

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXIII

Junho — 1930

Fasciculo 5

Do phenomeno de endomixis em ciliados
do genero *Balantidium* (*)

Observações sobre o enkystamento desses ciliados e descrip-
ção de uma nova especie parasita do *Macacus rhesus*
pelos

DRS. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ

(Com as estampas XLIX—LXV).

Summario	Pags.
Introdução.	190
Material estudado.	190
Methodo de pesquisa.	190
Das especies de <i>Balantidium</i> encontradas em macacos.	192
Do <i>Balantidium</i> parasito do <i>Macacus rhesus</i>	193
Estudo dos kystos do <i>Balantidium</i> parasito do <i>Macacus rhesus</i>	193
Estudo dos kystos do <i>Balantidium coli</i> do porco.	194
Da posição systematica do <i>Balantidium</i> do <i>Macacus rhesus</i>	195
<i>Balantidium simile</i> n. sp.	195
O phenomeno de <i>endomixis</i> no <i>Balantidium simile</i>	197
Phenomenos que precedem o processo de <i>endomixis</i>	197
Formas em que se inicia o phenomeno de <i>endomixis</i>	198
Alterações por que passa o micronucleo desde o inicio do phenomeno até a formação das duas placentas.	201
Alterações do macronucleo durante o phenomeno.	201
Desenvolvimento das placentas e formação do micronucleo.	202
Reconstituição do aparelho nuclear.	203
Variantes do processo de <i>endomixis</i>	204
Caso em que se formam 4 placentas.	204
Casos de 3 e de 8 placentas.	205
Considerações geraes	205
Significação do phenomeno de <i>endomixis</i>	206

(*) Recebido para publicação a 7 de Março de 1930.

INTRODUÇÃO

No presente trabalho iremos relatar o resultado das nossas pesquisas sobre o phenomeno de *endomixis*, que tivemos occasião de observar em ciliados do genero *Balantidium*, parasitos do *Macacus rhesus*, phenomeno este até agora conhecido sómente entre os ciliados de vida livre.

Estudando esta especie de *Balantidium*, haviamos observado, aliás ha tempos, o apparecimento frequente de certas formas, semelhantes ás encontradas por alguns auctores em parasitos do mesmo genero, mas que não haviam recebido d'elles uma interpretação satisfactoria. Foi com o fim de esclarecer esse ponto, que iniciamos nossas pesquisas e por ellas, pudemos verificar representarem essas formas ao lado de outras, que não tinham ainda sido observadas, phases de um mesmo phenomeno porque passa o ciliado durante a sua vida.

O resultado de nossos estudos, foi exposto resumidamente na sessão da Sociedade Brasileira de Biologia, realisada no dia 29 de Janeiro do corrente anno e reservámos para o presente trabalho, a descripção minuciosa das varias phases do phenomeno bem como a documentação do mesmo, representada por eschemas, desenhos e microphotographias. Além da parte propriamente descriptiva, discutiremos a significação do phenomeno de *endomixis* no cyclo evolutivo dos ciliados, pois, alguns dos factos que tivemos occasião de observar, concorrem a nosso vêr, para esclarecer o modo pelo qual se deva encarar esse phenomeno.

Antes de entrarmos na descripção do phenomeno de *endomixis*, aproveitando a occasião, estudaremos o processo de enkystamento nessa especie de *Balantidium*, tratando em seguida da posição systematica desse ciliado em relação ás outras especies conhecidas (do homem, do porco, da preá e do *Cebus carayá*).

MATERIAL ESTUDADO

O material que utilisámos para o estudo do phenomeno de *endomixis*, provinha de *Macacus rhesus*, importados de Hamburgo, pelo Instituto Oswaldo Cruz para estudos sobre febre amarella. Esses animaes em alta porcentagem apresentavam-se parasitados por ciliados do genero *Balantidium* sendo que alguns delles intensamente.

Trabalhámos sempre com fézes recentemente emittidas. Os macacos geralmente quando aprisionados, ao serem retirados das gaiolas, se debatem e, nessa occasião, quasi sempre defecam, o que facilita enormemente a obtenção do material. Quando isso não acontecia, o material era retirado por meio de sonda. Nunca sacrificámos o animal para colheita das fézes, pois, quasi sempre para melhor estudar o phenomeno, um mesmo animal era observado durante dias seguidos e nesse espaço de tempo as suas fézes eram colhidas n'um mesmo dia, varias vezes, com intervallos de horas. Para estudo comparativo, foi-nos de grande utilidade material com *Balantidium*, de proveniencia humana, do porco, do *Cebus carayá* e da preá, que possuímos archivado na Secção de Protozoologia do Instituto.

METHODO DE PESQUISA

Exame a fresco.—Este methodo se mostrou de pouca utilidade nos nossos estudos, pois, por elle só podiamos suspeitar da existencia no material examinado do phenomeno de *endomixis*, pelo apparecimento de fórmãs pequenas do parasito, de aspecto transparente e quasi completamente desprovidas de inclusões e que geralmente representam as formas nas quaes se inicia o phenomeno. Para o estudo das alterações porque passam o macronucleo e o micronucleo durante as varias phases do processo, elle se mostrou de completa inutilidade, pois, a simples observação do macro-

nucleo no estado a fresco é muitas vezes difficil, devido á existencia no interior do corpo do ciliado de grande numero de vacuolos ou de inclusões. O emprego de uma luz artificial intensa, bem como do lugol que tão bons resultados dá na evidenciação do nucleo de outros protozoarios de nada adiantou, pois, este ultimo impregna tão intensamente as inclusões do corpo do ciliado que mascara completamente a observação do nucleo.

Preparações fixadas e coradas.—Devido a grande riqueza em *Balantidium* no material com que trabalhámos, faziamos quasi sempre com elle, esfregaços em laminulas que em seguida eram fixadas a humido. Utilizámos algumas vezes, porém, do processo de fixação em massa. De todos os fixadores por nós utilizados o que deu melhores resultados foi o Bouin alcoolico ou liquido de Duboscq-Brasil, cuja formula é a seguinte:

Alcool a 80°	150 cc.
Formol a 40 %	60 cc.
Acido acetico crystallizavel	15 cc.
Acido picrico.	1 gr.

Elle nos deu muito melhores resultados que o sublimado—alcool de Schaudinn, não só para fixação das fórmias vegetativas como principalmente dos kystos. O material distendido em camada fina sobre uma laminula era, ainda humido, collocado no liquido fixador pelo espaço de 1 a 2 horas. As laminulas eram transferidas depois para uma placa com alcool a 90°, onde permaneciam até completa eliminção do acido picrico, sendo que o alcool era substituido 2 a 3 vezes durante esse tempo. Em seguida eram passadas para alcool a 70° e dahi para agua afim de soffrerem depois a coloração.

Processos de coloração.—Utilizámos em nossas pesquisas dos seguintes methodos: coloração nucleal de Feulgen, hematoxylina de Delafield, borax-carmin, trioxyferrihemateina de Hansen e o

classico processo de Heidenhain, bem como este ultimo modificado.

A reacção nucleal de Feulgen, prestou-se muito para coloração dos kystos, corando no interior delles o nucleo sem que isso se dê com o plasma, o que facilita a observação do primeiro. Para evidenciação do micronucleo e estudo das transformações por que elle passa durante o phenomeno de *endomixis*, a reacção nucleal de Feulgen se mostrou de valor nullo, pois, o micronucleo quasi não se cora por este processo.

O methodo classico de Heidenhain, foi, de todos os processos, aquelle que peiores resultados deu em nossas mãos, pois, o emprego do alumen como diferenciador, não permite que se obtenha uma bôa differenciação do plasma, ficando este ultimo com quasi a mesma tonalidade de coloração que o nucleo. Si se prolongar a differenciação por mais tempo, afim de obter maiores contrastes, entre esses elementos, o nucleo e o plasma se descoram igualmente.

Com uma pequena modificação nesse ultimo processo, conseguimos obter colorações magnificas, que nos facilitaram enormemente o estudo das varias phases porque passa o ciliado durante o processo de *endomixis*. Ella consiste, em substituir o alumen como diferenciador, por uma diluição de acido chlorhydrico em alcool a 70°, na proporção de 1 %. As laminulas após fixação pelo Bouin e passagem pelos alcooes a 90°, 70° e agua, eram collocadas na solução a 3,5 % de alumen ferrico. Após 12 horas no mordente, eram lavadas e collocadas na solução de hematoxylina de Heidenhain. No corante permaneciam 5 a 6 horas, a temperatura do laboratorio, podendo, porém, permanecer ahi pelo espaço de 12 horas sem maiores inconvenientes.

As laminulas eram em seguida lavadas e submettidas ao diferenciador. Como já dissemos acima, este ultimo é representado por uma diluição a 1 % de

acido chlorhydrico em alcool a 70°. Logo após collocados nessa solução, os preparados adquirem côr avermelhada e vão se descorando. A differenciação precisa ser seguida ao microscopio, devendo ser levada a um ponto em que o plasma do ciliado se mostre quasi que completamente descorado, o que é de grande importancia, pois, pela lavagem em agua após a differenciação, dá-se uma viragem pela qual a côr avermelhada do preparado se transforma em azul escuro o que traz um reforçamento da coloração. Após a permanencia n'agua corrente pelo espaço de 2 horas, os preparados são deshydratados e montados em balsamo. Com o emprego dessa technica obtivemos preparados magnificos, nos quaes todos os elementos do ciliado apparecem admiravelmente corados, mesmo o micronucleo que tão mal se cora pelos outros processos.

A hematoxylina de Delafield e o borax carmin que tão bons resultados dão no estudo de outros ciliados, se mostraram de valor inconstante e na dependencia da constituição das fezes. E' assim que, quando estas ultimas são constituídas em grande parte por muco, os *Balantidium* nellas existentes, se coram bem por esses processos, mas fóra disso, se obtem colorações mediocres que não podem ser comparadas com as obtidas com o processo anteriormente descripto.

A conselho do Dr. Gomes de Faria empregámos o corante trioxyferrihemateina de Hansen (Trioxyeisenhämäteinfärbung nach Hansen) com bons resultados. Elle tem a vantagem de ser um processo rapido, corando o aparelho nuclear do ciliado intensamente e em preto.

Os preparados fixados a humido são collocados na solução corante pelo espaço de 10 a 20 minutos. Em seguida lavados e differenciados pelo alcool chlorhydrico. A differenciação deve ser rapida e seguida ao microscopio.

Esse processo se presta muito para a coloração dos kystos, pois corando in-

tensamente o nucleo, permite que pela differenciação se obtenha um nitido contraste entre esse elemento e as outras partes constituintes do kysto.

Resumindo diremos, que para o estudo do *Balantidium* no estado de vida vegetativa, nenhum dos processos de coloração acima citados substitue o de Heidenhain desde que, em vez do alumen ferrico como differenciador, se empregue uma solução de 1 % de acido chlorhydrico em alcool a 70°. Esse processo se presta muito principalmente para o estudo das alterações porque passa o micronucleo durante o phenomeno de *endomixis*.

DAS ESPECIES DE *BALANTIDIUM* ENCONTRADAS EM MACACOS

A presença de ciliados, do genero *Balantidium*, parasitando macacos de diferentes especies, tem sido assignalada por varios auctores, taes como Brooks, Noc, Brumpt, Joyeux etc. Quasi todos identificaram os parasitos encontrados ao *Balantidium coli*. Hegner e Holmes observaram em um macaco proveniente do Brazil (*Cebus variegatus*) um *Balantidium* e assignalaram em seu trabalho differenças morphologicas existentes entre esse *Balantidium* e o *coli*, sem comtudo o considerar como uma especie distincta. Em 1927 descrevemos com o nome de *Balantidium aragaoi* uma nova especie do genero, parasito do *Cebus carayá*.

Demonstrámos então, que esse parasito se differenciava do *Balantidium coli* principalmente pela fórmula do macronucleo que era redondo. Hegner, em publicação posterior, sem apresentar razões para isso, considerou essa especie como duvidosa, enquadrando-a com o *Balantidium coli*.

Em um outro trabalho, demonstrámos o absurdo do ponto de vista em que se collocou Hegner, pois, sendo a fórmula do macronucleo da especie por nós descripta, diferente d'aquella apre-

sentada pelo *Balantidium* do porco e sendo esse caracter constante, não havia razão para estabelecer a identidade das duas especies.

E' preciso levar em conta que a fórma redonda do macronucleo do *Balantidium aragaoi* não póde ser considerada como devida a uma phase especial da evolução do ciliado, pois, nunca encontrámos em todo o material por nós estudado, fórmias com outro aspecto de macronucleo a não ser aquellas, que também foram assignaladas em nosso trabalho, possuindo duas placentas arredondadas e que muito acertadamente considerámos como ex-conjugantes.

Baseados nisso, continuámos a encarar o *Balantidium aragaoi* como uma bôa especie e não vemos razão para pensar de outra maneira, pelo menos, emquanto não fôr demonstrado que as fórmias neutras do *Balantidium coli*, possam apresentar, quando mudando do hospedeiro, macronucleo arredondado.

DO *BALANTIDIUM* PARASITO DO *MACACUS RHEBUS*

Esse ciliado tem sido até agora considerado como sendo da especie *B. coli*. Este modo de vêr se baseia não só na semelhança morphologica que apresentam as fórmias vegetativas desses ciliados, como no facto demonstrado primeiramente por Brumpt (1909) e confirmado mais tarde por Walker (1913) de que o *Balantidium* do porco póde infectar macacos e vice-versa.

Convém assignalar aqui, que Brumpt trabalhou com o *Balantidium* encontrado parasitando o *Macacus cynomolgus*, sendo que, em uma de suas experiencias, esse ciliado se mostrou pathogenico para o porco determinando uma dysenteria, confirmada pela autopsia que revelou lesões do grosso intestino iguaes ás encontradas na balantidiose humana. Walker em seu trabalho não diz com que especie de macacos trabalhou, affirmando sómente, que

conseguiu infectar alguns desses animaes com material humano e do porco contendo *Balantidium*. O exame *post-mortem* de dois desses animaes revelou a presença de fórmias do ciliado no interior das paredes do grosso intestino.

Pelo estudo que fizemos da especie de *Balantidium*, que parasita o *Macacus rhesus*, verificámos que esse ciliado não apresenta em suas fórmias vegetativas nenhuma característica morphologica importante que permita a sua differenciação do *Balantidium coli*. As dimensões das suas fórmias neutras, conforme se póde ver na tabella C do quadro II que figura neste trabalho, embora um pouco menores que as dimensões dadas por Mac Donald para o *Balantidium coli*, apresentam a relação comprimento—largura igual a 1,26, numero que muito se aproxima de 1,30, encontrado pelo mesmo auctor para a especie do porco.

Vê-se portanto, que baseados sómente na morphologia dos elementos vegetativos não se póde separar o *Balantidium* do *Macacus rhesus* da especie *coli*.

Si isso se dá com as fórmias vegetativas o mesmo não acontece com as fórmias de resistencia ou kysticas, como se verá nas linhas que seguem.

ESTUDO DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM* PARASITO DO *MACACUS RHEBUS*

Examinando fézes de *Macacus rhesus* é muito frequente encontrar-se kystos de *Balantidium*, sendo que em alguns casos em grande numero, quer ao lado de fórmias vegetativas do ciliado, quer na ausencia dellas. Os kystos, quando maduros, apresentam-se, pelo exame a fresco, de fórma arredondada, cercados por uma membrana de duplo contorno, refringente, com o seu interior de aspecto granuloso e contendo inclusões. Pelo lugol, póde-se pôr em evidencia no interior do kysto uma grande massa unica ou granulos menores que se coram em pardo e que parecem ser constituídos por glycogenio ou substancia proxima.

Pelo que nos foi dado observar o enkystamento passa-se da seguinte fórma: o ciliado que vae se enkystar não se mostra mais dotado de movimentos de progressão, ficando como que fixo n'um dado ponto, apresentando então intensos movimentos de rotação. Elle se arredonda, dando-se então a formação de uma membrana kystica que, a principio delgada, se mostra depois de um duplo contorno. A estriação, assim como o peristoma, permanecem, podendo ser observados na maioria dos kystos. O movimento de rotação, que no inicio do enkystamento era bastante intenso, vae diminuindo, sendo substituído n'um dado periodo, por simples correntes plasmáticas e essas mesmas desaparecem completamente nos kystos maduros. O ciliado nem sempre enche totalmente o espaço limitado pela membrana kystica, podendo-se notar muitas vezes, um espaço claro comprehendido entre a membrana e o corpo do ciliado.

Nos preparados corados (Feulgen—Delafield) as fórmas iniciaes do enkystamento apresentam-se arredondadas, com uma membrana que póde em alguns exemplares se mostrar desprovida de duplo contorno. No seu interior nota-se um macronucleo guardando ainda aspecto reniforme, deixando vêr um nitido micronucleo collocado no hylo. Já aqui póde-se observar perfeitamente individualizado, como demonstra claramente a coloração pelo methodo de Feulgen, uma massa de substancia de reserva que póde variar de tamanho. N'uma phase mais adiantada, vamos encontrar o macronucleo em fórma de fuso. Por uma especie de estrangulamento desse fuso dá-se a formação de dois novos nucleos que tomam então a fórma arredondada. Tanto nesta ultima phase como na que lhe dá origem, não se consegue evidenciar mais o micronucleo.

A fórma binucleada representa o kysto maduro e é ella que predomina nas

fézes do *Macacus rhesus*. Kystos com 4 nucleos, pódem ser raramente observados e elles se originam das fórmas nas quaes se notam 2 nucleos com aspecto de fusos, que após se dividem formando 4 nucleos.

Pensamos que esses kystos representam fórmas supernucleadas a semelhança do que ocorre em outros protozoarios.

Os kystos medem cerca de 31,4 micra de diametro como se poderá vêr examinando os dados contidos na tabella A do quadro I e os seus 2 nucleos médem cada um cerca de 8 a 10 micra de diametro.

ESTUDO DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM COLI* DO PORCO

Os dados que possuímos actualmente sobre as fórmas kysticas do *Balantidium coli*, são em pequeno numero, o que poderá ser verificado consultando a bibliographia sobre o assumpto. Os trabalhos existentes, principalmente os de Hartmann e de Dobell e O'Connor, descrevem os kystos do *Balantidium coli*, como possuindo um nucleo unico, alongado, semelhante aos encontrados em algumas fórmas vegetativas. Dobell e O'Connor dão 50 a 60 micra para as dimensões dos kystos ao passo que Hartmann dá 40 micra.

Em material proveniente do porco, contendo kystos de *Balantidium coli* e que serviu para o estudo comparativo que procedemos, elles apresentavam-se arredondados, dotados de membrana espessa, com duplo contorno e mediam cerca de 38,8 micra de diametro conforme se póde vêr no quadro I, tabella B. No interior dos kystos, em preparados corados pela trioxyferrihemateina, encontra-se um plasma de aspecto granuloso que póde apresentar no seu interior um ou mais vacuolos. A massa de substancia de reserva que se encontra nas fórmas kysticas do *Balantidium* do *Macacus rhesus* não são encontradas no presente caso.

O macronucleo é unico e apresen-

ta-se muito alongado, encurvado, com as extremidades dilatadas e atravessa o kysto, muitas vezes, quasi de lado a lado. Elle méde de 20 a 30 micra de comprimento. Nas numerosas fórmulas que examinámos não nos foi possível encontrar o micronucleo.

DA POSIÇÃO SYSTEMÁTICA DO *BALANTIDIUM*
DO *MACACUS RHEBUS*

Pelo que acabámos de expôr, pôde-se vêr que si as fórmulas vegetativas do *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus* não se differenciam das do *Balantidium coli*, nem pelas dimensões nem pela morphologia, as fórmulas kísticas desses dois ciliados, apresentam differenças nítidas, representadas principalmente pelo numero de nucleos que elles possuem, quando maduros, bem como pelas suas dimensões.

Esses factos aqui relatados, trazem forte argumento contrario a identidade do *Balantidium* encontrado nas infecções espontaneas do *Macacus rhesus* com o *Balantidium coli*.

O facto de se poder infectar o macaco com o *Balantidium* do porco e vice-versa não pôde ser considerado como argumento definitivo para a identidade dos dois parasitas. Para isso seria preciso demonstrar que o *Balantidium coli* do porco, que ahi forma kystos com nucleo unico, perde essa propriedade quando parasito do macaco, passando as suas fórmulas kísticas a possuirem 2 nucleos. O contrario deveria acontecer quando se infecta o porco com *Balantidium* do macaco. Não só esses factos não foram ainda observados em relação ao *Balantidium*, como é difficil conceber que elles realmente se dêem, pois, identico facto não foi até agora assignalado em nenhum outro protozoario.

Baseados na differença nitida que apresentam as fórmulas enkystadas, propomos crear para o *Balantidium* encontrado em infecções espontaneas do *Macacus rhesus* e que formam kystos com

2 nucleos, uma nova especie que denominaremos:

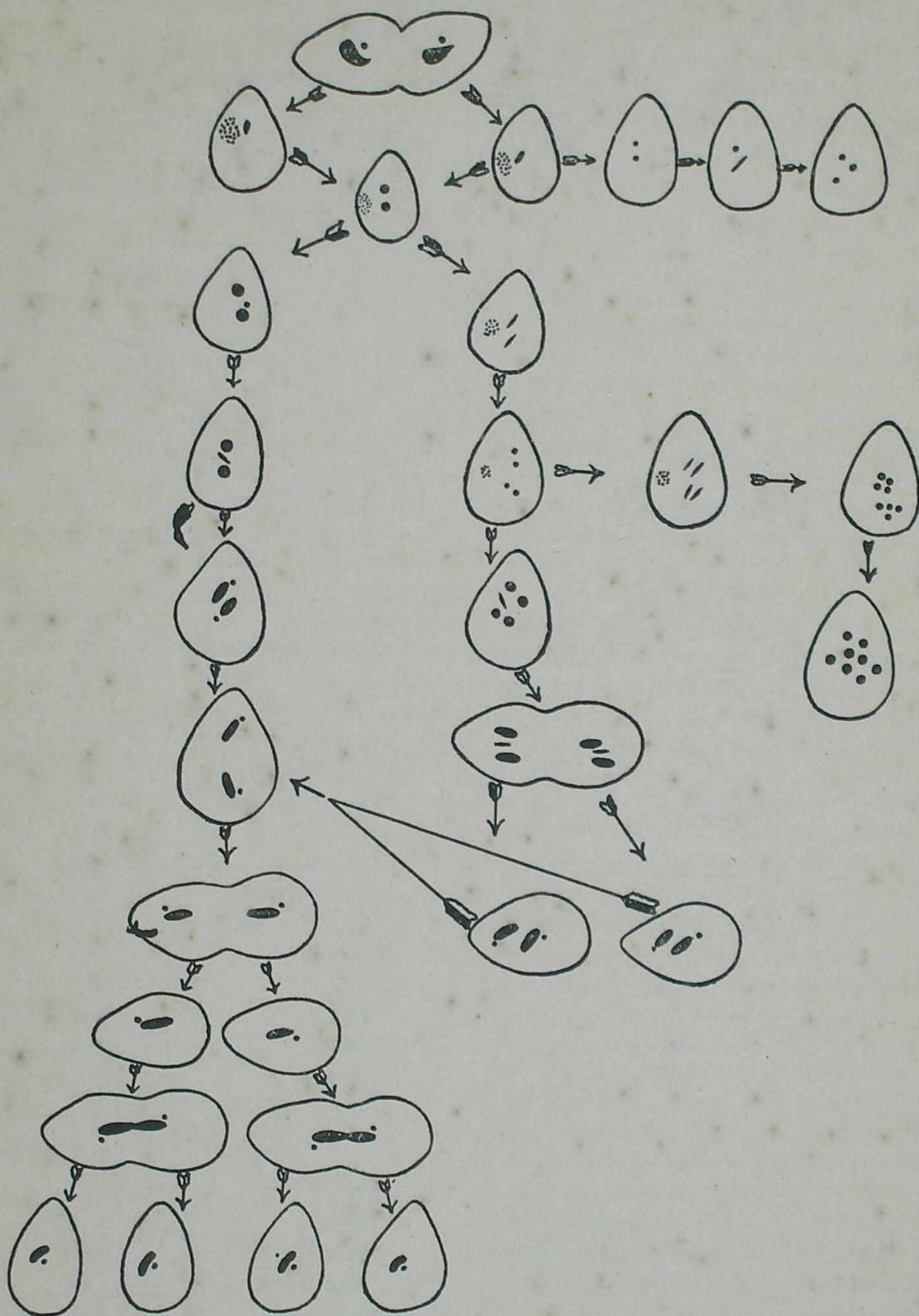
Balantidium simile n. sp.

Diagnose: Ciliado do genero *Balantidium*. Fórmulas vegetativas semelhantes as do *Balantidium coli*, medindo de 61 a 86 micra de comprimento por 51 a 70 micra de largura. Relação comprimento/largura igual a 1,26. Kystos arredondados, medindo de 23 a 38 micra de diametro, possuindo, quando maduros, 2 nucleos redondos (excepcionalmente 4) e uma ou mais massas de substancias de reserva. Esta especie geralmente não é pathogenica para o *Macacus rhesus*.

Habitat: caecum e grosso intestino de *Macacus rhesus*.

Quadro I

DIMENSÕES DOS KYSTOS DO <i>BALANTIDIUM SIMILE</i> , DO <i>MACACUS RHEBUS</i>		DIMENSÕES DOS KYSTOS DO <i>BALANTIDIUM COLI</i> DO PORCO	
TABELLA A		TABELLA B	
36,4	micra	43	micra
32,2	«	38,7	«
38,7	«	36,4	«
23,6	«	36,4	«
26,4	«	43,0	«
36,4	«	43,0	«
27,9	«	38,7	«
26,4	«	38,7	«
36,4	«	36,4	«
26,4	«	38,7	«
36,4	«	38,7	«
36,4	«	47,3	«
26,4	«	38,7	«
32,2	«	36,4	«
36,4	«	36,4	«
27,9	«	36,4	«
32,2	«	43,0	«
36,4	«	30,1	«
26,4	«	38,7	«
27,9	«	38,7	«
Média 31,4	micra	Média 38,8	micra



Schema do phenomeno de *endomixis* no *Balantidium simile*.

O PHENOMENO DE *ENDOMIXIS* NO *BALANTIDIUM SIMILE*

O phenomeno de *endomixis* foi pela primeira vez observado por Hertwig e mais tarde detalhadamente descripto por Woodruff e Erdmann no *Paramecium aurelia*. Um processo semelhante tem sido assignalado em outros ciliados passando-se o phenomeno ou nas fórmas vegetativas ou após o enkystamento do protozoario. Até agora todos os ciliados nos quaes o processo tem sido observado, são protozoarios de vida livre.

As nossas observações sobre a existencia de identico processo no *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus* constituem a primeira observação do phenomeno em ciliados parasitos.

Segundo pudemos verificar, esse phenomeno é bastante frequente no caso do *Balantidium* do *Macacus rhesus*. Elle se passa como a conjugação sob a fórma de verdadeiras epidemias tomando parte nelle a maioria dos individuos.

Apesar da correlação que existe entre as varias phases do processo, expressa pela predominancia n'um mesmo material de uma determinada phase, acontece encontrarem-se sempre, embora em menor numero, ao lado daquella que predomina, phases mais adiantadas ou mais atrasadas.

O phenomeno póde se repetir n'um mesmo animal em espaço de tempo relativamente curto; é assim que n'um dos macacos que forneceu material para nossos estudos (*Rhesus* nº 58) esse phenomeno poude ser observado nos dias 10, 15 e 18 de Janeiro do corrente anno.

A duração das diversas phases do phenomeno é muito variavel, sendo as do inicio e as finaes do processo as mais rapidas emquanto que a phase de placenta é a mais demorada.

PHENOMENOS QUE PRECEDEM O PROCESSO DE *ENDOMIXIS*

A existencia de phenomenos especiaes precedendo o processo de *endomixis*, á semelhança do que ocorre na conjugação, embora prevista por Dogiel, não havia sido até agora assignalada.

Em nosso caso verificámos que o processo de *endomixis* é precedido de divisões binarias, que se differenciam d'aquellas dos individuos neutros por certas características. No correr do nosso trabalho as denominaremos de divisões progamicas deixando para justificar mais tarde a razão dessa designação.

Quanto ao seu numero não podemos precisar, mas podemos garantir não serem ellas menos de duas, pois, foi esse o numero de divisões que tivemos occasião de observar. Entre si essas duas divisões se differenciavam pelo facto de que as resultantes de uma dellas apresentavam os seus nucleos (macro e micronucleo) em via de alterações especiaes, que estudaremos mais tarde e que indicam o inicio do phenomeno de *endomixis*, enquanto que os da outra nada apresentavam para o lado do aparelho nuclear a não ser uma simples reconstituição que apparece no final de todo o processo de divisão. A primeira dellas representa sem duvida, a ultima das divisões progamicas emquanto que a outra deve representar uma divisão anterior.

Essas duas divisões progamicas se differenciam das divisões das fórmas neutras, por darem origem a individuos de dimensões muito menores como se póde observar comparando a figura 4 da estampa XLIX e 10 e 11 da estampa LI.

A figura 4 da estampa XLIX representa uma fórma de divisão encontrada entre uma população constituida exclusivamente por individuos neutros ao passo que as fórmas representadas nas figuras 10 e 11 da estampa LI provém de material no qual se encontrou grande numero de fórmas iniciaes do phenomeno.

As dimensões de cada individuo tomadas na phase final da ultima divisão progamica são semelhantes ás dos individuos nos quaes se observa o inicio do phenomeno de *endomixis*. Assim, na fórma representada na figura 11 estampa LI o individuo anterior media 43 micra de comprimento por 28 micra de largura, e a posterior 45 por 30 micra, numeros comprehendidos entre as dimensões extremas dos individuos nos quaes se inicia o processo de *endomixis*, que são de 36 a 46 micra de comprimento por 25 a 36 de largura.

Antes mesmo da completa separação dos dois ciliados resultantes da ultima divisão progamica, já o micronucleo se apresenta muito augmentado de volume e as vezes mesmo em inicio de divisão, acompanhada então nesse caso de começo de degeneração do macronucleo.

Jameson, em seu trabalho sobre conjugação do *Balantidium coli*, refere que o phenomeno é precedido do apparecimento de individuos pequenos que se multiplicam rapidamente ao mesmo tempo que decrescem de tamanho, facto este que se assemelha ao que observámos no presente caso. Além disso, as dimensões dadas por Jameson para os preconjugantes são por assim dizer iguaes ás que encontramos nos individuos em que se inicia a *endomixis*. Foram esses factos que nos levaram a identificar as divisões que precedem o phenomeno de *endomixis* ás divisões progamicas.

FORMAS EM QUE SE INICIA O PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*

Os individuos nos quaes vae se proceder o phenomeno de *endomixis* e que se originam dos individuos neutros por uma serie de divisões progamicas, conforme expuzemos acima, apresentam certos caracteres que os distinguem desses individuos. As suas dimensões são muito menores conforme se póde vêr claramente comparando os dados das tabel-

las A e C do quadro II que damos em seguida. Na tabella C estão as dimensões de varios individuos neutros e na tabella A as dimensões de igual numero de individuos nos quaes se inicia o phenomeno de *endomixis*. As médias dessas dimensões são as seguintes: 73,7 micra para os primeiros e 41,4 para o segundo, o que quer dizer que o comprimento dos primeiros representa 1,7 vezes o dos segundos. Pelos dados contidos nessas tabellas verifica-se que as fórmas nas quaes se inicia o phenomeno de *endomixis* apresentam-se mais alongadas que as neutras, conforme mostra a relação comprimento—largura que nas primeiras é de 1,46 enquanto que nas segundas é de 1,26.

As fórmas em que se inicia a *endomixis*, são em geral desprovidas de inclusões alimentares e se apresentam ao exame a fresco com aspecto hyalino e muito moveis.

Quanto aos vacuolos contracteis, pelo que pudemos observar, parece que essas fórmas possuem um unico em lugar dos dois que se encontram nos individuos neutros.

O micronucleo apresenta-se muito augmentado de volume e geralmente collocado proximo do macronucleo.

O macronucleo apresenta-se geralmente com uma das extremidades afilada, facto esse, devido a elle não se reconstituir após a divisão progamica e entrar logo em degeneração, como se póde vêr nas figuras 12 e 13 da estampa LI.

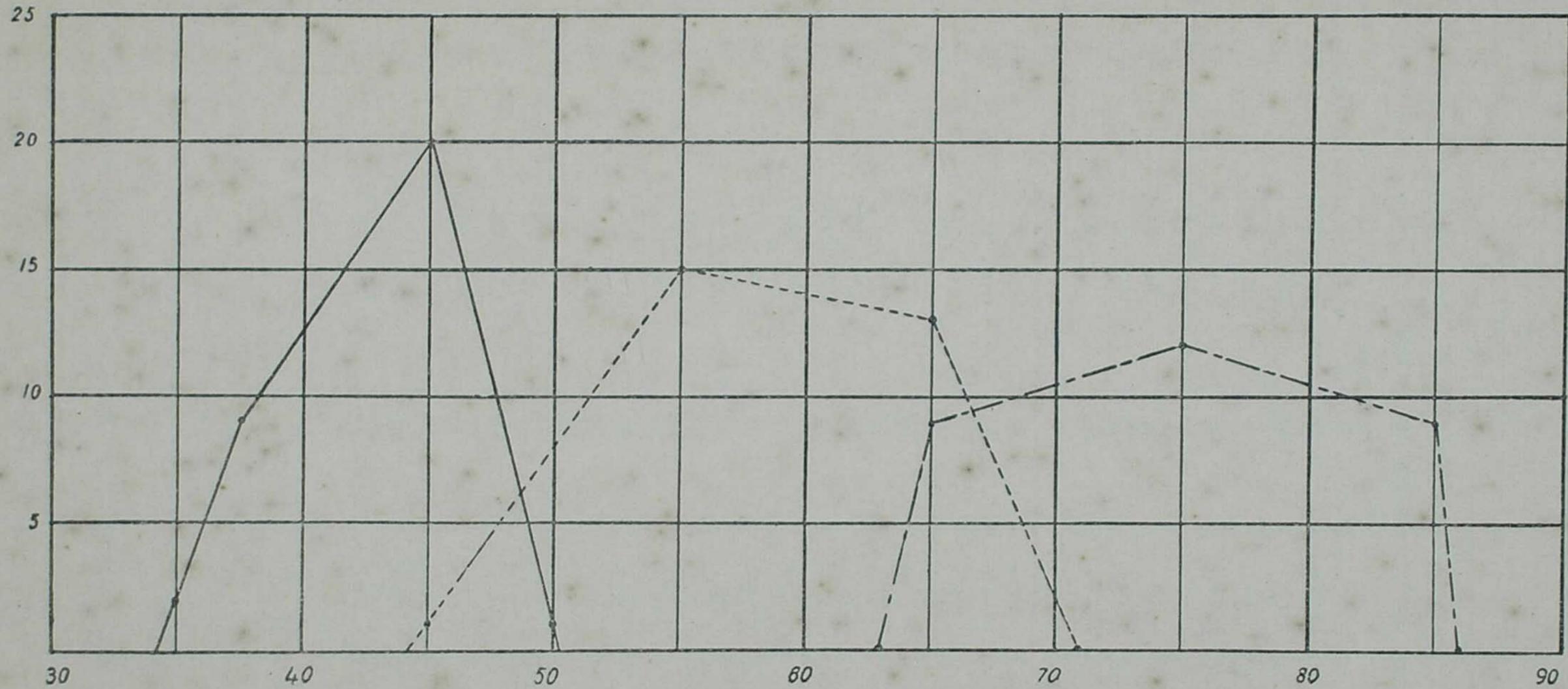
Os caracteres que acabamos de assignalar são semelhantes aos que se observam nos preconjugantes de outros ciliados, principalmente o augmento de volume do micronucleo.

Além disso, si compararmos as dimensões dos preconjugantes do *Balantidium coli* dados por Jameson (45×21 micra, em média), veremos que ellas são sensivelmente iguaes ás das fórmas que acabamos de estudar.

Quadro II

C = comprimento; L = largura; R = relação comprimento e largura.

TABELLA A FÓRMAS PROGAMICAS			TABELLA B FÓRMAS COM PLACENTA			TABELLA C FÓRMAS NEUTRAS		
C	L	R	C	L	R	C	L	R
36 micra	30 micra	1,20	55 micra	35 micra	1,57	83 micra	58 micra	1,43
40 «	30 «	1,33	51 «	33 «	1,54	66 «	53 «	1,24
35 «	28 «	1,25	50 «	43 «	1,16	80 «	63 «	1,27
50 «	30 «	1,66	65 «	38 «	1,71	60 «	53 «	1,13
48 «	30 «	1,60	56 «	43 «	1,30	83 «	70 «	1,18
38 «	31 «	1,22	45 «	31 «	1,45	61 «	51 «	1,19
35 «	26 «	1,34	60 «	35 «	1,71	86 «	63 «	1,36
45 «	31 «	1,45	58 «	36 «	1,61	66 «	56 «	1,17
41 «	32 «	1,28	63 «	38 «	1,65	68 «	53 «	1,28
45 «	26 «	1,73	51 «	30 «	1,70	66 «	58 «	1,13
45 «	28 «	1,60	56 «	35 «	1,60	80 «	63 «	1,27
38 «	23 «	1,65	56 «	31 «	1,80	83 «	65 «	1,27
40 «	26 «	1,53	51 «	30 «	1,70	86 «	70 «	1,22
46 «	25 «	1,84	63 «	36 «	1,75	81 «	56 «	1,44
40 «	35 «	1,14	60 «	31 «	1,93	70 «	58 «	1,20
43 «	30 «	1,43	51 «	35 «	1,45	73 «	55 «	1,32
45 «	36 «	1,25	50 «	43 «	1,16	76 «	61 «	1,24
40 «	30 «	1,33	50 «	33 «	1,51	76 «	58 «	1,31
46 «	30 «	1,53	51 «	35 «	1,45	70 «	58 «	1,20
36 «	30 «	1,20	63 «	35 «	1,80	73 «	61 «	1,19
46 «	33 «	1,39	71 «	38 «	1,86	83 «	60 «	1,38
41 «	25 «	1,64	51 «	36 «	1,41	63 «	45 «	1,40
41 «	28 «	1,46	53 «	40 «	1,32	68 «	53 «	1,28
38 «	33 «	1,15	60 «	36 «	1,66	76 «	53 «	1,43
36 «	25 «	1,44	66 «	38 «	1,73	73 «	60 «	1,21
40 «	28 «	1,43	66 «	36 «	1,83	71 «	58 «	1,22
36 «	23 «	1,56	65 «	36 «	1,80	71 «	56 «	1,26
46 «	28 «	1,64	66 «	36 «	1,83	76 «	61 «	1,24
40 «	26 «	1,53	63 «	38 «	1,65	75 «	56 «	1,33
46 «	23 «	2,00	68 «	40 «	1,70	68 «	61 «	1,11
			Médias					
41,4 micra	28,6 micra	1,46	57,8 micra	36 micra	1,61	73,7 micra	58 micra	1,26



GRAPHICO DAS DIMENSÕES DO *BALANTIDIUM SIMILE* DURANTE AS DIVERSAS PHASES DO PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*, BEM COMO DAS FÓRMAS NEUTRAS.

As abscissas representam o comprimento do ciliado em micra e as ordenadas o numero de ciliados de cada dimensão.

- Individuos na phase inicial do phenomeno.
 - - - - - Individuos com 2 placentas.
 - . - . - . Individuos neutros.

Baseados nesses factos, consideramos os individuos nos quaes se inicia o phenomeno de *endomixis* como *preconjugantes* e assim os denominaremos no correr do nosso trabalho.

ALTERAÇÕES POR QUE PASSA O MICRONUCLEO DESDE O INICIO DO PHENOMENO ATE' A FORMAÇÃO DAS DUAS PLACENTAS

A primeira modificação que soffre o micronucleo é o augmento de volume, que se inicia, conforme vimos anteriormente, antes mesmo da separação dos preconjugantes após a ultima divisão progamica.

O micronucleo apresenta-se então espherico, deixando ver pequeno numero de finissimos granulos de chromatina no interior de uma massa achromatica. Elle se acha situado geralmente proximo ao macronucleo podendo entretanto algumas vezes se achar afastado d'elle.

Em seguida entra em divisão que se faz por mitose com a formação de um fuso achromatico, e o apparecimento de uma placa equatorial constituídos por chromosomas cujo numero foi de todo impossivel determinar. Esta é a phase mais commumente encontrada no periodo inicial do phenomeno e se acha representada na figura 15 estampa LI.

Dá-se depois a divisão da placa equatorial seguida de migração para os polos das placas resultantes dessa divisão. Esse phenomeno é acompanhado do estiramento do fuzo e de seu estrangulamento na parte média (fig. 16, estampa LII).

Logo após a separação dos dois nucleos resultantes dessa divisão e antes mesmo da completa reconstituição dos mesmos, já se observa augmento de volume desses nucleos.

Esse augmento de volume corre por conta principalmente da rêde de linina e os nucleos se apresentam então muito pobres em chromatina que se dispõe em granulos esparsos nas traves dessa rêde (fig. 17, estampa LII).

Essa phase do processo parece se processar rapidamente dada a sua pequena frequencia no material por nós estudado.

Com o crescimento, os nucleos resultantes da divisão do micronucleo tomam o aspecto de duas placentas á semelhança do que se observa em outros ciliados.

Mais raramente encontrámos fórmias apresentando duas mitoses do micronucleo. De nossas pesquisas podemos concluir que essas ultimas fórmias correspondem ao caso especial e raro da formação de 4 placentas.

No processo predominante, aquelle em que se formam 2 placentas, ha uma unica mitose do micronucleo.

Si houvesse nesse caso 2 mitoses dahi se originariam 4 nucleos e forçosamente 2 delles tinham de degenerar formando-se as placentas a custa dos dois outros. Mas acontece que nunca observámos micronucleo em via de degeneração nem a persistencia delles ao lado das duas placentas conservando o seu primitivo aspecto. Observam-se tambem fórmias, como a representada na figura 17 da estampa LII, em que se vêem os dois nucleos resultantes da mitose do micronucleo apresentando ainda signaes dessa divisão e já em via de se transformarem em placentas. Além disso, as fórmias com uma mitose são as que predominam em nosso material, o mesmo acontecendo com as fórmias com duas placentas.

ALTERAÇÕES DO MACRONUCLEO DURANTE O PHENOMENO

A degeneração do macronucleo começa as vezes antes mesmo da separação dos dois preconjugantes resultantes da ultima divisão progamica. O macronucleo não chega a se reconstituir após essa divisão, conforme mostra a persistencia de uma extremidade afilada, vestigio de divisão recente, nas fórmias iniciaes do phenomeno onde se observam os primeiros signaes de sua degeneração.

A degeneração se faz pelo afrouxamento da rêde de linina e o apparecimento de granulos intensamente corados.

Esses granulos ás vezes se condensam na peripheria do macronucleo cuja parte central mostra aspecto vacuolado.

A medida que esses granulos augmentam de volume o seu numero diminue, o que se pôde explicar pela sua fuzão. Ao mesmo tempo que isso se dá, ha como uma retracção do volume do macronucleo. Em phase mais adiantada o macronucleo é representado por uma massa unica, redonda, compacta e intensamente corada, de dimensões muito menores que as dimensões primitivas do macronucleo. Essa massa diminue progressivamente de tamanho até completo desaparecimento. Excepcionalmente se observa fragmentação do macronucleo em degeneração. O completo desaparecimento do macronucleo se dá durante a phase de crescimento das placentas.

DESENVOLVIMENTO DAS PLACENTAS E FORMAÇÃO DO MICRONUCLEO

Conforme vimos, mal terminada a divisão do micronucleo, os nucleos dahi resultantes crescem rapidamente transformando-se em placentas. Elles se mostram então constituídos por uma rêde de linina em cujas traves se dispõe a chromatina sob a fórmula de granulos finos e irregularmente dispostos (figura 17, estampa LII). A evolução da placenta se faz pelo rapido crescimento da rêde de linina e da membrana, que adquirem logo as dimensões de quando completamente desenvolvidas. O augmento da chromatina é menos rapido e se faz pelo crescimento do volume dos granulos que ficam a principio condensados na parte central, cercados de um espaço claro constituído exclusivamente de substancia achromatica, que é separado do protoplasma por uma nitida membrana. Em uma dessas fórmulas o tamanho total da placenta é de 10 micra enquanto que a parte central, occupada pela chroma-

tina, apenas media 5 micra. Essa massa central chromatica cresce pouco a pouco até occupar quasi completamente o espaço limitado pela membrana da placenta. Esse crescimento é devido ao augmento da chromatina, pois essa massa central que a principio se corava fracamente, agora, quando completamente crescida, apresenta-se intensamente corada. As placentas perfeitamente desenvolvidas medem de 8 a 12 micra de diametro e apresentam então a seguinte estrutura: um corpo central chromatico enchendo quasi completamente o espaço claro que é limitado pela membrana. Esse corpo se mostra de fórmula geralmente arredondada mas de contorno muitas vezes irregular, tendo em seu interior a chromatina, que ahi se dispõe irregularmente sobre a fórmula de finos granulos, como tambem em massas maiores, que se apresentam então muitas vezes cercadas por ligeiro halo claro. Além dos granulos de chromatina notam-se quasi sempre no interior desse corpo pequenos vacuolos de numero variavel e collocados ou na parte mais interna ou na peripheria concorrendo então para tornar o seu contorno de aspecto irregular.

Durante as varias phases do crescimento da placenta não se observa o micronucleo o que podemos assegurar baseados na observação de centenas de fórmulas.

As placentas a principio afastadas, approximam-se depois até se collocarem uma ao lado da outra.

A formação do micronucleo se faz a custa de uma das placentas conforme mostram claramente as figuras 19 e 20 da estampa LII.

Ahi vemos o micronucleo corando-se menos intensamente que a placenta, alojado em uma depressão desta e ainda envolto pela membrana placentaria.

O micronucleo é expulso da placenta já completamente constituído e não nos foi possivel observar como elle se fór-

ma no interior dellas, devido á existencia das massas de chromatina que acima assignalámos.

A expulsão do micronucleo se dá geralmente quando as placentas estão proximas uma da outra, sendo que em alguns casos, porém, isso se dá quando ellas se acham ainda afastadas (figuras 21 e 22, estampa LIII).

Com a approximação das placentas e formação do micronucleo este fica geralmente collocado entre ellas.

As placentas perdem então a fórma espherica e as faces que ficam voltadas uma para outra, apresentam-se achatadas ou mesmo dotadas de uma concavidade limitando um espaço, geralmente de fórma lenticular, em que se aloja o micronucleo. Esse espaço fica como que forrado pelas membranas das duas placentas.

Durante esse periodo o ciliado cresce principalmente no comprimento, medindo 45 a 71 micra de comprimento por 30 a 43 de largura ou em média $57,8 \times 36$. A relação comprimento—largura que era em média nos preconjugantes de 1,46, passa aqui a 1,61, o que demonstra a nossa asserção.

As fórmas com duas placentas já desenvolvidas com ou sem micronucleo, são as que se observam com mais frequencia o que indica ser essa a phase mais demorada do processo de *endomixis*.

RECONSTITUIÇÃO DO APPARELHO NUCLEAR

As transformações por que passa o aparelho nuclear, da phase que acabamos de estudar até adquirir a estructura typica que apresentam as fórmas neutras, são acompanhadas de duas divisões do ciliado, de modo que, de um individuo em que se passa o phenomeno de *endomixis*, se originam quatro individuos neutros.

O processo se inicia pela divisão do micronucleo. Esta se faz por mitose, que

differe das anteriormente descriptas por ser o fuso muito menor.

A divisão do micronucleo se faz geralmente quando as duas placentas se acham proximas uma da outra collocando-se então o fuso entre ellas.

No caso em que o micronucleo se forma muito antes da approximação das placentas, a divisão delle póde se iniciar com ellas ainda afastadas.

Uma vez terminada a divisão, cada um dos micronucleos della resultantes se colloca junto de uma das placentas.

Estas então se alongam tomando a forma de faixa cujo comprimento é de 2,5 a 3 vezes a sua largura.

A principio ellas permanecem ao lado uma da outra, sendo que o estiramento se faz em sentidos parallellos.

Os micronucleos se collocam então, cada um delles junto a extremidade de cada placenta mas, em sentido opposto.

As placentas assim alongadas, emigram dirigindo-se cada uma dellas para uma das extremidades do ciliado. Essa migração se faz no sentido de sua maior dimensão, occupando o micronucleo geralmente a extremidade na direcção da qual se dá a migração.

Em alguns casos póde o micronucleo se collocar ao lado dessa extremidade, mas sempre proximo della.

Concomitantemente apparecem signaes de divisão do plasma que se accentuam a medida que se dá a migração das placentas, até completa separação dos dois ciliados, cada um dos quaes fica com uma placenta alongada em fórma de faixa e um micronucleo situado junto de uma das extremidades da mesma.

A estructura que apresenta a placenta nestas fórmas é muito caracteristica, pois, a sua chromatina se dispõe sob a fórma de filamentos que percorrem a placenta no seu maior comprimento, dando a impressão de estar ella se estirando para entrar em divisão. Por esses carac-

teres essas fórmulas podem ser facilmente distinguidas dos individuos neutros.

Os individuos assim formados entram em nova divisão que se inicia pela do micronucleo indo se collocar cada um dos resultantes da divisão, junto ás extremidades da placenta cujo estiramento é nesse momento mais pronunciado.

Dá-se então o estreitamento da parte média da placenta até completa divisão da mesma, que é acompanhada da do plasma formando-se assim dois ciliados cada um dos quaes com um micronucleo e uma placenta que se reconstitue adquirindo o aspecto do macronucleo dos individuos neutros.

Essa segunda divisão se distingue da divisão das fórmulas neutras não só por apparecer em material em que predominam os individuos com 2 placentas e juntamente com as fórmulas da divisão precedente, como por outros caracteres que iremos precisar e que permitem reconhecer-a com segurança.

E' assim que na divisão das fórmulas vegetativas o macronucleo estirado fica situado na parte média do ciliado coincidindo o plano de sua divisão com o do plasma: na divisão final do processo de *endomixis* nem sempre isso se dá, pois, a placenta estirada permanece geralmente proxima a uma das extremidades do ciliado e o plano de divisão da placenta não coincide com o do plasma, não existindo tambem perfeita correlação entre esses dois processos.

Além disso, nessas fórmulas, o macronucleo em divisão se mostra muito menos volumoso em relação ao plasma do que nas fórmulas correspondentes da divisão dos individuos neutros.

O que acabamos de affirmar melhor do que em qualquer descripção, resalta da comparação das figs. 4 da estampa XLIX e 32, 33 e 34 da estampa LV e das microphotographias nº 2 da estampa LX, nºs. 21 e 22 da estampa LXIII e nºs. 23, 24 e 25 da estampa LXIV.

VARIANTES DO PROCESSO DE *ENDOMIXIS*

O phenomeno de *endomixis* embora se passe na maioria das vezes da fórmula que acabamos de descrever, pôde num pequeno numero de individuos apresentar variantes constituídas pela formação de maior numero de placentas que na fórmula habitual.

Dessas variantes a mais frequente é aquella em que se formam 4 placentas, podendo-se ainda excepcionalmente encontrar fórmulas com 3 e 8 placentas.

Não podemos estabelecer a percentagem de frequencia dessas variantes, pois, mesmo no caso mais commum entre ellas, o de fórmulas de 4 placentas, era preciso muitas vezes percorrer um ou mais preparados cheios de individuos com 2 placentas para encontrar algumas fórmulas dessa variante.

Quanto aos dois outros casos, para dar uma ideia de sua extrema raridade, basta lembrar que em todo o nosso material, só duas vezes encontramos fórmulas com 8 placentas, uma unica com 3.

Por isso mesmo, no estudo dessas variantes, apenas a primeira, aquella em que se fórmam 4 placentas, pode ser melhor estudada.

CASO EM QUE SE FORMAM 4 PLACENTAS

Como vimos na parte em que estudámos as alterações por que passa o micronucleo desde o inicio do phenomeno até a formação das placentas, encontram-se raramente fórmulas apresentando 2 mitoses do micronucleo. Expuzemos então as razões que nos levaram a não incluir essas fórmulas no decurso habitual do phenomeno, considerando-as como estadio inicial da variante em que se fórmam 4 placentas.

Dessas duas mitoses resultam 4 micronucleos que crescem transformando-se em placentas. Estas se apresentam geralmente na parte média ou posterior do ciliado e, em uma phase adiantada, agrupam-se duas a duas.

O micronucleo, como no caso de 2 placentas, é unico e se forma a custa de uma das placentas. Esse micronucleo se divide dando dois outros.

Os grupos constituídos cada um delles, por um micronucleo resultante dessa divisão e duas placentas, se afastam em direcção ás extremidades oppostas do ciliado, ao mesmo tempo que se inicia a divisão do plasma. Terminada esta, fica cada ciliado della resultante com duas placentas e um micronucleo, que entra em divisão, como no caso da formação de 2 placentas.

CASOS DE 3 E DE 8 PLACENTAS

Desses dois casos sómente pudemos observar individuos em que as placentas já se acham formadas, sem termos visto nenhuma das phases que precedem a sua constituição nem sua evolução posterior para individuos neutros.

Creemos porém não ser difficil explicar a origem das fórmulas que observámos nesses dois casos.

Quando se dá a formação de 3 placentas após a primeira mitose do micronucleo, um dos nucleos dahi resultantes evolue logo para placenta enquanto que o outro soffre uma nova divisão.

No caso de 8 placentas temos 3 divisões successivas do micronucleo das quaes resultam 8 nucleos que evoluem posteriormente para placentas.

CONSIDERAÇÕES GERAES

Si considerarmos o phenomeno descrito no presente trabalho em sua essencia, veremos que elle consiste na substituição do primitivo macronucleo que degenera por um novo formado a custa do micronucleo, tudo isso se passando sem o concurso de outro individuo e sem fusão de chromatina. Assim não póde subsistir duvida de que se trata de um phenomeno de *endomixis*.

Em dois pontos o phenomeno agora observado differe das descripções exis-

tentes de identico processo em outros ciliados.

O primeiro se refere a existencia, precedendo o processo, de divisões do ciliado das quaes resultam fórmulas especiaes, differentes das fórmulas neutras e que identificamos aos preconjugantes.

Esse facto, embora não tenha sido anteriormente assignalado, deve ser considerado, não como peculiar ao presente caso, mas sim como um processo geral e necessario para a realização do phenomeno.

O outro ponto se refere a transformação dos nucleos resultantes da divisão do micronucleo em placentas, e formação posterior de um novo micronucleo a custa de uma dellas.

No caso do *Paramecium* e de outros ciliados, os nucleos resultantes da divisão do micronucleo têm destino diverso, uns se transformando em placentas, e outros permanecendo como micronucleos. No caso do *Balantidium* isso não acontece, pois, como vimos, todos os nucleos formados pela divisão do micronucleo se transformam em placentas, dando origem, assim, a fórmulas nas quaes não existe micronucleo. Este se fórma depois a custa de uma das placentas.

Por ser a phase em que se observam duas placentas com ou sem micronucleo, a de mais longa duração do processo e portanto aquella que se encontra com mais frequencia, já tinha sido ella observada por outros auctores em ciliados do genero *Balantidium*. E' assim que Hegner e Holmes encontraram fórmulas semelhantes no *Balantidium* parasito do *Cebus variegatus* e as interpretaram como individuos em que se havia dado a divisão do macronucleo sem divisão simultanea do plasma.

A observação em algumas dessas fórmulas do micronucleo em divisão é encarada por elles como argumento favoravel a essa interpretação.

As massas de chromatina que muitas vezes se observam no interior das placentas, foram consideradas como chromosomas e comparados aos chromosomas trophicos das *Opalinas*.

Felix Pritze observou fórmulas idênticas no *Balantidium* parasito do porco e dá para ellas a mesma interpretação.

Em nosso trabalho sobre o *Balantidium aragaoi* assignalámos tambem fórmulas com duas placentas interpretando-as como ex-conjugantes.

Os resultados do presente trabalho, bem como os do trabalho de Jameson sobre a conjugação no *Balantidium coli*, mostram o acerto de nossa interpretação e o quanto se afasta da verdade a maneira de vêr dos autores acima citados.

Presentemente tivemos occasião de encontrar em material de *Balantidium coli*, quer de proveniencia humana, quer do porco, individuos apresentando duas placentas. O mesmo facto foi observado em outros ciliados como na *Isotricha ruminantium* e *Bütschlia parva* por Dogiel e na *Paraisotricha acuminata* por nós.

Da observação de fórmulas com duas placentas não se póde concluir da existencia do phenomeno de *endomixis*, pois ellas tambem occorrem na conjugação. No caso especial do *Balantidium*, fórmulas semelhantes foram observadas por Jameson em ex-conjugantes. Jameson diz que os dois pronucleos não se fundem e que ha indicios de que um corpusculo menor que elle considera como sendo o micronucleo, se fórma a custa delles de maneira indeterminada.

Pelos estudos desse autor sobre a conjugação do *Balantidium*, vê-se a semelhança existente entre os dois phenomenos, facto aliás já observado em outros ciliados.

Jameson admite a fusão das duas placentas para formar o macronucleo. Em nosso caso é fóra de duvida que isso não se dá e é provavel que o mesmo aconteça na conjugação o que só

poderá ser decidido por novas pesquisas. A formação de mais de uma placenta e a divisão posterior do plasma para distribuição dellas em tantos individuos quantas são as placentas, já eram conhecidas em outros ciliados, tanto na *conjugação* como na *endomixis* e foram interpretadas por Schweyer como caso de *polyembryonia*, a semelhança do que ocorre em certos metazoarios.

SIGNIFICAÇÃO DO PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*

Hertwig, que pela primeira vez observou o processo de *endomixis*, o considerou como um phenomeno de parthenogenese e assim o denominou.

Mais tarde Woodruff e Erdmann, que estudaram detalhadamente o phenomeno no *Paramecium aurelia*, não se mostraram favoraveis a essa opinião, creando então, para designar o phenomeno, o novo termo de *endomixis*.

Os autores que consideram a *endomixis* como um caso de parthenogenese baseiam suas convicções na semelhança que apresenta esse phenomeno com a conjugação em todas as suas phases, a não ser na divisão de redução, na troca e fusão de nucleos, isto é, nas phases que caracterisam o phenomeno de fecundação.

Woodruff e Erdmann acham, para que o phenomeno de *endomixis* seja considerado como um caso de parthenogenese, necessario demonstrar nelle a existencia de uma divisão de redução e ainda mais que o micronucleo em que se passa o phenomeno corresponda ao nucleoleo de um gameto.

O facto de não existir uma terceira divisão do micronucleo no phenomeno de *endomixis* do *Paramecium aurelia* não prova que não exista redução do numero de chromosomas, pois, como sabemos, essa redução não se faz muitas vezes na terceira divisão e sim numa divisão anterior como é o caso do *Dididium nasutum* estudado por Prandtl e do *Chilodon uncinatus*, de accordo com Enriques.

Mesmo que se demonstrasse a não existencia de redução na *endomixis*, ainda assim não haveria motivo para não ser ella considerada como parthenogenese, a não ser que se adoptasse a opinião de Strasburger.

Essa opinião não é seguida pela maioria dos autores e assim Winkler divide a parthenogenese em dois grupos, aquelles em que não ha redução, *parthenogenese somatica* ou *diploide* e aquelles em que ha redução, *parthenogenese geradora* ou *haploide*.

Nem nos parece razoavel a necessidade de redução no phenomeno de parthenogenese, pois, ella não se observa em muitos casos na formação dos gametos vindo a se dar sómente após a fecundação, como no caso dos coccidios, para só citar um exemplo entre os protozoarios. Erdmann, em trabalho posterior, já considera o phenomeno de *endomixis* como um caso de parthenogenese diploide.

A demonstração feita por Dogiel da existencia, precedendo o phenomeno de conjugação, de divisões especiaes (divisões progamicas), das quaes resultam individuos com caracteres proprios, diferentes daquelles das fórmulas neutras e destinados a conjugação (*preconjugantes*), veio até certo ponto alterar a semelhança

entre os dois phenomenos, pois esse facto não havia sido observado na *endomixis*.

Como vimos, um dos factos principaes de nossas pesquisas é exactamente a demonstração da existencia, precedendo o phenomeno de *endomixis*, de divisões das quaes resultam individuos diferentes dos individuos neutros e nos quaes se processa o phenomeno. Ainda mais, mostrámos como, em nosso caso, esses individuos são identicos aos preconjugantes do mesmo ciliado, conforme se póde vêr comparando as fórmulas por nós estudadas com as descriptas por Jameson na conjugação do *Balantidium*.

Esse facto, como já dissemos, não deve ser considerado como peculiar ao caso do *Balantidium* por nós estudado e sim como um processo geral e necessario para que se dê o phenomeno de *endomixis*. Se elle ainda não havia sido observado, é porque não se conhecia até agora phenomeno de *endomixis* em nenhum ciliado parasito, onde a differença dos preconjugantes e dos individuos neutros é mais accentuada.

Vemos, assim, que o phenomeno de *endomixis* se passa, não em uma cellula somatica, mas em um preconjugante, isto é, em uma fórmula do ciliado destinado a fecundação, o que traz forte argumento em favor daquelles que consideram o phenomeno de *endomixis* como um caso de parthenogenese.

Bibliographia

- BRUMPT, E. 1909.—Demonstration du rôle pathogène du *Balantidium coli*. C. R. Soc. Biol. Vol. 67.
- CALKINS, G. e BOWLING, R. 1929.—Studies on *Dallasia frontata* Stokes II cytology, gametogamy and conjugation. Arch. f. Protistenkunde Bd. 66, H. 1.
- CUNHA, A. M. e MUNIZ, J. 1927.—Sobre os ciliados do genero *Balantidium* parasitos dos macacos. Boletim Biologico. Abril—Fasc. 5.
- DOBELL, C. e O'CONNOR, F. W. 1921.—The Intestinal Protozoa of Man. London.
- DOGIEL, V. 1925.—Die Geschlechtsprozesse bei Infusorien (speziell bei den Ophryoscoleciden). Arch. f. Protistenkunde. Bd. 50.

- DOGIEL, V. 1928.—Ueber die Conjugation von *Bütschlia parva*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 62.
- ENRIQUES, P. 1907, 1908.—La conjugazione negli Infusori, I. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 9 e 12.
- ERDMANN, R. 1922.—Art und Artbildung bei Protisten. Biologisches Zentralblatt. Bd. 42.
- HARTMANN, M. 1927.—Allgemeine Biologie—Jena.
- HARTMANN, M. e SCHILLING, C. 1917.—Die pathogenen Protozoen—Berlin.
- HEGNER, R. W. e HOLMEES, F. O. 1923.—Observations on a *Balantidium* from a Brazilian monkey, *Cebus variegatus*, E. Geoffr., with special reference to chromosome—like bodies in the macronuclei. Amer. Journ. Hyg. 3.
- IVANIC, M. 1928.—Ueber die mit den Parthenogenetische Reorganisationsprozessen des Kernapparates verbundenen Vermehrungscysten von *Chilodon uncinatus* Ehrbg.. Archiv. f. Protistenkunde. Bd. 61.
- IVANIC, M. 1929.—Ueber die centrosomenähnlichen Gebilde bei der Grosskernteilung und die promitotische Kleinkernteilung, nebst Bemerkungen über die Chromosomenverhältnisse bei einen Infusor. (*Euplotes patella* Ehrbg.). Arch. f. Protistenkunde. Bd. 66. Hf. 1.
- JAMESON, A. P. 1927.—The behaviour of *Balantidium coli* Malm. in cultures. Parasitology. Vol. 19, No. 4 Dec.
- MC DONALD, J. D. 1922.—On *Balantidium coli* (Malmsten) and *Balantidium suis* (sp. nov.), with an account of their neuromotor apparatus University of California Publications in Zoology. Vol. 20, No. 10 May 8.
- PRANDTL, H. 1906.—Die Conjugation von *Didinium nasutum*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 7.
- PRITZE, F. 1928.—Beiträge zur Kenntnis der *Balantidium coli*. Zeitschrift für Parasitenkunde. Bd. 1 f. 3.
- PROWAZEK, S. V. 1920.—Infusoria—Ciliata. — Prowazek—Handbuch der path. Protozoen. Vol. 2.
- WENYON, C. M. 1926.—Protozoology.
- WOODRUFF, L. L. e ERDMANN, R. 1914.—A normal periodic reorganization process without cellfusion in *Paramecium*. The Journal of Experimental Zoology. Vol. 17.

Explicação das estampas

ESTAMPA XLIX

Balantidium simile

Fig. 1—Fórma neutra.

Figs. 2 e 3—Apparelho nuclear de um individuo neutro, mostrando a colocação do micronucleo em relação ao macronucleo.

Fig. 4—Individuo neutro em divisão. Um dos micronucleos não foi representado por se achar collocado debaixo do macronucleo.

ESTAMPA L

Fig. 5—Fórma recentemente enkystada deixando vêr ainda o micronucleo.

- Fig. 6—Fórma kystica com o nucleo em divisão.
- Fig. 7—Kysto maduro, mostrando 2 nucleos e uma massa de substancia de reserva (coloração pelo Feulgen).
- Fig. 8—Kysto com os dois nucleos em divisão.
- Fig. 9—Kysto com 4 nucleos (fórma supernucleada) (coloração pelo Feulgen).

ESTAMPA LI

Endomixis no *Balantidium simile*

- Fig. 10—Divisão progamica.
- Fig. 11—Phase final da ultima divisão progamica.
- Figs. 11a e 11b—Apparelho nuclear das fórmas precedentes visto com maior augmento, mostrando o micronucleo augmentado de volume já em inicio de divisão e o macronucleo em via de degeneração.
- Fig. 12—Fórma mostrando o inicio do phenomeno de *endomixis* com o micronucleo augmentado de volume e o macronucleo em inicio de degeneração, apresentando uma das extremidades ainda afilada, vestigio de recente divisão (ultima divisão progamica).
- Fig. 13—Apparelho nuclear de uma fórma no inicio do phenomeno. Micronucleo em mitose, macronucleo em degeneração com uma extremidade afilada.
- Fig. 14—Micronucleo em mitose, macronucleo em degeneração adiantada, mostrando a disposição peripherica da chromatina.
- Fig. 15—Mitose do micronucleo, mostrando a placa equatorial.

ESTAMPA LII

- Fig. 16—Phase adiantada da divisão do micronucleo, macronucleo em degeneração.

- Fig. 17—Os dois nucleos provenientes da divisão do micronucleo, ainda com vestigios dessa divisão e já em via de crescimento para se transformarem em placentas, macronucleo em degeneração.
- Fig. 18—Fórmas com duas placentas e o macronucleo em adiantada degeneração.
- Figs. 19 e 20—Formação do micronucleo a custa de uma das placentas.

ESTAMPA LIII

- Figs. 21 e 22—Micronucleo já formado e em divisão com as duas placentas ainda afastadas.
- Fig. 23—Micronucleo em divisão collocado entre as duas placentas.
- Fig. 24—Micronucleo em divisão, visto com maior augmento, deixando vêr as duas placas formadas pela divisão da placa equatorial em via de migração para os polos.
- Fig. 25—Phase final da divisão do micronucleo.
- Fig. 26—Fórma com dois micronucleos provenientes da divisão representada nas figs. precedentes e com duas placentas em inicio de estiramento.

ESTAMPA LIV

- Fig. 27—Placentas estiradas, collocadas ao lado uma da outra e com os micronucleos nos polos oppositos.
- Fig. 28—Placentas estiradas em via de migração com os micronucleos junto ás extremidades.
- Figs. 29 e 30—Duas phases da migração das placentas, em ambas se observam os primeiros signaes de divisão do plasma.

ESTAMPA LV

- Fig. 31—As duas placentas, após migração, acham-se collocadas nas extremidades do ciliado, que apre-

senta adiantada divisão do plasma.

Fig. 32—Fórma proveniente da divisão representada na figura precedente, com o macronucleo estirado junto a uma das extremidades do qual se vê o micronucleo.

Fig. 33—Apparelho nuclear de uma fórma semelhante á representada na figura precedente.

Fig. 34—Fórma mais adiantada que as precedentes deixando vêr a divisão do micronucleo e o estreitamento da parte média do macronucleo.

ESTAMPA LVI

Fig. 35—Fórma semelhante á precedente em estado mais adiantado.

Figs. 36, 37 e 38—Macronucleo em degeneração, duas mitoses do micronucleo (fórmulas destinadas a formação de 4 placentas).

Fig. 39—Fórma com 4 placentas e o macronucleo em degeneração.

Fig. 40—Quatro placentas dispostas duas a duas e um micronucleo em divisão.

ESTAMPA LVII

Fig. 41.—Fórma com 4 placentas dispostas em pares, cada um delles com um micronucleo e collocados nas extremidades do ciliado, que mostra inicio de divisão do plasma.

Fig. 42—Fórma semelhante á precedente (coloração pelo Feulgen).

Fig. 43—Fórma proveniente da divisão anterior com as duas placentas alongadas e o micronucleo em divisão.

Fig. 43a—Apparelho nuclear da fórma

precedente vista com maior augmento.

Fig. 44.—Fórma com 8 placentas.

ESTAMPA LVIII

Balantidium coli do porco.

Fig. 45—Individuo neutro em divisão.

Fig. 46—Kysto (coloração pelo trioxi-ferrihematheina).

Fig. 47—Fórma com duas placentas sem micronucleo (coloração pelo borax-carmin).

Fig. 48—Fórma com 2 placentas e micronucleo (coloração pelo borax-carmin).

Balantidium coli do homem.

Fig. 49—Fórma com 2 placentas (coloração pelo borax-carmin).

Todos os desenhos foram feitos com camara clara á altura da mesa. As figs. 4, 10, 11, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, com augmento de cerca de 1.200 diametros; a figura 24 com augmento de cerca de 3.000 diametros e as demais com augmento de 1.750 diametros.

Todas as figuras que não trazem indicação foram feitas de preparados corados pelo Heidenhain modificado.

ESTAMPA LIX

Fig. 1—Fórma neutra do *Balantidium aragaoi* mostrando o macronucleo arredondado tendo ao lado o micronucleo.

Fig. 2—Fórma do *Balantidium aragaoi* com duas placentas e o micronucleo já formado.

Fig. 3—Fórma semelhante a anterior com o micronucleo em divisão.

Desenhos feitos com a camara clara a altura da mesa. Augmento 1750 diametros.

Microphotographias

ESTAMPA LX

- Fig. 1—Fórma vegetativa do *Balantidium simile*.
- Fig. 2—Fórma de divisão do *Balantidium simile*.
- Fig. 3—Kysto do *Balantidium simile* ainda com o macronucleo unico.
- Fig. 4—Kysto do *Balantidium simile* mostrando o nucleo em fórma de fuso, (microphotographia feita com maior augmento que a do nº 3).
- Fig. 5—Kysto maduro do *Balantidium simile*, mostrando 2 nucleos provenientes da divisão do macronucleo.
- Fig. 6—Kysto do *Balantidium simile* mostrando em *s. res.* a massa de substancia de reserva e em *n* o nucleo (microphotographia tirada com o mesmo augmento que a do nº 4).
- Fig. 7—Kysto maduro do *Balantidium coli* do porco. Em *m* vê-se o macronucleo, unico, em fórma de faixa e atravessando todo o kysto.

ESTAMPA LXI

- Fig. 8—Fórma de divisão do *Balantidium coli* do porco.
- Fig. 9—Fórma progamica do *Balantidium simile*, mostrando em *micro* o micronucleo augmentado de tamanho e em *macro* o macronucleo.
- Fig. 10—Fórma progamica do *Balantidium simile* mostrando em *micro*, o micronucleo se dividindo, em fórma de fuso. Vê-se na parte central do fuso os chromosomios. Junto do micronucleo encontra-se o macronucleo.
- Fig. 11—*Balantidium simile*, mostrando em *pl* as duas placentas já for-

madadas e em *macro* o macronucleo já degenerado com fórma arredondada e corando-se intensamente em preto (microphotographia tirada com pequeno augmento, para mostrar as duas placentas que se achavam em planos diferentes).

- Fig. 12—A mesma fórma da microphotographia nº 11, tirada com maior augmento, ficando uma das placentas fóra de fóco. Esta microphotographia foi tirada para mostrar a estrutura que apresenta a placenta no inicio do seu crescimento; *m* indica o limite da membrana já completamente desenvolvida, enquanto que a massa *c* que se mostra corada e na qual se encontra a chromatina, por não se achar completamente desenvolvida, ainda não enche o espaço limitado pela membrana. Em *macro* vê-se o macronucleo degenerado, de fórma arredondada, e intensamente corado e com o seu tamanho muito reduzido.

- Fig. 13—Fórma com duas placentas (*pl.*) e na qual não se nota mais vestigios do macronucleo; *e* mostra o espaço claro existente entre a membrana da placenta e a massa central chromatica.

ESTAMPA LXII

- Fig. 14—Fórma com duas placentas, já proximas uma da outra. Nesta fórma não se nota a membrana que cerca a placenta.
- Fig. 15—Fórma em que as duas placentas encontram-se proximas uma da outra e entre ellas vê-se nitidamente o micronucleo (*micro*).
- Fig. 16—Fórma com as duas placentas já em fórma de faixa collocadas parallelamente uma a outra e prestes a emigrarem para as

extremidades oppostas do parasito.

Fig. 17—Fórma em que mostra as duas placentas estiradas e já emigrando cada uma dellas para uma das extremidades do parasito.

ESTAMPA LXIII

Figs. 18 e 19—2 fórmas com as placentas emigrando e com indicios de divisão do plasma.

Fig. 20—Fórma em que as duas placentas já se encontram nas extremidades oppostas do parasita.

Figs. 21 e 22—Fórmas provenientes da divisão das fórmas anteriores, mostrando as placentas muito estiradas.

ESTAMPA LXIV

Figs. 23 e 24—Fórmas semelhantes as dos

numeros 21 e 22, porém numa phase mais adiantada, mostrando signaes de divisão do plasma.

Fig. 25—Fórma representando uma phase mais adiantada de divisão. Em *b* vê-se o novo cytostoma já formado.

Fig. 26—Fórma final da divisão das fórmas precedentes. Macronucleo ainda não reconstituído.

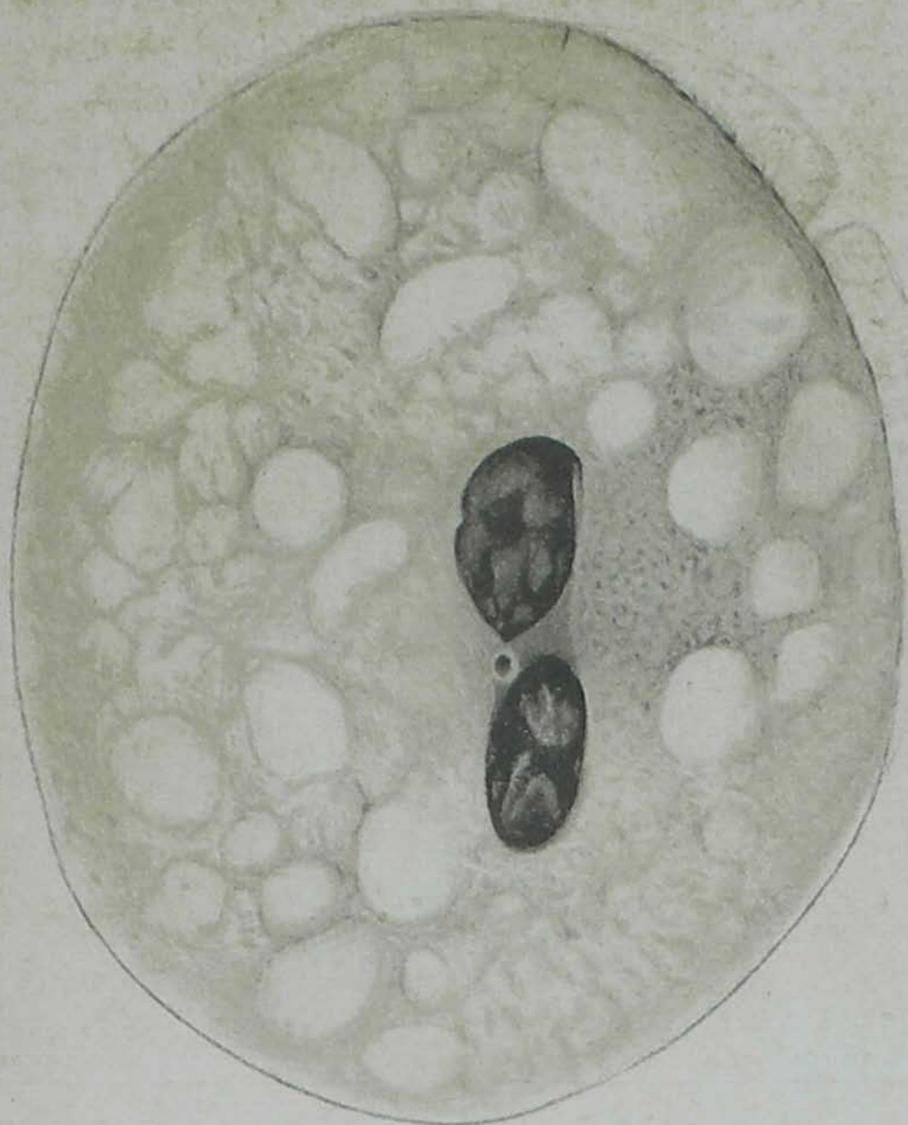
ESTAMPA LXV

Fig. 27—Fórma com 4 placentas.

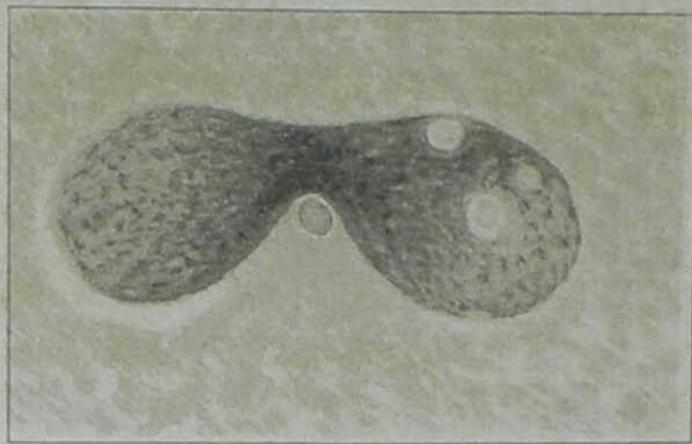
Fig. 28—Fórma com 4 placentas (*pl*) dispostas duas a duas.

Fig. 29—Fórma com 3 placentas (*pl*).

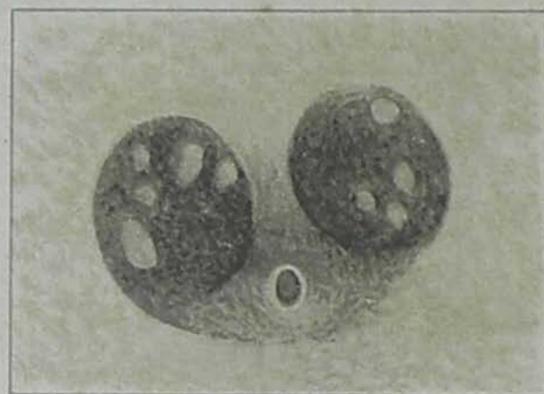
Fig. 30—Fórmas com 2 placentas estiradas (*pl*) e com micronucleo unico e proveniente da divisão de fórmas com 4 placentas.



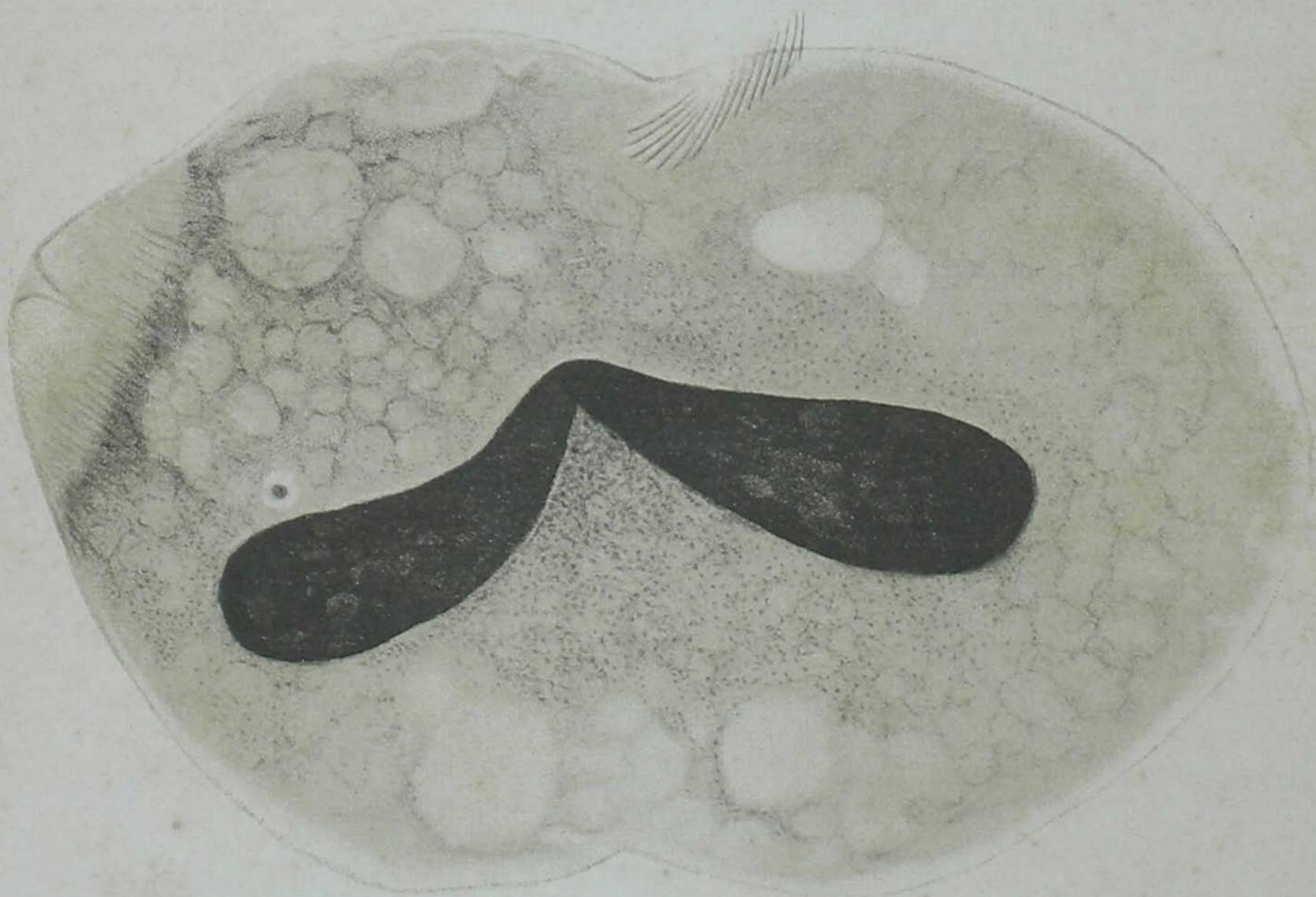
1



2



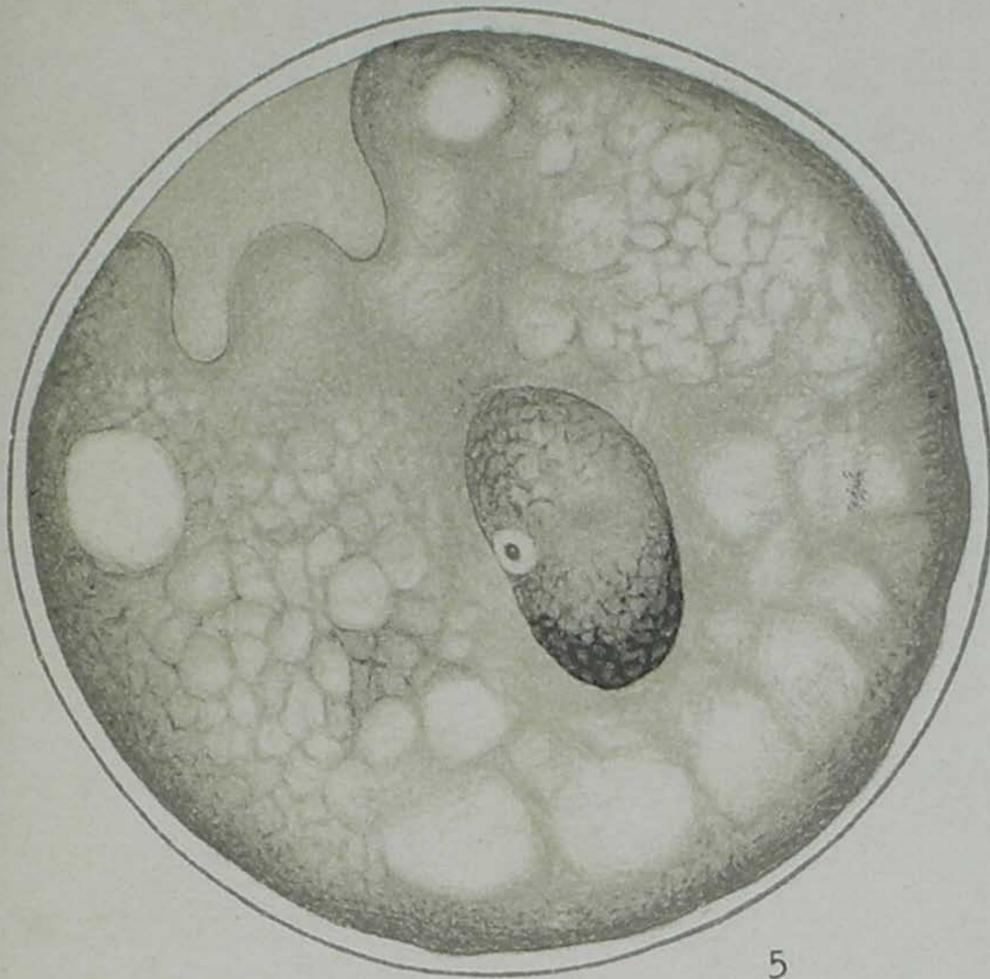
3



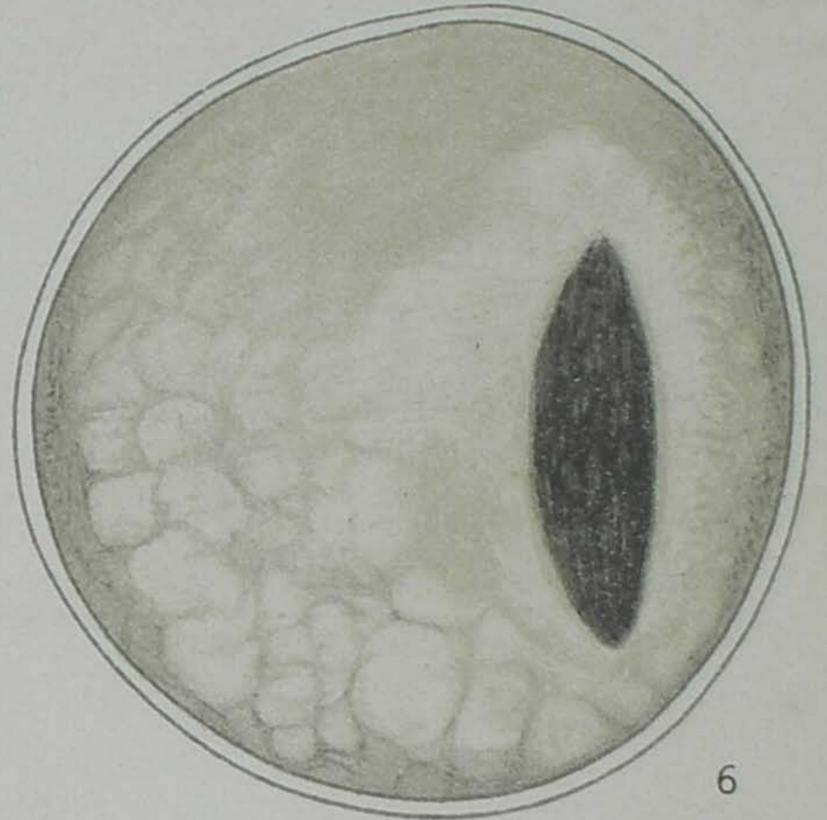
4

Dr. Julio Muniz del.

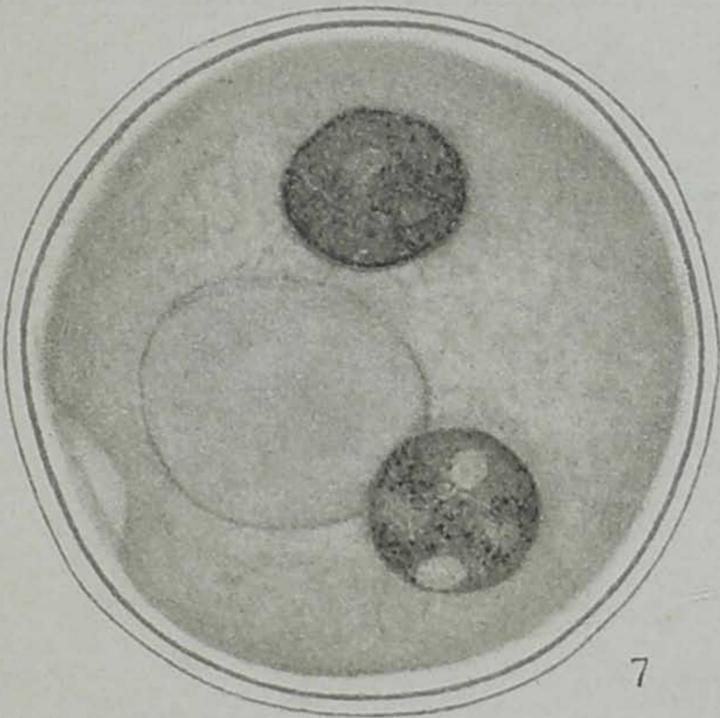
COMP. LITH. YPIRANGA, S. PAULO, RIO



5



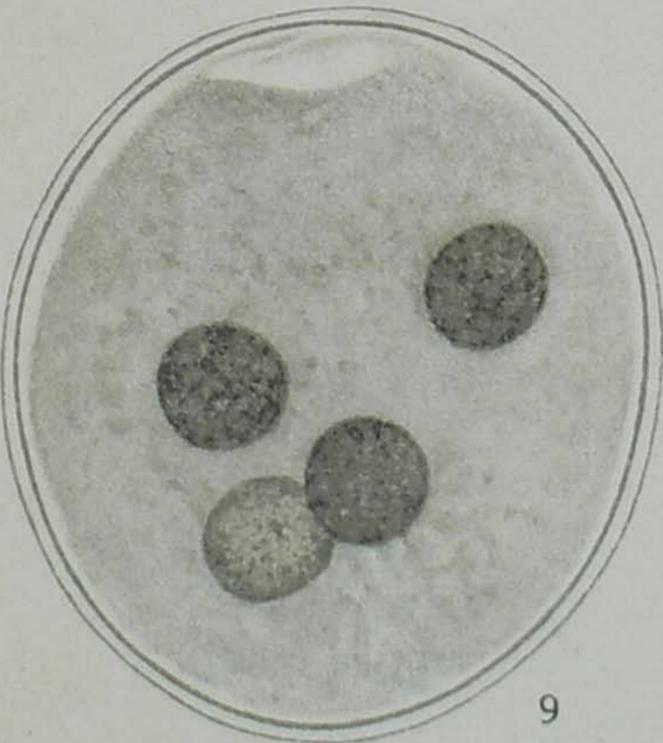
6



7

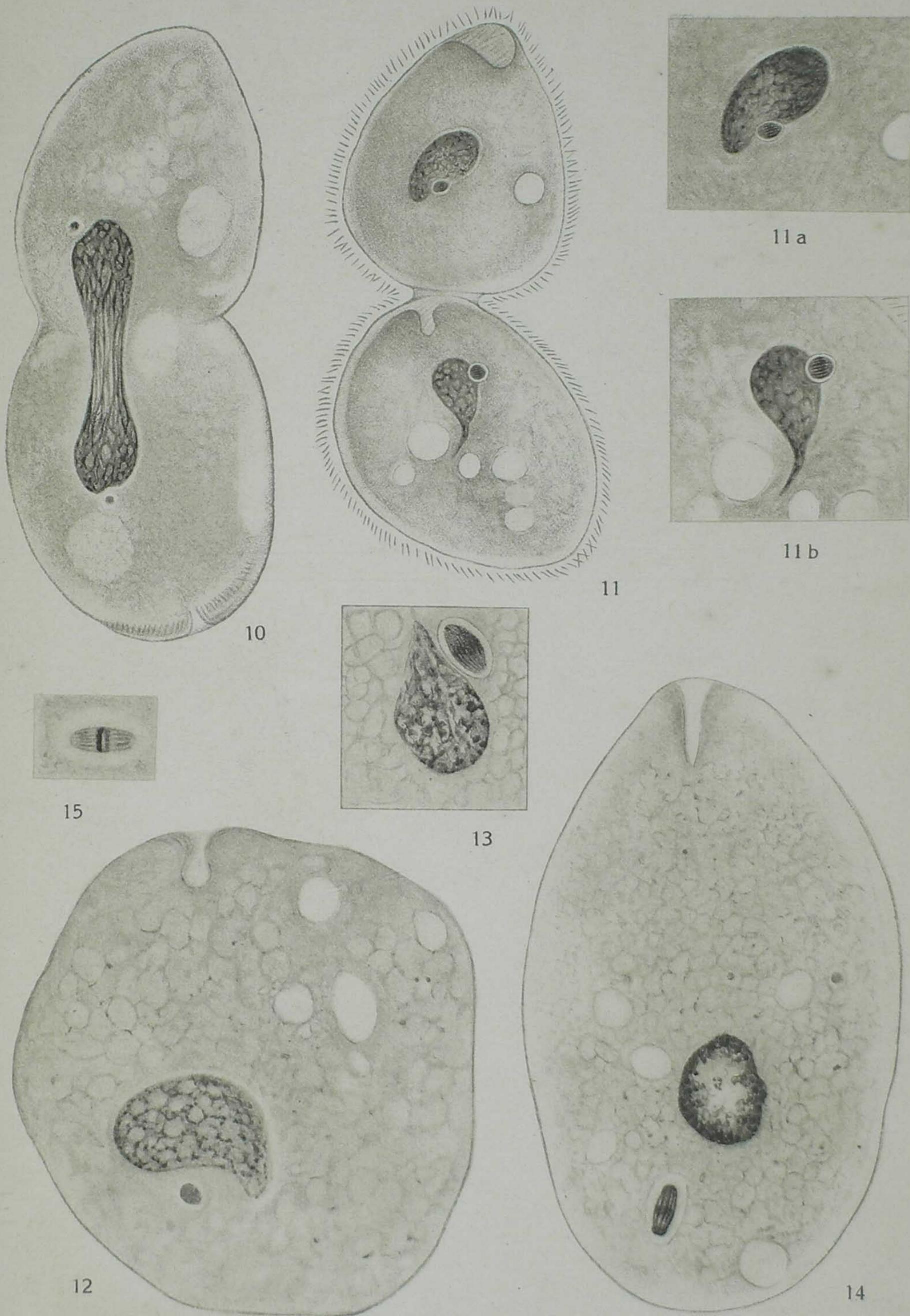


8



9

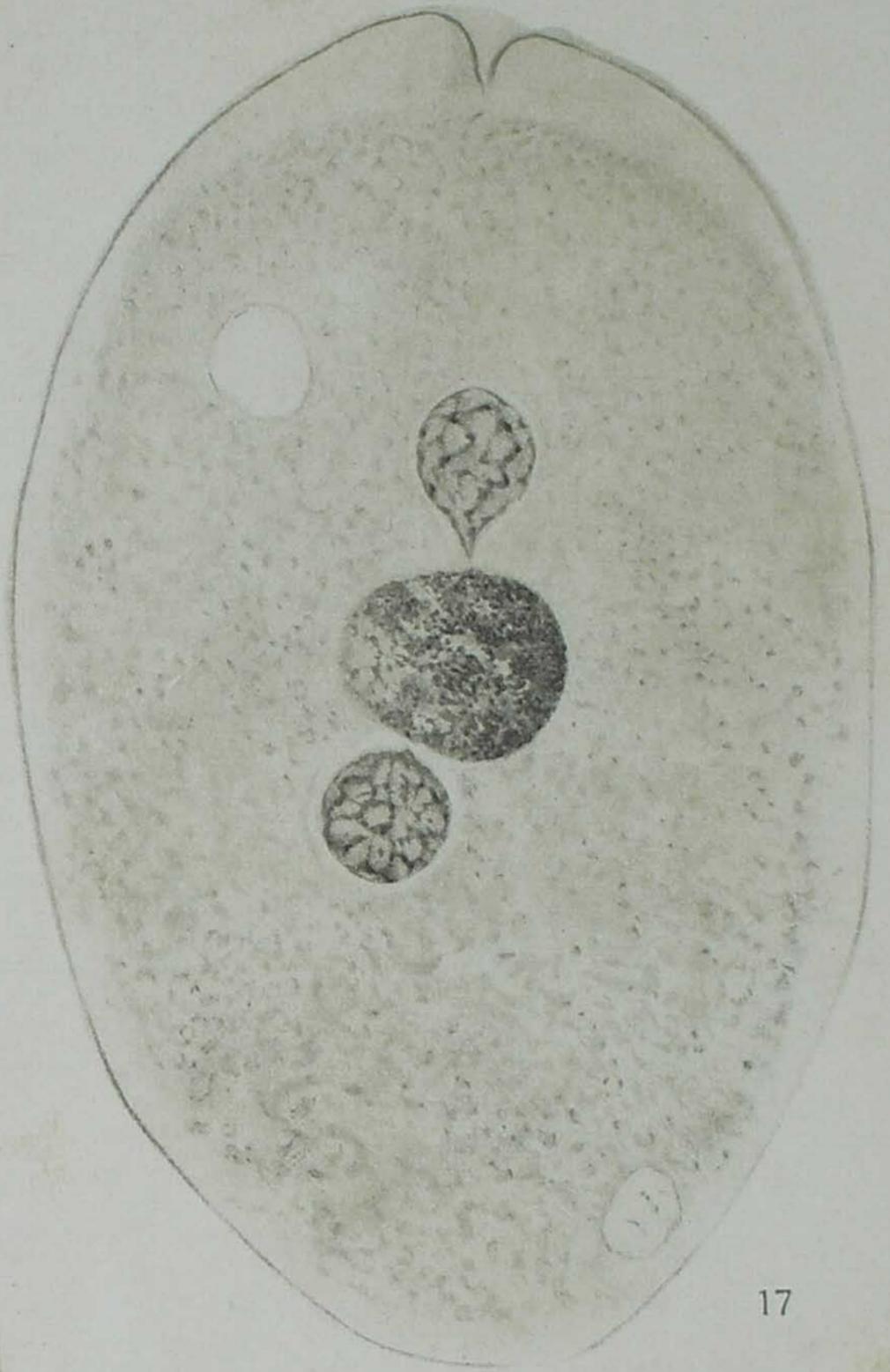
Dr. Julio Muniz del.



Dr. Julio Muniz del.



16



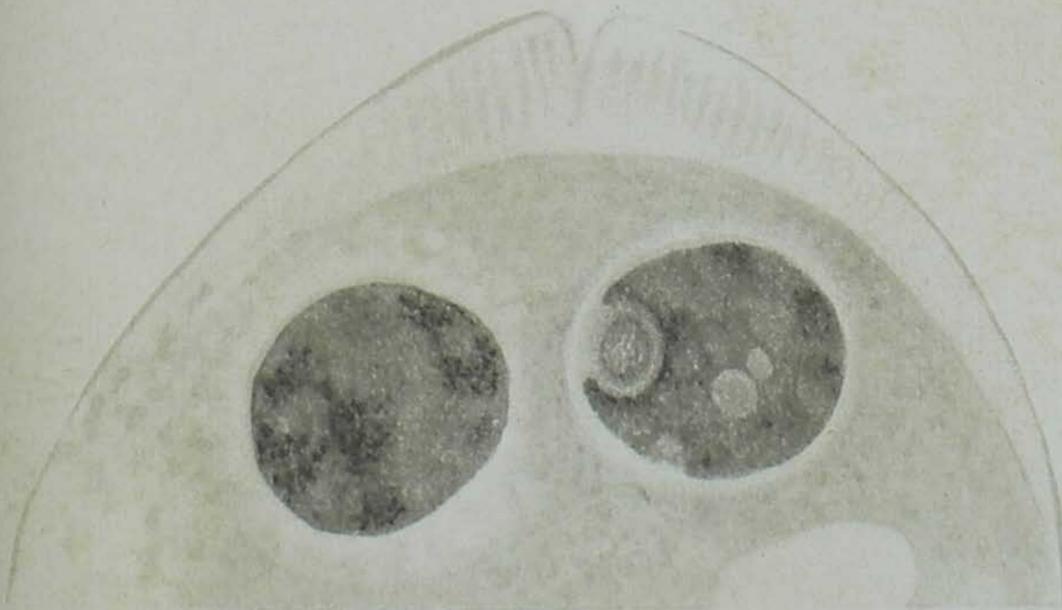
17



18



20

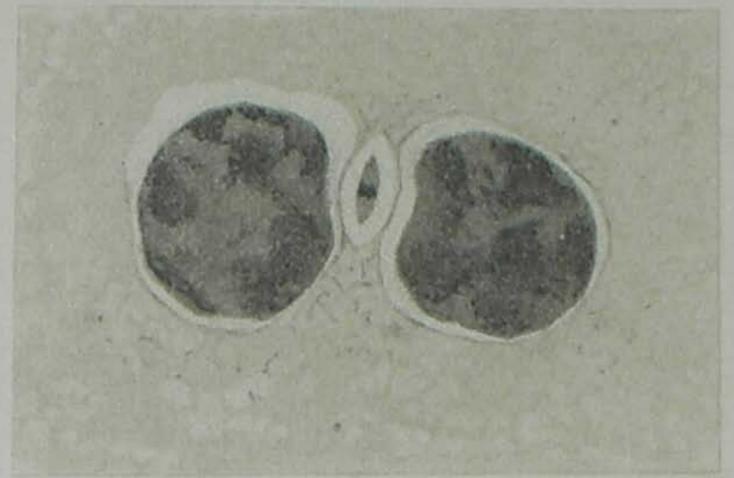


19

Dr. Julio Muniz del.



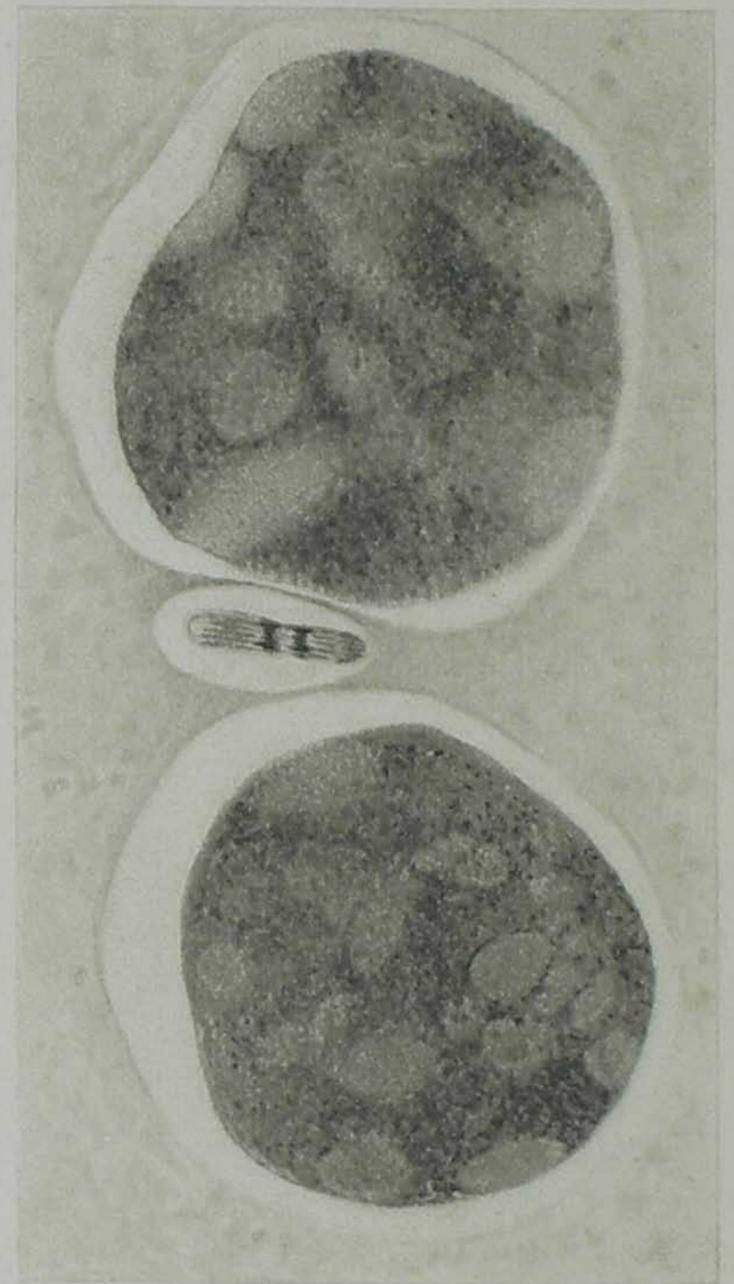
21



23



22



24



26



25

Dr. Julio Muniz del.



27



28

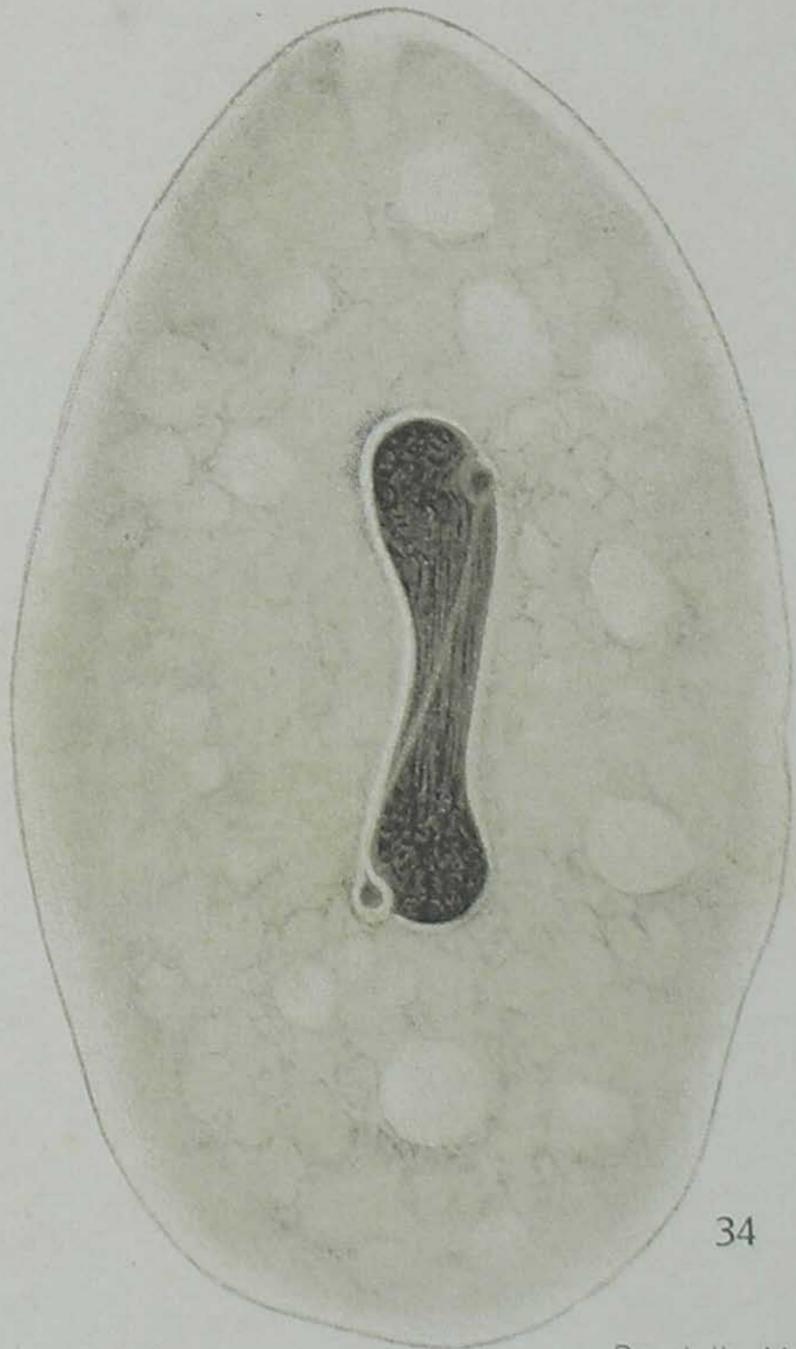
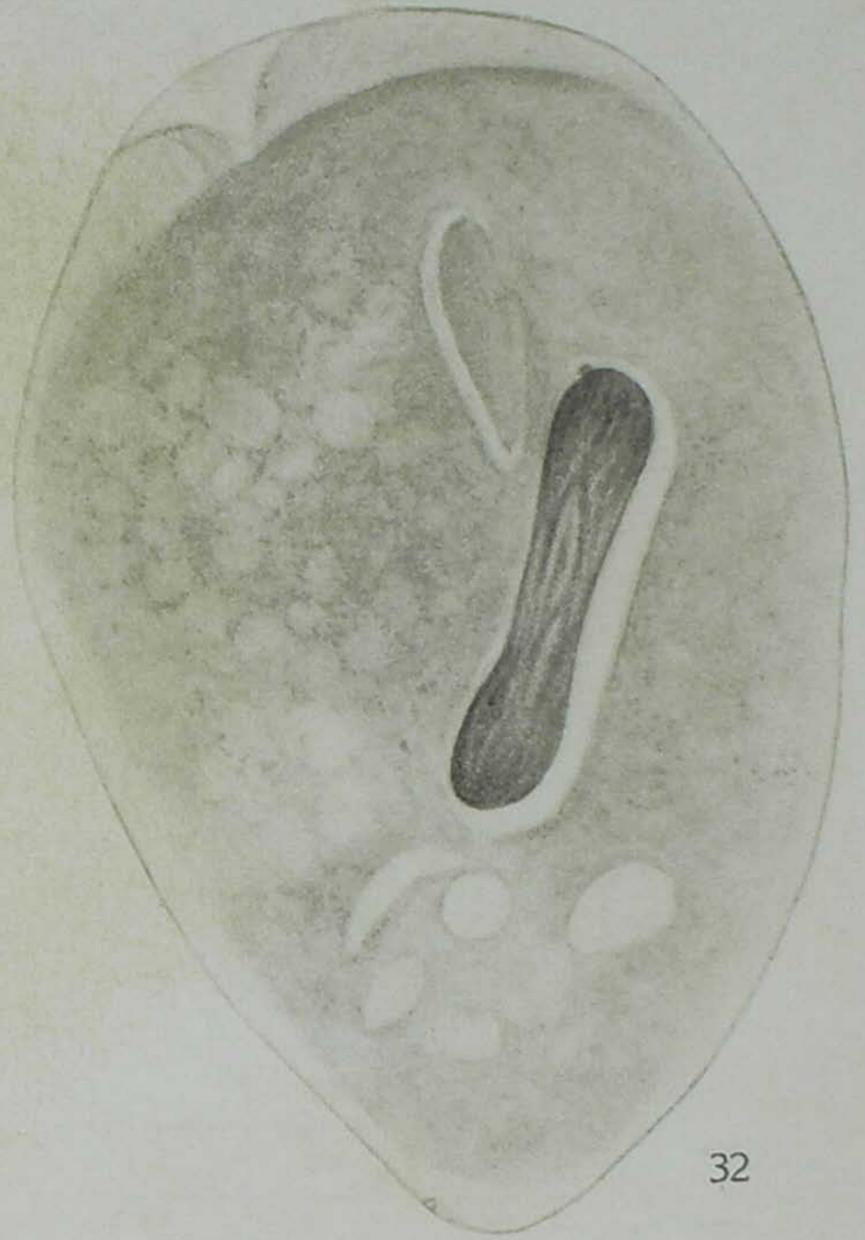


29



30

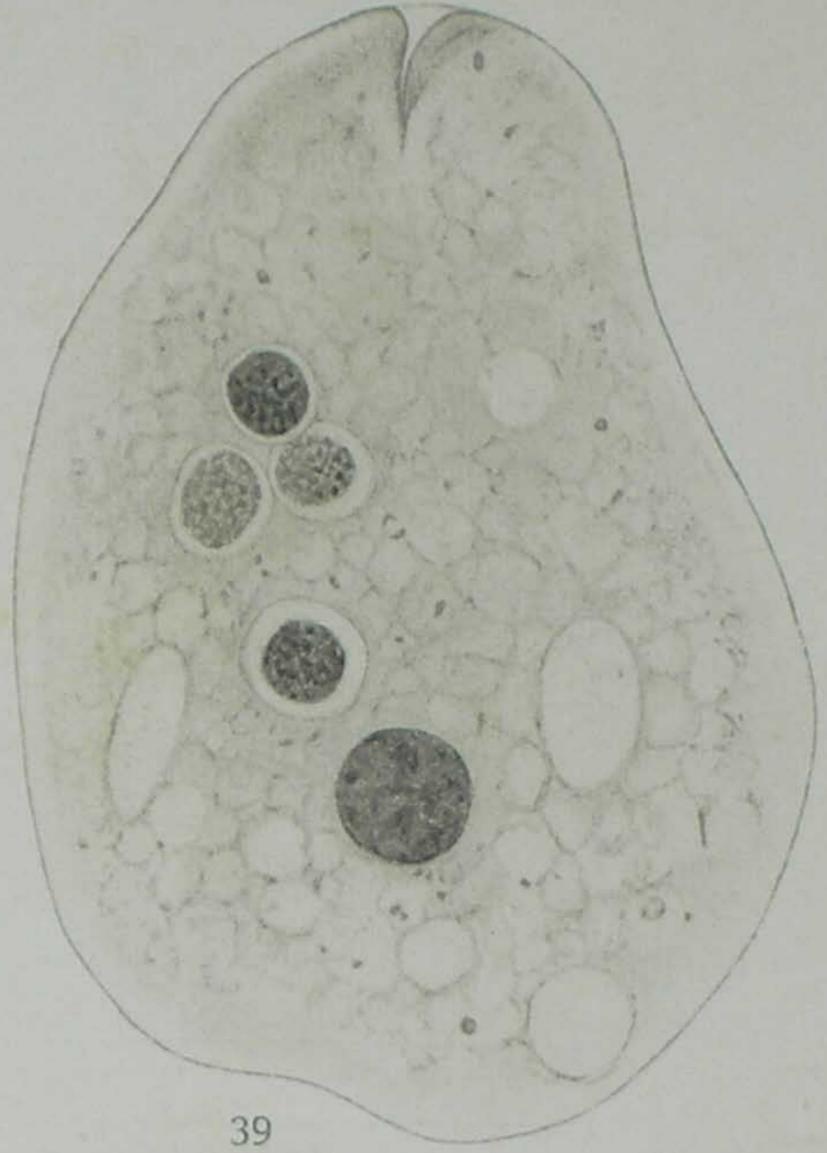
Dr. Julio Muniz del.



Dr. Julio Muniz del.



35



39



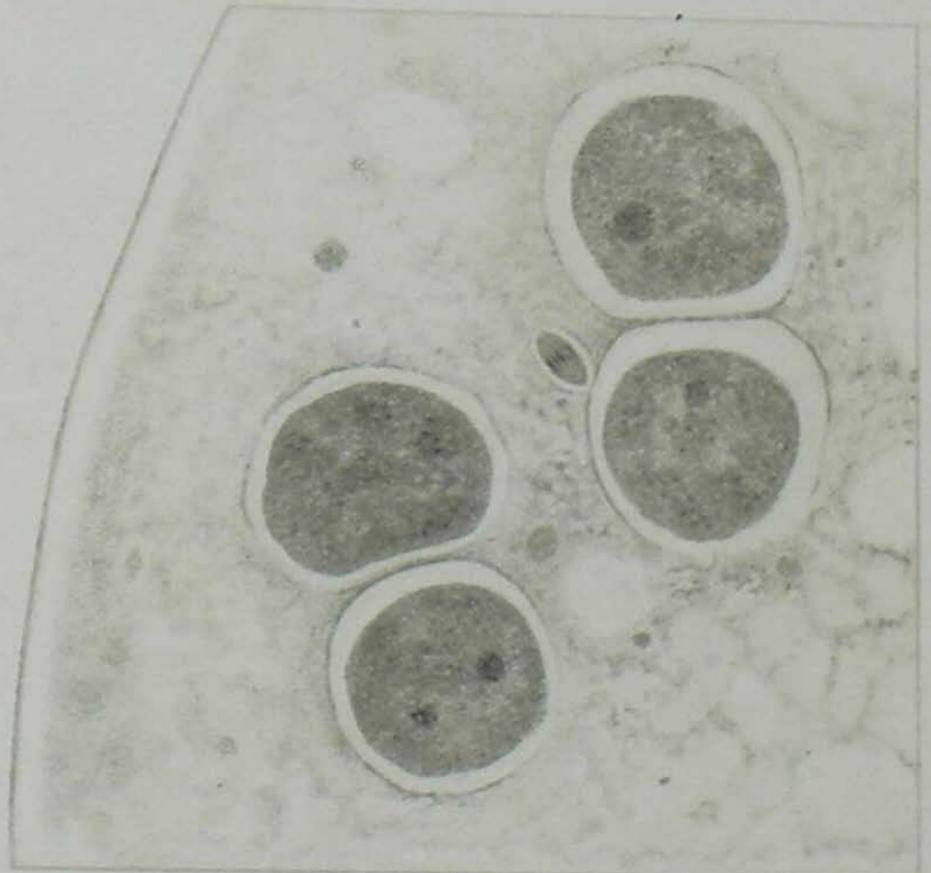
36



37

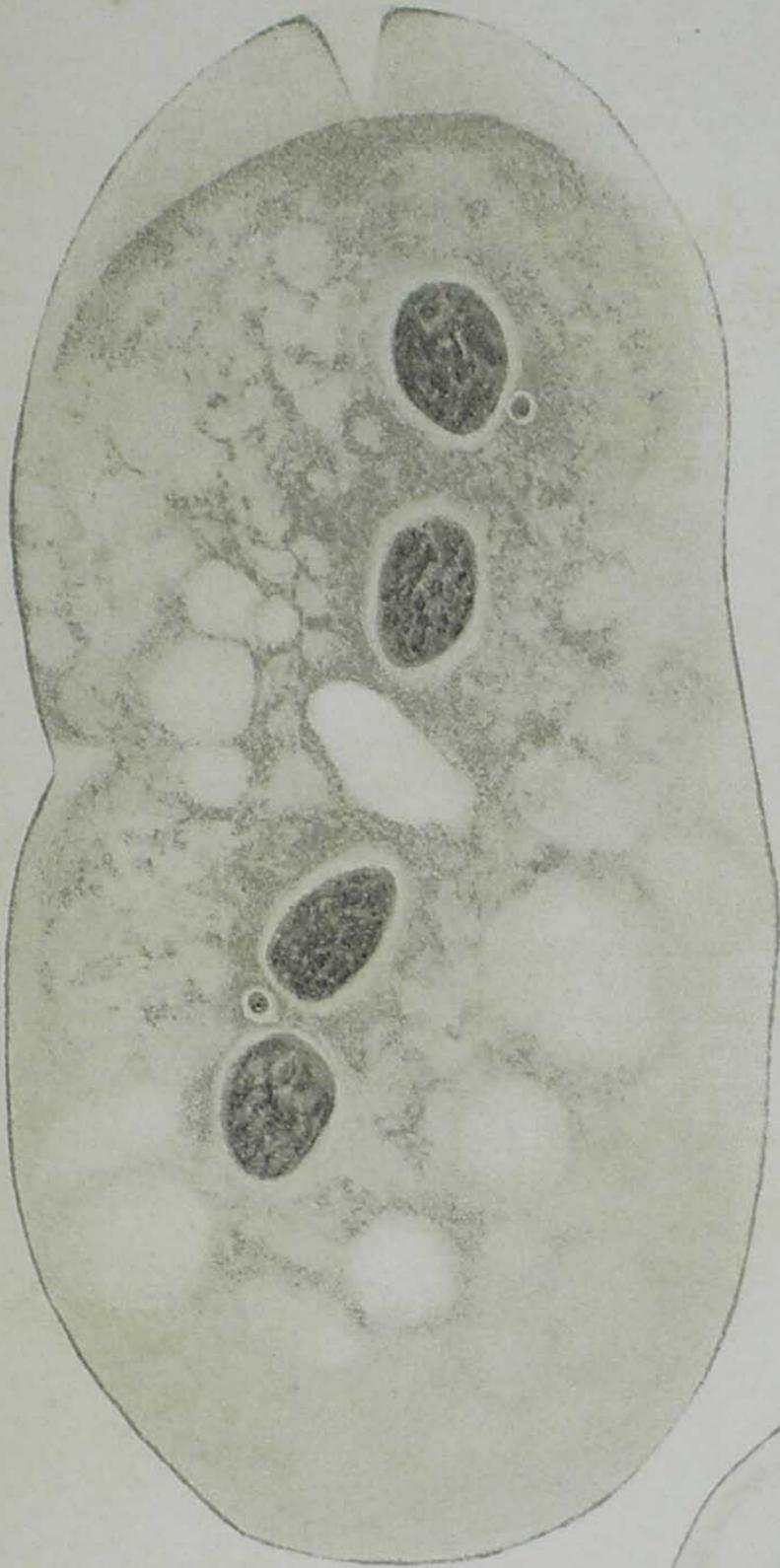


38

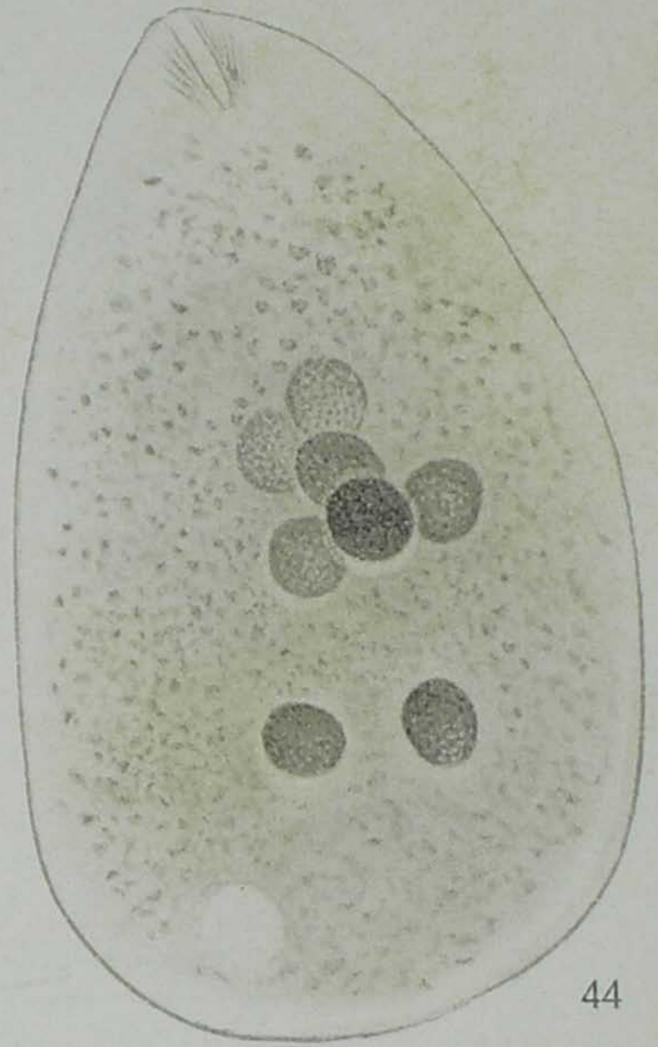


40

Dr. Julio Muniz del.



41



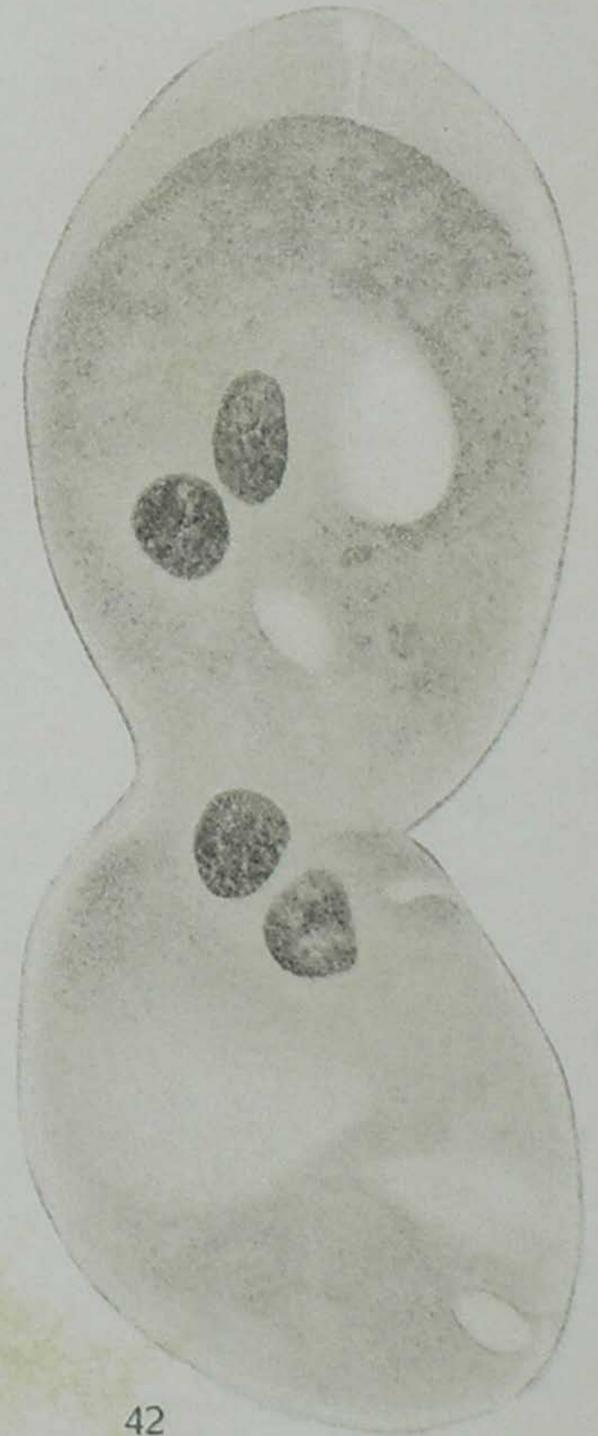
44



43 a

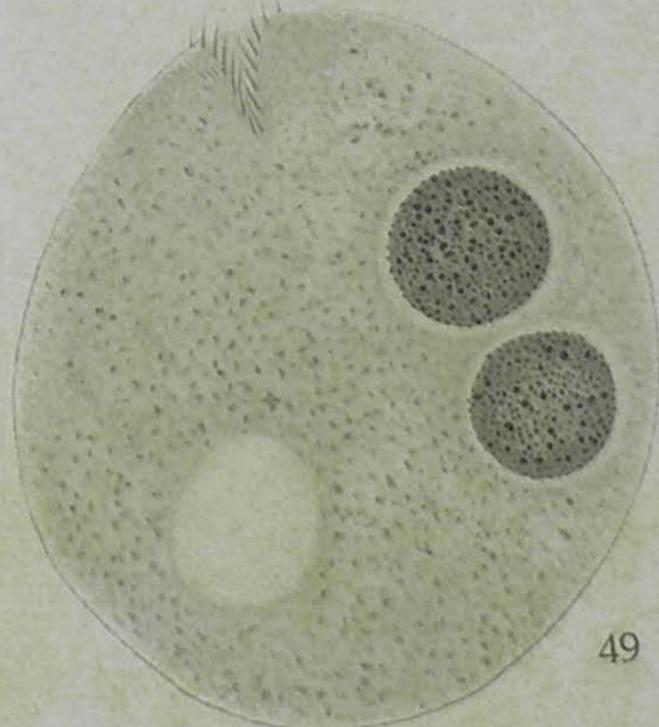
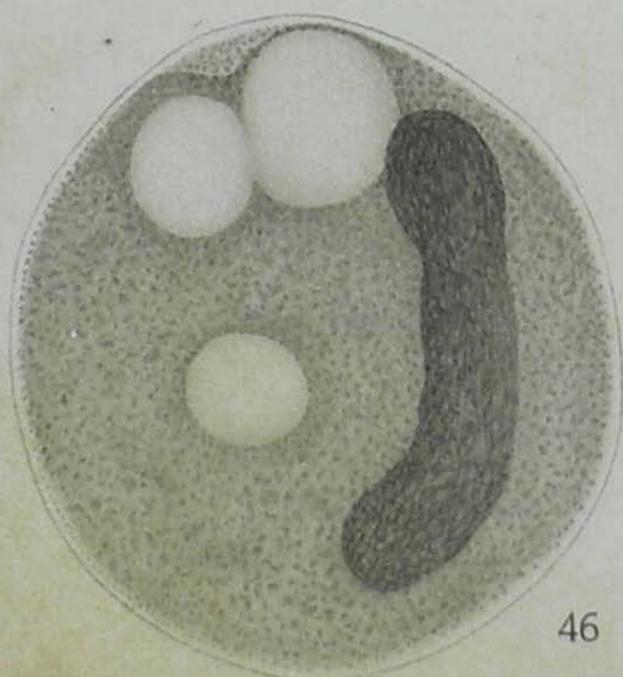
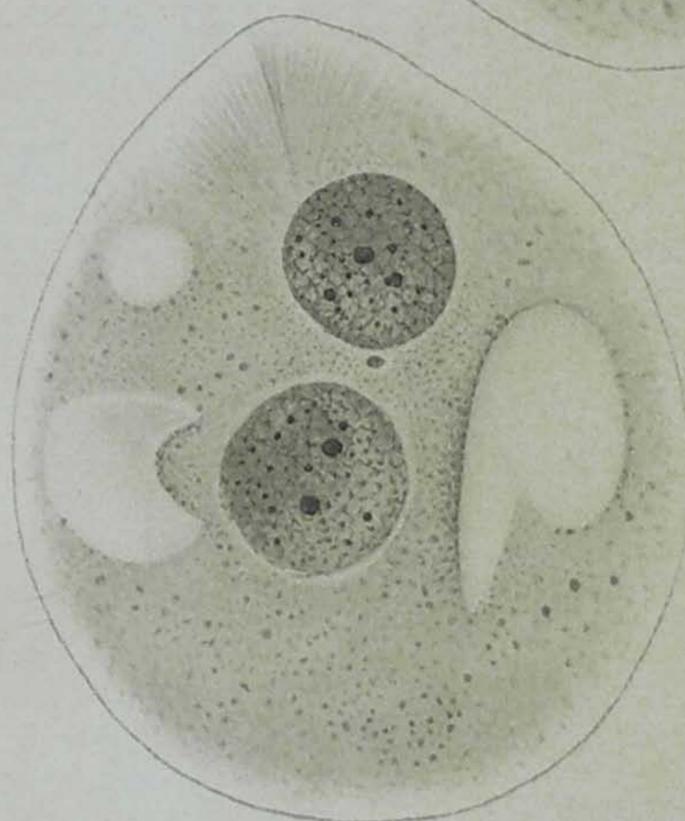
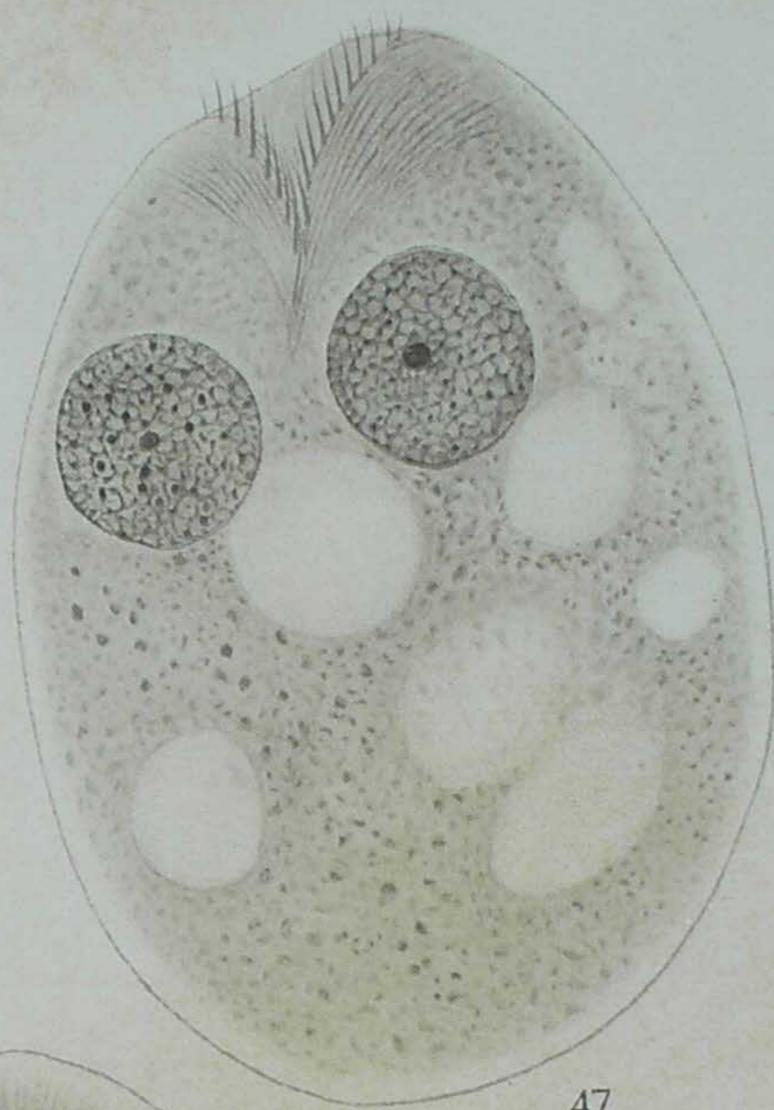


43

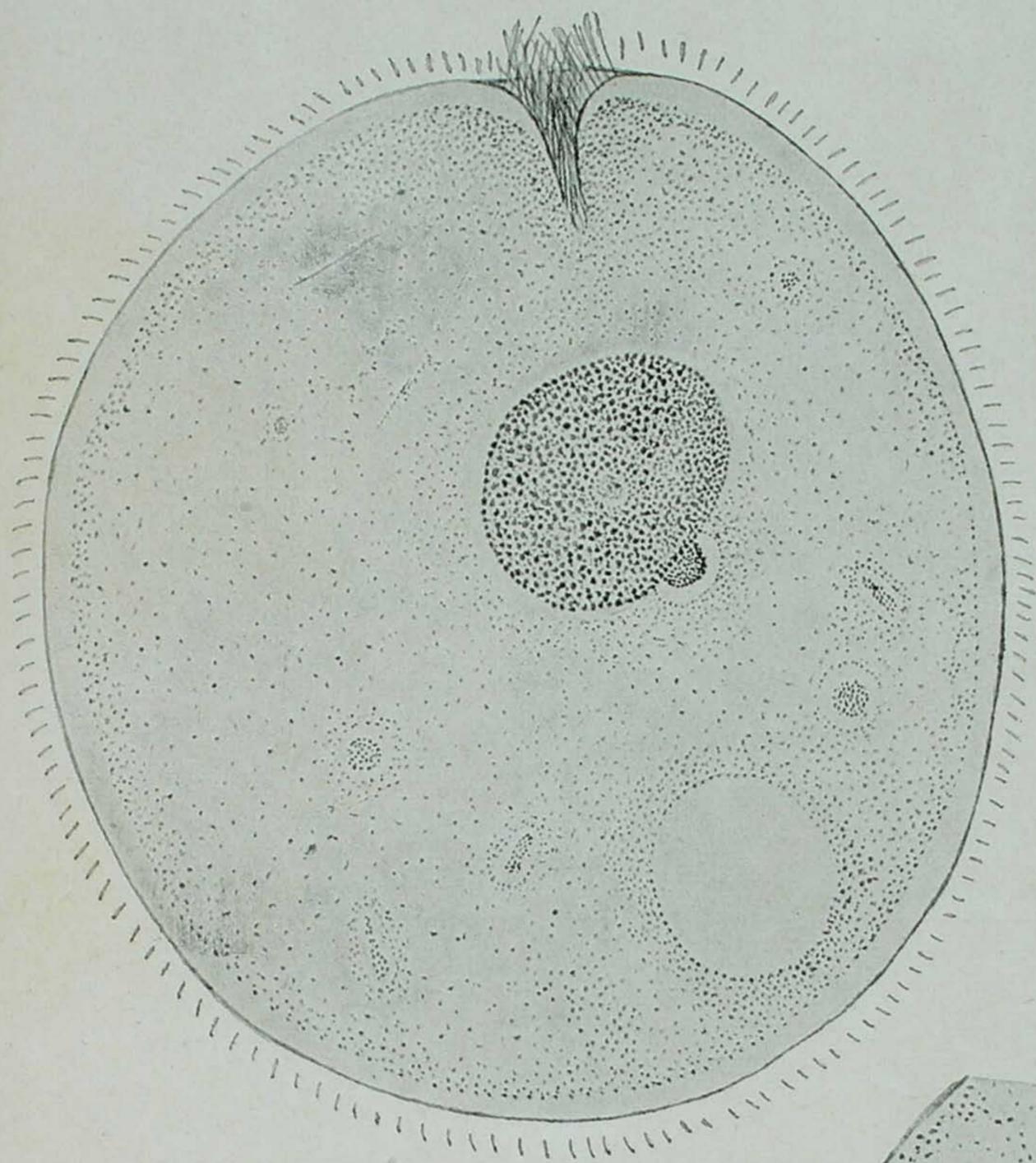


42

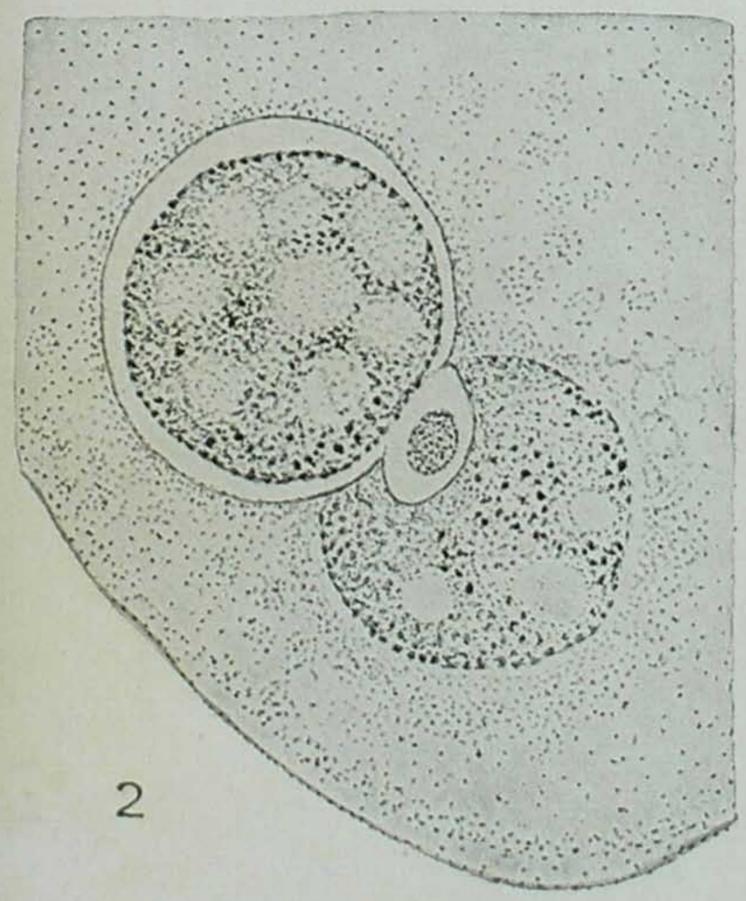
Dr. Julio Muniz del.



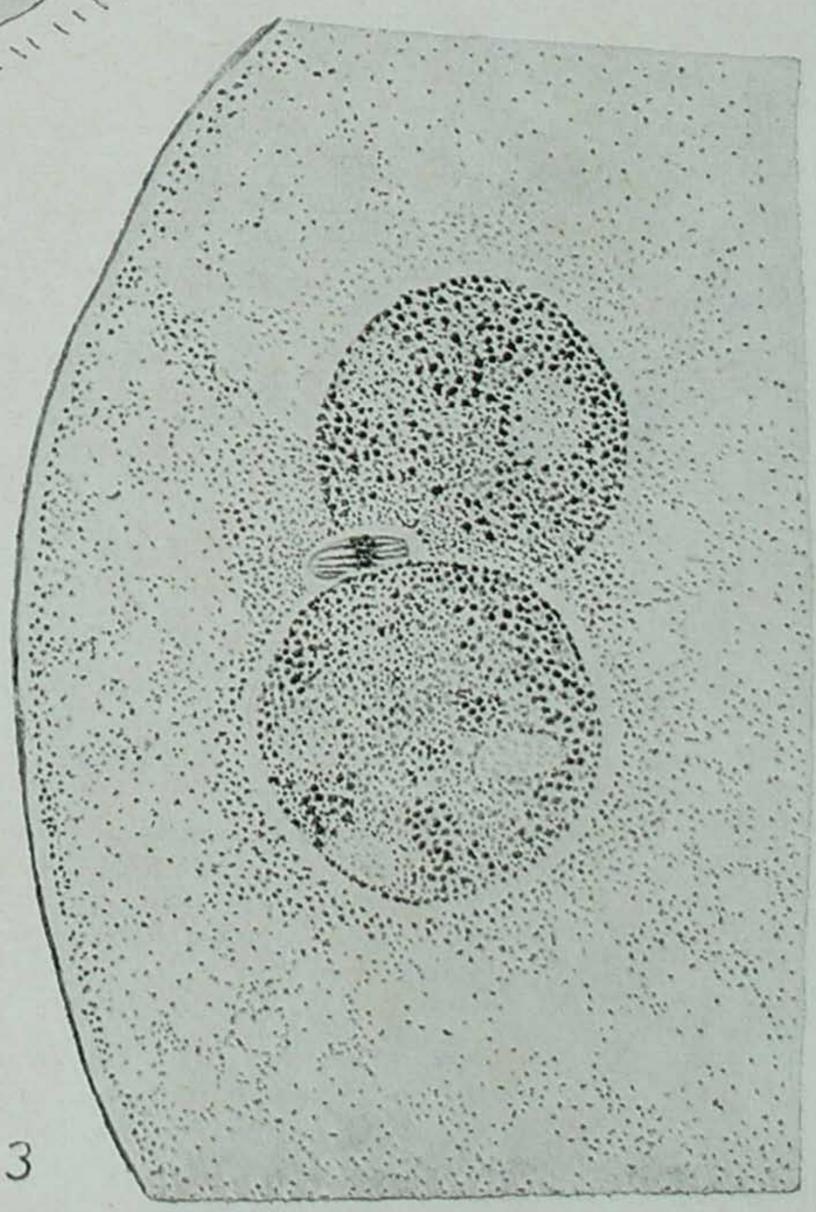
Dr. Julio Muniz del.



1



2



3

Dr. J. Muniz del.

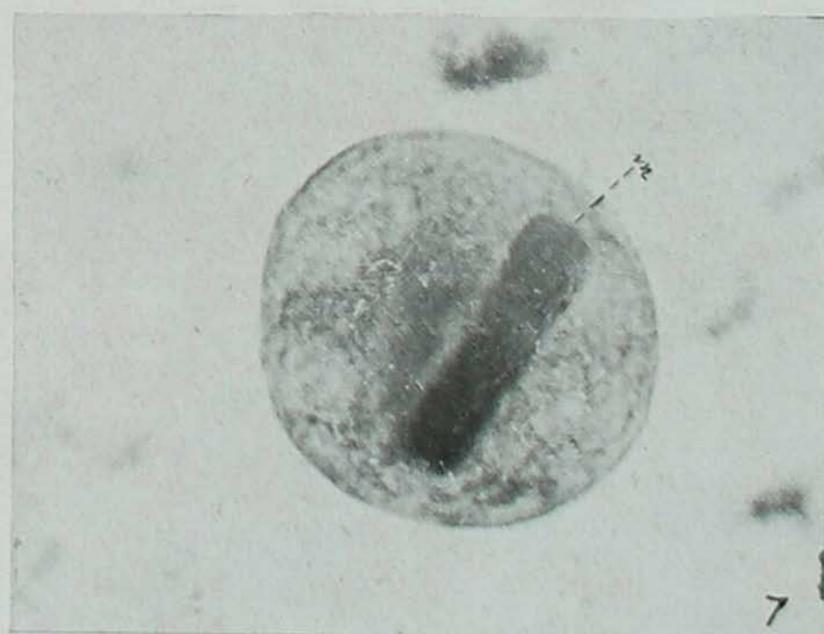
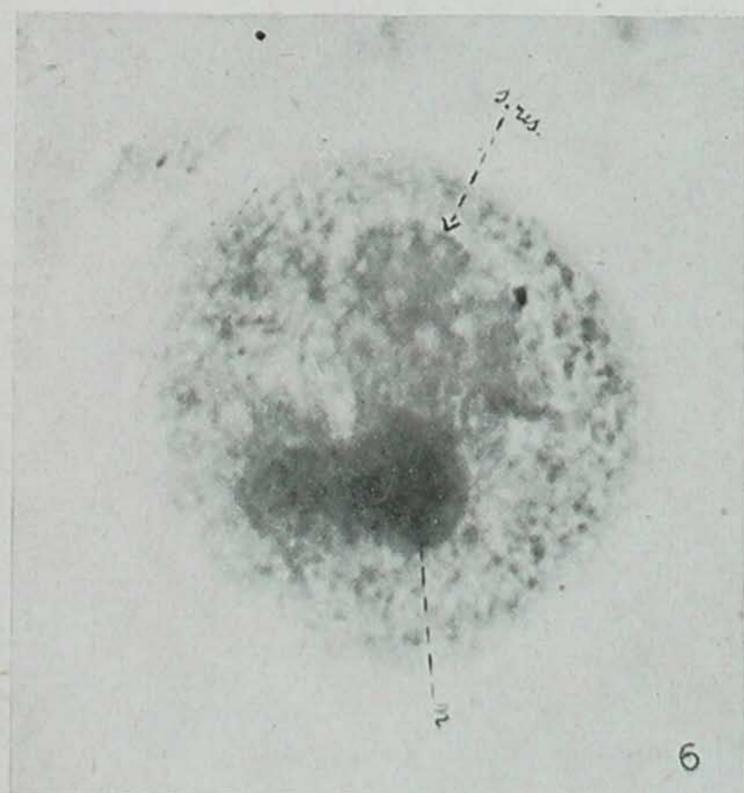
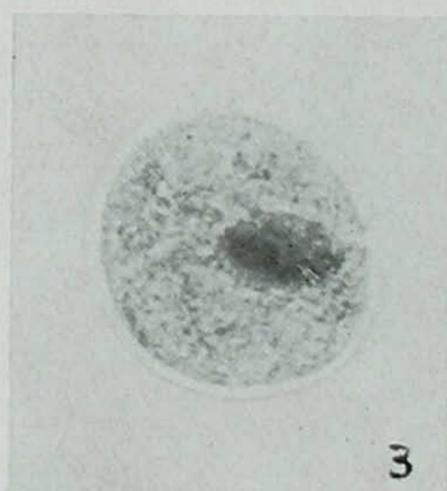
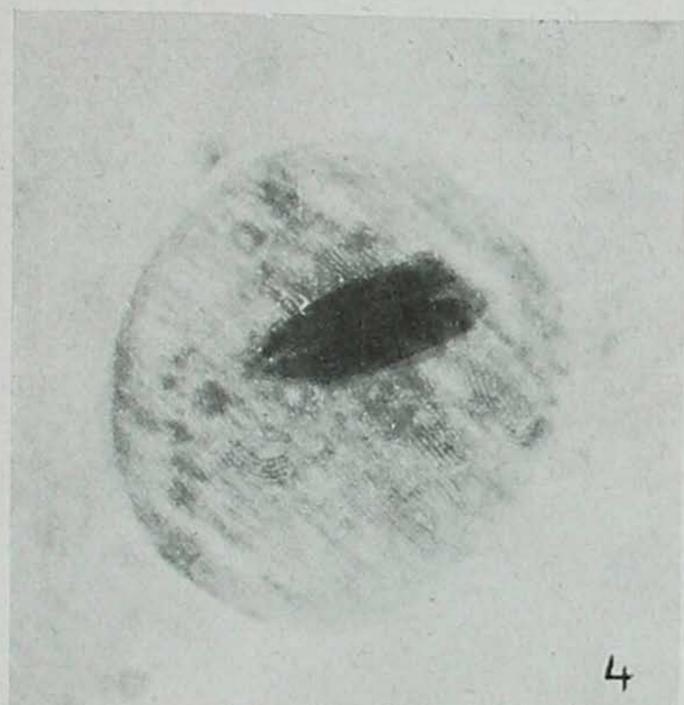
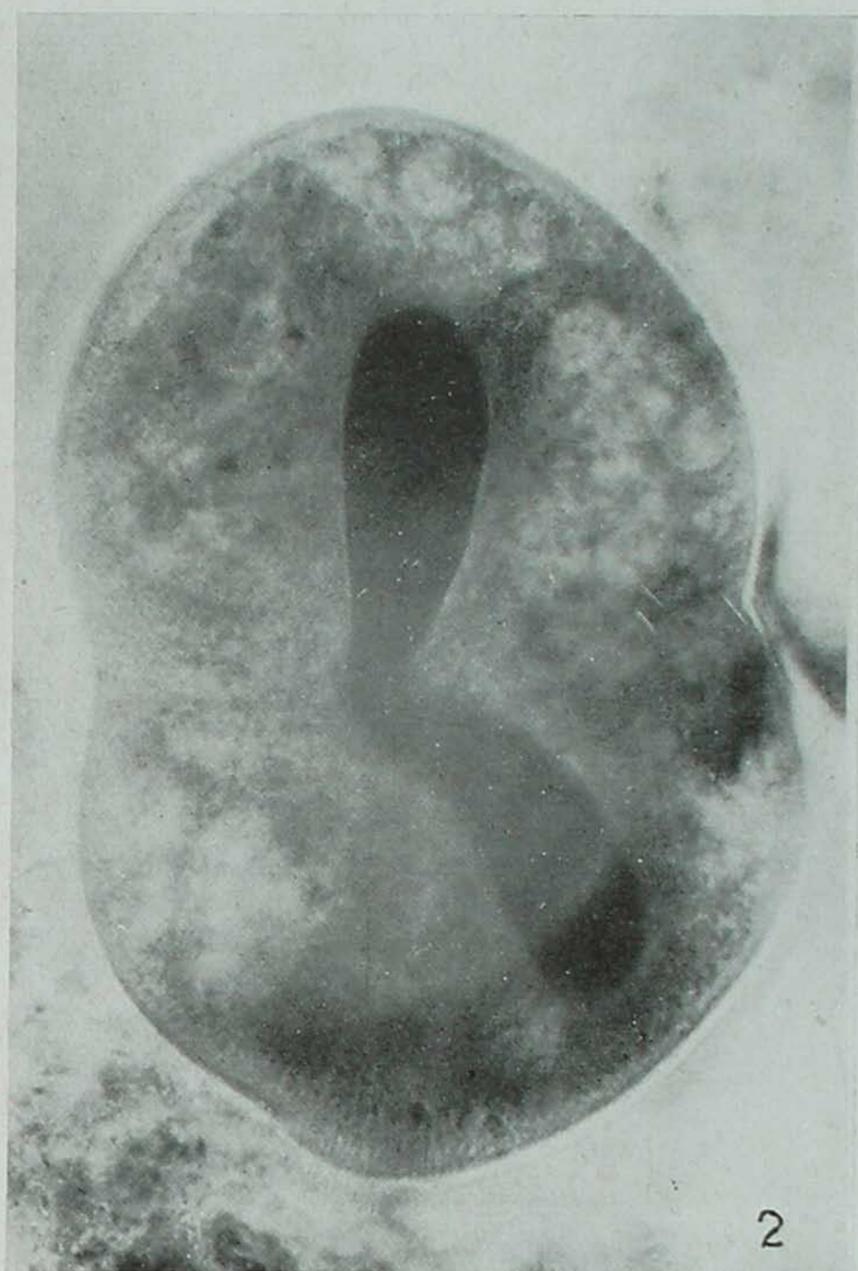
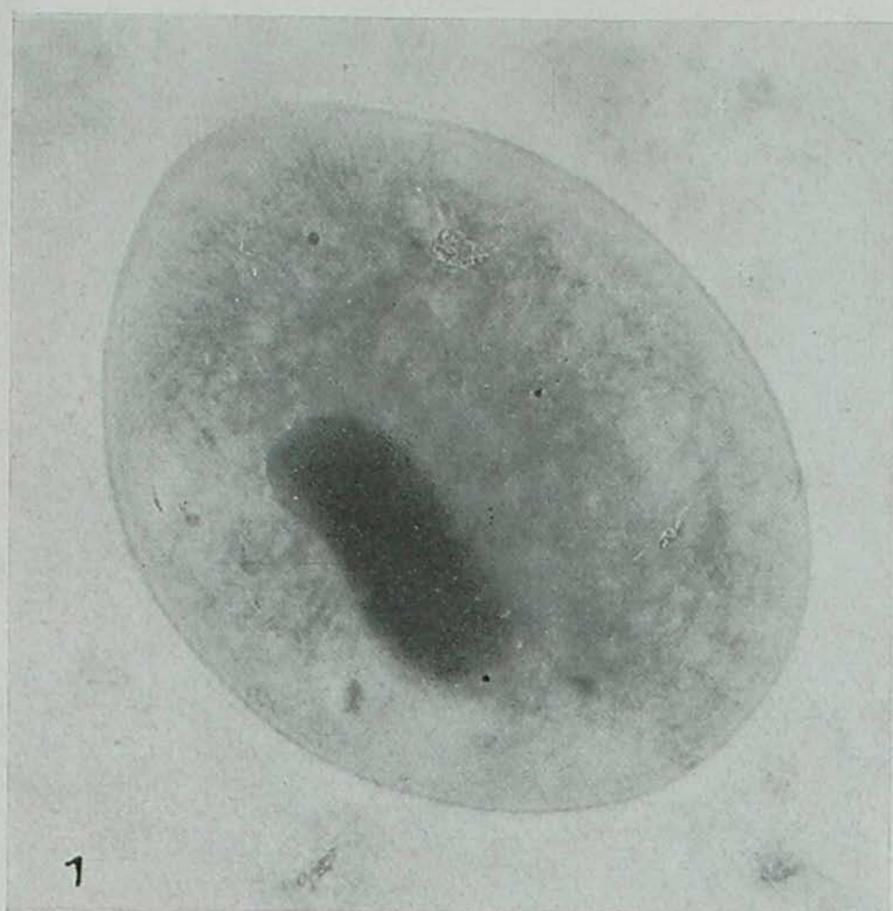


Photo J. Pinto.

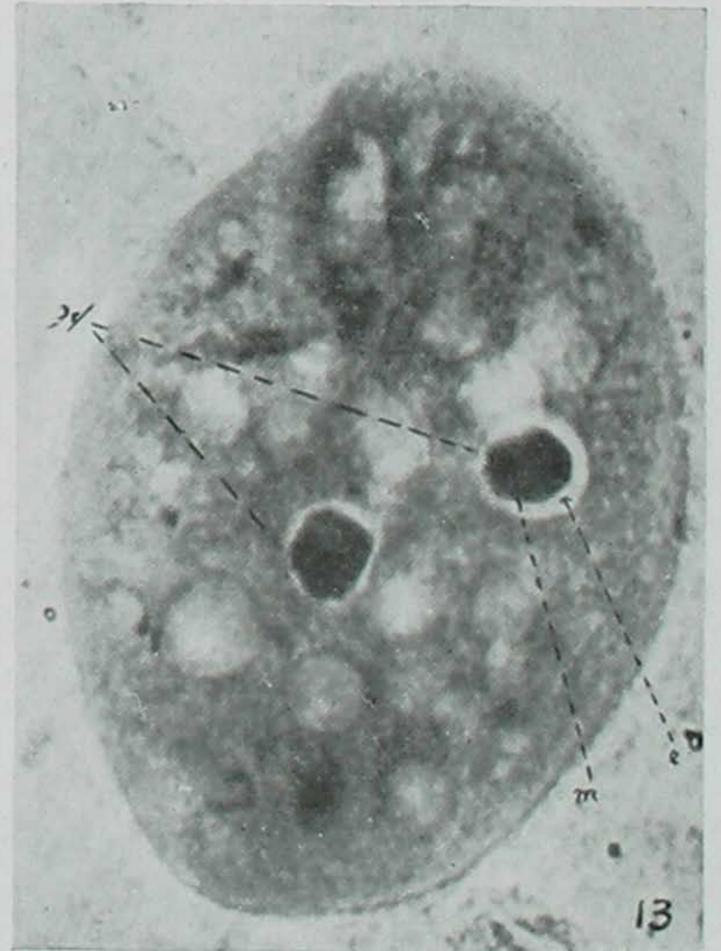
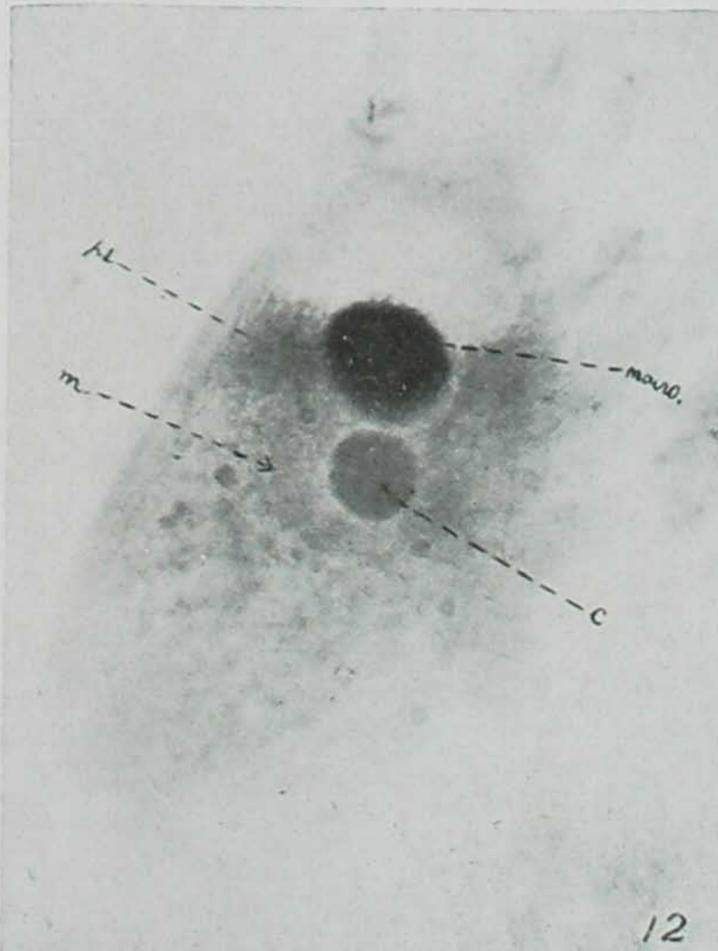
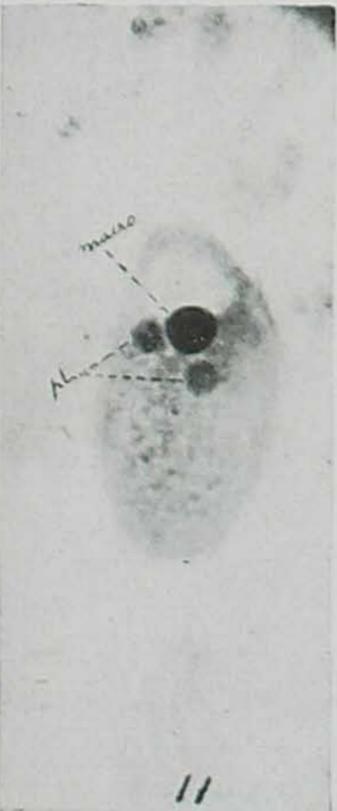
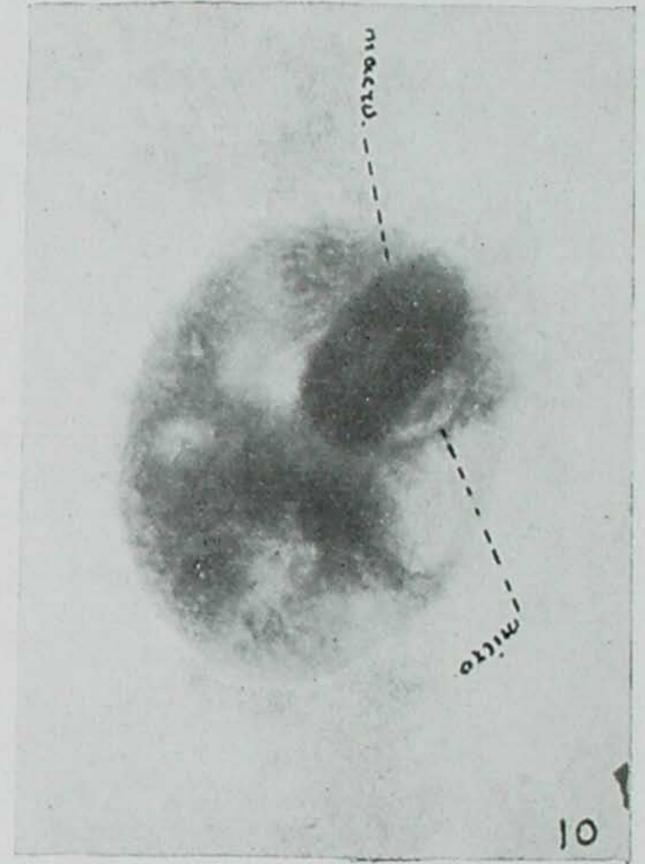
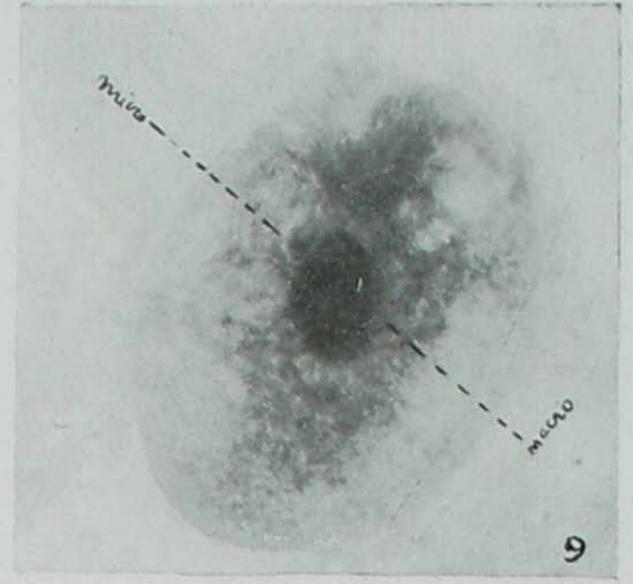
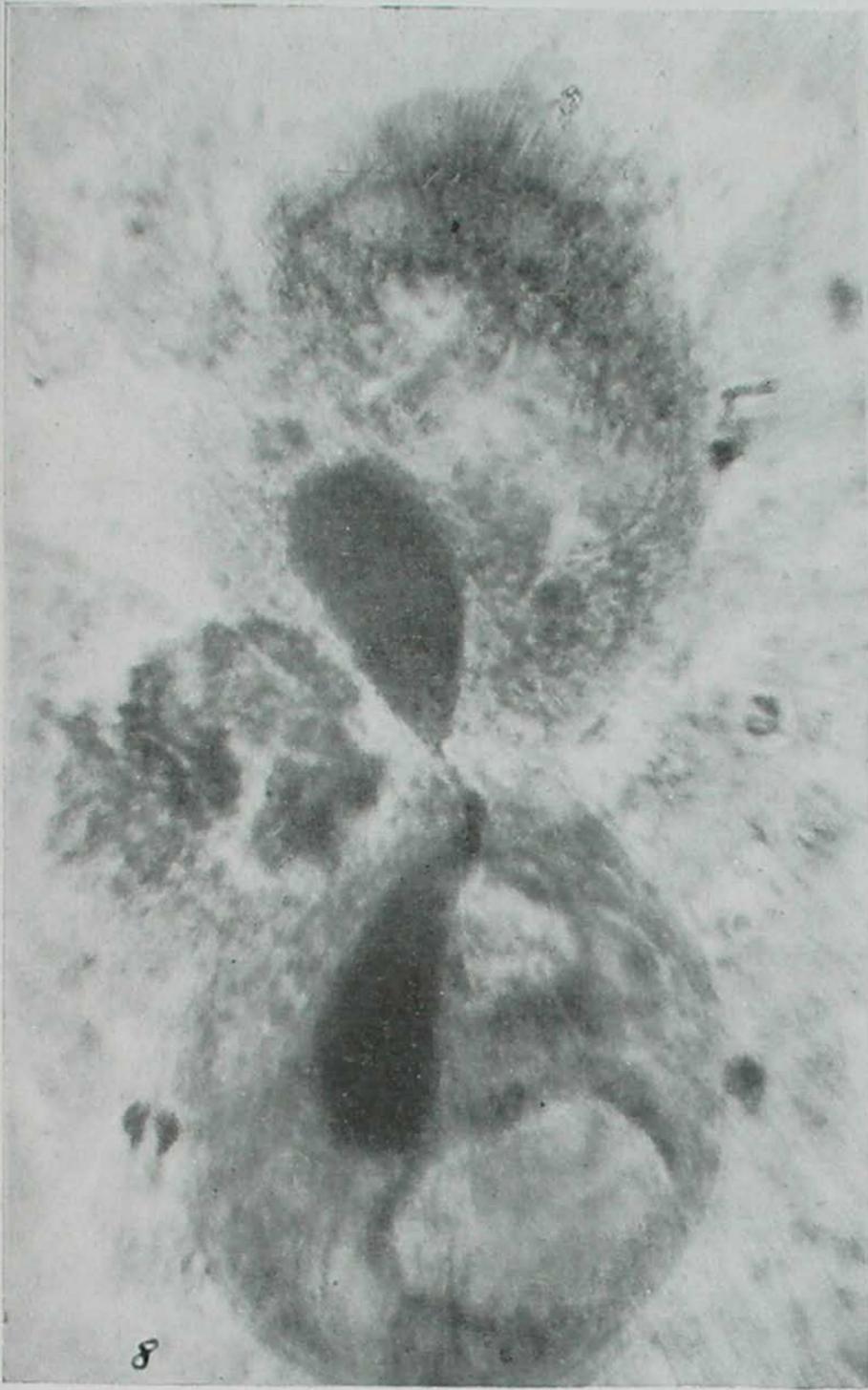


Photo J. Pinto.

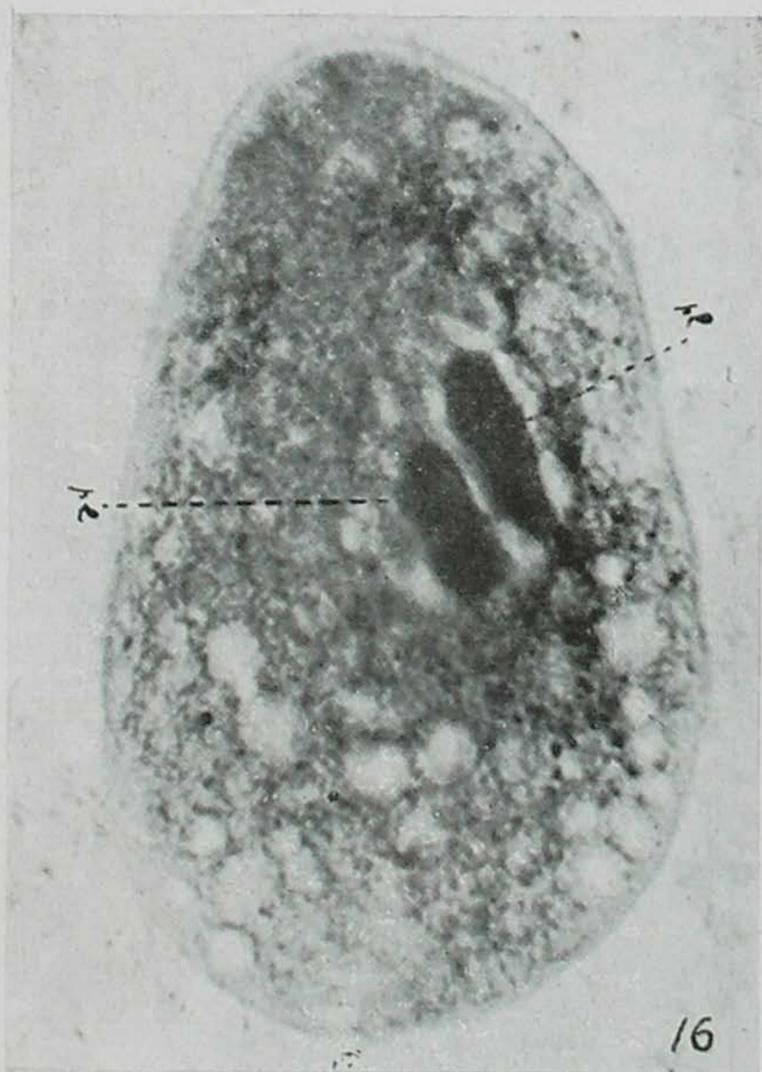
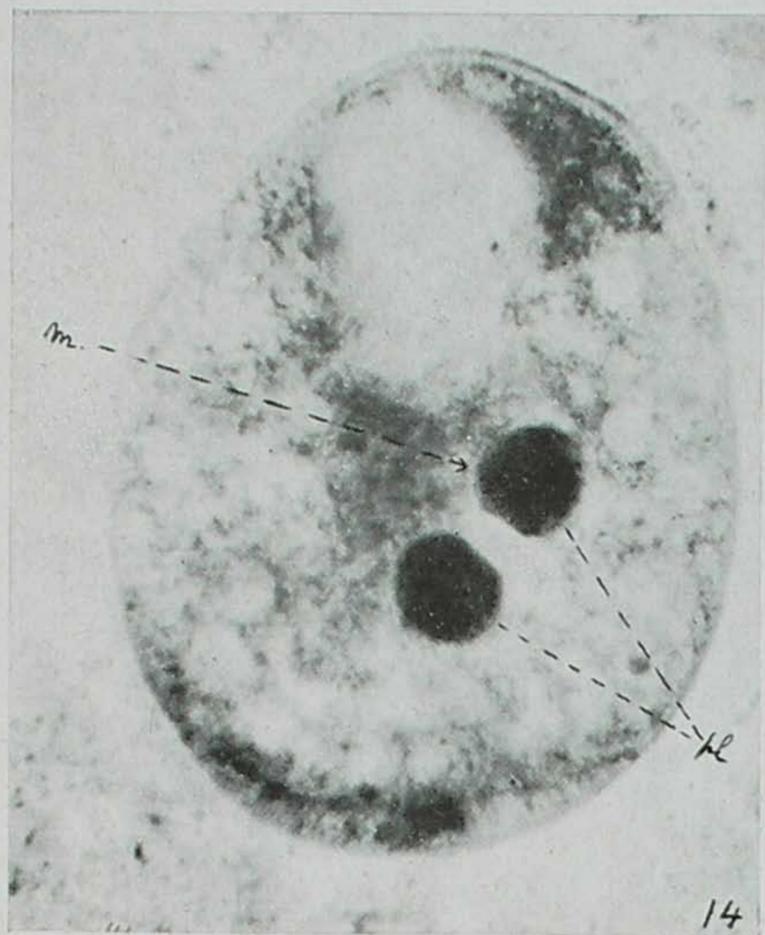


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz : Endomixis em *Balantidium*.

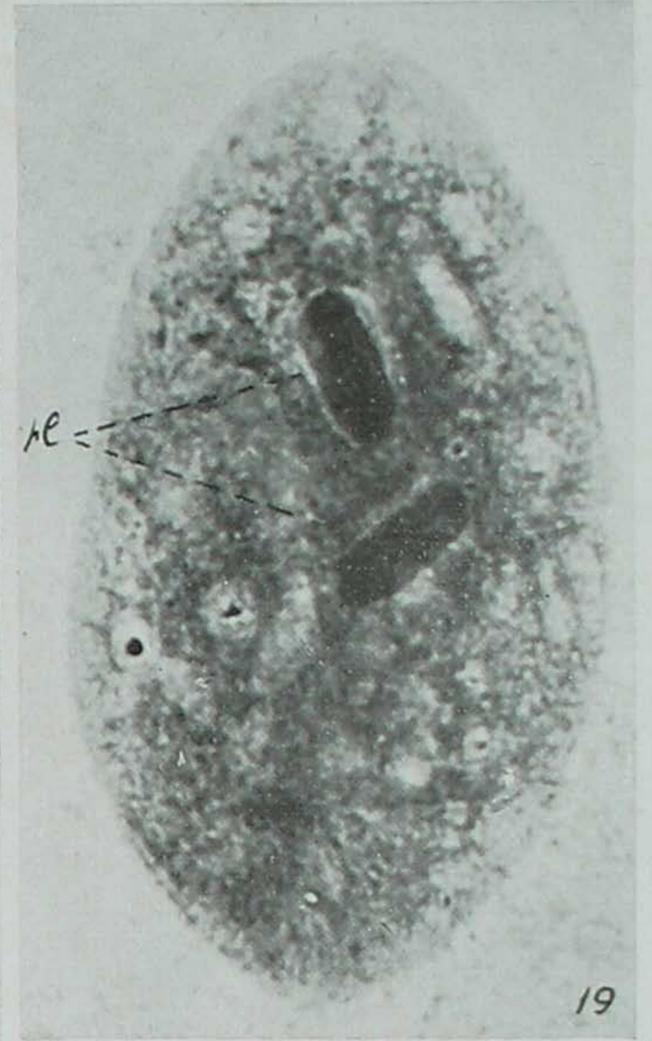
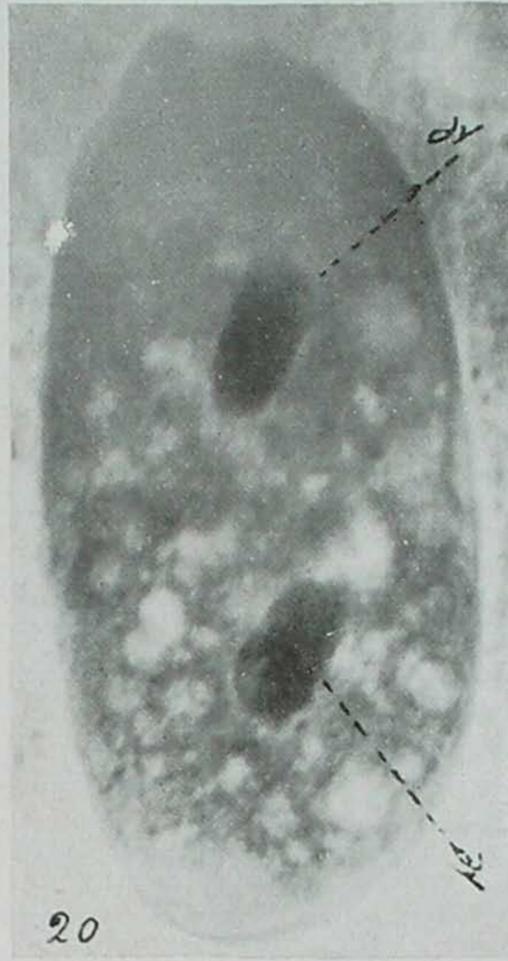
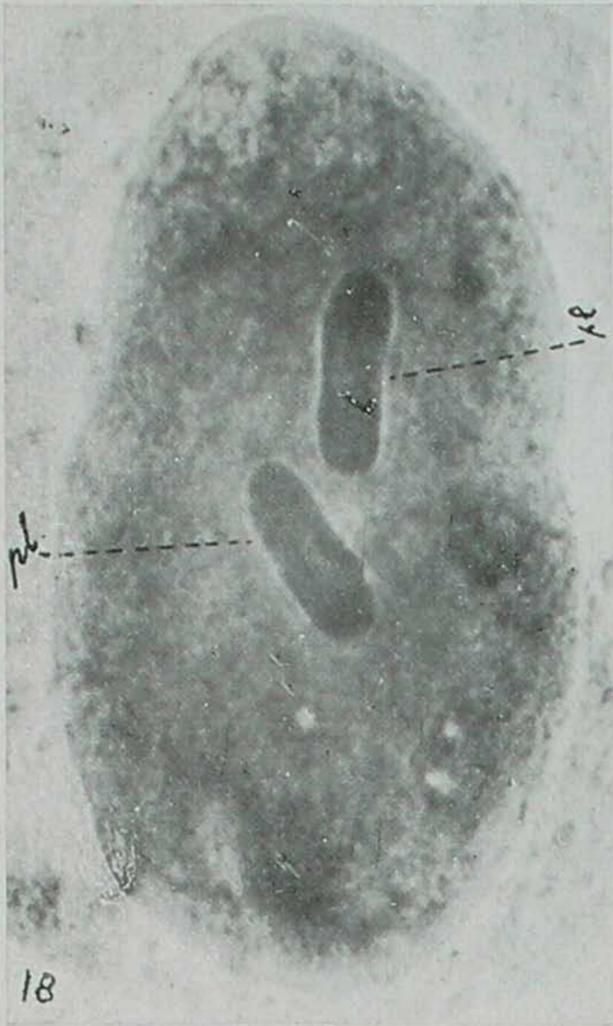


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

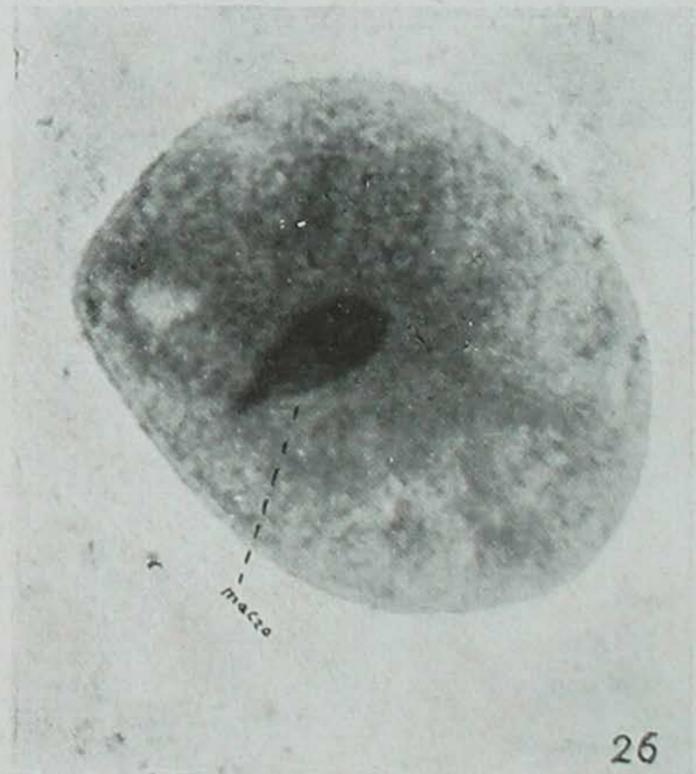
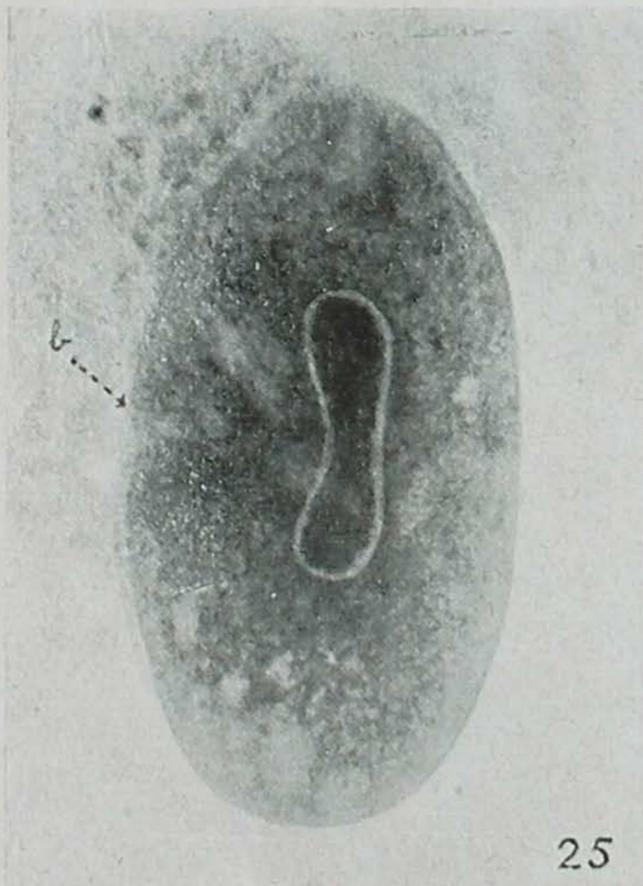
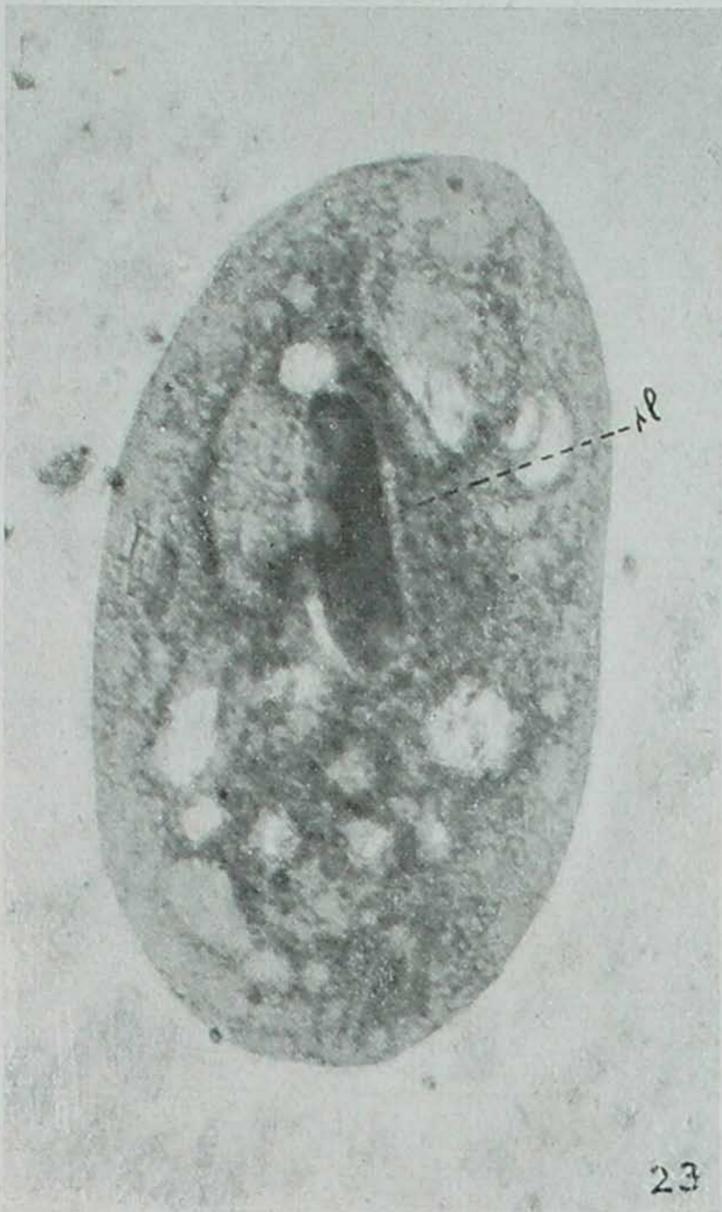
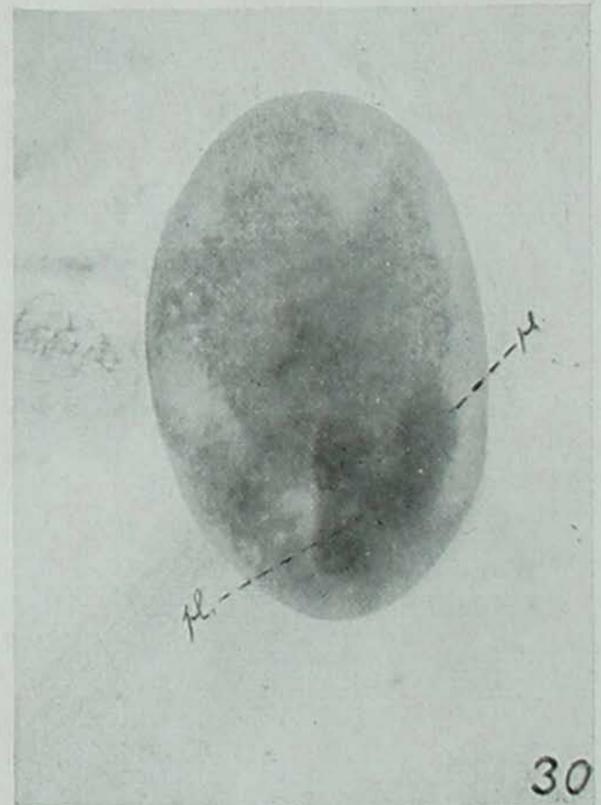
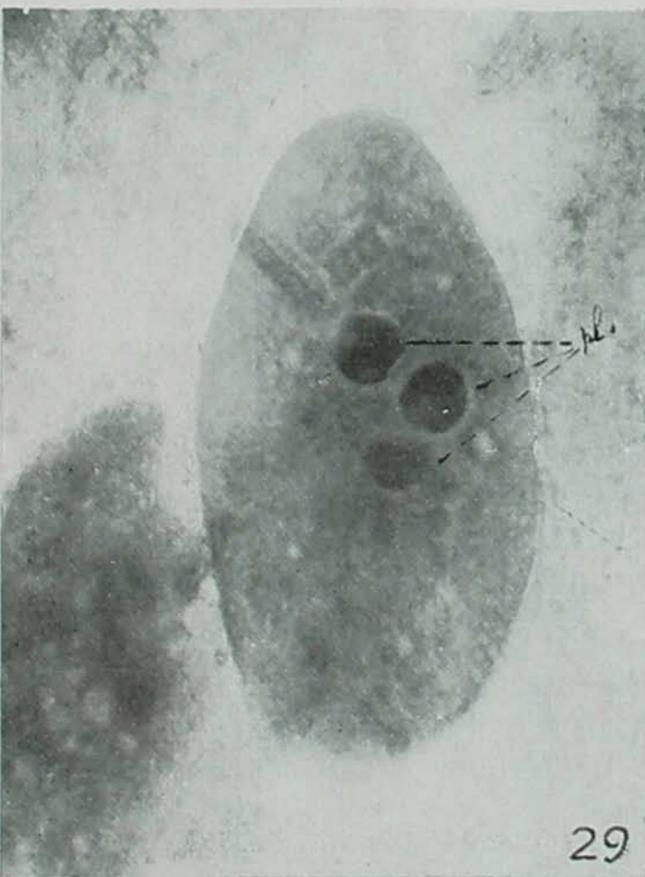


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz : Endomixis em *Balantidium*.



Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz : Endomixis em *Balantidium*.