

Conjugação e Endomixis em ciliados do genero *Balantidium* *

pelos

Drs. Aristides Marques da Cunha e Julio Muniz

(Com 3 estampas)

Todos os autores que se tem occupado com o cultivo de ciliados do genero *Balantidium*, são accordes em assignalar a grande frequencia com que se observa o phenomeno de conjugação nessas condições. Era portanto naturalmente indicado empregar-se esse meio para estudo do processo de conjugação nesses ciliados, principalmente na especie *coli*, parasito do homem, que ainda não havia sido estudado sob esse ponto de vista.

Pareceu-nos tambem de interesse verificar como se comportaria em cultura o *Balantidium simile*, parasita do *Macaca mullata*. Conforme descrevemos em trabalho anterior, esse ciliado não conjuga quando no intestino do macaco, sendo o phenomeno de conjugação substituido pelo de *endomixis* cuja descripção fizemos detalhadamente. Pelo que nos foi dado observar, o *Balantidium simile* se comporta na vida parasitaria, de maneira inteiramente differente das demais especies do genero e por isso seria de interesse verificar, si igual facto occorreria tambem fóra do organismo do hospedador, isto é, nas culturas.

Foram esses os objectivos do presente trabalho cujos resultados passamos a relatar.

MATERIAL E METHODOS DE PESQUIZA

O material que utilizamos em nossas pesquisas provinha de tres origens: material proveniente de um caso de *Balantidiose* humana; material proveniente de coecum e do grosso intestino de porcos mortos no matadouro e parasitados com *Balantidium*; material de fézes de *Macaca mullata* infectados naturalmente com *Balantidium*.

As culturas eram effectuadas no meio de Boeck e Drbohlaw modificado por Dobell e Laidlaw, consistindo a parte solida de sôro de ca-

* Recebido para publicação a 19 de Novembro de 1936 e dado a publicidade em Março de 1937.

vallo, coagulado pelo calor, e a parte liquida de ovo-mucoide, que era preparado retirando-se com cuidado de asepsia a albumina de um ovo que era collocado em um balão com perolas de vidro e fortemente agitado, juntando-se depois 200 cc. de liquido de Ringer tambem esterilizado. Antes de fazer as sementeiras adicionava-se ao meio pequena quantidade de amido de arroz esterilizado.

O *Balantidium* parasita do homem foi facilmente cultivado nesse meio, obtendo-se com elle numerosas passagens. Com *Balantidium* parasita do porco fizemos tres tentativas todas coroadas de exito, obtendo-se tambem aqui numerosas passagens. Já com o *Balantidium* parasita do *M. rhesus* o mesmo não se deu, e, as primeiras tentativas ou eram completamente infructiferas ou oblinha-se proliferação do ciliado apenas nas culturas iniciaes. Verificando que os tubos de cultura que serviam para os repiques e nos quaes o ciliado não se havia multiplicado apresentavam reacção fortemente acida, juntamos ao meio um pouco de carbonato de calcio e deste modo, pudemos obter intensa proliferação do parasita não só nas culturas iniciaes como nos 4 ou 5 primeiras passagens.

Com o material que servia para sementeira faziamos preparados, fixados pelo sublimado-alcool ou pelo Bouin alcoolico (Bouin-Duboscq), e corados pelo hematoxylina ferrica de Heidenhain, diferenciando-os em alcool-chlorhydrico.

Tambem das culturas faziamos preparados corados empregando a technica de preparação em massa. Para esse fim a parte liquida do meio juntamente com o deposito constituido principalmente pelo amido, era retirada do tubo por meio de uma pipeta estirada e collocada num tubo de centrifugo e centrifugada pelo espaço de alguns minutos a pequena velocidade. Esta operação tinha por fim, separar os ciliados da parte liquida do meio de cultura que era depois da centrifugação desprezada para ser substituida pelo fixador. Sem esse cuidado prévio, ao collocarmos o fixador, teriamos uma precipitação em massa das albuminas contidas na parte liquida do meio de cultura que iria prejudicar por completo o material de estudo. A centrifugação quanto feita com cuidado e a pequena velocidade nenhuma influencia nociva exerce sobre as formas dispostas em pares como seria de pensar, determinando uma separação violenta dos elementos assim dispostos. Como fixador utilizamos do sublimado-alcool de Schaudinn. A technica usada foi a de fixação em massa, porque utilizando a fixação em laminulas, grande numero de formas são perdidas por cahirem durante a operação. O tempo de mordançagem era de 24 horas e o de coloração variou entre 6 a 24 horas. Os preparados

que permaneciam sómente 6 horas no corante diferenciavam-se mais facilmente que os outros. Como diferenciador davamos preferencia ao alcool a 70° com algumas gottas de acido chlorhydrico.

CONJUGAÇÃO NO *BALANTIDIUM COLI* PARASITA DO HOMEM

Estudos das culturas á fresco. — Nas culturas examinadas 24 horas após a sementeira, quer nos tubos iniciaes quer nos de passagens, podia-se distinguir logo a primeira vista 2 typos bem differentes; uns maiores, com o plasma cheio de inclusões alimentares constituídas por grãos de amido, outros menores, com plasma de aspecto quasi sempre hyalino, desprovido de inclusões e dotadas de movimentos bastante vivos. Ao lado dessas formas eram encontrados na maioria das vezes, pares em numero variavel em cada cultura, sendo algumas vezes bem numerosos, pares esses constituídos pela reunião de duas formas pequenas acima referidas. Quando nas culturas examinadas, eram verificadas á presença de formas pequenas com ausencia concomitante dos pares, um exame posterior do material realizado 1 a 2 horas após a volta das culturas a estufa, já revelavam sempre a existencia das formas dispostas duas a duas. Um exame mais aprofundado dos elementos que constituíam os pares, demonstrou que um delles era sempre um pouco maior que o outro e que a união desses elementos se fazia a custa da região do peristoma que permanecia acolada uma a outra. A zona adoral, pelo que nos foi dado observar, não desapparecia enquanto permaneciam os elementos assim reunidos, embora em alguns delles não se apresentasse ella com bastante nitidez. Os elementos constitutivos do par se dispunham um ao lado do outro, não parallelos, mas formando um angulo mais ou menos agudo com o vertice anteriormente disposto, constituído pela reunião dos peristomas. Esse aspecto que se observa pelo exame á fresco é bem differente daquelle que se nota nos preparados corados em que os elementos se dispõem um em frente do outro occupando um mesmo eixo. As formas dispostas em pares, continuam a se mover embora não tão intensamente como as outras formas. O tempo em que essas formas permanecem reunidas não nos foi possivel determinar, devido a precaria resistencia apresentada por ellas ás condições em que fosse possivel esse exame.

Estudo do material corado. — Para melhor exposição do assumpto estudaremos em primeiro logar as phases preparatorias da conjugação, em seguida a conjugação propriamente dita, para depois tratarmos da phase final do phenomeno.

PHENOMENOS QUE PRECEDEM A CONJUGAÇÃO. PRECONJUGANTES.

Correspondendo ás formas de menor tamanho com o protoplasma desprovido quasi sempre de inclusões e observadas no exame á fresco das culturas de 24 horas, encontramos nos preparados corados desse mesmo material formas de dimensões idênticas e com o protoplasma também isento de inclusões apresentando o micronúcleo extremamente desenvolvido, podendo atingir, como verificamos, cerca de 6 micra de diametro. Esse aspecto particular do micronúcleo distingue facilmente essas formas daquellas denominadas neutras, das quaes sem duvida as primeiras se originam após successivas divisões como demonstra a forma representada na fig. 1, Est. 1, provida de um micronúcleo bastante augmentado de volume com o macronúcleo apresentando uma das extremidades afilada, que denota não ter se processado ainda completa reconstituição após a divisão que veio a soffrer, reconstituição essa que se fará mais tarde quando o macronúcleo assumirá uma forma semelhante aos da forma neutra, continuando o micronúcleo augmentar de volume, attingindo então grandes dimensões como a que referimos acima.

O numero de divisões effectuadas para a formação dos preconjugantes (divisões progamicas) não pode ser determinado.

Em alguns das formas referidas, o micronúcleo apresentava uma estrutura interna que se assemelha muito com as chamadas formas em paraquedas, descriptas por alguns autores na conjugação de outros ciliados. É assim que no interior do micronúcleo observa-se junto a um dos polos uma pequena massa chromophila intensamente corada, ligada por filamentos a uma outra menos chromophila, de maior tamanho, em forma de crescente e collocada no polo opposto do micronúcleo (Est. 1, fig. 2). As formas, porém, que mais abundavam no material, eram aquellas que apresentavam o micronúcleo extremamente augmentado e com aspecto estriado, o que denota o inicio de um processo de mitose. Em individuos isolados não encontramos micronúcleos em phase mais adiantada de divisão (Est. 1, fig. 3).

As formas de preconjugantes que eram encontradas em grande numero do material por nós estudado, apresentavam dimensões bem menores que as encontradas para as formas neutras. Póde-se dizer serem ellas em tamanho cerca da metade destas ultimas como facil se torna verificar, observando as tabellas que damos neste trabalho. As dimensões dos preconjugantes oscillam entre 36 a 47 micra de comprimento para 27 a 38 micra de largura, sendo a média representada por 38,6 e 32,1 micra. O comprimento que verificamos para as formas

neutras oscilla entre 63 a 95 micra enquanto a largura entre 49 a 65 micra, representando a média 75,5 e 57,8 micra.

Apezar da grande diferença de dimensões apresentada por essas formas, a relação comprimento-largura conservou-se por assim dizer idêntica, sendo de 1,30 para as formas neutras e 1,26 para os preconjugantes.

CONJUGAÇÃO PROPRIAMENTE DITA. CONJUGANTES.

O phenomeno de conjugação se inicia pela reunião de 2 formas pequenas como as que descrevemos ha pouco, e que representam os preconjugantes. Como já tivemos occasião de nos referir ao modo porque se dispõem esses elementos para formarem pares, vamos agora estudar aqui separadamente o comportamento do micronucleo e do macronucleo nesta phase do phenomeno.

Comportamento do micronucleo. — Após a reunião de dois individuos, o micronucleo que já se apresentava nos preconjugantes, conforme referimos, em phase preparatoria de mitose, entra em franca divisão.

Essa se faz por processo de mitose semelhante ao que se encontra em outros ciliados. É digno de nota o grande desenvolvimento da parte achromatica da mitose, em contraste com pequena quantidade de chromatina que se dispõe em chromosomas em forma de pequenos granulos, cujo numero não foi possivel determinar (Est. 1, figs. 4 e 5).

Durante a primeira divisão o micronucleo se acha collocado junto ao macronucleo e o phenomeno se passa de maneira semelhante nos dois elementos do par.

Dessa mitose resultam dois nucleos que entram immediatamente em nova divisão, que se faz por processo de mitose semelhante ao anteriormente descripto (Est. 1, fig. 6).

Terminadas essas divisões, vamos encontrar em cada conjugante 4 nucleos, um dos quaes se destina a formação dos pronucleos, enquanto os 3 outros degeneram (Est. 1, fig. 7). O processo de degeneração se inicia pela retracção do conteúdo do nucleos que toma um aspecto de massa de contorno irregular occupando a parte central do nucleos, cercada de um halo claro e limitada exteriormente pela membrana nuclear. A substancia chromatica se apresenta condensada no interior da massa irregular acima referida.

Com a continuação do processo degenerativo, verifica-se a diminuição cada vez mais accentuada desses elementos que ficam reduzidos a pequenos granulos chromaticos cercados de halo claro. De um modo

geral, esses elementos persistem até a formação dos pronucleos não sendo mais observados nas phases adiantadas do phenomeno.

O producto da divisão do micronucleo que não soffre degeneração (um em cada conjugante) e que se destina á formação dos pronucleos, mostra-se com aspecto bem differente dos elementos em via de degeneração; assim, apresenta maiores dimensões, não se observando aqui nem retracção do conteúdo nuclear nem condensação da substancia chromatica. Em torno desse elemento, observa-se de maneira constante uma condensação do plasma que se exteriorisa nos preparados corados por uma coloração mais intensa. Esse phenomeno, que se esboça desde o inicio do processo de conjugação em redor dos elementos em via de divisão, se accentua cada vez mais no decurso do phenomeno, tornando-se aqui bem nitido. Essa condensação do plasma não é observada em redor dos elementos em via de degeneração.

A formação dos pronucleos se faz por divisão desse elemento, divisão essa que se dá por processo de mitose semelhante aos anteriormente referidos (Est. 1, fig. 8).

Uma vez formados os dois pronucleos, um delles (*pronucleo estacionario*) permanece geralmente na parte posterior do ciliado, proximo do macronucleo e as vezes atraz delle, enquanto que o outro (*pronucleo migrador*) se dirige para a parte anterior do corpo do ciliado, passa para o outro elemento do par se encaminhando para o pronucleo estacionario (Est. 1, fig. 9).

Os pronucleos apresentam-se bastante volumosos, de forma redonda ou ligeiramente pyriforme, com a chromatina geralmente condensada.

Uma vez chegando o pronucleo migrador junto ao pronucleo estacionario, permanecem os dois pronucleos lado a lado. Os pronucleos apresentam nessa phase uma estrutura que lembra as formas em paraquedas a que já nos referimos (Est. 1, fig. 10). Nunca observamos a fusão dos dois pronucleos para constituição do syncario; o que vimos foi o estiramento desses elementos, formando dois fusos parallelos mais ou menos proximos um do outro (Est. 2, figs. 13 e 14). Esse facto deve ser interpretado como um phenomeno de *gonomeria* já conhecido em outros ciliados. É geralmente nessa occasião que se dá a separação dos dois elementos constitutivos do par proseguindo então a evolução nos ciliados já separados (*ex-conjugantes*) para reconstituição do aparelho nuclear.

Embora muitas vezes a evolução do micronucleo durante o phenomeno de conjugação se passa synchronicamente nos dois elementos do par, casos existem em que isso não se dá e nos quaes se observa que

um dos conjugantes se acha em phase mais adiantada que o outro elemento do par (Est. 1, fig. 11 e Est. 2, fig. 12).

Comportamento do macronucleo. — Durante o processo de conjugação, o macronucleo conserva a principio o aspecto normal degenerando sómente nas phases finaes do phenomeno. Geralmente, os primeiros signaes de degeneração, são observados durante a formação dos pronucleos e se manifestam por uma retracção do conteúdo do nucleo que se desloca da membrana nuclear. O conteúdo do nucleo assim retrahido, apresenta-se de aspecto compacto, intensamente corado e com alguns pequenos vaculos no interior (Est. 1, figs. 6, 8, 11 e Est. 2, fig. 12). A retracção da substancia nuclear se faz lentamente e o macronucleo conserva esse aspecto até a separação dos conjugantes.

PHENOMENOS QUE SEGUEM Á CONJUGAÇÃO. EX-CONJUGANTES.

Comportamento do micronucleo. — Pelo que nos foi dado observar, a separação dos conjugantes se dá quando os dois pronucleos se acham em divisão, formando dois fuzos paralelos, collocados um junto do outro (gonomeria).

É geralmente durante a divisão dos pronucleos, que os dois fuzos se fundem dando em resultado, uma vez terminadas as mitoses, a dois outros nucleos. Um desses nucleos, vae constituir o novo micronucleo e apresenta-se a principio de aspecto pyriforme com a chromatina condensada no polo mais largo. O outro nucleo, entra logo em divisão e por isso, nunca nos foi possivel observal-o em estado de repouso. Essa divisão se processa por mitose semelhante as que temos descripto no decorrer do phenomeno (Est. 2, fig. 15).

Terminada essa divisão, fica o ex-conjugante com tres nucleos. além do macronucleo em via de degeneração. Um delles que representa o novo micronucleo apresenta-se redondo e com a chromatina condensada, os outros dois, que provem da mitose referida mais acima, mostram-se tambem de forma redonda, um pouco maiores que o micronucleo e apresentam a chromatina pouco abundante e uniformemente espalhada (Est. 2, fig. 16). Esses dois nucleos a que nos referimos por ultimo, formam duas placentas que crescem rapidamente, apresentando-se a principio muito pobres em chromatina que em certa phase da evolução se dispõe em granulos bastante finos e uniformemente espalhados. Estas placentas, apresentam no seu interior alguns granulos arredondados de tamanho regular e cuja significação não nos foi possivel esclarecer. As placentas se dispõem um ao lado da outra, ficando

o micronucleo junto a ellas (Est. 2, fig. 18). A chromalina vae augmentando progressivamente e tudo leva a crêr que as duas placentas terminem por se fundirem para constituir o novo micronucleo.

No *Balantidium* do homem não observamos nos ex-conjugantes nem placentas estiradas nem divisão do micronucleo como acontece com o *Balantidium simile*, na phase de reconstituição nuclear após o phenomeno de endomixis, estudado e descripto por nós em trabalhos anteriores.

Comportamento do macronucleo. — Logo após a separação dos conjugantes o macronucleo soffre retracção rapida, apresentando-se pequeno, intensamente corado e de contorno irregular (Est. 2, fig. 15). Dá-se em seguida a fragmentação do macronucleo em 3 ou 4 massas pequenas, intensamente coradas (Est. 2, fig. 16) e que são rapidamente reabsorvidas pois não são mais encontradas em phases posteriores do phenomeno. Esta fragmentação se processa geralmente logo após a formação das placentas.

Excepcionalmente o macronucleo póde se conservar sem fragmentação após a formação das placentas (Est. 2, fig. 18).

CASOS ANOMALOS

Embora habitualmente o phenomeno se passa conforme acabamos de descrever, algumas formas observadas mostram que póde certas vezes, o processo se afastar das normas referidas. Assim, a fig. 19, Est. 2 representa uma forma com duas placentas e dois micronucleos emquanto que a fig. 20, Est. 2, uma outra com quatro placentas e tambem dois micronucleos. A origem dessas formas poderá ser facilmente explicada pela persistencia do phenomeno de gonomeria observado como regra na conjugação desse ciliado. No primeiro caso, haveria fusão dos elementos provenientes de um dos polos de cada fuso, emquanto os outros dois permaneciam separados; no segundo caso os dois fusos terminavam a divisão sem se fundirem dando logar de um lado aos dois micronucleos e de outro a dois nucleos que por nova divisão iriam formar as quatro placentas.

Uma outra anomalia observada refere-se a formação de uma unica placenta (Est. 2, figs. 21 e 22). Acreditamos que essas formas constituam anomalias de cultura destinadas á perecerem, conforme se póde observar na fig. 22 onde tanto o macronucleo como o micronucleo apresentam signaes nitidos de degeneração. Quanto a julgarmos essa anomalia peculiar ás formas de cultura, somos levados a assim pensar pelo facto de termos observado formas semelhantes em cultura de *B.*

simile após o phenomeno de endomixis, enquanto que nunca observamos esse mesmo phenomeno em material proveniente directamente do animal infectado.

Juntamos ao trabalho quadros com as dimensões não só das formas neutras como dos pre-conjugantes, conjugantes e ex-conjugantes, assim como a relação comprimento-largura para cada um desses casos.

Quadro 1

Dimensões das formas neutras.

Comprimento em micra	Largura em micra	Relação comprimento / largura
76	53	1,33
63	53	1,19
66	49	1,34
72	53	1,35
78	63	1,24
85	63	1,35
82	65	1,26
68	57	1,19
95	57	1,49
70	61	1,15
media 75,5 μ	57,8 μ	1,30

Quadro 2

Dimensões dos preconjugantes.

Comprimento em micra	Largura em micra	Relação comprimento / largura
40	30	1,33
38	33	1,15
38	33	1,15
29	27	1,07
38	28	1,35
47	32	1,46
40	34	1,17
42	38	1,10
36	28	1,27
38	28	1,35
media 38,6 μ	32,1 μ	1,26

Quadro 3

*Dimensões dos conjugantes **

Comprimento em micra	Largura em micra	Relação comprimento / largura	Comprimento em micra	Largura em micra	Relação comprimento/largura
42	30	1,40	40	33	1,21
46	30	1,53	40	34	1,18
44	33	1,33	38	34	1,12
50	43	1,16	44	35	1,25
46	34	1,35	44	38	1,15
57	49	1,18	52	44	1,18
47	32	1,46	38	28	1,39
44	32	1,36	40	32	1,25
38	27	1,40	34	30	1,13
47	34	1,38	42	32	1,31
46,1 μ	34,4 μ	1,35	41,2 μ	34,0 μ	1,21

* As dimensões da tabella á esquerda correspondem a um dos elementos do par (o de maiores dimensões) e as dimensões correspondentes a tabella á direita, ao outro elemento do mesmo par.

Quadro 4

Dimensões dos ex-conjugantes.

Comprimento em micra	Largura em micra	Relação comprimento / largura
57	44	1,29
47	34	1,38
41	33	1,24
47	31	1,51
54	37	1,45
51	41	1,24
42	37	1,13
62	44	1,40
53	38	1,39
49	38	1,31
media 50,3 μ	37,7 μ	1,33

DISCUSSÃO

A conjugação no *Balantidium coli* do homem segue em suas grandes linhas, a mesma marcha observada em outros ciliados. Ao contrario do que suppunha Jameson para o *Balantidium* do porco, a conjugação

no *Balantidium coli* do homem é halogamica, isto é, ambos os elementos do par são fecundados.

Na reunião dos ciliados para formação dos pares observa-se também neste caso uma selecção dos elementos á se associarem (*associative matting*) mas essa selecção se faz não pela reunião de elementos de identicas dimensões mas de um ciliado menor com um maior, guardando, porém, determinadas proporções. Merece ser notado que o individuo maior de um par apresenta-se sempre mais alongado, isto é, mostra uma relação comprimento-largura maior que o outro elemento.

A marcha do phenomeno é no *Balantidium coli* do homem semelhante ao que observou Nelson no parasita do chimpanzé, afastando-se da descripção desse autor apenas em um ponto. Nelson descreve a reunião dos dois pronucleos formando um syncaryo que daria por uma divisão heteropolar o micronucleo e um outro nucleo que por nova divisão forma as duas placentas. Em nosso caso nunca observamos fusão dos pronucleos nem formação de syncaryo. O que observamos como regra é que os dois pronucleos chegando a proximidade um do outro, entram em divisão, formando dois fusos paralelos (*gonomeria*). É durante essa divisão que se dá geralmente a fusão dos dois elementos.

BALANTIDIUM PARASITA DO PORCO

Com o *Balantidium* parasita do porco fizemos 3 vezes culturas com material de proveniencias diferentes. Em todas as vezes obtivemos culturas abundantes conseguindo com facilidade passagens successivas. Verificamos também que em todas as culturas após 24 horas, observava-se a formação de pares constituídos por formas pequenas que appareciam também isoladas (*pre-conjugantes*). No caso do *Balantidium* do porco, nos limitamos a verificar a occurrencia do phenomeno de conjugação nas culturas, deixando o estudo detalhado do phenomeno para trabalho posterior.

Não chegamos também a determinar si o ciliado cultivado por nós era a especie *coli*, a especie *suis* ou ambas especies.

BALANTIDIUM SIMILE

Conforme assignalamos anteriormente, na parte referente ao material e methodos de pesquisa, as primeiras tentativas para cultura desse ciliado foram infructiferas e só mais tarde, com o emprego de certos artificios de technica, é que conseguimos obter abundante multiplicação do parasita não só nas primeiras culturas como em algumas passagens cujo numero porém nunca excedeu de 4 a 5.

Ao contrario, porém, do que haviamos observado com o *Balantidium* do homem e do porco, o exame quer das culturas originaes quer dos repiques, praticados repetidas vezes e em prazos differentes que oscillavam desde 4 horas até 72 horas após á sementeira, nunca mostraram formas dispostas em pares, embora se observasse a presença no fim de cerca de 24 horas, de numerosas formas de menores dimensões que as demais, com protoplasma desprovido de inclusões alimentares.

As culturas de *Balantidium simile* foram feitas muitas vezes e com material proveniente de diversos animaes, sendo o resultado sempre o mesmo por mais exhaustivo que fosse o exame das culturas. Com o material das culturas (originaes e repiques) fizemos preparados corados e o exame desses preparados veio demonstrar a presença de formas que correspondiam ás diversas phases do phenomeno de endomixis por nós descripto nesse ciliado. Assim foram encontrados nas culturas, formas representando a divisão progamica (divisão de que resultam ciliados pequenos com o micronucleo muito volumoso), formas nas quaes eram observadas mitose do micronucleo com inicio de degeneração do macronucleo (phase pela qual se inicia o processo de endomixis) Est. 2, fig. 23 e outras formas representando as phases iguaes do phenomeno. Deixamos de reproduzir desenhos dessas formas para, por assim dizer, não reeditar as figuras de nosso trabalho anterior sobre o assumpto. Particularmente interessante eram as formas nas quaes podia ser observado nitidamente a formação de novo micronucleo a custa de uma das placentas. A observação desse facto no material das culturas veio confirmar um dos pontos de nosso trabalho, em que a documentação parecia menos abundante e por isso damos novos desenhos e microphotographias dessas formas obtidas em material de cultura (Est. 2, fig. 24; Est. 3, microph. 25 e 26). Dessas nossas pesquisas podemos concluir que o *Balantidium simile* não conjuga nas culturas como as outras especies estudadas, mas passa por um processo de reorganisação semelhante ao que se observa no intestino do macaco que foi por nós descripto em trabalho anterior. Sobre a marcha do phenomeno de endomixis, as observações que fizemos nas culturas confirmam os factos verificados por nós anteriormente. Um ponto, porém, merece referencia especial. Ao descrevermos o phenomeno de endomixis no *Balantidium simile*, admittimos a existencia de uma unica divisão do micronucleo da qual resultaria a formação das duas placentas e interpretamos os individuos em que observamos duas formas de mitoses, como formas anomalas, destinadas á formação das formas com quatro placentas e que tivemos occasião de observar. Levando, porém, em consideração que em todos os casos até agora estudados, o phenomeno de endomixis corresponde em todas as sua pha-

ses ao processo de conjugação, com excepção apenas de formação dos pronucleos e respectiva fusão, somos levados a modificar a nossa primitiva interpretação, admittindo que os individuos nos quaes se observam duas mitoses correspondem a uma phase normal do processo de endomixis, havendo assim duas mitoses successivas do micronucleo de que resultam quatro nucleos, tres dos quaes degeneram indo o restante por divisão formar as duas placentas.

Essa interpretação decorre da comparação entre os phenomenos de conjugação e endomixis, pois a rapidez com que se succedem algumas das phases desse ultimo processo não nos permittiu a observação minuciosa das alterações por que passa o ciliado nesta phase do phenomeno. Observamos comtudo em algumas formas em que se viam as placentas recentemente formadas, a presença de granulos que podiam ser interpretados como restos dos nucleos em via de degeneração.

Conjugação e endomixis. — Si compararmos de um lado o phenomeno de conjugação observado em diversas especies de *Balantidium* e de outro o processo de endomixis que descrevemos no *Balantidium simile*, notamos que, além da differença fundamental que distingue os dois processos de reorganisação, isto é, a formação dos pronucleos e sua fusão que ocorre no processo de conjugação e que falta no de endomixis, em mais dois outros pontos divergem os dois phenomenos. Assim, o processo de endomixis se passa no *Balantidium simile* com muito maior frequencia que o phenomeno de conjugação nas outras especies de *Balantidium*, encontrando-se nas fézes do macaco sempre muito maior numero de formas com 2 placentas (Phase de reorganisação nuclear encontrada nos dois processos) do que em material proveniente do homem ou do porco.

Por outro lado, o phenomeno de endomixis tem uma marcha muito mais rapida, de modo que muitas vezes as diversas phases do phenomeno como que se superpõem uma as outras. Para documentar essa nossa asserção basta lembrar que, após a divisão progamica o macronucleo não se reconstitue, como acontece na conjugação, tomando forma semelhante á das formas neutras, mas entra logo em degeneração. Este facto explica a forma que apresenta o macronucleo nas phases iniciaes do phenomeno. A formação do micronucleo por uma das placentas pode tambem ser explicada como um processo de abreviação do phenomeno, acarretando a occurrencia simultanea das duas phases de reorganisação nuclear, a separação da chromalina geradora da trophica e o crescimento dessa ultima para formação do macronucleo.

DISCUSSÃO

Em trabalho anterior assignalamos a existencia do phenomeno de endomixis no *Balantidium simile* e descrevemos as diversas phases do phenomeno.

Em trabalho publicado sobre a conjugação do *Balantidium* parasita do chimpanzée, S. C. Nelson contesta as conclusões a que chegamos e nega a existencia do phenomeno de endomixis nessa especie de *Balantidium*, dizendo que os diversos aspectos por nós descriptos representam apenas phases do phenomeno de conjugação desse ciliado.

Faltou, porém, a esse autor o unico argumento no qual elle se podia basear para chegar a uma tal conclusão, isto é, o encontro de pares de conjugantes. A isso elle não se refere em seu trabalho o que certamente teria feito si os tivesse observado, cabendo-lhe pois de direito as censuras que nos dirige em seu trabalho.

Quanto aos preparados nossos que elle diz ter examinado, tratam-se de algumas preparações dadas ao Prof. Hegner em sua passagem pelo Rio de Janeiro e que continham algumas phases do phenomeno.

Os resultantes a que chegamos agora no presente trabalho, isto é, a ausencia de conjugação do *Balantidium simile* nas culturas e a occurrencia nessas condições do phenomeno de endomixis, constituem as melhores provas do acerto de nosso trabalho anterior.

Assim, enquanto que nas culturas feitas com material proveniente do homem como do porco, formas em conjugação, isto é, dispostas aos pares, eram encontradas constantemente, nas culturas feitas com material proveniente do *Macaca mullata* (*Balantidium simile*) nunca observamos pares embora tivessemos examinado centenas de culturas.

Convém assignalar que apesar da ausencia de pares, as culturas no fim de 48 horas se mostravam constituídas quasi exclusivamente por formas com duas placentas, formas essas que só podiam resultar de um phenomeno de endomixis.

Si, por acaso, houvesse conjugação no *Balantidium simile*, a observação de pares deveria ser muito mais facil que em outras especies, dada o numero muito maior de formas com 2 placentas resultantes desse phenomeno. Além disso, as conclusões a que chegamos quer no trabalho anterior quer no presente, não se baseam sómente nesse facto.

Já havíamos no trabalho que estudamos o phenomeno de endomixis, assignalado a presença de formas com macronucleo em degeneração e micronucleo em franca mitose, as vezes em phase final desse phenomeno (Est. 2, fig. 16 desse trabalho), phases essas que nunca oc-

correm quando se trata de conjugação em um individuo isolado. Esse mesmo facto verificamos agora nas culturas.

O *Balantidium simile* constitue o exemplo de um ciliado no qual o phenomeno de conjugação se acha substituido de maneira permanente pelo de endomixis. Identico phenomeno ocorre com um grande grupo de ciliados das familias *Cyathodinidae* e *Enterophrydae* segundo trabalhos de Cunha e Freitas.

Para esses ciliados propuzemos a designação de ciliados *azygoticos* ou *parthenogeneticos*.

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho estudamos o comportamento de alguns ciliados do genero *Balantidium* nas culturas em meios artificiaes. Utilisamos de preferencia nesses estudos o meio para ameba de Dobell e Laidlaw, enriquecidos com amido de arroz. As especies com que trabalhamos foram: *B. coli* isolado do homem; *Balantidium* sp. do porco e *B. simile* do *Macaca mulatta*.

A especie originaria do homem, foi por nós cultivada com grande facilidade durante um tempo bastante longo, fazendo-se os repiques com o espaço de 24 a 48 horas. Observamos com grande constancia nessa especie o apparecimento do phenomeno de conjugação nas culturas de 24 horas (cultura original ou repiques). Os pares eram constituídos por fórmãs pequenas medindo em média $38,6 \times 32,1$ micra ao contrario das fórmãs neutras que mediam em média $75,5 \times 57,8$ micra, sendo de notar que fórmãs pequenas eram tambem encontradas em grande numero isoladas (preconjugantes). Essas fórmãs se caracterisavam nos preparados corados, não só pelo seu tamanho como tambem pela grande dimensão do micronucleo que tinha em média 6 micra de diametro. Pelo estudo do material corado verificamos que os elementos depois de se reunirem pela região do peristoma dando origem aos pares, soffrem 2 divisões successivas (mitoses) do micronucleo e dos 4 elementos assim formados, 3 soffrem degeneração, vindo o restante novamente a se dividir para formar os pronucleos em torno dos quaes se processa uma condensação do plasma. Depois da troca dos pronucleos migradores que se vão collocar em cada um dos elementos em conjugação ao lado dos pronucleos estacionarios, dá-se a formação de 2 fuzos de divisão, parallelas (gonomeria) só então se processando a fuzão dos 2 pronucleos (estacionario e migrador). Dos 2 novos elementos originados dessa divisão, um vae constituir o novo micronucleo e o outro depois de soffrer nova mitose, vae dar origem a duas placentas que crescendo pouco a pouco vão se fundir mais tarde para dar origem ao novo macronucleo. Os macro-

nucleos dos elementos que entraram em conjugação, permanecem durante quasi todo o phenomeno embora em via de degeneração por picnose, fragmentando-se mais tarde para serem reabsorvidos na phase em que se processa a fusão dos pronucleos. O *Balantidium sp.* existente nas fézes do porco, foi tambem por nós cultivado com grande facilidade, occorrendo o phenomeno de conjugação constantemente nas culturas de 24 horas. Com o *B. simile* parasita do *M. mulatta* o resultado foi completamente differente. Essa especie é difficil de cultivar e só se obtem resultados usando certos artificios de technica taes como junção de uma substancia tampão ao meio de cultura conseguindo-se então uma intensa proliferação do ciliado 24 horas depois da sementeira, quer nos tubos iniciaes como nos repiques (4.^a a 5.^a passagem). Essa especie ao contrario da do homem e da do porco absolutamente não conjuga nas culturas e isso podemos affirmar baseados em longa observação. Nas culturas se passa identico facto ao que já foi por nós observado e descripto em material de fézes de *M. mulatta*, isto é, a « *Endomixia* ». Nos preparados corados feitos com o material das primeiras culturas como dos repiques, pudemos observar toda a evolução do phenomeno, isto é, desde as fórmias iniciaes (mitose do micronucleo e inicio de degeneração do macronucleo) até as phases finaes do processo. Nesse material verificamos mais uma vez, de maneira clara que a formação do micronucleo se faz a custa de uma das placentas como já tivemos occasião de assignalar em nosso trabalho acima referido. Nelson em recente trabalho (Observations and Experiments on Conjugation of the *Balantidium* from the Chimpanzee — Amer. Jour. of Hyg., Vol. 20, n.º 1, 1934), põe em duvida o phenomeno de endomixia estudado por nós nessa especie de *Balantidium*. A affirmação desse autor não merece ser discutida por não ter elle apresentado a unica prova que poderia invalidar a nossa observação e que seria, a demonstração da existencia de pares de conjugantes, facto esse que o proprio autor declara nunca ter observado em material que teve occasião de estudar. Quanto ao nosso material que Nelson diz ter examinado temos a declarar se tratar apenas de algumas laminas nas quaes podiam ser vistas algumas das phases do phenomeno e que foram cedidas por nós ao Professor Hegner quando de passagem pelo Brasil. Baseados em longas pesquisas, concluimos que o *Balantidium simile* representa uma especie de ciliado em que a conjugação parece ter sido substituida de maneira permanente, pelo phenomeno de endomixia. Facto identico ocorre, segundo estudos nossos ainda ineditos, em um grupo de ciliados, isto é, na familia *Cyathodiniidae*. Para esses ciliados propomos aqui a denominação de ciliados *azygoticos* ou *parthenogeneticos*.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

We report here on the behaviour of some Ciliates of the genus *Balantidium* in artificial culture media. For this study we have employed mainly Dobell and Laidlaw's amoeba medium to which rice starch was added. We investigated *Balantidium coli*, isolated from man; *Balantidium* sp., from the pig; and *Balantidium simile*, from *Macaca mulatta*, the Rhesus monkey.

We could cultivate the human parasite very easily for a long time, transplanting it every 24 to 48 hours. Conjugation was very constantly observed in this species in culture about 24 hours old, either original cultures or transplants. The conjugants are found in pairs as small forms about $38,6 \times 32,1$ micra. The neutral individuals reach an average size of $75,5 \times 57,8$ micra. Small isolated preconjugant forms were also found in large numbers. These pre-conjugant forms in stained slides could be distinguished not only by their small size but also by the large size of their micronuclei which reached an average of 6 micra in diameter. The study of the stained material shows that the conjugants associate in pairs attaching themselves one to another by their peristomal region. Then their micronuclei divide twice by mitosis. From the four micronuclei thus formed three degenerate the remaining one dividing again in order to form the pronuclei around which a condensation of the cytoplasm is produced. After the exchange of the migratory pronuclei takes place, they are found in each of the conjugants side by side with the stationary pronuclei. In each pair of pronuclei two mitotic spindles are formed, parallel one to another (gonomery) the fusion of both pronuclei (stationary and migratory) only then taking place. From both nuclei formed by this mitotic division simultaneous to the nuclear fusion, two new nuclei result one of which will become the new micronucleus. The other new nucleus divide again to form two placentae which will slowly grow and then fuse again to form the new macronucleus. The macronuclei originally found in both conjugants in spite of being found to degenerate by pycnosis are usually seen throughout almost all the conjugating process. Later on they break up in fragments which are reabsorbed during the stage of pronuclear fusion.

The species of *Balantidium* occurring in the pig was also very easily cultivated, conjugation being constantly observed in 24 hours old cultures.

In *Balantidium simile* things were quite different. This species is difficult to cultivate, good results being obtained only when special technique is used as, for instance, when a buffer is added to the

culture medium. In such a case abundant growth and multiplication of the Ciliate is seen after 24 hours either in the original cultures or in the transplants to the 4th. or 5th. subcultures. On the ground of a prolonged observation we can assert that *Balantidium simile*, in opposition to what one sees in the human and pig parasites, never conjugate in culture. In the original cultures and transplants of *Balantidium simile* the same phaenomena occur that we described from the faeces of *Macaca mulatta*, the Rhesus monkey, that is *endomixis*. On the stained slides we could observe the entire process, since the appearance of the initial forms (mitosis of the micronucleus and beginning of the degeneration of the macronucleus) until the final stages. Once more in this material we could see in a very clear way that the micronucleus is formed from one of the placentae, as we had the opportunity to show in a previous paper.

Nelson in a recent paper (Observations and Experiments on Conjugation of the *Balantidium* from the Chimpanzee — American Journal of Hygiene, vol 20, n. 1, 1934), express his doubts about the phaenomena of *endomixis* we described in *Balantidium simile*. This author's opinion does not deserve discussion since he did not present the only proof that could invalidate our conclusions, that is the demonstration of the occurrence of pairs of conjugants, a fact he never succeeded to observe in the material at his disposal. As for our material that Nelson says to have examined it consists only in a few slides we gave to Professor Hegner when he visited Brazil. In these slides some stages of *endomixis* could be seen. On the ground of long lasting researches we conclude that *Balantidium simile* is a Ciliate in which conjugation seems to have disappeared and been replaced entirely and permanently by *endomixis*. According to our researches a similar fact occurs among another group of Ciliates, the families *Cyathodiniidae* and *Enterophryidae*. We propose to name *azygotic* or *parthenogenetic* the Ciliates in which this phaenomenon is observed.

BIBLIOGRAPHIA

CALKINS, G. N.

1926. The Biology of the Protozoa. Lea & Febiger, Phila.

CUNHA, DA, A. M., & MUNIZ, J.

1927. Sobre os ciliados do genero *Balantidium* parasitos dos Macacos. Boletim Biol., Fasc. 5, 6-15.

1930. On the *endomixis* phenomenon in ciliates of the genus *Balantidium*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **23** (5).

DOGIEL, V.

1925. Die Geschlechtsprozesse bei Infusorien (speziell bei den Ophryoscoliciden), Archiv für Protistenkunde, **50** : 283-442.

HEGNER, R. W., & CHU, H. J.

1930. A comparative study of the intestinal protozoa of wild monkeys and man. Amer. Jour. Hyg., **12** : 62-109.

HEGNER, R. W., & HOLMES, 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. Jour. Hyg., **3** : 3.

JAMESON, A. P.

1927. The behaviour of *Balantidium coli* Malm. in cultures. Parasitology, **19** : 4.

MALMSTEN, P. H.

1857. Infusorien als Intestinaltiere beim Menschen. Virch. Arch., **11** : 302-309. Cited by Wenyon, 1926.

MCDONALD, J. D.

1922. On *Balantidium coli* (Malmsten) and *Balantidium suis* (sp. nov.) with an account of their neuro-motor apparatus. Univ. Calif. Pub. in Zool., **20** : 243-300.

NEIVA, A., & AL.

1914. *Balantidium caviae*. Mem. Inst. Osw. Cruz, **6** : 180.

NELSON, E. C.

1934. Observations and experiments on conjugation of the *Balantidium* from the Chimpanzee. The Amer. Jour. of Hyg., Vol. 20, n.º 1, pp. 106-134.

SCOTT, M. J.

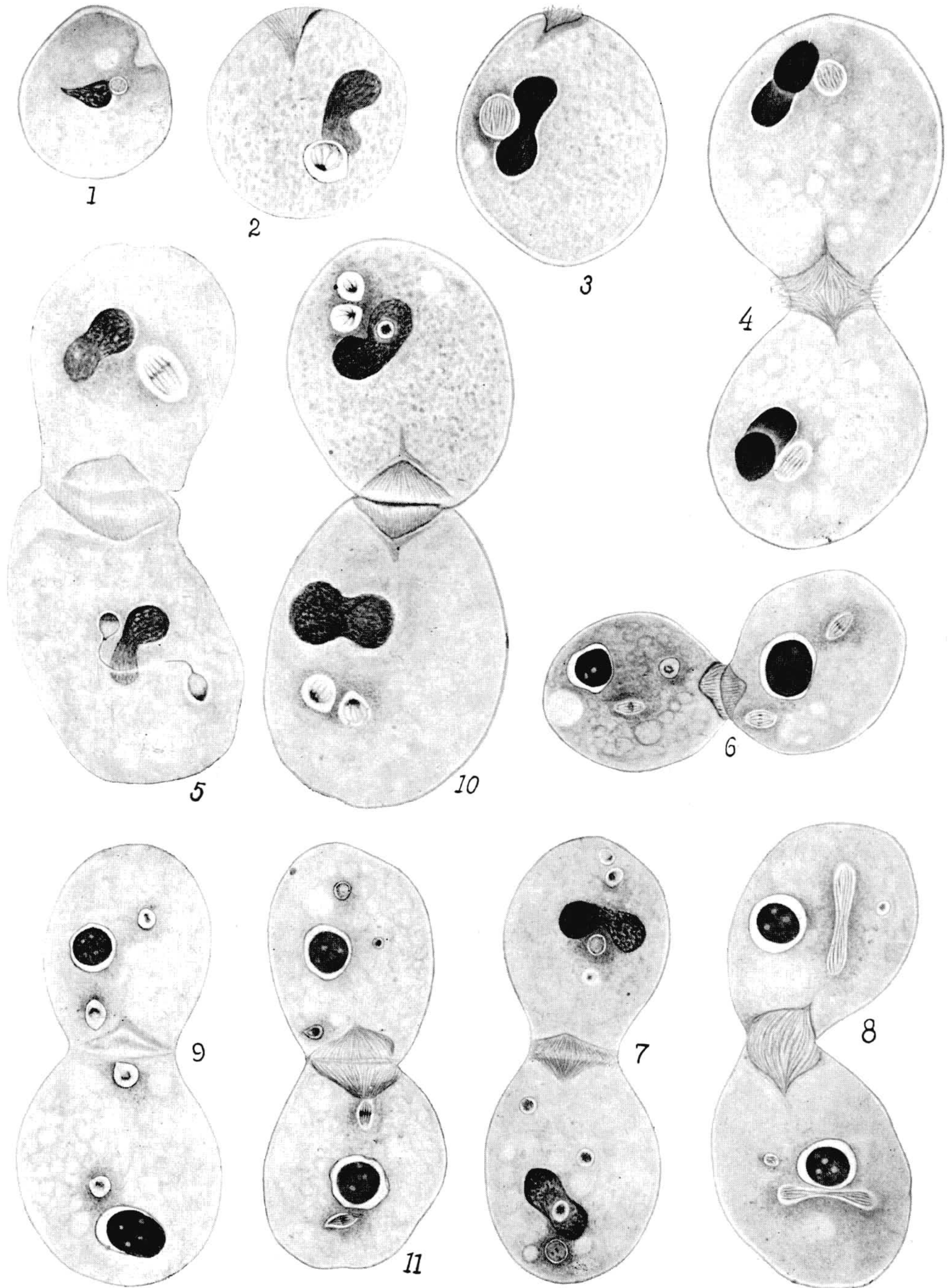
1927. Studies on the *Balantidium* from the guinea pig. I—Morphological studies. II—Studies in fission and conjugation. Jour. Morph. and Physiol. **44** : 3.

Estampa 1

Desenhos feitos com camara clara á altura da mesa.

Balantidium coli (de origem humana)

- Fig. 1 — Preconjugante logo após a divisão progâmica com o macronúcleo ainda não reconstituído (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 2 — Preconjugante com macronúcleo já reconstituído, micronúcleo em paraquedas (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 3 — Preconjugante com o micronúcleo em phase preparatoria de mitose (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 4 — Par com os conjugantes apresentando o micronúcleo em inicio de mitose (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 5 — Par com um dos conjugantes em franca mitose, outro em phase final de mitose (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 6 — Par com os conjugantes apresentando 2 mitoses (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 7 — Par em que se observa os conjugantes com os 4 elementos provenientes das divisões do micronúcleo sendo que em cada um delles, 3 desses elementos se acham em degeneração (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 8 — Par apresentando em cada conjugante a mitose para formação dos pronúcleos, vendo-se em cada um dos conjugantes um dos restos provenientes da degeneração dos elementos não aproveitados na formação dos pronúcleos (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 9 — Par em que cada um dos conjugantes mostra os dois pronúcleos, estaccionario e migrador (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 10 — Par mostrando em cada conjugante os dois pronúcleos, juntos um ao outro e apresentando a forma de paraquedas (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 11 — Par em que um dos conjugantes mostra os dois pronúcleos já formados enquanto o outro ainda se acha na phase de duas mitoses (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).



Cunha & Muniz: Genero *Balantidium*.

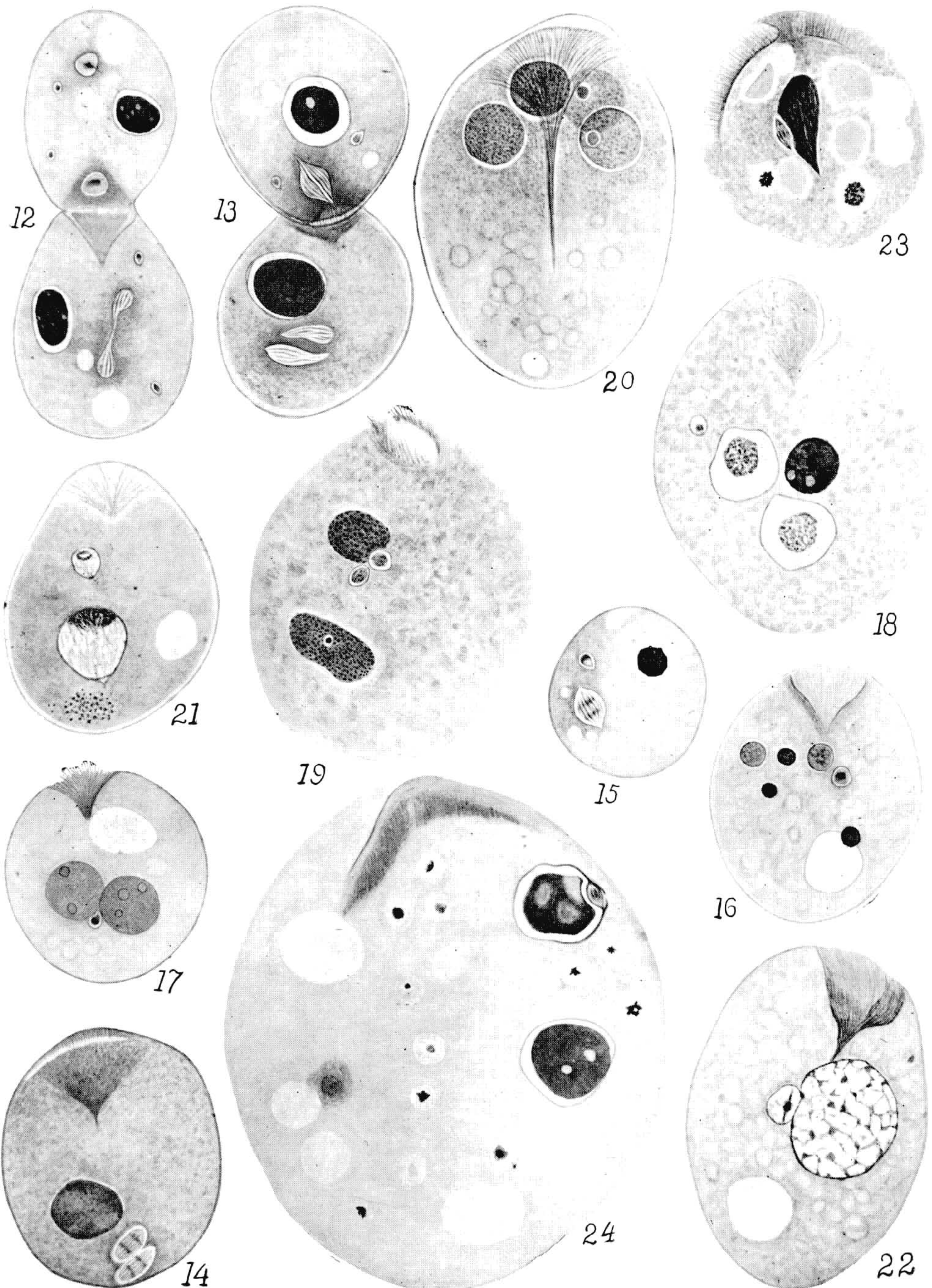
Estampa 2

Desenhos feitos com camara clara á altura da mesa.

- Fig. 12 — Par em que um dos conjugantes apresenta os dois pronucleos já formados enquanto o outro ainda se acha no estado de mitose para formar os pronucleos (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss)
- Fig. 13 — Par no qual ambos os conjugantes apresentam os dois pronucleos em mitose formando dois fuzos parallelos (gonomeria). Em um dos conjugantes observam-se dois restos (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 14 — Ex-conjugante com os dois pronucleos em mitose formando dois fuzos parallelos (gonomeria) (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 15 — Ex-conjugante com o novo micronucleo e um nucleo em mitose para formação das placentas. Macronucleos em pynose accentuada (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 16. — Ex-conjugante com micronucleo e duas placentas recém formadas. Macronucleo já fragmentado (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 17 — Ex-conjugante com duas placentas e micronucleo. Os restos provenientes da degeneração do macronucleo não são mais observados (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 18 — Ex-conjugante com o micronucleo e duas placentas bem desenvolvidas e com o macronucleo em degeneração ainda não fragmentada (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 19 — Ex-conjugante com duas placentas e dois micronucleos (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 20 — Ex-conjugante com dois micronucleos e quatro placentas (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 21 — Ex-conjugante com micronucleo e uma placenta unica. Tanto o micronucleo como a placenta apresentam signaes de degeneração (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 22 — Ex-conjugante com micronucleo e uma placenta unica. Tanto o micronucleo como a placenta apresentam signaes de degeneração (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).

Balantidium simile

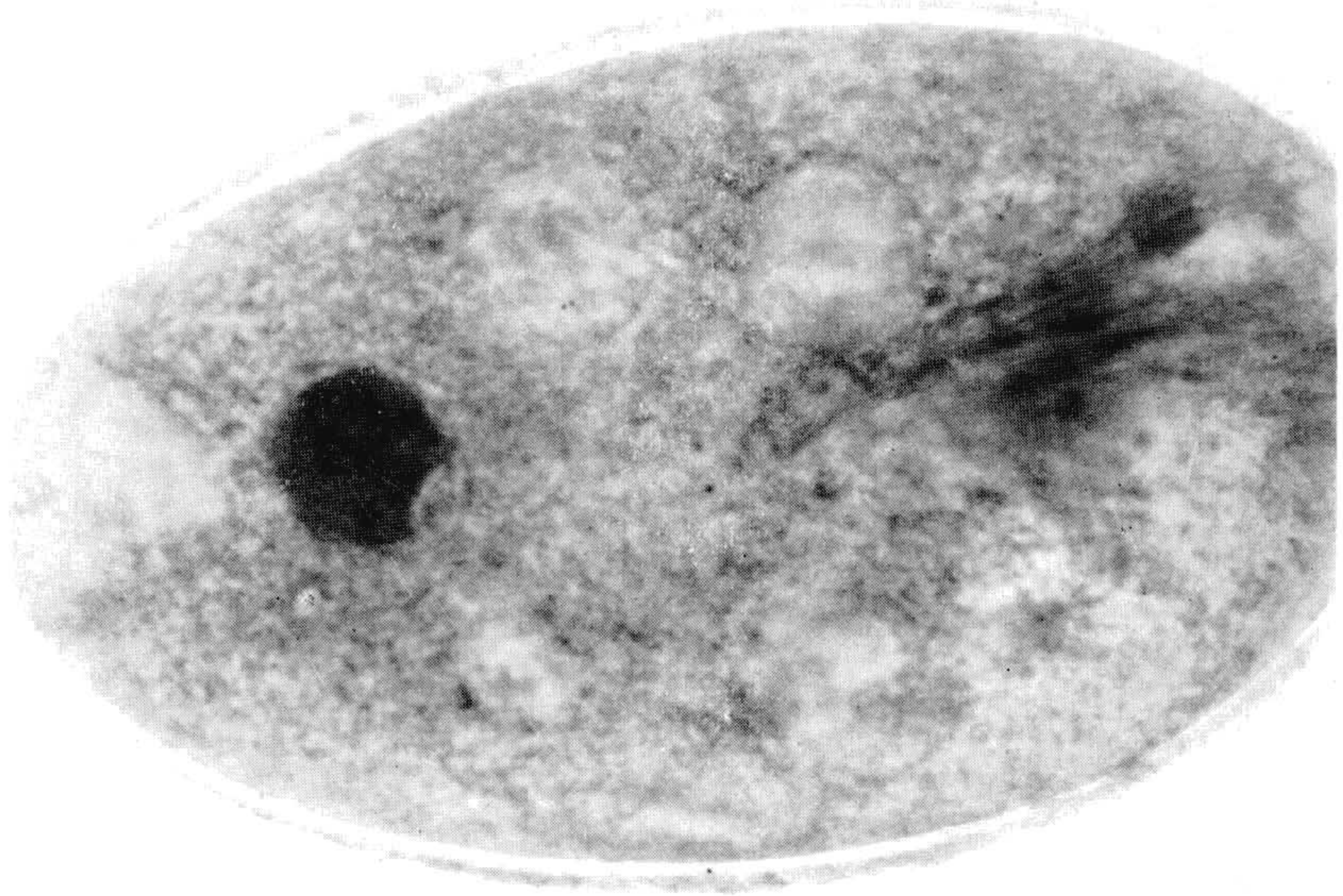
- Fig. 23 — Forma em cultura de 24 horas com o macronucleo ainda não reconstituído após a divisão progamica e o micronucleo em mitose (occ. compens. 7 e object. imm. hom. 90, Zeiss).
- Fig. 24 — Ex-conjugante em que se observa a formação do micronucleo por uma das placentas (occ. Huyghens 10 e object. imm. hom. 90, Zeiss).



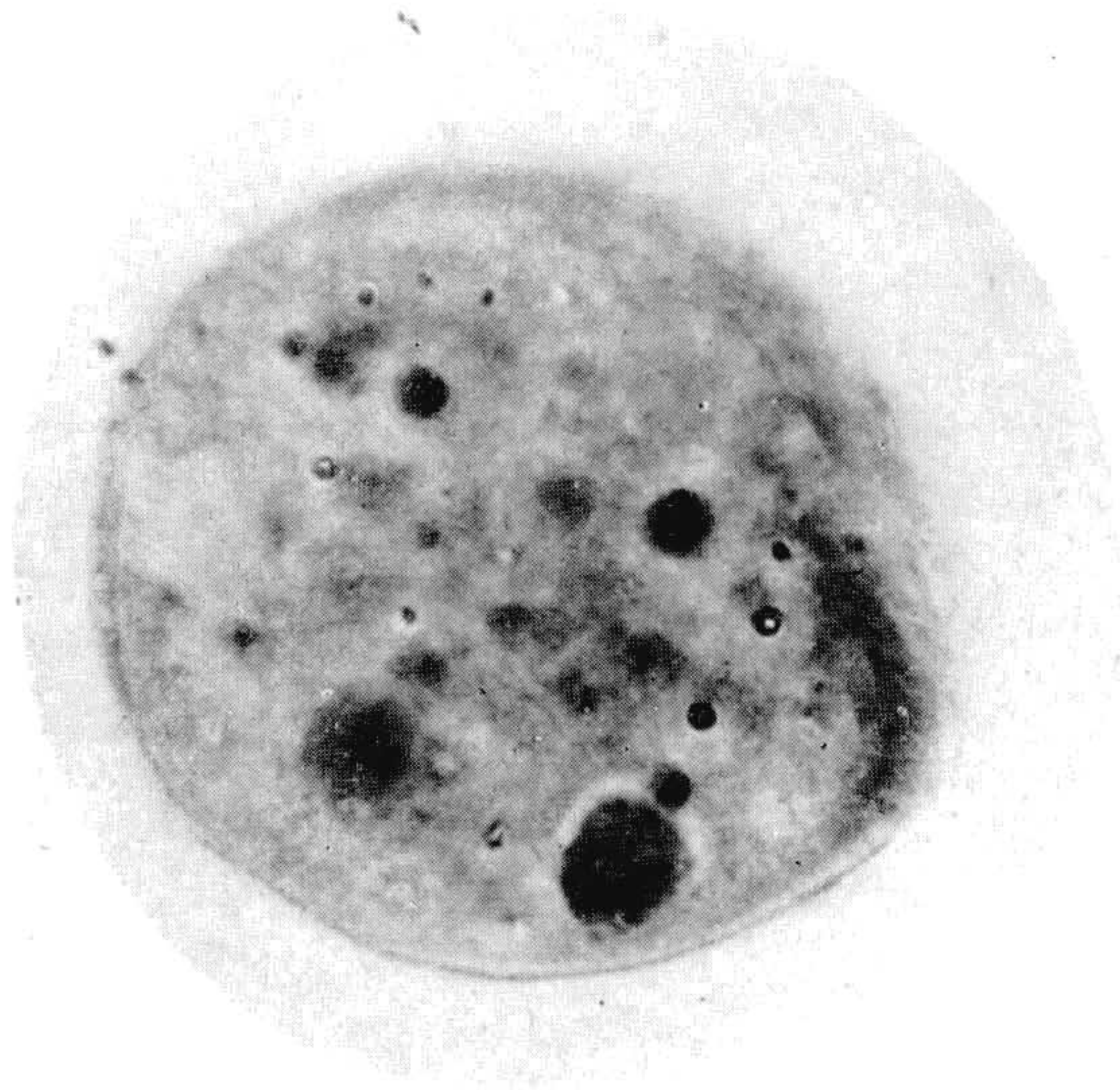
Cunha & Muniz: Genero *Balantidium*.

Estampa 3

Figs. 25 e 26 — (Microphotographias). — Ex-conjugante com o micronucleo em formação a custa de uma das placentas.



25



26