

Sobre a morfologia e ciclo evolutivo dos flagelados do genero *Metasaccinobaculus* n. gen. (Polymastigina, Oxymonadidae) do termita *Kaloterme*s (*Neoterme*s) *Wagneri*, *Desneux*, 1904, com a descrição de duas espécies novas ⁽¹⁾

pelo

Dr. Gilberto de Freitas

Instituto Oswaldo Cruz

	<i>Págs.</i>
Introdução	349
Material e métodos	350
Morfologia e ciclo	
Forma fixa	353
Divisão e mitose	358
Forma jovem	361
Diagnose do gênero <i>Metasaccinobaculus</i>	364
Diagnose de <i>M. oxymonoides</i> n. sp.	365
Diagnose de <i>M. clevelandi</i> n. sp.	365
Discussão	366
Sumário	373
Summary	375
Bibliografia	376
Explicação das estampas	378

INTRODUÇÃO

No presente trabalho é estudado um novo gênero de flagelados do termita *Kaloterme*s *wagneri*. Estes notáveis organismos estreitamente relacionados com a família *Oxymonadidae*, apresentam uma série de características morfológicas muito interessantes, decorrentes da alta adaptação às suas condições de vida.

A perda definitiva dos flagelos bem como a existência de duas fases distintas no seu ciclo com características morfológicas próprias, emprestam a estes organismos um interesse invulgar. Suas relações com os dinenimphideos são incontestes, o que estabelece uma forma de passagem entre os *Oxymonadidae* e os *Dinenymphidae*.

Kaloterme wagneri, o hospedador, é um grande *Kalotermitidae* não muito raro no Rio de Janeiro, onde é encontrado atacando o lenho vivo de mangueiras, tamarindeiros e urucuzeiros (Ilha de Paquetá). COSTA LIMA (1938, 1942) teve a oportunidade de reestudar esta espécie incompletamente descrita por DESNEUX, precisando seus caracteres.

Como os demais calotermitídeos, *K. wagneri* possui uma fauna abundante de protozoários, com numerosas outras espécies. Além de numerosos tricomonades entre os quais se salienta uma *Trichomonas* com um grande citostoma, existem outros flagelados de grandes dimensões, como uma *Calonympha* e um lofomonade recentemente referido por KIRBY (1944) de *Kaloterme howa*.

Como norma, nos capítulos consagrados ao estudo dos flagelados em questão, só os fatos referentes a eles serão examinados. Estudos comparados com outros protozoários, discussões gerais sobre as estruturas, etc., serão reservados para o capítulo à parte de "Discussão".

MATERIAL E MÉTODOS

A colônia que ofereceu o material para o presente trabalho, foi proveniente de um ramo situado três metros do solo de uma velha mangueira no bairro de Botafogo e mantida durante perto de um ano no laboratório, dentro de cristalizadores com fragmentos da própria madeira em que se encontrava e de papel de filtro, freqüentemente umedecido com a água destilada.

a) Produção de mitoses.

Para produção de ondas mitóticas, foi utilizado com resultados perfeitamente satisfatórios o método de defaunação parcial (ANDREW & LIGHT, 1929).

Como outros termitas, *K. wagneri* expulsa seu conteúdo intestinal com muita facilidade. Nestas circunstâncias eram colhidos individualmente e postos numa placa com papel de filtro úmido. Já no momento de serem apanhados com a pinça, emitiam uma certa quantidade do conteúdo. Os termitas isolados eram então irritados comprimindo delicadamente o abdome com uma pinça curva até que tivessem emitido 5 a 6 gotículas de material. As últimas são pouco abundantes e de um amarelo muito claro, isto é, da cor do material que se obtém quando se disseca o tubo digestivo.

Exames frequentes nestes termitas assim parcialmente defaunados mostraram que duas horas após a operação já se encontravam numerosas formas

de flagelados em mitose. As mitoses nas lofomonades são mais raras, parecendo exigir um lapso de tempo maior para atingir o máximo de frequência. Em *Zootermopsis*, ANDREW & LIGHT encontraram ondas mitóticas 21 horas após.

Com este método tão simples foram obtidas tôdas as figuras mitoses que estudamos.

b) Exame "in vitro".

O exame *in vitro* foi praticado com material do tubo digestivo dissecado em solução de Ringer com uma concentração 70% "normal". Estas preparações vivas foram igualmente estudadas com condensador de campo escuro, sobretudo para pesquisa dos flagelos.

c) Métodos de fixação e coloração.

Para o estudo com material fixado e corado os seguintes métodos foram usados:

Schaudinn + 5% ác. acético .	Heidenhein
Schaudinn + 5% " "	hemateina ác. picrico segundo Freitas (1927)
Schaudinn + 5% " "	Feulgen
Schaudinn + 5% " "	Delafield
Schaudinn + 5% " "	Mann-Dobell
Bouin + 5% " "	Heidenhein
Bouin + 5% ác. acético	hemateina ác. picrico
Champy	Heidenhein
Formol	Achucarro-Ranke, 1. ^a variante de Del Rio Hortega (1916).

As preparações foram confeccionadas dissecando o intestino do termita sôbre uma gota de solução de Ringer diluido com água distilada na proporção acima referida e adicionada de um ponta de bisturi de albumina de ovo seca (MERCK), como usualmente se procede para fixar material na laminula e evitar grandes distorções durante a fixação.

Uma vêz isolado, o intestino é ligeiramente dilacerado, e muito delicadamente, espalhado sôbre a superfície da laminula. E' conveniente que sejam conservados os fragmentos de intestino que ficam aderidos à laminula após a fixação, pois tais fragmentos se encontram crivados de exemplares de *Metasaccinobaculus* podendo-se observar bem as mitoses.

A hematoxilina férrea cora energicamente o axostilo ondulante, prejudicando por vêzes a observação do núcleo. Fornece imagens muito claras do aparelho de fixação d'esta organela na parede do corpo. Contudo este método, dentro dos limites de uma diferenciação conveniente, não se presta bem ao estudo das fibrilas cromófobas.

Do mesmo modo as esferas endoplasmáticas se bem que não se corando, apresentam-se muito amarelas e pouco transparentes, o que comunica um aspecto menos agradável ao protozoário.

O método de hemateína férrea-ácido picrico cora a membrana ondulante interna menos intensamente que a hematoxilina férrea, fornecendo contudo imagens perfeitamente nítidas d'esta organela e permitindo uma mais fácil observação do núcleo. As esferas protoplasmáticas apresentam-se mais pálidas e transparentes e as fibrilas cromóforas mais intensamente coradas, de modo que este método permite um estudo mais minucioso do componente cinético.

A reação de FEULGEN embora apresentando imagens nítidas do núcleo de *Metasaccinobaculus* e de outros protozoários de *K. wagneri*, não fornece aspectos novos em relação às estruturas consideradas cromáticas pelos outros métodos. Os fragmentos de madeira, reagem positivamente com o reativo sulfofucsínico, fato observado por KIDDER (1929) e confirmado por todos os AA. que têm aplicado esta reação ao estudo dos protozoários dos termitas.

Com o método tanoargênico de Açúcar-Ranke-Del Rio Hortega, não conseguimos mais que uma boa impregnação de organismos espiralados e bactérias filamentosas da flora intestinal do termita. Os fragmentos de madeira situados tanto dentro do corpo dos protozoários quanto livres no líquido intestinal, reduzem fortemente o complexo argênico, dando às *Calonympha* tricomonades e lofomonades, a aparência de aglomerados de estruturas negras que impedem qualquer observação. Os tufo flagelares das lofomonades impregnam-se claramente em púrpura escura assim como as esferas protoplasmáticas de *Metasaccinobaculus*. Na superfície d'estes últimos, são evidenciado nitidamente em negro um grande número de bacilos curtos espalhados por toda a superfície da membrana do corpo.

Após fixação pelo fixador de Champy, nem o método de Heidenhein nem o da hemateína férrea-ácido picrico foram capazes de evidenciar estruturas que não haviam sido demonstradas após outros fixadores.

O método de Mann modificado por Dobell forneceu preparações muito claras das várias organelas.

Se após a retirada da solução corante, são os preparados lavados n'água muito fracamente acidulada pelo ácido acético predominam os efeitos da eosina, corando-se o núcleo em vermelho. Por outro lado, se após o corante se lava rapidamente na água destilada e a seguir rapidamente também

numa solução a 2% de ácido fosfomolibdico, a coloração pelo azul de metila fica ressaltada, corando-se o núcleo em escuro e mostrando muito limpidamente o sistema de fibrilas cromóforas. A lavagem nágua acidulada pelo ácido acético é muito conveniente para evidenciação dos granulos eosinófilos do rostelo. Nas preparações coradas por este método o axostilo ondulantes aparecem corados intensamente pela eosina, mas as imagens são bastante transparentes.

MORFOLOGIA E CICLO

Forma fixa.

A forma fixa, completamente desenvolvida, tem em ambas as espécies do gênero um aspecto sacciforme.

Aparecem a primeira vista como sacos com um longo e delgado colo e cheios de esferas até uma certa altura.

A superfície do corpo em corte ótico, aparece eriçada de pequenas saliências constituídas pelas bactérias aderentes.

Nas preparações coradas pelos métodos acima referidos, estes microorganismos aparecem palidamente corados, mas, como foi dito, deixam-se impregnar intensamente pelo método de Achucarro-Ranke-Del Rio Hortega (1.^a variante).

"In vivo", os flagelados aparecem em tão grande número que, apertados uns de encontro aos outros, revestem inteiramente a parede do tubo digestivo do termita, onde se fixam pelo longo rostelo. O exame dos cortes do tubo digestivo dos termitas demonstra que *M. clevelandi* constitue uma camada mais próxima da membrana do tubo digestivo enquanto que *M. oxymonoides* introduzindo os rostelos entre os exemplares de *M. clevelandi*, formam uma segunda camada.

O axostilo ondulante vibra rapidamente embora com uma amplitude relativamente menor que nas formas jovens. Quando destacados na parede do tubo digestivo, movem o rostelo lentamente de um lado para o outro.

Em ambas as espécies, o endoplasma é envolvido por uma espessa camada externa de aspecto quasi homogêneo. A espessura d'esta camada não é igual em toda a extensão do corpo; pouco espessa na base do rostelo, atinge o máximo de espessura na extremidade posterior onde sobretudo em *M. oxymonoides*, é bastante apreciável. Internamente a sua superfície não é lisa, mas ao contrário irregular e apresentando numerosas depressões onde se incrustam as esferas do endoplasma. Esta camada periférica do flagelado é

quasi homogênea, deixando porém ver uma fina estriação em certos indivíduos e um retículo pouco perceptível em outros; é muito possível porém que não sejam mais que artifícios de fixação.

No endoplasma, além de fragmentos de madeira por vezes de grande dimensões e sempre em pequeno número, são encontradas em grande quantidade e enchendo todo o corpo das formas fixas, formações esféricas de um amarelo pardo e não coráveis pela hematoxilina ou hemateína assim como pelo método de MANN-DOBELL. Estas esferas consideradas produtos metabólicos e bem descritas e figuradas por KIRBY (1929, figs. 16b e 17) merecem aqui um certo número de observações. Ausentes nas formas jovens que nadam livremente no líquido intestinal, o aparecimento d'estas esferas parece estar ligado a fixação do protozoário à parede. De qualquer modo as formas mais jovens exibindo esferas no endoplasma já apresentam um rostelo em desenvolvimento.

A região do corpo onde se formam em primeiro lugar, é na vizinhança da base do rostelo. Em formas um pouco mais desenvolvidas se formam pelo corpo inteiro sob a forma de páldas gotículas (Pl. II fig. 11). Em concordância com o que KIRBY descreve em relação a *Proboscidiella kofoidi* as esferas apresentam uma certa variação morfológica, mostrando-se homogêneas em alguns casos, ou com uma depressão em outros.

É frequente a ocorrência de duas esferas comprimidas uma de encontro à outra (Pl. I, fig. 1 e Pl. III, fig. 3.). Também em certos casos não possuem contornos muito nítidos ao passo que em outros dão a impressão de possuírem externamente uma membrana nítida, como interpreta KIRBY (loc. cit.). Na reprodução, as esferas que não ficam situadas na região do corpo ocupada pelos flagelados-filhos, tendem à dissolução, como veremos mais adiante. À medida que os exemplares vão-se desenvolvendo, estas inclusões vizíveis no seu endoplasma vão-se tornando mais volumosas, até que, entre os indivíduos com os caracteres de formas inteiramente desenvolvidas, os seus tamanhos médios não variam muito. As medidas realizadas em 100 esferas com contornos nítidos para cada espécie distribuídas entre 10 indivíduos mostram o seguinte resultado (em μ)

	Máximo	Mínimo	Média	Moda
<i>M. oxymonoides</i>	7.3	2.9	5.0	4.4
<i>M. clevelandi</i>	5.1	1.5	2.7	3.0

O rostelo apresenta no gênero *Metasacchinobaculus*, grande semelhança com o dos oximonadideos conhecidos. As suas dimensões verdadeiras são dificilmente apreciáveis de modo correto em grande número de exempla-



PLANCHA I

Freitas: Morfologia e ciclo evolutivo dos flagelados

res, pois se comportam como estruturas extremamente elásticas, se alongando consideravelmente sob a influência da menor tração. É assim frequente o encontro de fôrmas possuindo um rostelo com duas ou mais vezes o comprimento do corpo. Nos córtices de tubos digestivos de termitas fixados "in toto", assim como entre os exemplares com a morfologia particularmente bem conservada, nunca se encontram tais dimensões; nestes casos o comprimento da referida organela varia comumente entre metade e dois terços do comprimento do corpo, nunca maior que este. Provavelmente este fato interferiu nas observações e medidas KIRBY em relação a *Microhøpalodina* (= *Proboscidiella*) *kofoidi* (KIRBY, 1929, pág. 363 e fig. 16, Pl. 22).

Do mesmo modo, a estrutura da extremidade anterior do rostelo não é passível de ser determinada em todos os exemplares arrancados da parede do tubo digestivo durante a confecção da distensão. Aspectos como os das figs. 1, 2 e 5 da Pl. I e 7 da Pl. II, são os mais frequentemente encontrados. Nos exemplares praticamente livres de qualquer traumatismo, a extremidade fixadora aparece como um disco deprimido no centro, dando a aparência de verdadeira ventosa.

No interior do rostelo há um grande número de fibrilas que estudaremos a seguir juntamente com os outros elementos do componente cinético.

Na descrição do componente cinético do gênero *Metasaccinoba* e *cubus*, temos a considerar : a) fibrilas cromófobas independentes, isto é, não ligadas ao axostilo; b) fibrilas cromófobas intrarostelares ligadas ao axostilo ondulante; e c) axostilo ondulado.

a) As fibrilas cromófobas não ligadas ao axostilo, são claramente demonstradas pelo método de hemateína férrea-ác-picrico assim como pelo de MANN-DOBELL, particularmente após a ação do ácido fosfomolibdico. O método de HEIDENHEIN mostra tais estruturas com muito menor clareza. Apresentam uma absoluta semelhança com as estruturas descritas por CLEVELAND (1935) em *Oxymonas grandis*. Estas fibrilas formam um feixe que corre da extremidade do rostelo onde já é possível individualizá-lo destas fibrilas, separando-o das que são ligadas ao axostilo. Os dois feixes cromófobos correm assim lado a lado até a base do rostelo. Chegando a base desta organela, as fibrilas cromófobas não ligadas ao axostilo continuam pelo corpo onde se resolvem em outros feixes mais finos que se dirigem para varias direções cruzando o corpo do protozoário e se insinuando entre as esferas (figs. 1 e 6 Pl. I).

Em certos casos os feixes parecem terminar abruptamente sem muitas subdivisões (P III, fig. 13). Na fig. 16 (Pl III) pode-se vêr unidos feixes mais

finos. Em *M. clevelandi* estas fibrilas são incomparavelmente menos desenvolvidas e portanto também menos visíveis.

As fibrilas cromóforas ligadas ao axostilo tem sido descritas pelos AA. que têm estudado os flagelados oximônades, com parte integrante desta organela. Em *Metasaccinobaculus* formam uma estrutura cilíndrica que corre desde a extremidade do rostelo até a membrana ondulante interna (axostilo). São muito mais numerosas que as que formam o sistema cromóforo acima descrito; morfológicamente porém, não é possível evidenciar diferenças.

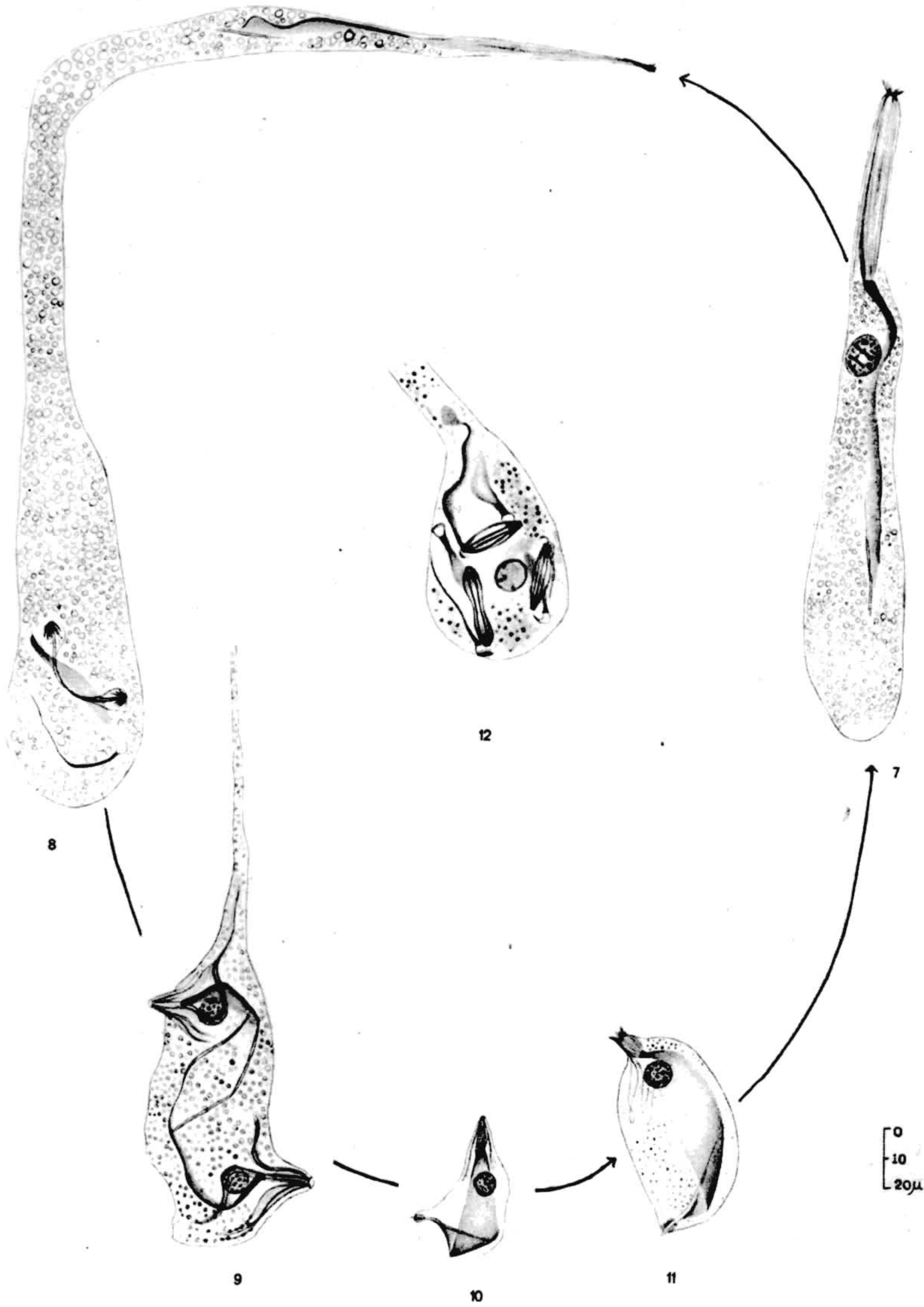
Nas preparações coradas pelo método de MANN-DOBELL observa-se um ou mais granulos sistematicamente presentes nos exemplares examinados e que aparecem corados pela eosina, mesmo quando as preparações são passadas por uma solução de ácido fosfomolibdico que fixa consideravelmente o azul de metila. Em alguns exemplares se apresentam com um só granulo irregular de dimensões maiores, ao passo que em outros é possível identificar dois ou três granulos muito próximos uns dos outros.

Este granulo se situa logo abaixo da expansão terminal do rostelo, e é difícil o seu estudo apurado, pelo fato de se situar numa região muito sujeita a distensões e torções durante o arrancamento do flagelado e onde também os corantes se fixam com maior intensidade.

É possível que tal estrutura tenha uma importância maior do que parece a primeira vista, e que então seu estudo mais aprofundado venha a trazer esclarecimentos sobre certos problemas relacionados com o componente cinético dos flagelados oximônades

Em conexão com sistema fibrilar que acabamos de descrever, encontra-se o axostilo ondulante. O aspecto da extremidade anterior onde ele encontra as fibrilas cromóforas logo abaixo da base do rostelo, sugere uma forma primitivamente tubular para esta estrutura. É assim que a extremidade anterior aparece como um calice com o bordo mais aberto do lado oposto ao que corre o feixe de fibrilas independentes (Pl. I, fig. 1 e Pl. III, figura 13). Tal aspecto tubular, muito cedo se evidencia (Pl. III, fig. 20).

Na sua extremidade anterior o axostilo ondulante aparece nas preparações coradas como um cilindro que logo se achata e se alarga enormemente de modo a adquirir o aspecto de uma grande faixa membranosa, que "in vivo" é dotada de vigorosos movimentos, particularmente nas formas jovens. Com forte aumento é possível ver que esta membrana é formada por fibrilas muito mais finas e muito mais firmemente unidas que as do sistema cromóforo. Muito frequentemente o axostilo aparece como que dilacerado nos seus bordos (Pl I, figs. 1, 6 e 6), dando o aspecto de franjas. Este dilaceramento



PLANCHA II

Freitas: Morfologia e ciclo evolutivo dos flagelados

se faz apenas no sentido das fibrilas e pode ser comparado no que o ocorre nas folhas dos vegetais como as palmeiras. Este fenômeno ocorre muito mais intensamente em *M. oxymonoides* que em *M. clevelandi*. Não foi possível relacionar estes aspectos dos axostilos com a existência de maior número de espécies incluídas dentro destas duas já citadas.

O axostilo é preso na parede do corpo pela sua extremidade posterior. Como veremos mais adiante, nas formas jovens o ponto de fixação é na extremidade posterior do corpo (Pl I, fig. 4, Pl II, fig. 10). Com o crescimento porém este ponto vai-se deslocando, chegando a se fixar no terço anterior do protozoário (Pl I, fig. 2). Nos indivíduos adultos mas sem indícios de divisão, o ponto de fixação se situa na metade posterior do corpo (Pl I, fig. 1, Pl III, fig. 13).

O axostilo se fixa posteriormente por uma curiosa estrutura fina e cilíndrica formada pelo enrolamento sobre si mesmo de um de seus bordos, de modo a constituir um tubo alongado (Pl I, figs. 1, 5 e 6, Pl II, fig. 7). Na espessa camada superficial do corpo este tubo termina em uma ponta situada dentro de uma estrutura dilatada como um cabo de espada. Esta dilatação em ampola parece formada pelas fibrilas superficiais do tubo (Pl III, fig. 21).

A estrutura que acabamos de descrever são mais conspícuas em *M. oxymonoides* que em *M. clevelandi*.

Nas formas adultas não foi possível evidenciar bainhas axostilares como as que CLEVELAND (1935) descreve em *Oxymonas grandis* ou estriações como em *Saccinobaculus* (CLEVELAND et alr. 1934), e que ocorrem nas formas jovens das espécies aqui estudadas, como será descrito mais adiante. O máximo que se evidencia, e isto nas preparações pelo método de MANN com ação subsequente do ácido fosfomolibdico, é uma área alongada e homogeneia em torno da estrutura da inserção do axostilo.

O núcleo em ambas as espécies está situado no quarto anterior do corpo e geralmente o seu contorno se projeta em grande parte sobre o axostilo ondulante (Pl, fig. 1).

A não ser nas formas em que as fibrilas cromóforas são vistas envolvendo o núcleo, (Pl I fig. 3 e Pl III fig. 14) nenhuma estrutura ligada à fixação do núcleo na sua posição foi encontrada, e nada portanto comparável com a "nuclear sleeve" (CLEVELAND, 1935). Em ambas as espécies o núcleo é esférico ou ovoide. Embora fundamentalmente apresente uma estrutura formada por retículos de cromatina como em muitos dinofíceis e oxymónades os aspectos desta organela no gênero *Metasaccinobaculus* é mais ou

menos invulgar entre os flagelados, assemelhando-se a primeira vista ao núcleo de *Pseudotriconympha*.

A estrutura do núcleo varia mais com a fase do ciclo que com a espécie. Na forma adulta, o aspecto mais frequente é o de retículo grosseiro de cromatina. As malhas deste retículo são irregulares, de diferentes tamanhos, tão variáveis que fazem desaparecer o aspecto reticulado. Grossos granulos de cromatina de tamanho e forma variáveis (Pl I figs. 1 e 2, Pl II figs. 7 e 11) constituem as estruturas cromáticas mais frequentemente encontradas. Por vezes apresentam um aspecto mais delicado (Pl I fig. 6) em que ao lado de granulos grossos e irregulares são encontrados um grande número de granulos finos.

Nos exemplares jovens os aspectos são mais ou menos diferentes. Possuem um número menor de granulos grossos e as outras estruturas cromáticas são mais delicadas como veremos adiante. Nas formas fixas não é possível evidenciar qualquer estrutura que se possa considerar como um cariosoma, quer pela forma, quer pela constancia. Nas formas jovens, como veremos adiante, há um ou mais granulos de aspecto muito sugestivo neste particular.

De nenhum modo e em qualquer fase do ciclo foram vistos flagelos.

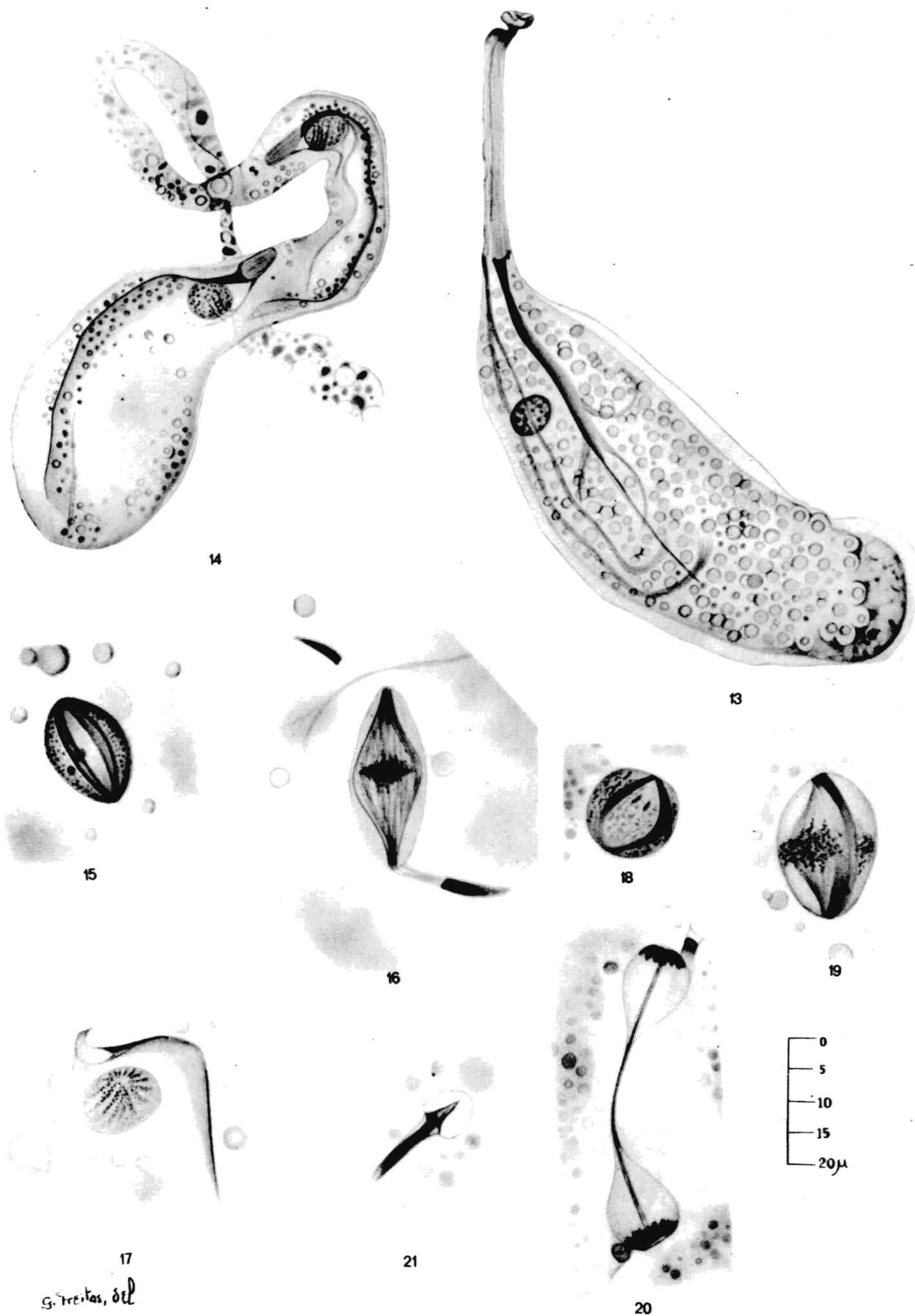
Divisão e mitose

Fenômenos de divisão ocorrem exclusivamente, segundo o que podemos observar, nas formas fixas, completamente desenvolvidas.

Os primeiros sinais de divisão consistem numa degeneração progressiva do componente cinético extranuclear, isto é, do axostilo ondulante e das fibrilas cromóforas (Pl I, fig. 2). Simultaneamente nota-se um alongamento do corpo, que em geral não é acentuado como o que se vê na figura 2 (Pl I). Nunca pudemos surpreender estádios de divisão em cortes de intestinos de termitas parcialmente desfaunados, certamente devido ao pequeno número de preparações; porém nos fragmentos de intestinos que ficam aderidos à lamínula, pode-se observar que os exemplares cuja extremidade posterior se salienta da massa de indivíduos aderidos a parede apresentam núcleos em mitose. Finalisticamente poder-se-ia interpretar este alongamento como visando uma saída mais fácil para as formas livres recém-formadas que sempre se originam na porção posterior do corpo.

Como ocorre nos demais oximônades, antes da divisão, o núcleo emigra para extremidade posterior, fato ligado à degeneração do axostilo ondulante e do sistema fibrilar.

Uma vez livre na parte posterior do corpo o núcleo entra em mitose. Este processo em *Metasaccinobaculus* se assemelha notavelmente ao que ocorre em



PLANCHA III

Freitas: Morfologia e ciclo evolutivo dos flagelados

Oxymonas grandis de CLEVELAND, sendo, nos seus grandes traços, idêntico mesmo. Embora o aspecto das figuras seja diferente, tal similitude é de se esperar, dadas as estreitas relações entre êstes flagelados e os oximônades. Continuando no seu alongamento, o fuso passa a ser comportar como um feixe de fibras comprimido pelas suas duas extremidades, pois ao envê de se apresentar como um feixe único e reto resolve-se em vários feixes convexos, abaulados. O espaço interno que se forma pela subdivisão e abaulamento do fuso central é homogêneo e não contém grânulos de cromatina (Pl III, fig. 15), que ficam então comprimidos entre os furos e a membrana nuclear.

Como nos demais oximônades os cromosomas são extremamente finos. Nada que possa ser considerado como a imagem positiva de um centriolo ficou evidenciado em nossas preparações (V. capítulo Discussão).

Nesta fase, por vêzes é possível evidenciar dois grânulos redondos (Pl III fig. 15) ou alongados (Pl III, fig. 18), naturalmente sem qualquer relação aparente com a estrutura acima referida.

Na metafase um número imenso de estruturas cromosômicas se aglomera no fuso, e de um modo acentuadamente mais denso no equador (Pl III figs. 16 e 19).

Embora com uma certa variação, nesta fase surgem os primeiros sinais de reorganização do componente cinético extranuclear. Êste processo segue o mesmo método que nos demais *Oxymonadidae*, e já descrito por CONNELL (1930). Os novos axostilos aparecem como duas pequenas estruturas alongadas e fortemente cromófilas, geralmente situadas nos polos da figura mitótica, sendo porém por vêzes encontradas em outras posições, na vizinhança sempre do núcleo. É possível que êste fato esteja relacionado com acidente na preparação do material. De qualquer modo, é impossível evidenciar de modo irrefutável, qualquer estrutura que relacione os axostilos ondulantes em formação com o fuso central da mitose ou qualquer estrutura ao nível da membrana nuclear.

Certas figuras mitóticas sugerem a existência de uma estrutura membranosa hialina que envolveria o núcleo em mitose e de cujas extremidades se desenvolveriam os novos axostilos (Pl III, fig. 16). É curioso que notar que esta figura que mereceu idêntica interpretação do Dr. JULIO MUNIZ coincide em traços gerais com as de CONNELL (loc. cit.) em *Oxymonas dimorpha*.

As figuras de telofase mostram um fuso central persistente como nas oximônades em geral, mas de aspecto mais regular e homogêneo que o de *Oxy-*

monas grandis (Pl III, fig. 20). A massa de cromosomas se condensa nos polos deixando vêr o resto do núcleo com um aspecto quase homogêneo e muito finamente granuloso.

Nas figuras vistas pelos polos (Pl. III fig. 16) observa-se o aspecto radiados das fibras cromosomicas (s^o CLEVELAND) densamente incrustadas de estruturas cromosomicas, bem como o espaço claro circular na periferia do qual nascem as fibras do fuso central (v. também Pl. III fig. 20). A partir desta fase estas estruturas cromáticas vão-se condensando mais e mais, os axostilos ondulantes crescem rapidamente (Pl. III figs. 17 e 20), podendo-se perceber então claramente a estrutura de cálice na extremidade anterior do axostilo, sôbre o qual já nos referimos durante a descrição desta organela na fase adulta. Vista de lado em córte ótico (Pl III, fig. 17) observa-se uma chanfradura em V correspondendo ao cálice visto lateralmente. Visto de cima (Pl. III, fig. 20) observa-se uma seção circular correspondendo à abertura do cálice.

Da superfície do cilindro que compõe a extremidade do axostilo, partem as primeiras fibrilas cromófobas que logicamente deverão constituir o sistema cromóforo do rostelo associado com o axostilo. Nas primeiras fases de desenvolvimento, assumem os aspecto de colarinho (fig. 20) que tende a se estreitar a medida que cresce.

As primeiras fibrilas cromófobas não associadas com o axostilo nascem na extremidade deste colarinho que se afila com o crescimento (Pl. III, fig. 17). Em estádios posteriores onde as estruturas já aparecem com seu aspecto definitivo, a origem destas fibrilas aparece de modo irrefutavel (Pl. II, fig. 9).

Terminada a divisão nuclear o componente cinético (sistema neuromotor) de *Metasaccinobaculus* já se acha completamente organizado, de modo que encontramos na extremidade posterior do corpo do indivíduo gerador duas fôrmas jovens perfeitas, no mesmo substrato protoplasmático.

A metade ou os dois têtços anteriores do organismo que deu origem a estas fôrmas jovens entra em degeneração, desprendendo-se da parede do tubo digestivo do termita pela destruição do aparelho de fixação e permanece no meio intestinal como um saco, tendo no seu interior os dois indivíduos recém-formados (Pl. II, fig. 9 e Pl. III, fig. 14). E' muito fácil limitar as duas regiões do corpo. Na que se mantém viva, as esferas endoplasmáticas conservam a sua morfologia típica, ao passo que na região do corpo em degeneração, estas inclusões perdem seu contorno nítido assim como na sua fôrma arredondada, e se transformam em manchas irregulares e imprecisas.

Simultaneamente aparecem grandes vácuolas, algumas contendo no seu interior estas esferas (V. Pl. III, fig. 14).

Nos indivíduos recémformados, é possível evidenciar com tãda a clareza (Pl. III, fig. 14) um sistema de fibrilas cromófobas envolvendo o núcleo, como já foi referido anteriormente.

Como a divisão do plasma se realiza numa região pouco diferenciada e num organismo em degeneração parcial, não parece haver um plano de divisão muito nítido. Na maioria dos casos, como os que ilustram esta descrição, o sentido da divisão é transversal. Em outros casos os flagelados recémformados são vistos lado a lado na extremidade anterior da porção protoplasmáticas que os contém. Nunca nos foi possível obter figuras de evolução de uma tal situação, e, assim sendo, ou admitimos uma disposição dos indivíduos jovens de modo a garantir um plano transversal de divisão, ou simplesmente uma tendência à rotação de cada um em sentido contrário, do que resultaria um plano de divisão longitudinal em relação ao eixo do corpo do flagelado gerador.

No processo de multiplicação ocorrem anomalias de diferentes tipos com relativa freqüência. Indivíduos com dois e mais raramente com três núcleos são por vêzes observados, e em tais casos sempre existe um igual número de sistemas neuromotores. Na fig. 12 (Pl. II) vê-se um exemplar trinucleado de *M. clevelandi* em divisão. Ao contrário porém encontra-se por vêzes exemplares com dois neuromotores e um só núcleo. O método de formação de tais anomalias fica sem explicação.

Um tipo muito curioso de anomalia aparece na figura 6 (Pl. I). Tudo leva a crêr que neste caso um fator qualquer teria inibido a divisão citoplasmática, e é extremamente curioso observar que quando o organismo situado anteriormente fixou seu rostelo na parede do tubo digestivo do termita, o outro situado posteriormente foi estimulado de modo que o seu rostelo cresceu no interior do primeiro indo atingir a parede do intestino do hospedador através o corpo d'este.

Fórma jovem

As fórmulas que se originam segundo o processo que acabamos de descrever, apresentam um aspecto bastante diversos das adultas, fixas, se bem que conservando as características fundamentais do gênero. Os aspectos morfológicos são profundamente influenciado pelo axostilo ondulante que aqui atinge a dimensões relativas muito maiores.

"In vivo", a presença destas formas chama imediatamente a atenção pelos seus movimentos peculiares, nadando livremente no meio intestinal do termita, graças exclusivamente ao seu axostilo ondulante. Este movimento se efetua em duas fases que se sucedem muito rapidamente. Na primeira fase a membrana dobra-se sobre si mesma de modo que a extremidade posterior do corpo fica quase ao nível da extremidade anterior. Numa segunda fase ela se distende bruscamente.

Indivíduos fixados nesta posição, isto é, dobrados pela metade aparecem como tendo um contorno circular, o rostelo repousando sobre a parte posterior do corpo.

Se fixados em extensão apresentam uma forma alongada como na figura 4 (Pl. I).

Ao contrário das formas inteiramente desenvolvidas cuja camada externa do corpo apresenta grande espessura, ambas as espécies possuem quando jovens apenas uma delgada membrana externa.

O endoplasma é muito finamente granuloso e fortemente cromófilo. Pela hematoxilina férrea cora-se em azul negro e pelo método de MANN violeta azulado. Nas preparações tratadas pelo ácido fosfomolibdico, o endoplasma aparece azul. Não se nota a presença de esferas no endoplasma que somente mais tarde fazem o seu aparecimento.

O rostelo é rudimentar, largo na base e se afinando ligeiramente até a extremidade, que é arredondada.

Nesta porção anterior do rostelo, se pode observar, sobretudo nas preparações pelo método de MANN, alguns granulos alongados, simulando espessamentos da fibrilas cromófilas e que se coram eletivamente pela eosina. São estes granulos eosinófilos que vamos encontrar nas formas adultas, e sobre os quais já nos referimos.

Muito precocemente e antes de qualquer indício de fixação, é possível evidenciar, na extremidade do rostelo, um pequeno disco pediculado simulando uma minúscula ventosa e de morfologia extremamente parecida com a mesma estrutura da forma adulta, como é representada na fig. 13 (Pl. III). As fibrilas cromóforas não associadas ao axostilo formam um sistema que corre superficialmente pelo rostelo e distribuídas igualmente por toda superfície interna desta organela, atingindo o corpo do flagelado de modo formar uma corôa de fibrilas que envolvem a extremidade do axostilo ondulante e o núcleo. A formação de um feixe que corre por um lado do rostelo e que se vai resol-

vendo progressivamente em feixes menores só ocorre posteriormente e é possível que se relacione com as alterações morfológicas determinadas pela fixação do organismo na parede do tubo digestivo do hospedador.

O axostilo ondulante é amplo, de bordos contínuos, não franjados como nos adultos, corando-se eletivamente pela eosina no método de MANN.

As estruturas que garantem a fixação da sua extremidade posterior na parede do corpo são um pouco diferentes da forma adulta e apresentam certa semelhança com idênticas estruturas em *Saccinobaculus*. Como neste dineninfideo de *Cryptocercus*, a extremidade do axostilo se projeta para o exterior, e se fixa na membrana por espessamento anular. Outra analogia muito interessante é a existência de uma bainha de aspecto estriado, como sendo formada de um número imenso de finíssimos filamentos que partindo do axostilo se dirigissem para membrana do corpo. No caso de *Metasaccinobaculus* porém, estas estriações estão restritas à porção tubular terminal do axostilo e não parecem atingir a membrana. Nestas formas jovens pode-se perceber também muito nitidamente como o tubo terminal se origina pelo enrolamento de um dos bordos.

O núcleo tem igualmente uma estrutura pouco semelhante ao das formas adultas. De início apresenta uma estrutura cromática muito pobre e constituída por granulos finos de cromatina que se dispersam uniformemente pelo carioplasma como em *Oxymonas grandis*. Cêdo porém inicia-se o aparecimento de granulos cada vez mais grossos, e irregulares até que reproduzem o aspecto do núcleo dos exemplares desenvolvidos, com seus grossos granulos irregulares e barras de cromatina. Nas formas jovens encontra-se um dos mais granulos cromófilos, de morfologia diferente. (Pl. II, fig. 10). São esféricos e envolvidos por um halo claro como um cariosoma, mas como foi dito, nem sempre únicos. Tais granulos persistem durante um certo tempo. (Pl. I, fig. 5), diminuindo cada vez mais e terminam por desaparecer. A coincidência do aparecimento d'estes granulos em fases do ciclo em que o núcleo é ainda pobre de cromatina e o seu desaparecimento progressivo a medida que este se vai enriquecendo em cromatina, apresenta certa analogia com o nucleolo dos organismos pluricelulares. Assim sendo, é possível que aqui ocorra uma transformação cíclica das nucleoproteínas do ácido ribonucleico em nucleoproteínas do ácido desoxiribonucleico.

As formas jovens crescem sem sofrer grandes alterações estruturais, como é demonstrado pela ampla variabilidade de dimensões. Transformações que conduzem aos aspectos característicos dos indivíduos adultos, operam-se mais ou menos simultaneamente, e tudo leva a crêr serem determinadas pela fixação

do organismo. Assim, uma forma recém fixada simula uma forma adulta de pequenas dimensões.

O axostilo perde a capacidade de executar movimentos tão amplos, pois nunca é possível observar formas com indícios de fixação e com o corpo dobrado, como as formas livres. "In vivo" constata-se que o movimento do axostilo das formas fixas é também ondulante, mas incapaz de dobrar ou mesmo imprimir alterações profundas na forma do corpo como nos exemplares jovens. Como foi dito mais acima na descrição das formas adultas, os axostilos ondulantes não acompanham o ritmo do crescimento do corpo, de modo que seu ponto fixo de inserção vai-se ocupando uma posição cada vez mais anterior. Compare-se p. ex. as figs. 2 e 4 da Pl. I.

Não é ilógica a hipótese de que a tensão que se exerce sobre esta organela concorra pelo menos em parte para dilaceração dos bordos.

O rostelo cresce rapidamente desenvolvendo o disco de fixação (Pl. I, fig. 5).

As fibrilas cromóforas se alongam, atingindo a região posterior do corpo, e se concentrando progressivamente de modo formar o feixe que corre lateralmente (Pl. I, fig. 5).

As esferas endoplasmáticas começam a se formar em primeiro lugar na extremidade anterior do corpo do protozoário, na região compreendida entre a parede e o axostilo ondulante, do lado oposto àquele em que correm o feixe de fibrilas cromóforas. Posteriormente, em toda a superfície do endoplasma, é iniciada a formação destas inclusões.

A princípio tem o aspecto de gotículas amareladas quase imperceptíveis que aumentam de tamanho e espessura até atingirem as dimensões que apresentam na forma adulta. Esferas endoplasmáticas e o ponto de inserção do axostilo são elementos preciosos para a determinação do estágio do ciclo de um determinado exemplar.

Gênero *Metasaccinobaculus* n. gen.

Diagnose.

Flagelados sem flagelos, com o corpo alongado, sacciforme, cheio de esferas endoplasmáticas. Rostelo anterior funcionando como órgão de fixação na parede do tubo digestivo do termite. O axostilo formado por uma membrana larga dotada de movimentos muito ativos e servindo de órgão de locomoção; sua extremidade anterior se situa na região da base do rostelo e sua

extremidade posterior se fixa na parede do corpo por meio de uma estrutura tubular, com uma dilatação terminal, em copo de espada.

Dois sistemas de fibrilas cromófobas intrarostelares, o primeiro associado ao axostilo e que corre da extremidade do rostelo à extremidade anterior da porção ondulante e cromófila; o segundo é constituído por um feixe que corre da extremidade anterior do rostelo, atingindo o corpo propriamente dito, e percorrendo-o em grande extensão.

Duas formas evolutivas. Foram jovem, nadando livremente no líquido intestinal do hospedeiro, com camada externa formada por uma delgada membrana, endoplasma muito finamente granuloso e fortemente cromófilo; esferas ausentes. Axostilo ondulante relativamente muito desenvolvido, e se fixando na extremidade posterior do corpo. Rostelo e fibrilas cromófobas rudimentares. Núcleo a princípio com granulos de cromatina muito finos e uniformemente distribuídos; com o desenvolvimento, grossos grânulos irregulares.

Forma completamente desenvolvida, fixa, com rostelo muito desenvolvido e disco de fixação. Camada superficial do corpo espessa, sobretudo na extremidade posterior. Endoplasma com numerosas esferas amarelo-pardas, muitas com contornos nítidos. Axostilo ondulante com movimentos menos extensos que na forma jovem e se fixando na parede do corpo tanto mais anteriormente quanto mais desenvolvido o exemplar. Núcleo esférico ou ovoide com um retículo grosseiro de grossos grânulos e traves de cromatina, de forma irregular.

Mitose do tipo dos oximonadideos, realizada na região posterior do corpo, grande fuso central intranuclear comumente dissociado em dois ou mais feixes. Degeneração do componente cinético extranuclear e reorganização nos polos da mitose.

Espécie tipo: *Metasaccinobaculus oxymonoides* n. sp.

Metasaccinobaculus oxymonoides n. sp.

Corpo volumoso. Camada externa do corpo, espessa, particularmente na extremidade posterior. Grande axostilo ondulante, apresentando frequentemente os bordos dilacerados em franja. Fibrilas cromófobas independentes muito nítidas, formando feixes que atingindo o corpo se sub-dividem em outros secundários que percorrem toda a sua superfície interna. Esferas endoplasma-

ticas grandes, medindo as que apresentam contornos, nítidos entre 7,3 e 2,9 com uma média de 5 e uma moda de 4,4.

(Comprimento	Max. 401 — Min. 165 — Med. 235
Corpo (
(Largura	Max. 70 — Min. 33 — Med. 67
Rostelo	Max. 131 — Min. 81 — Med. 108
Núcleo	Max. 19x17,5; Min. 11,7x11,7; Med. 15,2x13,5

Metasaccinobaculus clevelandi n. sp. (*)

Corpo relativamente delgado. Camada externa do citoplasma não muito espessa. Axostilo ondulante menor e mais estreito que o de *M. oxymonoides*, apresentando escassa tendência a formar franjas. Fibrilas cromofobas não associadas ao axostilo, pouco conspicuas. Esféricas endoplasmáticas pequenas, medindo as de contornos nítidos entre 1,5 e 5,1 com uma média de 2,7 e uma moda de 3.

Dimensões (forma inteiramente desenvolvida)

(Comprimento	Max. 237 — Min. 169 — Med. 217
Corpo (
(Largura	Max. 44 — Min. 31 — Med. 37
Rostelo	Max. 87 — Min. 55 — Med. 70
Núcleo	Max. 20,4x13,1; Min. 10,2x10,2; Med. 14,5x12,7

DISCUSSÃO

Antes de entrarmos na discussão dos pontos diretamente relacionados com o gênero aqui criado, isto é, sobre sua legitimidade e sobre as contribuições que seu estudo trouxe para o conhecimento do grupo, é conveniente que se trate de alguns pontos preliminares.

1) Fibrilas cromóforas independentes.

Sob esta denominação consideramos no decorrer deste trabalho o feixe de fibrilas cromóforas não relacionadas com o axostilo, em contraposição àquelas que, partindo da extremidade anterior da membrana ondulante terminam na extremidade do rostelo. De acôrdo com o nosso conhecimento, um tal feixe

* Dado em honra ao prof. L. R. Cleveland da Universidade de Harvard, pelos seus notáveis trabalhos sobre a citologia dos protozoários em geral, particularmente sobre os flagelados de termitas.

de fibrilas ocorre somente no flagelado descrito por CLEVELAND como *Oxymonas grandis*. Este A. contudo interpreta esta estrutura de um modo diverso; isto é, como sendo constituída pelas próprias fibrilas intrarostelares do axostilo que, atingindo a extremidade anterior do rostelo, dobram-se e percorrendo-o em sentido contrário atingem o corpo do protozoário. Esta interpretação do A. é figurada (Fig. de texto 33-3, 4, 5), e declarada textualmente (página 52 linha 2). "The axostyle consists of a staining and a non-staining portion the latter beginning near the rostellum, extending into this organelle to its anterior tip where it bends and then extends posteriorly through the rostellum and the body, usually forming a coil in the posterior portion of the body" . . .

Ora, em *Metasaccinobaculus* os fatos não se passam deste modo. Vimos que as fibrilas independentes se formam na extremidade cálice se dirigindo imediatamente para traz (Pl. III, fig. 17), e, nos estádios subseqüentes, pode-se apreciar com igual nitidez que elas se originam na extremidade do rostelo não sendo absolutamente constituída pela simples curvatura das fibrilas do axostilo.

A origem destas fibrilas cromóforas independentes cria um novo problema que se adiciona aos que já existem em relação à mitose a formação do componente cinético extranuclear nos oximonadideos. Por analogia com o que ocorre nos outros flagelados, é lícito perguntar de que organela cinética se originam estas estruturas, e se não haverá alguma relação entre a sua origem e os grânulos eosinófilos situados perto da extremidade anterior do rostelo, referidos no texto (pg. 356).

Como dissemos acima, o único flagelado que apresenta uma estrutura indubitavelmente idêntica ao feixe de fibrilas cromóforas independente de *Metasaccinobaculus* é *Oxymonas grandis*. Contudo, nos gêneros *Oxymonas* e *Microrhopalodina* (= *Proboscidiella*) têm sido descritas estruturas fibrilares que parecem ser homologas das fibrilas cromóforas independentes. KOFOID & SWEZV (1926 e 1926 a) denominaram fibras retratoras, atribuindo-lhes a função de retratoras do rostelo. Posteriormente KIRBY (1929) redescreve tais fibrilas em *Microrhopalodina* (= *Proboscidiella*) Kofoidi mas infelizmente não se possui dados seguros sobre a origem destas fibrilas. KIRBY adianta que provavelmente nascem no rostelo sem dar mais detalhes, enquanto que ZELIFF (1930) admite que sejam fibrilas que se originam em blefaroplástos e que "em certos casos" ao invés de se dirigirem para o rostelo se orientam no sentido posterior.

CONNELL (30) revela a existência de fibras (*supporting fibrils*) que seriam formada pela união de fibrilas cromóforas do rostelo na forma fixa de *Oxymonas dimorfa*. Tudo leva a crêr sejam também organelas homologas.

E' possível que as estruturas descritas por CLEVELAND "et altr" como paraxostilo em *Saccinobaculus* e *Pyrrsonympha* sejam também homologas das fibrilas cromóforas independentes. Tal fato estabeleceria mais um ponto de contato entre as duas famílias.

2) Morfologia do axostilo.

O exame das preparações mostra uma grande variação nos aspectos do axostilo e pode-se perguntar se uma tal variação não estaria ligada a existência de outras espécies além daquelas aqui descritas. Segundo o que podemos interpretar, a variação nos aspectos do axostilos corre por conta do ângulo sob o qual é observado e do grau de dilaceração que apresenta; em ambos os casos todas as formas intermediárias entre tipos extremos podem ser vistas. Tliás, fenômenos de dilaceração ocorrem também nos axostilos ondulantes de *Dinenympha* (KIRBY, 1924) e *Pyrrsonympha* (POWELL, 1928).

Se estas organelas são realmente homologas do axostilo dos outros flagelados como discutem CLEVELAND et altr. (loc. cit.) em relação a *Saccinobaculus*, não possuímos argumentos novos para discutir.

3) A ausência de flagelos.

Uma das características mais interessantes do gênero aqui criado é ausência de flagelos em qualquer fase da vida.

Tal fato é interpretado como o resultado de uma alta adaptação à vida fixa, bem como de uma aquisição da capacidade de executar movimentos próprios, por parte desta organela que denominamos de axostilo de acôrdo com os AA. que têm estudado o assunto, e por falta de argumentos em contrário. Em *Saccinobaculus* em que também existe uma tal organela fortemente desenvolvida e capaz de determinar movimentos no protozoário, os flagelos são pouco desenvolvidos, e tem um papel secundário na sua progressão. Que uma adaptação avançada à vida fixa pode determinar a perda de flagelos, prova a estrutura de *Oxymonas dimorfa* (CONNELL, loc. cit.). Este flagelado possui flagelos apenas na forma jovem que nada no conteúdo intestinal do termita; com a sua fixação perde os flagelos. *Oxymona dimorfa* possui contudo, como as demais *Oxymonas* um axostilo rudimentar e não em faixa e ondulante como no presente caso.

4) Mitose e origem do sistema neuromotor.

O estudo descritivo mais recente e detalhado sobre a mitose dos flagelados oximonadideos é o CLEVELAND sobre o *Oxymonas grandis*. Neste trabalho o A. admite a existência de um centriolo intranuclear que se divide, indo os dois centriolos filhos para cada um dos polos da figura mitótica. Realmente, tanto em *Metasaccinobaculus* como em *Oxymonas grandis* nota-se que as fibrilas do fuso central se originam na superfície de um espaço circular vazio; porém nem nas figuras de CLEVELAND nem nas nossas é possível evidenciar a imagem de um centriolo tal como êle aparece comumente. Assim sendo, se ali existe realmente um centriolo como as razões teóricas indicam, o que vemos é a sua imagem negativa. Contudo em um trabalho anterior, CLEVELAND et altr." figuram a mitose de um "*Oxymonas — like flagellate*", em que são nitidamente representados os dois centriolos. (Pl. 60, figs. 444 e 445). Ora, "*Oxymonas — like flagellate*" foi com toda a certeza um simples nome provisório para *O. grandis*, embora CLEVELAND não o tenha declarado, pois seus caracteres coincidem perfeitamente e provêm do mesmo hospedador. Do mesmo modo este A. descreve a formação do componente cinético extranuclear a partir destes centriolos, que se diferenciam em duas porções, isto é, uma porção formadora do axostilo (axostyle-producing portion) que se salienta da membrana nuclear e se torna extranuclear, e outra porção (achromatic figure-producing portion), formadora da figura acromática, que permanece intranuclear.

A impossibilidade de reconhecer um centriolo pela imagem negativa, precisando sua forma, suas relações com a membrana nuclear e com os axostilos, néo-formados, nos impede de decidir com certeza sobre a existência de tal organela nos nossos flagelados, e conseqüentemente sobre seu comportamento tal como é descrito.

E' certo contudo que a formação dos novos axostilos está indubitavelmente relacionada com a figura mitótica. CONNELL (loc. cit.) estudando *Oxymonas dimorfa*, não se pronuncia de modo claro e definitivo sobre a origem do sistema neuromotor e nega que estas organelas sejam formadas às custas de uma porção extranuclear da centrodeseose (= fuso central) como pensava JANICKI ou de qualquer granulo extra ou intranuclear.

Segundo CONNELL, o sistema neuromotor aparentemente se forma numa zona clara e mais refractil quando examinada em fundo negro e que envolve a figura mitótica.

Mais adiante no "Sumário" se expressa mais decisivamente: "6) The axostyle does not arise as an extranuclear remnant of the centrodesmose, but from fused rostellar fibrillae which seem to arise from the nuclear membrane".

Ora, no estudo da mitose de *Metasaccinobaculus* tivemos a ocasião de nos referir à impressão da existência de um envólucro hialino em certas figuras mitóticas, e relacionados com os novos axostilos. Tal coincidência é tanto mais interessante se atentarmos que esta interpretação de CONNELL era desconhecida quando examinamos as figuras mitóticas em questão.

Em conclusão, as pesquisas de CLEVELAND em *Oxymonas grandis* afirmam a existência de um centriolo primitivamente intranuclear, e que adquire posteriormente duas porções, uma intranuclear, formadora do fuso central e outra extranuclear formadora dos axostilos e outras organelas. Embora esta interpretação forneça uma explicação para os fenômenos, não pode ser considerada como definitiva, dada a contradição de CONNELL e a nossa incapacidade de comprova-la.

5) Validade do gênero *Metasaccinobaculus*.

Este gênero apresenta relações estreitas com dois gêneros já criados: *Saccinobaculus* CLEVELAND, HALL, SANDERS e COLLIER, 1934, e *Oxymonas* (JANICKI, 1915) KOFOID & SWEZY, 1926, EMEND.

A possibilidade da inclusão dos flagelados acima descritos no primeiro dos gêneros é afastada a primeira vista. A existência de um axostilo ondulante em ambos os gêneros assim como a existência de uma mitose intranuclear estabelecem relações filogenéticas, mas não suportam nem superficialmente a hipótese da inclusão do mesmo gênero. Resta portanto o gênero *Oxymonas*.

Pondo de lado as grandes dimensões de *Metasaccinobaculus*, a sua semelhança com *Oxymonas* é a primeira vista perfeita. Contudo, há certos pontos fundamentais que estabelecem as bases para criação do novo gênero e sua distinção do gênero *Oxymonas*.

1.º) *Oxymonas* possui flagelos durante toda a vida (exceto *O. dimorfa* que o possui na fase móvel), *Metasaccinobaculus* não possui flagelos em nenhuma fase da vida.

Se autoridades como KIRBY acham que a exemplo do que ocorre com o gênero *Trichomonas*, a existência de mais um flagelo é suficiente para o desdobramento do gênero *Oxymonas* colocando as espécies com quatro flagelos num gênero a parte, é evidente que a ausência definitiva dos flagelos com todas as alterações do componente cinético dela decorrentes, constituem um argu-

mento incomparavelmente mais forte, e por si só suficiente para a instituição deste novo gênero.

2.º) Em *Oxymonas* (exceto *O. grandis*) o axostilo é rudimentar e não possui qualquer função na locomoção do protozoário.

Em *Metasaccinobaculus* o axostilo é hipertrofiado, laminado, dotado de intensos movimentos que determinam a progressão do protozoário, e com estruturas comparáveis as de *Saccinobaculus*, se bem que diferentes.

3.º) Com exceção da chamada *Oxymonas grandis* em nenhum flagelado oximonadideo existem fibrilas cromóforas dispostas em feixe independentes, constituindo as fibrilas chamadas impropriamente de retracteis por KOFOID & SWEZY às únicas estruturas que poderiam ser consideradas homologas destas.

4.º) Em *Oxymonas* como nos demais gêneros da família *Oxymonadidae* o núcleo possui (exceto *O. grandis*) cariosoma. Em *Mesaccinobaculus* não é possível evidenciar um cariosoma.

5.º) Em *Oxymonas* não há nenhuma estrutura análoga ao disco fixador que se encontra na extremidade anterior do rostelo do gênero que aqui descrevemos.

6.º) Em *Oxymonas* a camada superficial do corpo é delgada, em *Metasaccinobaculus* é espessa. Não atribuímos contudo importância fundamental a este caráter. O fato de *Oxymonas grandis* contrariar um grande número de características do gênero, nos conduz à necessidade de salientar as diferenças entre *O. grandis* e o gênero aqui criado. Acreditamos que o fato de *Oxymonas grandis* apresentar flagelos em todas as fases do ciclo e *Metasaccinobaculus* não os apresentar nunca, constitui um argumento mais que suficiente em protozoologia para a criação de um novo gênero. Além deste caráter outros menos importantes são dignos de nota; assim, enquanto que *O. grandis* possui uma estrutura de fixação muito rudimentar na extremidade do rostelo, o novo gênero a possui muito desenvolvida e em forma de disco.

Não pode escapar na análise que fizemos dos elementos de diferenciação, o fato de *Oxymonas grandis* fazer exceção ao um grande número dos caracteres do gênero. Seria talvez mais preciso colocar *O. grandis* num gênero a parte e esta idéia é mesmo admitida em parte pelo próprio creador da espécie na introdução do artigo em que é apresentada.

Tal assunto deverá ser tratado separadamente, pois sai dos limites deste trabalho.

Em relação ao gênero *Kirbyella* incompletamente descrito por ZELIFF (1930 a), apesar de possuir relações estreitas com o gênero aqui descrito, acreditamos que o simples fato da presença de múltiplos axostilos assim como a de um cariosoma, torna inútil qualquer discussão sobre a possível identidade destes dois gêneros.

Relações filogenéticas

Os caracteres do gênero *Metasaccinobaculus* vem dar uma considerável precisão às idéias de CLEVELAND sobre as relações filogenéticas entre as famílias *Dinenymphidae* e *Oxymonadidae*, baseadas largamente no tipo mitótico e mais precisamente no método de formação das organelas cinéticas.

Como *Saccinobaculus* — um dineninfideo — o gênero que é aqui estudado apresenta um axostilo ondulante dotado de movimentos como em *Dinenympha* e *Pyronympha*. Apresenta ainda do gênero *Saccinobaculus* a estrutura estriada característica, na extremidade do axostilo.

Das *Oxymonas* típicas, ele possui o rostelo e em todos os detalhes conhecidos, absoluta semelhança no processo de divisão, da mitose e da formação das novas organelas.

Pode ser interpretado como um flagelado com caracteres da família *Oxymonadidae*, altamente adaptado à vida fixa, perdendo definitivamente os flagelos e mantendo o axostilo ondulante dos dinenfideos.

Metasaccinobaculus e seu mais próximo relacionado *Oxymonas grandis*, mostram com notável clareza como um grupo evolúe para outro, quando os tipos extremos são absolutamente diferentes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos profundamente ao Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAÇÃO pelo estímulo que garantiu a realização deste trabalho. Ao Prof. ANGELO DA COSTA LIMA pela imensa bondade em determinar os exemplares de termitas, afastando-se dos seus problemas do momento e ao prezado mestre Dr. JULIO MUNIZ pela valiosa crítica na condução deste trabalho.

SUMÁRIO

1) O A. descreve, no presente trabalho duas novas espécies de um novo gênero de flagelados (*Metasaccinobaculus*), colocado entre os *Oxymonadidae*.

2) Morfológicamente, caracterizam-se pela existência de um rostelo que juntamente com o aspecto geral e as esferas endoplasmáticas os aproxima dos oximonadideos, e pela presença de um axostilo ondulante dotado de movimentos enérgicos, únicos responsáveis pela locomoção do protozoário.

Os flagelos foram definitivamente perdidos.

3) No seu ciclo evolutivo o protozoário apresenta duas formas perfeitamente distintas: uma forma jovem que nada livremente no fluído intestinal do termita e uma forma adulta, fixa pelo rostelo na parede do tubo digestivo do hospedeiro.

A forma adulta é sacciforme, com um longo rostelo em cuja extremidade anterior existe um disco de fixação. O ectoplasma é espesso sobretudo na extremidade posterior, e o endoplasma cheio de esferas pardas. O componente cinético extranuclear é constituído por um axostilo ondulante muito cromófilo, por vêzes franjados nos bordos e prêso a parede do corpo por uma estrutura tubular. Além desta organela, observa-se ainda dois sistemas fibrilares. O primeiro é constituído de fibras rostelares e que ligam a porção ondulante do axostilo à extremidade do rostelo. O outro que denominamos fibrilas cromófobas independentes, nascem na extremidade do rostelo, percorrendo-o lateralmente em toda a sua extensão e atingindo o corpo, onde se resolvem em feixes secundários que se espalham em todas as direções.

O núcleo é formado de traves grosseiras de cromatina, formando um retículo muito irregular.

A forma jovem é muito menor, com rostelo e fibrilas cromófobas rudimentares. O axostilo ondulante relativamente muito desenvolvido, se fixa na extremidade posterior. Com o crescimento, este ponto vai-se deslocando em direção à região anterior do corpo.

Nota-se perto do ponto de inserção, uma bainha de filamentos finíssimos envolvendo a porção tubular posterior do axostilo, bastante semelhante ao de *Saccinobaculus*.

O endoplasma é fortemente cromófilo, mas sem esferas.

O núcleo a princípio formado de granulos muito finos de cromatina e uniformemente dispersos, apresenta uma ou mais estruturas envolvidas por um halo claro, com a aparência de cariosoma. Cêdo porém desaparecem.

4) Antes da mitose, que é muito semelhante à de *O. grandis*, o núcleo desprende-se e cai na porção posterior do corpo, por degeneração de tôdas as organelas cinéticas extranucleares.

A membrana nuclear persiste. Forma-se um fuso central muito desenvolvido. Os cromosomas são em número imenso, muito finos e irregulares. No lugar onde deveriam estar presentes os centriolos, vê-se um espaço claro circular na superfície do qual se inserem as fibrilas do fuso.

Os novos axostilos ondulantes e demais organelas se formam nos polos da figura mitótica, a partir dos centriolos perceptíveis pela sua imagem negativa, ou por uma estrutura hialina que envolve a figura mitótica, como é sugerido pelo exame de certas preparações (v. texto desenvolvido).

De extremidade hialina em fôrma colar dos novos axostilos, formem-se as fibrilas cromófobas.

5) São descritas duas espécies novas: *M. oxymonoides* e *M. clevelandi*, facilmente distinguíveis pelas dimensões do corpo, tamanhos das esferas, morfologia do rostelo e axostilo. Certamente há uma terceira espécie, menor que as demais.

6) O novo gênero se distingue de *Saccinobaculus* (*Dinenymphidae*) principalmente pela ausência de flagelos, presença de um rostelo e sistema fibrilas cromófobas independentes. Os elementos componentes da mitose também são diferentes embora presente o novo gênero, o mesmo esquema mitótico. Do gênero *Oxymonas* se distingue pela ausência de flagelos, pela disposição das fibrilas cromófobas, axostilo ondulante e ausência de cariosoma.

Do flagelado descrito como *O. grandis* que também possui axostilo ondulante, fibrilas cromófobas em feixe e ausência de cariosoma, distingue-se principalmente pela ausência de flagelos e pelo disco de fixação na extremidade do rostelo.

7) Sob o ponto de vista de suas relações filogenéticas *Metasaccinobaculus* pode ser considerado como um *Oxymonadidae* altamente evoluído para as condições de vida fixa, tendo contudo mantido caracteres dos *Dinenymphidae*, o que estabelece as relações filogenéticas entre estas duas famílias.

SUMMARY

1 — The A. describes two new species belonging to a new genus of flagellate Protozoa from the termite *Kalotermea wagneri*, Desneux and placed amongst the *Oxymonadidae*.

2 — They exhibit the general aspect of an oxymonad flagellate, although possessing a more complex rostellum and a highly developed undulating axostyle, responsible for the movement of the organism. Flagella have been completely lost.

3 — During life-cycle, these flagellates present two forms viz. a young, swimming form and an adult form, attached to the gut wall of the termite.

The fixed form is a flask-like organism, with a long rostellum which possesses at its distal end an attachment disk. Ectoplasm is thick, chiefly at posterior end of the organism. Endoplasm full of brown spheres. The extranuclear kinetic component is constituted by an undulating axostyle and two systems of chromophobic fibrils. The axostyle is a ribbon-like structure, vigorously undulating when living, intensely stained by iron haematein and eosin, and fixed posteriorly to the body wall through a special tube-like structure. The system of chromophobic fibrils is constituted by rostellar fibrils which connect the undulating portion of the axostyle to the tip of the rostellum. The other system referred to as independent chromophobic fibrils takes origin at the distal end of the rostellum perhaps in granules there found, runs backward through this organelle and reaches the body, where it suffers subdivisions into thinner bundles. The nucleus presents the chromatin arranged in large, thick and irregular structures: there is no karyosome.

The young form is much smaller and its undulating axostyle is relatively very large in relation to the size of the body. It is attached to the body wall at posterior end. During growth, this point moves forward. Near the point where the tube-like structure is fastened to the surface of the body, a sheath can be observed, constituted by a great number of very fine hyaline strands. The endoplasm is deeply chromophile, but free from brown spheres, which makes their appearance after the fixation of the organism. The nucleus, at the early stages, exhibit very thin granules of chromatin with a uniform dispersion. One or more structures surrounded by a clear halo and simulating a karyosome can be seen at this stage; nevertheless they soon disappear.

4 — Before mitosis which is quite similar to that of *Oxymonas grandis*, the nucleus migrates to the posterior end of the body, due to the degenera-

tion of the neuromotor organellae. The nuclear membrane persists during the whole process. A central spindle develops within the nucleus as a straight rod, reaches the nuclear membrane assuming a convex barrel shape, and suffering a torsion in opposite sense on each pole. At sites where centrioles must lie, a clear circular space can be seen, the spindle fibrils being attached to its periphery. The chromosomes are very minute structures, irregular in shape and in enormous number.

The new axostyles as well as the other cinetic organellae take origin near the poles of the mitotic figure, from centrioles or from a hyaline structure which seems to surround the mitotic figure, as suggested by the examination of certain preparations (see developed text). New chromophobic fibrils originate from a collar-shaped structure at the end of the young axostyles.

5 — Two new species are described here: *M. oxymonoides* n. gen. n. sp. and *M. clevelandi* n. gen. n. sp., easily distinguishable chiefly by the size both of the body and endoplasmic spheres as well as by the shape of the rostellum and undulating axostyle. Certainly a third and smaller species is also present.

6 — The new genus is distinguishable from *Saccinobaculus*, chiefly by the absence of flagella and presence of a rostellum. From the flagellate described as *Oxymonas grandis* which also possesses an undulating axostyle, chromophobic fibrils forming a bundle and no karyosome in the nucleus, the genus *Metasaccinobaculus* is distinguished chiefly by the absence of flagella as well as by fixation disk.

7 — From the viewpoint of its phylogenetical relations, *Metasaccinobaculus* can be considered as an oxymonad highly evolved toward fixed life conditions, but still maintaining characters of the dinenymphids, and providing additional support to Cleveland viewpoints concerning the phylogenetical relationships of the families *Oxymonadidae* and *Dinenymphidae*.

BIBLIOGRAFIA

CLEVELAND, L. R.

1935. The intranuclear achromatic figure of *Oxymonas grandis* sp. nov. Biol. Bull. 69 (1).

CLEVELAND, L. R., HALL, S. R., SANDERS, F. P. & COLLIER, J.

1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and symbiosis between protozoa and roach. Mem. Am. Ac. Arts & Sc. 17 (2).

CONNELL, F. H.

1930. The morphology and life-cycle of *Oxymonas dimorpha*, sp. nov. from *Neotermermes simplicornis* (Banks).
Un. Cal. Publ. Zool. 36 (2).

COSTA LIMA, A. da

- 1938 Sobre um *Kalotermes* do Rio de Janeiro.
Mem. Inst. Osw. Cruz T. 33 (3).
1942 Sobre *Kalotermes* (*Neotermermes*) *wagneri* e espécies afins.
Bol. Soc. Bras. Agron. 5, (1).

KIDDER, G. W.

- 1929 *Strblomastix strix*, morphology and mitosis.
Un. Cal. Publ. Zool. 33, (6).

KIRBY, H. JR.

1924. Morphology and mitosis of *Dinenympha fimbriata* sp. nov.
Un. Cal. Publ. Zool. 26 (10).

KIRBY, H. JR.

1929. A species of *Proboscidiella* from *Kalotermes* (*Cryptotermes*) *dudleyi*, Banks, a termite of Central America, with remarks on the oxymonad flagellates.
Quart. J. Micr. Sc. 72.

KIRBY, H. JR.

1944. Some observations on cytology and morphogenesis in flagellate. Protozoa.
J. Morph. 75, (6).

KOFOID & SWEZY, O.

1926. On *Oxymonas*, a flagellate with an extensile and retractile proboscis from *Kalotermes* from British Guiana.
Un. Cal. Publ. Zool. 28 (15).

POWELL, W. N.

1928. On the morphology of *Pyrsonympha*, with a description of three new species from *Reticulitermes hesperus*, Banks Un. Cal. Publ. Zool. 31 (10).

DEL RIO-HORTEGA, P.

1916. Estudios sobre el centrosoma de las células nerviosas e neuroglícas de los vertebrados en sus formas normales y anormales.
Trab. Labor. Invest. Biol. Un. Madrid. 14.

ZELIFF, C. C.

1930. A cytological study of *Oxymonas*, a flagellate, including the descriptions of new species.
Am. J., Hyg. 11 (3).

ZELIFF, C. C.

- 1930-a *Kirbyella zeteki*, a new genus and species of protozoa from *Kalotermes* (*Calcaritermes*) *brevicollis* from the Canal zona.
Am. J., Hyg. 11 (3).

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

PLANCHA I

M. oxymonoides

Desenhos semi-esquemáticos. Figs. 1 e 6 Schaud.-Mann-Dobell, as restantes Bouin-Hemat. ferrea-ac. picrico. Aumento: 325 diâmetros

- Fig. 1 — Fôrma fixa completamente desenvolvida.
- Fig. 2 — Fôrma fixa mostrando alongamento que precede à divisão. Observe-se o início de degeneração das organelas neuromotoras.
- Fig. 3 — Fôrma jovem recém-destacada do corpo do indivíduo gerador e ainda não perfeitamente formada.
- Fig. 4 — Fôrma jovem.
- Fig. 5 — Fôrma em desenvolvimento.
- Fig. 6 — Fôrma anomala diplozoica. Observe-se as fibrilas rostelares do indivíduo inferior atravessando o endoplasma até atingir a extremidade distal do rostelo.

PLANCHA II

M. clevelandi

Desenhos semi-esquemáticos. Figs. 7 e 10, Schaud.-Mann-Dobell, as restantes Bouin-Hemat. ferrea-ac. picrico. Aumento: 325 diâmetros

- Fig. 7 — Fôrma completamente desenvolvida, fixa.
- Fig. 8 — Fôrma alongada. Organelas neuromotoras em degeneração. Mitose avançada.
- Fig. 9 — Fase mais avançada da divisão. Indivíduos-filhos ainda não separados. Resto alongado do corpo do indivíduo gerador em degeneração.
- Fig. 10 — Fôrma jovem.
- Fig. 11 — Fôrma em desenvolvimento.
- Fig. 12 — Figura de divisão múltipla.

PLANCHA III

- Fig. 13 — Schaud.-Mann-Dobell; as restantes, Bouin-Hemat-ferrea-ac. picrico. (A escala que figura nesta plancha não se aplica às figs. 13 e 14). Aumentos: Figs. 13 e 14: 325 diam.; as restantes 825 diâmetros.
- Fig. 13 — *M. oxymonoides*. Indivíduo adulto, fixo. Observe-se o disco de fixação na extremidade do rostelo.
- Fig. 14 — *M. oxymonoides*. Indivíduos recém-formados, ainda encerrados na porção posterior do corpo do indivíduo gerador, parte do qual já em franca degeneração.
- Fig. 15 — *M. oxymonoides*. Mitose. Profase avançada.
- Fig. 16 — *M. oxymonoides*. Metafase. Observe-se os novos axostilos ondulantes e suas ligações com a figura mitótica, possivelmente por intermédio de uma estrutura hialina que parece envolver a figura mitótica.
- Fig. 17 — *M. oxymonoides*. Telofase avançada. Observe-se a origem das novas fibrilas cromofobas.
- Fig. 18 — *M. clevelandi*. Profase avançada. Figura mitótica em posição oblíqua.
- Fig. 19 — *M. clevelandi*. Metafase. Observe-se um dos novos axostilos ondulantes em estadio muito precoce de sua formação.
- Fig. 20 — *M. clevelandi*. Telofase avançada. Observe-se a estrutura caliciforme da extremidade dos novos axostilos, que dá origem às fibrilas cromofobas.
- Fig. 21 — *M. oxymonoides*. Detalhe da extremidade posterior do axostilo ondulante no indivíduo fixo. A área cromofila que envolve não foi representada.