve ser igual em tôdas as células (Levi).

CHAMPY acha que a disposição dos condriocentos e sua tendência a se entumescerem nas extremidades em forma de bola e de se libertarem, lembra de maneira flagrante a forma e a mutabilidade de alguns cristais fluentes.

Compara, assim, o condrioma ao resto do citoplasma cuja constituição lipoproteica o diferencia do mesmo, formando destarte do ponto de vista coloidal fase distinta, donde resulta a forma alongada dos condriocentos provavelmente oriundos do agrupamento de grandes moléculas.

PENSA, LEVI e LOWSHIN interpretam o condrioma como produto de gelificação das substâncias coloidais constitutivas do citoplasma, semelhantes as formas mielínicas de Quinke que se formam igualmente *in vitro* nas substâncias coloidais.

Documenta PENSA a sua opinião com estudos realizados em células vegetais, cuja observação microscópica permite ver, no seio da substância pigmentada, imagens semelhantes aos condriosomas, que nada mais são do que a *antocianina*. (Pétala de rosa)





A gelificação que dá lugar a esta imagem na antocianina surge, provavelmente, como fato espontâneo em relação às variações das condições físico químicas da célula.

A semelhança das imagens com os condriosomas é tal, que levou PENSA a julgá-los como sendo também produtos de gelificação do protoplasma celular.

O referido autor acrescenta, a mais, que as reações químicas e as contínuas e alternativas passagens do estado de "sol" ao de "gel", e as variações de densidade das partes gelificadas caracterizam as diversas formas com que se apresentam os condriosomas.

LEVI conclue que, para a vida e função normal das células, é necessário a presença em seus citoplasmas de certa quantidade de colóide gelificado em forma de condriosomas contendo lipídios fosforados.

Em resumo, a constituição lipoproteica do condrioma apresenta propriedades físico-químicas particulares que o distingue dos demais elementos celulares e que se podem condensar nos itens abaixo:

I — Possui refringência maior que a do citoplasma no qual se acha mergulhado, fator que permite sua pesquisa em certas células vivas, o que demonstra não ser o aparelho mitocondrial um artifício.

II — Os condriosomas se deixam corar pelos métodos ditos vitais ou supravitais de tal sorte que se podem evidenciá-los no estado vivo.

- III — O condrioma não reduz o ácido osmico, que no entanto o fixa bem.
- IV — O aparelho mitocondrial só se fixa e se cora bem mediante o emprego de métodos especiais ou digamos específicos para os seus elementos (Altmann, Benda, Regaud e variantes).

FUNÇÃO DO CONDRIOMA

E' no estudo da fisiologia do condrioma, que encontramos uma verdadeira plêiade de cientistas esforçados em desvendar as principais funções dêste aparelho, cuja significação histofisiológica, ainda não está bem esclarecida, mas que, no entanto, torna-se a cada instante imprescindível na estrutura e vida celular, tal a sua importância nos momentos mais íntimos da biologia da célula.

Desde ALTMANN vem a função do condrioma preocupando os investigadores, motivo que deu origem a varias concepções, hipóteses e conclusões, não se chegando, contudo, ainda, pelas pesquisas atuais, a uma afirmação definitiva sobre o importante papel, que se percebe haver, do aparelho mitocondrial, na fisiologia celular.

Dos estudos realizados conclue-se que, em verdade, o condrioma exerce papel de relevância no metabolismo da célula e nas elaborações citoplasmáticas,

funções básicas e que são, em parte, documentadas por experiências e observações oriundas do campo experimental e, por outro lado, resultantes de pesquisas igualmente experimentais e cuja sistematização nos convencem dos seus resultados.

Encontramos destarte divergências de opiniões entre os vários biólogos que se dedicaram aos seu estudo.

Para uns, os condriomas se transformam substancialmente em produtos de secreção; para outros, o condrioma exerce influência, por simples ação de presença, como um catalisador; vemos outros que lhe atribue papel de destaque na edificação de algumas diferenciações celulares, tais como as fibras colágenas, elásticas e reticulares, fibras neuróglícas, miofibrilas, tonofibrilas, neurofibrilas, etc. MEVES acha que o aparelho mitocondrial serve de base á herança protoplásmica; para COWDRY o condrioma intervém de forma mais ou menos direta na elaboração de numerosas substâncias e, em 1918, publicou uma lista de 80 destas substâncias; para REGAUD os mitocôndrios selecionariam substâncias do citoplasma, condensando e transformando-as. KINGSBURY em 1912 lhes confere papel de participantes ativos da função respiratória da célula. Em 1914 MAYER, RATHERY e SCHAEFFER sustentaram a mesma opinião baseados em que as fosfátidas, com ácidos graxos não saturados e grupos etilídénicos, estão perfeitamente adaptados á função óxido, redutora respiratória. A êste respeito diz BOUIN que-

encarando se desta forma o papel do condrioma, compreende-se sua presença em todas as células, sua abundância nos elementos de grande atividade funcional e sua estrutura proteolipóidica.

Quanto a hipótese do condrioma se transformar substancialmente em produtos de secreção, a defendem autores como SCHULTZE, HOVEN, CHAVES, MORELLI, e DEBEYRE, achando-se que os condriosomas fixam previamente materiais escolhidos por êles no meio interior do organismo (ecletosomas), depois transformam-os em *plasto* (substância plastica) que, por sua vez, dão origem a grãos de secreção. Desta maneira, os condriomas aumentam inicialmente de volume deixando, ao cabo de algum tempo, transparecer granulações graxas que se evidenciam tratando-se os cortes pelo vermelho neutro e verde Janus. O primeiro destes corantes tingem o centro do elemento, de vermelho e, a periferia, corada pelo segundo, se mostra como uma casca de cor verde. Este corte termina por se dilacerar deixando, como resíduo, delicadas granulações punctiformes disseminadas em uma área mais ou menos extensa do citoplasma.

LAGUESSE admite que, nas células pancreáticas do vertebrados inferiores, a reconstrução do condrioma se efetua na dependência do paranúcleo (Neben Kern) que é de origem nuclear, ou diretamente na dependência do núcleo nos elementos desprovidos de paranúcleo, como nos mamíferos.

REGAUD, NAGEOTTE, ATHIAS, NOEL e DUBREUIL são de opinião de que o condrioma funciona como catalisador, isto é, selecionando as substâncias para as células e operando sínteses que dão origem à produtos de elaboração. Por êste conceito, o condrioma persiste no citoplasma após a excreção ou utilização *in situ* do referido material.

Esta interpretação foi constatada, de maneira eloqüente, em relação às pesquisas executadas nas células vegetais. Entre elas, destacam-se as de GUILLERMOND e de seus alunos dirigidas tão somente pela perseverança dêste grande biologista no estudo desta minúscula organização celular.

Anteriormente ao estudo do condrioma animal, os botânicos assinalaram nas células vegetais a presença de grãos volumosos na dependência dos quais se elaboravam algumas inclusões, como o amido, a clorofila e os pigmentos.

Apareceram então os *leucitos* de Van TIEGHEM, e os *plastos* de SCHIMPER em 1880.

As pesquisas de MEVES, DUESBERG, HOVEN, LEWITSKY, COWDRY e GUILLERMOND mostraram que os plastos derivam de pequenos elementos semelhantes aos mitocôndrios das células animais e, principalmente, as investigações de GUILLERMOND e de seus alunos MANGENOT e EMBERGER, provaram que é, igualmente, na vizinhança imediata ou no seio dos mito-

côndrios e dos condriocontos, que se elaboram e se condensam os grãos de amido e as inclusões pigmentares. Ficou igualmente constatado que são os mitocôndrios que se transformam nestes volumosos plastos, designados por SCHIMPER e A. MAYER de *cloroplastos* ou *cloroplastídios*, nos quais se fixa a clorofila, tornando-se, dêste modo, os agentes da fotosíntese.

Verificaram, outrossim, que êstes plastos persistem no citoplasma após mesmo a reabsorção do amido ou da clorofila.

Segundo a concepção de MEVES, os condriosomas, elementos permanentes da célula, são capazes de se reproduzirem por divisão e de se transmitirem, de forma contínua, do ovo fecundado a todos os elementos celulares do embrião, representando, destarte, papel preponderante em Genética.

O advento desta concepção foi o fruto de investigações dirigidas por MEVES no estudo dos espermátocitos de um molusco — *Paludina Vivípara*.

Durante as mitoses que precedem a formação do zoosperma (espermátidas), os condriosomas se dispõem em figuras que se assemelham as dos cromosomas e que revelam que a natureza, ao repartir tais grânulos nas células filhas, procedem com a mesma perfeição que ao distribuir nos núcleos filhos os filamentos cromáticos.

Assim se expressa RAMON CAJAL sôbre os estudos de MEVES nas células seminais da *Paludina Viví-*

para. Nos espermatocitos dêste molusco, observou MEVES que, nas diversas fases da cariocinese os mitocôndrios de início se dispõem em grânulos em tórno da esfera atrativa, formam depois cadeias de anéis que, dispostos durante a metáfase, em uma espécie de estrêla mãe, complementar à de cromatina, dividem-se transversalmente nos estados ulteriores para restabelecer novamente um grupo de anéis pericentrosomáticos.

Nas fases posteriores os mitocôndrios, antes dispersos no protoplasma, se concentram e constituem um verdadeiro envólucro em tórno da peça intermediária do espermatozóide.

A esta observação, acrescenta-se, as de BENDA e WALDEYER nas espermátidas de alguns animais, em que verificaram igualmente que os mitocôndrios, antes dispersos no corpo celular, nesta fase, se fundem em colônias para constituirem o filamento espiral.

Dêste modo, em tórno da peça intermediária do espermatozóide, verifica-se a presença de uma substância especial, disposta em forma de manguito e corável pela hematoxilina férrica, cujo contórno oferece aspeto granuloso característico.

O fato demonstrado por MEVES de que os condriosomas do zoosperma e do óvulo participam na fecundação, repartindo-se no embrião pelo protoplasma de todos os elementos, empresta, ao aparelho mitocondrial uma dignidade fisiológica muito superior à das inclusões co-

muns das células e, principalmente, a hipótese sugerida por êste cientista de que o referido aparelho intervém na hereditariedade em igual ou maior percentagem do que a cromatina nuclear.

Os mitocôndrios estudados *in vivo* em algumas células glandulares e ainda noutras cultivadas *in vitro*, não permitiram a observação de que fôsem elementos ativos na edificação de grânulos secretores, conforme testemunham COWDRY, LEVI, MICHAELIS, PARAT, PAINLEVÈ e LEWIS.

Quanto ao papel elaborador do condrioma, não concordam MAYER, SCHAEFFER e RATHERY porque acham difícil de dissociar, em sua estrutura, o núcleo protídico capaz de satisfazer as sínteses exigidas para tal fim.

Acrescente-se aquí a opinião de BENDA, que considera que as figuras de transição, descritas entre os condriosomas e as granulações secretoras, não são mais do que artefactos originados pelos reativos fixadores, ou imagens devidas a emprêgo de métodos tintoriais não específicos, e conclue achando que o aparelho mitocondrial intervém na função de contratilidade protoplásmica.

Para muitos autores, o condrioma representa, na célula, um verdadeiro agente transformador dos enzimas; pensam outros que êsses elementos atuam pela sua superfície (camada monomolecular), onde seriam con-

densados os ácidos aminados, o glutatião e os enzimas proteolíticos.

O que de fato se nota pelas experiências realizadas, é que o condrioma representa um papel importante no metabolismo, podendo-se assim considerá-lo como um elemento fundamental entre aqueles que participam das operações químicas intracelulares.

Em relação à doutrina de MEVES, DUESBERG, etc., segundo a qual os mitocôndrios dos corpúsculos do embrião representariam os germes do retículo específico dos elementos nobres, tais como as neurofibrilas, as miofibrilas etc., podemos declarar que não foi aceita pela maioria dos autores, mas, no entanto, os mesmos não apresentam documentação satisfatória e contrária a esta doutrina.

Sôbre êste assunto temos em mão o interessante trabalho de J. SZEPESENWOL, chefe dos trabalhos do laboratório de Anatomia da Universidade de Genebra, intitulado "Le rôle morphogénétique du chondriome" e publicado no "Bulletin d'Histologie", tomo XI, n.º 8 de 1934, pág. 302, em que trata, de forma magistral, das relações existentes entre condrioma e edificações fibrilares. Diz êste autor que, apesar dos numerosos trabalhos realizados sôbre o condrioma, atualmente, pouco se sabe sôbre o papel morfogenético do mesmo. Relata que, antes da descoberta do aparêlho mitocondrial por BENDA, vários autores haviam descoberto, em diversas

células do organismo, corpúsculos que se apresentavam sôbre a forma de granulações ou de bastonetes e lhes tinham atribuído um papel principal na edificação da substância fibrilar. Entre êsses investigadores são citados os nomes de REINKE (1894), FLEMMING (1897), GOLOWINSKI (1907), GODLEWSKI (1902), MOLDOWSKA (1908), que assinalaram nos fibroblastos a existência de pequenos órgãos que constituíam, segundo êles, os elementos precursores dos filamentos colágenos, enquanto que os dois últimos encontraram elementos análogos, estudando a formação das miofibrilas nas células musculares, fato igualmente constatado por BENDA, em 1899. Foi, no entanto, MEVES (1907-1910) o primeiro que enunciou de maneira categórica que as mitocôndrias representavam papel importante na edificação do sistema fibrilar. Assim, as grânulações ou bastonetes, forma sôbre as quais os condriosomas se apresentam, representam, segundo êste autor, elementos precursores das miofibrilas, neurofibrilas, fibras colágenas, etc. afirmando ainda que estas resultam da fusão dos condriosomas e, principalmente, dos condriocontos que se unem pelas extremidades, sendo que desta fusão resulta uma formação química secundária.

Condrioma e fibras colagenas — Recapitula, então, o autor que as fibrilas pre-colagenas de GOLOWINSKI se coram como os condriocontos e as experiências praticadas no tendão da pata de um embrião de galinha pelos

autores alemães, mostrou que os condriocentos sofrem transformações importantes. Alojados, a princípio, no centro da célula, ao redor do núcleo, emigram em seguida, para a periferia, numa zona chamada "épícelular" para depois se alongarem, aumentarem de diâmetro e mudarem de constituição química, de tal sorte que, ao lado dos bastonetes escuros (corados pela hematoxilina férrica), aparecem filamentos (tintos em velmelho pela fucsina) que constituem os primeiros elementos do tecido colágeno.

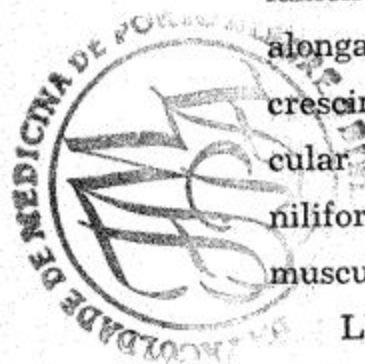
Nêste movimento de formação das fibrilas, verifica-se que, após a soldadura das extremidades dos condriocentos, elas se destacam rapidamente da superfície do citoplasma, tornando-se intercelulares. De tôdas estas mutações, a única assinalada por MEVES, é a da emigração epícelular dos condriosomas, enquanto que a transformação química e a fusão mútua não são senão frutos da imaginação dêsse autor. A teoria de MEVES é defendida por ROMEIS (1913), SERAFINO d'ANTONNA (1914) e FREDERIKSE (1917) que nada acrescentam de novo aos fatos observados por MEVES. Em 1913 DUBREUIL estuda o condrioma das células conjuntivas jovens; não verifica a transformação destas em fibrilas, mas, nos territórios em que a atividade secretora é mais intensa (células ragiocrinas), constatou que os elementos mitocondriais aumentam consideravelmente, o que lhe permitiu deduzir que as fibrilas conjunti-

vas têm origem na substância intersticial, recebendo apenas dos condriosomas as substâncias indispensáveis à sua elaboração.

LEVI, MARGARET READ LEWIS e LAGUESSE contestam igualmente a doutrina de MEVES, achando que as fibras colágenas não se originam nunca dos condriocontos e sim, talvez, de formações pré-existentes no meio intersticial ou do exoplasma fatos resultantes da observação de cultura de tecidos.

Condrioma e miofibrilas. — Concordando com os trabalhos de MEVES, na transformação direta e integral dos condriocontos em miofibrilas, DUESBERG, em 1909, estudou a diferenciação mioblástica em embriões de mamíferos, encontrando os condriocontos sob a forma de filamentos mais ou menos curtos, isolados a princípio, alongando-se rapidamente à medida e à proporção do crescimento do mioblasto e dando origem à fibrila muscular homogênea que não tarda a apresentar aspecto moniliforme para, em seguida, assumir o espeto de fibrila muscular estriada, resultante da fusão dos condriosomas.

LEPLAT (1911), LUNA (1913) e NAVILLE (1922) aceitam e concordam com a doutrina de MEVES e com os estudos de DUESBERG. HOSSELET em 1928 após estudos realizados sobre a diferenciação dos músculos na ninfa do *Culex annulatus* concluiu que os condriocontos se transformam em discos escuros. Em 1912 LEVI, observando o comportamento do condrioma na





elaboração das miofibrilas, verificou que, em realidade, êste aparelho intervém de certo modo, na edificação miofibrilar mas, no entanto, não aceita a teoria de MEVES.

GAUDISSERT, em 1919, discorda, após estudos realizados sôbre a diferenciação mioblástica na galinha, da transformação direta dos condriocentos em fibrilas musculares.

Condrioma e neurofibrilas — Poucos autores têm se preocupado com o estudo das relações entre condrioma e neurofibrila e, entre êsses, se distingue HOVEN que, em 1910, constatou que, nas células nervosas de um embrião de galinha de menos de 72 horas, os condriocentos se acham repartidos sem ordem ao redor do núcleo, enquanto que, em embriões de mais de 72 horas de incubação, algumas células nervosas pirofórmes ou unipolares, apresentam deslocamento do aparelho mitocondrial em direção aos seus prolongamentos e, nesta fase, conseguiu, por meio dos sais de prata, surpreender a existência de neurofibrilas. Estudando comparativamente as suas preparações coradas pelo método de BENDA com as pelo método de CAJAL, impregnação pelo nitrato de prata, verificou HOVEN que os condriosomas se apresentam, quanto à forma e orientação, de modo análogo às neurofibrilas. Em fase mais adiantada constatou êste autor que o número dos condriosomas diminuía na razão inversa do aparecimento das neurofibrilas, sendo, então, o aparelho mitocondrial representado na

célula adulta, apenas por pequenas granulações ou filamentos curtos, dispostos ao redor do núcleo.

Conclue HOVEN, baseado em seus dados experimentais, que o condrioma representa, na célula nervosa, o estado primitivo indiferenciado das neurofibrilas. Desta forma, apóia HOVEN, de maneira integral, a concepção de MEVES.

Após estas considerações, SZEPESENWOL apresenta o resultado de suas pesquisas pessoais que foram realizadas em aves e batráquios e cujas técnicas adotadas foram as de impregnação pelo nitrato de prata, segundo o método de BIELSCHOWSKY, fixação das peças no líquido de BENOÏT e coloração das mesmas pela hematoxilina férrica de REGAUD ou pela fucsina ácida de ALTMANN. Em seguida discorre o autor sôbre os estudos e observações colhidos nos diferentes estados embrionários dos pássaros, assim como nas diferentes fases das larvas dos batráquios, estabelecendo, por fim, discussão relativa aos fatos mais concludentes e da qual escolhemos, para anotar aquí, as que mais interessam ao nosso estudo.

Declara o nosso articulista nunca ter observado nos pássaros ou nos anfíbios a fusão dos condriosomas que, segundo êle, se conservam com a mesma forma desde o início do desenvolvimento até aos estados de diferenciação os mais adeantados, ora sob a forma de granulações (anfíbios), ora sob a fórmula de bastonetes (pássaros).

Diz, ainda, ter observado que o condrioma persiste, enquanto que o rêde neurofibrilar já está completamente diferenciada, observação feita igualmente por CAJAL, COWDRY, PARAT e outros.

Estas observações são completamente contrárias à hipótese de MEVES-HOVEN.

O que se passa, explica o autor, não é uma transformação integral dos condriocontos em neurofibrilas. Deve HOVEN, em seus trabalhos, ter tido uma causa de erro motivada, naturalmente, pelo emprêgo, em suas preparações, da hematoxilina férrica que, corando simultaneamente neurofibrilas e condriocontos, não lhe permitiu distinção precisa entre êstes dois elementos.

Continuando, SZEPESENWOL declara que não há transformação direta dos condriocontos em neurofibrilas, existindo, entretanto, relação entre êsses dois constituintes celulares porque a substância filamentosa toma origem na vizinhança dos elementos do condrioma.

Nos pássaros os elementos argentófilos começam a aparecer na zona fibrilógena de HELD, enquanto que os bastonetes enegrecidos pela hematoxilina férrica vão, nesta zona, se concentrando.

Nos batráquios, os fenômenos são mais demonstrativos; a substância neurofibrilar aparece sob a forma de granulações cuja distribuição é idêntica ao do condrioma. Por outro lado, nos neuroblastos mais diferenciados, êste último se concentra em agrupamentos no colo periférico

da célula, onde a rede argentófila sofre a diferenciação. Esta coincidência de fenômenos fala em favor da existência de uma relação de causa e efeito entre essas duas organizações citoplásmicas.

Ao concluir, o autor lança a opinião de que o condrioma representa, nestas células, um papel de catalisador, segundo o termo de NAGEOTTE.

O CONDRIOMA E PROTOPLASMA FUNCIONAL — O CONDRIOMA NA CULTURA DOS TECIDOS — O CONDRIOMA E APARELHO RETICULAR DE GOLGI

No citoplasma existem formações que se podem aproximar ao condrioma. Por exemplo, os grandes agrupamentos esféricos chamados “Nucleos vitelinos”, que se encontram no citoplasma, ou “Vitellus” de alguns ovos em crescimento, que são formados por lâminas concêntricas possuindo as mesmas afinidades para os corantes do condrioma, que, segundo alguns autores, se assemelham a condriocitos enrolados.

Outra formação vizinha do condrioma é o protoplasma funcional, ergastoplasma.

Êstes dois elementos podem coexistir na mesma célula, razão pela qual devem ser cuidadosamente distinguidos. REGAUD diz que o condrioma é um órgão permanente que persiste durante a mitose; que ocupa toda a extensão do citoplasma e que se observa em todas as

células sem exceção, fornecendo, dêste modo, três caracteres distintos e que servem para estabelecer as diferenças com o ergastoplasma.

Para outros autores, ao contrário, o ergastoplasma e o condrioma são dois aspetos de u'a mesma substância tratada por reativos diferentes.

PRENANT estabelece a diferenciação entre êstes dois elementos, praticando o exame em células vivas, em tecidos frescos e corados, concluindo que o aspeto do condrioma é mais preciso do que o do ergastoplasma.

GARNIER e BOUIN são de opinião de que as formações ergastoplásmicas, descritas principalmente no protoplasma basal das células glandulares e nos gonocitos em evolução, sejam consideradas como um protoplasma distinto do condrioma e igualmente diferente do protoplasma fundamental, por apresentarem propriedades tintoriais particulares.

Outros autores, como REGAUD e BENOÏT, apresentam as seguintes distinções entre ergastoplasma e condrioma:

- 1.º — O ergastoplasma resiste à ação do ácido acético que faz desaparecer o condrioma;
- 2.º — Ergastoplasma e condrioma podem coexistir na mesma célula;
- 3.º — Não existe paralelismo entre a importância do ergastoplasma numa célula e abundância de seu condrioma, como deveria ser, se os filamentos ergastoplásmicos resultassem da alteração dos condriosomas,

O método idealizado por HARRISON — BURROWS — CARREL para cultivar tecidos *in vitro* tem prestado valor inestimável em biologia experimental.

Quase todos os ramos da ciência médica se têm servido dêste notável processo para as multiplas investigações de que carecem e, neste particular, a histologia moderna tem aurido ensinamentos preciosos, principalmente, no que concerne a citologia atual.

Nestes últimos anos, o estudo da célula e dos tecidos receberam, por seu intermédio, um impulso verdadeiramente maravilhoso. Assim, além de observação morfológica, pôde-se igualmente patentear as questões de ordem fisiológica.

Utilizando-se de vários processos, oriundos do original, diversos cientistas têm contribuído com valiosos ensinamentos acêrca dos elementos constitutivos do protoplasma, podendo, mesmo além do estudo sistemático das diversas partes do citoplasma, lançarem, como recursos, a fotografia e a cinematografia.

Assim, tem sido constatado a presença do condrioma em tôdas as células cultivadas *in vitro*, testemunho da existência, morfologia e propriedades fisiológicas do do referido aparêlho.

A divulgação do processo foi de real valor para o estudo do aparêlho mitocondrial, tanto que, todos os trabalhos que visam de preferênciã a função do condrioma, vão buscar subsídio na cultura dos mesmos *in vitro*, pois,

grande número de investigadores têm conseguido argumentação, favorável ou não, às questões dos condriosomas por meio d'êste engenhoso método.

Além dos elementos já citados, impõem-se ainda aqui, a citação do *vacuoma*, aparelho reticular de GOLGI, que deve, igualmente, ser distingüido do aparelho mitocondrial.

MEVES considerou o aparelho reticular de Golgi como sendo um quarto tipo de condriosoma, mas, esta afirmação não foi aceita pelos autores até êste momento.

Indiscutivelmente, o condrioma mantém com o aparelho de GOLGI relações mais ou menos estreitas, mas que, na prática, se distinguem, não só, pelas reações titoriais, como também, pelo aspeto morfológico e distribuição no seio do citoplasma.

Não será supérfluo recordar de momento o que seja a zona de Golgi. Esta zona citoplásmica é caracterizada:

- 1.º — Pela facilidade com que os lipóides e as proteínas se libertam da sua união;
- 2.º — Por sua riqueza em água, do que resulta a formação de numerosos pequenos vacúolos ao nível dos quais se condensa o vermelho neutro.

Êstes pequenos vacúolos, de conteúdo sobretudo aquoso, assinalam o aparecimento do *vacuoma*, vendo-se em contato com êles grandes condriosomas (*condrioma peri-vacuolar*) em forma de escama (*lepidosomas*) que devem à sua maior resistência e à sua colorabilidade a

facilidade de serem postos em evidência pelas impregnações metálicas. Os lepidosomas localizados na região supra-nuclear ou misturadas aos elementos do vacuoma para formar a zona de Golgi, são muito ativos do ponto de vista secretor, (*condrioma ativo*), fato que os distingue do condrioma situado no resto da célula, principalmente na região infra-nuclear (*condrioma celular*), cuja atividade fisiológica reduzida está em relação com as funções gerais da vida celular. Vacuoma e lepidosomas formam uma associação funcional que intervém na maior parte das elaborações (*vacúolos plasmócrinos, vacúolos raiócrinos . . .*), de que são séde as células secretoras.

Também essa associação faz da zona de Golgi a zona verdadeiramente secretora do citoplasma. No momento da excreção celular, os vacúolos confluem e formam uma verdadeira rede cujo aspeto lembra o do aparelho de Golgi (BEYLOT e BAUDRIMONT).

Transcrevemos abaixo o quadro diferencial entre aparelho reticular de Golgi e condrioma, que se encontra na excelente técnica de LEE.

Diferenciação entre o Aparelho de GOLGI e Mitochondrios

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|--|--|---|--|------------------------------------|
| MÉTODO EMPREGADO | Método de GOLGI — tratado de prata; CALZADA FANO | KOPPSCH, MANN KOPPSCH (métodos do tetroxido de ósmio) | FLEMMING — sem ac. acético, REGAUD, CHAMPY, formalina etc... seguida pelo alúmen de ferro, hematoxilina. | Verde JANUS a 1:10.000 | Ultracentrifuga |
| APARÉLHO DE GOLGI (Dictyosomes, nebenkern, bâtonnettes, idiozome, rods, etc...) | Negro (acentuado) | Enegrecem | Não evidencia a não ser na ovogonia ou ovocitos muito jovens e nas células germinativas masculinas; raramente noutras células | Raramente cora (excepto nas células germinativas masculinas) | Passam a ocupar posição central |
| MITOCONDRIOS | Dourado (não acentuado) Pardo (acentuado) Negro — mais raramente | Não coram; amarellecem ou raramente enegrecem | Quando corado o é, geralmente, menos intenso que os mitochondrios Em alguns casos obtém-se uma imagem negativa do Ap. de GOLGI | Verde | Passam a ocupar posição periférica |

Em resumo, o condrioma constitue no citoplasma um verdadeiro aparelho de forma, composição e função, diferenciado do resto dos elementos componentes do protoplasma celular.

DO CONDRIOMA EM PARTICULAR

Exposto como foi, do condrioma em geral, passamos agora ao seu estudo nas diferentes células dos diversos órgãos, cuja presença, localização, distribuição e fisiologia caracterizam as células e o aparelho mitocondrial de maneira particular.

Servimo-nos, para tal fim, de trabalhos publicados no "Bulletin d'Histologie", "Comptes Rendus" e "Archives d'Anatomie Microscopique" assim como de algumas obras que fazem igualmente parte da relação de nossa bibliografia.

Pela leitura atenta dêste manancial científico, conclue-se de início que o condrioma mais bem estudado é o da célula hepática, naturalmente, por apresentar ela as duas funções (exócrina e endócrina), não deixando, no entanto, de abordar, porém de forma mais sucinta, o seu estudo em células de outros órgãos.

Quanto à nossa observação, reservamos para mais adiante expressá-la no capítulo intitulado: — Pesquisas Pessoais.

Dos trabalhos que nos orientam na feitura dêste artigo ressaltam os de R. Noel e G. Pallot sobre "Recherches histophysiologiques sur la cellule hépatique des Mammifères", do qual extraímos o que mais nos impres-

sionou sobre o condrioma hepático, investigado respectivamente no camundongo, no rato e no gato, e publicados nos "Archives d'Anatomie Microscopique" em 1923 e no "Bulletin d'Histologie" em 1933/34.

O objetivo do trabalho, declara o autor, é o de pesquisar as modificações morfológicas sofridas pela célula hepática sob a influência de diversas condições de funcionamento.

O estudo foi dirigido simultaneamente à observação da célula hepática viva (estudo vital) e à célula hepática fixada (estudo post-vital).

O animal escolhido foi o camundongo que, após a abertura da cavidade abdominal por uma incisão grande, tendo sido previamente atordoado por uma pancada na cabeça, permitiu fôsse extraído o fígado, estando ainda pulsando o coração (condição ótima para colheita de material).

Depois de ser reduzido a lâminas muito finas e colocado entre lâmina e lamínula com algumas gotas do sôro de Locke, observou que o parênquima hepático se apresenta como uma superfície acinzentada, em tabuleiro de xadrez, sobre o qual se destaca a secção dos grandes vasos centro e peri-lobulares que constituem, pelas razões que exporemos mais adiante, pontos preciosos de reparo para o estudo de determinada variedade de condriosomas. Dêste modo a veia centro-lobular é envolvida por uma zona especial a qual o autor chama

de “zona de repouso permanente” e na qual os condriocontos são constantes e muito abundantes.

Fator importante é o tempo da manipulação do preparado, pois êste não deve ultrapassar de alguns segundos, sob pena de se alterarem os condriosomas, dada a sua delicadeza de forma e constituição, conforme dissemos páginas atrás.

Na observação *in vivo*, no caso para os condriosomas, diz NOEL, que foi em vão que ensaiou o verde Janus, o violeta dália e o azul de pirrol, indicados por diferentes autores. Para êle os condriosomas não necessitam de coloração específica para se tornarem vizíveis nas células vivas pois, dada a sua refringência e forma própria, se destacam sôbre o fundo homogêneo do gel protoplásmico.

O condrioma em estado vivo na célula hepática, observada no sôro de Locke tépido, sem coloração, alguns segundos depois da morte do animal, se apresenta seja sob a forma de longos condriocontos ondulosos e entrecruzados entre si, seja sob a forma de curtos bastonetes, destacando-se, em ambos os casos, nitidamente. Acham-se repartidos mais ou menos de modo uniforme na área protoplásmica e não apresentam movimentos facilmente perceptíveis, deixando ver entre si mitocôndrios granulados, arredondados, de dimensões iguais e de refringência idêntica ao dos condriocontos.

Algumas células possuem condrioma quase que ex-

clusivamente constituído por filamentos delgados, alongados e de calibre uniforme. Em outras, o citoplasma contém, em proporções mais ou menos iguais, mitocôndrios e filamentos e, em uma terceira categoria de células pode-se observar granulações cujo volume ultrapassa de muito o dos mitocôndrios granulosos, de refringência idêntica ao dos condriosomas, constituindo, não o próprio aparelho mitrocondrial, mas sim, plastos elaborados por êle.

Aconselha NOEL que o meio prático de observar os condriosomas consiste em os pesquisar ao redor dos grandes vasos, sem querer identificar, a princípio, as veias portas e as supra-hepáticas.

Esta identificação se fará *a posteriore*; as veias supra-hepáticas estão cercadas de células cujo condrioma é quase sempre filamentososo, enquanto que as células peri-portais contêm geralmente granulações elaboradas.

O tempo, durante o qual os condriosomas não se modificam nas células vivas, pode ser avaliado mais ou menos em 20 minutos, findo os quais se iniciam alterações que se traduzem pela mudança de forma dos mitocôndrios ou dos condriocontos que se apresentam arredondados, fusiformes ou em vesículas, fato já assinalado no capítulo anterior.

No estudo da célula hepática do camondongo branco, Noel empregou, para a observação post-vital do condrioma os líquidos fixadores de Regaud, líquido de TUPA

(soluções I e II) e o ácido ósmico, associado aos ácidos crômico e acético e, como métodos de coloração, utilizou os de Altmann, Kull, Benda e o da hematoxilina férrica de HEIDENHAIN.

Além destes processos utilizou, para a elucidação da natureza de algumas elaborações intracelulares, o método de CIACCIO para a pesquisa dos lipóides, o da fixação pelo formol isotônico e coloração pelo vermelho Sudan ou o vermelho escarlata utilizado para a evidência das graxas.

Diz o autor que a célula hepática do camundongo branco constitue uma notável peça de estudo para o condrioma; que os condriosomas se apresentam ora sob a forma de delicadas granulações, os mitocôndrios, ora com o aspecto de filamentos mais flexuosos de comprimento variável, os condriocontos e que nunca observou as cadeias de grãos, designadas desde MEVES com o nome de condriomitos.

Acha que o condrioma representa um papel de primeiro plano no metabolismo celular, que sua morfologia está em relação estreita com a função da célula, motivo que o fez classificar as células em duas categorias:

- 1.º — Células cujo condrioma é filamentososo;
- 2.º — Células cujo condrioma apresenta modificações morfológicas em relação com o papel elaborador.

Em relação às células com condrioma filamentososo, diz o autor que é necessário assinalar com exceção de

uma zona especial e vizinha da veia centrolobular que denomina de “zona de repouso”, que as células hepáticas nunca se encontram em estado de repouso absoluto, fato evidenciado pelos elementos cuja forma modificada serve de índice à atividade funcional.

Foi na zona da veia supra-hepática que o referido autor encontrou condriocontos alongados, uniformemente distribuídos na massa citoplásmica, constituindo uma verdadeira trama de filamentos tortuosos cuja direção principal está perpendicular ao bordo da célula que está em contato com a veia.

O comprimento dos condriocontos varia de um micron e meio a cinco micra, algarismos que mostram como se encontram, em estado de repouso, os condriocontos, sendo, no entanto, mais numerosos, os mais longos, entre três e cinco micra, podendo-se encontrar, ainda, forma gigante ou, então, formas curtas e ligeiramente grossas, lembrando bacilos ou cocobacilos.

Ao lado destes filamentos delgados, que parecem ser a principal forma que reveste o condrioma na célula hepática do caso em estudo, encontram-se mitrocôndrios arredondados e dispersos nas malhas da trama constituída pelo entrelaçamento dos condriocontos.

Com BRENANT e ^HCAMPY, NOEL acha que os condriosomas na célula hepática não mostram nenhuma tendência a se concentrarem em um determinado campo do citoplasma.

Quanto às células com condrioma modificado, acrescenta que fora da zona que se descreveu (peri-surpra-hepática), encontra-se, na área citoplásmica das células hepáticas, formações siderófilas ou fucsinófilas semelhantes ao condrioma e que representam em parte produtos de elaboração mitocondrial.

Passa em seguida o autor a discutir a significação das imagens observadas, comparando-as com os resultados fornecidos pela observação vital, achando que não sejam artifícios oriundos da fixação ou da autólise e procura estabelecer a natureza desta elaboração perguntando si se trata de graxa, de glicogênio ou de substâncias albuminóides e conclue dizendo:

1. — o condrioma representa na célula hepática papel importante;
- 2.º — na célula hepática existem duas formas de condriomas: mitocôndrios e condriocontos;
- 3.º — os condriocontos finos e longos se transformam, após uma série de estados intermediários que afetam a sua morfologia, em duas categorias de granulações elaboradas: grãos massivos de natureza albuminóide e grãos ôcos que relacionados, seja à elaboração dos lipóides intracelulares, seja à elaboração de um dos elementos constituintes da bilis ou talvez dos dois ao mesmo tempo;
- 4.º — o condrioma hepático pode, por um mecanismo ligado aos fenômenos físicos da condensação de micelas ao nível das zonas de superfície dos colóides cito-

- plásmicos, fixar em torno de si as graxas intracelulares;
- 5.º — fenômenos idênticos foram observados por REGAUD e MAWAS nas glândulas serosas salivares, por HOVEN no pâncreas e na glândula mamária, por CHAMPY no epitelio intestinal, por PRENANT, ASWADOUROVA e VERNE nas células pigmentares e por DUBREUIL nas células adiposas;
 - 6.º — a elaboração mitocondrial se efetua segundo um ciclo fechado que, partindo dum tipo de condriossoma, volta ao mesmo, passando por uma série de fases ou estados distintos morfológicamente;
 - 7.º — as fases acima assinaladas se repetem em três etapas sucessivas: a) fase preparatória da elaboração; b) plasto; c) fase regressiva;
 - 8.º — estas constatações permitem aproximar os plastos da célula animal aos cloroplastos das Algas e dos Ptéridofitos.

Aponte-se aqui, ainda, os interessantes estudos de NOEL sôbre a histofisiologia do lóbulo hepático cuja atividade funcional é indicada pelo condrioma e cujas conclusões são as que se seguem:

- 1.º — no lóbulo hepático existe, do ponto de vista funcional, três zonas distintas: a)—zona péri-supra-hepática ou zona de repouso permanente; b)—zona peri-portal ou zona de funcionamento permanente; c)—zona intermediária variável;
- 2.º — na zona central peri-supra-hepática o condrioma é muito fino e está frequentemente em repouso funcional;

3. — nas zonas peri-portais, o condrioma elabora de maneira contínua;
- 4.º — na zona intermediária variável a atividade elaboradora do condrioma está em relação com as fases da digestão e o estudo dos elementos desta zona mostra que o lóbulo hepático funciona da periferia para o cêntro.


Em outro trabalho publicado no "Bulletin d'Histologie" n.º 6, de junho de 1933 PALLOT e NOEL apresentam o estudo do condrioma hepático no rato em jejum e durante a digestão.

Após considerações de ordem geral e da citação dos trabalhos de KATER, SMITH, GIUGLIO MUGGIA e LORENZO MASUELLI respectivamente das Escolas de Washington e de Turim, passam os articulistas a descrever suas pesquisas relativas ao condrioma hepático do rato em jejum e durante o período da digestão.

No rato em jejum os autores descrevem o condrioma de modo sistemático nas três zonas do lóbulo hepático, conforme seu trabalho anterior e concluem que existe diferença nítida, tanto no rato como no camondongo, entre a zona peri-portal (funcionamento permanente) e zona peri-supra-hepática (repouso permanente), ligadas por uma zona intermediária de funcionamento variável.

No estudo do condrioma hepático do rato durante a digestão e com alimentação exclusiva de clara de ovo, dois ratos adultos foram sacrificados em plena digestão

após 4 dias de submetidos a êsse regimen, verificando os autores que o parênquima hepático apresenta-se constituído por zonas alternativamente claras, zonas perisupra-hepáticas, e escuras, zonas peri-portais. A coloração escura destas últimas é devida ao acúmulo de volumosos plastos que são intensamente siderófilos. As células do cêntro de lóbulos possuem, ao contrário, um condrioma alongado, percebendo-se que são bastonetes curtos, espessos e não condriocentos filamentosos e delgados, como descreveu, nas mesmas regiões no rato em jejum. Nota-se, igualmente, nas células centro-lobulares, granulações punctiformes que são sempre de dimensões inferiores às dos plastos das células peri-portais.



Em 1934 no "Bulletin d'Histologie", n.º 3, os infatigáveis investigadores NOEL e PALLOT escrevem um artigo intitulado "Sur la genèse mitochondriale des graisses intrahépatiques", no qual relatam o aspeto oferecido pelo fígado após fixação pelo formol isotônico, coloração pelo escarlata R ou Sudan IV, corte pela congelação e o mesmo fígado observado depois da fixação pelo ácido ósmico, inclusão em parafina, passagem nos álcooes e coloração por um método qualquer mitocondrial.

No primeiro caso há abundância de graxa que se apresenta em maior quantidade na periferia do lóbulo.

No segundo caso, verifica-se geralmente pouca graxa. Torna-se impossível o estudo da distribuição topo-

gráfica desta graxa, mas, em compensação, as preparações permitem estudo citológico no sentido de se pesquisar eventuais relações entre o condrioma e a graxa ósmio-redutora.

Em realidade, o que se observa, é que, no primeiro caso, vê-se tôdas as graxas contidas nas células enquanto que, no segundo, vê-se apenas as graxas insolúveis no álcool e coráveis pelo tetróxido de ósmio.

Em face desta circunstância, propõem-se os autores a precisar a distribuição topográfica de tôdas as variedades de graxa no lóbulo e o modo de elaboração da graxa intra-hepática de origem mitocondrial.

Consequentemente, relatam as pesquisas realizadas e, entre outros fatos, verificam que, a distribuição das graxas, no interior do lóbulo, coincide exatamente com a zona de funcionamento permanente, no animal em jejum e, a invasão da zona intermediária variável segundo o estado de digestão, durante o qual foi praticado o exame. Desta forma, verificaram haver correlação entre a distribuição das graxas intra-hepáticas e as modificações morfológicas do condrioma no lóbulo em funcionamento, havendo portanto estreita ligação entre a elaboração das graxas e a atividade mitocondrial.

Comparam em seguida os seus estudos aos dos americanos KATER e SMITH e chegam à conclusão de que estão perfeitamente de acôrdo com êstes autores quanto a origem mitocondrial das graxas no fígado, e que, na



célula hepática, deve-se distinguir duas variedades de graxas, umas, elaboradas pelo condrioma e outras, sem relação alguma com o mesmo.

Temos, conforme dissemos anteriormente, reunido o que de mais moderno e melho possuímos do condrioma mais bem estudado, o do fígado e queremos deixar aqui igualmente assinalado o que já se tem feito em relação ao aparêlho mitocondrial de outras células, que infelizmente, ainda, não mereceram a atenção especial a que são dignas mas que, no entanto, o possuem de cuja influência decorrem muitos estados que frequentemente são surpreendidos ao microscópio.

Lendo-se com atenção as coleções do “Comptes Rendus des Séances de la Societé de Biologie” verifica-se que vários têm sido os cientistas modernos que se preocupam com o estudo do condrioma nas diversas células animais, acrescentando, ainda, alguns dêles, técnicas novas de investigação e modificações das já existentes como veremos na parte dedicada às técnicas de evidenciação do condrioma.

Entre os trabalhos publicados, destacaremos aqueles que se relacionam ao aparêlho mitocondrial em um determinado tipo celular ou em determinado órgão.

Assim, no n.º 33, de 1931 JANINA ORSKA do Instituto de Zoologia da Universidade de Lwow, o professor HIRSCHLER, publica, em rápidas palavras, o desenvolvimento atípico do corpo mitocondrial da abelha domés-

tica, dizendo que, durante suas pesquisas sôbre a espermatogênese do macho da abelha, observou desenvolvimento do corpo mitocondrial nas espermátidas que diferem em outros insetos. Comumente existe nas espermátidas jovens corpo mitocondrial ímpar que se divide mais tarde em duas partes iguais e simétricas de estrutura interior específica; essas duas partes se alongam de maneira uniforme, formando a cauda do espermatozóide que apresenta considerável comprimento nos insetos.

Nos machos da abelha, os mitocôndrios constituem, após a última divisão dos espermátocitos, corpo mitocondrial limpo, que se divide nas espermátidas em duas partes iguais, como nos outros insetos; mais tarde êsses elementos se alongam simultâneamente na espermátida de grau mais diferenciado, apresentando a forma de dois fusos de igual comprimento; porém, a partir dêste momento, estas duas partes do corpo mitocondrial diferem do fenômeno observado nos outros insetos.

Destarte, enquanto uma das partes continua a se alongar, a outra se contrai cada vez mais a ponto de transformar-se em uma bola; em processo ulterior verificou o autor que quando o outro filamento tornou-se bastante longo a referida bola começa a se estirar, tomando a forma de fuso que, alongando-se cada vez mais, se transforma em filamento que tem quase o mesmo comprimento do constituído pelo primeiro.

Conclue dizendo que os trabalhos conhecidos sôbre

a espermatogênese da abelha (MEVES 1904/907, DONCASTER 1906 a 1907, MARK-COPELAND 1906 e outros), não falam dêste desenvolvimento atípico do corpo mitocondrial nas espermátidas da abelha.

Em relação ao corpo mitocondrial na espermatogênese temos, no n.º 18 daquela Revista, do ano de 1933, o trabalho de STANISLAW PILAWSKI realizado na *Cicindela Hybrida L.* e na qual constatou que os mitocôndrios se conduzem de maneira muito interessante. Diz êle que nas espermatogônias, tanto nas que estão em repouso como nas que estão em plena divisão, os mitocôndrios acham-se disseminados em tôda a área citoplásmica envolvendo o núcleo ou o fuso mitótico, diferindo nos espermatocitos, pois, nestes, os mitocôndrios se entumescem e formam uma massa quase esférica mostrando vacuolização nítida e em conjunto esta massa é idêntica ao corpo mitocondrial das espermátidas.

Observou igualmente que o corpo mitocondrial não apresenta modificações em nenhuma fase, isto é, durante o crescimento dos espermatocitos, nos espermatocitos maduros e no início da prófase, ao passo que neste último estado em fase mais adiantada o corpo mitocondrial se alonga em forma de fuso e no término da prófase notou filamentos mitocondriais vacuolares, destacando-se do corpo mitocondrial fusiforme, fato que verificou na metáfase da primeira divisão dos espermatocitos. Êsses filamentos se dispõem em tórno do fuso mitótico. Na

telófase da primeira divisão dos espermatocitos, êsses filamentos se fundem e reproduzem o corpo mitocondrial, cuja existência é de curta duração, porque a segunda divisão dos espermatocitos sucede rapidamente à primeira, sem passar por fase de repouso. Na segunda divisão dos espermatocitos os mitocondrios se dispõem da mesma maneira que durante a primeira. Na telófase da segunda divisão os mitocôndrios se aglutinam de novo, constituindo o corpo mitocondrial, que tende a se arredondar na espermátida joven, cujo aspeto é análogo ao dos espermatocitos.

Vê-se que o autor estudou de forma minudente o aparêlho mitocondrial durante a espermatogênese e apreciou que, em dado momento, o corpo mitocondrial se divide em duas substâncias: central e periférica, sendo a primeira fortemente cromófila e a segunda de aspeto alveolar; constatando ainda que, em fases ulteriores, a substância central se retrai em favor da alveolar.

Ao terminar, diz o autor que as suas observações se parecem com as da tese de CHAMPY (1923), segundo a qual os fenômenos que descreveu, durante o desenvolvimento da espermátida, representam uma cinese modificada, resultando de suas pesquisas ser o corpo mitocondrial constituído não só de mitocôndrios, mas também, da substância fibrilar, provavelmente fusimática (HIRSCHLER).

No número 19 do ano de 1933, encontra-se na mes-

ma coleção, um trabalho de J. CARVET "Étude du chondriome dans les cellules épiphysaires de quelques Mammifères", que estudou, por vários métodos, as células pineais do boi e do carneiro, chegando à concepção de que todos os elementos que integram o parênquima glandular são de origem neuro-epitelial e que representam um estado de evolução especial, provavelmente função secretora.

Nestas células epiteliais, de forma mais ou menos poliédrica, ostentando por um lado prolongamentos protoplásmicos que se confundem com os das células puramente neuróglícas, e de protoplasma abundante, com centrosoma visível, rica em inclusões, efetuou o autor a pesquisa do condrioma. Para tal fim, utilizou numerosos cortes tratados pelos métodos de ALTAMANN e REGAUD, com resultados inconstantes. Por isso empregou o formol isotônico neutro a 10 % e cromagem no líquido de KIYONO, não obtendo ainda bons resultados. Finalmente, com a técnica de CHAMPY encontrou mitocôndrios filamentosos na epífise do boi.

Achando o articulista que as células epifisárias seriam um estado provável de um ciclo secretor, levou a cabo o estudo do condrioma. Após as observações microscópicas assinala a presença de mitocôndrios alongados em bastonetes, condriocontos, disseminados na massa protoplásmica e principalmente em tórno do centrosoma, concluindo que, esta disposição particular encon-

trada nas células pineais, é idêntica à que se encontra em outras células secretoras.

Outro condrioma mais ou menos bem estudado é o dos gonocitos embrionários.

Apontam-se os trabalhos de RUBASCKIN sobre o condrioma dos gonocitos no embrião dos mamíferos, caracterizados, segundo êste autor, por se apresentarem em forma de pequenos grãos; os de TSCHASCHIN realizados nos gonocitos do embrião dos pássaros confirmando a forma granulosa. Êstes grãos se encontram na zona justanuclear perto de aparelho de Golgi, do centrosoma e das granulações vitelinas, sendo a forma granulosa do condrioma considerada como caráter distintivo. Segundo FIRKET, o condrioma, nestes casos, é constituído por curtos filamentos e CHAMPY pensa da mesma maneira, principalmente no que concerne aos anfíbios, achando, no entanto, difícil a obtenção de preparados nítidos que permitam provar êste conceito.

J. MARQUEZ relata que, graças ao seu processo, que descreveremos em outra parte, conseguiu preparações que puderam afirmar a concepção dos dois últimos cientistas.

Observação igualmente digna de nota é a de BOISSEZON em relação às modificações histológicas do fígado do coelho, durante a preparação do sôro hemolítico. Verificou em estudo simultâneo das graxas, do aparelho mitocondrial e do de Golgi, em comparação com

o fígado de um coelho testemuo, que existe a inversão dos mesmos em relação às porções centro e peri-lobulares, do lóbulo hepático.

No hepato-pâncreas do *Agriolimax Agrestis L.*, J. FILHOL estudou o condrioma nas células cianófilas secretoras; células de trinta a quarenta micra, e regularmente poligonais, com núcleo arredondado de treze a quinze micra de diâmetro, com nucléolo central e no citoplasma nota-se a presença de grânulos brilhantes de dimensões variáveis, mascarando *in vivo* os elementos do condrioma, difíceis de observar a pesar da refrigência particular.

Empregando técnicas variadas, conseguiu o autor estabelecer a diferenciação desses elementos e realizar o estudo do aparelho mitocondrial ao que passamos a relatar: a forma primitiva é de condriocontos, numerosos em torno do núcleo, observando-se no meio deles formas em raqueta que caracteriza a paquinese, enfim mais adiante o fenômeno invade a totalidade do condrioconto primitivo e o transforma em um disco concavo ou em figuras de algarismos (8), crescentes e fusos. Faz o autor uma série de considerações entre o condrioma destas células e os elementos vacuolares e aparelho de Golgi, discutindo se os elementos de Golgi impregnados não sejam o próprio condrioma paquinético?

Em sua opinião os elementos de GOLGI (lepidosomas) do hépato-pancreas nada mais representam do que o próprio condrioma paquinético.

Em outro trabalho, publicado na mesma revista, J. FILHOL observa o condrioma nas glândulas mucosas do oviduto do *Arion Rufus L.*; que se prestam de modo especial à verificação dos aspetos sucessivos que tomam as suas células no curso do ciclo secretor.

Assim, escolhe o autor três aspetos mais representativos do papel funcional das referidas células:

- 1.º — Início do ciclo secretor: o núcleo oval e cheio de pequenos grãos de cromatina, numerosos e redondos, possui grande nucléolo; o condrioma abundante achase distribuído em toda a célula, principalmente perto do núcleo e ao redor da membrana, parecendo ser morfológicamente representado por uma única espécie de elementos, condriocontos curtos ou filamentos;
- 2.º — Os primeiros sinais da atividade secretora se traduzem pela separação dos condriosomas em duas categorias, misturados uns aos outros, mas morfológicamente distintos: conservam alguns a forma de bastonetes e de filamentos, ficando livres no citoplasma. São os elementos do condrioma comum; a maior parte se transforma em pequenas escamas por espessamento, paquinese, de sua parte média. São os elementos do condrioma ativo;
- 3.º — Inicia-se a elaboração do muco; volumosos grãos mucosos aparecem em grande quantidade na região distal peri-nuclear acompanhados por um ou dois grandes elementos fucsinófilos, derivados dos pequenos lepidosomas.

Os elementos fucsinófilos são condriosomas modificados cuja transformação o autor diz ter assistido desde a sua gênese que se inicia nos condriocontes comuns e que pela situação e aspeto indicam claramente serem os impregnados anteriormente.

Acha mais uma vez que os corpos de Golgi são de natureza condriosômica pois, no estudo que faz, estabelece o paralelismo dos elementos de Golgi ao condrioma, declarando que o corpo de GOLGI se processa da diferenciação dos condriocontos normais, e que as suas investigações têm sido em parte confirmadas por outros cientistas.

PIERRE FEYEL escreve, no "Comptes Rendus" n.º 11, de 1934, "Sur l'existence et le rôle de cellules spéciales dans le segment intermédiaire et le tube de Bellini du rein chez la Souris".

Ao iniciar o trabalho, refere-se a OKKELS que, impregnando pela prata o rim de numerosos vertebrados, assinalou uma heterogeneidade notável entre as diferentes células do terceiro e quarto segmentos do rim, constatando que algumas reduzem a prata, tomando aspeto escuro e difuso, contrastando com outras que se mantinham claras, assim como verificou, também, que as células escuras faziam saliência na luz do tubo. O autor dizia que êste aspeto é comum, que se tratava de artifício de técnica mas não deu explicação fisiológica às suas observações.

P. FEYEL verificou igualmente esta hêterogeneidade nas impregnações argênticas do rim do camundongo, fato que encontrou nas preparações mitocondriais segundo a técnica de DIETRICH-PARAT-VOLKONSKY. As células comuns são baixas e o núcleo ocupa tôda a altura do citoplasma, fazendo mesmo muitas vezes uma leve saliência na luz do tubo; o condrioma, muito reduzido, é representado por raros filamentos sinuosos atingindo raramente o equador do núcleo. Intercaladas entre estas células encontram-se outras cujo aspeto e altura contrastam com as primeiras, sendo seu condrioma mais rico que o das comuns e representados por condriosomas em filamentos espessos, particularmente numerosos na região que faz saliência na luz do tubo. Êste condrioma descendo sôbre os lados do núcleo formam um verdadeiro capacete. Trata-se de uma categoria celular absolutamente autônoma. Segue o autor em experiências sôbre a excreção dos cloretos no rim do camundongo, para precisar o papel destas “células especiais”, ao cabo das quais chega aos seguintes resultados:

- 1.º — existe, nos segmentos intermediários (segundo tubo contornado) e no início dos tubos de Bellini do rim do camundongo, uma categoria de células com característicos morfológicos especiais cuja existência já foi assinalada por OKKELS em 1929;
- 2.º — estas “células especiais” apresentam riqueza particular em cloretos, o que provâavelmente lhes empresta grande argentofilia;

3.º — o fato da quantidade de sal contido nestas células ser máxima nos animais submetidos ao jejum e mínima naqueles que receberam injeções de sal nos faz pensar que as “células especiais” representam o papel de aparelho de ressorção para os cloretos, tomando-os na luz do tubo para de novo os lançar no sangue. Esta polaridade especial, inversa daquela das células excretoras, corresponde naturalmente a uma disposição particular do aparelho mitocondrial que é aquí essencialmente apical.

Em estudos mais ou menos recentes NOEL e PALLOT assinalaram a presença do condrioma na substância dita granulosa das placas motoras e dos fusos musculares e A. DEHORNE estudou as modificações do condrioma na pró-secreção das células mucosas.

P. ROJAS e RESTA publicaram em 1939 no número 16 do “Comptes Rendus” interessante observação sobre a histofisiologia do condrioma da fibra muscular estriada.

O estudo foi efetuado no músculo estriado do *Bufo Arenarum*, fixado segundo o método de DIETRICH - PARAT e corado pela técnica de ALTMANN - VOLKONSKY.

Praticaram igualmente pesquisas sobre o condrioma *in vivo*, durante a contração muscular (faradisação) e coloração supravital com o verde Janus. Verificaram que normalmente o condrioma intrafibrilar se apresenta sob a forma de bastonetes flexuosos, delgados ou espes-

sos (condriocentos) ou por grãos dispostos em série (condriomitos), corados de verde. Após três minutos de excitação do músculo a côr do condrioma começa a se modificar, diminuindo cada vez mais e terminando por desaparecer completamente, apresentando a fibra muscular uma coloração verde difusa.

Dizem os autores que essa mudança de côr parece estar ligada à falta do oxigênio, processo de oxido-redução.

Em conclusão acham os mesmos que a excitação faradical do músculo não modifica o aspeto e nem a quantidade do condrioma intrafibrilar e que no espaço perinuclear se percebe hiperplasia desde o terceiro minuto de excitação.

WASHINGTON BUÑO em seu recente livro sôbre “Estudios de Histofisiologia e Histofisiopatologia Tiroidea”, de 1943, diz que, para o conhecimento do mecanismo funcional da célula glandular, não se pode prescindir do estudo metódico do condrioma que, conjuntamente com o aparelho de GOLGI, são os órgãos celulares que têm demonstrado maior variação durante o ciclo secretor de tôda a célula glandular.

Após considerações e citações de outros autores, diz que o condrioma das células tiróides foi estudado por BENSLEY, como sabemos, e que se acha uniformemente distribuído no citoplasma, podendo distinguir-se duas porções: apical e basal.

Nesta última, os condriocentos se dispõem de forma

paralela, enquanto que, os condriosomas apicais são muito mais irregulares, tanto no que diz respeito à forma, como direção. TOMAS classifica o condrioma tiroideu em dois tipos: filamentososo e granuloso.

Este autor não aceita que tanto o tipo secretor como o excretor das células possua uma forma especial do condrioma.

BUÑO diz que não concorda com esta maneira de interpretar os fenômenos, dizendo que TOMAS acredita que a forma dos condriosomas depende de algum fator extra-tiroideu, porque, quando o condrioma é granuloso da célula parenquimatosa o é também nos elementos conectivos e nos endotélios vasculares. O estado de fragmentação do condrioma se deveria a alguma variação da composição química do sangue.

Para este autor a forma dos condriosomas varia com o tipo celular que se considere ou melhor com o estado funcional da célula.

Outros trabalhos têm sido realizados acerca do condrioma, demonstrando todos a presença deste aparelho nas diferentes células de animais e vegetais.

O seu estudo torna-se, como já vimos, cada vez mais necessário, tanto no que diz respeito a estrutura citoplásmica, como no que se refere a função das diferentes células que traduzem, em última análise, a expressão morfo-fisiológica dos órgãos e, principalmente, nos destinados às funções glandulares.

ESTUDO PRÁTICO DO CONDRIOMA

O condrioma, constituindo verdadeiro aparelho intraprotoplásmico e apresentando caracteres físico-químicos que o distingue do resto da área citoplásmica, necessita, para sua evidenciação, de métodos específicos, ditos mitocondriais.

As técnicas utilizadas são tôdas pertencentes aos processos de investigação citológica.

Estabelece-se, pois, contato direto com a técnica citológica que difere completamente dos métodos gerais utilizados em histologia; faz-se, desta forma, histologia especializada.

Os processos de fixação e coloração empregados para o núcleo e o citoplasma em geral representam, em face da demonstração do condrioma, técnicas grosseiras de laboratório.

Em prática citológica dois são os objetivos: o de revelar as inclusões protoplásmicas vivas e o da verificação das inclusões deutoplásmicas mortas.

Utilizou-se a princípio, e ainda se emprega em histologia, o processo de diferenciação policrômico: coloração tricômica de MASSON, métodos de MALLORY, de CURTIS e outros, que, por colorações eletivas, mostram a distribuição dos diversos tecidos nos órgãos, as

reações cromáticas do núcleo, do citoplasma e das inclusões.

Deve-se a ERLICH, com os estudos das granulações dos leucocitos, a criação dêste novo ramo da citologia.

A citologia propriamente dita tem por fim obter a diferenciação estrutural não se observando a coloração é poli ou monocromica.

A distinção entre corantes nucleares e citoplásmicos não interessa às pesquisas citológicas, pois estas se realizam com outros corantes, chamados específicos em relação ao elemento em estudo, condrioma ou vacuoma.

Atualmente, a técnica citológica, tende a se especializar nos métodos monocromicos que coram a estrutura citoplásmica tanto pelos processos de coloração propriamente ditos, como pelo das impregnações metálicas.

Além das inclusões citadas, preocupa-se a citologia da investigação de granulações, tais como a do leucocitos, que ainda não foram classificadas nem como inclusões vivas e muito menos como deutoplásmica.

Das inclusões denominadas vivas: condrioma ~~ou~~ ^o aparelho reticular de GOLGI, é que estuda a técnica citológica propriamente dita.

Impõe-se, desta forma, à verificação do condrioma, técnicas específicas ou métodos mitocondriais de que falam os autores.

Passaremos a descrever os métodos e técnicas empregados para o estudo prático do condrioma.

Vários são os métodos de técnica empregados para a verificação do condrioma que, para torná-los mais didáticos, propomos a seguinte orientação:

- I — Estudo do condrioma vivo.
- II — Estudo do condrioma após o emprêgo dos corantes vitais.
- III — Estudo do condrioma fixado e corado.
- IV — Estudo do condrioma pelas impregnações metálicas.

I) *Estudo do condrioma vivo*

O exame das peças em estado fresco, constitui o método ideal para o reconhecimento da estrutura celular que, infelizmente, em técnica atual representa meio rudimentar para isoladamente estabelecer com precisão o diagnóstico citológico; no entanto, serve de momento como meio de controlo às preparações fixadas e coradas.

Este método pode ser empregado ao condrioma por apresentar êste refringência superior ao do citoplasma.

É aconselhável praticar-se anteriormente à pesquisa do condrioma da célula animal à investigação do mesmo nas células vegetais.

GUILLERMOND destacou um fragmento de epiderme das pétalas da flor do lírio encontrando células de grandes dimensões, cujo citoplasma transparente deixa vêr o condrioma de maneira perfeita. Observações idênticas podem ser realizadas nas flores da tulípa, nas folhas da *Elodea Canadensis* e em alguns cogumelos. Nos

cogumelos o condrioma aparece de forma mais nítida fazendo atuar o ácido ósmico ou Lugol ou então pelas colorações vitais.

Nas células animais a verificação do condrioma não é tão nítida como nas que acabamos de escrever, mas, no entanto, em exames praticados entre lâmina e lamínula e, principalmente, em fundo negro, pode-se observá-lo em certas células com relativa nitidez.

A técnica dêste método consiste no seguinte:

- a) — Sacrificar o animal por pancada ao nível da cabeça (não usar substancia anestésica);
- b) — colheita da peça, com todo o cuidado de técnica devendo, para condição ótima, estar pulsando ainda o coração do animal;
- c) — praticar os córtes, *in situ*, o mais fino possível;
- d) — colocar o córte na lamina com algumas gotas de sôro de Locke, tépido, cobrindo-o com lâminula e exercendo-se leve pressão;
- e) — observação microscópica com luz direta, indireta ou fundo escuro.

Tem prestado êste método relevante contribuição à histologia moderna, pois, elementos considerados por alguns autores como artifícios de técnica, ficaram, graças a êle, definitivamente identificados e como exemplo pode-se citar o próprio aparelho mitocondrial.

II) *Estudo do condrioma após o emprêgo dos corantes vitais*

Consiste êste método, o processo intermediário en-

tre o exame a fresco e os praticados após fixação.

O condrioma pode ser evidenciado pela técnica intravital ou postvital.

Para êste fim deve-se recorrer ao uso das matérias corantes que, acumuladas ou reduzidas ao seu nível, fornecem colorações específicas.

Como os corantes vitais em geral, os do condrioma dividem-se igualmente em básicos e ácidos.

Entre os básicos (corantes eletro-positivos) temos o verde Janus B ou verde diazina que é o principal corante do condrioma e o menos tóxico, empregado principalmente em coloração postvital; o azul Janus, o preto Janus I, o violeta de metila 5 B, violeta dália, o violeta de cresil e o azul de metileno.

Entre os ácidos (corantes eletro-negativos) temos a alizarina, o azul pirrol e o azul tripan.

A técnica das colorações vitais empregadas para o condrioma pode ser, como vimos, intravital ou vital propriamente dita e postvital, também chamada por alguns autores de supravital.

Na técnica intravital, faz-se a introdução da substância corante previamente diluída em sôro fisiológico ou em água destilada, por meio de injeções que podem ser endovenosa, subcutânea, intraperitonal e endolinfática, sendo a subcutânea a mais indicada por possuírem os corantes vitais do condrioma certo grau de toxidez.

TURCHINI injeta o azul de metileno quimicamente

puro em solução a 1 p. 100 no saco linfático dorsal do *Bufo Vulgaris*, na quantidade de 1 c. c., com o objetivo de estudar o condrioma das células secretoras do rim. No dia seguinte sacrifica o animal e examina por esmagamento, entre lâmina e lamínula, pequenos fragmentos do rim dilacerado. Simultaneamente coloca pequenos fragmentos no seguinte líquido que fixa ao mesmo tempo os tecidos e a coloração:

| | |
|---|---------|
| Sol. aq. sat. de ácido pírico..... | 60 c.c. |
| Formol a 40 p. 100..... | 20 c.c. |
| Sol. aq. sat. de molibdato de amônio..... | 20 c.c. |

Incluir em parafina e corar pela safranina. Os glomérulos apresentam-se incolores, os tubos com epitélio em escova e os tubos com bastonetes apresentam elementos corados, com o condrioma (condriocentos e mitocôndrios) corados vitalmente.

Em outra técnica, TURCHINI e SLOBOZIANO provocam a coloração vital do condrioma das células cartilaginosas injetando 5 c. c. da solução a 1 p. 100 de azul de metileno no pulmão do cão. Sacrificam o animal ao cabo de 6 horas e examinam as cartilagens brônquicas em estado fresco e fixadas como no processo anterior.

Outro corante usado nesta técnica é o verde Janus que COWDRY, LAGUESSE e MICHAELIS empregam em solução de 1 p. 30.000 e MONNÉ a 1 p. 10.000. Como se vê este corante atua em soluções bastante diluídas e GUILLERMOND diz que este corante, como

todos os que se fixam no condrioma, é muito mais tóxico que os corantes do vacuoma.

Os autores supracitados o diluem segundo o caso no sôro fisiológico, no sôro de RINGER e na água do mar.

BENSLEY em 1911 empregou pela primeira vez o verde Janus para a demonstração do condrioma pancreático, com a seguinte técnica: injetou uma solução de verde Janus B. em sôro fisiológico a 1 p. 10.000 na aorta de um cobaio.

LEWIS acha igualmente o verde Janus muito tóxico para as células que morrem em poucos segundos, mesmo na diluição de 1 p. 200.000.

DEBEYRE cora simultâneamente plastosomas e grãos de secreção com a mistura de verde Janus e vermelho neutro.

GOLDMANN injeta por via subcutânea ou intraperitonal o azul tripan ou o azul pirrol em solução aquosa a 1 p. 100 ou em solução fisiológica. Emprega esta solução na proporção de 0,5 — 1 c. c. para cada 20 grammas de pêso do animal. As injeções devem ser praticadas com intervalos de 4 a 6 dias até que o animal tome a côr azul. Fixação em solução de formol a 10 p. 100. Cortes por congelação ou inclusão em parafina.

TSCHASCHIN administra o azul tripan por via intravenosa sem prejuizo para o animal, na proporção de

1 p. 100 e na quantidade de 10 c. c. em sôro fisiológico, de 2 em 2 dias, até que o animal tome coloração azul.

Para MOELLENDORFF a coloração com o azul tripan fica melhor fixada por uma solução aquosa de sublimado a 6 p. 100 do que pelo formol.

Igualmente injeta RIBBERT, por via intravenosa, o azul tripan ou o azul pirrol.

Na técnica postvital, que consiste em estabelecer o contacto da matéria corante com a peça extraída recentemente do animal podem ser empregados todos os corantes do condrioma, sendo porém considerado o mais eficiente o verde Janus B., que, segundo POLICARD, é o corante específico, postvital do aparelho mitocondrial.

COWDRY e outros empregam o verde Janus colocando um fragmento de tecido em algumas gotas do corante e no fim de 30 minutos cobrem com uma lamínula e, examinando no microscópio as partes verdes periféricas, verificam se os elementos do condrioma estão ou não corados; caso não o estejam aconselha aumentar a taxa da diluição.

Os títulos das soluções empregadas são os mesmos indicados anteriormente.

A mesma técnica pode ser seguida em relação aos outros corantes, cuja diluição pode variar de 1-3 p. 100.

III) *Estudo do condrioma fixado e corado*

a) — *Fixação*

Os fixadores comumente empregados em técnica histológica não servem para o estudo do condrioma, por motivos que abaixo esclareceremos.

Na fixação do condrioma dois problemas se impõem: o da conservação e o da insolubilização.

Por este fato passou o aparelho mitocondrial por muito tempo despercebido, pois os fixadores habitualmente usados, Zenker, Bouin, Flemming e outros, não apresentam as propriedades essenciais de que se necessitam para a sua fixação.

Nestas condições FREMIET, MAYER e SCHOEFFER escolheram e classificaram os fixadores do condrioma em três grupos:

- 1.º — Oxidantes — ácidos crômico e ósmico e bicromato de potássio.
- 2.º — Sais de metais pesados — mercúrio, urânio, cobre, molibdeno, platina e etc., que precipitam os ácidos graxos e algumas de suas combinações (fosfátidas) sob a forma de sabões insolúveis.
- 3.º — Formol de precipita além da albumina os complexos de ácidos graxos ou de fosfátidas com os protídios.

Deve-se, desta forma, evitar os reativos que contêm em sua fórmula o ácido acético, o álcool e o clorofórmio, substâncias capazes de destruir os complexos lipo-proteicos, como no caso o condrioma.

MASCRÉ é de opinião que o ácido tricloracético pode fixar o condrioma desde que seja completada pelo formól.

Os fixadores do condrioma constituem, dêste modo, um grupo a parte, apresentando as duas propriedades indispensáveis à sua fixação: insolubilização dos lipóides que entram em sua constituição, para que mais tarde possam resistir à desidratação, e a conservação dos mesmos.

Assim o ácido ósmico atua sôbre o condrioma transformando os lipóides em corpos insolúveis no álcool, xilol e clorofórmio e o formol como conservador.

Destarte os fixadores do aparelho mitocondrial devem ser complexos.

A quantidade do fixador não deve ultrapassar de 4 vezes o volume das peças, que não podem ter mais de 2 a 3 milímetros de espessura, pois trata-se de reativos pouco penetrantes.

O tempo da fixação oscila entre 24 a 48 horas e geralmente deve ser feita na geladeira (+ 4, + 8° C.).

PARAT divide igualmente êstes fixadores em três grupos: líquidos ósmicos, líquidos bicromatados sem ácido ósmico e formol; as misturas ósmicas ou bicromatadas contendo sais de metais pesados (mercúrio, urânio, etc.).

Misturas ósmicas

Líquido de ALTMANN (1890)

| | | |
|---------------------------------------|---|----|
| Bicromato de potássio a 5 p. 100..... | } | ãã |
| Ácido ósmico a 2 p. 100..... | | |

A solução de bicromato de potássio não deve encer-





rar ácido crômico livre e, portanto, a solução de ácido ósmico deve ser feita nágua destilada e não no ácido crômico.

Líquido de CHAMPY (1911)

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Bicromato de potássio a 3 p. 100..... | 7 partes |
| Ácido crômico a 1 p. 100..... | 7 partes |
| Ácido ósmico a 2 p. 100..... | 4 partes |

Líquido de J. BENOÎT (1922)

| | |
|--|----------|
| Bicromato de potássio a 5 p. 100..... | 6 partes |
| Ácido ósmico a 2p. 100..... | 5 partes |
| Bicloreto de mercúrio a 5 p. em solução fisiológica | 5 partes |
| Nitrato de urânio a 4 p. 100..... | 4 partes |

A taxa de cloreto de sódio será de 9 p. 1.000 para os vertebrados superiores e de 6 p. 1.000 para os vertebrados inferiores e os invertebrados; para os animais marinhos, empregar água do mar.

Êste fixador é aconselhado por PARAT.

Misturas bicromatadas

Líquido REGAUD (1910)

| | |
|---|----------|
| Sol. aq. de bicromato de potássio a 3 p. 100... | 4 partes |
| Formol neutro | 1 parte |

Líquido de HELLY ou ZENKER — formol (1904)

| | |
|-----------------------------|----------|
| Bicloreto de mercúrio | 5 gr. |
| Bicromato de potássio | 2 gr., 5 |
| Sulfato de sódio | 1 gr. |
| Água destilada | 100 c.c. |

No momento de ser empregado ajunta-se formol neutro a 10 p. 100.

Líquido de ZENKER (1894)

| | |
|-----------------------------|----------|
| Bicloreto de mercúrio | 5 gr. |
| Bicromato de potássio | 2 gr., 5 |
| Sulfato de sódio | 1 gr. |
| Água destilada | 100 c.c. |

Este fixador deve ser usado sem a adição do ácido acético.

Líquido de ORTH ou MÜLLER — formol (1896)

| | |
|-----------------------------|----------|
| Bicromato de potássio | 2 gr., 5 |
| Sulfato de sódio | 1 gr. |
| Água destilada | 100 c.c. |

No momento de se empregar ajunta-se 10 p. 100 de formol neutro.

Líquido de TUPA II

| | |
|--|-----------|
| Sol. aq. de bicromato de potássio a 3 p. 100.... | 80 partes |
| Formol neutro | 20 partes |
| Nitrato de urânio | 1 parte |

Misturas formoladas

Líquido de TUPA I

| | |
|--------------------------|------------|
| Formol a 20 p. 100 | 100 partes |
| Nitrato de urânio | 1 parte |

Líquido de MARQUEZ

| | |
|-----------------------------|----------|
| Formol a 10 p. 100..... | 100 gr., |
| Bicromato de potássio | 5 gr. |

O formol empregado em citologia deve ser neutro constituído desta forma excelente fixador. Pode-se empregar-lo ainda em mistura com sôro fisiológico. É o formol isotônico, fórmula ótima para conservação do condrioma.

b) — *Mordentagem*

Na técnica de coloração do contrioma fixado, tem-se de lançar mão de substâncias que estabeleçam entre os fixadores e os corantes as condições ótimas para que os mesmos atuem de modo favorável no conjunto do método.

Estas substâncias usadas em técnica laboratorial recebem o nome de mordentes.

Constituem desta forma s mordentes, corpos que servem de intermediários entre o tecido a corar e o corante.

MANN define a mordentagem como sendo um processo de combinação química entre dois corpos que não apresentam entre si afinidade de ordem química.

Em realidade, os mordentes sensibilizam os tecidos contraíndo com êles uma combinação estável que exalta a eletividade em face do corante, produzindo assim, um precipitado que se cora bem e insolúvel na água. Forma-se, por êste meio, entre o tecido, o mordente e o corante uma tríplice combinação corada, bastante estável para resistir aos agentes da descoloração (ácidos, álcool, etc. . .).

Denomina-se pois, mordente, tôda substância que intervem seja reforçando as colorações seja tornando-as possíveis em outros casos.

Para o condrioma, aparêlho delicado e de composição lipo-proteica, torna-se indispensável a aplicação dêste recurso técnico.

Todos os processos de coloração empregados para o condrioma encontram dificuldades motivadas pelo emprego de fixadores, dos quais a maior parte são desfavoráveis à ação dos corantes e igualmente pela pouca corabilidade dos seus elementos.

Impõem-se dessa forma, em técnica mitocondrial, o emprego dos mordentes que tem por fim completar e assegurar os fenômenos de oxidação necessários para corarem os lipídios do condrioma e torná-los ao mesmo tempo insolúveis.

Tomando-se em consideração os fixadores empregados, assim como os corantes que posteriormente serão utilizados, dividem os técnicos a mordentagem do condrioma em três tipos diferentes:

I — *Superfixação* — Este meio é empregado tôdas as vezes em que os líquidos ósmicos foram ou fizeram parte da mistura fixadora utilizada. Nestas condições deve-se superfixar durante 48 horas as peças sem que haja perigo, porque se pode corrigir esta superfixação pelo descoramento. Consiste êste processo em reoxidar o ósmio reduzido que se torna, dessa forma, novamente solubilizado, ficando a preparação descorada e capaz de se deixar impregnar pelas matérias corantes que mais tarde serão usadas. A operação é rápida e consiste no seguinte:

- a) tratar os cortes por alguns segundos pelo permanganato de potásio a 1. p. 100;

- b) lavar rapidamente em água destilada;
- c) descorar pelo ácido oxálico a 4 p. 100;
- d) lavar cuidadosamente em água destilada.

II — *Post-cromização* — Quando os fixadores tem por base o bicromato de potássio ou o formol, a mordentagem oxidante recebe o nome de post-cromização, porque ela se realiza por intermédio do bicromato de potássio.

A técnica de BENDA e REGAUD consiste em post-cromizar a frio e por meio do bicromato de potássio a 3 p. 100. Esta operação, de tempo variável, pode levar de algumas semanas até alguns meses, por causa do fraco poder de penetração do bicromato. É igualmente de difícil controle devendo-se, de vez em quando, retirar um fragmento da peça em experiência para observá-la. Além dos inconvenientes citados, surge ainda o perigo da supercromização para o qual não existe solução porque acarreta a incorabilidade do condrioma. Para sanar esta falha, DIETRICH-PARAT empregam para a post-cromização um processo derivado do de SMITH-DIETRICH utilizado para os lipóides e que consiste no seguinte: sem lavar as peças, coloca-se-as, diretamente, ao sair do fixador, numa solução saturada de bicromato de potássio, na estufa à 37 graus. O tempo desta operação varia de 12 a 48 horas no máximo. Casos há, como por exemplo, nas células cujo condrioma esteja

muito ativo, que se deve conduzir a post-cromização até 72 horas.

III — *Mordentagem pelo mercúrio de GOUG e FULTON* — Quando se deseja trabalhar com tecidos ricos em líquidos ou com tecido conjuntivo, a post-cromização pode endurecer demasiadamente as peças, tornando-as quebradiças e friáveis, devendo-se então, nestes casos, e após a fixação pelo formol isotônico, usar a mordentagem pelo líquido de GOUGH e FULTON, que permite obter cortes finos e cuja fórmula é a seguinte:

| | |
|-----------------------------|--------|
| Biacetato de mercúrio | 3 grs. |
| Ácido acético | 0,1 cc |
| Água destilada | 100 cc |

A quantidade de ácido acético que figura nesta fórmula é muito fraca para alterar o condrioma já fixado; sua presença é necessária para impedir a formação de sais básicos insolúveis.

c) — *Lavagem*

Este tempo de técnica é de importância capital em histologia.

No caso do condrioma torna-se imperiosa a eliminação dos fixadores e dos mordentes que deve ser feita por uma lavagem cuidadosa.

As peças fixadas pelas misturas ósmicas e bicromatadas devem ser lavadas em água corrente e é necessário que a mesma não seja nem muito calcárea e nem muito selenitosa, impedindo-se assim a formação de de-

pósitos aderentes à superfície das peças. O tempo da lavagem deverá ser mais ou menos igual ao da fixação. Para as peças fixadas pelo sublimado corrosivo a água deve ser levemente iodada, pois esta operação tem por fim transformar o sublimado corrosivo (insolúvel na água) em iodureto de mercúrio (solúvel na água), tornando-se em seguida indispensável a eliminação do iodo por uma solução de hiposulfito de sódio a 0,25 p. 100. Enfim, a lavagem tem por objetivo retirar qualquer traço de precipitado que sob a forma de poeira, de agulha ou de granulação possa prejudicar tanto a coloração como também constituir artefato nos cortes.

d) — *Inclusão em parafina*

Para o condrioma esta operação exige precauções particulares. Assim, PARAT recomenda que a desidratação seja mais ou menos rápida, passando, no entanto, os cortes pelas escalas seguintes:

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Alcool à 15 graus..... | 10 minutos |
| Alcool à 40 graus..... | 15 minutos |
| Alcool à 50 graus..... | 15 minutos |
| Alcool à 70 graus..... | 30 minutos (iodar 15 minutos) |
| Alcool à 90 graus..... | 60 minutos |
| Alcool à 100 graus..... | 2 horas (renovando o líquido) |
| Tolueno..... | 2 horas (renovando o líquido) |
| Tolueno-parafina..... | 2 horas |
| Parafina pura..... | 2 horas |

Seja 4 horas e 10 minutos para a desidratação e no total 10 horas e 10 minutos para tóda a operação.

e) — *Coloração*

Cmo já se disse, os fixadores do condrioma, perturbam sobremaneira os processos de coloração que o evidenciam. Nestas condições deve-se lançar mão de co-

rantes regressivos poderosos, tais como: a hematoxilina férrica, método de ALTMANN com fucsina ácida e ácido pícrico, método de BENDA com alizarina e o cristal violeta e outros. É no processo regressivo destes métodos que reside a evidenciação do aparelho mitondrial, tornando-se, pois, necessária longa experiência.

Matérias corantes

A relação das matérias corantes empregadas para o condrioma é restrita. Entre estas substâncias destacam-se as utilizadas pelos processos clássicos de coloração do referido aparelho. Temos, antes de estabelecermos os métodos tintoriais empregados, necessidade de anotarmos aqui as fórmulas dos principais corantes usados.

Hematoxilina de KULTSCHITZKY (1889)

| | |
|---|----------|
| Sol. Alcoólica de hematoxilina cristalizada a | |
| 10 p. 100..... | 10 cc |
| Ac. acético cristalizável..... | 1 — 2 cc |
| Água destilada | 100 cc |

Aguardar o amadurecimento.

Fucsina ácida anilinada de ALTMANN (1890)

| | |
|--|------------|
| Sol. de fucsina ácida ou rubina S..... | 20 gramas |
| Água anilinada saturada..... | 100 gramas |

LANGERON aconselha empregar somente 10 gramas da fucsina ácida, dizendo que, em realidade, esta não se dissolve além de 5 a 6 gramas por cento.

A água anilinada deve ser preparada com óleo de anilina recente e PARAT aconselha a preparação da se-

guinte maneira: dissolver 5 cc. de óleo de anilina em 10 c.c. de álcool absoluto e derramar aos poucos esta mistura, agitando, em 100 c.c. de água distilada. Outro processo consiste em se tomar 100 c.c. de água e saturá-la com óleo de anilina, filtrando-o todo em papel de filtro molhado. Qualquer que seja o processo de preparação deve-se deixar envelhecer e filtrá-la no momento do emprêgo.

Hematoxilina ácido fosfotúngstica de MALLORY (1900)

| | |
|---------------------------|-----------|
| Hematoxilina | 1 grama |
| Ácido fosfotúngstico..... | 20 gramas |
| Água distilada | 1000 cc |

Dissolver o ácido fosfotúngstico e a hematoxilina separadamente em água distilada, sendo que a dissolução de hematoxilina deve ser levada ao fogo brando. Deixar esfriar, reunir as duas soluções e completar 1000 cc. Esperar algumas semanas para amadurecer. Necessitando-se abreviar o amadurecimento basta adicionar 0,177 gramas de permanganato de potássio.

Cristal violeta de BENDA (1901)

| | |
|--|----------|
| Sol. saturada de cristal violeta no álcool a 70 graus | 1 parte |
| Alcool clorídrico | 1 parte |
| Água anilinada saturada | 2 partes |

Misturar as substâncias no momento de usá-las.

Para preparar o álcool clorídrico procede-se do seguinte modo:

| | |
|------------------------|--------|
| Alcool a 90 graus..... | 70 cc. |
| Água destilada | 30 cc. |
| Ac. clorídrico | 1 cc. |

Hematoxilina de REGAUD (1910)

| | |
|--|--------|
| Sol. alcoolica de hematoxilina cristalizada..... | 10 cc. |
| Glicerina | 10 cc. |
| Água destilada | 80 cc. |

Deve-se esperar a maturidade da solução.

Safranina neutra, BENSLEY (1911)

- A. Sol. aq. Saturada de violeta ácida
- B. Sol. aq. saturada de safranina 0 (básica).

Prepara-se o corante, adicionando-se aos poucos a sol. A à sol. B. Verifica-se, praticamente, o ponto de neutralização da sol. B, gotejando em papel de filtro de quando em quando, até que a mancha se apresente incolor (prova da reação neutra da sol. B). Filtrar em papel de filtro. O resíduo do filtro deve ser abandonado até que esteja completamente sêco, procedendo-se então a extração do pó do papel de filtro e com o qual se fará uma solução alcoolica saturada de safranina neutra.

Cloro carmim de HOLLANDE (1916)

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Ac. Clorídrico | 5 cc. |
| Carmim pulverizado n.º 40..... | 14 gramas |

Mistura-se em cápsula de porcelana e reduz-se o todo a uma massa compacta e homogenea, deixando 24 horas em repouso.

Ajunta-se:

| | |
|----------------------|---------|
| Água destilada | 250 cc. |
|----------------------|---------|

Ferver durante meia hora.

Filtrar, completar o volume à 180 c.c. com água destilada, depois a 300 c.c. com álcool à 75 graus.

Essa solução encerra mais ou menos 4,5 gramas de carmim por cento.

Estes são os corantes mais usados em técnica mitocôndrial. Outros existem, assim como, as substâncias que servem à diferenciação e que deixamos para mencioná-las na descrição dos diversos métodos que passaremos a relatar.

Métodos de coloração

Vários são os métodos de coloração empregados para o condrioma, verificando-se no entanto, que a maior parte dêles nada mais são do que modificações imprimidas aos processos clássicos e que podemos dividir em três métodos distintos: método de ALTMANN, método de BENDA e método de REGAUD.

I. — Método de ALTMANN — Data de 1890 e é o processo mais antigo e de execução delicada, razão pela qual sofreu várias modificações. Sua técnica (DIE ELEMENTARORGANISMEN, Leipzig 1890) consiste no seguinte:

- a) Fixação na mistura de ALTMANN.
- b) Lavagem em água corrente.
- c) Inclusão em parafina.
- d) Cortar (2-3 micra).
- e) Colagem e desparafinização.

- f) Corar pela fucsina ácida anilinada de ALTMANN recentemente preparada, aquecendo-se, levemente, até o desprendimento de vapores por 5 minutos, não deixando secar a lâmina.
- g) Resfriar a preparação.
- h) Lavar em água destilada e limpar a lâmina ao redor do corte.
- i) Diferenciar em solução alcoólica saturada de ac. pícrico ao têtço em água distilada, até que os núcleos tomem coloração amarela.
- j) Desidratação e montagem em balsamo sêco, sa-lilicado. Os mitocôndrios devem aparecer em vermelho ou púrpura sôbre um fundo amarelo e a coloração nuclear se confunde com a do fundo. O método primitivo de ALTMANN sofreu as seguintes modificações:

1.º *Modificação de PARAT.* — Êste autor recomenda que durante a diferenciação pela solução alcoólica sat. de ac. pícrico, se verifique ao microscópio e com auxílio da glicerina o momento em que os núcleos apareçam corados de amarelo. Outrossim, aconselha substituir o diferenciador acima citado, pelo picro-indigo-carmin ou pela solução alcoólica de aurantia a 0,5 p. 100, achando que se obtem desta forma uma melhor coloração nuclear.

2.º *Modificação de BENOÎT.*

- a) Fixar pelo líquido de BENOÎT.

- b) Descorar si fôr necessário.
- c) Corar e diferenciar segundo ALTMANN.
- d) Corar o fundo com o verde luz em solução aquosa diluída durante alguns segundos. PARAT emprega o verde luz em solução hidroalcoólica.
- e) Deshidratar, bruscamente, pelo tolueno.
- f) Bálsamo sêco, salicilado (montagem).

3.º *Modificação de BENSLEY*. (American Journal Anat. Vol. XII, pg. 308, 1912).

- a) Fixar durante 24 horas na mistura cromo-ósmica seguinte:

| | |
|--|--------|
| Sol. aq. de bicromato de potássio a 2,5 p. 100.. | 8 cc. |
| Ácido ósmico a 2 p. 100 | 2 cc. |
| Ácido acético glacial | I gota |

- b) Lavagem cuidadosa em água corrente.
- c) Inclusão em parafina.
- d) Clarificar com essência de bergamota.
- e) Cortar.
- f) Desparafinar.
- g) Lavar em água.
- h) Imersão por um minuto numa solução de permanganato do potássio a 1 p. 100.
- i) Descorar com uma sol. de ac. oxálico a 5 p. 100 durante um minuto.
- j) Lavar em água.
- k) Corar pela fucsina anilinada de ALTMANN.

- l) Diferenciar com uma solução aquosa de verde de metila a 1 p. 100.
- m) Lavagem rápida no álcool a 95 graus. Alcool absoluto. Xilol.
- n) Montagem no bálsamo.

O uso do permanganato atenua a mordentagem pelo ácido ósmico e o bicromato. O verde de metila dá contrastes mais delicados que o ácido pícrico e as preparações são mais duráveis que as obtidas pelo método de ALTMANN.

4.º *Modificação de BENSLEY - COWDRY.* (1918 — Contrib. Carnegie Inst. Washington).

- a) Fixar pelo líquido de REGAUD.
- b) Postcromar segundo DIETRICH - PARAT.
- c) Corar segundo ALTMANN.
- d) Diferenciar pelo verde metila a 1 p. 100 durante alguns segundos.
- e) Deshidratar, bruscamente, pelo tolueno.
- f) Montagem com o bálsamo oxidado de MASSON.

GOUGH e FULTON coram por êste processo, após fixação pelo formol isotônico e mordentagem pelo mercúrio.

5.º *Modificação de KÜLL - CHAMPY.* (1913 — Anat. Anzeiger — Vol. XLI).

- a) Fixar pelo líquido de CHAMPY.
- b) Corar segundo ALTMANN.
- c) Corar o fundo pelo azul de toluidina ou pela

tionina a 0,5 p. 100 em água distilada durante 1 ou 2 minutos.

- d) Lavar, rapidamente, em água distilada.
- e) Diferenciar pela aurantia a 0,5 p. 100 na alcool a 70 graus.

PARAT inverte os tempos: diferencia a princípio pela aurantia levando em seguida a preparação ao microscópio (montada em glicerina) para depois corar a cromatina pelo azul de toluidina, aconselhando este processo para os órgãos hematopoiéticos:

- f) Deshidratar, bruscamente, pelo tolueno.
- g) Montar no bálsamo oxidado de MASSON.

A coloração geral do corte é violacea, o condrioma purpura, a cromatina azul e o fundo amarelado ou esverdeado.

6.º *Modificações de VOLKONSKY.*

Primeiro processo:

- a) Fixar pelo líquido de HELLY.
- b) Postcromar segundo DIETRICH - PARAT.
- c) Corar segundo ALTMANN.
- d) Diferenciar pela aurantia segundo KÜLL, controlando ao microscópio (montagem extemporânea na glicerina e exame de imersão).
- e) Lavar em água distilada.
- f) Fixar a fucsina ácida no condrioma pelo ac. fósfomalibdico a 1 p. 100, durante um minuto.

- g) Corar o fundo pelo azul policromo de UNNA e diferenciar pelo tanino-orange.

Segundo processo: Este processo difere do método primitivo de VOLKONSKY pela composição da solução fósfolibídica e do corante de fundo.

- a), b), c) e d) semelhantes aos tempos do primeiro processo.

- e) Lavagem rápida em água destilada.

- f) Fixar a fucsina ácida no condrioma fazendo atuar por 3 a 5 minutos a seguinte solução:

| | |
|-------------------------|---------|
| Ac. fósfolibídico | 1 grama |
| Sóda normal | 10 cc. |
| Água destilada | 90 cc. |

Podemos se a diferenciação fôr muito bruta empregar a mistura especial de VOLKONSKY que dá ao mesmo tempo a diferenciação e a fixação da coloração:

| | |
|-------------------------|-------------|
| Ac. fósfolibídico | 1 grama |
| Aurantia | 0,25 gramas |
| Alcool a 95 graus..... | 25 cc. |
| Sóda normal | 10 cc. |
| Água destilada | 65 cc. |

Dissolver o ac. fósfolibídico em 10 cc. de soda adicionado em 30 cc. de água destilada. Dissolver a parte a aurantia no alcool diluído em 35 cc. de água destilada. Aquecer para ativar a dissolução, depois misturar ambos os líquidos.

- g) Lavar cuidadosamente.

- h) Corar o fundo durante 10 - 15 minutos pelo azul

de VOLKONSKY:

| | |
|----------------------------|------------|
| Violeta de metileno..... | 0,4 gramas |
| Azur II | 0,1 gramas |
| Carbonato de potássio..... | 0,1 gramas |
| Glicerina | 50 cc. |
| Água destilada | 50 cc. |

- i) Lavar em água destilada.
 - j) Diferenciar pelo tanino-orange de UNNA.
 - k) Lavar em água destilada.
 - l) Deshidratar, bruscamente, pelo tolueno.
 - m) Montagem em bálsamo oxidado de MASSON.
- 7.º *Modificação de VOLKONKY - PARAT, (1926).*
- a) Fixar no líquido de HELLY de 4 a 12 horas.
 - b) Postcromização na estufa a 37 graus em solução aquosa saturada de bicromato de potássio, de 12 a 48 horas.
 - c) Lavar em água corrente de 12 a 16 horas.
 - d) Inclusão em parafina.
 - e) Cortar (3 micra no máximo).
 - f) Corar pela hematoxilina de REGAUD ou melhor pelo processo de VOLKONSKY.

Este processo dá ótimos resultados, sobretudo, após o uso das misturas bicromatadas e da postcromização.

8.º *Modificação de HOLLANDE.* — Neste processo a ação do ac. fósfolibídico e a coloração de fundo precedem a diferenciação. Para êle o orange G substitue a aurantia.

- a) Fixar pelo líquido de BENOÎT durante 4 dias.

- b) Mordentar diretamente no formol a 5 p. 100, durante 12 horas.
- c) Corar segundo ALTMANN.
- d) Fixar a coloração pelo ácido fósfolibídico a 0,5 p. 100, durante 5 minutos.
- e) Lavar em água destilada.
- f) Corar o fundo pelo azul de metila a 1 p. 100, 2 minutos.
- g) Lavar em água destilada.
- h) Diferenciar no orange G em saturação no álcool a 80 graus de 15 a 30 segundos.
- i) Lavar em água destilada.
- j) Desidratar e montar no bálsamo.

Pode-se substituir o azul de metila pelo azul políeromo diluído a 1 p. 100 e corar durante 5 minutos, obtendo-se desta forma resultado análogo ao processo de VOLKONSKY.

9.º *Modificação de J. BAKER e M. THOMAS.* (BAKER — Cytological Technique, 1933). Propõe a seguinte modificação:

- a) Fixar em partes iguais de bicromato de potássio a 3 p. 100 e ac. ósmico a 2 p. 100 durante 4 dias ou por um dia e postcromar por 3 dias somente em bicromato de potássio.
- b) Lavar uma noite em água corrente.
- c) Cortar (5 micra ou menos).
- d) Corar pelo ALTMANN por um minuto.



- e) Esfriar por 5 minutos.
- f) Lavar em água destilada.
- g) Imersão no soluto de ac. pícrico preparado da seguinte maneira:

| | |
|---|-----------|
| Sol. alcoólica sat. de ac. pícrico..... | 20 partes |
| Sol. de alcool a 20 p. 100 | 80 partes |

O descoramento inicia-se mais ou menos rapidamente. Após meio minuto examinar ao microscópio.

Os núcleos devem apresentar-se nitidamente amarelados e os mitocôndrios vermelhos. Se a diferenciação está quase completa passar a preparação por uma solução mais fraca de ac. pícrico:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Sol. sat. de ac. pícrico..... | 10 partes |
| Sol. de alcool a 20 p. 100..... | 90 partes |

- h) Lavar em água destilada.
- i) Deshidratação brusca em alcool a 70 p. 100, em alcool 90 p. 100 e alcool absoluto (neste por 2 minutos) então no xilol.
- j) Montagem no bálsamo.

10.^o *Modificação de MAXIMOW* (C. R. Soc. Biol., Paris, vol. LXXIX, pg. 462).

- a) Fixar no líquido de CHAMPY.
- b) Lavar em água corrente.
- c) Tratar pela seguinte mistura, durante 24 horas:

| | |
|---------------------------|----------|
| Ac. crômico 1 p. 100..... | 1 parte |
| Ac. acético glacial | 2 partes |

- d) Lavar em água corrente por uma hora.

- e) Colocar numa solução de bicromato de potássio a 3 p. 100 durante 3 dias.
- f) Lavar em água corrente.
- g) Corar segundo ALTMANN.
- h) Diferenciar pela aurantia.
- i) Corar o fundo pelo azul de toluidina.

II. *Método de BENDA* — (Verh. Anat. Gesellsch., 1901; Ergebn. d. Anat. und Entw., Vol. XII, pg. 702 e outros lugares) — Não é de constância absoluta além de longo e difícil, porém, em caso de êxito, as imagens são admiráveis e as preparações tem maior durabilidade do que as obtidas pelo método de ALTMANN.

A. — Endurecimento:

- a) Fixar por 8 dias, os fragmentos de tecidos (o quanto possível pequenos e frescos) no líquido de FLEMMING:

| | |
|-----------------------------|--------|
| Ac. crómico a 1 p. 100..... | 15 cc. |
| Ac. ósmico a 2 p. 100 | 4 cc. |
| Ac. acético | 1 cc. |

- b) Lavar em água por uma hora.
- c) Tratar pelo espaço de 24 horas pela seguinte mistura:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Ac. pirolenhoso retificado | 1 parte |
| Ac. crómico 1 p. 100 | 1 parte |

- d) Mordentagem por 24 horas na solução de bicromato de potássio a 2 p. 100.
- e) Lavar em água corrente por 24 horas.

- f) Deshidratar na série ascendente de alcoões.
- g) Incluir em parafina.

Note-se que os fragmentos se apresentam após o endurecimento com coloração doirada clara, não sendo, sensivelmente, enegrecidas pelo ac. ósmico. A inclusão em parafina deve-se seguir imediatamente. Deve-se também evitar um estágio demorado no álcool absoluto.

B. — Coloração:

- a) Cortar (5 micra mais ou menos).
- b) Colagem do corte sôbre laminula.
- c) Desparafinização.
- d) Lavagem em água corrente.
- e) Mordentagem pela solução de alumem de ferro a 4 p. 100 por 24 horas.
- f) Lavagem em água.
- g) Corar imergindo a laminula na seguinte solução:

| | |
|--|--------------|
| Sol. alc. sat. de sulfalizarinato de sódio.... | 1 cc. |
| Água destilada | 80 a 100 cc. |

na qual permanecerão por 24 horas.

- h) Lavagem cuidadosa, para desembaraçar o corte da matéria corante, colocando a preparação num cristalizador de fundo chato.
- i) Secar com papel de filtro.
- j) Corar à quente, até o desprendimento de vapores durante 5 minutos, colocando os cortes

num vidro de relógio com a seguinte solução preparada no ato de usar:

| | |
|---|--------|
| Sol. de cristal violeta saturada a frio no álcool | |
| a. 70 graus | 1 vol. |
| Alcool clorídrico | 1 vol. |
| Água anilinada | 2 vol. |

- k) Esfriar, deixando agir o corante por 5 minutos.
- l) Secar com papel de filtro.
- m) Diferenciar pelo ac. acético a 30 p. 100, 1 minuto
- n) Secar.
- o) Passar pelo álcool absoluto, até que ele quase não mais se tinta.
- p) Xilol.
- q) Montagem no bálsamo de Canadá.

O momento mais delicado do processo é o banho no álcool absoluto. Exagerado, os grãos dos filamentos se descoram completamente devendo-se recomeçar a operação desde j) após retirado o bálsamo pelo xilol. Insuficiente, estando corados outros elementos, procederemos a diferenciação pelo creosoto ou melhor pelo cresoto adicionado ao xilol para moderar a ação daquele. Segundo FRITSCH, se empregado um bom álcool absoluto podemos montar, diretamente, a lamínula no bálsamo.

Nas boas preparações, os mitocôndrios aparecem nitidamente limitados e corados em violeta intenso. O protoplasma e o núcleo apresentam-se pardo avermelhados.

Modificação de MEVES e DUESBERG (1908). Refere-se, principalmente, a coloração. Até a coloração pelo sulfalizarinato de sódio, inclusive, assemelha-se ao método original. Daí seguiremos:

- a) Lavagem em água destilada.
- b) Corar a preparação colocando-a numa placa de Pétri na qual foi posta a mistura em partes iguais da solução de cristal violeta de BENDA e água, aquecendo até desprender vapores e deixando então esfriar por 5 minutos.
- c) Lavagem rápida em água destilada.
- d) Diferenciar no ac. acético a 30 p. 100 por 1 a 2 minutos.
- e) Lavar em água corrente por 10 minutos mais ou menos para eliminar todos os traços do ácido.
- f) Secar pelo papel de filtro.
- g) Deshidratar, cautelosamente, pelo álcool absoluto.
- h) Tratar pela essência de bergamota.
- i) Xilol.
- j) Montagem no bálsamo.

III. Método de REGAUD (Arch. d'Anatomie microscopique, vol. II, 1910). — É o método mais simples e talvez o mais seguro das técnicas mitocondriais. É particularmente recomendável.

- a) Fixar os fragmentos durante 4 dias na solução seguinte:

| | |
|--|--------|
| Sol. aq. de bicromato de potássio a 3 p. 100.... | 20 cc. |
| Formol | 5 cc. |

O fixador enegrece rapidamente devendo ser renovado diariamente.

- b) Mordentagem na solução aquosa de bicromato de potássio a 3 p. 100, renovando o líquido todas as 48 horas, assim por uma semana.
- c) Lavar em água corrente durante 24 horas.
- d) Inclusão em parafina.
- e) Cortar.
- f) Os cortes são mordentados com uma solução aquosa de alumem de ferro a 5 p. 100 na estufa a 37 graus C durante 24 horas.
- g) Lavagem rápida em água destilada.
- h) Corar na seguinte solução, por 24 horas:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Hematoxilina cristalizada | 1 grama |
| Alcool absoluto | 10 cc. |
| Glicerina | 10 cc. |
| Água destilada | 80 cc. |

A glicerina e a água não devem ser misturadas senão após dissolução completa da hemotoxilina no alcool. Esperar o amadurecimento da solução (algumas semanas). Podendo-se usá-la muitas vezes sem inconvenientes.

Antes da coloração, deve-se lavar a preparação cuidadosamente pela água destilada, para evitar uma precipitação muito densa da laca ferrica. Por outro lado não

lavar demasiado, sob pena de eliminar o mordente. É um artifício de técnica que a experiência confere.

- i) Diferenciar sob o controlo do microscópio com uma solução de alumem de ferro a 5 p. 100.
- j) Lavar em água corrente por meia hora.
- k) Deshidratar.
- l) Clarificar.
- m) Montar.

Os mitocôndrios aparecem corados de azul escuro. Mas, há outras inclusões, não pertencentes ao aparelho mitocondrial, que também são evidenciadas.

Modificação do método de REGAUD por PARAT.

— PARAT aconselha:

- a) Fixar pelo REGAUD durante 24 horas em geladeira, renovando o líquido no caso de se turvar.
- b) Sem lavar, postcromisar segundo DIETRICH-PARAT.
- c) Lavar em água corrente, por 12 a 16 horas.
- d) Incluir em parafina.
- e) Cortar (2 a 5 micra).
- f) Mordentagem dos cortes pelo alumem de ferro a 5 p. 100 durante 24 horas.
- g) Lavar em água destilada.
- h) Corar na hematoxilina de REGAUD por 24 horas.
- i) Diferenciar no alumem de ferro a 3 p. 100 ob-

servando ao microscópio sem se preocupar com o descoramento dos núcleos.

j) Lavar em água destilada.

k) Deshidratar.

l) Montar em bálsamo.

As colorações assim obtidas são muito estáveis.

Além dos métodos expostos existem outros que merecem igualmente atenção e que passamos a enumerar.

Método de COWDRY. — (Bibliographie anatomique, vol. XXIII, 1913).

a) Fixação no líquido de BENSLEY por 2 a 16 horas.

b) Lavar em água destilada por uma hora.

c) Deshidratação cuidadosa na série de alcooes crescentes: 50 graus, 70 graus, 96 graus e absoluto. Em cada alcool deixar os fragmentos pelo espaço de 24 horas.

d) Clarificar pela essência de bergamota.

e) Incluir em parafina.

f) Cortar.

g) Desparafinar.

h) Lavar.

i) Passar por uma solução saturada de acetato de cobre por 5 minutos.

j) Lavar em água destilada muitas vezes renovada, por um minuto.

k) Corar um minuto pela solução aquosa de he-

matóxilina a 0,5 p. 100 partindo de uma solução alcoólica perfeitamente amadurecida.

- l) Lavar em água destilada.
- m) Passar em uma solução aquosa de cromato de potássio neutro a 5 p. 100 até aparecer coloração azul carregada o que acontece ao cabo de 1 minuto mais ou menos. Ficando azul-claro, lavar rapidamente em água destilada e recommençar muitas vezes como precedentemente, até surgir a coloração carregada.
- n) Lavar em água destilada.
- o) Transformação em laca cuprica, passando a preparação, novamente, na solução de acetato de cobre.
- p) Lavar alguns minutos em água destilada.
- q) Diferenciar, sob o controle do microscópio, com a seguinte solução:

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Borax | 4 gramas |
| Ferrocianureto de potássio | 5 gramas |
| Água destilada | 600 cc. |

- r) Lavar em água mineralizada por 6 a 8 horas.
- s) Deshidratar.
- t) Clarificar.
- u) Montar no bálsamo.

Pode-se igualmente usar como fixador a mistura de

ALTMANN.

Método de DIETRICH-PARAT-KULTSCHITZKY.

- a) Fixar no líquido de HELLY de 2 a 6 horas.
- b) Postcromar segundo DIETRICH-PARAT.
- c) Lavar em água corrente.
- d) Corar pela hematoxilina de KULTSCHITZKY durante 24 horas na estufa a 37 graus.
- e) Diferenciar na mistura borax-ferrocianureto de WEIGERT:

| | |
|----------------------------------|------------|
| Borato de sódio | 2 gramas |
| Ferrocianureto de potássio | 2,5 gramas |
| Água destilada | 1000 cc. |

- f) Lavar em água destilada.
- g) Deshidratar e montar no bálsamo.

Método de J. MARQUEZ (C. R. Soc. de Biol. — CXII, 1933, pg. 1056, Paris).

- a) Fixação: de preferência líquido de CHAMPY ou ZENKER sem ácido acetico. De 24 a 36 horas, segundo o tamanho das peças.
- b) Lavagem em água corrente por 24 horas.
- c) Deshidratação.
- d) Inclusão na parafina.
- e) Cortar (3 micra).
- f) Colagem e desparafinização dos cortes.
- g) Colodionagem segundo REGAUD.
- h) Colocar as laminas em frascos de Borrel cheios de licor cromo-ferrico, deixar de 24 a 36 horas na temperatura do laboratório e na obscuridade.
- i) Lavagem em água corrente por alguns minutos.

Observa-se, nitidamente, que os cortes tomam coloração amarela o que indica o tempo da cromagem.

- j) Colocar as laminas, agitando-as, numa solução de alumem de ferro de 10 a 12 p. 100 para eliminar o excesso dos sais de cromo e dissolver os pequenos cristais que porventura existam na preparação.
- k) Lavagem em água corrente por alguns minutos.
- l) Corar durante 18 a 24 horas na hematoxilina do mesmo autor, cuja fórmula é a seguinte:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Hematoxilina cristalizada | 1 grama |
| Alcool absoluto | 20 gramas |
| Glicerina | 20 gramas |
| Água destilada | 60 gramas |
- m) Diferenciação no alumem de ferro a 2 p. 100, cuidando ao microscópio.
- n) Deshidratação e montagem no bálsamo do Canadá.

O que se verifica de original neste método é o processo de mordentagem pelos sais de cromo, formando, como se sabe, um composto cromo-lipídico que favorece a coloração. Nestas condições o autor oferece o licôr cromo-férrico (do tempo h) —) cuja fórmula é a seguinte:

| | |
|-----------------------------|------------|
| Alumem de cromo | 10 gramas |
| Alumem de ferro | 10 gramas |
| Bicromato de potássio | 10 gramas |
| Água destilada | 100 gramas |

Prepara-se triturando num grál os cristais dos alu-
mens de cromo e de ferro e o bicromato de potássio.

Após pulverisação é lançado todo em um frasco on-
de se adiciona água destilada e agita-se até a dissolução
completa, que é fácil. Filtra-se. O licôr apresenta côr
escura como tintura de café. Sua conservação é longa
desde que seja conservado em lugar fresco e na obscu-
ridade. Antes de ser usado deve ser agitado e filtrado.

Método de MEVES (1908).

- a) Fixar no líquido de FLEMMING.
- b) Inclusão em parafina.
- c) Coloração pela hematoxilina férrica de HEI-
DENHAIN.

Os mitocôndrios apresentam, bem como os núcleos,
coloração escura.

Além dos métodos citados existem outras cujas mo-
dificações são de pequena significação técnica, tais como
os de: SCHRIDDE, RUSSEL, tricrômio de CAJAL, ME-
VES II, LEVI e outros.

IV) *Estudo do condrioma pelas impregnações metálicas*

Emprega-se, em citologia, a prata sob três formas:

Nitrato de prata, RAMON Y CAJAL

Carbonato de prata, DEL RIO HORTEGA

Complexo de prata amoniacal, BIELSCHOWSKY-
FONTANA.

Todos estes processos derivam do método primitivo
de RAMON Y CAJAL, publicado em 1903.



Consistem, em síntese, em impregnar tecidos previamente fixados ou os cortes, por uma solução fraca de nitrato de prata e reduzir o metal por redutores fotográficos como a hidroquinona ou o pirogácol. Fixa-se em seguida com ou sem viragem prévia, ao ouro. Representam estes meios, processos valiosos para o estudo do tecido nervoso para o qual foram idealizados e aplicados.

Com os progressos da técnica moderna seus horizontes tornam-se mais amplos, servindo também hoje, para a evidenciação dos elementos citológicos como o vacuoma e o condrioma.

Entre os métodos de impregnação metálica destacam-se neste setor do laboratório os de ACHUCARRO e DEL RIO HORTEGA que são aplicados em citologia com resultados satisfatórios.

Método de ACHUCARRO modificado por DEL RIO HORTEGA (1916 — Trab. Lab. Investig. biol. Madrid, XIV, p. 181; XV, 1918, p. 375).

O princípio do método devido a ACHUCARRO é o seguinte: as peças fixadas ao formol e cortadas por congelação, são mordentadas pelo tanino e depois impregnadas pelo complexo amônio-argentico de BIELSCHOWSKY e reduzidos pelo formol alcalino. A técnica é a seguinte:

- a) Fixar pequenos fragmentos no formol a 20 p. 100 durante 2 a 3 dias. Alcalinizar pelo amoníaco até obter reação básica ao tornasol.

- b) Cortar por congelação (10 micra).
- c) Fazer atuar o mordente durante 10 minutos (sol. aq. de tanino a 10 p. 100 aquecido, até o aparecimento de vapores).
- d) Deixar esfriar o corte.
- e) Lavar em água amoniacal.
- f) Impregnar no complexo argéntico de BIEL-SCHOWSKY diluído (3 a 4 gotas para 10 cc. de água destilada), até que a substância branca comece a se corar.
- g) Reduzir ao formol a 20 p. 100 alcalinizado.
- h) Lavar, desidratar e montar em bálamo.

O outro processo que é o de DEL RIO HORTEGA, deixamos para expôr na parte referente às técnicas por nós escolhidas para a evidencição do aparêlho mitocôndrial.

Causas de erro em técnica mitocôndrial.

- 1 — Todo o traumatismo dos órgãos no momento da extração deve ser evitado, sob pena de destruição do aparêlho mitocôndrial.
- 2 — Evitar que as peças fiquem por muito tempo expostas ao ar nas mesas de necrópsia, fator que pode prejudicar a morfologia dos condriossomas.
- 3 — As variações osmóticas são igualmente prejudiciais conforme já dissemos anteriormente.
- 4 — Na impossibilidade de fixar as peças imedia-

tamente, devem-se conservá-las na geladeira, tendo o cuidado de retirar com navalha bem afiada a superfície de contáto da mesma com o vaso, antes de colocá-la no reativo fixador.

5 — Geralmente, as células das camadas mais profundas dos órgãos, não ficam bem fixadas e vários tipos de artefatos podem-se apresentar.

6 — Os processos de má fixação, de mordentagem incompleta e de excessiva diferenciação dos corantes podem reduzir o número de condriosomas.

7 — O número dos condriosomas não sofre aumento pelos defeitos de técnica.

8 — A fixação incompleta traz ainda a transformação morfológica dos elementos do condrioma.

Parte Experimental
Partindo das concepções, técnicas e conclusões a que chegaram os diversos autores a respeito do aparêlho mitocondrial, lançamo-nos, naturalmente, ao seu estudo, dada a sua grande importância em citologia moderna.

Orientamo-nos em primeiro lugar, pelas investigações e técnicas consideradas clássicas neste ramo da histologia contemporânea e em segundo lugar interessou-nos, sobretudo, a investigação do condrioma em células cuja presença já está perfeitamente estudada, para, em seguida, nos transportarmos a sua verificação em zonas anatômicas cuja presença e funções não estão ainda bem esclarecidas.

Destarte, tomamos como ponto inicial, a escolha dos animais e a das técnicas que deveríamos seguir.

Entre os animais de laboratório, escolhemos o coelho, o coelho, o camondongo branco, o cão e o gato.

Em relação às técnicas, podemos declarar que em sua totalidade nos passaram pelas mãos, apresentando umas, vantagens iniciais que se desfaziam em obstáculo no término de seus tempos essenciais, ao passo que outras, aparentemente difíceis tornam-se, no entanto, com o emprêgo de certos recursos técnicos, mais fáceis, mais simples e de resultados práticos mais evidentes.

No estudo sistemático do condrioma, tendo como ponto de referência os trabalhos publicados e relatados por nós em páginas anteriores, praticamos, simultaneamente, a sua pesquisa nas células em aparente repouso e em plena atividade funcional.

Nestas condições, tivemos a oportunidade de observar o condrioma hepático em animais postos em jejum, em alimentação comum e em alimentação especial.

Fizemos, igualmente, o estudo do condrioma renal, cujas características de forma, de localização na célula e de distribuição nos tubos deixaremos para assinalar mais adiante.

As técnicas que, como acabamos de verificar, são numerosas e entrelaçadas umas com as outras pelas modificações imprimidas, ora em relação aos fixadores, ora aos diferenciadores e, finalmente, às colorações.

São tôdas elas, conforme os seus autores, boas, mas, naturalmente, em suas mãos mais experimentadas, pela fôrça das repetições em suas manipulações.

Além da escolha dos animais e da análise meticulosa das técnicas preocupamo-nos com o método de investigação biológica a que nos propuzemos realizar.

Para tal, executamos em nossas pesquisas o estudo do condrioma vivo sem coloração, o estudo do condrioma em coloração intravital, o estudo do condrioma em coloração supravital, o estudo do condrioma fixado e corado e o estudo do condrioma mediante o uso das impregnações metálicas.

Material de estudo.

- 1.º — Animais: camondongo, branco, cobaio, coelho, gato e cão.
- 2.º — Órgãos: fígado, rim, pâncreas, ovário e testículo.
- 3.º — Fixadores: BENOÎT, TUPA I, TUPA II, ORTH sem sulfato de sódio e formol isotônico a 10 p. 100.
- 4.º — Corantes: Fucsina ácida anilinada de ALTMANN, Verde de metila, Azul de toluidina e Azul de metileno.
- 5.º — Diferenciadores: Aurantia e Orange G.
- 6.º — Redutor: Formol a 1 p. 300.
- 7.º — Impregnadores: Carbonato de prata amoniacal e o cloreto de ouro.

Métodos e técnicas.

Estudo do condrioma vivo sem coloração.

As nossas observações acêrca do condrioma em estado fresco foram praticadas principalmente na célula hepática, cuja riqueza em condriosomas, facilita a investigação.

Após a morte do animal por pancada na cabeça, abertura da cavidade abdominal com todos os cuidados de técnica e a retirada de finas laminas de tecido hepático por meio de gilete nova montada em pinça hemostática colocadas as mesmas entre lamina e lamínula com algumas gotas de sôro de Locke tépido, exercendo-se leve compressão sôbre a lamínula, levamos ao exame microscópico praticado, simultâneamente, com luz direta e com luz transmitida, fundo escuro.

Em ambos os processos tivemos oportunidade de verificar o aparelho mitocondrial em estado vivo representado em algumas zonas por granulações, mitocôndrios que bem se assemelham a pequenos cocos ora aglutinados, ora isolados deslocando-se na parte líquida da preparação e vendo-se que de fato êstes pequenos corpusculos não possuem movimentos próprios, mas se transportam, por meio das correntes fluídas que se originam no preparado, para os diversos setores do campo microscópico.

Observamos, igualmente, alojados em pleno citoplasma hepático mitocôndrios e condriocentos, estes úl-



timos representados por bastonetes que em nossas preparações não se apresentaram livres em certos lugares como os mitocôndrios e muito menos arrastados pelas correntes líquidas.

I. *Estudo do condrioma em coloração intravital.*

Infelizmente, não nos foi possível obter para tal desideratum o verde Janus B que, conforme já nos pronunciamos páginas atrás, é o melhor corante vital do condrioma. No entanto, percorrendo a lista das substâncias tintoriais possíveis de serem aplicadas neste processo experimental, encontramos entre outras, o azul tripan, considerado um dos melhores corantes ácidos para técnica intravital. Efetivamente, os resultados por nós alcançados, foram de real valor no que diz respeito ao rim e demonstraram completa tolerância por parte do animal, parecendo-nos que não se trata de corante de toxidês elevada.

Empregamos a técnica indicada por GOLDMANN (ROMEIS — Guia-formulário de TÉCNICA HISTOLÓGICA, 1928, parágrafo 465) que executamos do seguinte modo:

Preparação do corante: dissolvemos 1 grama de azul tripan em 100 cc. de sôro fisiológico. Filtramos e autoclavamos à 120 graus durante 15 minutos. Conservamo-la na geladeira. Êste cuidado é indispensável pois esta solução corante está sujeita à alterações de ordem coloidal que tornam o corante muito tóxico. Mesmo

conservando-a em baixa temperatura ela não deve ultrapassar de trinta dias a contar da época da sua preparação.

Emprega-se-a na proporção de 0,5 a 1 cc. para cada 20 gramas de peso do animal.

Técnica das injeções: Inoculamos 0,5 cc. da solução corante por via subcutânea no abdome de camundongo branco pesando 21 gramas, repetindo a inoculação cada cinco dias até perfazer o total de sete injeções.

Algumas horas após a primeira inoculação observamos que o camundongo já apresentava a pele ligeiramente azulada, coloração que foi aumentando de intensidade à proporção que se renovavam as injeções, chegando no final com coloração azul intensa que se percebia, principalmente, nas zonas em que os pêlos são menos densos como cauda, orelhas, patas, ventre e focinho. No resto do corpo, zona de pêlo mais denso, era preciso afastá-los para se verificar que, igualmente, a epiderme se achava corada.

Acresce salientar que importante tempo de técnica é o intervalo de 24 horas que deve mediar entre a última inoculação e a morte do animal.

Extração e tratamento das peças: Isto feito, sacrificamos o animal por pancada na cabeça e após abertura da cavidade abdominal observamos que tôdas as vísceras abdominais, sem exceção, achavam-se fortemente coradas em azul escuro, contrastando com a coloração

azul anil da pele. As peças colhidas com todos os requisitos técnicos foram reduzidas a pequenos fragmentos e colocadas no formol isotônico a 10 p. 100 durante 12 horas.

Os cortes foram praticados por congelação e montados no bálsamo do Canadá, sem interferência de qualquer outra matéria corante.

A observação microscópica forneceu-nos imagens instrutivas e nítidas acêrca do aparelho mitocondrial e que mais adiante voltaremos a abordar.

I. *Estudo do condrioma em coloração supravital.*

Como já nos referimos, anteriormente, na falta do verde Janus empregamos também aquí o azul de metileno em solução a 1 p. 100. Êste meio de investigação foi empregado por nós tôdas as vezes que sacrificávamos animais para estudo. Ao material, colhido como no processo anterior, acrescentamos algumas gotas da solução de azul de metileno a 1 p. 100 e observamos que ao cabo de 30 a 40 minutos já se apresentavam, geralmente, os condiomias corados em azul claro.

Em relação a êste método, NOEL acha que além de, muitas vezes, não corar os elementos do condrioma fornece resultados que não representam a expressão morfológica dos mesmos, visto o tempo que necessitam para se impregnarem pela matéria corante que no caso do condrioma, aparelho delicado e sensível, é o suficiente

para conduzir os condiosomas à alterações de forma e de localização intracelular.

As nossas observações concordam com as do referido autor.

GUILLIERMOND e LEWIS aconselham, para retardar tais alterações morfológicas, o uso dos vapores do iodo ou a solução iodo-iodurada que, conforme as suas observações, evitam as transformações rápidas que se operam nas células vivas e isoladas do organismo, fazendo desta forma melhor conservação do aparelho mitocondrial.

III, *Estudo do condrioma fixado e corado*

Tomando como base os estudos atuais em relação aos fixadores do condrioma e das propriedades que os mesmos devem apresentar, experimentamos as misturas fixadoras clássicas e encontramos em nossas pesquisas os melhores resultados com os líquidos de BENOÎT (aconselhado por PARAT), TUPA I, TUPA II e formol isotônico a 10 p. 100. As fórmulas destas misturas já estampamos páginas atrás. O mesmo fizemos em relação aos corantes e diferenciadores.

Após várias tentativas e ensaios preferimos a coloração pela fucsina ácida anilinada de ALTMANN à quente e os diferenciadores: solução de aurantia a 0,5 p. 100 em álcool à 70 graus, solução saturada de ácido pícrico em álcool absoluto ao têtço e solução saturada de orange G em álcool à 80 graus. Como corantes de fundo em-

pregamos o verde de metila e o azul de toluidina em soluções a 1 p. 100.

A técnica que seguimos foi a seguinte:

- 1.^o — Sacrificar o animal por pancada na nuca.
- 2.^o — Proceder a extração das peças com o máximo cuidado técnico para evitar artefatos futuros.
- 3.^o — Fragmentar os órgãos em pequenas porções tendo no máximo 2 a 3 milímetros de espessura e mais ou menos 1 centímetro de superfície, pois sabemos que os fixadores do condrioma são pouco penetrantes.
- 4.^o — Lavagem cuidadosa das peças com água destilada em placa de Petri.
- 5.^o — Fixação pelos líquidos de BENOÏT, TUPA I e II durante 24 horas.
- 6.^o — Lavagem em água corrente por 24 horas.
- 7.^o — Deshidratação na série ascendente de álcooes: 30, 50, 70, 90, 95 e álcool absoluto; e xilol ou toluol para completar e clarificar.
Gastamos nestas manipulações mais ou menos 12 horas.
- 8.^o — Inclusão em parafina de 56 à 58 graus em dois banhos, perfazendo um total de 12 horas, ao fim das quais foram feitos os blocos.
- 9.^o — Os cortes foram executados em micrótomo tipo Minot, graduado para 3 micra.

10.^o — Colagem pela albumina de MAYER e colocação na estufa durante meia hora.

11.^o — Desparafinização dos cortes em xilol ou toluol e na série decrescente de álcooes sendo que na passagem do álcool de 90 graus para o de 70 graus o corte recebe a colodionagem aconselhada por REGAUD e que consiste em mergulhar a preparação pelo espaço de um a dois minutos na seguinte solução:

| | |
|-----------------------|-----------|
| Colódio comum | 20 partes |
| Eter sulfúrico | 40 partes |
| Alcool absoluto | 40 partes |

Retira-se a lamina e escôa-se com cuidado, sem deixar que se produza a exaporação e imerge-se-a imediatamente no álcool a 70 graus. O colodio se precipita quase que instantâneamente sob a forma de película transparente que preserva os cortes do descolamento e não perturba em absoluto a coloração.

Reputamos de grande valor prático êste artjificio de técnica que evita dissabores nos numerosos tempos que se seguem.

12.^o — Lavagem em água corrente, com cuidado e por alguns minutos.

13.^o — Tôda a vez que houver superfixação, no caso com o BENOÎT, deve-se praticar o descoramento pela solução de permanganato de potásio por um minuto; lavar ràpidamente em água distilada e descorar na solução de ácido

oxálico a 4 p. 100 durante um minuto. Lavar em seguida em água destilada.

- 14.^o — Corar pela fucsina ácida anilinada de ALTMANN à quente, em platina aquecedora, durante 5 minutos, tendo o cuidado de não deixar evaporar o corante.
- 15.^o — Deixar esfriar as lâminas pelo espaço de mais ou menos 6 minutos.
- 16.^o — Lavar cuidadosa e prolongadamente em água destilada, limpando bem a lâmina ao redor do corte.
- 17.^o — Imergir a lâmina em solução de aurantia por 2 minutos.
- 18.^o — Lavar rapidamente em água corrente.
- 19.^o — Corar pelo verde metila por 15 segundos.
- 20.^o — Lavar, desidratar e montar no bálsamo neutro.

Por esta técnica, os elementos do condrioma se apresentam corados de vermelho enquanto que o resto do campo se apresenta de côr esverdeada.

Outra técnica seguida foi aconselhada por LUDFORD (The Microtomist's Vade-mecum — ARTHUR BOLLES LEE, 1937, parágrafo 748) e que executamos do seguinte modo:

- 1.^o, 2.^o, 3.^o e 4.^o tempo semelhantes ao processo anterior.

- 5.º — Fixação: formol isotônico a 10 p. 100 durante 24 horas.
- 6.º — Cortes por congelação (5 a 10 micra).
- 7.º — Corar durante um minuto os cortes pelo clorocarmim de HOLLANDE.
- 8.º — Lavar em água destilada ou em álcool a 30 graus.
- 9.º — Enegrecer os cortes pelo alumem de ferro a 3 p. 100.
- 10.º — Lavar em água destilada.
- 11.º — Tratar pela solução de piridina a 1 p. 100.
- 12.º — Lavar em água morna durante 10 a 15 minutos.
- 13.º — Deshidratar e montar no bálsamo de Canadá.

IV) Estudo do condrioma mediante o uso das impregnações metálicas

Em nossas experimentações utilizamos também o método de impregnação metálica. Para êsse fim lançamos mão do método do carbonato de prata amoniacal que DEL RIO HORTEGA aconselha para o estudo do condrioma (Bol. R. Soc. Española de Hist. Nat., abril, 1929 — PRÉCIS DE MICROSCOPIE — LANGERON, 1934).

Eis a sua técnica:

Fixação no formol bicromatado (semelhante ao MÜLLER — formol ou líquido de ORTH sem sulfato de sódio, fixadores à base de cromo). A impregnação opera-se na solução mãe de carbonato de prata fortemente piridinada.

- 1.º — Fixar no formol bicromatado durante 24 horas (esta solução deve ser preparada no momento de emprêgo devido a ação redutora do formol sôbre o sal crômico).
- 3.º — Lavar rapidamente os cortes em água amoniacal (30 segundos) e em seguida por mais tempo em água distilada. A água amoniacal obtem-se adicionando 3 a 4 gotas de amoniaco em 20 cc. de água distilada.
- 4.º — Impregnar em 6 cc. da sol. mãe de carbonato de prata amoniacal adicionada de 8 a 15 gotas de piridina.

A sol. mãe de carbonato de prata amoniacal prepara-se do seguinte modo:

| | |
|--|---------|
| Sol. de carbonato de sódio a 5 p. 100..... | 150 cc. |
| Sol. de nitrato de prata 10 p. 100..... | 50 cc. |

Deita-se amoniaco até a dissolução completa do precipitado.

- 5.º — Aquecer os cortes, na temperatura de 50 a 55 graus, na solução piridinada, até que os mesmos apresentem coloração doirada.
- 6.º — Lavar no álcool a 50 graus.
- 7.º — Reduzir na solução de formol neutro de 1 p. 200 ou 1 p. 300 até coloração amarela dos cortes.
- 8.º — Virar no cloreto de ouro e 1 p. 500 até obter coloração cinza-violacea, que se opera no espaço de meio minuto.



- 9.^o — Fixar no hiposulfito de sódio a 5 p. 100.
10.^o — Lavar em água destilada, desidratar e montar em bálsamo.

Observações dos preparados e interpretação dos resultados

Com o emprêgo das técnicas citadas conseguimos não só evidenciar o aparelho mitocondrial como também observá-lo na célula hepática conforme os estudos de NOEL.

Em tôdas as células dos órgãos que examinamos, já citados anteriormente, tivemos oportunidade de encontrá-lo mas no entanto, nos interessou, sobretudo, a verificação do comportamento do condrioma hepático e do condrioma renal, êste último, ainda muito pouco explorado pelos autores modernos.

Falemos, a princípio, sôbre as investigações relativas ao condrioma hepático e realizadas em camundongos brancos divididos em três lotes: A, B e C constando cada, de dois camundongos, colocados respectivamente em jejum de 48 horas, em alimentação a pão e leite e em alimentação gordurosa com queijo.

Os camundongos do lote A nos ofereceram condrioma escasso nas *zonas de repouso permanente e intermediária*, notando-se maior acúmulo, na periferia do lóbulo hepático correspondendo, justamente, a *zona de funcionamento permanente*.

Nos camundongos do lote B observamos que o con-

drioma é mais abundante do que no anterior, verificando-se em maior quantidade nas células das *zonas de funcionamento permanente e intermediária*.

Nos camundongos do lote C, sacrificados em pleno período digestivo, duas horas após a suspensão do alimento, nos mostrou tôdas as células do lóbulo ricas em condrioma, sem, pròpriamente, distinção de zonas, conforme o cliché que acompanha esta parte.

Para o estudo do condrioma renal, servimo-nos do método de coloração intravital pelo azul tripan, de cuja técnica já nos preocupamos páginas atrás, assim como, de peças fixadas pelos métodos descritos anteriormente.

Em face de dificuldades criadas no momento da execução dos preparados, nos vimos na contingência de utilizar várias adaptações e modificações para obtermos os métodos de que necessitávamos. Nestas condições imprimimos algumas modificações aos referidos processos.

Com o uso dos fixadores já assinalados e da fucsina de ALTMANN diferenciada, ora pela aurantia, ora pelo orange G e com o contraste estabelecido pelo verde metila ou pelo azul de toluidina obtivemos boas preparações que nos permitiram o estudo topográfico do rim.

Queremos assinalar ainda, que durante a composição das técnicas que utilizamos, encontramos a explicação da diversidade de métodos, quase todos modificados pelos diferentes investigadores e decorrentes, natural-

mente, como a nós aconteceu, das dificuldades iniciais da evidenciação do aparêlho mitocondrial.

O camondongo branco injetado pelo azul tripan, camondongo azul, como o chamamos, nos forneceu belas imagens ao nível da porção glomerular do rim, destacando os tubos contornados, intermediário de SCHWEIGGER - SEIDEL, assim como nos assinalou a existência em determinada zona da parte interna da cápsula de BOWMANN de rico aglomerado tintorial.

Como se sabe, os corantes intravitais se reduzem ou se acumulam de preferência, ou quase que eletivamente, nas células que apresentam atividade funcional. Ora, a presença do corante no primeiro e no terceiro segmento do tubo urinário não nos causou surpresa, visto estes tubos já serem classificados, pelos histologistas modernos, como sendo portadores de células capazes pela sua estrutura e pelas atitudes fisiológicas que se tem surpreendido, de elaborarem, de secretarem ou de reabsorverem. Mas no entretanto, o que nos causou espécie foi a constatação dêste determinado setor da cápsula de BOWMANN ter-se impressionado com a matéria corante injetada.

Várias suposições poderão ser levantadas, mas parece-nos, que êste epitélio possa ter importância nos processos histo-fisiológicos do rim.

Em face dêste achado microscópico, insistimos na pesquisa do condrioma renal em outros camondongos,

não injetados pelo azul tripan mas sim fixados e corados pelo processo já indicado. Observamos desta forma que a fucsina tingiu grânulos e bastonetes das células pertencentes aos tubos contornados e das do terceiro segmento. Encontramos na cápsula de BOWMANN, como na preparação do camondongo azul, uma extensão corada em vermelho na qual se distinguiu granulações idênticas às encontradas nas células dos tubos.

Acresce salientar, que submetemos, igualmente, os cortes do camondongo azul à coloração pela fucsina de ALTMANN e constatamos que a mesma não corou nem as células dos tubos e nem mesmo as porções da cápsula de BOWMANN que permaneceram azues.

Indiscutível para nós, é que de fato as porções das células tubulares impregnadas pelo azul tripan correspondem, exatamente, às mesmas coradas em outras preparações pela fucsina de ALTMANN, verificando-se o mesmo em relação a determinadas zonas da cápsula de BOWMANN, conforme se observa no cliché anexado a esta contribuição.

Talvez seja ainda cedo para querermos, de momento, estabelecer afirmativas científicas que só o tempo e as observações subsequentes amparadas nos progressos da técnica poderão revelar com maior exatidão o que de real possa existir.

Desejamos, no entanto, deixá-la aqui consignada como resultado de nossas investigações.

Para a feitura de nossos trabalhos consultamos os tratados e os artigos esparsos que constam em nossa bibliografia e realizamos preparações num total de 150 lâminas oriundas de 14 animais por nós sacrificados.

Quanto as microfotografias, podemos declarar que não são fáceis em relação ao condrioma e que só após algum tempo de experiências em relação ao tempo de exposição, filtro etc... é que conseguimos as que junto publicamos. Talvez um dos fatores que intervém tornando difícil tal processo seja o do contraste dos corantes empregados. Apresentamos, igualmente, desenhos esquemáticos assim como as microfotografias que obtivemos, graças à série de tentativas, coradas mais ou menos de confrimidade com as combinações cromáticas utilizadas parecendo-nos desta forma destacar melhor os condriomas.

CONCLUSÕES



I

A evidenciação do condrioma não é fácil, sendo necessário algum tempo de aprendizagem técnica.

II

Dos animais de laboratório, o que melhores resultados nos forneceu, para o estudo do condrioma, foi o camundongo branco.

III

Entre os fixadores, os que mais se destacaram em nossas experiências foram os líquidos de: BENOÎT, TUPA I e TUPA II.

IV

Do ponto de vista da coloração, alcançamos os melhores resultados com a fucsina ácida anilinada de ALTHANN, diferenciada pela solução de aurantia a 0,5 p. 100 em álcool a 70 graus e com a coloração de fundo pelo verde de metila a 1 p. 100.

V

A combinação ótica que melhor evidencia o aparelho mitocondrial deve ser superior a x 600.

VI

As células que nos forneceram condrioma mais

abundante foram as hepáticas, razão pela qual êste aparelho se evidenciava com maior facilidade, tanto *in vivo* como *post-mortem*.

VII

As nossas observações sobre o condrioma hepático nos permitiram verificar que, realmente, êle é mais abundante em certas zonas do lóbulo do que em outras, o que se parece relacionar com o regime alimentar.

VIII

Nos cortes de fígado notamos predominância de mitocôndrios, tanto nos animais em jejum como em pleno período digestivo.

IX

Constitue, igualmente, fonte de nossas investigações a circunstância de que os elementos do condrioma renal se apresentam com predominância de condriocôntos sobre os mitocôndrios; os primeiros localizados na base das células e dirigidas para cima e os segundos distribuídos nas partes média e apical das mesmas.

X

O azul tripan em solução a 1 p. 100 em soro fisiológico não se mostrou tóxico aos camundongos injetados até o momento em que foram sacrificados (35 dias após a primeira inoculação).

XI

No rim dos camundongos inoculados subcutânea-mente pelo azul tripan, verificamos que o corante se acumulou ou se reduziu nas células do primeiro e do terceiro segmentos do tubo urinário, assim como em determinadas zonas do folheto visceral da cápsula de BOWMANN; concordando com as experiências de v. MÖLLENDORFF.

XII

Não conseguimos a coloração do condrioma das células dos tubos urinários e a do folheto interna da cápsula de BOWMANN pela fucsina de ALTMANN nos camundongos injetados com azul tripan nas zonas onde êste corante se acumulou ou se reduziu prèviamente.

XIII

Notamos, enfim, que as zonas coradas pela fucsina de ALTMANN, primeiro e terceiro segmentos e folheto interno da cápsula de BOWMANN, coincidiram com as que fixaram o azul tripan consoante resultados obtidos em nossas experiências feitas na série de animais examinados.

BIBLIOGRAFIA

OBRAS CONSULTADAS

- ANDERSON (C.) — Histologia y embriologia — 1942.
- ALOISE (Dr. LUIZ) — Tratado de Fisiologia, Tomos I e II — 1938.
- ANDREA DOS SANTOS (MARIO) — Técnica Histológica — 1926.
- BUÑO (WASHINGTON) — Estudios de Histofisiologia e Histofisiopatologia Tiroidéa — 1943.
- BEST and TAYLOR — Physiological basis of Medicine Practice — 2.^a ed. — 1940.
- BRANCA (A.) — Précis d'Histologie — 5.^a ed. — 1921.
- BOLLES-LEE — The Microtometist's Vade-Mecum — 10.^a ed. — 1937.
- BERTRAND (YVAN) — Techniques histologiques de neuropathologie — 1930.
- BÖHM et OPPEL — Technique microscopique — trad. francesa de E. Rouville — 4.^a ed. — 1907.
- BRANCHET (A.) — Traité d'Embryologie des vertébrés — 2.^a ed. — 1935.
- BENSLEY (R. R.) and S. H. BENSLEY — Handbook of Histological and Cytological Technique — 2.^a ed. — 1941.
- BOUIN (P.) — Éléments d'Histologie — 2 vol. — 1939.
- BEYLOT (E. MARC) — Alb. BAUDRIMONT — Manuel Theorique et Pratique — 2 vols., 3.^a ed. — 1932.
- BERDAL (Dr. ENRIQUE) — Manual de Histologia normal — 2.^a ed. hesp., trad. pelo Dr. Carlos Coleja y Borja-Tarrus da 6.^a ed. fr.

- BULLIARD (H.) — Ch. CHAMPY — Abrangé d'Histologie — 10.^a ed. — 1920.
- BIANCHI-LISCHETTI (ANGEL) — Biologie general — 6.^a ed. — 1942.
- CARAZZI-LEVI — Técnica microscópica — 3.^a ed. 1916.
- CHAMPY (Dr. Ch.) — Précis d'Histologie — 2 vols. — 1928.
- COWDRY (E. W.) — A textbook of HISTOLOGY — 2.^a ed. — 1938.
- DONCASTER (L.) — An Introduction to the study of cytology — 2.^a ed. — 1924.
- ERAUSQUIN (JORGE) — Apuntes de tecnica histologica — 3.^a ed. — 1934.
- FORT (J. A.) — Traite élémentaire d'Histologie — 1863.
- FREY (A.) — Precis d'Histologie — 1878.
- JORDAN (H. E.) — A texbook os Histology — 7.^a ed. — 1934.
- KOELLIKER — Éléments d'Histologie Humaine — 1856.
- LEVI (G.) — Tratado de Histologia — trad. hesp. pelo prof Fernandez Goliano — 2.^a ed. — 1931.
- LANGERON (Dr. M.) — Précis de Microscopie — 5.^a ed. — 1934.
- LAUNOY (L.) — Précis de Technique histologique — 1904.
- LABBÉ (ALPHONSE) — La Cytologie experimentale — 1898.
- MOREL (C.) — Précis d'Histologie humaine — 1860.
- MALLORY (FRANK BURR) — Pathological Technique — 1938.
- McCLUNG (C. E.) — Handbook of Microscopical Technique — 2.^a ed. 1937.
- PUJUILE (JAIME) — S. J. — Citologia (teórica e prática) — 2 vols., 2.^a ed. — 1928.
- PIERANTONI (M.) — Compêndio de Biologia — trad. hesp. pelo Dr. Fernandez Goliano — 1931.
- POLICARD (A.) — Précis d'Histologie physiologique — 3.^a ed. — 1934.

- PENSA (A.) — Trattato di Istologia Generale — 2.^a ed. — 1939.
- ROMEIS (Prof. Dr. B.) — Guia Formulário de Técnica histológica — trad. hesp. 11.^a ed. alem. — 1928.
- RANVIER (L.) — Traité Technique d'Histologie — 2.^a ed. — 1889.
- RONDONI (P.) — Compêndio de Bioquímica — trad. hesp. — 4.^a ed. — 1935.
- RETTNER (ED.) — Éléments d'Histologie — 1924.
- RAMON Y CAJAL e J. F. TELLO Y MUÑOZ — Elementos de Histologia normal e de técnica micrografica — 10.^a ed. — 1931.
- STÖHR (Dr. PHILLIP) — Tratado de Histologia y anatomia microscópica del hombre — refundida pelo Dr. Wilhelm von MÖLLENDORFF — 2.^a ed. hesp. trad. da 24.^a ed. alem. — 1943.
- SAMORRÃO BRANDÃO (J.) — E. M. PENIDO BURNIER — Compendio de Histophysiologia — 1936.
- SZYMONOWICZ (L.) — R. KRAUSE — Tratado de Histologia y Anatomia microscópica — trad. hesp. da 6.^a ed. alem. — 1935.
- SCHAFFER (E. S.) — Manual de Histologia — 1.^a ed. hesp. trad. pelo Dr. D. J. PUCHE ALVAREZ da 12.^a ed. Ing. — 1934.
- SCHUMACHER (Dr. S.) — MARIENFRID — Compêndio de Histologia humana — trad. hesp. pelo Dr. F. GALIANO da 1.^a ed. Alem. — 1936.
- TOURNEUX (F.) — Précis d'Histologie Humaine — 2.^a ed. — 1911.
- TRAUTMANN-FIEBIGE — Histologie und Vergleichende mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere — 2.^a ed. — 1931.
- VIAL ETON (L.) — Précis de Technique Histologique et Embryologique — 2.^a ed. — 1909.



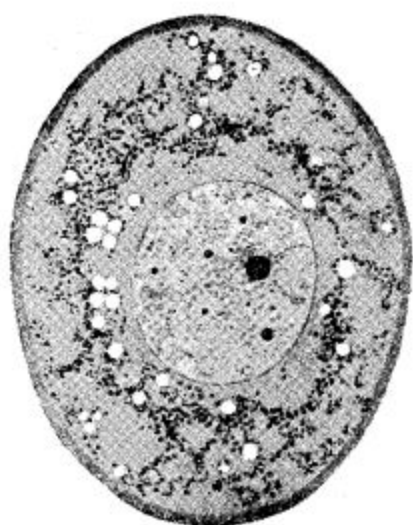
REVISTAS CONSULTADAS

- ARGESEANU (S.) et FEYEL (P.) — Étude cytologique du tube de Malpighi du Dytique (C. R. Soc. Biol. t. CXV — 1934 — n.º 11 — pg. 1151).
- BOISSÉZON (P. de) — Des modifications histologiques du foie observées chez le Lapin au cours de 1.^a préparation du sérum hemolitique. (C. R. Soc. Biol. t. CXVI — 1934 — n.º 21 — pg. 500).
- CALVET (J.) — Étude du chondriome dans les cellules epiphy-saires de quelques mammiferes. (C. R. Soc. Biol. t. CXIII — 1933 — n.º 19 — pg. 300).
- CORNET (P.) — Modifications cytologiques observées dans quelques plantes soumises au rayonnement de la lampe a vapeur de mercure. (C. R. Soc. Biol. t. CXIV — 1933 — n.º 29 — pg. 47).
- DEHORNE (A.) — Un exemple de modifications du chondriome dans les sens d'un apport figure a la prosécretion. (C. R. Soc. Biol. t. CXXX — 1939 — n.º 9 — pg. 892).
- FILHOL (J.) — Le chondriome dans les cellules cyanophiles de l'hépatopancreas chez *Agriolimax agrestis* L. — C. R. Soc. Biol. t. CXVI — 1934 — n.º 22 — pg. 579).
— Le chondriome au cours du cycle secrettoire des glandes muqueuses de l'oviducte chez l'*Arion rufus* L. (C. R. Soc. Biol. t. CXVII — 1934 — pg. 1066).
- FEYEL (P.) — Sur l'existence et le rôle des cellules speciales dans le segment intermediaire et le tube de Bellini du rein chez la souris. (C. R. Soc. Biol. t. CXV — 1933 — n.º 11 — pg. 1148).
- GATENBY (J. B.) et DUTHIE (E. S.) — Les colorations vi-

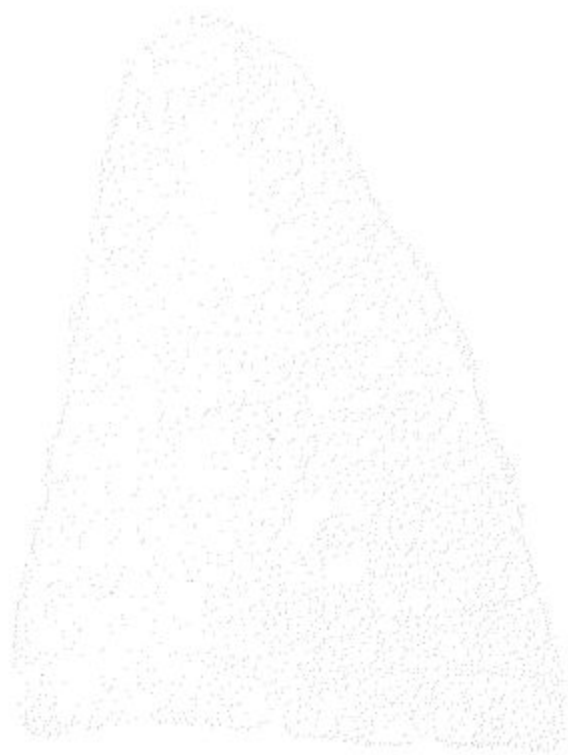
- tales des cellules sexuelles mâles chez *Cavia* (C. R. Soc. Biol. — t. CXIII — 1933 — n.º 18 — pg. 173).
- HIRSCHLER — Sur la chromisation des pièces sur coupes pour mettre en évidence l'appareil de Golgi, le chondriome et d'autres composants plasmatiques. (C. R. Soc. Biol. — t. CXII — n.º 16 — 1933 — pg. 1640).
- JACQUIERT (CLOVIS) — Recherches sur l'ovogenèse du Dytique. (Bulletin d'Histologie Appliquée — t. XII — 12.º année — n.º 4 — avril 1935 — pg. 139).
- MARQUEZ (J.) — La forme du chondriome des gonocytes de l'embryon de poulet. (C. R. Soc. Biol. — t. CXV — 1934 — n.º 14 — pg. 1573).
- Un nouveau procédé de chromage des pièces sur coupes, simples et rapide, pour mettre en évidence le chondriome (C. R. Soc. Biol. — t. CXII — 1933 — n.º 11 — pg. 1056).
- Impregnation du chondriome et de quelques éléments tissulaires sur des coupes à la paraffine par le complexe tungstène-argentique ou molybdène-argentique. (C. R. Soc. Biol. — t. CXVII — 1934 — n.º 36 — pg. 986).
- CXII — 1933 — n.º 16 — pg. 1691).
- NOEL (R.) et G. PALLOT — Recherches histophysiologiques sur la cellule hépatique des mammifères: III — Sur la genèse mitochondriale des graisses intra-hépatiques. (Bulletins d'Histologie appliquée — t. XI — 11.º année — n.º 3 — Mars 1934 — pg. 115).
- Recherches sur le chondriome de la cellule hépatique des mammifères: I — Le chondriome hépatique chez le rat. (Bulletin d'Histologie appliquée — t. X — 10.º année — n.º 6 — Juin 1933 — pg. 169).
- Sur la substance dite "granuleuse" des plaques motrices et des fuseaux musculaires. (Bulletin d'histologie appliquée

- t. XII — 12.^o année — n.^o 4 — Avril 1935 — pg. 172).
- NOEL (ROBERT) — Recherches histo-physiologiques sur l'acellule hépatique des mammifères. (Archives d'Anatomie microscopique — t. XIX — fasc. I — 1923 — pg. 1).
- OKKELS (H.) — Fonctionnement cellulaire et appareil de Golgi. Secretion renale et Thyroïdienne. (C. R. Soc. Biol. — t. —
- ORSKA (J.) — Sur un développement atypique du corps mitochondrial chez le mâle (Fauxbourdon) de l'Abeille domestique (*Apis mellifica*) — Hyménoptères (C. R. Soc. Biol. t. CVIII — 1931 — n.^o 33 — pg. 680).
- PILAWSKI (S.) — Le corps mitochondrial dans la spermatogénèse chez *Cicindela hybrida* L. (C. R. Soc. Biol. — t. CXIII — 1933 — n.^o 18 — pg. 189).
- PARAT (M.) et VILLELA (E.) — Les colorations vitales des cellules sexuelles mâles et de quelques cellules somatiques chez les mammifères. (C. R. Soc. Biol. — t. CXII — 1933 — n.^o 6 — pg. 565).
- ROJAS (P.) et RESTA (L. S.) — Histophysiologie du chondriome de la fibre musculaire striée. (C. R. Soc. Biol. — t. CXXXI — 1939 — n.^o 16 — pg. 293).

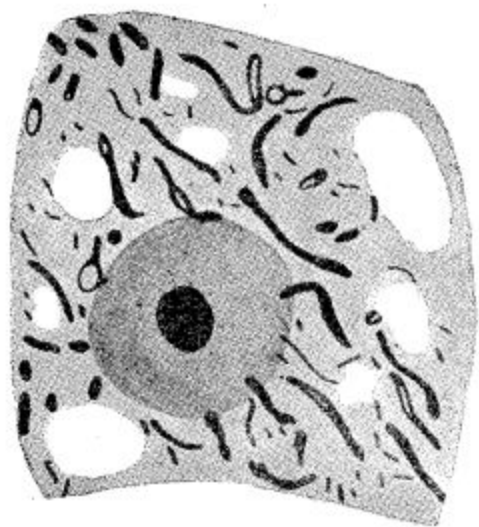
Ao terminar este trabalho apresentamos para a necessária documentação, uma série de microfotografias e desenhos extraídas umas de autores clássicos e outras relativas as nossas preparações, destinadas a darem melhor esclarecimento ao estudo que acabamos de realizar.



Ovocito de camundongo, com mitocôndrios no citoplasma.
x 1.000 (P. Bouin)



Células epidermicas vivas de uma pétala de rosa, a antociani-
na acha-se distribuída de forma difusa nas células próximas da
base e gelificada em forma de filamentos nas situædas perto do
ápice. (De Pensa).



Célula do parênquima da raiz do *Athyrium felix femina*
Condriocontos no seio dos quais se percebe espaços claros
onde começam a se formar grãos de amido. Segundo Emberger
(P. Bouin).

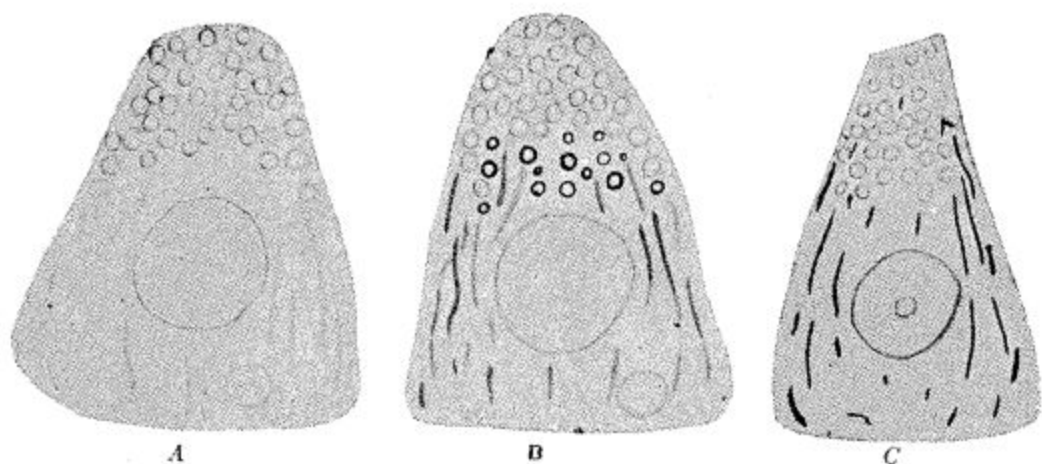


Diagrama das células do acinus pancreático

A, observação em estado vivo, sem coloração.

B, após coloração supra-vital com verde janus e vermelho neutro

C, após fixação com Regaud e coloração com fucsina ácida e verde de métila.

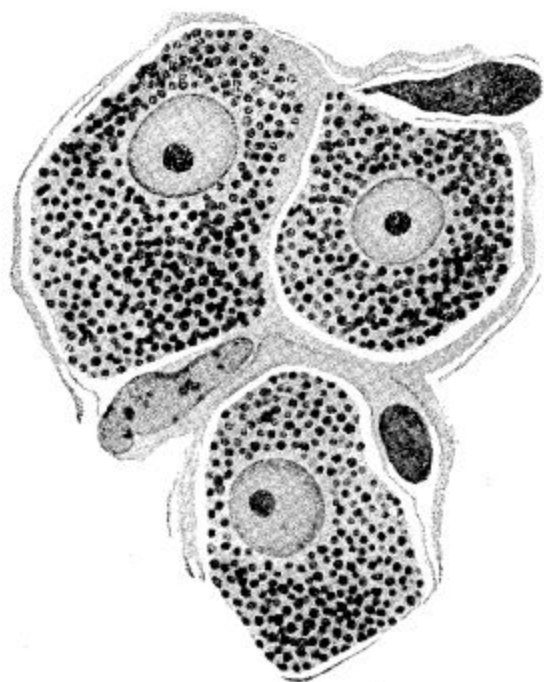
Os grãos de zimogênio ocupam a zona apical e o aparelho mitocondrial o resto da área citoplasmica.

(Cowdry).

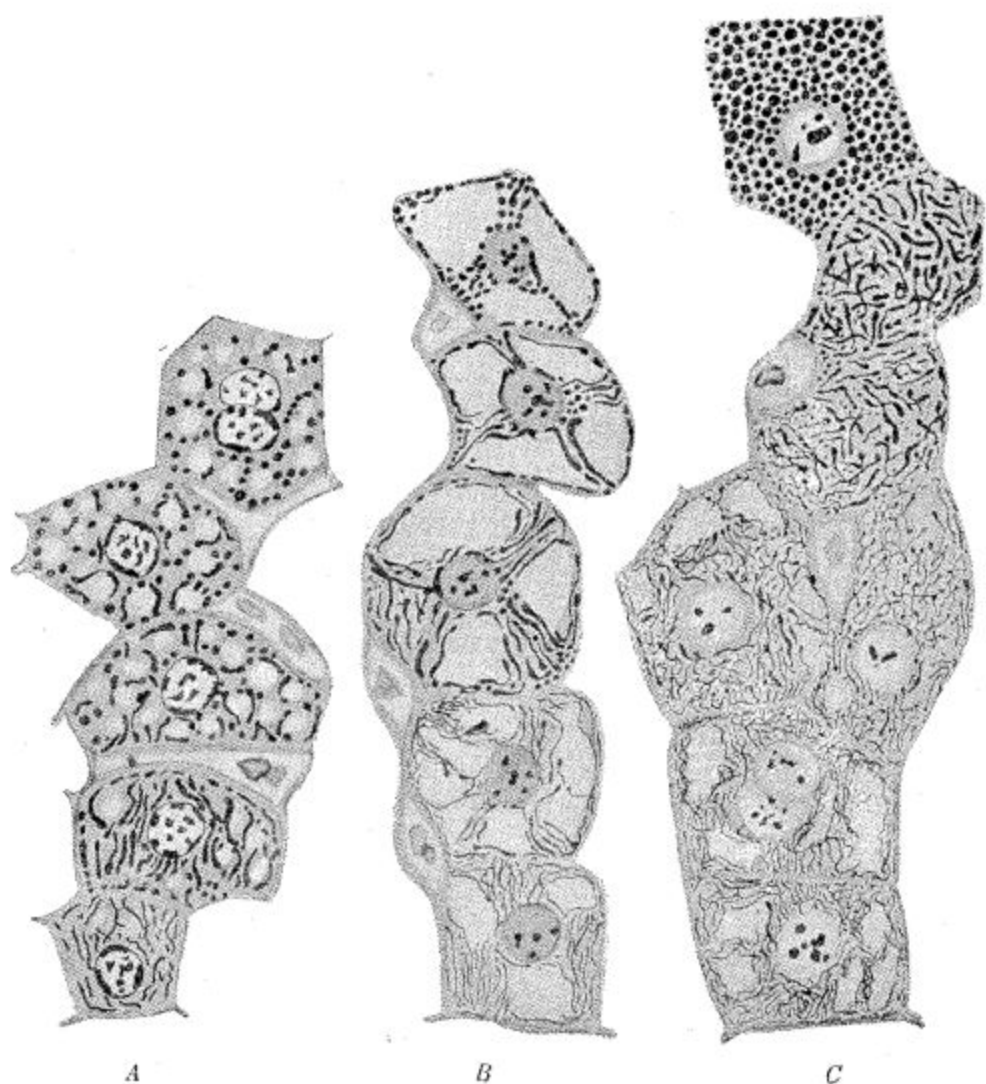


Formas semelhantes aos condriocentos obtidas por A. Giroud com lécitinas.

(Champy)



Células adiposas intersticiais da glandula mamária do camundongo. Volumosos mitocôndrios (plastosomas) na fase que precede ao aparecimento das esferulas graxas, prep. Bencît.
X1 .300 (P. Bouin)



Aspetto das células hepáticas de ratos brancos alimentados em A, gorduras em B, açúcar e em C, proteínas.

O aparelho mitocondrial está representado em preto.

(Tese de Noël, Universidade de Paris). (Cowdry).

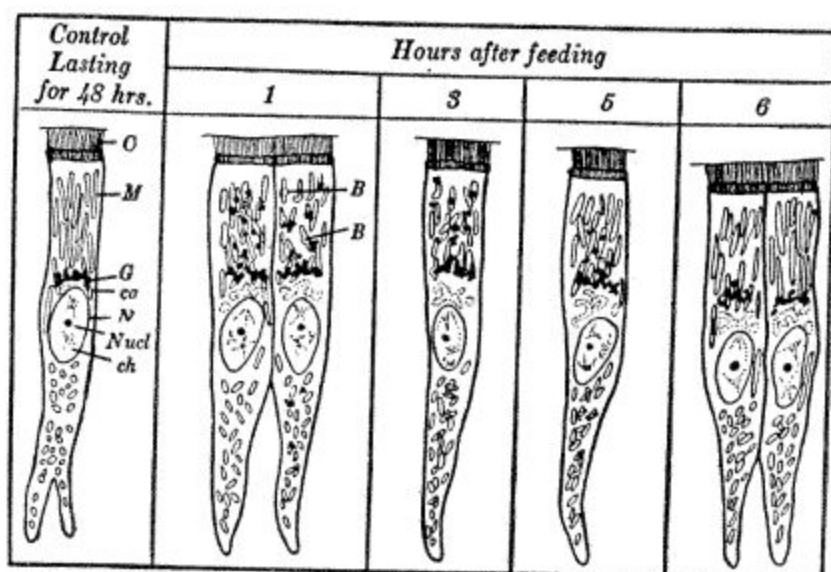


Diagrama das modificações apresentadas pelos aparelhos mitocondrial e de Golgi das células do epitélio intestinal durante a absorção.

M, ap. mitocondrial

G. ap. de Golgi

ch, cromatina nuclear

B, protuberância de um mitocôndrio

C, cutícula

ca, canaliculos

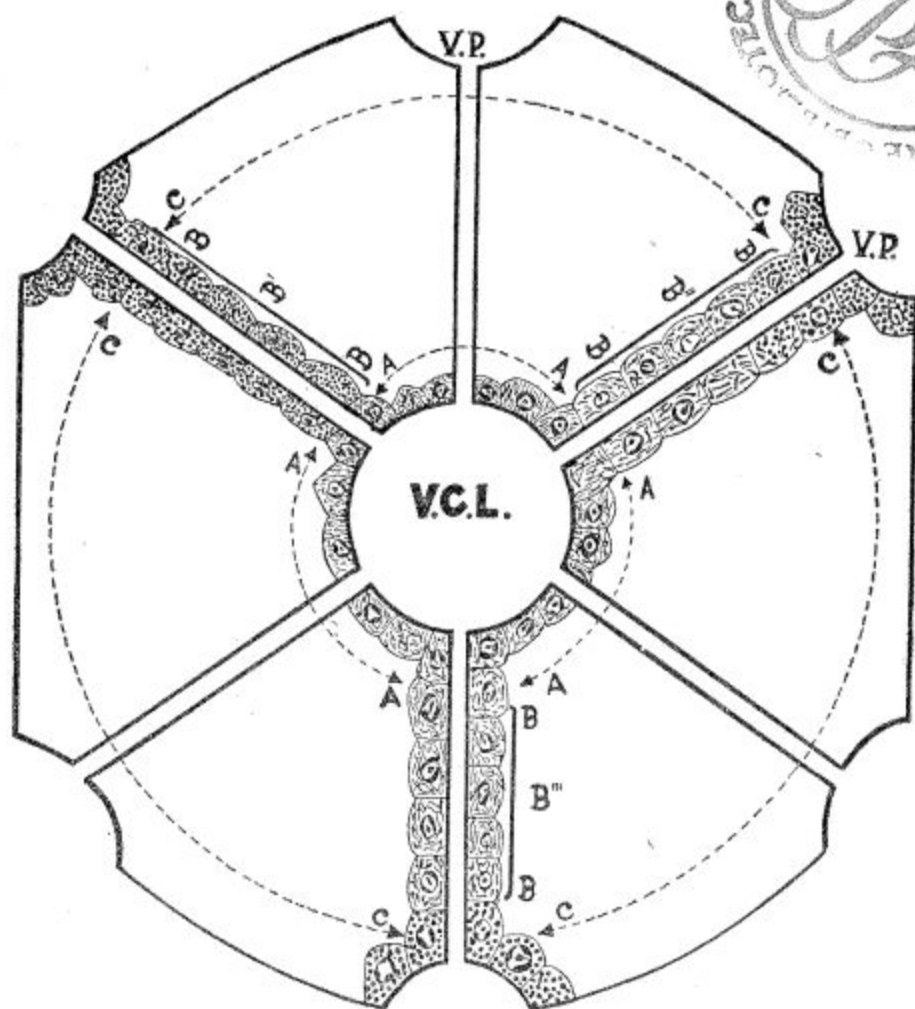
N, núcleo

Nucl, nucléolo

(Cowdry).



Célula de embrião de frango proveniente de cultura *in vitro* (fibroblasto?), com mitocôndrios e condriocentos muito visíveis pelas dimensões gigantes da célula (Preparação do Prof. Borrel) X 600 (P. Bouin).



Esquema sobre o funcionamento histofisiológico do lóbulo hepático. — (R. Noël).

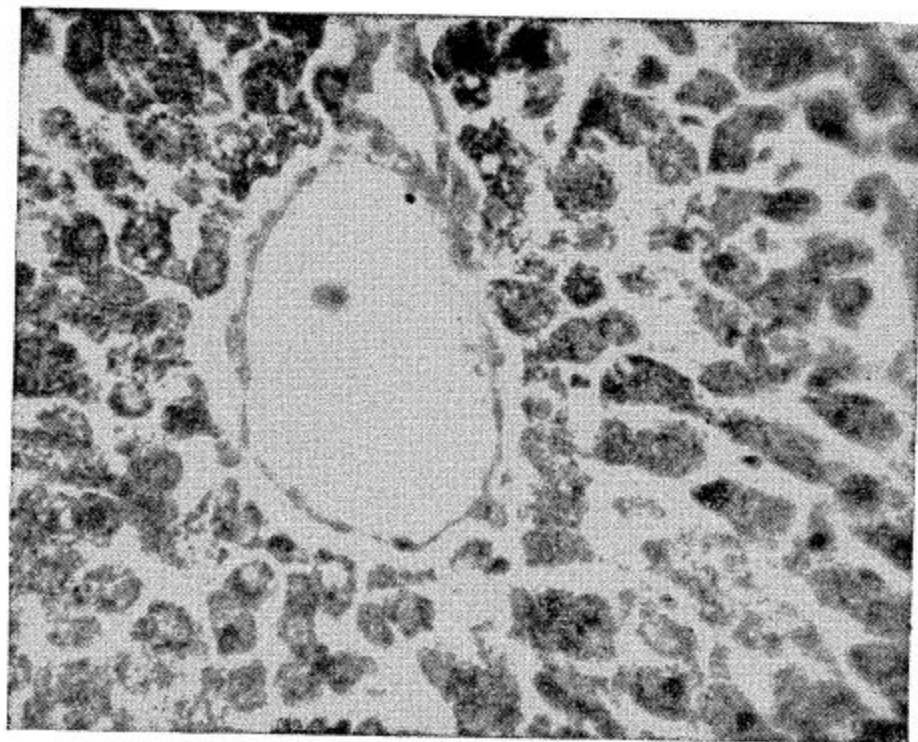
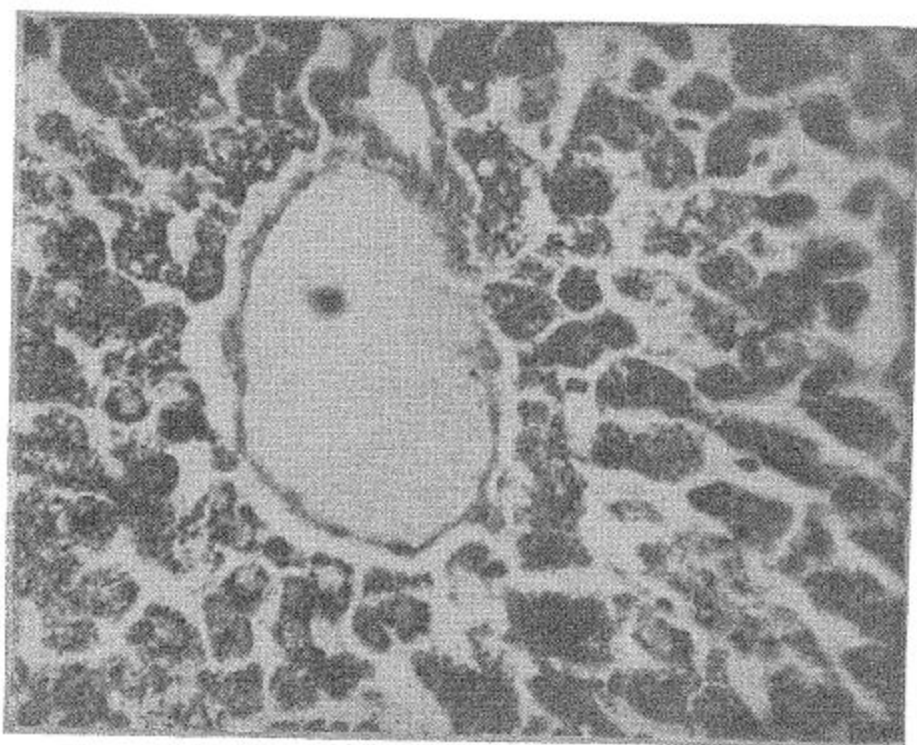
V. C. L. — Veia centrolobular V. P. — Veia porta

A.A. — Zona de repouso permanente (de suplência funcional)

B. B. — Zona intermediária de atividade variável:

B', em pleno funcionamento, quatro horas após a refeição; B'', zona de média atividade; B''', em repouso (vinte e quatro horas após a refeição).

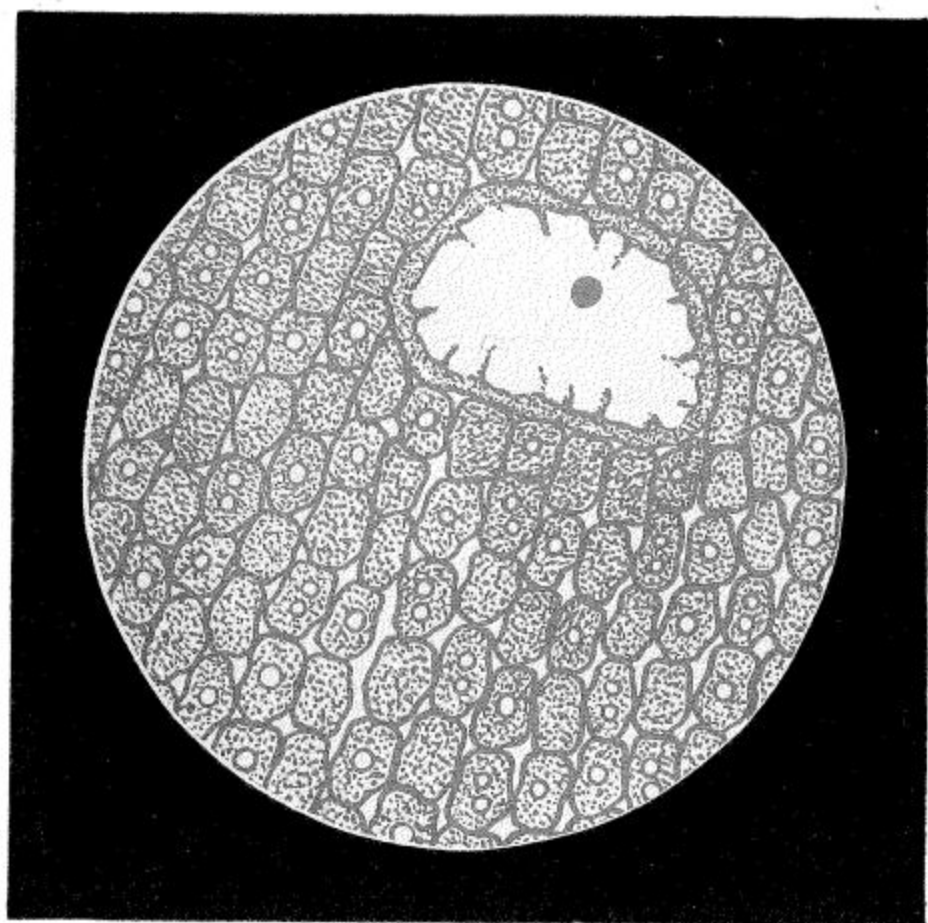
C.C. — Zona periportal, em atividade permanente.

A**B**

A — Microfotografia da zona centrolobular do figado de preparação original n.º 13 (condrioma h patico).

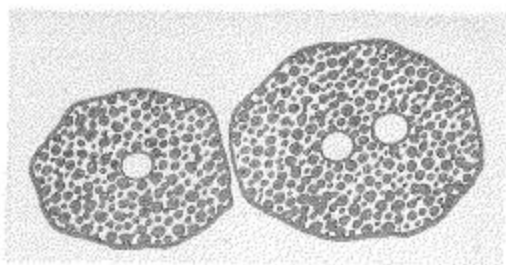
B — A mesma, corada para destacar o aparelho mitocondrial.
X 800

A



C.S.

B



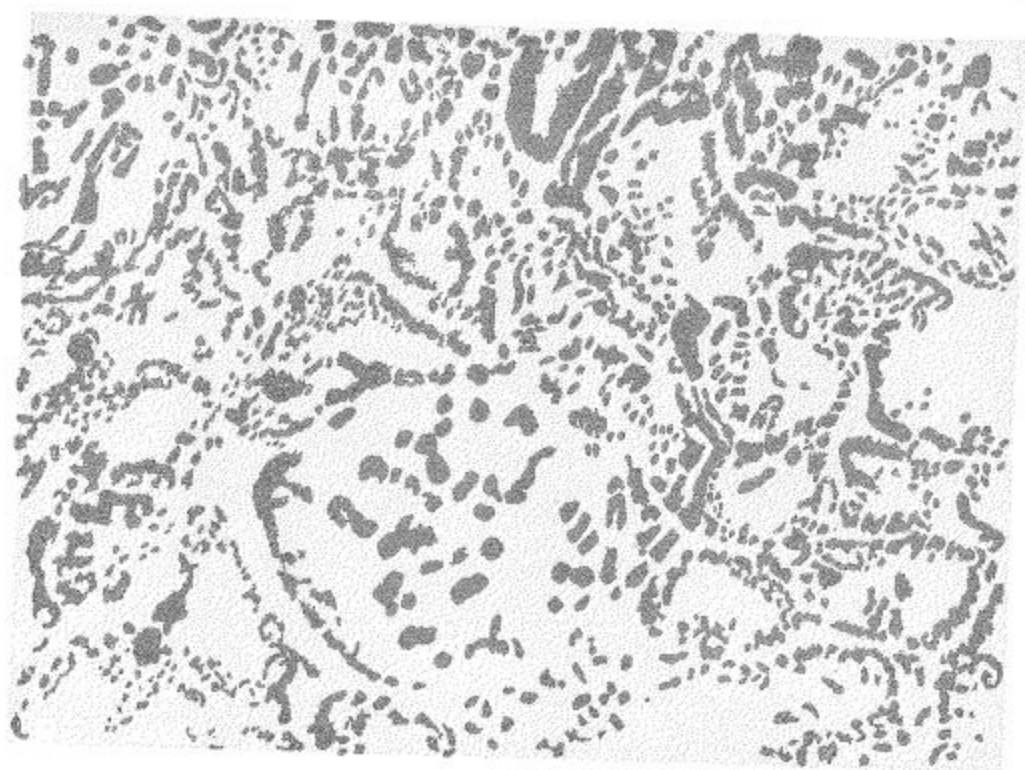
A — Desenho esquemático de corte de fígado.

Fixador: BENOÏT.

Coloração; Fucsina ácida anilinada de ATLMANN para o condrioma e verde de metila para o fundo.

Original lamina n.º 13 (Preparação própria).

B — Celulas isoladas e aumentadas do mesmo corte.



Microfotografia colorida da zona glomerular de rim de preparação original n.º 113 (condrioma renal). X 710

A



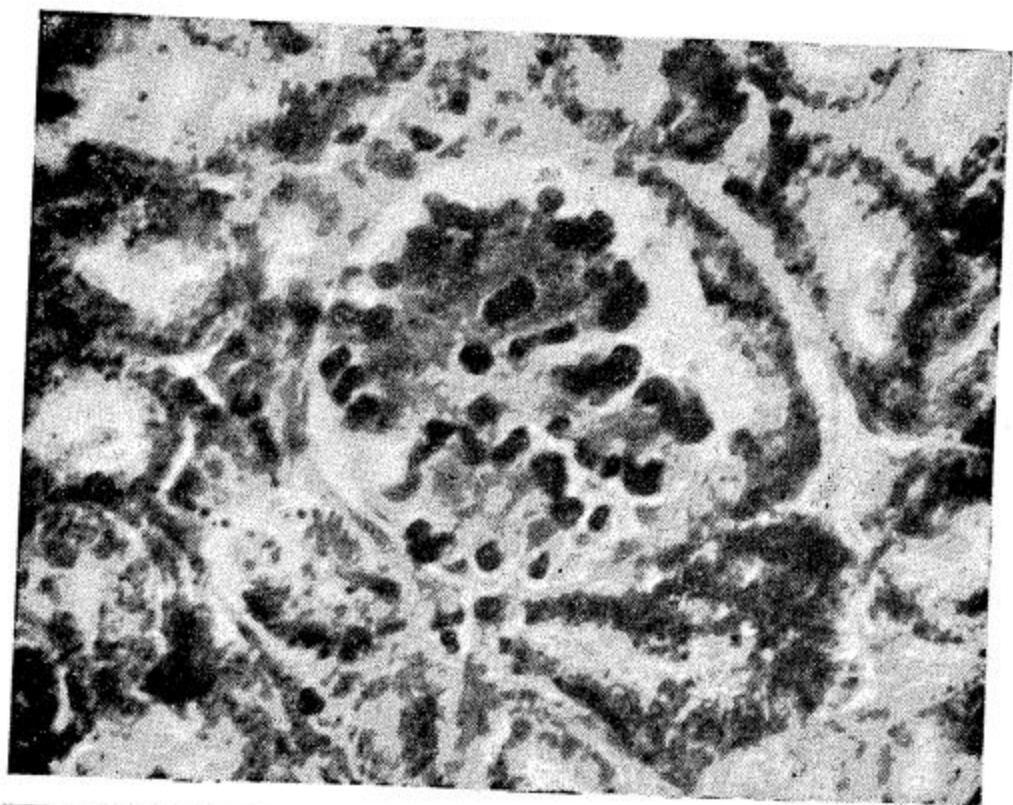
B



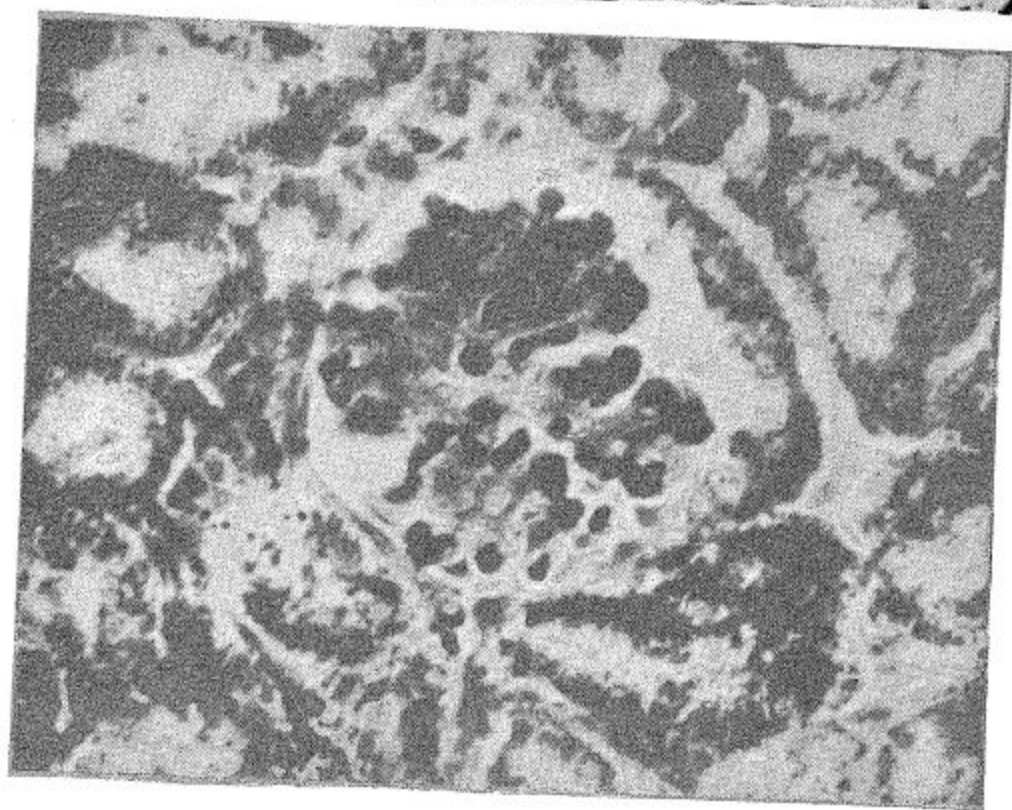
A — Microfotografia da zona glomerular de rim de preparação original n.º 93 (condrioma renal). X 710

B — A mesma corada para destacar o aparelho mitocondrial.

A



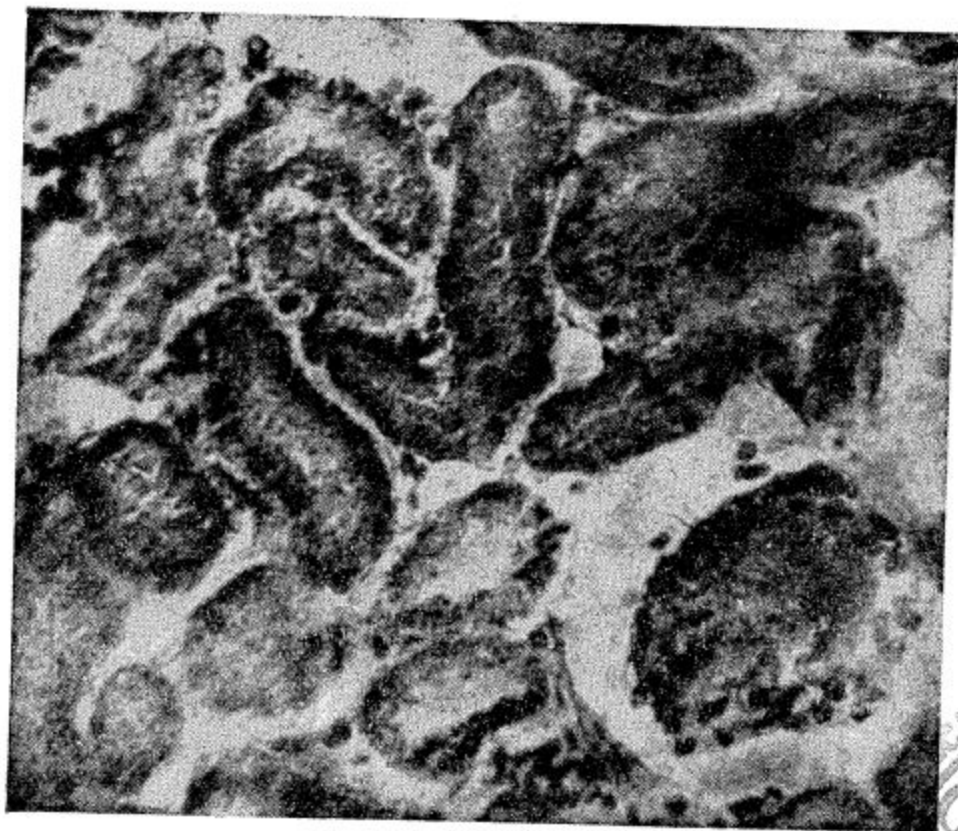
B



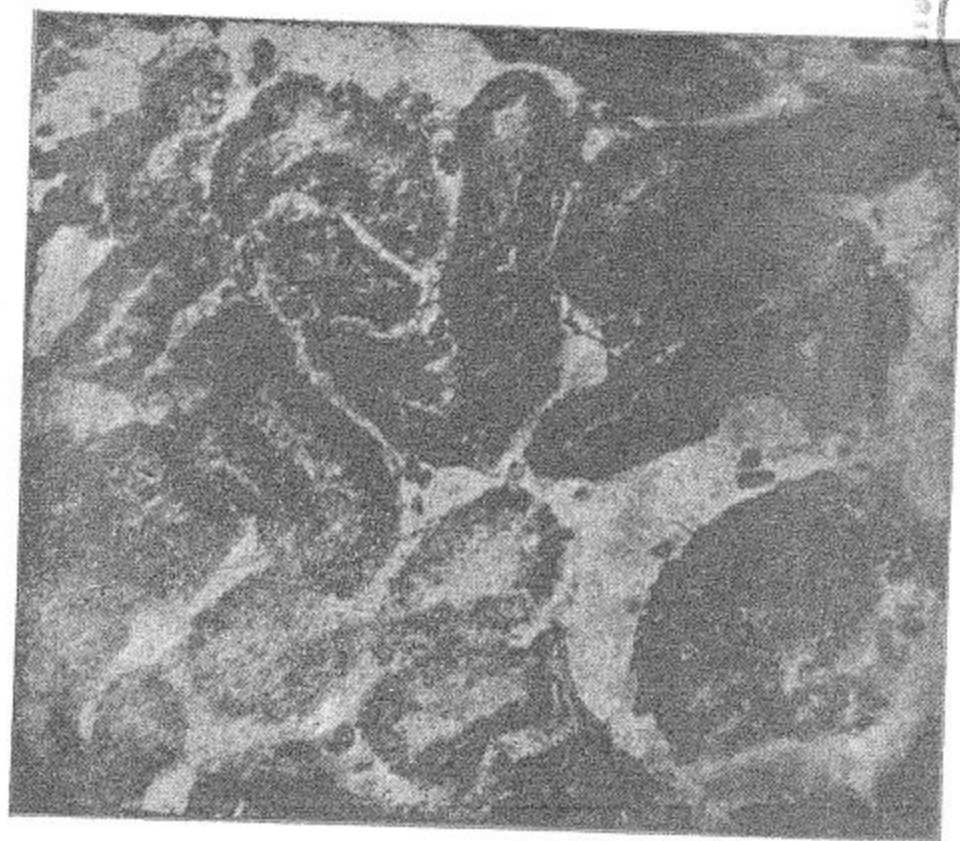
A — Microfotografia da zona glomerular de rim da preparação original n.º 113 (condrioma renal). X 1.000

B — A mesma corada para destacar o aparelho mitocondrial.

A



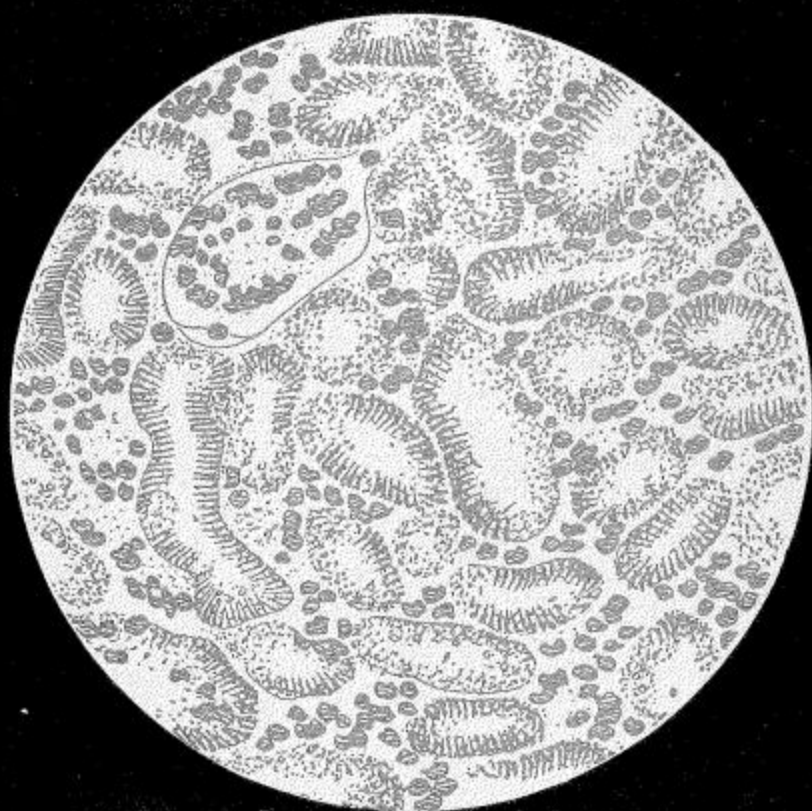
B



A — Microfotografia da zona glomerular de rim de preparação original n.º 93 (condrioma renal). X 1.000

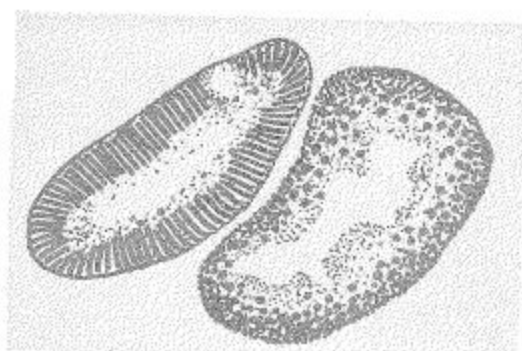
B — A mesma corada para destacar o aparelho mitocondrial.

A



C.S

B



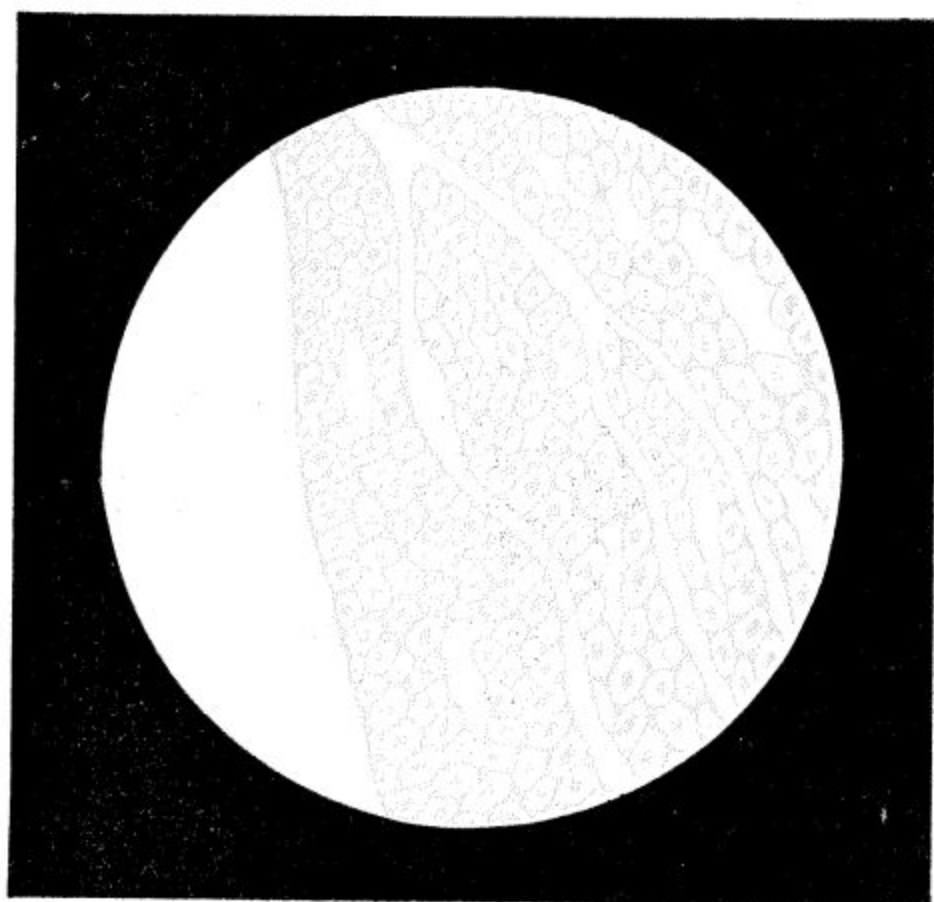
A — Desenho esquemático de corte de rim.

Fixador: BENOÏT

Coloração: Fucsina ácida anilina de ALTMANN para o condrioma e verde de metila para o fundo.

Original: lamina n.º 93 (Preparação própria).

B — Tubos isolados e aumentados do mesmo corte, mostrando nitidamente o condrioma.

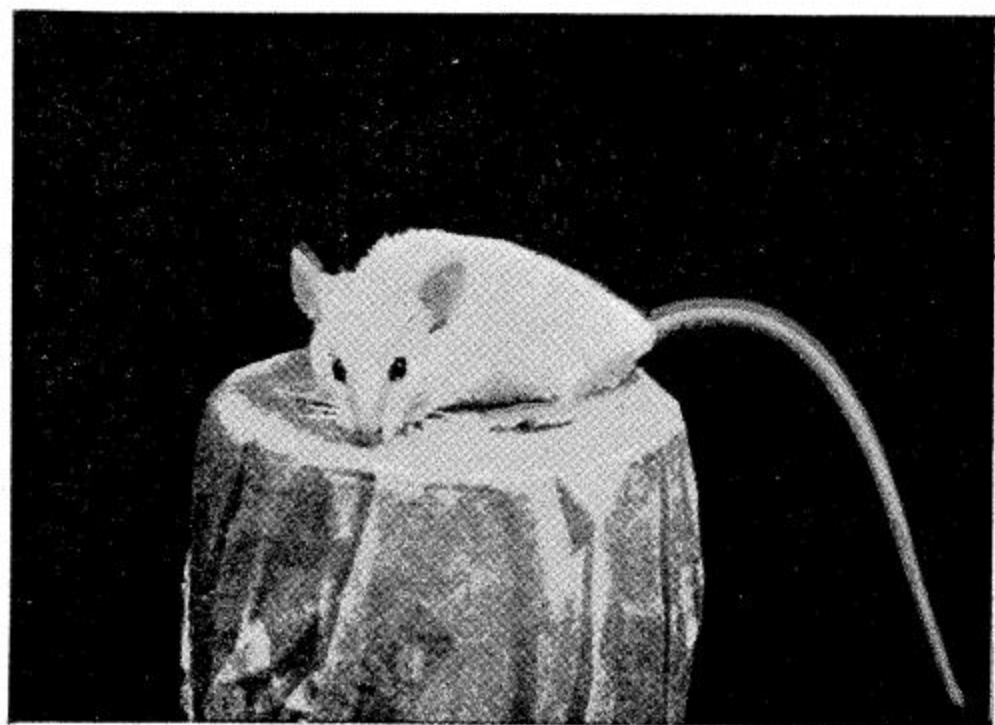


C.S.

Desenho esquemático da zona papilar de rim em cujas células não foi evidenciado o condrioma, Fixador: BENOÎT.

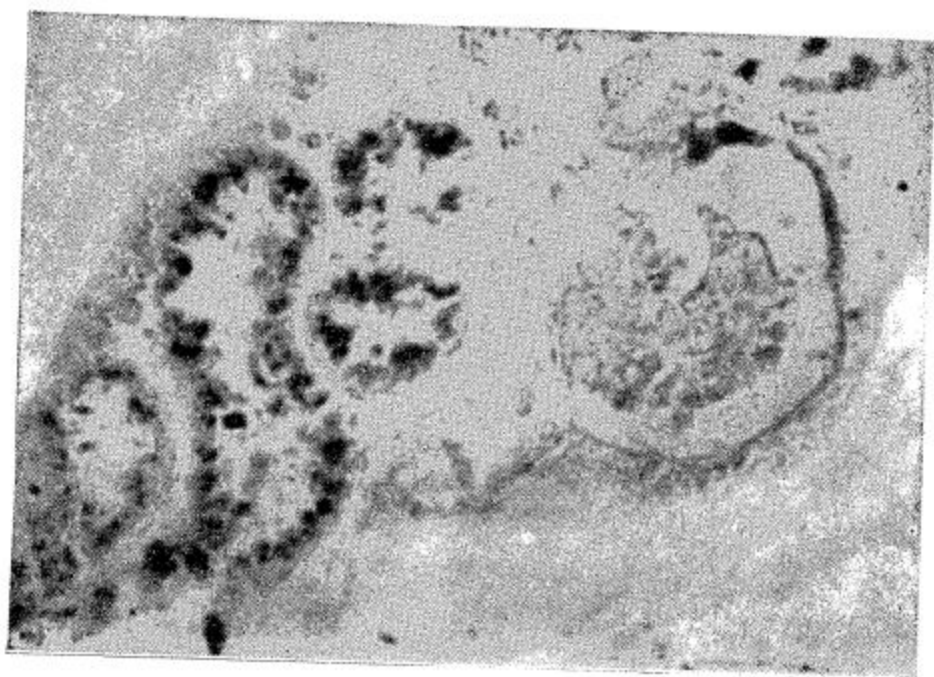
Coloração: Fucsina àcida anilizada de ALTMANN para o condrioma e verde de metila para o fundo.

Original: lamina n.º 93 (preparação própria).

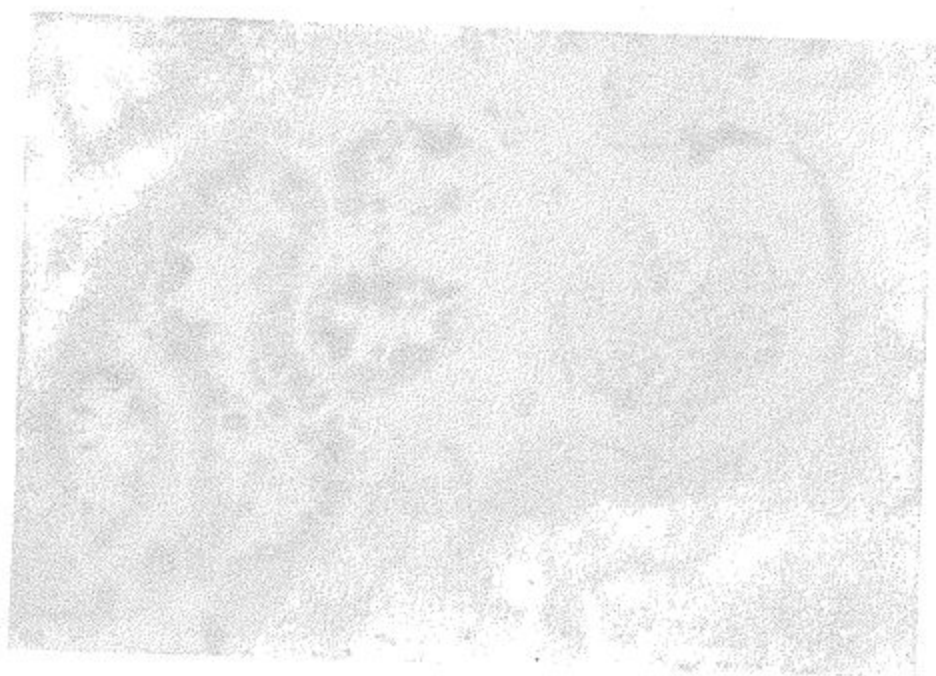


Camundongo branco injetado com azul tripan.
(Original)

A

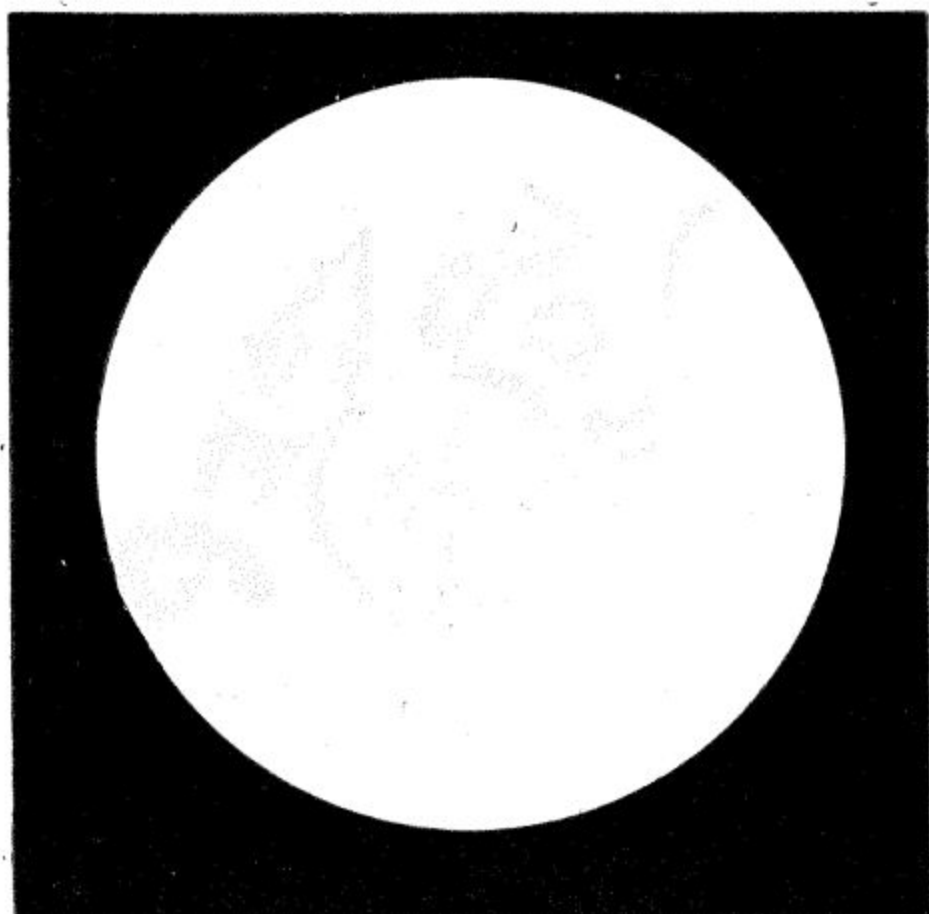


B



- A — Microfotografia da zona glomerular do rim de camomongo injetado com azul tripan, evidenciando nos pontos mais escuros o acumulo do corante.
- B — A mesma, corada em azul para destacar os pontos em que se acumulou o corante X 600

A



C.S.



B



A — Desenho esquemático da zona glomerular do rim de camundongo branco, injetado pelo azul tripan indicando os pontos corados em azul, os territórios em que se operou o acúmulo de corante.

Original: lamina n.º 72 (Preparação própria).

B — Tubos isolados e aumentados do mesmo corte.

INDICE

| | |
|--|------------|
| Prefácio | 1 |
| Introdução ao estudo do condrioma | 3 |
| Do condrioma em geral | 15 |
| — Histórico | 15 |
| — Definição, sinonimia, morfologia, distribuição, quantidade, evolução do condrioma..... | 21 |
| — Constituição química e caracteres físico-quí- micos do condrioma..... | 29 |
| — Função do condrioma | 28 |
| — Condrioma e protoplasma funcional, o con- drioma na cultura dos tecidos, condrioma e aparelho reticular de GOLGI | 52 |
| Do condrioma em particular | 59 |
| Estudo prático do condrioma | 83 |
| — Estudo do condrioma vivo | 85 |
| — Estudo do condrioma após o emprego dos corantes vitais | 86 |
| — Estudo do condrioma fixado e corado | 90 |
| — Estudo do condrioma pelas impregnações metálicas | 122 |
| — Causas de erro em técnica mitocondrial..... | 124 |
| Parte experimental | 125 |
| Conclusões | 143 |
| Bibliografia | 146 |

