

técnica das diatomáceas do sr. José da Silva e Castro, que actualmente anda trabalhando sobre as Surirelas e que em breve trará a público os resultados do seu estudo.

Sendo, pois, tão insignificante o que em Portugal existe escrito sobre estes organismos, resolvemo-nos a fazer a pequena publicação que segue. Apesar das lacunas que encerra, julgamos, todavia, que a primeira parte poderá prestar alguns serviços a quem dela se queira utilizar. Dar-nos-íamos por satisfeitos se isso conseguíssemos.

*

O plano deste trabalho é o seguinte:

Dividimo-lo em duas partes.

Na primeira, depois de umas breves referências à história das diatomáceas, sua estrutura, locomoção, etc. indicamos os processos seguidos para a sua colheita, as localidades onde se encontram, e as operações que se executam a fim de as preparar para o exame microscópico. Referimo-nos, finalmente, à sua classificação, indicando os instrumentos para isso necessários e a maneira de deles fazer uso.

É esta primeira parte uma compilação do que existe exposto nos numerosos tratados estrangeiros. O nosso esforço concentrou-se todo em extrair quanto pudéssemos e condensar na forma mais ligeira possível o que os diatomistas tem escrito sobre o assunto.

A segunda parte é o relatório do trabalho original que quâse se resume à lista das diatomáceas existentes na Guarda e suas circunvizinhanças.

PRIMEIRA PARTE

Diatomáceas ¹

As diatomáceas são algas unicelulares, pertencentes à divisão das *Zigoficias*, segundo a classificação do Dr. A. ENGLER, exposta na última edição do *Syllabus der Pflanzenfamilien*.

¹ Estes organismos são também designados por *Bacilariáceas*. Foi esta a primitiva designação, devida a *Nitzsch* (1817). O termo *Diatomácea* é posterior; resolvemos, porém, empregá-lo de preferência ao outro, por ser geralmente o adoptado na maioria das obras sobre estes vegetais.

Abundam por toda a parte, sôbre a terra húmida, sôbre o musgo das árvores e dos velhos muros, nos rios, ribeiros, lagos, no mar enfim, onde existe um número extremamente grande de formas raras e belas. Encontram-se até ao cume das altas montanhas e em todas as latitudes.

Organismos microscópicos de beleza rara, de formas variadas e de estrutura delicada e elegante, cedo começaram a prender a atenção de todos os micrógrafos.

ANTHONY VAN LEEUWENHOEK diz numa carta publicada em 1702 nas *Philosophical Transactions* que, tendo recolhido uma pequena quantidade de água num canal em Delft, observara partículas microscópicas regulares e transparentes, dispostas duma maneira análoga à dos ramos duma planta. Julgou serem essas partículas pequenos cristais e procurou reproduzi-las, deixando evaporar soluções fracas de um sal de prata.

Restos doutras cartas publicadas em 1703 e de autor desconhecido referem-se às mesmas partículas, considerando-as, porém, já como seres vegetais.

Pelos desenhos juntos a essas observações foi-se levado a concluir que se tratava da diatomácea hoje conhecida com o nome de *Tabellaria flocculosa*.

Mais tarde LOUIS JOBLOT descobriu uma espécie que designou por *Vibrio Bacillus* e que se julga ser a mesma *Tabellaria*. Depois WILLIAM ARDERON, FRÉDÉRIC MULLER e SCHRANK foram descrevendo outras por êles encontradas, entre as quais algumas *Fragilariaceae* e *Naviculaceae*.

O número de diatomáceas conhecidas até esta época (1797) era relativamente pequeno. Os naturalistas pretendiam já classificá-las; viam-se, porém, em grandes embaraços, o que levou uns a incluí-las no reino vegetal, outros no reino animal, chegando mesmo INGENHOUSZ a considerá-las como minerais, em virtude da sua carapaça siliciosa.

Pouco a pouco ia-se enriquecendo com novas espécies o pequeno número até então conhecido. Os diatomistas iam surgindo de toda a parte, publicando memórias sôbre as suas observações.

O estudo das diatomáceas foi-se especializando cada vez mais e tornou-se o apanágio de numerosos sábios que dele fizeram o objecto exclusivo das suas investigações; assim RALFS, SMITH, P. CLÉVE, VAN HEURCK, AD. SCHMIDT, OTTO MULLER e muitos outros criaram pelo estudo dêstes pequenos seres um ramo especial da botânica.

A filiação das diatomáceas entre os vegetais ou animais foi questão debatida durante muito tempo por vários naturalistas eminentes.

EHRENBERG foi um dos que as consideraram incluídas no reino animal e que com mais brilho defendeu a sua afirmação.

Todavia trabalhos ulteriores sôbre a observação minuciosa da estrutura e vida dêstes organismos, apresentados por diatomistas célebres, são unânimos em demonstrarem a natureza vegetal das diatomáceas.

Estrutura das diatomáceas

Cada indivíduo, designado pelo termo *frústula*, é constituído por uma célula membranosa, encerrando, além do suco celular, um núcleo envolvido por protoplasma, algumas gotas oleaginosas e uma matéria mais ou menos escura, denominada *endocroma*, composta essencialmente de *clorofila* e *ficoxantina*.

A célula existe encerrada numa carapaça formada em grande parte por sílica e que predomina a tal ponto de tornar essa película quebradiça, incombustível e inatacável pelos ácidos.

Um exame atento sob a objetiva de um microscópio de grande aumento mostra-nos que o invólucro silicioso consiste numa pequena caixa: as partes superior e inferior, isto é, a tampa e o fundo, designadas respectivamente *valva superior* e *valva inferior*, estão reünidas entre si por um anel ou fita chamado *zona conetiva* ou simplesmente *conetivo*. No estado de desenvolvimento completo duma diatomácea, o conetivo é ainda formado por duas membranas, cobrindo-se uma à outra, mas independentes entre si e não soldadas às *valvas*, aderindo apenas.

A carapaça é também envolvida por uma membrana externa.

Examinemos agora minuciosamente cada uma das partes a que nos referimos.

O *núcleo* (fig. 1) é análogo ao de todas as células vegetais e apresenta geralmente um *nucléolo* muito aparente. Nas diatomáceas

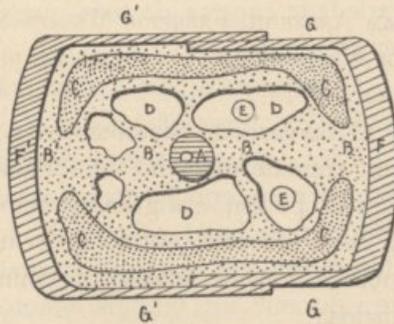


Fig. 1 — Corte esquemático duma *Navicula*.
A. Núcleo e nucléolo; BB protoplasma; B/B' membrana celular; CC endocroma; EE gotas oleaginosas; FF' valvas; GG. G'G' conectivos; DD cavidade central.

em que o núcleo é quasi invisível pode pôr-se em evidência por meio duma solução aquosa fraca de azul de metileno.

A *massa protoplásmica* é granulosa; rodeia o núcleo e liga-se ao protoplasma que reveste a parede celular por filamentos radiantes, anastomozados entre si e de diversos diâmetros.

O *suco celular* é água quase pura.

A *membrana celular* ou *célula primordial* aplica-se contra a superfície da carapaça. É mais ou menos espessa, apresentando geralmente um engrossamento considerável nos extremos das diatomáceas cujo eixo é alongado. É transparente e não adere intimamente às valvas, pois que o emprêgo dos mais fracos reagentes fazem-na contrair e arrastar o conteúdo para o centro da frústula.

O *endocroma* tem a côr amarelo-dourado ou acastanhado, raramente verde, como succede na *Navicula cuspidata*. Está espalhado em grânulos ou em lâminas — *cromatóforos* — cujo número e situação são constantes em cada espécie.

A matéria corante do endocroma é a *diatomina*, que se pôde desdobrar em *ficoxantina*, princípio corante amarelo, e em *clorofila*, princípio corante verde, ao que já nos referimos. A relação destas duas matérias corantes varia de umas espécies para outras e daí a variedade enorme de tons que os endocromas das diversas espécies apresentam.

Quanto maior for a proporção de clorofila, mais escura é a coloração dos cromatóforos.

Para separar os dois princípios que constituem a diatomina, P. PETIT fez macerar as diatomáceas em álcool a 90° e diluiu o produto obtido com igual volume de água destilada. Ajuntou em seguida clorofórmio em quantidade igual a $\frac{1}{3}$ do volume total, agitou a mistura durante um ou dois minutos e deixou repousar.

Passadas algumas horas a separação era completa: o clorofórmio apoderou-se da clorofila e desceu para o fundo do frasco, a ficoxantina¹ mais solúvel no álcool ficou na parte superior.

A matéria corante que constitue os cromatóforos actua sob a influência da luz, como a clorofila das plantas verdes: decompõe o ácido carbónico, assimilando carbono e expelindo oxigénio.

¹ Parece que a ficoxantina de PETIT se pode ainda decompôr em vários princípios corantes; o mesmo succede à clorofila.

Julgou-se durante muito tempo ser a membrana das diatomáceas formada por uma substância orgânica fina, coberta por uma camada siliciosa, produzida por excreção.

Esta idéa primitiva foi abandonada. WEISS foi o primeiro que deu indicações sôbre a sua estrutura: admitiu que a silica e a substância orgânica estavam intimamente combinadas. A natureza da membrana orgânica era porém desconhecida.

Foi o Prof. M. MANGIN quem últimamente se dedicou a êsse estudo, tomando para material das suas experiências diatomáceas planctónicas de fraca silicificação. Não nos podemos referir permenorisadamente ao trabalho de MANGIN, trabalho valioso e de grande utilidade, pois constitue a base dum novo processo de preparação das diatomáceas que vem facilitar bastante a sua classificação. Diremos apenas os resultados a que chegou e indicamos ao leitor que deseje estudar esse assunto o referido trabalho ¹.

«Em resumo, diz MANGIN, as valvas das diatomáceas são constituídas por uma substância orgânica idêntica aos compostos pécticos e combinada mais ou menos íntimamente à silica; o esqueleto silicioso assim formado está impregnado e revestido de uma membrana anista externa que encobre muitas vezes, pelo menos no plancton, os ornamentos característicos e que é rápidamente dissolvida pelos reagentes».

A constituição da membrana segundo MANGIN explica fácilmente a formação da geleia que geralmente envolve cada individuo. Com efeito, os compostos pécticos são caracterizados, como sabemos, pela facilidade com que se transformam em mucilagem; ora, visto as valvas serem revestidas duma membrana externa, a maior parte das vezes sem silica, não repugna admitir que a parte externa desta membrana seja susceptível de absorver água e dar lugar a uma geleia mais ou menos espessa.

As valvas das diatomáceas teem variadíssimas formas. Observadas com boas objectivas, suficientemente resolventes e em meios de índices elevados, todas, ou quasi todas, se mostram cobertas de desenhos ou estrias dirigidas em diversos sentidos. Com os numerosos recursos da óptica moderna reconheceu-se serem as estrias geralmente illusórias; são na realidade pérolas alojadas na espessura das valvas e dispostas de uma maneira regular, pérolas essas, a principio supostas granulos salientes e hoje consideradas alvéolos cavados no

¹ *Annales des Sciences Naturelles*, neuvième série — Botanique: Observations sur les diatomées, par M. L. MANGIN.

corpo do individuo, como, ha poucos anos ainda, ALBERT BRUN o confirmou por um processo engenhoso e simples de reproduzir ¹.

Num grande número de espécies, particularmente nas formas mais ou menos alongadas, as valvas são divididas, segundo o seu eixo maior, por uma linha bastante visível, em duas metades longitudinais, ordinariamente simétricas. Esta linha, denominada *rafe*, parece ser, pelo menos numa parte do seu comprimento, uma verdadeira fenda que põe em comunicação o conteúdo da frústula com os líquidos ambientes. Termina geralmente em cada extremidade por

um espessamento mais ou menos circular, chamado *nódulo*, e no centro é por vezes também interrompida por um espessamento igual (fig. 2).

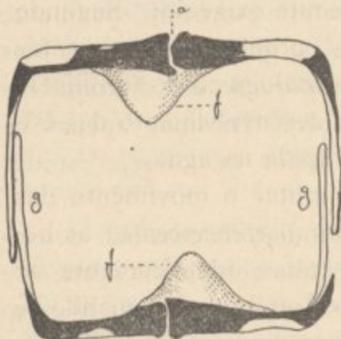


Fig. 2 — Secção duma *Navicula* segundo W. Prinz. a Rafe; f nodulos; g conectivos.

Locomoção das diatomáceas

Quando examinamos ao microscópio algumas diatomáceas colhidas pouco antes, vemo-las deslocarem-se lentamente com um movimento contínuo, ou por pequenos saltos. Chegadas ao limite da sua carreira, param e tomam em sentido inverso o caminho que precedentemente percorreram; muitas vezes seguem uma direcção oblíqua em relação à que possuíam ou dão varias voltas no mesmo ponto.

Com as objéctivas de maiores aumentos tem sido impossível até hoje notar nas diatomáceas o menor órgão de movimento. Passou-se então ao campo das hipóteses para explicar a causa dêsses deslocamentos, hipóteses perfeitamente gratuitas na sua maioria.

A que foi durante muito tempo aceite consistia em admitir um fenómeno de contratilidade geral, tão subtil, que escapasse à vista. Uma das últimas utilizava para a explicação a existência de cordões

¹ Quando se examina ao microscópio uma particula dum corpo transparente banhado num líquido e que, depois de bem focada, se eleva o tubo do microscópio, o objecto aparece com um centro brilhante, se o seu indice de refração é maior que o do líquido que o rodeia, e com um centro obscuro no caso contrário. Abaixando o tubo, o fenómeno dá-se em sentido reciproco.

Posto isto, observando uma espécie de *Coscinodiscus*, por exemplo, primeiro em água e depois em estoraque (*I. styrax*), reconhece-se ser o indice da pérola menor que o do esqueleto silicioso, no primeiro caso, e maior no segundo. Daqui resulta que a pérola toma o indice de refração do meio em que mergulha; se a pérola fôsse sólida, era impossivel dar-se o que acabamos de dizer.

mucosos e correntes líquidas que se manifestavam em volta da diatomácea, quando junto dela se lançava carmim pulverizado ou tinta da China: a alga deslizaria sobre os cordões e quebrá-los ia à medida da sua progressão.

M. JACKSON propôs, há pouco tempo ainda, uma hipótese bastante plausível. Notando que as diatomáceas só se deslocam quando estão iluminadas, supôs com lógica que existe entre a luz e o movimento uma relação de causa a efeito.

Ora a diatomina, como já dissemos, decompõe em presença da luz o ácido carbónico dissolvido na água e emite oxigénio. Segundo JACKSON, é esse gaz que, saindo da frústula, produz os movimentos de progressão por uma espécie de fenómeno análogo ao do torniquete hidráulico. Não é visível ao microscópio o desenvolvimento das bôlhas gazosas em virtude da sua dissolução rápida na água.

Afirma o autor desta hipótese ser fácil imitar o movimento das diatomáceas, lançando na água um *comprimido efervescente*; as bôlhas desenvolvidas fazem-no mover e dar voltas, idênticamente ao que sucede numa Bacilariácea. A imitação é ainda maior quando se lança em soda cáustica um fragmento de alumínio cortado em forma duma espécie do género *Navicula*. Sob a influência do hidrogénio que se produz a frústula em alumínio executa os mesmos exercícios corográficos que uma diatomácea viva.

As diatomáceas, cujas frústulas existem reunidas em grande número, são dotadas também de movimentos, alguns bastante extravagantes.

Assim a *Bacillaria paradoxa* composta de numerosas frústulas, dispostas paralelamente umas às outras, de maneira a formarem uma pastilha quadrangular, apresenta deslocamentos característicos. A primeira frústula desliza sobre a segunda, paralelamente à sua direcção, e pára quando apenas está ligada às outras por uma extremidade; a seguir a segunda frústula, imitando a primeira, vai juntar-se-lhe, deslizando sobre a terceira; depois esta, a quarta, etc. executam movimentos iguais. Dêste modo deslocou-se a *Bacillaria paradoxa* de uma extensão igual à sua largura. Agora a primeira frústula recomeça o movimento em sentido contrário e retoma a posição que ocupára então, segue-se-lhe a segunda, a terceira, etc. E o fenómeno reproduz-se assim indefinidamente.

Multiplicação e reprodução das diatomáceas

As diatomáceas multiplicam-se por divisão e reproduzem-se por conjugação.

MULTIPLICAÇÃO POR DIVISÃO. — Enquanto as duas valvas se afastam uma da outra, impelidas pela massa protoplásmica que aumenta no interior da frústula, o núcleo alonga-se e começa a dividir-se em dois, ficando cada uma das partes com um nucléolo proveniente da divisão simultânea do primitivo nucléolo. Ao mesmo tempo o protoplasma periférico, com o endocroma que limita, estrangula-se na zona média, sob os conetivos prolongados, e a célula começa totalmente a dividir-se em duas novas células (fig. 3).

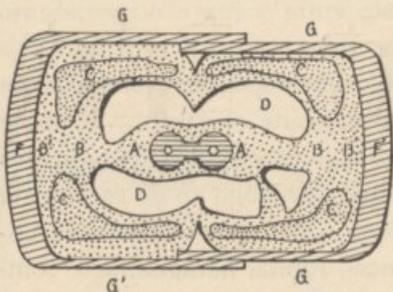


Fig. 3 — Seção duma diatomeia no começo da divisão. A Núcleo começando a dividir-se com nucléolos distintos; B protoplasma; B' membrana celular; C endocroma; D cavidades centrais; FF' valvas; GG' conetivos.

Esta divisão feita, sobre as duas superfícies em contato, formam-se duas valvas encostadas uma à outra, que em breve se silicificam (fig. 4); a parte dos conetivos que as excedem não tarda a ser resorvida, tornando-se então livres as duas frústulas assim formadas. Um pouco

mais tarde produz-se em cada nova diatomeia, ao longo do bordo da nova valva, um conetivo que encaixa no conetivo da valva antiga: a estrutura inicial fica deste modo restabelecida nos dois indivíduos.

Pelo que acabamos de dizer conclue-se a possibilidade de encontrar na mesma espécie duma Bacilariácea, segundo o seu estado de desenvolvimento, organismos possuindo:

1.º — Duas valvas, um conetivo e um núcleo. (Estado simples incompleto).

2.º — Duas valvas, dois conetivos sobrepostos e um núcleo. (Estado simples completo).

3.º — Duas valvas, dois conetivos e dois núcleos. (Começo da divisão).

4.º — Quatro valvas, dois conetivos e dois núcleos. (Continuação da divisão).

5.º — Quatro valvas, quatro conetivos e dois núcleos. (Fim da divisão).

Segundo o que atrás dissemos, toda a frústula simples e completa possui duas valvas de idade diferente, uma antiga e outra nova,

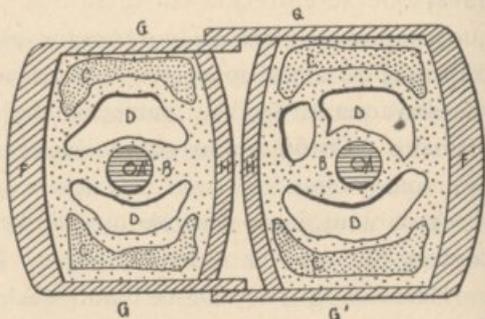


Fig. 4 — Seção duma diatomeia em via de divisão. AA Novos núcleos e nucléolos; BB protoplasma; CC endocroma dividido; DD cavidades centrais; F' valva mãe externa; F valva mãe interna; HH' novas valvas; GG' conetivos.

sendo esta sempre a mais pequena. Se o tamanho da diatomácea vai pois diminuindo pelas suas divisões sucessivas, como se depreende da série de fenómenos decorridos durante a divisão, persiste sempre um indivíduo que mantém a estatura primitiva: é aquele em que uma das valvas é a maior da diatomácea mãe (fig. 4).

O decrescimento pode, porém, deixar de fazer-se com a rapidez que a principio se é levado a supor.

Examinemos uma espécie filamentosa, em que as frústulas não se separem no fim de

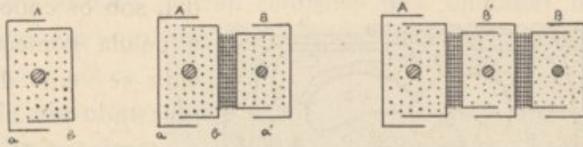


Fig. 5 — Esquemas de uma diatomácea filamentosa em varias divisões sucessivas.

cada divisão. Ficando coladas umas às outras é mais facil compará-las entre si. Num filamento de diatomáceas dessa natureza, as células não teem todas o mesmo valor biológico: algumas são destinadas a uma multiplicação mais ativa, podendo mesmo distinguirem-se, segundo M. O. MULLER, por certos caratères morfológicos, como, por exemplo, o espessamento do bôrdo das valvas. Um indivíduo *A* (fig. 5) produz por divisão uma célula *B*, cuja valva maior *a'* é igual à pequena *b* de *A*. Ficando estas duas diatomáceas reünidas, dá-se o comêço dum filamento composto pela célula mãe *A* e pela célula filha *B*. Se *A* sofre segunda divisão, produz uma nova célula *B'*, semelhante em estatura a *B*; esta é repelida pela nova, que se entrecala entre ela e *A* para formar o filamento 2, em que o tamanho permanece o mesmo que no filamento 1. A célula *A*, continuando a multiplicar-se, produz novas células *B''*, *B'''*, etc. que sucessivamente se vão entrecalando entre ela e a anteriormente formada. O filamento alonga-se dêste modo sem que a estatura diminua.

A diminuição aparece só quando uma das células *B*, *B'*, *B''*..., começa por sua vez a dividir-se.

REPRODUÇÃO POR CONJUGAÇÃO. — A diminuição de estatura não é indefinida: há para cada espécie um limite além do qual nunca passa o seu decrescimento. Intervêm então um fenómeno de natureza sexual, uma conjugação mais ou menos evidente, cujo resultado é a formação dum esporo, denominado por *E. Pflüzer auxósporo*, o qual origina uma frústula — a *frústula esporangial* — que por seu turno retoma a estatura máxima da espécie.

Examinemos os diversos modos de reprodução descritos pelos autores. São em número de quatro:

1.º — Passa-se numa só frústula. A diatomácea segrega matéria

gelatinosa em que se encerra, as valvas afastam-se, o conteúdo celular toma uma forma globular e condensa-se num *esporângio* que por si dá logar a um *auxósporo*.

Este de forma variável e encerrado num invólucro silicioso, pelo seu crescimento rasga o esporângio, tornando-se livre. Pouco depois aparecem no seu interior frústulas um pouco diferentes, pelo seu tamanho, das frústulas iniciais. Essas frústulas, denominadas *frústulas esporangiais*, reproduzem por sua vez a diatomácea primitiva.

Este modo de reprodução é contestado por alguns autores.

2.º — Duas frústulas diferentes aproximam-se e confundem o seu conteúdo celular; da mistura nasce um só esporângio que dá logar à produção duma frústula esporangial.

Tem sido observado êste modo de reprodução na *Surirella Splendida*. A união tem logar pela extremidade estreita das frústulas, o conteúdo celular mistura-se e em seguida forma-se o esporângio.

3.º — A conjugação de duas frústulas dá como resultado a produção de dois esporângios, de dois auxósporos e de duas frústulas esporangiais.

É êste o modo de reprodução mais frequente e o que melhor se conhece. Tem sido observado rigorosamente por numerosos diatomistas, como SMITH, PFITZER, VAN HEURCK, etc.

4.º — Uma só frústula dá logar a dois esporângios.

Este caso foi descrito por WILLIAM SMITH; julga-se porém, ter havido um êrro de observação, pois nunca mais foi observado.

*

Para terminar êste assunto diremos ainda que alguns diatomistas preveem a possibilidade dum modo de geração por germens, micro ou macrozoósporos, segundo diz M. J. DEBY. Para fundamento dessa ideia apresentam o facto do aparecimento súbito de espécies em lugares onde precedentemente não existiam; e, além disso, o aparecimento periódico cada ano, na mesma localidade, de certas diatomáceas sem que se possam encontrar no tempo decorrido entre dois aparecimentos consecutivos.

Onde e como se encontram as Diatomáceas?

Existem em toda a parte onde haja água, a não ser que esta seja pútrida. Nem charco deixado pelas chuvas, nem fosso úmido, nem canal de irrigação, nem fonte, tanque ou qualquer reservatório de

água, deve ser esquecido. O mar, rios, ribeiros, lagos, lagoas, são outras tantas minas inexgotáveis para o diatomista.

Não é a água em si que deve ser examinada, para se reconhecer a presença de diatomáceas, mas a superfície dos corpos imersos ou em contacto com ela, como as algas, todas as plantas aquáticas, as pedras, as rodas dos moinhos. Apenas as diatomáceas pelágicas se encontram em suspensão na água; delas nos ocuparemos também. Se a água é pouca e o fundo cheio de lodo ou areia está a descoberto, examina-se igualmente.

As Bacilariáceas manifestam-se pela sua côr, pelo tacto e até algumas vezes pelo cheiro. Muitas formam à superfície dos corpos que revestem uma camada mais ou menos mucilagínosa ao tocar-se-lhe e de uma côr variando do amarelo-alaranjado ao castanho escuro, segundo a espécie e a espessura da camada; em certos casos, sobretudo nas espécies marinhas, a côr é de um verde azeitona. Quanto ao cheiro, é por vezes característico em certas espécies, como na *Navicula scopulorum*.

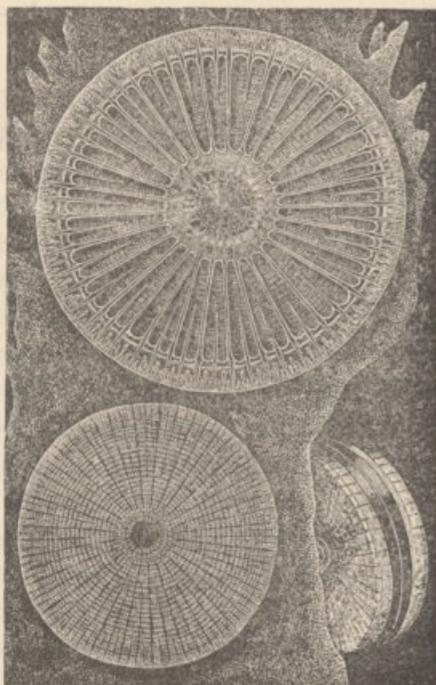


Fig. 6 — *Arachnoidiscus Ehrenbergii*. Diatomácea vista em diferentes posições, vegetando sobre uma alga.

DIATOMÁCEAS TERRESTRES. — São assim designadas as diatomáceas que habitualmente estão fixas a algas ou quaisquer outros objectos.

Quando o naturalista as deseja procurar, é preciso ir munido de instrumentos necessários para as colher e de vasos apropriados para as transportar. Um saco de couro guarnecido por uma correia, contendo vários compartimentos para receber alguns frascos de boca larga e de capacidade de 50^{cm} aproximadamente, um pincel de pêlo fino para evitar transporte de muito material, pedaços de tela impermeável para embrulhar as algas ou outras plantas contendo diatomáceas, uma colher de cobre ou de qualquer metal para raspar as superfícies de objectos imersos, uma bengala e uma navalha são os utensílios necessários para se fazer uma excursão.

É muitas vezes ainda conveniente ir-se munido de uma lente para

a observação imediata do material no lugar onde foi colhido ¹; evita-se assim regressar-se carregado com algas ou outros quaisquer objectos desprovidos totalmente de espécies.

As excursões podem fazer-se durante qualquer epoca do ano; todavia a primavera e o outono são as duas estações mais favoráveis, a primavera sobretudo. Ao acabar o inverno há um pouco de água por toda a parte e as diatomáceas nela existentes, com o auxilio do calor, multiplicam-se muito rapidamente, cobrindo os corpos à superficie dos quais vegetam.

Para efectuar uma excursão, diz a êste respeito o Sr. P.^o ZIMMERMANN, num interessante artigo, publicado na serie de vulgarização científica da «Brotéria», o seguinte que guiará ótamente o leitor:

«Em toda a parte, por assim dizer, e muito fácilmente se encontram as diatomáceas, como o leitor verá. Se não, venha comigo e vamos ambos a um passeio. Cheios de entusiasmo e esperança sigamos a estrada que nos leva para fora do povoado. Ainda não há muito que choveu; por isso logo a poucos passos nas valas ao longo da estrada se vê água empoçada, que já se cobriu de algas, côr de tijolo amarelado. Será aqui que faremos a nossa primeira descoberta? Quem sabe?

«Recolhemos boa porção destas algas e metemo-las num frasco em cujo rótulo escrevemos o lugar e a data do achado.

«Vamos adiante. Mais além está um lago que alimenta com suas águas a azenha próxima. Dentro de alguns minutos lá estamos. Que alegria a nossa ao vê-lo todo coberto de umas lâminas verdes de algas filamentosas que evidentemente se desprenderam do fundo, e ainda à nossa vista veem subindo de quando em quando até à superficie.

«Apanhamos com a mão ou com a bengala uma boa porção destas algas flutuantes. Deixamos escorrer a água ou exprememo-la levemente, e metemos as algas num outro frasco ou em papel impermeável com o rótulo da data e da localidade.

«Mais ao largo emergem umas plantas aquaticas, onde a custo conseguimos chegar. Arrancamo-las e logo o tacto mucilaginoso dos caules nos revela a presença de colónias diatomíferas. Passando estas plantas pela mão apertada, desapegamos fácilmente a massa

¹ Há um pequeno aparelho destinado a isto, chamado pelos franceses «chercheur d'algues», muito cómodo e de fácil transporte, pois pode levar-se num bolso do colete.

É um pequeno microscópio com uma disposição especial para colocar o material que se quer analisar.

mucilaginoso e recolhemo-la num dos frascos. Vamos logo direitos à azenha vizinha que felizmente está parada. Com uma colher raspamos das palhetas das suas rodas hidráulicas parte da crusta gelatinosa que nelas se formou, onde haverá milhares de diatomáceas, e fazemos outro tanto às paredes da azenha constantemente molhadas.

«Mais. No rêgo por onde corre a agua para a azenha, ha musgos banhados de continuo pela água. Ali se abrigam de preferênciamuitas espécies de diatomáceas. Recolhemos uma boa porção e depois de deixar escorrer a água metemo-los numa bolsa impermeável.

«Mas na água há ainda pedras completamente submergidas que também merecem a nossa atenção. Se ao tomá-las se sente uma camada de matéria mucilaginoso, recolhe-se um pouco dessa crosta com a mão ou com a colher e mete-se no mesmo frasco das diatomáceas recolhidas sôbre a roda.

«A poucos passos desta azenha está uma quinta dum nosso amigo. Vamos também lá e fazemos abundante colheita nas algas que flutuam nas presas, nas que aderem às velhas paredes dos tanques e das calhas de madeira e alvenaria por onde corre a água. Nas paredes duma gruta sombria, por onde resumbra constantemente a água, a côr escura olivácea logo nos dá a conhecer a existência dessa camada mucilaginoso onde não faltam as diatomáceas.

«E por hoje basta. Carregados com êste espólio voltamos contentes a casa depois de um passeio ao mesmo tempo científico e saudável. Amanhã prepararemos as diatomáceas.

«Antes porêem duas palavras sôbre o modo de colher as diatomáceas marítimas.

«Na maré baixa há nas praias umas algas avermelhadas, filamentosas e ramificadas, pertencentes a um grupo que chamam *Florídeas*.

«É nelas que se abrigam sobretudo as diatomáceas, ao passo que nas algas verdes poucas se encontram. Que essas algas estejam já secas ou ainda molhadas pela água, não importa para o caso.

«Recolhemos as florídeas presas aos rochedos, pedras, paredões, postes de madeira, boias, quilhas de embarcações, raspando ao mesmo tempo qualquer superficie de tacto mucilaginoso».

DIATOMÁCEAS PELÁGICAS. — Dá-se êste nome às diatomáceas que fazem parte do plancton, isto é, do conjunto dos organismos vegetais e animais que flutuam passivamente no seio das águas.

Para as colher utiliza-se uma rêde de seda de malhas muito finas, em forma de tronco de cone, tendo a parte mais larga ligada a um anel de ferro galvanizado ou arame de latão e a parte estreita terminando por um recipiente metálico munido de uma pequena abertura, susceptível de se fechar herméticamente quando se deseje.

Quatro fios resistentes partem do anel e reúnem-se num mesmo ponto, ao qual se liga uma corda que serve para transportar a rêde.

Para se efectuarem as pescas, lança-se a rêde cautelosamente à água e reboca-se durante algum tempo; mas de maneira que a velocidade da embarcação em que se vai não exceda 200 metros por minuto. As diatomáceas muitas vezes misturadas a outros organismos do reino animal e vegetal, reúnem-se no fundo da rêde com o aspecto de uma massa gelatinosa, mais ou menos corada.

Quando a quantidade da colheita fôr suficiente, puxa-se a rede e mergulha-se em álcool a 95°. É êste liquido, segundo TEMPÉRE, o melhor fixador para as diatomáceas, porque consolida as porções fracamente siliciosas, obstando à sua desagregação ulterior. É ainda empregado com grandes resultados para fixador o sublimado corrosivo em solução concentrada.

Um trabalho recente sobre o Plancton da costa portuguesa, que o SR. DR. WITTNICH CARRISSO anda publicando, dará ao leitor a quem interessarem estes estudos largos conhecimentos sôbre as pescas e técnica dos organismos planctónicos, entre os quais estão incluídos, como dissemos, as diatomáceas pelágicas.

DIATOMÁCEAS FÓSSEIS. — Durante certas épocas pre-históricas a flora diatomífera devia ter sido de uma riqueza incomparável, tanto debaixo do ponto de vista da abundância, como da variedade e beleza das suas formas. É sobretudo o período terciário o mais rico. Certas camadas são conhecidas desde muito tempo; algumas teem uma extensão considerável, formam o sub-solo de grandes regiões e attingem uma espessura variando entre 5 e 20 metros. Encontram-se na Hungria, Russia, Japão, Alemanha, Espanha e outros países ainda. Berlim, por exemplo, assenta sôbre uma *turfeira argilosa* de 7 a 20 metros de altura, composta principalmente de restos de diatomáceas.

O diatomista fará, pois, bem em examinar com cuidado todos os materiais conhecidos com os nomes de *argila*, *farinha fóssil*, *caolim*, *trípoli*, etc. O aspecto e consistência destas diversas substâncias varia, segundo as camadas em que se encontram, passando do pó impalpável, branco como a neve, ao mais duro cimento de côr escura.

É vasto o campo no que respeita a diatomáceas fósseis. A abertura de túneis ou de poços e as excursões geológicas oferecem aos interessados numerosas ocasiões de procurarem material, por vezes interessante e nôvo. É bom recolher amostras em diferentes pontos da espessura das camadas, tendo o cuidado de tomar nota na sua posição aproximada.

Mencionaremos finalmente os *guanos*, enormes monturos de de-

jeçõis de aves marinhas e de peixes que se encontram em certas ilhas e datando de muitos milhares de anos. Contem grande número de diatomáceas que cobriam a superfície das algas com que aqueles animais se alimentavam.

Cultura das diatomáceas

Muitos diatomistas, para manterem em vida as espécies colhidas nas suas excursõis, tem experimentado a preparação de meios próprios para a sua cultura.

M. MIQUEL distingue as *culturas ordinárias*, nas quais se cultivam várias espécies reunidas com o fim de se terem à disposição para quaisquer observaçõis e as *culturas puras*, que encerram uma só espécie a fim de se poderem seguir todas as modificaçõis que espontaneamente soffra ou as que lhe sejam provocadas artificialmente.

Para as diatomáceas de água doce pode utilizar-se o seguinte meio, contendo alimentos salinos e orgânicos.

Os primeiros são preparados em 2 soluções, A e B:

SOLUÇÃO A

| | |
|------------------------------|---------|
| Sulfato de magnésio | 10 gr. |
| Cloreto de sódio..... | 10 gr. |
| Sulfato de sódio | 5 gr. |
| Azotato de amónio..... | 1 gr. |
| Azotato de potássio | 2 gr. |
| Azotato de sódio..... | 2 gr. |
| Brometo de potássio..... | 0,2 gr. |
| Iodeto de potássio | 0,1 gr. |
| Água..... | 100 gr. |

SOLUÇÃO B¹

| | |
|---|----------|
| Fosfato de sódio..... | 4 gr. |
| Cloreto de cálcio..... | 4 gr. |
| Ácido clorídrico puro a 22°..... | 2 c. c. |
| Per-cloreto de ferro líquido a 45°..... | 2 c. c. |
| Água..... | 80 c. c. |

¹ A solução B deve ser preparada do seguinte modo :

Ao fosfato de sódio, dissolvido em 40 c. c. de água, ajuntam-se primeiro os 2 c. c. de ácido clorídrico, depois os 2 c. c. de percloroeto de ferro e finalmente as 4 gr. de cloreto de cálcio dissolvidas em 40 c. c. de água. Forma-se geralmente um ligeiro precipitado que se deve separar do líquido das culturas.

Estas soluções são conservadas isoladamente. No momento do seu emprego, a um litro de água ordinária, ajuntam-se 40 gotas de *A* e 20 de *B*; deitam-se no mesmo litro de água 5 centigramas de palha de trigo e a mesma quantidade de musgos, préviamente lavados em água fervente.

É conveniente aquecer o líquido, antes de se utilizar, a uma temperatura de 70° c. aproximadamente e durante um quarto de hora, a fim de destruir esporos, fragmentos de algas ou diatomáceas estranhas que os líquidos possam conter.

Lançadas no líquido assim preparado um certo número de frústulas, é conveniente manter a cultura a uma temperatura entre 10 e 30 graus centígrados. Todos os 10 ou 15 dias restabelece-se o nível do líquido, que diminuiu devido à evaporação, com água esterilizada.

Para as diatomáceas marinhas, as culturas fazem-se com bons resultados na própria água do mar. Na falta desta, emprega-se a água artificial que se obtém dissolvendo:

| | |
|--------------------------|---------|
| Sal marinho..... | 250 gr. |
| Sulfato de magnésio..... | 20 gr. |
| Cloreto de magnésio..... | 40 gr. |

numa quantidade de água tal que o conjunto dê um litro. A solução assim obtida adiciona-se-lhe no momento em que se utiliza 9 litros de água.

A água do mar natural ou artificial ajuntam-se-lhe as soluções *A* e *B* nas mesmas proporções atrás indicadas, tendo o cuidado também de aquecer a mistura final a 70° centígrados. Como elemento orgânico lança-se no líquido uma pequena fita de *zoostera*.

As *culturas puras* de diatomáceas são muito trabalhosas.

Consistem em isolar uma espécie, o que se faz geralmente fracionando o meio em que existe, semelhantemente ao processo seguido pelos bacteriologistas. Mistura-se uma gota do líquido diatomífero com 100 c. c. de líquido nutritivo e dilue-se um centímetro cúbico do líquido actual em 99 centímetros cúbicos de novo líquido. Este líquido é agora dividido em dez partes que se submetem à cultura. Examinam-se estas depois. Se junto com a espécie que se pretende isolar existem outras ainda, será necessário fazer passar o líquido que a contenha por uma terceira ou quarta diluição. Por este processo chegam a obter-se culturas com uma só forma.

Técnica das diatomáceas terrestres

§ 1.º

Limpeza das diatomáceas

Feita a colheita das diatomáceas, é necessario separá-las dos detritos orgânicos que as acompanham e privá-las do seu endocroma.

Vários processos são empregados.

PROCESSO PELO ÁCIDO SULFÚRICO E CLORATO DE POTÁSSIO. — É êste o que habitualmente se aplica. Consiste no seguinte :

Toma-se uma boa porção do material colhido e lança-se numa cápsula de porcelana. Ajunta-se-lhe ácido azótico ou clorídrico, sendo preferido o primeiro por ser mais enérgica a sua ação. A mistura é aquecida sôbre uma rêde metálica ou em banho de areia e deixa-se ferver até acabar de se desprenderem vapores rutilantes, que começam geralmente apenas se principia o aquecimento.

O efeito dêstes ácidos é dissolver os sais calcáreos que porventura contenha a água onde foi feita a colheita e ir queimando e destruindo parte das substâncias orgânicas que acompanham as diatomáceas.

Dada a fervura por terminada, deixa-se arrefecer a mistura e passa-se depois para uma proveta bastante alta que se acaba de encher com água destilada. Agita-se com fôrça o conteúdo e abandona-se ao repouso. Decorridos 10 ou 20 minutos aparece no fundo da proveta um depósito, geralmente escuro, e à superficie restos de matérias vegetais. Decanta-se tudo até à massa sólida depositada, enche-se de novo com água, agita-se e deixa-se novamente em repouso. Esta operação é repetida o número suficiente de vezes para desaparecer totalmente qualquer vestígio de ácido.

O depósito que resta da última decantação é lançado numa cápsula de porcelana; aí deixa-se repousar alguns minutos e por meio de uma pipeta extrai-se-lhe a água que ainda exista sôbre êle. Feito isto, adiciona-se-lhe uma porção do ácido sulfúrico igual a 2 ou 3 volumes da massa sólida depositada e ferve-se.

Pouco a pouco a massa começa a enegrecer. Quando estiver completamente negra, o que sucede decorridos uns 10 ou 15 minutos, juntam-se-lhe alguns cristais de clorato de potássio de pequenas dimensões. Devem ser deitados um a um, com pequenos intervalos, de maneira que cada cristal seja lançado só depois de terminada a efervescência produzida pelo anterior.

Logo que pela ação do sal de potássio o liquido se torne totalmente branco, retira-se a lampada e abandona-se a mistura até resfriar. A massa depositada é decantada e introduzida numa proveta ou balão com água destilada. Por repousos e decantações sucessivas, eliminam-se, como anteriormente, os vestígios de ácido.

Realizadas estas operações, leva-se ao microscópio uma pequena porção do material assim preparado e examina-se se as diatomáceas estão completamente limpas de toda a matéria orgânica. Geralmente assim sucede; no caso contrário é repetido o tratamento pelo ácido sulfúrico e clorato de potássio o número de vezes necessário para a limpeza perfeita.

É costume ainda, por fim, ajuntar-se-lhe 30 ou 40 gotas de amoníaco e passadas algumas horas água destilada, agitando então fortemente. As diatomáceas veem ao fundo; a água ordinariamente muito turva é decantada e o depósito lavado até se eliminar qualquer traço de amoníaco.

O tratamento pelos ácidos deve ser efectuado num nicho de laboratório, ou, na falta dêste, ao ar livre, porque os vapores desenvolvidos são deletéreos.

PROCESSO PELO PERMANGANATO DE POTÁSSIO E ÁCIDO CLORÍDRICO. — Numa cápsula com capacidade de 100 gramas lança-se uma porção da colheita e uma solução concentrada de permanganato de potássio, contendo mesmo alguns cristais em excesso, de maneira que cubra o material destinado à operação.

Deixa-se actuar durante 12 horas aproximadamente, sendo conveniente colocar a mistura ao sol ou em lugar um pouco quente e tendo o cuidado de agitar de vez em quando.

Enche-se depois a cápsula até ao meio e adiciona-se-lhe uma pouca de magnésia calcinada (50 centigramas pouco mais ou menos). Agita-se repetidas vezes durante 2 ou 3 horas e, decorrido êsse tempo, lançam-se-lhe pequenas doses de ácido clorídrico puro, de 10 em 10 minutos.

Quando o conteúdo da cápsula estiver descorado, dá-se a operação por terminada.

Algumas vezes, para facilitar a reação, é costume executar-se êste tratamento a quente.

Finalmente, procede-se às lavagens com água destilada e decantações, como no processo anterior.

Nesta serie de operações há primeiro a oxidação enérgica do endocroma pelo permanganato e magnésia; depois com o ácido produz-se desenvolvimento de oxigénio que actua como comburente e de cloro que serve de descorante.

PROCESSO DO PROF. MANGIN. — É fundado na constituição das valvas das diatomáceas.

Como dissemos, são constituídas por uma substância orgânica idêntica aos compostos pécticos, combinada com a sílica mais ou menos intimamente. Ora os corpos de natureza péctica teem um grande poder de fixação para os corantes básicos em meio neutro, como o vermelho de ruténio e a hematoxilina aluminosa velha; é sobre êsse facto que assenta êste processo.

O depósito de diatomáceas que se quer preparar é primeiro submetido ao acido clorídrico fumante, diluído com um terço do seu volume de agua e adicionado de cristais de clorato de potássio.

Passadas vinte e quatro horas é lavado o depósito por centrifugação¹, primeiro em agua, depois em alcool; deixa-se então macerar, durante vinte e quatro horas, numa solução alcoolica de potassa pelo alcool, lava-se depois em alcool, em seguida em agua e, finalmente, numa solução de acido bórico a três por cento, para fazer desaparecer os últimos traços de alcali.

O depósito branco assim obtido é corado pela hematoxilina aluminosa velha ou pelo vermelho de ruténio. Neste último caso, ajunta-se-lhe uma solução aquosa de vermelho de ruténio e agita-se de tempo a tempo para obter uma coloração uniforme de toda a massa; ao fim de duas ou três horas o depósito é lavado em água e alcool.

*

Os três processos que acabamos de expor são empregados para as diatomáceas terrestres. As diatomáceas pelágicas e fósseis teem outros tratamentos de que adeante nos ocuparemos.

Para evitar uma grande demora nas operações descritas, é conveniente separar as Bacilariaceas das substâncias orgânicas a que estão presas. Para isso deita-se numa proveta uma parte de acido clorídrico e oito de agua pura. Lança-se nesta solução o material colhido e agita-se fortemente durante algum tempo. Antes que repouse decanta-se o líquido para outro recipiente, evitando que os restos orgânicos que contem o sigam. Pode evitar-se pegando na proveta com a mão direita e fazendo passar o líquido por entre os dedos da mão esquerda que se conservam um pouco cerrados. Esta operação depende, é claro, da habilidade do operador.

O depósito obtido, depois de eliminado todo o ácido, é sujeito então a qualquer dos tratamentos atrás indicados.

¹ Na falta de centrifugador segue-se o processo das decantações sucessivas.

§ 2.º

Extracção das areias

As colheitas diatomíferas, tratadas por qualquer dos processos que exposémos, não devem conter senão diatomáceas, areias, espículas siliciosas, radiolários, mica e pedra pomes.

A matéria extranha às diatomáceas que geralmente encontramos é a areia; extraí-la completamente é uma operação difícil de executar.

Indicaremos dois processos relativamente fáceis e que, apesar de imperfeitos, dão resultados bastante satisfatórios.

Um dêles consiste em lançar o depósito diatomífero, obtido pelos tratamentos indicados, numa cápsula de porcelana juntamente com um pouco de água. Depois de nela bem dessiminado por meio de uma varêta de vidro, segura-se a cápsula pelos bórdos com a mão e imprime-se-lhe um movimento de rotação durante alguns minutos. Grande parte das areias aglomerar-se hã assim no fundo da cápsula.

Decanta-se imediatamente o liquido que sobrenada para uma segunda cápsula; com esta repete-se a mesma operação, lançando o liquido outra vez na primeira, préviamente lavada, e assim se continua até que não se deposite mais areia.

O outro processo é, pode dizer-se, a continuação do primeiro.

Lança-se numa cápsula ou em qualquer copo o residuo diatomífero com alguma água, agita-se e decanta-se em seguida: ficam dêste modo separadas as areias mais volumosas que existiam no referido depósito. Em seguida tomam-se duas lâminas de vidro *A* e *B*. Sôbre *A* coloca-se uma gôta de água destilada e sôbre *B* uma pequena quantidade do liquido decantado. Imprime-se a *B* um pequeno movimento rotatório horizontal, o que faz acumular a areia no centro do liquido, e inclina-se a lâmina para um dos seus ângulos; as diatomáceas escorrem para o lado da inclinação, e são recolhidas na água destilada da lâmina *A*.

É êste processo, como vêmos, um processo de decantações, como o anterior, mas em que se opéra sôbre pequenas quantidades, aproveitando ao mesmo tempo a aderência à lâmina de vidro das partículas mais pesadas.

Teem sido ainda utilizadas as chamadas rede de sêda; o seu emprêgo principal é, porém, para a separação das diatomáceas de uma mesma colheita, segundo a sua estatura. Consiste essa operação em fazer atravessar o liquido que contem as bacilareáceas por duas ou três redes de sêda, cujo número de malhas por centimetro quadrado esteja compreêndido entre 200 e 3:000 aproximadamente.

O líquido, passando pela primeira rede, deixa aí retidas as diatomáceas maiores, passando depois pela segunda deixa retidas espécies de tamanho mais pequeno que o daquelas e assim sucessivamente.

Pode-se efectuar esta mesma separação obtida pelas redes, utilizando ainda o processo das decantações. O líquido, encerrando diatomáceas, depois de bem agitado, deixa-se repousar durante dois a cinco minutos. Separa-se o depósito, formado durante êste tempo, do líquido que sobrenada, e lança-se êste numa outra provêta, onde, por seu turno, se deixa repousar durante alguns minutos (8 a 10). O depósito formado é novamente separado e assim sucessivamente.

Dêste modo os depósitos sucessivos contêm diatomáceas pela ordem decrescente dos seus pêsos e portanto dos seus tamanhos.

Tudo a que acabamos de nos referir é bastante imperfeito. Existem processos e mesmo instrumentos que permitem escolher peça por peça num grupo de diatomáceas os especímenes que queremos aproveitar. Veremos mais adiante por meio de que artificios se chega a manejar por assim dizer cada uma das formas que se encontram em cada colheita.

*

Preparadas as diatomáceas e separadas da areia que geralmente as acompanha, podemos conservá-las indefinidamente em tubos de vidro.

Decanta-se toda a água e junta-se-lhes um pouco de álcool ou água fénicada com o intuito de impedir a formação de colónias de bactérias que fácilmente contaminariam o depósito diatomífero.

§ 3.º

Montagem das diatomáceas

PREPARAÇÕES MISTAS. — São assim chamadas porque compreendem todas as diatomáceas de uma colheita, misturadas entre si, sem ordem determinada, podendo encerrar mais de cem espécies diferentes. Por meio de uma ou duas preparações desta natureza podemos ter com a sua inspecção uma ideia geral da flóra diatomológica de uma dada região; tem porém um inconveniente: ser mais difícil encontrar uma determinada espécie.

Vamos descrever os processos seguidos para se obterem.

Montagem a séco. — Esta montagem não é muito usada; exige numerosos cuidados e grande atenção nas operações a executar.

a) *Confecção da célula.* A primeira operação a fazer é construir uma célula num porta objeto.

É fácil prepará-la por meio do torniquê, aparelho empregado em todos os laboratórios para lutar preparaçõis. Colocada uma lâmina de vidro neste instrumento, comunica-se-lhe um movimento de rotação com a mão esquerda, e com a mão direita segura-se um pincel fino embebido em betume de Judeia e aplica-se ligeiramente sôbre ela. Fica assim traçado um anel circular em relêvo que constitue as paredes laterais da célula.

Visto o torniquê, fácilmente se percebe o modo de operar.

O anel deve ter exactamente o mesmo diâmetro exterior das lamelas empregadas e a sua espessura deve estar compreendida entre um oitavo e um décimo de milímetro, espessura que se obtêm praticamente, applicando uma unica camada de betume. Deve preparar-se bastante tempo antes, afim de estar completamente sêco e duro no momento do seu emprego.

b) *Maneira de estender uniformemente as diatomáceas sôbre as lamelas.* Escolhem-se lamelas redondas de 15 a 16 milímetros de diâmetro e de vidro muito delgado. Limpam-se bem. Para isso, se não forem novas, colocam-se primeiro numa solução de carbonato de sodio a dez por cento e agitam-se durante alguns instantes de maneira a pôr toda a superficie em contacto com o líquido. Decanta-se êste e substitue-se por água destilada, decanta-se novamente e lança-se em seu logar água acidulada pelo ácido sulfúrico.

Lavam-se em seguida em água destilada e deixam-se secar espontaneamente ao abrigo das poeiras.

No momento do seu emprego passam-se por um pano de linho.

Limpas as lamelas, colocam-se umas após outras numa superficie perfeitamente plana.

Toma-se então um dos tubos onde foram conservadas as diatomáceas de uma colheita, decanta-se o líquido preservador e substitue-se por água. Repete-se esta lavagem algumas vezes, agita-se depois bem o tubo e deita-se uma pequena porção do líquido num recipiente bem limpo, contendo água destilada. Toda a dificuldade está em calcular bem a quantidade de diatomáceas que deve contar êste recipiente para que não fiquem amontoadas depois sôbre a lamela. Em geral pode dizer-se que a água encerrando as espécies em suspensão nunca deve ter uma aparência leitosa, mas só ligeiramente opalina. Uma curta experiência indicará o justo termo.

Com uma pipêta retira-se uma porção do líquido, depois de bem agitado, e deixa-se cair immediatamente sôbre as lamelas. O líquido espalhar-se há uniformemente em toda a superficie, se estiverem bem

limpas; deve, contudo, atender-se a que a porção do liquido que se deita não seja tanta que passe para fora da lamela, nem tão pouca que não chegue a cobri-la.

Feito isto deixa-se evaporar a água num lugar abrigado da poeira. Não é conveniente provocar uma evaporação rápida pelo aquecimento, porque o emprêgo do calôr produz correntes, cujo efeito é fazer amontoar as frústulas em linhas irregulares que dão um péssimo aspecto às preparaçõis, e tornam impossível a observação de grande número de espécies.

c) *Operação final.* A lâmina que contém a célula é aquecida ligeiramente à chama de álcool, afim de desaparecer qualquer traço de humidade que contenha. Com uma pinça toma-se a lamela com a camada de diatomáceas voltada para cima e aquece-se também ligeiramente, para o mesmo efeito. Coloca-se em seguida sôbre a célula, tendo o cuidado que a tenuíssima camada de bacilariáceas fique na parte interna.

Passa-se depois por uma chama uma lâmina de vidro, applica-se totalmente sôbre a preparação e carrega-se muito ao de leve com auxilio da parte superior da pinça. Sob a influência do calor, a célula, amolecendo, adere à lamela e fixa-a de um modo absoluto.

Para completar luta-se finalmente a preparação.

Em virtude da grande diferença entre os índices de refração do ar e da sílica que compõe as frústulas, os detalhes das diatomáceas assim montadas são mais fáceis de observar; todavia essas vantagens são prejudicadas pela grande perda de luz que se dá por reflexão na superficie interna da célula.

Montagem nos meios resinosos. — É o processo mais usado e o que permite uma conservação mais duradoira das preparaçõis. Além disso todos os detalhes delicados se distinguem nitidamente, sobretudo se o meio resinoso possui um alto índice de refração.

Vários meios são empregados: entre outros, o *bálsamo de Canadá*¹, o *Stirax*² e o *bálsamo de Tolú*³. Todos se encontram à venda em qualquer casa de objectos microscópicos, já convenientemente limpos e prontos a serem utilizados.

A maneira de operar é a seguinte⁴:

¹ Resina que se obtêm do *Abies canadensis*.

² Bálsamo de composição bastante complexa, extraído do *Styrax orientalis*.

³ Bálsamo do *Toluiфера balsamun*.

⁴ Na montagem das diatomáceas tratadas pelo processo de MANGIN tem de proceder-se de maneira um pouco diferente e é necessário tomarem-se certas pre-

Depois de estender as diatomáceas sobre as lamelas e ter aquecido estas para fazer desaparecer qualquer traço de humidade, do modo explicado na montagem a sêco, toma-se uma lâmina, limpa-se bem e aquece-se levemente para ficar bem sêca. Depositam-se em seguida uma ou duas gôtas do *meio* que queremos empregar exactamente no centro. Com uma pinça toma-se a lamela, inverte-se e assenta-se lentamente sobre o Stirax, bálsamo de Canadá, ou o que empregámos. A seguir aquece-se a lâmina um pouco. Formam-se então no interior do *meio* numerosas bôlhas que, partindo de vários pontos se afastam para a periferia da lamela, onde se desfazem. As bôlhas vão-se tornando cada vez mais volumosas e o *meio* acaba por emitir um leve fumo. Nessa altura dá-se por terminado o aquecimento, retira-se a lâmina da chama, coloca-se sobre uma superfície plana e com uma varêta aperta-se suavemente a lamela contra o porta-objecto.

Deixa-se a preparação a secar durante um ou mais dias. Depois de sêca, por meio dum pano embebido em benzina, tira-se o bálsamo que saiu para fora da lamela. Luta-se finalmente a preparação.

*

PREPARAÇÕES ARTÍSTICAS. — Além das preparações chamadas *mistas*, hã tambem outras nas quais se dispõem as diatomáceas uma a uma, numa determinada ordem.

As mais célebres dessas preparações são os notáveis *Typenplatte* de *J. Möller*, que teem reunidas de uma maneira maravilhosa 20.400 e mesmo 1:000 espécies. É de admirar a perfeição e a regularidade dos desenhos executados com as diatomáceas umas após outras; ou formam circunferências, elipses ou quaisquer figuras geométricas, ou estão dispostas em curvas caprichosas, assemelhando rendados, tão regulares e tão belos que chega a parecer impossivel realizarem-se com sêres tão pequenos trabalhos daquela natureza.

Para produzir essas preparações, *Möller* empregava um microscópio disposto de maneira especial e processos particulares cujo segredo confiou apenas a três ou quatro amigos. Outros preparadores e mesmo amadores zelosos estudaram a questão e se os resultados que obtiveram não foram tão perfeitos como os de *Möller*, aproximaram-se todavia extraordinariamente da perfeição.

Ao lado dos *Typenplatte* costumam colocar-se as preparações

cauçõis. Vêr adiante quando nos referimos ao tratamento das diatomáceas pelágicas pelo processo do Prof. MANGIN.

contendo uma ou mais diatomáceas escolhidas e isoladas umas das outras. É muitas vezes util prepará-las. Os processos não são de uma grande dificuldade.

Para efectuar a escolha em boas condições e sem risco de confundir as espécies, é necessario empregar uma combinação ótica dando um aumento de 80 a 100 diâmetros e tendo uma distância focal suficientemente grande que permita ao operador a livre manipulação do instrumento que lhe serve para agarrar e transportar as diatomáceas. Para êstes trabalhos há ainda uma dificuldade a vencer: é a da imagem invertida dos objetos vistos ao microscópio; o emprêgo duma ocular que transforme a imagem invertida em imagem direita tira muita luz e nitidez, sem contar que cança extraordinariamente a vista; é pois bom empregarem-se as oculares vulgares e ir-se conseguindo pouco a pouco a familiarização com êsse efeito óptico. Passado algum tempo de prática, nem já se dá pela dificuldade que nos primeiros trabalhos se encontra.

O instrumento mais simples e de bons resultados para agarrar as frústulas consiste numa sêda de porco extraída de um animal vivo ou recentemente morto; nessas condições a sêda conservando a sua matéria gorda natural, apresenta-se flexível e os objectos adêrem-lhe fácilmente. Prende-se a um tira-linhas leve e cómodo; é mais fácil assim o seu manejo e pode-se com esta disposição alongar ou encurtar a sua extremidade livre, segundo as necessidades do momento. Na ocasião do seu emprêgo passa-se entre os lábios ligeiramente cerrados para se limpar de quaisquer poeiras que se lhe tivessem fixado e ficar suficientemente húmida para apanhar as espécies.

Posto isto, vejâmos o modo de operar.

Estendem-se as diatomáceas de uma colheita, já preparadas e contidas em água destilada, sôbre uma ou mais lamelas que lhe servirão de suporte. Deixam-se secar espontaneamente ao abrigo de poeiras. Sôbre outras lamelas, convenientemente limpas, estende-se uma ligeira camada de uma substância fixadora, para que uma vez uma diatomácea nelas colocada não se desprenda com facilidade.

A melhor substância e a que geralmente se emprega é a *goma de Adragante*. Para se preparar faz-se dissolver a quente uma pequena quantidade em água destilada, e filtra-se. O pouco que se dissolve é suficiente. Ajunta-se-lhe ordinariamente um pouco de álcool com o fim de impedir o desenvolvimento posterior de bactérias.

Para espalhar mais fácilmente a substância fixadora sôbre as lamelas, é conveniente fixarem-se estas provisoriamente sôbre uma lâmina porta-objecto; basta para isso lançar bafo formente sôbre a lâmina e deixar deslizar rápidamente as lamelas sôbre a superfície

húmida: nove vezes em dez a lamela adere suficientemente, podendo-se então executar a operação desejada. Para se desprender, um simples aquecimento basta.

Feito tudo isto, uma diatomácea escolhida numa das lamelas que as contenham é transportada para a lamela convenientemente preparada. Podem empregar-se dois microscópios, mas o melhor é um só com platina móvel. Em um dos lados duma lâmina coloca-se a lamela com o depósito diatomífero e na outra a lamela com a substância fixadora. Foca-se o depósito, apanha-se uma diatomácea, dá-se à platina um movimento de translação de maneira a colocar a outra lamela no campo e deposita-se finalmente a diatomácea escolhida. Feito isto um determinado numero de vezes, segundo o desejo do operador, monta-se a preparação a seco ou nos bálsamos.

Muitas vezes, quando se pretende apanhar com a sêda uma espécie, esta salta e desaparece do campo de visão. A maior parte das vezes é isso devido a ter sido tocada a diatomácea num dos bordos em lugar de ser no centro.

Técnica das diatomáceas pelágicas

As colheitas destas diatomáceas não podem ser tratadas pelos ácidos em virtude da sua fraca silicificação.

Um dos processos empregados consiste em aquecer até ao rubro sombrio as diatomáceas estendidas nas lamelas, afim de destruir as matérias orgânicas que contenham. Usa-se para isso uma lâmina de platina, não muito delgada, porque apresentaria irregularidades superficiais que impediriam as lamelas de se ajustarem perfeitamente, de maneira que, pela ação do calor, se deformariam com facilidade. Durante o aquecimento a superfície das lamelas tornar-se-há castanha, depois negra e em seguida completamente branca. É nessa altura que se dá a operação por terminada. Montam-se em seguida pelos processos atrás expostos.

Citaremos ainda outro processo.

PROCESSO DO PROF. MANGIN. — O sedimento contendo as diatomáceas do plancton é misturado com uma solução de hipoclorito de potássio (um centímetro cúbico de sedimento conservado no álcool para vinte ou trinta centímetros cúbicos da solução de hipoclorito) e deixa-se actuar durante meia hora aproximadamente; dilue-se a mistura num grande volume de água e, depois de repousar, o depósito decantado é tratado pelo álcool e reduzido em seguida por decantação a um ou dois centímetros cúbicos. Adiciona-se-lhe então potassa alcoólica xaroposa e deixa-se actuar durante dez ou doze horas. Ter-

minado êsse tempo lava-se primeiro em álcool, depois em água destilada e por fim neutraliza-se pelo ácido bórico em solução aquosa a 3 por 100.

O depósito final está apto a ser tratado pelo vermelho de ruténio ou pela hematoxilina aluminosa velha. No primeiro caso o depósito é adicionado de uma solução aquosa de vermelho de ruténio, tendo o cuidado de agitar de vez em quando para se obter uma coloração uniforme; no fim de duas ou três horas o depósito é lavado em água, depois em álcool e finalmente passado pela essência de cravo para ser montado no bálsamo ¹.

Este processo é muito delicado. Se a permanência no hipoclorito foi longa, a quasi totalidade das membranas ficou destruída; se foi curta, a coloração não se produz.

As diatomáceas pelágicas são ainda muitas vezes montadas no bálsamo, após uma simples fixação pelo bicloreto de mercúrio, sem qualquer outro tratamento.

Técnica das diatomáceas fósseis

Os tratamentos destas diatomáceas são os mais variados. Conforme a natureza do terreno onde se encontram e os materiais a que estão reunidas, assim se aplica um ou outro processo.

Se se trata, por exemplo, dos guanos, pode aplicar-se o tratamento do ácido sulfúrico e clorato de potássio ou bem assim o seguinte de *M. J. Brun*, algumas vezes empregado.

A massa pulverenta ou compacta é tratada numa cápsula pelo ácido clorídrico aquoso, afim de eliminar o calcáreo. O depósito obtido, depois de lavado e sêco, é misturado com duas vezes o seu volume de ácido sulfúrico concentrado, que se deixa actuar durante muitas horas, agitando algumas vezes. A massa escurece. Passado um repouso suficiente, decanta-se parte do ácido sulfúrico. Sobre o líquido restante lança-se bicromato de potássio, por pequenas doses sucessivas e agitando sempre. Pára-se a operação quando a massa passar de negro para vermelho ou quando se formarem cristais de ácido crômico. O líquido é adicionado de água, pouco a pouco. Em seguida decanta-se e o depósito é lavado numerosas vezes e por fim montado.

Quando as diatomáceas estão presas a outros materiais, outros

¹ Não se deve empregar o bálsamo dissolvido no clorofórmio com a coloração pelo vermelho de ruténio, porque o bálsamo torna-se ácido e descora as preparações; é o bálsamo em xilol que se deve preferir.

processos são empregados. Não nos podendo alargar sôbre êste assunto, enviâmos o leitor para as obras especiais que dêle tratam.

Classificação das diatomáceas

Resta-nos, para completar o resumido estudo que temos feito sôbre as diatomáceas, indicar ao leitor o processo a seguir e os objectos necessários para classificar as espécies das suas colleitas.

Um microscópio que dê pelo menos um aumento de 900 diâmetros é indispensavel; além disso uma câmara clara e, se fôr possível, um aparelho fotográfico para adaptar ao microscópio.

Uma determinação precisa de uma diatomácea qualquer não pode fazer-se sem um bom desenho ou uma fotografia do exemplar para ser comparada aos desenhos publicados pelos diversos autores e que acompanham sempre as suas obras de classificação. É bom, podendo-se, tirar sempre uma fotografia à espécie que se pretende classificar, pois é ella seguramente o modo de reprodução mais fiel; mas a sua dificuldade impede que se faça amiudadas vezes. Então a câmara clara substitue, e de um modo bastante perfeito, o aparelho fotográfico, tendo mesmo até sôbre elle algumas vantagens. Com effeito, num desenho podemos representar todos os detalhes de um organismo que não estejam no mesmo plano, isto é, podemos effectuar a imagem exacta do objecto tal e qual elle se nos apresentaria à nossa vista, se o seu tamanho não fosse tão diminuto; podemos emfim dar-lhe um certo relêvo, fazê-lo resaltar em conjunto, por meio de sombreados e dos outros artificios de que um desenhista se serve. Na fotografia microscópica com grandes amplificações não succede assim; se os detalhes de um determinado plano estão bem focados, os de outro já não são bem visiveis.

Nota-se a princípio uma certa dificuldade em obter um desenho à câmara clara; o hábito porém, pouco a pouco, vai facilitando a sua execução perfeita e rápida.

Não é necessario representar com rigor toda a espécie: a sua simetria e portanto as suas minúcias, iguais em partes simétricas, permite que se suprima a reprodução total da frústula. É sufficiente muitas vezes determinar apenas com rigor o contorno da diatomácea e as particularidades em uma das suas metades.

O tamanho da frústula póde ser determinado no próprio desenho. Mede-se com uma régua a imagem feita à câmara clara, reduz-se essa medida a centéssimas de milímetro e divide-se pelo aumento do

sistema óptico previamente calculado¹. O quociente dará em centésimas de milímetro o comprimento da diatomácea. O número de costelas por centessima de milímetro pode determinar-se por um processo semelhante.

Por meio das oculares microméticas é fácil de calcular-se imediatamente o tamanho da frústula e o número de costelas por centessima de milímetro; basta para isso uma prévia observação para determinar a quantas divisões de um dado micrómetro corresponde cada divisão da ocular micrométrica.

Feito o desenho e conhecidas estas grandezas, procede-se à classificação. Numerosos livros há sobre esse assunto e alguns bastante completos. Aconselhamos aos principiantes o «*Traité des Diatomées*», pelo DR. HENRI VAN HEURCK, de que nos servimos freqüentes vezes para o nosso estudo. A melhor obra que conhecemos é o *Atlas de Schmidt* que ainda anda em publicação; outras há porém que trazem grandes auxílios ao diatomista, entre elas citaremos as duas seguintes:

Sylloge Algarum, por DE TONI. Volume II. Bacillareae.

Diatomées marines de France, por PERAGALLO.

Recorre-se muitas vezes ainda para a classificação de uma espécie, principalmente nos casos de dúvida, ás coleções típicas de diatomáceas.

(Continua).

FAUSTO LOPO DE CARVALHO.

¹ O aumento é fácil determinar-se pelo micrómetro. Colocado este no campo de visão, desenham-se à câmara clara alguns dos seus traços, dez por exemplo. Supomos que cada divisão do micrómetro é de uma centessima de milímetro e que o tamanho da imagem dos dez traços obtida pela câmara clara é de 2 centímetros, ou sejam 2:000 centessimas de milímetro. O aumento do sistema ótico será

$$2:000 : 10 = 200 \text{ diâmetros.}$$

Cadaverização e autólise da medula espinhal

(Continuado do n.º 1, pág. 178)

D) Núcleo

No sistema nervoso, cujo estudo histológico está no seu início e cançará ainda os investigadores durante centenas de anos (CAJAL), o núcleo constitue um dos pontos mais obscuros e discutidos.

De longas controvérsias, de laboriosas pesquisas, da análise de milhões de preparações feitas em todos os centros scientificos, pode deduzir-se como elementos componentes do núcleo: nucléolo, formado pela reunião de esferas argentófilas, separadas por uma substância intersticial; crescentes basófilos perinucleares de LÈVI; corpo acessório de CAJAL; esférulas neutrófilas e grumos ialinos do nucleoplasma; plasma nuclear; membrana.

Como elementos menos constantes: bastonete de RONCORONI, nucléolos supranumerários ou acessórios; vacúolos intranucleolares ou corpos refringentes de LACHE; gránulos isolados nucleolares; nucleolulo ou nucleolino.

São estes os elementos sôbre que incidirá a minha atenção no estudo das alterações regressivas nucleares *post mortem*.

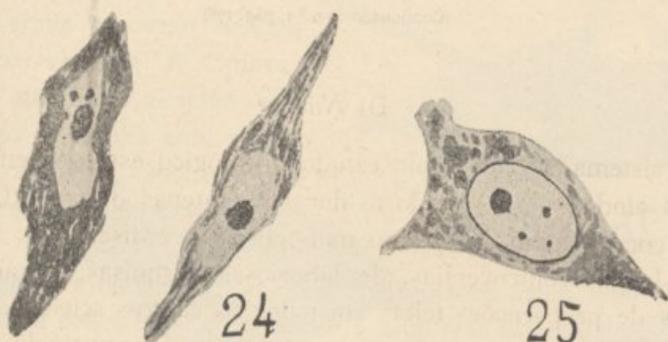
Como nas páginas precedentes, estudarei estas alterações em fragmentos da medula de coelho e de cão, conservados em meio húmido ligeiramente fenicado, em meio secador, em meio úmido aséptico a 37º, e immersos em azeite esterilizado a 37º, formando quatro séries, em cada uma das quais recorri a vários processos de tintura e impregnação.

1.ª série. — Medula de cão. Meio húmido ligeiramente fenicado. 1/2 hora depois da morte¹.

¹ Para evitar monótonas repetições não indico aqui quais os pontos da medula a que correspondem os diferentes blocos. Devo, porém, recordar que os processos corantes, citados relativamente a cada período depois da morte, referem-se a blocos diferentes e não a um mesmo fragmento medular. Assim o método de NISSL foi

Tratando cortes pelo azul de metilena, depois de fixação pelo álcool, o aspecto do núcleo é variável com a disposição das massas cromáticas no citoplasma. Nas somatocrômicas, em que os corpos de Nissl são igualmente distribuídos pelo corpo celular, estes ocultam por completo a membrana nuclear.

Nas pequenas somatocrômicas em que os corpos cromáticos se acumulam num dos polos, ou se distribuem na célula de maneira tal que deixam livre a vizinhança do núcleo, a membrana é bem visível.



Em regra os núcleos são excêntricos podendo mesmo observar-se casos em que ficam colocados completamente à periferia da célula. A forma nem sempre é arredondada; as deformações são frequentes e paralelas às deformações do corpo protoplásmico (fig. 24).

Nas grandes somatocrômicas os detalhes nucleares são dificilmente visíveis; o mesmo sucede em parte nas pequenas e nas células da substância gelatinosa de ROLANDO. O núcleo cora-se uniformemente e nessa massa azul apenas se destaca o nucléolo, a maior parte das vezes corado com a maior uniformidade, e 3, 4, 5 granulações coradas com a mesma tonalidade. O retículo de linina do nucleoplasma é invisível (fig. 25).

Este resultado, constatado em numerosas preparações, mais coradas umas, menos outras, melhor fixadas umas, peor outras, obtidas em diferentes andares da medula, é deficiente se o compararmos com o quadro que fizemos dos elementos estruturais do núcleo.

Empregando a hematoxilina férrica de HEIDENHAIN, depois de fixação pelo líquido de MÜLLER, com surpresa constatei que nesses cortes não é possível apreciar quaisquer detalhes nucleares; a coloração é uniforme. Fixação viciosa? Diferenciação deficiente ou excessiva?

aplicado a um fragmento, ao passo que os processos de HEIDENHAIN, de BEHMER e hematoxilina-eosina foram aplicados a um segundo fragmento. Os casos em que se não deu esta distribuição são expressamente indicados.

Técnica errada? Não podia admitir facilmente qualquer destas hipóteses.

Como meio de verificação empreguei a hematoxilina de BÆHMER, depois da mesma fixação. Constatei que era preciso forçar muito a coloração para que os núcleos nervosos se coram e, apesar de tudo, tão defeituosamente que se não reconhecem detalhes. A aproximação dos núcleos nevróglícos oferece um contraste interessante. Estes, sem atingir os excessos de coloração referidos, mostram todas as suas



26

minúcias estruturais, quando os núcleos nervosos ainda se não coram. À referida coloração dos núcleos neuronais corresponde uma excessiva coloração dos núcleos nevróglícos, tornados verdadeiros borrões de tinta.

Daqui uma única conclusão a tirar: neste período a afinidade corante dos núcleos da nevrógliá é muito maior que a dos núcleos das células nervosas. O nucléolo é a única parte do núcleo que se destaca, uniformemente corado.

Insistindo ainda com a fórmula de BÆHMER numa dupla coloração com a eosina, os mesmos factos verifiquei.

1 $\frac{1}{4}$ horas depois da morte.

Pelo método de NISSL observa-se que o nucléolo não se tingem duma maneira homogénea em alguns casos. Existem massas centrais mais intensamente coradas e pequenos espaços, nítidamente circulares, dum azul muito mais claro. Algumas vezes, raras, êste espaço claro pode ocupar toda a parte central do nucléolo (fig. 26).

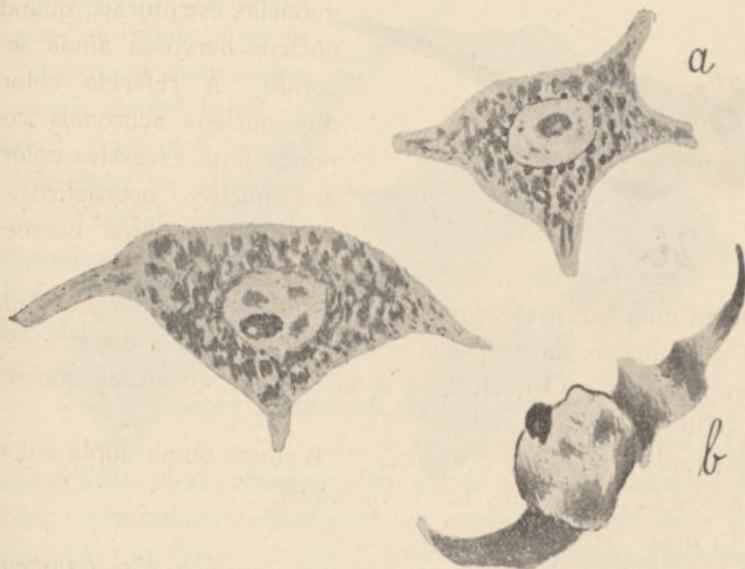
A aplicação das fórmulas de HEIDENHAIN e de BÆHMER só excepcionalmente leva à coloração dos núcleos com diferenciação dos elementos componentes usuais. Na enorme maioria das células observadas o núcleo é uma mancha azul, contendo uma outra menor, mais intensamente corada. Do mesmo modo para obter estes precários resultados é necessário forçar a coloração.

Em alguns cortes em que a técnica aplicada foi a mesma, e em que é igual a tonalidade de coloração, a par de células nervosas cujos núcleos apresentam os caracteres citados, encontram-se na substância gelatinosa de ROLANDO, junto de muitos em que a indiferença de electividade corante é completa, alguns em que a coloração é menos intensa, mas em que se evidenciam as granulações nos pontos nodais do retículo de linina, parcialmente visível. Estes detalhes são obtidos pelo emprego da coloração hematoxilina-eosina.

2 ¹/₄ horas depois da morte.

Nos núcleos tratados pelo azul de metilena de Nissl observam-se por vezes deformações do nucléolo e a presença no plasma nuclear de pequenas massas mais intensamente coradas, de limites muito confusos (fig. 27).

Tratando cortes dos mesmos fragmentos pelas hematoxilinas de HEIDENHAIN e de BÈHMER nada se observa que corresponda a estas massas mal definidas. Na maior parte dos núcleos a diferenciação



27

é mais completa; o núcleo cora-se com uma tonalidade mais fraca que o citoplasma e nele são bem distintas algumas granulações quasi tão volumosas como o nucléolo e uma infinidade doutras granulações muito mais finas. As manchas claras do nucléolo aparecem com frequência, tanto nos elementos da substância de ROLANDO como nas grandes somatocrômicas. Nas pequenas somatocrômicas aparecem ligeiras deformações da membrana nuclear, como chanfraduras irregulares. Mais importante é, todavia, uma alteração observável no núcleo daquelas células em que só uma coloração excessiva consegue pôr em evidência o núcleo e o nucléolo.

Junto do núcleo e imediatamente contíguos à face externa da sua membrana aparecem granulações semiesféricas, de dimensões sensivelmente uniformes, umas vezes pouco numerosas, outras em grande número (fig. 27, a). O conteúdo é homogêneo e corado do mesmo modo que a membrana e a substância nuclear da qual não é separada por qualquer espaço visível mesmo a uma grande ampliação. A esta

alteração chamarei, para comodidade de descrição, estado muriforme do núcleo.

3 $\frac{1}{4}$ horas depois da morte.

Pelo azul de metilena vê-se que a frequência das deformações nucleolares é maior (fig. 28), o deslocamento do nucléolo por vezes muito considerável, e algumas aplicado à face interna da membrana nuclear.

No contorno nuclear aparecem massas correspondentes às granulações hemisféricas, precedentemente descritas, mas um pouco mais volumosas.



Pelas hematoxilinas revelam-se com uma frequência desusada as pequenas manchas nucleolares.

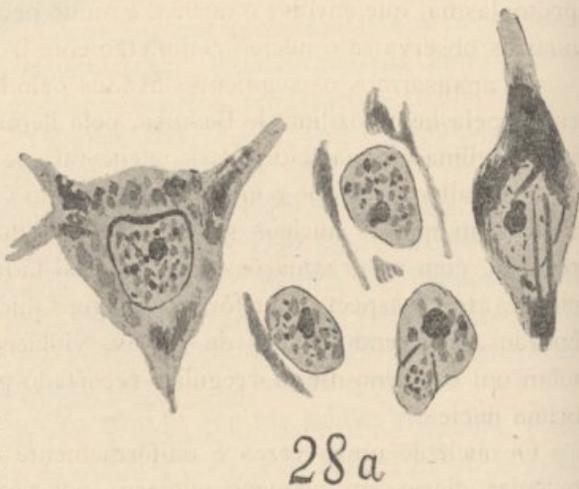
Pela dupla coloração hematoxilina-eosina verifica-se uma abundância de núcleos muriformes não observada até

agora pela aplicação de nenhum dos outros processos.

4 $\frac{1}{2}$ horas depois da morte.

A coloração nuclear obtida pelo reagente de Nissi. é muito desigual, e são frequentíssimas as deformações nucleolares. São mais numerosas as granulações nucleares, a par das máculas referidas (fig. 28, a).

Em muitos nucléolos aparecem granulações justapostas e comparáveis às que constituem o estado muriforme do núcleo, das quais diferem apenas em serem sempre menos numerosas e de desigual volume.

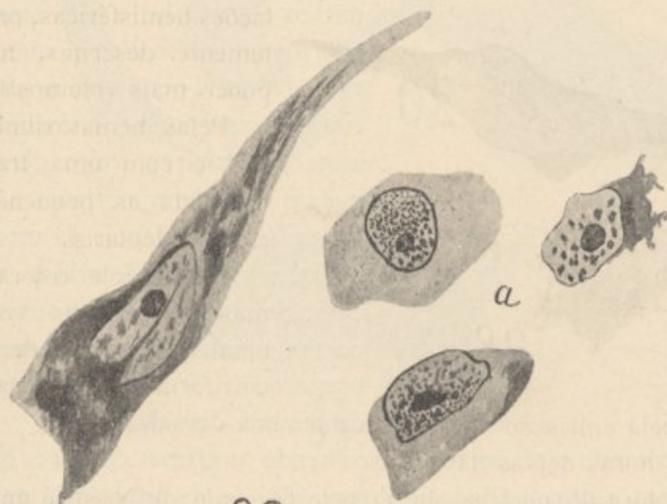


Além desta alteração, uma outra se constata, de grande interesse. Em algumas células, quer da substância gelatinosa, quer somatocrômicas, é extremamente fácil observar longos e finos filamentos, em regra um ou dois, atravessando o núcleo numa direcção arbitrária, mas afastando-se sempre do nucléolo (fig. 29).

Estas alterações são comprovadas pela hematoxilina simples ou em coloração combinada com a eosina. Os cortes tratados por estes processos nada mais revelam além dos factos já citados.

5 $\frac{1}{4}$ horas depois da morte.

Mantem-se a freqüência das células cujo nucléolo se acha aplicado à membrana engelhada. Em algumas pode vêr-se a membrana nuclear rôtta e o nucléolo fora do núcleo para onde arrastou uma pequena quantidade de plasma nuclear (fig. 27, *b*). Em outras a camada de



29

protoplasma, que envolve o núcleo, é muito pequena (fig. 28) e por fim noutras observa-se o núcleo completamente isolado.

Se analisarmos os segmentos fixados pelo líquido de MÜLLER e corados pela hematoxilina de BÆHMER, pela hematoxilina-eosina ou pela hematoxilina-fucsina-ácido pícrico, encontra-se com facilidade o conjunto de alterações que pouco a pouco se tem vindo a constituir, desde a fase em que os núcleos se mostram intactos com o seu finíssimo retículo, com as granulações nodais quási tão volumosas como o nucléolo, até ao aspecto muriforme. Alguns núcleos são anormalmente corados, parecendo cheios de grumos violáceos ou rosados; outros teem um contôrno muito irregular, recortado pelas inflexões da membrana nuclear.

O nucléolo umas vezes é uniformemente corado, outras contem máculas claras em pequeno número; por vezes são completamente cheios destas manchas descoradas sobrepostas e distinguíveis pela diferença de tinção.

9 $\frac{3}{4}$ horas depois da morte.

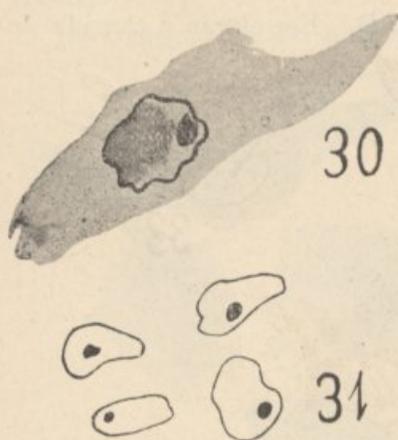
É agora o método de NISSL que vem revelar em muitos núcleos granulações abundantísimas de todas as dimensões, constituindo uma

forma granular (fig. 29, a). Excepcionalmente aparecem células em que é notável a perda de colorabilidade do núcleo, coincidindo com o aspecto verdadeiramente sinuoso da membrana nuclear, que se destaca com o maior vigor na coloração pálida quasi uniforme do citoplasma e do nucleoplasma (fig. 30).

Pelas hematoxilinas simples ou combinadas, vê-se o início dum processo regressivo, manifestando-se pela uniformidade de coloração do núcleo e nucléolo, e pelo estado muriforme muito frequente, mas não geral. De resto persistem as alterações citadas, com notável redução de volume dos núcleos, cujos detalhes se podem considerar normais.

11 ³/₄ horas depois da morte.

Duas horas decorridas no processo de cadaverização trouxeram importantes alterações no aspecto das preparações, feitas no engrossamento da medula dorsal.



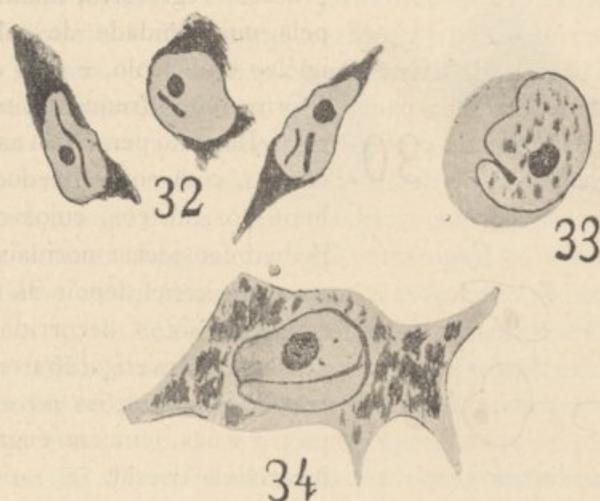
Observando estes cortes, e escolhendo os grupos celulares que mais se prestam a uma cuidadosa observação, os da substância gelatinosa de ROLANDO, nada no núcleo se distingue além duma mancha ligeiramente azulada, limitada por uma linha muito nítida, mas muito irregular, contendo um nucléolo uniformemente corado (fig. 31). Em alguns, em que várias granulações nucleares fixam ainda o azul de metilena, e mesmo naqueles em que a coloração é uniforme, aparecem com grande frequência, maior que a até aqui observada, filamentos uns muito finos, outros grossos, uns longos, ondulados extendendo-se dum extremo ao outro do núcleo deformado, outros curtos quasi rectilíneos, que simulariam bacilos, se não fossem as suas relativamente avantajadas dimensões (fig. 32). Em alguns casos (figs. 33 e 34) é indiscutível a dependência destes filamentos da membrana nuclear, em uns formando-se uma verdadeira ansa muito apertada no fundo duma chanfradura, em outros ligando-se pelas suas extremidades a esta membrana. Estes factos observam-se, tanto nos núcleos da substância de ROLANDO, como nos núcleos das pequenas e grandes somatocrómicas.

Da aplicação das fórmulas de BÆHMER e de HEIDENHAIN não decorre o conhecimento de factos que mereçam menção especial.

22 ¹/₂ horas depois da morte.

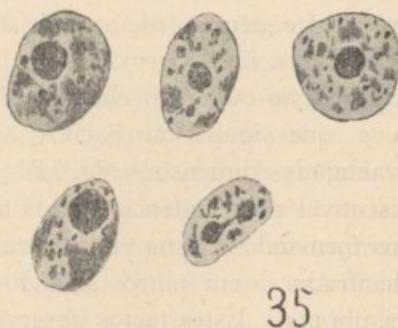
O estudo dos cortes de fragmentos fixados entre os limites do

tempo 11 ³/₄ e 22 ¹/₂ horas não fornece nenhum pormenor novo de valor. As lesões, tão rapidamente produzidas até aqui, evoluem agora lentamente, como se se tivesse passado o período de maior instabilidade morfológica. Apesar disso alguma coisa há ainda a mencionar. Assim o azul de metylena não é fixado pela membrana nuclear tão completamente como até aqui. Na maior parte das células o traço



da membrana é indistinto. Sómente o nucléolo mantêm a sua avidez para o azul; as suas deformações são frequentísimas; a sua coloração é uniforme. Em alguns núcleos, aliás raros, observa-se ainda uma grande avidez para o corante, manifestando-se, não só por esta coloração do nucléolo, mas também pela extrema facilidade com que tomam as tintas as massas informes que se observam no nucleoplasma (fig. 35).

A afinidade do núcleo e do próprio nucléolo para as hematoxilinas de BÈHMER e fèrrica vai diminuindo rapidamente, a ponto de, em muitas células, o núcleo e o nucléolo se confundirem com o protoplasma do corpo celular.



29 horas depois da morte.

São raras as células de substância gelatinosa de ROLANDO que não contem filamentos córados pelo método de NISSL.

Pelas hematoxilinas os núcleos são uniformemente córados. Em numerosas preparações examinadas não aparecem núcleos muriformes. A diminuição de afinidade corante é cada vez mais intensa.

46 horas depois da morte.

Pelo NISSL o núcleo uniformemente corado não é mais que uma mancha de tom azul, interposta entre o protoplasma, o menos colorido, e o nucléolo, o mais fortemente corado. Os filamentos são os últimos vestígios que acompanham o nucléolo e perdem a afinidade para a hematoxilina.

72, 96 horas depois da morte.

Qualquer que seja o processo empregado é o nucléolo o único elemento indicativo da existência do núcleo. Por sua vez este perde a sua afinidade corante; pequeninas manchas brancas perfeitamente circulares atestam mais profunda alteração.

Esta longa série de detalhes, que não observam uma ordem cronológica precisa, porque a cadaverização não é rigorosamente simultânea em todos os fragmentos da medula, pode resumir-se num pequeno número de conclusões a integrar nas conclusões gerais do estudo das alterações nucleares nos diferentes meios.

Alguns dos factos observados não farão parte destas conclusões, reservando-os para a discussão final do seu valor no processo de cadaverização.

Nas suas linhas gerais a cadaverização traduz-se, no núcleo das células nervosas fixadas pelo álcool, pelo aparecimento de deformações nucleares, pelas modificações da membrana nuclear e pela perda de afinidade corante. Na medula fixada pelo líquido de MÜLLER existe um período imediatamente depois da morte, em que a afinidade corante dos núcleos neuronais é insignificante, aumentando em seguida para depois novamente decrescer; logo ao iniciar-se o segundo período aparece uma modificação especial do núcleo, o estado muriforme, precedendo a perda de afinidade corante, com a qual deixa de ser apreciável.

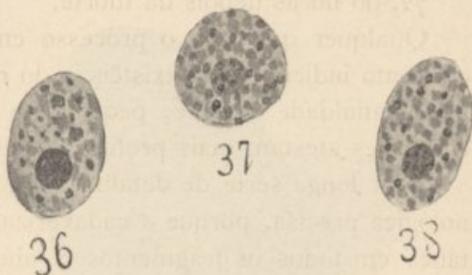
2.^a série — Medula de cão. Meio secador.

2 horas depois da morte.

Depois de fixação pelo ácido picrossulfúrico de KLEINEMBERG e de coloração pelo violeta de genciana anilinado, logo se encontram por menores de estrutura nuclear com uma admirável nitidez em todas as células (fig. 36). O nucléolo mostra muito ligeiras desigualdades de coloração; pode ter a forma de alter, inteiramente idêntico ao núcleo dos leucocytos polinucleares, com os quais o núcleo se confundiria facilmente, se não fôra o seu envólucro de protoplasma com caracteres identificáveis ao da célula nervosa.

Esta forma de alter, em que as massas estão situadas em planos diferentes, parece constituir uma forma de transição para os núcleos binucleolados que nas mesmas preparações encontrei.

No nucleoplasma existem duas espécies de granulações: umas cujo volume pode atingir $\frac{2}{3}$ do nucléolo, pouco numerosas; outras muito finas, espalhadas por todo o plasma nuclear, menos intensamente coradas que as primeiras, muito abundantes nuns núcleos, pouco noutros. Entre umas e outras existem pequenas massas de tom mais corado que o tom geral, de contornos irregulares e mal definidos, tendo aproximadamente o aspecto de grumos achatados. A membrana nuclear é uma linha admiravelmente corada em todas as células, mesmo nas grandes somatocrômicas. A rede da linina não é visível.



Aplicando a outro fragmento o método de CAJAL, reconhe-

ce-se que em alguns nucléolos existem pequenos corpúsculos arredondados, mais nítidos em uns que em outros, impregnados em castanho escuro e cada um deles cheio duma fina poeira; corpúsculos semelhantes, mas mais volumosos e menos impregnados, se encontram no nucleoplasma (fig. 37). Uns e outros teem um volume muito desigual em cada um dos grupos.

10 horas depois da morte.

O violeta de genciana revela, em quasi todos os núcleos das grandes somatocrômicas e em alguns de substância gelatinosa, uma interessante disposição das massas granulares. As mais pequenas granulações não são visíveis, mas, a par das maiores admiravelmente coradas, quasi tanto como o nucléolo, vêem-se outras numerosíssimas do mesmo volume, muito mais pálidas, como se os grumos precedentemente citados fossem todos circulares (fig. 38). A sua disposição é tão análoga à das massas de NISSL nas células griocromas, que poderemos chamar-lhes núcleos tigrados.

Pelo método de CAJAL os corpúsculos intensamente impregnados, que se observavam no nucléolo, não são apreciáveis em muito numerosas células, embora existam ainda em outras. Nas primeiras o nucléolo contém uma fina poeira, não homogéneamente distribuída, pois que existem espaços claros, e grânulos muito desiguais.

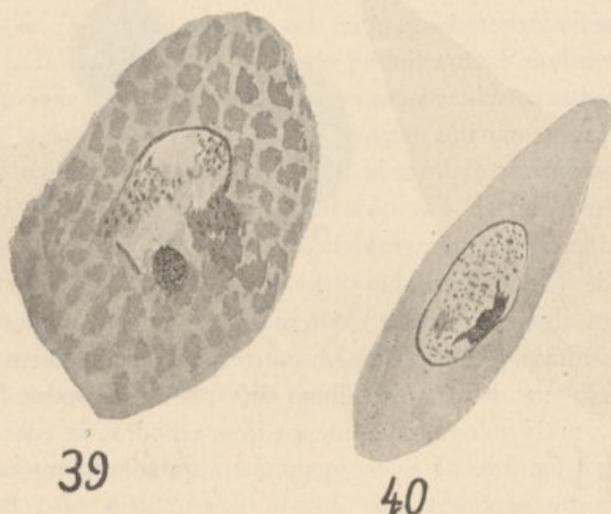
20 horas depois da morte.

Em cortes, tratados pelo método de EHRLICH, começam a aparecer irregularidades de coloração bem apreciáveis. Assim, ao passo que nas preparações precedentemente analisadas o nucleoplasma era menos intensamente corado que o plasma do corpo celular, nestas dá-se o inverso, isto é, o núcleo cora-se mais intensamente que o somato-

plasma. Não é constatável a existência de massas grumosas no núcleo; o nucleoplasma não é homogêneo em coloração, mas as irregularidades são confusas.

49 horas depois da morte.

Cortes de fragmentos fixados pelo ácido picrossulfúrico, 26 e 45 horas depois da morte, nada revelam a mais do que o que referi. Já o



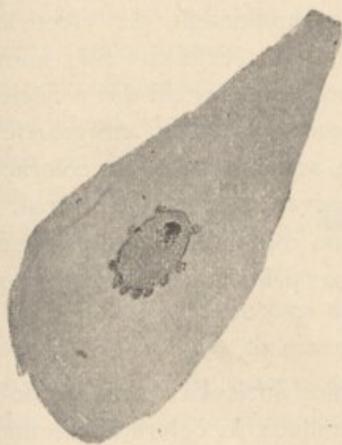
mesmo não sucede quando se deixam passar 49 horas depois da morte. As lesões tomam variados e interessantes aspectos. O mais freqüente, observável nas grandes somatocrômicas do corno anterior, identifica-se com o já descrito e representado na fig. 27. A membrana nuclear, cuja coloração tem uma intensidade muito variável nos diferentes pontos do seu traçado, rompeu-se; fora da rotura vê-se o nucléolo ainda rodeado duma pequena quantidade de substância nuclear (fig. 39); massiços da mesma substância encontram-se também em plena massa do somatoplasma; dentro da membrana nuclear ficaram restos do nucleoplasma com as suas granulações separadas por espaços claros, vãos de substância.

Noutros casos o nucléolo aparece (fig. 40) extremamente deformado, pouco corado, como de resto todo o núcleo, e inteiramente aplicado contra a membrana nuclear. As granulações que nestes núcleos se encontram são todas finíssimas e pouco ávidas do corante.

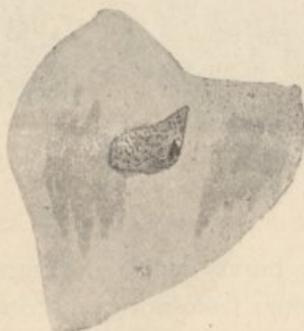
O núcleo pode ainda ser reduzido de volume, uniformemente corado, destacando-se nele unicamente o nucléolo, cuja coloração é também uniforme, e apresenta um aspecto muriforme característico. As pequeninas esférulas justapostas à membrana nuclear fixam o corante tão intensamente como o nucléolo (fig. 41).

Uma outra alteração consiste na perda de nitidez da membrana nuclear, acompanhando uma deformação considerável do núcleo, cujo nucléolo, também deformado, está periféricamente colocado (fig. 42).

Em outros casos o núcleo deforma-se caprichosamente, não sendo visível o nucléolo, mas numerosas as grandes granulações irregulares, tendo o aspecto de fragmentos nucleolares (fig. 43).



41



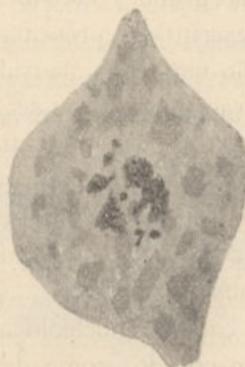
42

53 horas depois da morte.

É no fim deste período que, nos cortes tratados pelo método de CAJAL, é inteiramente impossível observar qualquer célula cujo núcleo se apresente com os caracteres que indiquei relativamente ao fra-



43



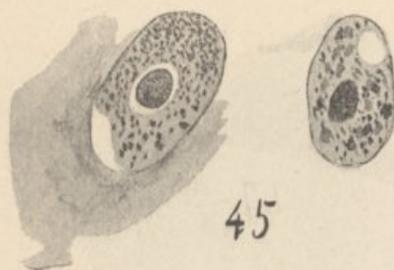
44

gmento fixado 10 horas depois da morte. O número de esférulas tinha vindo a diminuir cada vez mais até desaparecer agora por completo.

Nos cortes tratados pelo violeta anilado de EHRLICH, além de todas as alterações descritas, observa-se o estilhaçamento do núcleo.

Ainda nos fragmentos, muito mais corados que o somatoplasma, se podem distinguir granulações dum azul esverdeado mais intenso (fig. 44).

Mas, devo frisar bem este facto, até agora as células, cujos núcleos estão tão profundamente alterados, são relativamente pouco numerosos. Há, contudo, a par destas alterações, uma que é geral: a profunda modificação de electividade corante das células. São numerosíssimas aquelas em que o núcleo se não cora, e também em grande número aquelas em que a coloração é excessiva. Nenhuma é normal, nem mesmo comparável com as observadas nas primeiras 10 horas *post mortem*.



71 horas depois da morte.

Como facto novo, aparecem vacúolos nucleolares, mantendo-se a excentricidade de nucléolo e a uniformidade de coloração do núcleo.

82 horas depois da morte.

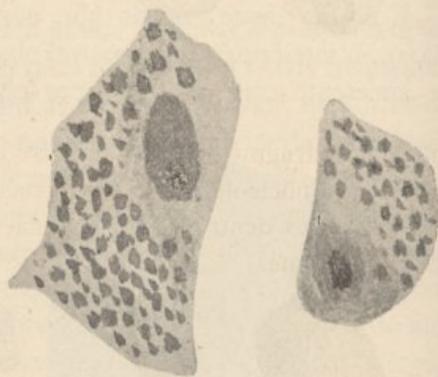
As lesões nucleares são de maior frequência. A vacuolização nucleolar igualmente. No nucleoplasma observam-se também vacúolos, uns centrais, outros periféricos, outros ainda rodeando o nucléolo como uma orla branca (fig. 45).

119 horas depois da morte.

Em presença das esférulas, caracterizadas por uma intensa ipercromia, que se encontram no somatoplasma (fig. 46), o núcleo e o nucléolo, parecem ainda mais descorados.

144 horas depois da morte.

Naquelas grandes somatocrómicas dos cornos anteriores em que a coloração era uniforme, a auréola nuclear é constante. Apesar desta brusca diferença de cor, a membrana nuclear não se apresenta como um traço, como primitivamente. É tal a igualdade de coloração do núcleo e do citoplasma que, quando a auréola falta, não é possível fazer a distinção destas duas porções celulares. Os núcleos podem ser mais intensamente corados, mas são apesar disso quasi irreconhecíveis, tal é a sua deformação (fig. 47).



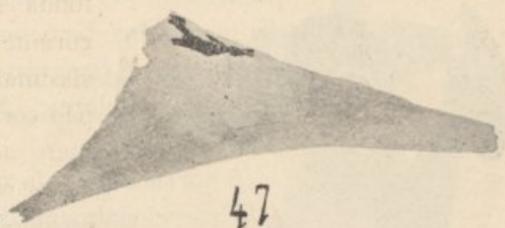
172 horas depois da morte.

Muitos dos núcleos das células nervosas, cujo protoplasma fragmentado se confunde com o tecido que as rodeia, tem aspectos duma irregularidade tal que fogem a qualquer tentativa de descrição (fig. 48). Igualmente interessantes são as disposições que podem tomar os fragmentos nucleolares no interior do núcleo (fig. 49).

Dispersos na substância cinzenta encontram-se núcleos e fragmentos de núcleos contendo restos de nucléolos, de formas variadíssimas (fig. 50).

Assim, podem resumir-se em poucas linhas as alterações constatadas nos núcleos das células nervosas da medula de cão, conservada num meio absorvente da água que a impregna:

Aparecimento de massas grumosas nucleares, excentricidade nucleolar, esvaziamento nucleolar por rotura da membrana, deformação



47



48

nucleolar, fragmentação do nucléolo, estilhaçamento do núcleo, vacuolização do nucléolo e do núcleo, desorganização completa dos elementos nucleares dentro da membrana, perda de afinidade corante, aspecto muriforme.



49



50

Estas lesões podem coexistir ou desenvolver-se simultaneamente e não traduzem as diferentes fases dum processo gradualmente agravado, progredindo uniformemente e sempre segundo a mesma direção. Esta degradação cronológica só seria possível se se pudesse seguir no campo microscópico a desorganização duma só célula numa identidade perfeita de meio e de condições ambientais.

3.^a serie — Medula de cão e de coelho. Conservação dos fragmentos, colhidos asépticamente, em meio húmido esterilizado.

2 horas depois da morte. Medula de cão — coloração de HELD¹.

O nucléolo nem sempre se cora em violeta; muitas vezes esta coloração é modificada por um tom avermelhado. Em alguns a cor vermelha intensa domina e nela se encontram pequenas zonas azuis periféricas. O núcleo, corado de vermelho vivo, de membrana bem perceptível, não é homogéneo; umas vezes é finamente granuloso, outras cheio de núcleos irregulares. Não se distinguem granulações nucleares.



51

6 horas depois da morte.

Excepcionalmente deformação do nucléolo. Nas grandes somatocrômicas o núcleo é rosado, uniforme, granuloso ou vacuolar, sendo este último aspecto o mais freqüente. No intervalo dos vacúolos, quando existem, e no nucleoplasma aparecem granulações punctiformes, umas dum rosado mais intenso, outras azuis.

26 horas depois da morte.

A membrana nuclear não é bem visível em todo o seu traçado; nos pontos em que se fez a acumulação das massas de NISSL, aglutinadas junto do núcleo, deram-se deformações e perda de nitidez; noutros a coloração é menos intensa. A irregularização do contorno nuclear é constante. Em numerosas células de substância gelatinosa do ROLANDO coram-se filamentos intranucleares, quasi todos muito finos, longos e flexuosos.

28 horas depois da morte. Medula de coelho. Método de NISSL.

Os núcleos apresentam formas extremamente variáveis, com chanfraduras ou entalhes mais ou menos profundos. Nas células funiculares, em que estas deformações são mais freqüentes, observam-se ainda filamentos intranucleares e, em alguns, poucas granulações; na maioria o nucleoplasma é homogéneo. As deformações nucleolares são interessantes; na fig. 51, a par das alterações citadas, desenhei uma célula em que o nucléolo está estirado, simulando dois tendo de comum uma pequena parte da sua superfície. Nestas células o núcleo é menos intensamente corado que o citoplasma.

É freqüente observar nas pequenas somatocrômicas grandes va-

¹ Todas as observações, como esta, se referem à medula de cão tratada pelo método de HELD, excepto nos casos em que expressamente for indicado o contrário.

cúolos nucleares de contorno bem nítido, coincidindo com filamentos, em geral em número de 3 ou 4, muito finos e flexuosos (fig. 15).

Em algumas células o nucléolo está completamente aplicado contra a membrana nuclear.

Nestas preparações pude observar duas células binucleoladas. As dimensões dos nucléolos são maiores que as habituais, e estão em planos diferentes numa delas.

45 horas depois da morte.

O núcleo coloca-se nalgumas células tão excêntricamente que vai ocupar a origem dum prolongamento.

50 horas depois da morte.

É difícil definir o sentido de afinidade corante do nucléolo. Cora-se de azul ou de rosa, segundo o tempo de acção do azul de metilena e da eritrosina; empregando os tempos habituais é geralmente azulado.



52

Na medula de coelho, tratada pelo processo de NISSL, o nucléolo é imediatamente contíguo à membrana nuclear, podendo determinar a formação duma dilatação empolar, em que está contido. É em regra deformado; os fragmentos intranucleares são numerosos. Na substância gelatinosa encontram-se todas as alterações precedentemente citadas, mas com maior freqüência. Encontram-se num dos cornos posteriores células binucleoladas, estando em algumas delas, os dois nucléolos ambos deformados, muito afastados um do outro, contíguos à membrana e no mesmo plano (fig. 52).

70 horas depois da morte.

As alterações mantem-se qualitativamente e também quantitativamente, como se conclue depois duma observação muito detalhada.

80 horas depois da morte.

O núcleo não é homogêneamente rosado; nele distingue-se um estado finamente granular, cujas granulações são muito refringentes.

A afinidade corante do nucléolo parece diminuída. A tonalidade da sua coloração é sempre fraca mesmo depois de acção demorada dos corantes. Apesar de tudo, em numerosíssimas células é o nucléolo o único elemento de que nos podemos servir para estabelecer a sua identidade.

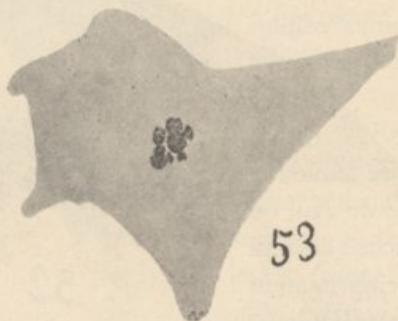
95 horas depois da morte.

Além das alterações já citadas e descritas, apenas de notável observei uma grande somatocrômica dos cornos anteriores contendo dois nucléolos, um dos quais mais pequeno, e uma grande fragmentação do nucléolo num grupo isolado de células.

100 horas depois da morte.

O estudo dêstes cortes revela um facto que aparece pela primeira vez, nesta já longa serie de preparações: a existência numa célula de dois núcleos bem caracterizados, contendo dois nucléolos de igual volume, como, de resto, o são também os corpos nucleares.

119, 121 e 124 horas depois da morte.



53



54

Tanto na medula do coelho como na do cão, preparadas, quer pelo método de NISSL, quer pelo de HELD, o facto dominante é a perda quasi completa de afinidade do nucléolo para o azul de metylena e a facilidade com que se cora em rosa pela eritrosina, em muitas células.

Em alguns, nessa côr rosada, existe um pouco de tom azulado, mas bem ténue. Esta coloração parece estabelecer a passagem para aquelas células, que se encontram nas mesmas preparações, em que o nucléolo é ainda francamente tingido em azul, pelo menos periféricamente. No nucleoplasma não se coram quaisquer granulações pelo azul de NISSL.

142, 144 e 148 horas depois da morte.

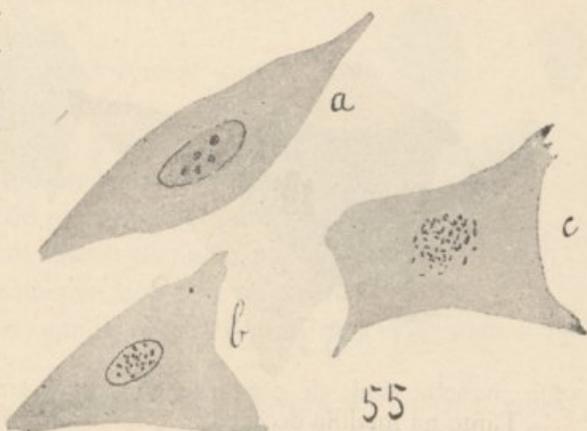
Neste período de cadaverização, das células restam apenas fragmentos mais ou menos volumosos; em alguns deles encontra-se o núcleo, ou antes o nucléolo, pois que não é fácil distinguir o núcleo do tecido ambiente. A sua fragmentação é característica em alguns retalhos de células (fig. 53) da medula do coelho. Contiguamente existem esférulas regulares de volume muito desigual e de desigual coloração. Em algumas células, em que a alteração é menos profunda e em que é ainda possível distinguir o núcleo, não pelo traçado linear da membrana, mas pela diferença de intensidade corante, muitas destas esférulas se encontram acumuladas no limite nuclear e fora dêste (fig. 54), sendo ainda o nucléolo representado por uma esférula um pouco mais volumosa.

Parece que no primeiro caso a fragmentação do nucléolo seguiu a perda completa de afinidade corante do núcleo, e no segundo caso

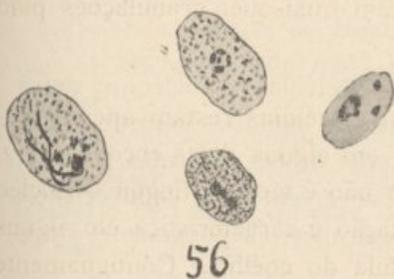
precedeu-a. Esta última marcha observa-se ainda em células, algumas das quais foram representadas na fig. 55, dentre aquelas em que as alterações eram mais nítidas. Os fragmentos nucleolares vêm-se distintamente no núcleo, em número de quatro, cinco, seis ou mais; noutras a fragmentação foi mais longe e os detritos são numerosíssimos; noutras por fim reduzem-se a uma fina poeira, já quando nada há que distinga o núcleo dos restos do citoplasma. Estes factos foram constatados na medula de coelho, corada exclusivamente pelo azul de metilena.

152 horas depois da morte. Medula de coelho—Método de Nissl.

Nestes cortes foi o estudo do núcleo das grandes somatocrômicas que mais prendeu a minha atenção.



Vêm-se nos grupos dos cornos anteriores células, cujos núcleos se encontram em fases diversas do processo regressivo cadavérico: núcleos excêntricos contendo numerosas granulações e o nucléolo uniformemente corado, membrana nuclear descorada; núcleos em que o nucléolo apresenta uma coloração muito reduzida, excepto em dois,



três ou quatro pontos em que existem granulações intensamente coradas; núcleos em que do nucléolo restam apenas granulações mais ou menos afastadas, coincidindo com uma maior riqueza em finas granulações em um dos seus pontos; núcleos em que o número das primitivas granulações é reduzido e em que as finas granulações nucleares são ainda mais abundantes, constituindo uma finíssima poeira; núcleos em que as mesmas granulações primitivas existem muito afastadas, uma delas rodeada de granulações finíssimas que não se encontram no resto do núcleo (fig. 56).

167 horas depois da morte.

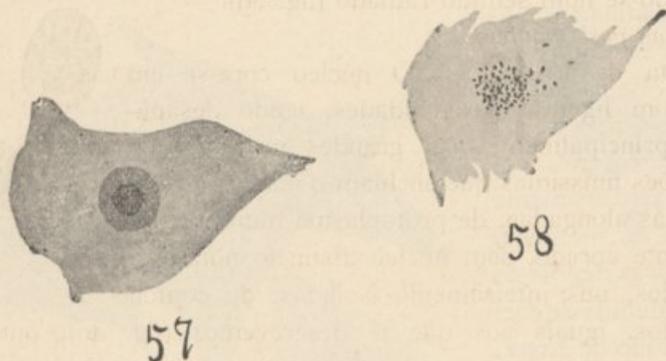
Nas grandes somatocrômicas, cujos núcleos até a esta altura da cadaverização escaparam às alterações regressivas que descrevi, observa-se a sobreposição de tom do nucléolo, núcleo e protoplasma, mas

*

apresentando os primeiros uma regularidade verdadeiramente geométrica (fig. 57), não observável nem mesmo em fragmentos fixados imediatamente depois da morte.

173 horas depois da morte. Medula de coelho — Método de NISSL.

As células da substância gelatinosa de ROLANDO estão reduzidas a



uma mancha azul, de contorno irregular, em que se não distingue nem nucléolo, nem granulações.

206 horas depois da morte. Medula do coelho — Método de NISSL.

As células grandes somatocrómicas, as mais resistentes ao processo regressivo, são simples manchas, pálidamente azuladas contendo finas pontuações, mais intensamente coradas (fig. 58). Por fim são estas que constituem os últimos vestígios, não só nucleares, mas celulares, nos largos espaços cavados na substância intermediária da substância cinzenta.

Em resumo:

Disposição periférica do núcleo e do nucléolo ou nucléolos, deformação nuclear e nucleolar, perda gradual de afinidade corante, dissociação esférica do nucléolo, fragmentação destas esféricas, tais são as alterações que se observam como provenientes da cadaverização da medula sã do coelho e da cobaia, extraídas asépticamente e conservadas em meio esterilizado.

4.^a serie—Medula de cão extraída asépticamente do canal medular e conservados os fragmentos imersos em azeite esterilizado e à temperatura de 37°-38°.

1 1/4 horas *post mortem*.

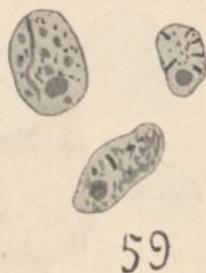
Violeta de genciana de EHRlich. — O retículo é de fácil observação em grande número de núcleos; em outros, dos mais volumosos, vêem-se largos vacúolos dividindo a rede de linina em retalhos, nos quais foram coradas finíssimas granulações.

Método de HELD. — No núcleo existem granulações vermelhas re-

fringentes, por vezes aglutinadas. Nas células em que o núcleo é bem corado, o nucléolo apresenta umas porções avermelhadas e outras azuis; a distribuição destas massas é impossível de sistematizar. Filamentos nucleares de formas e de posições muito variadas, finos, alongados, flexuosos, dispendo-se em qualquer direcção, ou curtos, grossos, muito numerosos, contíguos e aderentes à membrana nuclear, e dispendo-se num sentido radiado (fig. 59).

4 horas *post mortem*.

Violeta de EHRlich. — O núcleo cora-se em massa com ligeiras desigualdades, tendo desaparecido, principalmente nas grandes motrizes, as granulações finíssimas que enchem o nucleoplasma. Em células alongadas, de protoplasma muito homogéneamente corado, sem núcleo distincto notam-se corpúsculos, uns inteiramente isolados, de contornos nítidos, iguais aos que já descrevemos (fig. 46), outros pálidos.



Em alguns núcleos a desigualdade de coloração é nítida, constituindo-se verdadeiras massas isoladas, como que resultantes de aglutinação das trabéculas do retículo com as suas granulações. Outros são muriformes, isto é, teem aderentes à face externa da membrana nuclear corpúsculos hemisféricos.

Método de HELD. — O núcleo, cuja afinidade para a eritrosina, em prejuizo do azul de metilena, era evidente, começa a corar-se uniformemente em azul.

10 horas *post mortem*.

Violeta anilinado de EHRlich. — É nas grandes somatocrómicas que as alterações são mais intensas; a dominante é a deformação nuclear.

Se no núcleo considerarmos uma parte cromática e outra acromática, a primeira representada pelas finas granulações e a segunda pelo intervalo deixado entre elas, ocupado pelas trabéculas e pelas malhas da rede de líhina, partes bem distinctas nos fragmentos fixados imediatamente depois da morte, vemos que nestes não succedeu assim; deu-se uma difusão da substância cromática, de modo que todo o nucleoplasma se cora duma maneira quasi uniforme, destacando-se nele apenas as mais grossas granulações.

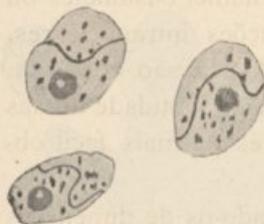
Método de HELD. — As células pelo aspeto do núcleo podem dividir-se em vários grupos: a) células em que as granulações nucleares são bem nítidas; b) células cujo núcleo contém massas irregulares aglutinadas; c) células de núcleo uniformemente corado.

Nas células de qualquer destes grupos observam-se finos filamentos

atravessando o núcleo de lado a lado, e tomando por vezes formas caprichosas (fig. 60).

Na mesma preparação e no mesmo grupo celular, encontram-se nucléolos azuis, nucléolos rosados, nucléolos azuis periféricamente e rosados na parte central.

35, 37 e 40 horas *post mortem*.



60

Violeta de genciana. — Aparecem, pela primeira vez nesta serie, pequenos vacúolos nucleolares e nucleares (37 horas). A afinidade corante do nucléolo é diminuída, por isso que, ao lado dos núcleos nevróglícos admiravelmente corados, se encontram núcleos e nucléolos das células nervosas muito pálidos.

61 e 63 horas *post mortem*.

Violeta de genciana. — A desorganização é completa. A maior parte das células são borrões azuis em que não se distingue núcleo nem nucléolo; em algumas a distincção faz-se com grande dificuldade. O próprio contorno celular é indeciso.

Método de HELD. — As células e os seus retalhos estão inteiramente corados de rosa muito pálido e não se distingue qualquer detalhe estrutural, núcleo ou nucléolo.

86 e 88 horas *post mortem*.

Entre os detritos tissulares nada se observa que mereça especial menção.

Esta serie, embora mais curta, não é menos interessante que as precedentes. As alterações produziram-se muito rapidamente, mercê da temperatura a que estavam submetidos os fragmentos. As afinidades corantes do núcleo rapidamente se modificaram, precedidas de aglutinação das granulações e de rutura das trabéculas da rede de linina.

A deformação nuclear aparece precocemente, e o mesmo sucede com os filamentos nucleares. As alterações finais são a vacuolização nuclear e a perda de afinidade corante.

Os factos expostos, relativos às modificações que sofre o núcleo no processo regressivo cadavérico, decorrentes da observação directa, prestam-se a comentários interessantes, discutidos no seu valor intrínseco, na sua importância na desagregação cadavérica e postos em paralelo com os observados por NEPPI, BARBACCI E CAMPACCI e CARLOS FRANÇA.

¿Qual o valor de cada um dos factos observados?

Sabido é que a histologia do núcleo é, em muitos pontos, ainda

misteriosa, apesar das numerosíssimas investigações de que tem sido objecto. Muitos detalhes estruturais são atribuídos à cadaverização.

A análise destas series em alguma cousa pode contribuir para a debatida questão.

No decurso do meu relato muitas vezes me referi a filamentos intranucleares e muito propositadamente lhes não chamei bastonetes ou balestilhas. Os autores designam assim formações intranucleares, cujos caracteres, disposição e significação fisiológica são obscuros. Ao ler as descrições, por vezes ocorre a ideia da não identidade dessas formações. Tudo é discutível desde os caracteres de mais fácil observação.

CAJAL refere-se passageiramente a êles, dizendo-os de dimensões porporcionais às do núcleo que os encerra, de forma muitas vezes espiralada. M. ATHIAS descreve e desenha estes corpos intranucleares como balestilhas delgadas ou espessas, rectas ou sinuosas, de extremidades adelgaçadas e muitas vezes ponteagudas, geralmente mais curtas que o diâmetro nuclear, que pode também ser igualado.

OLIVER não os encontrou nas células nervosas do simpático de vários mamíferos (cão, gato, coelho, homem). PRENANT teve melhor êxito no ouriço cacheiro, cujas células do sympático as mostram com uma grande freqüência. ATHIAS descreve as balestilhas nas células dos gânglios espinhaes do coelho e do gato, RONCORONI nas células piramidais médias do cortex cerebral, SJÖVALL nas células dos gânglios espinhais do ouriço, CAJAL, como constantes nas suas células anãs do cerebello e em muitas das células médias da medula, HOLMGREN no sistema nervoso das aves, SMIRNOW no núcleo duma célula nervosa do gânglio espinhal dum embrião humano de quatro meses.

As relações com os elementos componentes do núcleo são também pouco claras; para uns estes filamentos são completamente independentes (ATHIAS, CAJAL, HOLMGREN); para outros encontrar-se-hiam em relação directa com a membrana nuclear, de que seriam apenas pregas (LUGARO e seus discípulos); para outros ainda encontrar-se-iam, nas células nervosas dos gânglios espinhais do ouriço, bastonetes, uns em relação directa com o núcleo, outros contidos em vacúolos.

CAJAL, estudandô-os pelo processo de prata reduzida, admite a existência de um único em cada núcleo das células em que observou a sua existência.

A significação fisiológica é ainda mais obscura. Numerosos observadores, notandô que se assemelham a formações análogas que se encontram no citoplasma nervoso e àquelas que se descrevem em muitas outras células animais e vegetais e consideradas como crista-

loides, dão aos bastonetes igual significação, quando os não consideram decididamente como cristais.

OLIVER considera-os como cristais resultantes da transformação parcial do reticulo de linina, constituindo reservas nutritivas. ATHIAS identifica os cristaloides intranucleares com os citoplásmicos. CESAR BIANCHI faz igual identificação e constata que são muito mais abundantes nos animais em hibernação.

Para uns são productos de secreção accidentais, para outros constituem elemento componente normal de certos neurónios.

Poderemos dizer, com CAJAL, que se ignora actualmente a natureza e o papel d'este corpo singular ¹.

Nas series cujos resultados expus, observei com grande freqüência filamentos intranucleares. Vez alguma consegui distinguir, com os processos técnicos empregados, filamentos que a estes se pudessem assimilar no citoplasma nervoso da medula de cão ou do coelho.

Em todas as espécies de células nervosas da medula consegui distinguir estes filamentos; contudo o máximo de freqüência pertence às células da substância gelatinosa de ROLANDO e, num logar secundário, às pequenas somatocrómicas dos cornos anteriores. Várias vezes observei dois, três e cinco filamentos num mesmo núcleo, como desenhei nas figs. 15, 32, 52, 56, 59 e 60.

A sua forma é das mais irregulares, mas em caso algum a descrita por ATHIAS. Uma vez assemelha-se a um avantajado bacilo, grosso, curto, de arestas vivas, perfeitamente rectilíneo (fig. 32); outras é ainda grosso, mas mais longo e ligeiramente curvo (fig. 32); finalmente noutras observações apresenta-se muito fino, muito flexuoso (fig. 60).

É interessante a maneira como se comporta em presença dos corantes. O violeta de genciana anilado de EHRLICH é impotente para o corar.

¹ Para a elaboração desta resenha propositadamente recorri aos seguintes trabalhos: S. RAMON CAJAL, *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* Edit. franc., 1902; M. ATHIAS, *Anatomia da célula nervosa*, Lisboa, 1905; OLIVER, *Recherches sur les granulations de la cellule nerveuse*, Lyon, 1901; PRENANT, *Notes cytologiques. Cristalloïdes intranucleaires des cellules nerveuses sympathiques chez les mammifères*. Arch. d'anat. micr., vol. 1, 1897; RONCORONI, *Su un nuovo reperto nel nucleo delle cellule nervosa*. Arch. di psichiatria, 1895; LUGARO, *Su di un presunto nuovo reperto del nucleo della célula nervosa*. Riv. di patol. nerv. e ment., vol. v, 1896; SJÖVALI, *Ueber die Spinalganglienzellen des Igels. Ein neuer Befund von Krystalloiden Bildungen in Nervenzellen*, Anat. Hefte, 1901; HOLMGREN, *Weitere Mittheilungen über den Bau der Nervenzellen*, Anat. Anz., 1899; SMIRNOW, *Einige Beobachtungen über den Bau der Spinalganglienzellen bei einem viermonatlichen menschlichen Embryo*, Arch. f. mikr. Anat., vol. LIX, 1901.

Os métodos de NISSL e de HELD coram-o admiravelmente num tom azul pálido ou intenso. A sua afinidade para a hematoxilina, quer aplicada sob a formula de BOEHMER, quer sob a formula de HEIDENHAIN, é nula.

Mas a afinidade corante para o azul de metilena varia com a fase da cadaverização. Vai-se acentuando pouco a pouco, depois atenuando até ao desaparecimento total.

Por outro lado, se atentarmos nas series descriptas, constatamos que os filamentos nucleares sómente começam a aparecer ou a tornar-se mais frequentes numa certa altura da serie, isto é, concomitantemente a um estado de cadaverização mais ou menos avançado. Assim na 1.^a serie (meio húmido fenicado) aparecem sómente 4 $\frac{1}{2}$ horas *post mortem* nas células de substância gelatinosa de ROLANDO, isto é, quando o núcleo começa a modificar a sua afinidade química; na 4.^a serie em que a temperatura apressa as alterações regressivas, os filamentos aparecem no fim de $\frac{1}{4}$ depois da morte, mas só se tornam abundantes 2 horas depois e ainda nas células de substância gelatinosa; na 3.^a serie vimos que apareciam nas somatocrómicas 26 horas depois da morte. Os cortes eram tão numerosos que estes resultados merecem toda a confiança e os filamentos não poderiam passar despercebidos.

Mostram-se completamente independentes do nucléolo; não me foi possível observar filamento que fosse sequer tangente ao nucléolo. A maior parte das vezes são independentes da membrana nuclear (fig. 32). Em outras, porém, a sua dependência desta membrana impõe-se como evidentíssima. Representei nas figs. 33, 34, 59 e 60 casos típicos. Ora apresenta a membrana nuclear reentrâncias das quais uma penetra profundamente, sendo bem apreciáveis as paredes dessa depressão em betesga (fig. 33) que não chega a atingir a parte central do núcleo; ora é uma reentrância isolada, cujo fundo se prolonga por um traço, correspondente a um diâmetro da circunferência nuclear (fig. 34); ora são traços que vão dum ponto a outro da membrana (fig. 60); ora ainda filamentos numerosos, curtos, radialmente dispostos a partir da membrana e sem atingir o centro do núcleo (fig. 59).

Estes factos levam-me à convicção de que estes filamentos representam pregas da membrana nuclear, conseqüentes à retracção do núcleo, seccionadas em vários sentidos. Para reforçar esta convicção citarei:

A identidade de reacções corantes da membrana e destes filamentos tendo em consideração a fase regressiva; começam a fixar o azul de metilena, quando a membrana nuclear, na progressão do pro-

cesso cadavérico, começou também a manifestar a sua afinidade para este corante, em detrimento da eritrosina, no método de HELD.

A coincidência do seu aparecimento ou maior frequência com a irregularização do contorno nuclear, isto é, com a fase de regressão cadavérica em que o núcleo se retrai e as pregas se formam.

A sua máxima frequência nas células de substância gelatinosa, precisamente aquelas cujo núcleo mais rapidamente sofre a influência do meio e dos reagentes, não só pela sua situação topográfica, mas também pela sua pobreza de citoplasma protector.

¿Poder-se hão identificar estes filamentos com os bastonetes ou balestilhas?

Contrariamente à opinião de CAJAL, estes filamentos podem ser numerosos num mesmo núcleo; a sua forma é bastante diferente da descrita por ATHIAS; a sua dependência da membrana bem contrária à opinião daqueles que consideram os bastonetes completamente independentes dos elementos componentes do núcleo; as reacções corantes e em especial a de hematoxilina férrica diferentes em um e outro caso.

Mas o valor destes argumentos contrários à identificação não é realmente considerável. Assim, PRENANT encontrou dois bastonetes nas células dos gânglios simpáticos do ouriço; a forma só é diferente da descrita por ATHIAS nas células dos gânglios espinhais do coelho e do gato; corresponde à descrição da maioria dos autores; as reacções corantes só tem valor quando aplicadas em igualdade de condições de modo a tornarem-se comparáveis.

Nestas condições não me repugna aceitar a tese de LUGARO, que os bastonetes são simples pregas da membrana nuclear, reconhecendo, todavia, que sobre a questão é indispensável realizar mais amplas pesquisas para se alcançar um resultado definitivo.

O nucléolo constitue um ponto não menos obscuro na histologia da célula nervosa, e encheria volumes tudo o que se tem dito a respeito deste minúsculo corpo nuclear.

É geralmente único, dizem os autores, o que parece ser já ponto definitivamente assente, tal é o consenso quasi unânime que se observa.

Disse quasi unânime, pois que uma ou outra voz aparece apontando excepções, por vezes numerosas. Assim, MARINESCO, estudando o nucléolo nos diversos tipos celulares do feto, notou que no principio do desenvolvimento o número de nucléolos é grande, e que este número diminue com a aproximação do estado adulto. Citam-se mesmo neste período células bi- e tri-nucleoladas; das primeiras algumas observei das quais é exemplo a fig. 52.

A análise das series mostra-me que o progressivo desencadear do processo cadavérico pode induzir em êrro qualquer observador inexperiente, desde que não seja atentamente considerado o período decorrido depois da morte. Assim um período há em que o nucléolo se divide em dois e três fragmentos, podendo mesmo observar-se um comêço de divisão representado pelos nucléolos em alter (fig. 51). O número de fragmentos, um dos quais mantêm a forma esférica, pode ser maior (fig. 55), na fase que precede a pulverização nucleolar. Portanto a marcha de desintegração cadavérica do nucléolo reproduz, em sentido inverso, o desenvolvimento na sua progressão para o estado adulto celular. À medida que a célula nervosa se desenvolve, o número de nucléolos diminue; à medida que a cadaverização da célula nervosa progride, a partir de certo ponto, o número de fragmentos nucleolares augmenta.

Devemos, porém, notar que o início da fragmentação nucleolar é acompanhado de tais lesões regressivas dos outros componentes celulares que qualquer confusão é difícil de se dar numa conscienciosa observação.

Observei que o nucléolo é geralmente volumoso, não sendo possível estabelecer qualquer proporcionalidade entre o seu volume e o do núcleo.

Nos casos em que constatei núcleos plurinucleolares, nos primeiros dias depois da morte do animal, o volume era desigual e a situação variável, umas vezes lado a lado no mesmo plano, outras em planos diferentes, uns próximos, outros afastados. Estes casos constituem uma raridade, pois se reduzem a uma dezena em muitos milhares de células nervosas examinadas.

Se observarmos as células imediatamente ou pouco depois da morte, o nucléolo é esférico, de limites muito nítidos, mas o aparecimento da deformação nucleolar é precoce e observável muitas vezes com o núcleo intacto. Assim, nos fragmentos colocados em meio húmido fenicado 2 $\frac{1}{2}$ horas depois da morte, já apareciam nucléolos deformados quando não havia ainda outras lesões bem apreciáveis. Nos fragmentos colocados no exsicador e nos meios aséticos a deformação aparece também cedo, mantendo-se, porém, a nitidez primitiva do contôrno.

Muitos nucléolos mantem-se esféricos até às ultimas fases do processo regressivo, perdendo as suas afinidades corantes antes da modificação da forma.

A posição excêntrica do nucléolo é a regra; só excepcionalmente ocupa o centro do núcleo. Com o processo cadavérico o afastamento do centro aumenta e podem aparecer aplicados contra a face

interna da membrana nuclear (figs. 40, 42 e 54) ou fazendo hérnia nesta membrana (figs. 27 e 39).

Como nucléolos rigorosamente cêntricos, feriram a minha atenção os observados, com o método de NISSL, em cortes de fragmentos da medula de coelho, 167 horas depois da morte (fig. 57). O protoplasma é uniforme; igualmente uniforme e homogêneo o núcleo; no seu centro vê-se o nucléolo volumoso de contôrno geomêtricamente concêntrico à membrana nuclear. Esta regularidade interessante é inexplicável nesta fase tão avançada de cadaverização.

O nucléolo fixa o azul de metilena e a hematoxilina, quando empregados isoladamente e nas primeiras horas depois da morte, e, se a acção do corante é demorada, a coloração é uniforme.

Desde, porém, que a acção do reagente seja cuidadosamente seguida, nota-se desde logo que o nucléolo não é homogêneo e antes tem partes que se coram umas mais intensamente que outras. Num grande número a parte central é menos corada, noutras a irregularidade é tal que é difícil sistematizar, o que indica que, se porventura existe diferença química entre as substâncias que fixam com mais ou menos intensidade estes corantes, a sua distribuição é irregular na maior parte dos nucléolos.

Empregando a eosina juntamente com a hematoxilina a coloração violeta mantem-se dominante. Já o mesmo não sucede com a eritrosina acidificada; a parte central do nucléolo tingem-se de vermelho vivo. Este resultado está de acôrdo com o estabelecido por vários histologistas (LEVI, BUHLER, SCOTT, EWING, LENHOSSEK), segundo os quais no nucléolo existem duas regiões cuja afinidade química é diferente: a central, acidófila, a periféria, basófila. Mais próprio e em face das reacções descritas, deveríamos à primeira chamar anfófila.

Mas desde que começam a aparecer alterações cadavéricas as afinidades corantes modificam-se; pouco tempo depois da morte, em alguns casos 2 horas depois, a zona periférica fixa também a eritrosina, ficando todo o nucléolo corado de vermelho, mais intenso na parte central, o que prova que a basofilia periférica era duma grande instabilidade e merece também a designação de anfófila. Empregando só uma côr básica, a diferença de coloração entre as duas porções depressa desaparece também. Nas últimas fases de regressão cadavérica a coloração do nucléolo é uniforme qualquer que seja a tinta empregada e uniformes são também os fragmentos em que o nucléolo se divide num dos processos por que se faz a sua regressão. No segundo é a perda completa de afinidade corante tanto para as côres básicas como para as ácidas.

Não me foi dado observar em caso algum os blocos semilunares

basófilos de LEVI com os caracteres descritos por este histologista. Esta observação não podia deixar de ser deficiente por não terem sido empregados os processos técnicos preferíveis. Observei nas primeiras fases do processo regressivo esférulas aplicadas contra o nucléolo, umas de pequenas dimensões, outras volumosas, constituindo fragmentos da coroa perinucleolar descripta por LEVI (figs. 4, 5, 56). Outras vezes os corpos basófilos não fazem saliência à superfície do nucléolo mas conhecem-se distintamente na sua zona periférica, não chegando a unir-se, nem a constituir uma camada cortical contínua (figs. 17, 28 a, 28 e 56).

É de notar que nas fases avançadas da cadaverização desaparecem as esférulas salientes, coincidindo esta desapareição com a maior riqueza das granulações nucleares, muitas delas certamente provenientes do destacamento e fraccionação dos corpos basófilos.

Na minha exposição interpretativa das preparações observadas muitas vezes falei de pequenas manchas claras nucleolares e defini-as assim por não encontrar melhor expressão, extranha às discussões que existem sobre a sua natureza. Uns pretendem que são esférulas claras, refringentes, verdadeiros nucléolos (OBERSTEINER, HOLMGREN, SACHA RUZICKA, etc.). Outros que são simples vacúolos (FLEMMING, GOLDSCHIEDER, FLATAU, etc.). A minha observação não é suficientemente extensa para poder ter uma opinião definida sobre a questão. Comtudo um facto ha que me leva a inclinar-me mais para a natureza vacuolar dessas manchas claras das minhas preparações¹. Antes da fragmentação do nucléolo, por vezes estas manchas são mais numerosas mostrando um aspecto grosseiramente esponjoso, mantendo-se incolores e completamente idênticas a manchas iguais que aparecem no protoplasma e no núcleo das mesmas células, das quais apenas diferem pelas dimensões. Ora, assim como me repugna admitir que essas manchas citoplásmicas sejam corpos refringentes, igualmente me inclino a aceitar que o não sejam as nucleolares, nessa fase de decomposição e por dedução nas fases em que aparecem.

Nos casos em que existem e os nucléolos se não fragmentam, a não ser depois de perdidas as afinidades tinturiais, acompanham o nucléolo em todas as suas modalidades de coloração, mantendo sempre os seus caracteres próprios. É possível que, se fossem verdadeiros

¹ São raríssimas nos blocos medulares fixados imediatamente depois da morte do animal e quando aparecem é nos blocos das porções mais volumosas da medula, isto é, precisamente naqueles em que a penetração do fixador é mais lenta pela capa protectora da substância branca, dando tempo a que mais rápidamente progridam na substância cinzenta as alterações cadavéricas.

nucléolos, apresentassem alterações cadavéricas e que deixassem resíduo apreciável após a fragmentação.

CAJAL inclina-se a considerar os vacúolos ou corpos refringentes de LACHE produções artificiais provocadas pela acção dos reagentes ou por fenómenos autolíticos nucleolares, e ainda a que sejam vacúolos pela sua estreita semelhança com os vacúolos dos glóbulos brancos, pelo seu contôrno inteiramente comparável à zona periférica nucleolar, e pela sua colorabilidade menos enérgica.

É difícil admitir a identidade destes vacúolos e das esférulas argentófilas de CAJAL.

Estas são mais numerosas e a diferença de número é a maior parte das vezes flagrantíssima; por outro lado resistem pouco ao processo cadavérico e dentro de poucas horas depois da morte nos nucléolos não se via mais que uma fina poeira, onde se não distinguiam contornos das esférulas primitivas. As manchas claras, pelo contrário, aparecem e aumentam em número.

A identidade é possível entre estas manchas e os vacúolos que MARINESCO afirma que o método de CAJAL permite constatar entre as granulações nucleolares¹, e que eu encontrei quando as esférulas argentófilas começavam a rarear.

Frequentes vezes constatei a existência de corpúsculos nucleolares, especialmente revelados pelo método de NISSL, na medula em decomposição em meio húmido e fenicado. Estes corpúsculos e os vacúolos apareciam simultâneamente e nunca nos cortes feitos em fragmentos fixados immediatamemente depois da morte. Nas fases médias e últimas do processo regressivo os corpúsculos deixavam de se co-

¹ Bibliografia consultada relativamente ao nucléolo: S. RAMON CAJAL, *Estrutura del protoplasma nervioso*, Rév. trim. micr., 1896, t. 1, pag. 1; LEVI, *Su alcune particolarità di struttura del nucleo delle cellule nervose*, Rév. di patol. nerv. e ment., 1896, vol. 1; LENHOSSEK, *Ueber den Bau der Spinalganglienzellen des Menschen*, Arch. für Psychiatr., xxix, 1897; VAN GEHUCHTEN, *L'anatomie fine de la cellule nerveuse*, C. R. du XI Congrès intern. de Med. de Moscou, 1897; LEVI, *Ricerche citologiche comparate sulla cellula nervosa dei vertebrati*, Rév. di patol. nerv. e ment., 1897, vol. II, n.º 5 e 6; LEVI, *Considerazioni sulla struttura del nucleo della cellula nervosa*, Rév. di patol. nerv. e ment., 1898, vol. III, pag. 289; RUZICKA, *Zur Geschichte und kenntnis der feineren Structur der Nucleolen in den centralen Nerven zellen*, Anat. Anz., Bd. xvi, 1899; SUZZATO, *Ueber Ergebnisse der Nervenzellenfärbung in infixirtem Zustande*, Berl. klin. Wochenschr., vol. xxxix, 1902; LACHE, *Sur le nucléole de la cellule nerveuse*, Journ. de Neur., 1905; MARINESCO, *Recherches sur le noyau et le nucléole de la cellule nerveuse*, Centr. f. Psych. u. Neur., Bd. v, 1905; M. ATHIAS, *Anatomia da cellula nervosa*, Lisboa, 1905; MARINESCO, *La cellule nerveuse*, Paris, 1909, vol. I; S. RAMON CAJAL, *El núcleo de las células piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos*, Trab. del labor. de invest. biol., 1910, t. VIII.

rar, precedendo esta perda de afinidade corante a do nucléolo. Apresentaram-se sempre pouco volumosos, uniformemente corados, fixando o azul de metilena no método de HELD e nunca colocados no centro de vacúolos. O seu volume era sensivelmente o mesmo em todos êles, de modo que nenhum merece a designação de nucleólulo. A sua ausência constante em todas as células fixadas imediatamente depois da morte levam-me a aceitar abertamente a hipótese que CAJAL chegou a formular, depois de estudar os mesmos corpúsculos pela prata reduzida, que são produtos de alteração cadavérica.

Disse repetidas vezes nas minhas descrições que, com freqüência e precocemente, aparecem espaços claros no núcleo, a par de grumos ou massas grumosas, muito pálidamente corados em azul pelo processo de NISSL, em rosa mais ou menos viva pelo método de HELD e ainda tomando uma côr fraca pelas hematoxilinas de BOEHMER ou HEIDENHAIN. Estes espaços representam indubitavelmente uma alteração cadavérica, pois não se encontram nos blocos pouco espessos das porções mais finas da medula, fixados imediatamente *post mortem*. Representam o resultado da retração do núcleo, com rotura das trabéculas da rede de linina, cujos fragmentos se aglutinaram com os grumos ialinos constituintes das massas grumosas descriptas. Em alguns dêstes é ainda possível distinguir granulações irregulares que devem corresponder às granulações que CAJAL e LENHOSSEK se inclinam a considerar como grãos de edematina.

Além destas, muitas granulações observei cuja identificação oferece uma grande dificuldade.

Na fig. 24 representei, como exemplo de várias que encontrei, uma célula da medula de cão em que o núcleo apresenta dois outros corpúsculos arredondados, pouco afastados do nucléolo e corados com a mesma tonalidade pelas hematoxilinas. ¿Nucléolos supranumerários, granulações neutrófilas do carioplasma, glóbulos de nucleína desprendidos das *zolle* de LEVI?

Outros corpúsculos se mostram no carioplasma: uns em pequeno número, muito pequenos, fortemente corados em azul, ou em vermelho pelo método de HELD, ou todos em azul pelo processo de NISSL (figs. 51, 59, 60, 28 e 29), outros ainda mais pequenos e mais numerosos com as mesmas reacções corantes (figs. 28 a, 29, 56). Estes corpúsculos devem corresponder aos grânulos neutrófilos ou acidófilos de alguns autores e a que COLLIN chama ainda eosinófilos, distinguindo, segundo a sua abundância, duas variedades de núcleos: ipergranulosos e ipogranulosos. Parece, como decorre da análise das series, que estes corpúsculos podem fragmentar-se com a marcha da cadaverização, dando logar à extrema abundância em que se obser-

vam nas figs. 42, 43 e 45 em fase adeantada da regressão cadavérica. Sendo assim, se conclue quão precária é a classificação de COLIN; um núcleo ipogranuloso pode tornar-se ipergranuloso no último período da sua destruição.

Alguns núcleos, corados pelo violeta de genciana, mostram o plasma completamente cheio de esférulas, colocadas umas ao lado das outras, mais pálidas que o núcleo, pelo que demos a estes núcleos o nome de núcleos tígrados. ¿Qual é a significação destas granulações? Por agora nada posso dizer de plausível.

Envolvendo todas estas formações, encontra-se a membrana nuclear. O seu traçado acompanha a forma do núcleo e esta as deformações da célula. Observada imediatamente depois da morte, mostra o seu duplo contôrno, nitidamente apreciável e de uniforme espessura. No evoluir do processo cadavérico os seus caracteres modificam-se; começa a fixar os corantes básicos e a apresentar desigualdades de espessura (figs. 28 a, 30, 34, etc.), roturas, até que se fragmenta deixando espalhar os resíduos nucleares.

Aderentes à superfície externa desta membrana e representando um avançado estado de cadaverização, mais precocemente numa célula que noutras, aparecem granulações dando ao núcleo, nesses casos quasi sempre uniformemente corado, um aspecto a que chamei muriforme (fig. 27 a). Estas granulações semiesféricas, arredondadas, ou ainda irregulares, dispõem-se umas vezes regularmente em volta do núcleo, dando-lhe a forma duma roda dentada (figs. 27 a, 41); outras vezes acumulam-se em uma zona limitada da periferia (fig. 54). Nesta última figura, em que representei um dos mais característicos núcleos que observei, existe perto uma granulação idêntica, mas afastada da membrana, livre no citoplasma alterado.

As alterações existentes no protoplasma celular, na fase em que appareceu este estado muriforme, fazem pôr de parte a hipótese de serem formações citoplásmicas. A única plausível é que se trata de granulações emigradas do suco nuclear.

Feita esta análise interpretativa, podemos resumir as alterações cadavéricas do núcleo das células nervosas da substância cinzenta das medulas de coelho e de cão, colocadas meio séptico ou aséptico, húmido ou sêco, dizendo que as alterações apresentam variantes que se podem reduzir a dois esquemas que teem uma primeira parte comum. A primeira fase consiste em:

Retracção do núcleo, com pregueamento da membrana, rutura das trabéculas da rede de linina e conseqüente formação de massas grumosas.

Excentração do nucléolo e sua deformação.

Aparição de corpúsculos nucleolares.

Desaparição duma parte dos corpos basófilos de LEVI, coincidindo com o aumento das granulações nucleares.

Desaparição das esferas argentófilas de CAJAL.

Aspecto muriforme do núcleo. Emigração de granulações nucleares.

As alterações consecutivas divergem em seguida. No primeiro esquema observa-se:

Alveolização do nucléolo e fragmentação consecutiva, conservando os fragmentos as afinidades corantes.

Fragmentação do núcleo, reduzido a uma poeira de granulações.

No segundo deparamos com a perda completa de afinidade corante sem fragmentação, o que aliás já se vinha definindo pela diminuição dessa afinidade.

Em volta destes esquemas podem agrupar-se os mais variados tipos. Devemos ainda notar que, invadidas cronologicamente as células nervosas duma maneira muito diversa pelo processo cadavérico, que se inicia consequentemente em períodos diferentes, depois da morte do animal, no mesmo corte teremos sempre células em fases diversas do processo regressivo. Uma ainda estão no início das alterações e já outras vão numa avançada desagregação.

É ainda interessante comparar estes resultados com os obtidos por NEPPI, BARBACCI e CAMPACCI e CARLOS FRANÇA, os histologistas que mais cuidadosamente versaram este assunto.

NEPPI¹, estudando exclusivamente as células dos cornos anteriores da medula de cão pela coloração dupla com a eosina e a tionina, ou só com a tionina em soluto saturado, depois de 24 horas de fixação no sublimado, notou que o núcleo era o primeiro componente da célula que se mostrava alterado. 24 horas depois da morte a alteração consistia apenas numa ligeira cor azulada. Às 48 horas constatou a excentração do núcleo. Às 72 horas o núcleo aparece retraído. 96 horas depois da morte a auréola clara perinuclear, que aparecia desde as primeiras horas depois da morte, é muito aumentada, os contornos do núcleo tornam-se imperceptíveis, o nucléolo vacuoliza-se.

Nestas investigações aparece apenas, como facto por mim não referido, a existência de auréolas perinucleares, até certo ponto explicável pela diferença das técnicas empregadas. De resto a marcha do processo regressivo é fundamentalmente a mesma.

BARBACCI e CAMPACCI², empregando a mesma técnica de NEPPI e

¹ NEPPI, *loc. cit.*

² BARBACCI e CAMPACCI, *loc. cit.*

colocando a medula a uma temperatura constante de 22°, descreveu, como primeiro fenómeno cadavérico, uma certa indecisão do contôrno nuclear ou um estado idrópico do núcleo, que precede o estado atrófico, manifestando-se por aumento de volume, invisibilidade do retículo cromático, que é substituído por grumos granulosos. No período atrófico o contôrno é irregular e franjado; a massa nuclear corada homogéneamente contém pontuações tão coradas como o nucléolo. Em certos casos aparecem no núcleo esférulas de aspecto ialino, que pelo seu número podem enchê-lo quási completamente.

Esta disposição reproduz precisamente as minhas figuras 36 e 38, cujas esférulas deixei ficar sem explicação, que, aliás, BARBACCI E CAMPACCI também não dão.

Como lesões mais freqüentes do nucléolo estes autores citam a excentração, deformação, desagregação e perda de afinidade corante.

CARLOS FRANÇA¹ utilizou a cobaia, cuja medula era conservada a 0°-4°.

Fazia a fixação com o álcool e empregava o azul policrómico e a tionina. Refere que 2 horas *post mortem* o núcleo se desloca para a periferia e contém um nucléolo caracterizado por uma certa ipercromia. Depois segue-se a sua deformação e o destacamento de pequenos fragmentos de massa nucleolar que se espalham pelo núcleo o que o torna pulverulento. No fim de 20 horas os núcleos coram-se uniformemente de azul.

Nestas investigações existem detalhes que não se coadunam com o resultado das minhas investigações. Fundamentalmente o processo é o mesmo. Qualquer crítica seria injustificada porquanto só são comparáveis os resultados obtidos com o mesmo processo técnico e nas mesmas condições de experimentação.

Referindo estes trabalhos, pretendo apresentar novas variantes dum mesmo processo, que tão detalhadamente precisa de ser estudado para evitar graves erros interpretativos.

2.º RAMIFICAÇÕES E ARBORIZAÇÕES TERMINAIS DAS COLATERAIS DA SUBSTÂNCIA BRANCA, COLATERAIS INICIAIS DOS PROLONGAMENTOS CELULARES

Observando uma preparação microscópica da substância cinzenta da medula, tratada por qualquer dos processos de impregnação de-

¹ CARLOS FRANÇA, *Contribuição para o estudo das alterações cadavéricas das células radiculares da medula espinhal*, 1.ª com., *Lesões do protoplasma*. Arch. de Med., 1898, pag. 1.

rivados do método fotográfico de L. SIMARRO¹, surpreende o número infinito de filamentos que atravessam o campo da objectiva em todas as direcções. ¿O que são estes filamentos, donde veem e para onde vão? É a pergunta que formulará qualquer observador inexperiente na histologia do sistema nervoso.

Todos estes filamentos de desigual volume são prolongamentos das células nervosas, uns dendríticos, outros fibras amielínicas, cilindros eixos nus e as suas ramificações. Encontram-se nessa pseudo rede: cilindros eixos que das células motrizes se dirigem para as raízes anteriores (DEITERS, MEYNERT, RANVIER, etc.), colaterais iniciais destes prolongamentos (GOLGI, CAJAL), direitos ou recorrentes (LENHOSSEK); bifurcações e colaterais dos cilindros eixos que formam as raízes posteriores; cilindros eixos que das células do núcleo comissural (LENHOSSEK) se dirigem para o cordão anterior do lado oposto; cilindros eixos das células comissurais posteriores (CAJAL, VALENZA); cilindros eixos das células funiculares directas; cilindros eixos que das células de substância cinzenta se dirigem para os cordões; fibrilhas colaterais que das fibras dos cordões se lançam nos cornos anterior e posterior; prolongamentos protoplásmicos de todas as células nervosas da substância cinzenta e suas múltiplas ramificações; tubos terminais dos cilindros eixos das células do encéfalo; ramificações das células de GOLGI, tipo II.

Mas para que sejam visíveis todos os elementos deste emaranhado plexo, necessário é que se escolham medulas não demasiadamente alteradas cadavéricamente.

¿Quais são as alterações e qual a ordem cronológica da desintegração cadavérica?

Procurei estudá-las no cão e no coelho.

Na análise das preparações feitas foram rejeitadas sistematicamente todas aquelas em que a impregnação se não podia considerar boa, e em cada preparação escolhida a zona optima de impregnação.

A primeira serie de pesquisas diz respeito á medula de coelho. Analisando cortes de fragmentos, fixados cada vez mais tarde depois da morte, observamos detalhes interessantes.

1.^a serie — Conservação dos fragmentos numa atmosfera húmida e fénicada.

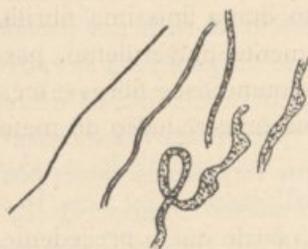
1/2 hora — Cortes da medula dorsal.

Na substância intercelular da substância cinzenta todas as fibras ficam admiravelmente impregnadas, umas duma delicadeza extrema,

¹ L. SIMARRO, *Nuevo método histológico de impregnación por las sales fotográficas de plata*. Rev. trim. microg., tom. v, 1900.

as colaterais, outras mais volumosas, os cilindros eixos e os dendritos. A impregnação é muito uniforme ao longo das fibras que se vêem sensivelmente rectilíneas em longos trajetos. O fundo da preparação, entrevisto pelas malhas deste falso retículo, é dum amarelo dourado, não homogéneo; se empregarmos um foco de luz artificial, iluminando o campo microscópico, vemos partes em que é finamente granuloso,

mas conservando sempre a côr geral do fundo, desigual e de distribuição indefinível.



61

Este aspecto deve ser devido à acção da prata coloidal sobre o protoplasma das células nevróglia e os seus prolongamentos.

1 ¹/₄, 3 horas. Em cortes da medula dorsal o aspecto em nada difere do já descripto.

24 ¹/₂ horas — Cortes da medula dorsal.

Ao focar uma preparação destas desde logo se nota, mesmo com uma fraca ampliação, que existe alguma cousa que rouba a identidade com as preparações analisadas anteriormente. A causa da diferença reside na substância intercelular. Os cilindros eixos nus não tem aquela nitidez de contôrno que os destacava tão vigorosamente no fundo, nem este tem a côr primitiva sensivelmente homogénea.

As fibras engrossaram desigualmente; não são já representadas por traços negros mas por estreitas fitas limitando um espaço mais claro (fig. 61). Tornaram-se muito sinuosas, donde resulta que é difficil segui-las em longos trajectos no campo do microscópio; a secção apanhando ansas diferentes dividiu-as em troços. A impregnação nas fibras amielínicas menos alteradas é desigual. Ainda se encontram algumas em que nada se opõe a que as consideremos normais.

O fundo é muito desigual em coloração. Além disso, não é finamente granuloso, mas antes grumoso, tão numerosas são as massas informes que nele se encontram, formando grumos de volume variável.

47 horas — Cortes da medula cervical.

As alterações que acima descrevemos generalizaram-se e só muito raramente se encontram fibras que não sejam alteradas.

51 horas — Cortes do engrossamento cervical.

No interior das delgadas fitas em que se transformaram os cilindros eixos nus, vêem-se pequeninas pontuações umas escuras, outras claras, as primeiras muito mais escuras que a linha limite, que se mostra muito pálida.

69 horas — Cortes da medula dorsal.

É notável a redução do número de fibras amielínicas que se observam impregnadas. Empregando uma luz mais forte, depressa se reconhecem algumas mal impregnadas e mais facilmente reconhecíveis como fitas de pontuações pulverulentas do que como filamentos. Naquelas em que a impregnação é regular e em que casualmente há no interior das fibras alteradas uma alternância de pontos escuros e espaços claros, o cilindro eixo nu toma o aspecto duma finíssima fibrilha muscular. O fundo de preparação é fracamente pulverulento, para o que certamente concorrerá a destruição de numerosas fibras e o espalhamento da sua substância, que determina uma redução do metal sob a forma de finíssimas partículas.

72 horas — Cortes da medula cervical.

Embora este fragmento fosse fixado mais tarde que o precedente, as modificações são menos intensas. É porém valiosa a sua análise, porque entre os cilindros eixos nus, dilatados, flexuosos, de contornos pouco precisos, encontra-se uma alteração intermédia entre estas lesões e a desapareição das fibras por pulverização. Essa alteração consiste na formação de pequeninos vacúolos ao longo das fibras, vacúolos que levantam a superfície e, sendo muito numerosos, lhes dão um aspecto moniliforme.

95 horas — Cortes da medula lombar.

As alterações são idênticas às constatadas nos fragmentos fixados 69 horas depois da morte.

119 horas — Cortes do engrossamento lombar.

Todas as preparações se mostram cobertas duma poeira finíssima. As fibras amielínicas são em número muito reduzido, umas como pálidas sombras, outras mais nítidas, mas mesmo estas completamente cobertas dessa finíssima poeira. Estas pontuações encontram-se em todas as camadas abrangidas pelo corte.

Este mesmo aspecto, diferindo apenas na desapareição destas últimas fibras, se observa em cortes da medula lombar, dorsal, cervical, engrossamento lombar, feitos em fragmentos fixados 121, 124, 143, 145, 148, 167, 169, 172 e 193 horas depois da morte do animal.

Portanto poderemos desde já concluir que as ramificações e arborizações terminais das colaterais da substância branca e as colaterais iniciais da substância cinzenta rapidamente patenteiam alterações de desintegração cadavérica.

Podem começar 24 horas depois da morte nas condições experimentais ensaiadas. As lesões consistem em perda de nitidez dos contornos, engrossamento desigual, vacuolização e pulverização intrafibrilar, precedendo a fragmentação.

2.^a serie — Medula de cão.

Fragmentos retirados da medula, colhida sem cuidados antisépticos, e colocada em secador fenicado à temperatura do laboratório (14°-16°).

2 horas — Medula dorsal.

O inextricável falso reticulo que enche os espaços intercelulares em nada difere do obtido na medula do coelho $\frac{1}{2}$ hora *post mortem*. Observa-se a mesma delicadeza das colaterais, como traços finíssimos percorrendo toda a preparação, os mesmos cordões volumosos, no interior dos quais se distingue a armação fibrilar, a mesma uniformidade de coloração do fundo.

Êste aspeto mantem-se nos cortes dos blocos fixados 4, 8, 10 horas depois da morte e cortados na porção cervical da medula.

20 horas $\frac{3}{4}$. — Medula cervical.

Excepcionalmente aparecem algumas fibras desigualmente engrossadas e de conteúdo pulverizado nas dilatações empolares.

49 horas — Medula dorsal.

O engrossamento é mais freqüente, aparecendo numerosas fibras em que o duplo contôrno é muito nítido.

53 horas — Medula dorsal.

Além de dilatadas aqui e além, as fibras são em geral muito flexuosas, descrevendo caprichosas ondulações em curto trajecto, o que é bem apreciável em muitas delas. A maioria das alteradas são divididas em fragmentos de variadas dimensões, o que pode ser atribuído à divisão pelo corte das tortuosidades, deixando ansas livres.

Êste mesmo aspecto é observável nas porções cervical, dorsal e lombar em cortes de blocos fixados 70, 74 $\frac{1}{2}$, 76, 80 $\frac{1}{4}$, 82 horas depois da morte do animal.

84 horas — Medula lombar.

As colaterais finas são difficilmente perceptíveis; nas preparações avultam bem impregnadas unicamente as colaterais mais volumosas. As primeiras reduziram-se a uma finíssima poeira que concorre para a falta de uniformidade do fundo das preparações.

As fibras não são unicamente engrossadas, apresentam no seu trajecto dilatações fusiformes e flexuosas, são moniliformes; as empôlas são pequenas e apreciáveis nos numerosos troços em que a secção dividiu as fibras. E de notar que estas alterações não apparecem uniformemente espalhados nos cortes; existem zonas em que as alterações abundam e outras em que são raras.

119 horas — Medula cervical.

As mesmas lesões anteriormente descritas, assim como nas observações feitas 124, 142, 148, 167 e 172 horas depois da morte.

Esta serie vem mais uma vez demonstrar que a secção da medula é um meio optimo de retardar as lesões cadavéricas, pois que em períodos iguais as lesões não atingiram nesta serie o último termo regressivo da serie anterior.

3.^a serie — Medula de coelho.

Depois de extraída asepticamente, foi dividida em pequenos fragmentos, colocados em seguida em tubos de ensaio esterilizados, sobre algodão húmido igualmente esterilizado, e fechados ao maçarico. Todos os tubos foram mantidos a uma temperatura oscilando entre 37° e 39°.

28 horas — Medula dorsal.

As mais finas colaterais são pouco nítidas, muito fracamente impregnadas mesmo na zona óptima. Quasi todas as fibras são flexuosas e não descrevem longos precursos no campo microscópico. Em alguns pontos existem massiços de grânulos poeirentos, por vezes dispostos em filas estreitas.

48 horas — Medula cervical.

Do complicado reticulo da substância cinzenta intercelular apenas restam pequenos fragmentos, de duplo contôrno, desigualmente impregnados na sua espessura. Todo o fundo da preparação é ocupado por uma poeira de grânulos muito desiguais em volume e em forma, produzidos certamente pela desagregação das fibras e da nevrógia, da qual seria fase preliminar a formação dos depósitos pulverulentos, citados na observação precedente.

74 horas — Medula dorsal.

Da substância cinzenta intercelular apenas se impregnam pequeninos troços fibrilares. As fibras na sua maioria desapareceram das preparações. Vêem-se apenas volumosas massas amarelas, em todos os tons, polvilhadas de finíssimas granulações pulverulentas, detritos do reticulo fibrilar.

77 horas — Medula lombar.

Já são muito raras as fibras impregnadas embora fragmentadas; mesmo nos cortes muito finos, em que as massas amarelas são muito transparentes, não se distinguem fragmentos fibrilares, no meio do amontoamento de granulações que constituem essas massas.

120 1/2 horas — Medula cervical.

Nestes cortes as lesões são muito menos avançadas, por causas de difficil explicação. Assim o reticulo é muito abundante e de regular impregnação. Comtudo algumas fibras que a uma pequena ampliação parecem normaes, observadas com um mais forte sistema óptico, apparecem dilatadas e cheias de fina poeira.

Parece que, segundo as indicações das series anteriores, se dispu-

zêssemos os blocos medulares pela ordem crescente das lesões, este bloco devia anteceder o precedentemente descrito.

154 horas — Medula dorsal.

Mesmo aspecto da medula lombar fixada 77 horas depois da morte.

167 horas — Medula lombar.

Em toda a zona da optima impregnação não há, em numerosas preparações um único filamento reticular impregnado, mas unicamente massiços de grânulos finíssimos, dispostos sem ordem.

171 horas (engrossamento cervical). 192 horas (medula dorsal).
196 horas (medula cervical). 215 horas (medula lombar).

As alterações regressivas cadavéricas, tendo atingido o seu máximo, em nada se modificaram. O reticulo deixou de existir e como produtos últimos encontram-se as massas de detritos poeirentos, que como tal se apresentam a uma grande ampliação, embora pareçam homogêneos com um sistema fraco.

O processo autolítico à temperatura 37°-39° apresenta-se morfológicamente sob o mesmo aspecto geral e passa pelas mesmas fases do processo regressivo séptico, embora os períodos de produção de lesões não sejam precisamente iguais.

4.^a série — Medula de cão.

Fragmentos colhidos asepticamente, colocados em tubos esterilizados, contendo azeite esterilizado e igualmente mantidos a 37°.

5 1/2 horas — Medula cervical.

Ao contrário das preparações feitas imediatamente depois da morte, em que a falsa rede intercelular se impregna com toda a nitidez, mostrando os seus filamentos contínuos, mais ou menos rectilíneos, mas sempre de longo percurso nas preparações de 10 a 15 μ de espessura, nestas a substância intercelular é fragmentada e os troços são engrossados em vários pontos e flexuosos; ao nível dos engrossamentos o conteúdo dos filamentos é poeirento.

35 horas — Medula lombar.

O que até aqui era excepção torna-se regra nestes cortes; o engrossamento observa-se em quasi todas as fibras, a má impregnação em muitas, a pulverização em poucas.

37 1/2 horas — Medula cervical.

Os cortes deste bloco, imediatamente vizinho do observado 5 1/2 horas depois da morte, mostra uma intensa desorganização da substância cinzenta. A maioria das fibras reduziu-se a fragmentos de formas muito variadas e descrevendo curvas diversas; naqueles em que o corte seccionou uma varicosidade, das muitíssimas que se observam, a extremidade assemelha-se a uma massa. Entre estes

fragmentos encontram-se ainda algumas fibras que se podem seguir dum extremo ao outro do campo, mas excepcionalmente. Massas amarelas ocupam quasi todo o espaço intermediário às células.

61 horas — Medula lombar.

O aspecto é sensivelmente o mesmo, à parte maior predominância de lesões num ou noutro ponto das preparações.

66 1/2 horas — Medula cervical.

A desorganização é completa. É difícil distinguir os limites da substância cinzenta, de tal modo se confundem os detritos das duas substâncias e se perderam os caracteres distintivos. As massas amarelas irregulares invadiram todas as preparações.

83 horas — Medula lombar.

Neste fragmento, em que as alterações regressivas são menos intensas que no anterior, é fácil observar uma outra fase regressiva não constatada e que estabelece uma forma de transição. É a existência de detritos muito pequenos, de forma alongada, assemelhando-se a bacilos, mas diferindo deles pela grossura e variabilidade de dimensões. Parecem ser o resultado da completa fragmentação das fibrilhas.

89 horas — Medula dorsal.

A fragmentação é ainda mais completa, os detritos de menor volume, mal impregnados; a sua observação e estudo exigem o emprêgo duma forte iluminação.

Conglomerando os resultados obtidos nestas series de investigações, em que foram postas em prática condições experimentaes tão diversas, quer relativas à intervenção microbiana, quer à temperatura, quer ainda ao grau de unidade do meio, tanto no coelho, como no cão, não podemos deixar de concluir que, quaisquer que sejam essas condições, qualquer que seja o animal em experiência, as lesões regressivas são as mesmas e consistem em: engrossamento empoliforme das fibras; aparecimento de grandes sinuosidades no seu trajecto; divisão em fragmentos, precedida ou acompanhada de redução da substância fibrilar a uma fina poeira, formação do duplo contôrno, como as paredes dum tubo; rutura dêste contôrno com dispersão dos detritos. Num ou noutro caso podem existir variantes de processo fundamental, tais como a vacuolização fina ao nível das dilatações moniliformes e a fragmentação sem aparecimento de pulverização do conteúdo das fibras.

Na literatura histológica apenas conhecemos o trabalho de LACHE¹ que se refere às alterações *post mortem* do plexo intercelular.

¹ JON. G. LACHE, *Alterations cadavériques des neurofibrilles*, Rev. neurol., XIV an., 15 mars, 1906.

Segundo este experimentador, as finas neurofibrilhas alteram-se por desintegração granular, as mais volumosas, isto é, os cilindros eixos ou grossas colaterais destes, por descolorações e fragmentações. Perdem a propriedade de reter a prata e fragmentam-se quer por adelgaçamento, quer por quebradura mantendo a grossura.

Nas minhas investigações, cujos resultados se identificam com estes, foi a fragmentação por quebradura que observei como sendo o fenómeno constante, não tendo tido ocasião de observar o adelgaçamento prévio, que, aliás, pode ser uma ilusão. Desde que a fibra engrosse em alguns pontos, o que é indiscutível, pois que se encontram lado a lado fibras engrossadas e intactas facilitando a comparação, no espaço intermediário parecerá adelgaçada por contraste.

Mas mesmo neste caso a fragmentação não é constante a este nível, pois, repito, pode a secção coincidir com o engrossamento ou dilatação empoliforme, dividindo-a em duas porções e dando lugar a dois fragmentos mais ou menos compridos, terminados em massa volumosa.

LACHE não faz qualquer referência à disposição flexuosa das fibras fenómeno constante e um dos primeiros observados. Esta diferença de observações só é explicável pela desigualdade de condições de experimentação e observação.

3.º CÉLULAS NEVRÓGLICAS

Os métodos de coloração, que empreguei, são insuficientes para dar quaisquer esclarecimentos acêrca do processo de desintegração cadavérica do protoplasma e das fibras ialinas que constituem uma tão importante porção das células aranhosas que se interpõem às células nervosas da substância cinzenta. Este ponto constitue o objecto das minhas actuais investigações, cujos resultados serão oportunamente publicados.

Por agora limitar-me hei ao relato do que observei relativamente ao núcleo destas células. Neste estudo não estabeleci distincção alguma entre as células nevrógllicas de expansões curtas de CAJAL ou *kurzstrahler de kölliker*, que ocupam quási exclusivamente os espaços interneuronais da substância cinzenta, e os elementos de longos raios ou células fibrilares de ANDRIEZEN, que em número reduzido se encontram nos limites desta substância.

As investigações foram feitas pela aplicação dos processos técnicos, já citados, a fragmentos medulares do cão, cadaverizados numa atmosfera húmida, ligeiramente fenolizada, numa atmosfera secativa, ou au-

tolizados num meio húmido aséptico ou em azeite estéril, estes a uma temperatura de 37°-39° centígrados.

Atmosfera húmida e fenolizada. Método de NISSL.

$\frac{1}{2}$ hora *post mortem*.

O retículo cromático distingue-se com a maior nitidez assim como as granulações cromáticas nodais. Existe, porém, uma certa diferença entre as granulações periféricas e as centrais, as primeiras mais nítidas, de contornos melhor delimitados que as segundas, umas e outras resistindo muito à acção descorante dos reagentes.



62

Segundo a abundância e o volume das granulações cromáticas, é possível num corte estabelecer dois grupos de núcleos nevróglícos. Em um os núcleos são volumosos, as granulações numerosíssimas, de dimensões próximamente iguais e finíssimas; dificilmente se podem distinguir uma ou duas mais volumosas. Outro grupo abrange núcleos de menores dimensões, contendo pequeno número de granulações e estas mais volumosas. Estes dois grupos, segundo as ideias de numerosos histologistas, representariam núcleos seccionados, uns segundo um plano meridiano, outros segundo um plano mais ou menos afastado do centro e contendo êste tanto maior número de granulações volumosas quanto mais se aproximar do plano tangente. É possível distinguir, rodeando alguns dêstes núcleos, pequenas sombras azuladas representativas do protoplasma nevróglíco.

2 $\frac{1}{4}$ horas *p. m.*

O núcleo de muitas células nevróglícas tende a uniformizar-se pela desapareição do retículo cromático e das granulações mais finas, restando apenas uma ou duas mais volumosas que aparecem com o aspecto de nucléolos.

4 $\frac{1}{2}$ horas *p. m.*

As granulações mais volumosas mantem todo o seu brilho só comparável com o do nucléolo da célula nervosa, quando já em muitas destas o núcleo começa a perder as suas afinidades corantes.

11 $\frac{3}{4}$ horas *p. m.*

Aparece deformação nuclear, embora as granulações de maiores dimensões mantenham a sua cromia intensa.

18 $\frac{3}{4}$ horas *p. m.*

São em maior número os núcleos nevróglícos deformados (fig. 62).

48 horas *p. m.*

Não aparecem novas alterações.

É digno de registo que são ainda numerosos os núcleos nevróglícos intactos.

96 horas *p. m.*

Os núcleos nevróglícos coram-se com tal intensidade que a hiper-cromia é evidente e se torna ainda mais frisante pelo facto de o citoplasma e o nucleoplasma neuronal se corarem muito pouco e uniforme-



63

64

mente. As granulações acumulam-se tão periféricamente que muitas parecem exteriores à membrana (fig. 63). Os contornos irregularizam-se;

o nucleoplasma parece finamente poirento e os vacúolos são frequentes (fig. 64).

Alguns núcleos aparecem muito pálidos, ao lado daqueles em que existe hiper-cromia.

Hematoxilina — Fórmulas de HEIDENHAIN e de BOEHMER.

Em toda a serie de preparações feita com estes dois processos observa-se mais uma vez a impossibilidade de numa mesma preparação obter boas colorações dos núcleos nervosos e nevróglícos.

Não se pode obter uma boa tinção dos primeiros sem que os segundos fiquem demasiadamente corados. Pelo contrário para que os detalhes nucleares nevróglícos sejam visíveis, os núcleos neuronais ficam quasi inteiramente descorados.

O retículo cromático, nas primeiras 18 horas depois da morte, não se distingue com a nitidez que se observava pelo emprêgo do método de Nissl. As alterações que aí se passam tornam-se de impossível observação.

18 horas *p. m.*

Começam a aparecer núcleos deformados, e especialmente alguns em que a membrana parece pregueada.

21 $\frac{1}{2}$ horas *p. m.*

Aparecem pequenos vacúolos.

45 horas *p. m.*

Como lesão dominante, constata-se a deformação, mas até agora sem modificação de afinidade corante das granulações.

4 dias *p. m.*

Todos os núcleos nevróglícos são intensa e uniformemente corados, mas sem revelarem qualquer detalhe estrutural. São os únicos elementos que aparecem ainda corados, pois que a essa data as células nervosas estão inteiramente desagregadas, chegando a ser muito difícil indicar a sua situação.

Dupla coloração hematoxilina de BOEHMER-eosina.

$\frac{1}{4}$ hora *p. m.*

Núcleos neyróglícos demasiadamente corados, a ponto de não deixarem ver os seus detalhes. Células nervosas pouco coradas.

4 horas *p. m.*

As granulações nodais deixaram de se corar. Pequenos vacúolos claros.

71 horas *p. m.*

Intensa e muito generalizada deformação.

4 dias *p. m.*

Intensa vacuolização.

Hemato-picro-fucsina ácida de VAN GIESON.

9 $\frac{1}{2}$ horas *p. m.*

As primeiras alterações interessantes apenas aparecem decorrido êste período depois da morte. A grande maioria dos núcleos mostra uma fina vacuolização, podendo ser estes vacúolos centrais ou periféricos ou mesmo formar saliência sob a membrana nuclear (fig. 65).

4 dias *p. m.*

Uns núcleos são completamente invadidos por vacúolos, outros inteiramente homogêneos, todos muito pouco corados.

Meio secador.

Violeta anilinado de EHRLICH.

4 horas *p. m.*

Um ou outro núcleo deformado e de reduzido volume.

20, 49 horas *p. m.*

Constatáveis apenas a deformação e a diminuição do volume nuclear.

71 $\frac{1}{2}$ horas *p. m.*

Coloração uniforme.

82 horas *p. m.*

Vacuolização em pequena escala.

98 horas *p. m.*

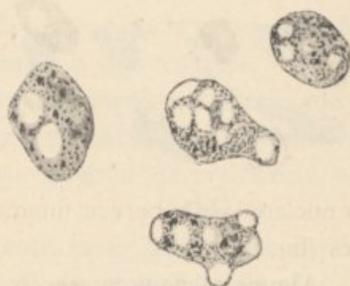
Os vacúolos são coalescentes e pela sua reunião formam alguns de um grande volume.

167 horas *p. m.*

Fragmentação nuclear.

Meio húmido aseptico.

Método de NISSL — Medula de coelho.



65

28 horas *p. m.*

Os núcleos aparecem corados de azul muito pálido, difíceis de distinguir e contendo uma única granulação.

95 horas *p. m.*

Núcleos diminuídos de volume e sem mostrarem qualquer detalhe nuclear.

148 horas *p. m.*

Junto dos núcleos nevróglícos, de contornos irregulares, vacuolizados, encontramos pequenas granulações de coloração inteiramente igual à do núcleo (fig. 66). Outros são adêrentes à membrana nuclear, factos estes que traduzem a desagregação.



66

152 horas *p. m.*

Todos os núcleos são uniformemente corados, espiculados, vacuolizados e alguns inteiramente fragmentados.

182 horas *p. m.*

As lesões citadas tem-se difundido pouco a pouco, de modo que, passado êste intervalo depois da morte, é interessante o aspecto das preparações. Mesmo a uma fraca ampliação a coloração geral é azul pálida, cheia de pequenas esférulas de um azul muito intenso, que são os detritos nucleares ou núcleos deformados e extremamente reduzidos de volume. Para êste aspecto as células nervosas em nada concorrem.

204 horas *p. m.*

Mantêm-se inalteravelmente o aspecto referido.

Azeite esterilizado.

Violeta de genciana — Medula de cão.

4 horas *p. m.*

Alguns dos núcleos nevróglícos que rodeiam as células nervosas parecem metidos em depressões do seu citoplasmá.

8 horas *p. m.*

Coloração difusa.

40 horas *p. m.*

Núcleos deformados, muriformes, de granulações hiperocrómicas.

63 horas *p. m.*

Hiperchromia nevróglíca coincidindo com hipocromia neuronal.

Processo de HELD.

2 horas *p. m.*

As granulações dos núcleos nevróglícos coram-se em azul brilhante.

26 horas *p. m.*

Esta coloração mantêm-se, embora pareça mais pálida a coloração, menos nítidas as granulações, excepto uma mais volumosa que mantêm a côr primitivamente observada.

45 horas *p. m.*

Núcleos de volume muito reduzido, de coloração quási uniforme.

74 $\frac{1}{2}$ horas *p. m.*

A coloração é uniformemente rosada exceptuando a granulação mais volumosa, o falso nucléolo que mantêm a sua côr azul.

Estas poucas observações que, pelas razões expostas, dizem unicamente respeito ao núcleo nevróglíco, são apesar disso em número suficiente para nos elucidar relativamente ao grau de resistência ao processo cadavérico ou autolítico.

A regressão cadavérica é sensivelmente mais rápida nos meios septicos, mas esta diferença está longe de se aproximar da que se poderia esperar.

A resistência é maior que a do núcleo das células nervosas e mesmo do nucléolo. A identidade pode ser estabelecida muitos dias, pelo menos quatro, depois da morte. As alterações regressivas reduzem-se a: perda de nitidez do retículo cromático e das mais finas granulações nodais, deformação, redução de volume, redução do número de granulações com hipercromia das mais volumosas e tendência destas para colarem-se à membrana nuclear, uniformização de coloração, modificação das afinidades corantes, vacuolização e espiculação, estado muriforme e emissão de glóbulos de substância nuclear, perda de afinidade corante, fragmentação.

4.^o CÉLULAS EPENDIMARES

A desintegração cadavérica destas células é duma relativa simplicidade é em muitos pontos análoga à das células nevróglícas, especialmente no que diz respeito ao núcleo, aquela que por agora mais prendeu a minha atenção.

Nas primeiras horas que seguem a morte, e principalmente em condições asépticas, a continuidade do revestimento do canal endimar mantem-se e concomitantemente as alterações são insignificantes e quanto muito reduz-se à perda de nitidez do retículo nuclear e à conglomeração de várias granulações (até 24 $\frac{1}{4}$ horas *p. m.*). A partir de então, e especialmente no meio húmido fenicado, a continuidade rompe-se, aparecem muitas células na luz do canal e outras estão ainda contíguas à parede, mas dissociadas. Com esta separação coincide a desapareção das mais finas granulações, a coloração muito ligeira da

substância nuclear em azul muito pálido, pelo método de NISSL, a deformação.

49 horas *p. m.* não se vê em algumas mais que duas ou três granações mais volumosas. O protoplasma que a princípio se podia distinguir, ainda que muito mal, sem que da observação se pudessem tirar quaisquer elementos de valor, torna-se quasi invisível.

A fase final consiste na perda de afinidade corante. A marcha dêste avanço progressivo para a destruição final é paralela à marcha dos núcleos nevróglícos. No último período muito difícil é dizer se se está observando um núcleo nevróglíco, se um núcleo endimar.

5.º VASOS SANGUÍNEOS

O estudo da cadaverização dos vasos sanguíneos medulares constitue apenas um insignificante capítulo do estudo das alterações cadavéricas dos vasos sanguíneos em geral.

Para então reservarei as constatações feitas, limitando-me por agora a singelas notas.

Qualquer que seja o processo de conservação dos fragmentos, os vasos conservam os seus caracteres histológicos com ligeiras modificações, durante muito mais tempo que qualquer dos elementos componentes da medula, até aqui estudados.

Nas fases avançadas da cadaverização (169 horas *p. m.*) podemos assistir a uma verdadeira dissecação vascular. Todos os tecidos circumvizinhos se fragmentam, se destroem e perdem as suas afinidades corantes. Os vasos completamente desembaraçados dos tecidos ambientes, que pela sua coloração ocultavam os seus detalhes, aparecem depois com a maior nitidez, destacando-se todas as suas ramificações, formando caprichosos traçados, especialmente se o corte não for demasiadamente fino.

Se o vaso estava no momento da morte cheio de sangue, êste mantêm-se intacto durante muito tempo (77, 90 horas). Os glóbulos vermelhos empilhados, cujos limites são reconhecíveis, dão aos capilares o aspecto de traqueias de insetos. 169 horas depois da morte o conteúdo dos vasos é um magma em que se não distingue qualquer glóbulo branco, como nas primeiras 40 horas, em que êles se destacavam com uma nitidez admirável. 172 horas depois da morte é frequente observar-se vacuolização dos núcleos das fibras lisas que constituem as paredes vasculares.

CAPÍTULO III

Substância branca

Do estudo das alterações cadavéricas da substância branca poucos factos poderei citar dignos de menção. Uma parte reproduz os já observados na substância cinzenta, especialmente os que dizem respeito às fibras amielínicas, que em feixes mais ou menos volumosos se encontram entre os tubos nervosos mielinizados das medulas do coelho e do cão. O mesmo sucede com as alterações dos vasos e com as dos núcleos das células nevróglícas de longas ramificações, que formam o tecido que enche os espaços intercalares, situados entre os tubos nervosos.

Observando cortes transversais da medula de cão, fixada meia hora depois da morte, e tratados pelo azul de metilena de NISSL ou pela hematoxilina, constata-se um aspecto correspondente à descrição clássica. A substância branca é formada de círculos concêntricos, dos quais os mais externos são contíguos e muitas vezes tangentes entre si. Estes círculos não têm uma regularidade geométrica, como também a não possui a sua centração. Estas linhas que representam camadas de mielina são em número variável, compreendido entre dois e cinco. No meio encontra-se o corte sensivelmente circular do axónio, muitas vezes encostado ao círculo mais interno; portanto a bainha de MAUTHNER apresenta uma espessura muito desigual. Nos espaços intercalares encontram-se: numerosas pontuações de volume variável, representando secções de cilindros eixos amielínicos tanto mais numerosas quanto mais vizinha é da substância cinzenta a região examinada; núcleos nevróglícos muito numerosos, mostrando com uma grande nitidez o retículo e as granulações.

Se conservarmos os fragmentos num meio húmido e fenicado e fizermos a fixação $2\frac{1}{4}$ horas depois da morte, notaremos desde logo que a invasão bacteriana é intensa na zona mais externa da substância branca e que nesta existem grandes lacunas, se mostram rotos alguns dos círculos periaxónicos.

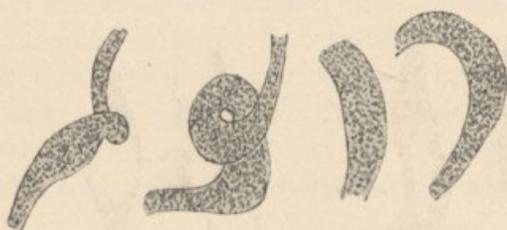
$4\frac{1}{2}$ horas *p. m.* Na zona invadida pelas bactérias os núcleos nevróglícos perdem a nitidez dos seus contornos. As granulações reduzem-se a uma ou duas mais volumosas. A substância branca toma uma cor quasi uniforme.

$5\frac{1}{4}$ horas *p. m.* Aparecem nas preparações pequenas massas de contorno irregular que, nas preparações coradas pelo método de NISSL, se coram, não em azul, mas em violeta mais ou menos pálido. Na zona periférica não se encontram já células nevróglícas; nas zonas

centrais encontram-se núcleos nevróglícos irregulares. Em grandes vacúolos notam-se grupos de grumos irregulares.

9 ³/₄ horas *p. m.* A substância branca fixa muito mais enérgicamente as côres que a cinzenta e descora-se com muito maior dificuldade.

72 horas *p. m.* Já pela simples inspecção à vista desarmada se



67

reconhece que a substância cinzenta é completamente incolor e que a substância branca é muito corada. Microscópicamente justifica-se êste aspecto pela composição da substância branca, reduzida a detritos fortemente cromófilos,

no meio dos quais se encontram alguns núcleos nevróglícos alterados.

11 ³/₄ horas *p. m.* É mais considerável o número de fragmentos informes, de retalhos corados em violeta ou azul pálido. A disposição da substância branca em nada se assemelha à disposição normal. Os núcleos nevróglícos são raros e mesmo nestes a coloração é uniforme e sem granulações.

Em fragmentos colocados no secador a redução a fragmentos, com perda completa do aspeto normal, só se observa naqueles cuja fixação se realizou 98 horas depois da morte.

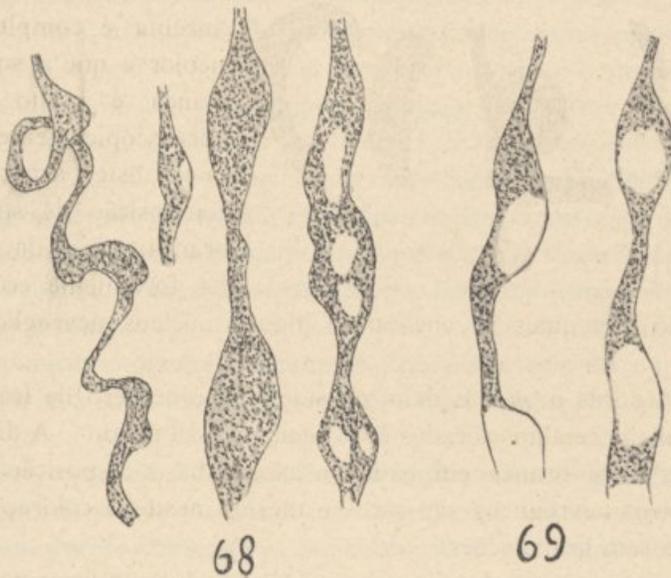
Fazendo a extracção da medula com todos os cuidados asepticos e mantendo os fragmentos em meio húmido esterilizado, a completa fragmentação só é constatável nos fragmentos fixados 182 horas *post mortem*, seguindo o processo regressivo a marcha já acima referida. No decorrer dêste processo são extremamente interessantes as alterações que se observam nas fibras mielinicas, estudadas em cortes longitudinais (figs. 67, 68, 69) e tratadas pelo processo de CAJAL.

As fibras nervosas apresentam enormes dilatações e estrangulamentos apertados, simulando fusos colocados tópo a tópo. Estas dilatações empolares estão cheias de pontuações formando massiços mais ou menos volumosos, separados por vacúolos. Numa mesma preparação é possível estudar todas as fases desde a fibra simplesmente alargada até a estas varicosidades. Por vezes nas dilatações empolares encontram-se espaços cheios de granulações reduzidos a uma finíssima poeira, muito mais fina que a das granulações que enchem a fibra.

Parece, portanto, que a substância branca submetida à cadaveri-

zação apresenta, como alterações próprias, a desapareção dos círculos concêntricos, a redução do axônio e das camadas de mielina a detritos fortemente cromófilos e a dilatação empoliforme das fibras com redução do seu conteúdo a fragmentos.

Por outro lado os núcleos neutróglícos, as fibras amielínicas, os vasos sofrem as alterações que já referi quando tratei da substância



cinzenta, neste caso mais rapidamente desenvolvidas, pelo mais fácil acesso das colônias bacterianas.

Conclusões

Para o estudo das alterações cadavéricas e mais especialmente autolíticas medulares, empreguei medulas de cães e coelhos sãos, mortos por secção de bolbo e hemorragia consecutiva. A cadaverização era obtida pelo abandono dos fragmentos medulares num espaço fechado, ligeiramente fenicado ou num espaço limitado contendo uma substância absorvente da humidade; a medula era autolizada, colocando fragmentos colhidos asepticamente num meio húmido aséptico ou imergindo-os em azeite esterilizado.

Estes fragmentos, conservados os primeiros à temperatura ordinária do laboratório (14° a 16°) e os segundos a uma temperatura de 37° a 40°, eram fixados no fim de períodos cada vez mais longos depois da morte do animal.

Como substância de inclusão foi adoptada a celoidina, depois de numerosas tentativas mal sucedidas de inclusão na parafina de blocos

muito alterados cadavéricamente, e como reagentes corantes: as hematoxilinas de BOEHMER e de HEIDENHAIN, isoladamente ou combinadas com a eosina ou com a picro-fucsina ácida de VAN GIESON; o método de NISSL, empregando como corante o azul de metilena; o método de HELD, ligeiramente modificado; o processo de impregnação argêntica de S. RAMON CAJAL; o violeta anilinado de EHRLICH.

Do estudo detalhado de numerosíssimas preparações obtive resultados interessantes sob vários pontos de vista, que vou mencionar sucintamente.

SUBSTÂNCIA CINZENTA

1.º Células nervosas.

Feito paralelamente o estudo da desintegração cadavérica dos corpos de NISSL e da substância acromática, reconhece-se que as alterações são muito apressadas pela intervenção microbiana, retardadas pela subtração da água e pela conservação aséptica dos fragmentos; estas duas últimas influências têm sensivelmente o mesmo valor na cronologia da cadaverização, embora a temperatura dos meios seja diferente.

As alterações, á parte ligeiras variantes, são idênticas e reduzem-se a: coloração muito precoce da substância acromática e conseqüente perda de nitidez dos corpos de NISSL, coalescência destes corpos, sua vacuolização ou pulverização, rarefação cromática e perda de eletividade corante, precedendo de perto a fragmentação do corpo celular. A afinidade corante dos corpos de NISSL e da substância acromática modifica-se pouco depois da morte dos animais; a eletividade habitual sucede a indiferença e a esta a acidofilia geral.

Existe um período de cadaverização em que os corpos de NISSL aparecem revelados pela prata coloidal. Esta reacção coincide com a diminuição de afinidade para o azul de metilena e com a diferença em presença deste corante e da eritrosina.

A regressão cadavérica das neurofibrilhas celulares faz-se duma maneira rápida, haja ou não intervenção microbiana. A menor resistência é oferecida pelas fibrilhas que constituem a zona perinuclear, a máxima pertence às fibrilhas dos prolongamentos celulares. O processo consiste em fragmentação e redução a fina poeira.

As granulações citoplásmicas e mais especialmente os grânulos eritrófilos de HELD tornam-se rapidamente invisíveis com as alterações da substância acromática; a sua afinidade para a eritrosina parece ir diminuindo.

Imediatamente depois da morte a afinidade dos núcleos neuronais para os corantes nucleares empregados é muito menor que a dos nú-

cleos nevróglícos. Esta desigualdade atenua-se com o progredir do processo cadavérico. As alterações regressivas nucleares traduzem-se por: retração do núcleo com pregueamento da membrana; rotura das trabéculas da rede de linina e conseqüente formação de massas grumosas; deformação nuclear e nucleolar; deslocamento para a periferia do núcleo na célula e do nucléolo no núcleo; aparecimento de filamentos intranucleares e duma auréola nucleolar; desaparecimento duma parte dos corpos basófilos de LEVI, coincidindo com o augmento das granulações nucleares; rotura da membrana nuclear e emigração do núcleo e do conteúdo nuclear; fragmentação das esferas argentófilas de CAJAL; aspecto muriforme do núcleo, caracterizado pelo aparecimento de esférulas fortemente coradas, applicadas contra a face externa da membrana nuclear; modificação das afinidades tinturiais da membrana nuclear; fragmentação do núcleo precedida de redução a detritos da massa nuclear, directamente ou depois da dissociação esferular do nucléolo.

Os filamentos intranucleolares aparecem em todas as espécies de células nervosas da medula, algum tempo depois da morte, em número que augmenta rápidamente com os progressos da cadaverização; a maior frequência do seu aparecimento observa-se nas células de substância gelatinosa de ROLANDO e nas pequenas somatocrómicas dos cornos anteriores. Observa-se por vezes, dois, três e cinco filamentos no mesmo núcleo, completamente independentes do nucléolo, irregulares, umas vezes grossos, curtos; rectilíneos, outros muito finos e flexuosos. A sua afinidade para os corantes é variável com a natureza do corante e com a fase do processo cadavérico.

Umaz vezes parecem independentes da membrana nuclear, outras prolongam reentrâncias ou unem pontos diferentes da membrana. Estes filamentos são pregas da membrana nuclear. Parecem corresponder á descripção dos bastonetes de RONCORONI feita por vários auctores.

Nas medulas de cães e de coelhos encontram-se células binucleadas e binucleoladas. Com a cadaverização o número de núcleos parece multiplicar-se pela fragmentação do nucléolo primitivo. A marcha de desintegração cadavérica do núcleo (augmento aparente do número de nucléolos) reproduz em sentido inverso o desenvolvimento dos núcleos neuronais na sua progressão para o estado adulto celular (diminuição do número de nucléolos).

A acidofilia central e a basofilia periférica apenas existem nas primeiras horas depois da morte do animal; passado algum tempo todo o nucléolo se torna acidófilo.

O estudo da desintegração do nucléolo leva a admitir, que os cha-

mados corpos refringentes de LACHE são verdadeiros vacúolos identificáveis aos que se encontram pelo método de CAJAL entre as granulações nucleolares, e que para a sua formação interveem as alterações cadavéricas. São estas que igualmente determinam o aparecimento de vários corpúsculos nucleolares e nucleares.

2.º Ramificações e arborizações terminais das colaterais da substância branca, colaterais iniciais dos prolongamentos celulares.

Estes elementos que enchem, juntamente com as células nevróglícas e vasos, os espaços interneuronais da substância cinzenta, apresentam alterações regressivas que consistem em: engrossamento empoliforme das fibras; aparecimento de grandes sinuosidades no seu trajecto; divisão em fragmentos precedida ou acompanhada de redução da substância fibrilar a uma fina poeira; formação do duplo contórno; rotura com dispersão dos detritos. Podem existir com menor frequência a vacuolização fina ao nível das dilatações empoliformes, e a fragmentação sem aparecimento da pulverização do conteúdo das fibras.

3.º Células nevróglícas.

Sómente foram apreciadas as alterações nucleares, reservando-se as alterações protoplásmicas e dos prolongamentos, em via de estudo, para novo relato. A resistência é maior que a do núcleo das células nervosas e mesmo do nucléolo. As alterações são: perda de nitidez do retículo cromático e das mais finas granulações nodais; deformação; redução de volume; redução do número de granulações com hipercromia das mais volumosas; uniformização de coloração, vesiculação e esferulação, estado muriforme e emissão de glóbulos de substância nuclear, perda de afinidade corante electiva, fragmentação.

4.º Células endimares.

As alterações dos núcleos destas células reproduzem as dos núcleos nevróglícos duma maneira sensivelmente igual. São constantes a perda de nitidez do retículo nuclear, a desapareição das mais finas granulações, a deformação e por fim, a perda de electividade corante.

5.º Vasos sanguíneos.

São os elementos da medula que mais resistem à cadaverização e à autólise. Nas fases mais adeantadas pode assistir-se a uma verdadeira disseção vascular pela destruição do tecido que rodeia os vasos. O sangue que os enche é reconhecível durante muito tempo (até 160 horas).

SUBSTÂNCIA BRANCA

Esta substância submetida à putrefacção e à autólise apresenta como alterações próprias a desapareição da disposição concêntrica das

camadas de mielina, e a sua redução, assim como a do axónio, a detritos fortemente cromófilos, precedida de dilatação empoliforme das fibras.

Devemos notar que todas as lesões descriptas podem coexistir e que a enumeração feita não traduz a evolução cronológica das diferentes fases dum processo, progredindo uniformemente e sempre segundo a mesma directriz. Numerosos factores modificam a cronologia regular da degradação morfológica, cujo estudo continuamos fazendo detalhadamente.

Janeiro de 1912.

GERALDINO BRITES.

TRABALHO DO LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA
DO MUSEU ZOOLOGICO.

L'éclipse de soleil du 17 avril 1912

Observation

À OVAR

L'atmosphère terrestre, le Soleil et la Lune se sont concertés pour donner satisfaction à tous ceux qui attendaient l'éclipse du 17 avril avec un intérêt tout particulier :

À ceux pour qui la cause du phénomène reste encore enveloppée d'un profond mystère et l'événement même un sujet de vagues appréhensions : — à d'autres pour qui ces phénomènes sont, au moins, des événements intéressants, et exaltent leur admiration pour la science qui les étudie et qui possède des forces capables de puiser dans la raison les plus belles connaissances, dont l'humanité est justement fière : — à ceux, enfin, pour qui les plus insignifiants détails du phénomène font l'objet d'observation et d'études approfondies, soit pour constater des conclusions déjà posées, soit pour ouvrir des horizons nouveaux aux découvertes passionnément attendues, et que l'humanité exige, on peut le dire, dans un vertige de savoir qui la pousse à prétendre dévoiler les mystères les plus cachés de l'Univers, à connaître leur constitution intime, leur origine et leur but.

On ne s'attendait pas au plaisir de pouvoir jouir, dans toute sa splendeur, de l'éblouissant spectacle de la couronne solaire ; celle-ci même si elle se montrait, devait avoir une durée très éphémère, et un aspect peu varié, puisque l'activité solaire est dans une période d'intensité minimum ; et, en acceptant la période de onze ans, elle devait être du même type que la couronne de 1901, très semblable à celle qui a été observée en Portugal le 28 mai 1900.

Cependant, la curiosité des professionnels et des amateurs était excitée par les divergences des opinions émises sur la position de la ligne centrale, sur l'aspect et la durée du phénomène.

Les éclipses solaires sont toujours impatiemment attendues à cause des recherches solaires ; cette fois-ci, ces divergences ont eu pour conséquence que l'observation de l'éclipse du 17 avril a tourné, presque en entier à l'avantage des investigations lunaires.

Dans une notice que j'ai publiée dans le premier numero de cette *Revue*, se trouve la justification de ces divergences comme conséquence des très petits écarts encore existants entre les résultats obtenus quant à la position de la Lune et quant à la mesure de son diamètre : ces écarts ont été mis bien en évidence dans l'éclipse du 17 avril, au grand profit de la science, en conséquence de la presque égalité présentée par les diamètres de la Lune et du Soleil.

Chez nous le mois d'avril est celui qui présente le moins de chances de beau temps. Le bon choix d'une position privilégiée comme celle de la centralité relevait beaucoup du hasard ; il pourrait bien se faire que l'observation en des endroits plus ou moins écartés de cette ligne fût préférable pour quelqu'uns.

Et, pourtant, ainsi que nous l'avons dit, les conditions dans les quelles on a pu observer le phénomène, les conclusions qu'on a pu en tirer ont réussi à souhait à presque tous les observateurs.

En Portugal sept mois de mauvais temps ont justifié un mois d'avril exceptionnel. Sauf en de rares endroits où le phénomène a été gâté par les nuages, comme à Coïmbra où l'on n'est pas arrivé à faire des observations utilisables, nous avons joui d'un ciel de la plus belle limpidité avec son azur parfait, et dont on a pu profiter dans toute la région de la centralité.

Notre pays a eu le plaisir de recevoir trois missions étrangères, une russe, une française, et une anglaise, et trois missions portugaises y ont aussi été établies ; une de l'Ecole Naval, une de l'Université de Lisbonne, et une autre de l'Université de Coïmbra que j'ai eu le plaisir de conduire.

J'ai eu l'honneur de recevoir les missions russe et française : la première était présidée par le savant astronome Mr. N. DONITCH, déjà consacré par ses travaux, parmi lesquels se détachent ceux des éclipses du Soleil et des passages de Mercure ; il était accompagné par Mr. LE BARON E. VON PAHLEN, dont les travaux sur l'analyse mathématique et l'astronomie sont déjà remarquables : Mr. SALLET, savant astronome de l'Observatoire de Paris, dont les publications sur la spectroscopie sont très appréciées, et qui s'est beaucoup distingué dans l'observation de l'éclipse de 1905 ; il était accompagné de M.^{me} SALLET qui au charme de sa distinction joint de vastes connaissances sur la science astronomique.

Depuis quelque temps j'avais décidé que nos installations, y compris une station principale et les postes qu'on pourrait organiser avec l'assistant d'astronomie Mr. VAZ SERRA et les élèves du cours d'Astronomie, devraient se trouver dans la région de Ovar. Cette région naturellement indiquée par les circonstances pour être traversée par

Avec ces éléments on a pu établir 10 installations portugaises sur la route qui, en traversant Ovar, suit du Carregal à Cadaval dans une direction à peu près normale à celle des lignes centrales.

Avec les positions occupées par les missions russe et française (comme il est indiqué sur la fig. 1) par notre station principale et les postes espacés à peu près à 500^m, on a occupé une ligne totale de 6 kilomètres.

Dans les 8 postes occupés par les élèves de l'Université, numeros 1, 2, 3, 6, 8, 9, 11 et 12, il a été installé une lunette, et chaque élève était accompagné d'un officier qui a eu l'obligance de compter le temps. On trouve une photographie du poste 9 dans la fig. 2.

Dans la station principale, n.º 10, établie près du chemin de fer dans la ferme aimablement mise à notre disposition par Mr. JOÃO BERNARDINO, j'ai installé les instruments suivants :

Un theodolithe Troughton, de 35^{mm} d'ouverture, 28^{cent.} de distance focale et 5 d'agrandissement, dont je me suis servi pour l'observation visuelle.

Un heliostat Silberman, miroir métall argenté, que a donné l'image du Soleil sur une objective de 7^{cent.} d'ouverture et 1^{m,14} de distance focale.

Un cinématographe très aimablement prêté par Mr. CARLOS FERREIRA, qui a suivi l'observation accompagné de l'élève Mr. RIBEIRO FERREIRA.

Une chambre photographique avec monture parallactique et obturateur automatique, de 15^{cent.} d'ouverture et 96^{cent.} de distance focale, que Mr. SALLET, déjà fort occupé de deux appareils, avait mis à ma disposition, ce dont il m'avait déjà avisé de Paris.

Deux thermomètres pour les observations de la temperature donnant des dixièmes de degré.

Un chronomètre Negus de temps moyen, dont la marche avait été réglée à l'Observatoire de Coïmbra, et dont l'état a été vérifié par des signaux télégraphiques envoyés par l'observatoire de la Tapada d'Ajuda, avec lequel ont été comparées les montres dont les observateurs se sont servis.



Fig. 2

Un poste d'observation de la mission de l'Université de Coïmbra

La fig. 3 donne la photographie de cette installation.

Dans la station n.º 4 a été installée une chambre photographique, montée parallactiquement, munie d'un teleobjectif Dalmeyer.

L'atmosphère a été toujours limpide et calme.

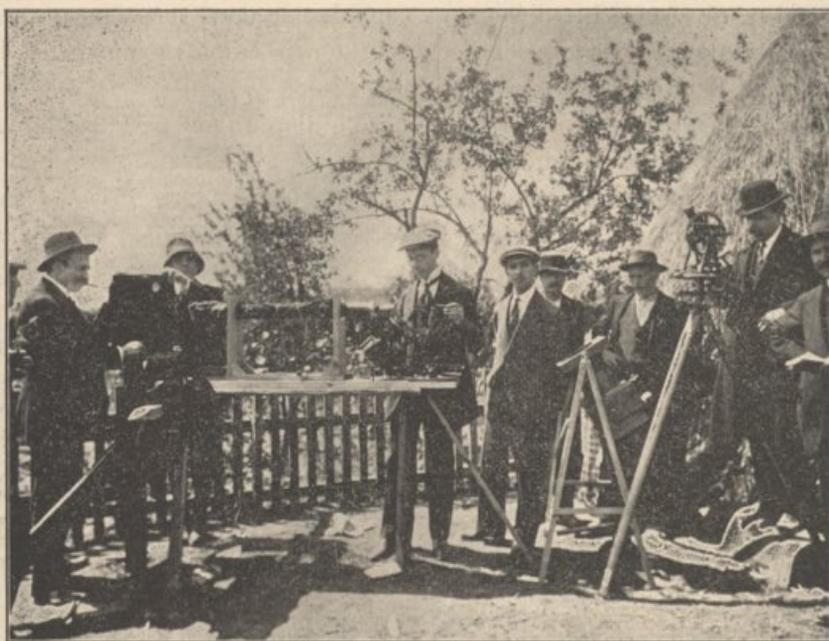


Fig. 3

Station principale de la mission de l'Université de Coimbra

Pendant le phénomène ont été exécutés les travaux suivants :

Dans la station n.º 10 situé à

+ 40° 51' 15" et 8° 35' 51" longitude W. Gr.

Avec le théodolithe : contacts observés

| | |
|-------------------------|--|
| 1 ^{ère} | 10 ^h 21 ^m 12 ^s (Temps moyen de Gr.) |
| 2 ^{ème} E..... | 11 42 50 |
| 3 ^{ème} W..... | 11 43 4 |
| 4 ^{ème} | 13 8 41. |

Les images se sont présentées avec grande netteté, et on a pu observer très distinctement, pendant plusieurs secondes, la silhouette des montagnes lunaires sur le disque solaire, et la variation de leurs dimensions jusqu'à disparition complète. Les temps de contact ont

été referées aux époques de la disparition du menisque solaire à l'E, et de son apparition à l'W.

Avec l'appareil cinématographique ont été prises plus de 5.000 images du phénomène — au commencement et à la fin de l'éclipse, dans la phase maxima et dans les intervalles, afin d'obtenir le plus grand nombre possible d'éléments capables de nous renseigner, sûrement, sur la classification de l'éclipse. On a employé une pellicule Eastman Kodak.

Dans la phase maxima l'objectif a été diaphragmé à 3^{mm} et l'appareil réglé de façon a pouvoir fournir près de 560 images à la minute, l'intervalle entre deux images consécutives étant donc de 0^s,11. Dans les autres phases cet intervalle a été réduit de moitié, et on a employé un diaphragme de 2^{mm}.

Dans la fig. 9 se trouvent reproduites 42 images positives, obtenues sur le film pendant 5^s, comprenant celle de la phase maxima, et placées dans les colonnes, de droite à gauche. Elles montrent toutes des grains de Baily, très intéressants à étudier. Ces grains se retrouvent sur 158 images.

Dans la fig. 13 sont reproduites 80 images negatives, qui comprennent presque toutes les images de la fig. 9, mais qui sont intéressants pour faire mieux reconnaître les variations des grains de Baily.

Dans la fig. 14 sont encore reproduites 6 images prises avant la phase maxima qui présentent une tache blanchâtre (marquée d'une croix dans la première); tache que l'on rencontre dans toutes les images (plus de 300) prises à cette période du phénomène, et que la reproduction a beaucoup abimée.

On trouve des taches semblables près du bord nord de la Lune, sur une suite d'images prises à la proximité de la phase maxima qui n'ont pas été reproduites parce qu'elles n'étaient pas sensibles sur le positif.

Les images prises pour l'observation des contacts ne permettent pas d'arriver à une conclusion sûre étant donné la difficulté de préciser l'image qui correspond au moment même du phénomène, puisqu'il y en a de nombreuses sensiblement pareilles.

Le procédé cinématographique pourra, certainement, être employé avantageusement dans ce but quand il s'agira d'images à grand diamètre; en tout cas, il sera certainement supérieur au procédé visuel. De l'examen attentif des images cinématographiques on devra conclure le peu de confiance que méritent les observations des contacts par rapport à la rigueur obtenue dans les observations d'un autre genre.

L'image de la fig. 7 a été prise dans la chambre photographique de 96^{cent.} presque au moment de la phase maxima, avec une pose de 0^s,5, dans l'espoir d'obtenir l'image de la couronne solaire et celle de la planète Venus, si celle-ci devenait visible ce qui, en effet, est arrivé.

Malheureusement la plaque photographique n'était pas absolument bonne.

Les résultats des observations thermométriques sont indiqués par le graphique de la fig. 8.

L'observation qu'on a voulu faire sur les ombres ondulantes n'a pas donné de résultat appréciable.

Des observations faites à ce poste on a conclu:—que personne n'avait remarqué la plus petite trace de couronne, que l'éclipse a été sensiblement centrale; et qu'on ne pouvait pas être fixé si elle avait été totale ou annulaire, tous les observateurs ayant remarqué des grains de Baily, mais n'étant pas d'accord à ce sujet. Quelques uns d'entre eux ont constaté l'existence d'une protubérance dans la partie inférieure du disque solaire.

Au poste n.º 4 il a été fait une suite de photographies, dont deux assez intéressantes figs. 5 et 6; la première prise avant la phase maxima et l'autre après cette phase; toutes les deux avec une pose de 0^s,5, espacées de une minute.

Pour les époques des contacts ont été obtenus les résultats, suivants:

Au deuxième poste, (+ 40° 51' 55", 8° 38' 35" W. Gr.)

| | |
|-------------------------|---|
| 2 ^{ème} E..... | 11 ^h 42 ^m 52 ^s |
| 3 ^{ème} W..... | 11 43 2 |
| 4 ^{ème} | 13 8 37 |

Au troisième, (+ 40° 51' 50", 8° 38' 15" W. Gr.)

| | |
|-------------------------|--|
| 1 ^{ère} | 10 ^h 21 ^m 8 ^s |
| 2 ^{ème} E..... | 11 42 47 |
| 3 ^{ème} W..... | 11 43 4 |
| 4 ^{ème} | 13 8 38 |

Au quatrième, (+ 40° 51' 42", 8° 37' 55" W. Gr.)

| | |
|-------------------------|---|
| 2 ^{ème} E..... | 11 ^h 42 ^m 50 ^s |
| 3 ^{ème} W..... | 11 43 2 |
| 4 ^{ème} | 13 8 37 |

Au sixième, (+ 40° 51' 36", 8° 37' 10" W. Gr.)

| | |
|-------------------------|---|
| 2 ^{ème} E..... | 11 ^h 42 ^m 55 ^s |
| 4 ^{ème} | 13 40 |

Au huitième, (+ 40° 51' 24", 8° 36' 36" (W. Gr.)

| | |
|------------------------|--|
| 1 ^{ère} | 10 ^h 21 ^m 9 ^s |
| maxima phase | 11 42 55 |
| 4 ^{ème} | 13 8 38 |

Au neuvième, (+ 40° 51' 17", 8° 36' 10" W. Gr.)

| | |
|------------------------|---|
| maxima phase | 11 ^h 42 ^m 59 ^s |
| 4 ^{ème} | 13 8 39 |



Fig. 4

Station russe à Ovat : MRS. DONITCH, BARON VON PAHLEN, SALLET, FREIRE DE MATOS, AUGUSTO CARDOSO RIBEIRO GOMES, ANÍBAL CABRAL, NOGUEIRA SOARES, CUSTÓDIO DE MORAIS, HEITOR CABRAL, LACERDA, VAZ SERRA, GREENFIELD DE MELLO, PACHECO DE AMORIM, CRISTIANO DE SOUSA e COSTA LOBO

Dans tous les postes on a observé le phénomène réduit à des grains de Baily, et on a eu l'impression d'une phase centrale.

On n'a observé des traces de couronne nulle part, les observateurs du poste n.º 4 ont remarqué que les grains de Baily ont été plus forts vers le nord.

Mr. DONITCH a eu l'obligeance de me communiquer qu'il avait eu l'impression d'une éclipse centrale à son poste (n.º 5), Mr. SALLET en a eu la même impression. Voici ce qu'il écrit dans les *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*: «La ligne de la centralité était vers le milieu de l'intervalle entre la ligne de la *Connaissance des Temps* et celle de l'*Ephéméride américaine*».

Aussitôt l'éclipse finie toutes les personnes qui avaient observé dans cette région se sont rendues à la station russe. Il est resté de cette réunion l'agréable souvenir du groupe photographique de la fig. 4 pour lequel nos aimables visiteurs nous ont fait l'honneur de poser avec nous.

Nous avons échangé nos impressions sur le phénomène, mais on n'est arrivé à aucune conclusion sur la position de la ligne de centralité, ni sur les limites de la zone de totalité ou annulaire; en conséquence, il nous a été impossible de faire la classification de l'éclipse à ce moment. Tous ceux qui ont observé à l'ouest de la station n.º 10, où je me trouvais moi-même, ont cru être dans la ligne centrale.

EN D'AUTRES POINTS DE LA RÉGION DE CENTRALITÉ

Il me semble intéressant de rapporter ici, rapidement, les communications des résultats des observations, les plus importantes réalisées dans la région de centralité en Portugal, en Espagne, en France et en Belgique, où le phénomène a été également observé, avec le plus grand intérêt, afin de mieux pouvoir en faire l'appréciation.

La mission anglaise, dont nous avons déjà parlé, s'est installée en trois endroits: à Maceda, près de Esmoriz, à Olho Marinho, au nord de Ovar, et à Milhundos, près de la ville de Penafiel.

Mrs. WORTHING et GLATHER ont observé dans le première poste, Maceda, beaucoup à l'ouest de nos postes de la région d'Ovar, une éclipse totale de près de 1^s, et obtenu une photographie d'une couronne, type *winde vane*, correspondante à un minimum d'activité.

Au second poste, Olho Marinho, établi dans la direction de notre poste n.º 1, Mrs. BUTHER, DEAN et CATPETAN, ont observé une totalité de moins de 1^s, une couronne sans prolongements, et un anneau brillant chromosphérique.

Au troisième, Milhundos, Mr. CHAMBERS voit une éclipse totale et deux protubérances.

Pour ces observateurs, sur des directions éloignées de plus de 3 kilomètres, et dont une est à deux kilomètres ouest de notre poste extrême n.º 1, l'observation a eu lieu dans la ligne de centralité et, tous, ils ont eu l'impression d'avoir vu la couronne solaire.

Des deux missions portugaises celle de l'École Navale a été dirigée par Mr. NUNES DA MATTA, très distingué professeur de l'École Navale. Ses élèves Mrs. CONCEIÇÃO RODRIGUES, JULIANO DE CARVALHO, SANTOS MOREIRA, CASTRO MASCARENHAS, ROXO DE CARVALHO, et PRESTES SALGUEIRO en faisant partie.

L'observation a été prise à Alto do Picoto, à un kilomètre de la

gare de Villa-Meã, SSO. Une photographie prise à l'époque de la phase maxima a été publiée dans l'*Illustração Portuguesa*, et semble être celle d'une éclipse annulaire avec grains de BAILY à l'ouest.

Cet illustre professeur a eu l'obligeance de me fournir les informations suivantes :

Époques des contacts :

| | |
|---------------------------|--|
| 1 ^{ère} | 10 ^h 22 ^m 7 ^s ,2 (Temps moyen de Gr.) |
| 2 ^{ème} (W.).... | 11 43 52 |
| 3 ^{ème} (E.).... | 11 43 53 |
| 4 ^{ème} | 13 9 37 |

«L'éclipse a été annulaire et l'anneau ayant été parfaitement égal en toute son étendue il en découle que la ligne de centralité était celle où se trouvait, justement, la mission de l'École Navale.»

L'autre mission, dirigée par les illustres professeurs Mrs. PEDRO JOSÉ DA CUNHA et ANDREA, installée à Milhundos près de la mission anglaise, confirme les informations de celle-ci, et conclut que la totalité a été de 2^s et que la ligne de centralité a passé par la position où se trouvait leur mission.

D. JOSÉ COMAS SOLAS, savant directeur de l'observatoire de Fabra, installé quelque peu au nord de la ligne centrale annoncée par l'Observatoire de Madrid «observa une éclipse sensiblement totale, instantanée», et en conclut, «que la ligne de centralité a dû passer au nord, éloignée de près de 2 kilomètres de son poste située à la latitude +42°24',5 et longitude 6°58',7 W de Gr.

L'observation de la couronne lui a permis d'en faire le croquis qui la place sous le type des couronnes au minimum d'activité, ayant, sensiblement, une forme pareille à celles qui ont été observées en 1900 et 1901. (*Bulletin de l'Association Astronomica de Espanha e America* du mois de mai 1912).

Il attribue aux filaments de la couronne une étendue de plus de 2 millions de kilomètres et fait la remarque que pour l'observation visuelle l'éclipse a été totale, mais que dans l'observation faite avec un spectrographe cinématographique il existe toujours des grains de BAILY.

Le savant directeur de l'Observatoire de S. Fernando, D. THOMAZ AZCARATE, qui a installé trois lignes d'observation sensiblement normales à la direction centrale, près d'Oviedo, arrive aux conclusions suivantes:— «Que l'éclipse a été totale sur toute la Péninsule et a eu une durée moyenne de moins de 0^s,5:— Que la largeur de la zone a été de 800 à 1000 mètres:— Que la ligne de centralité s'est

deplacée normalement à sa direction de 6 à 7 kilomètres, coïncidant sensiblement avec celle de l'Ephéméride Américaine et la deuxième ligne centrale de Battermann.»

D. FRANCISCO INIGUEZ, savant directeur de l'Observatoire de Madrid, d'après l'ensemble des observations effectuées en Espagne, conclut à ce que la ligne de centralité a passé entre les lignes prévues par Madrid et Greenwich.

Mrs. FRD. VILLAS et JACQUES CARVALLO qui ont observé à Caca-belos, près de Leon ont communiqué avoir obtenu sur un film une image de la couronne bordant en liseré tout l'hémisphère sud de la Lune.

Mr. LANDERER, dans les *Comptes-Rendus* de l'Académie des Sciences de Paris, conclut à $15^{\circ}31',62$ pour le semidiamètre lunaire et à la possibilité d'obtenir une photographie de la couronne avec un croissant solaire de $\frac{1}{32}$ du diamètre du Soleil.

En France aussi bien par la qualité des observateurs et leur nombre que par les moyens dont ils disposaient, les observations ont pris une importance remarquable.

Une mission anglaise dirigée par Mr. W. LOKYER y a été installée. Aux observations de la ligne et de la zone de centralité ont été destinées deux missions dirigées — l'une par Mr. le COMTE DE LA BAUME, savant astronome dont les travaux sur les éclipses et les comètes sont justement renommés; l'autre par Mr. CARVALLO, illustre directeur d'études à l'École Polytechnique. Des observations en ballon ont été suggérées par le savant directeur de l'Observatoire d'astronomie physique de Meudon, Mr. DESLANDRES à qui la science astronomique est redevable des plus remarquables découvertes.

Selon Mr. de la BAUME la ligne de centralité a passé par l'installation de Saint-Germain en Laye où il observa.

Des observations faites sur deux ballons, l'un ayant à bord Mrs. l'Amiral FOURNIER et le Colonel BOURGEOIS, et l'autre Mr. le Capitaine DUPIN, on a conclu que l'ombre de la Lune avait un diamètre de $3^{\text{km}},500$ et que la ligne de centralité passait entre Villiers le Sec et Belloy, plus près de Villiers le Sec.

Mr. FLAMARION, l'infatigable et distingué astronome à qui l'on doit une grande diffusion de la science astronomique et d'intéressantes découvertes, conclut d'après les observations comparées des groupes, que la ligne de centralité était 1800^{m} au nord de celle qui fut donnée par la *Connaissance des Temps*; c'est aussi la conclusion de Mr. de la BAUME.

Mr. G. FOURNIER au nom d'un groupe important de la Société Astronomique a fourni dernièrement d'intéressantes informations, et conclut que la ligne de centralité a passé 1200^{m} au nord de la ligne de la

Connaissance des Temps; donc 600^m au sud de celle indiquée par Mr. FLAMARION.

Sur la nature de l'éclipse, Mr. FLAMARION a emis l'opinion suivante: «Absolument parlant, cette éclipse n'a été ni annulaire, ni totale; on pourrait la qualifier d'éclipse perlée.» Par rapport à la détermination du diamètre de la Lune il conclut que, «Le diamètre lunaire qui a éclipsé le Soleil est le diamètre pris des sommets des asperité lunaires et non plus le diamètre moyen». Et cela en conséquence de ce qu'il avait déjà établi que les cimes des montagnes de la Lune ont été tangentés au bord solaire.

A ce sujet l'opinion emise par Mr. de la BAUME est: «Quant au diamètre moyen de la Lune, il a été, pour les observateurs situés aux environs de Paris, presque exactement égal à celui du Soleil.

En effet, les aspérités du bord de la Lune qui dépassent son niveau moyen, s'élevaient au dessus du bord du Soleil».

Mr. BAILLAUD, le savant directeur de l'Observatoire de Paris, dans son rapport à l'Académie des Sciences conclut que: «L'éclipse n'a pas été tout-à-fait totale en Europe, et la ligne de centralité était sensiblement au sud de la ligne de la *Connaissance des Temps*».

Mr. DESLANDRES qui par ses recherches originales a elargi extraordinairement les connaissances solaires, en plus des services de l'Observatoire où il a employé, une fois de plus, le spectro-héliographe polychrome, l'une de ses belles inventions, a préparé une installation spéciale à Grignon. On y a obtenu d'intéressants spèctres de la chromosphère; cependant Mr. DESLANDRES est arrivé dans son rapport, présenté à l'Académie des Sciences, à cette conclusion importante: «Aucune des épreuves de Grignon n'ont décèlé de détails intéressants attribuables à la couronne seule».

Mr. BIGOURDAN, savant astronome de l'Observatoire de Paris, observa à Courcelles et donne cette information intéressante: «Souvent les points des cornes du croissant solaire ont paru soit emoussées, soit détachées entièrement».

La mission anglaise installée à Chavennes, aux environs de Paris, considère l'éclipse comme ayant été centrale à ce point et en conclut que la ligne de centralité a été coïncidante avec celle de l'*American Ephemeris*.

En Belgique la Société d'Astronomie d'Anvers conclut d'après les résultats obtenus par la mission qu'elle a installé à Silenrioux, que la ligne de centralité a passé sensiblement par ce point, correspondant à la ligne Battermann II; et que pour diamètre on devra préférer celui qui fut proposé par le *Nautical Almanak* (31' 3",3); on a fait importantes observations à Naumur.

En Allemagne Mr. HARTMANN croit que d'après les observations faites à Göttingue l'éclipse a eu lieu 25^s,7 plus tôt que l'annonce du *Nautical Almanak* et conclut à une correction de +10'',3 pour la position de la Lune.

Les plus importantes conclusions par rapport à la ligne de centralité sont indiquées sur la fig. 1. Il est intéressant de remarquer dès à présent les divergences qu'elles présentent.

CONCLUSIONS

Soleil

Ainsi que nous l'avons déjà dit, dans cette éclipse on s'attendait tout spécialement à obtenir des indications intéressantes sur la position et le diamètre de la Lune; on espérait aussi de pouvoir observer, quoique très rapidement, la couronne solaire et, dans ce but, on a préparé plusieurs postes de observations.

Il y avait grand intérêt à reconnaître si la forme de cette couronne correspondait, effectivement, à celle qu'elle aurait du avoir par le fait que le Soleil se trouvait à cette époque dans un minimum d'activité: et, aussi à élargir l'étude de sa composition, seulement possible, jusqu'au présent, aux époques des éclipses.

Plusieurs astronomes distingués étaient certains de sa visibilité et, à ce propos, Mr. l'Abbé MOUREUX écrivait: «Quant aux photographies ne doutons pas qu'elles révèlent les appendices coronaux»; en se basant sur le fait que Mr. WILLIS avait en 1900 photographié la couronne 8 minutes après la totalité, et Mr. MAUNDER 5 minutes après.

En tout cas on croyait à la possibilité d'obtenir le spectre de la chromosphère.

L'importance de cette observation aux époques des éclipses, malgré les résultats très importants qu'on peut, à présent, obtenir par l'observation quotidienne du Soleil, est bien mise en relief par Mr. DESLANDRES dans sa communication du 2 avril 1912, faite sur cette éclipse, à l'Académie des Sciences de Paris, où il dit, «Mais (et c'est un point que l'on a tort, en général, de passer sous silence) ces résultats s'appliquent seulement aux gaz et vapeurs de la chromosphère; les particules de cette chromosphère qui offrent un intérêt au moins égal, et la couronne formée de particules, échappent encore à l'observation journalière; jusqu'à présent, elles sont accessibles seulement dans les éclipses totales et dans les instants très courts de la totalité».

Dans l'espoir d'obtenir des images de la couronne j'ai employé deux appareils.

En attendant que M. HARRISON soit que dans les observations
 dans le Géométrie l'ellipse a un lieu 27,7 plus tôt que l'annonce du
 Newton, il avait et conduit à une correction de 170,3 par la po-
 sition de la Lune.
 Les plus importantes conclusions que rapport à la ligne de centre
 ont été indiquées sur la fig. 10. Il est nécessaire de remarquer que
 a plusieurs les différences indiquées précédemment.

CONCLUSIONS

Soleil

Les observations faites par les auteurs de ce mémoire ont été
 tout spécialement faites pendant les périodes indiquées sur la page
 495 et se rapportent à la figure 10. Elles ont été faites à l'aide de
 plusieurs instruments différents, et dans les lieux indiqués sur
 la page 495. Les observations ont été faites pendant les périodes
 indiquées sur la page 495.

Il a été constaté que les observations faites pendant les périodes
 indiquées sur la page 495 ont été faites pendant les périodes
 indiquées sur la page 495. Les observations ont été faites pendant
 les périodes indiquées sur la page 495.

Les observations faites pendant les périodes indiquées sur la page
 495 ont été faites pendant les périodes indiquées sur la page 495.
 Les observations ont été faites pendant les périodes indiquées sur
 la page 495.

Les observations faites pendant les périodes indiquées sur la page
 495 ont été faites pendant les périodes indiquées sur la page 495.
 Les observations ont été faites pendant les périodes indiquées sur
 la page 495.

Les observations faites pendant les périodes indiquées sur la page
 495 ont été faites pendant les périodes indiquées sur la page 495.
 Les observations ont été faites pendant les périodes indiquées sur
 la page 495.

Les observations faites pendant les périodes indiquées sur la page
 495 ont été faites pendant les périodes indiquées sur la page 495.
 Les observations ont été faites pendant les périodes indiquées sur
 la page 495.



Fig. 5

Photographie prise au poste n.º 4 avant la phase maxima



Fig. 6

Photographie prise au poste n.º 4 après la phase maxima