

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE CILIADOS DE RÚMEN (ENTODINIOMORPHIDA, OPHRYOSCOLECIDAE) REVELADOS PELAS TÉCNICAS DO PROTARGOL E DA REAÇÃO DE FEULGEN

Marta D'Agosto¹

Milden Rodrigues de Santa-Rosa²

ABSTRACT. MORPHOLOGICAL ASPECTS OF RUMEN CILIATE (ENTODINIOMORPHIDA, OPHRYOSCOLECIDAE) DEMONSTRED BY PROTARGOL AND FEULGEN'S REATION TECHNIQUES. The results of the protargol's technique and Feulgen's reactions on ciliates of the genus *Entodinium* Stein, 1859, *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eudiplodinium* Dogiel, 1927 and *Ostracodinium* Dogiel, 1927 are presented. The ciliates were obtained from samples of bovine's ruminal content.

KEY WORDS. Entodiniomorphida, Ophryoseolecidae, rumen ciliate, silver impregnation, Feulgen's reaction

Desde a primeira observação por GRUBY & DELAFOND (1843), espécies de ciliados de rúmen vêm sendo assinaladas e descritas nas diversas regiões de ocorrência de seus hospedeiros, ruminantes e pseudo-ruminantes domesticados ou silvestres. Quanto às técnicas de evidenciação de suas estruturas são utilizadas montagens provisórias com ciliados não corados (VAN HOVEN 1983), em glicerina (KOFOID & MACLENNAN 1930; WERTHEIM 1935; DAS-GUPTA 1935; CLARKE 1964) ou corados. Para evidenciar o macronúcleo é comum o emprego do verde de metila (CLARKE 1964; DEHORITY 1974; IMAI 1988), verde de metilapironina-acéto-orceína-clorídrico ou reação ao Azur A. Gürr (CHARDEZ 1983) ou azul de metileno acidificado (DEHORITY 1974), e para evidenciação das placas esqueléticas solução de Lugol ou outra contendo iodo (KOFOID & CHRISTENSON 1934; DAS-GUPTA 1935; ZIELYK 1961; CLARKE 1964; DEHORITY 1974; VAN HOVEN 1975, 1983; CHARDEZ 1983).

Quanto às preparações permanentes, foram referidas a coloração pela hematoxilina de Heidenhain, Mallory, Delafield ou de Mayer, e ainda hematoxilina e eosina (KOFOID & MACLENNAN 1930, 1932; WERTHEIM 1935; DAS-GUPTA 1935; ZIELYK 1961; VAN HOVEN 1975, 1983; OGIMOTO & IMAI 1981; IMAI 1988). Preparações com verde de metila desidratadas em álcool e xilol e montadas em Euparal foram feitas por CLARKE (1964), e com carmin borácico por ZIELYK (1961).

1) Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

2) Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944-970 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

OGIMOTO & IMAI (1981) citaram como possíveis técnicas para preparações permanentes de ciliados de rúmen, além da hematoxilina férrica de Heidenhaim, a impregnação pela prata, segundo Bodian, mencionando ainda a técnica de CHATTON-LWOFF (1930) simplificada, de acordo com FRANKEL & HECKMANN (1968).

ZIELYK (1961), além das técnicas já citadas, fez preparações utilizando nigrosina, 10% de azul opala, e técnicas de impregnação pela prata de KLEIN (1958) e CHATTON-LWOFF (1930) para evidenciar estriações longitudinais de organismos do gênero *Entodinium* Stein, 1859. O autor assinalou não haver obtido nenhum resultado positivo na coloração ou impregnação da infraciliatura.

O presente trabalho objetivou investigar o resultado da utilização de duas técnicas de preparações permanentes, o protargol e a reação de Feulgen, no estudo de ciliados de rúmen de bovinos por se tratar de técnicas clássicas em ciliatologia, de ampla aplicação e que raramente são utilizadas para preservação de Entodiniomorfos.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos morfológicos de ciliados de rúmen de bovinos foram realizados em microscopia fotônica empregando-se a reação de Feulgen (FEULGEN 1926) e técnica de Bodian (protargol) segundo a variante de TUFFRAU (1964, 1967). O princípio desta última consiste na utilização de sais de prata, proteínato de prata, como agente impregnante e posterior revelação em hidroquinona. Já na reação de Feulgen, após uma hidrólise ácida, os componentes nucleares coram-se de vermelho intenso por reação com a fuccina do preparado de Schiff.

A triagem dos ciliados foi feita em saleira, com o auxílio de micropipetas, a partir de amostras de conteúdo ruminal fixadas e conservadas em formalina a 18, 5% (v/v), sob microscópio estereoscópico com aumento entre 20 e 40x. As amostras foram filtradas em gaze para eliminação dos fragmentos vegetais maiores e lavadas sucessivamente com água destilada para eliminação dos resíduos de conteúdo ruminal e para concentração dos ciliados.

Para a técnica do protargol, a cada gota de água contendo ciliados era adicionada quantidade cinco vezes maior de Bouin Hollande como pós-fixador, o que facilitava a visualização e triagem dos ciliados. O material foi lavado em água destilada até a eliminação dos resíduos do Bouin e de vestígios de conteúdo ruminal. A seguir, separavam-se os ciliados, agrupando-os segundo suas dimensões (*e.g.*, pequenos entodiniomorfos, grandes entodiniomorfos) em diversas saleiras, para clarificação em água de Javel, com concentração e tempo variáveis de acordo com grupo de ciliados.

O tempo de impregnação no proteínato de prata, a 1%, variou de 24 horas, para pequenos entodiniomorfos, a duas e três horas, para os grandes entodiniomorfos. As impregnações foram realizadas a temperatura ambiente.

Para a reação de Feulgen, os ciliados lavados, triados e concentrados por micropipetagem foram aderidos às lâminas com albumina glicerínada, preparada segundo FOISSNER (1991), antes de se proceder à hidrólise em ácido clorídrico a

1 N (14 a 60°C) e submersão no reativo de Schiff por três horas.

As demais etapas, não mencionadas, seguiram o preconizado pela técnica correspondente até a montagem em bálsamo do Canadá.

As micrografias foram feitas em microscópio ZEISS-Germany com aumento de 1000x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de rotineiramente utilizadas em ciliatologia, não é comum o emprego do protargol ou da reação de Feulgen para evidenciação de estruturas de ciliados de rúmen ou para sua preservação em coleções de referência.

O registro dos resultados obtidos com o protargol e a reação de Feulgen em ciliados ruminais dos gêneros *Entodinium* Stein, 1859, *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eudiplodinium* Dogiel, 1927 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927 pode ser observado nas figuras 1-5.

Com o protargol, os caracteres morfológicos principais para a identificação específica destes ciliados foram evidenciados como, por exemplo, a estrutura externa e suas particularidades como estrias e fendas na película (Fig. 1A, B), zonas de sincília (Figs 1-5), macro e micronúcleo (Fig. 1-5), vacúolo pulsátil (Figs 2B, 3A). Outros caracteres como o opérculo – quando presente –, citofaringe, citoprocto e fagossomo também podem ser observados (Figs 1-5). Registraram-se ainda, a impregnação do macronúcleo (Figs 1D, 3B) e do micronúcleo (Fig. 1D) em divisão e de novas zonas ciliares na formação do opisto (Fig. 3B, 4D, 5A).

Destacam-se as melhores impregnações nos organismos de menores dimensões e em geral sem placas esqueléticas, excetuando-se os do gênero *Eudiplodinium* que apresentam pequena placa esquelética e bons resultados de impregnação. Todavia, para os ciliados cuja identificação genérica é feita pelo número e forma das placas esqueléticas, em geral grandes entodiniomorfos, a impregnação argêntica é inadequada por não evidenciar completamente estas estruturas, apenas vislumbrando-se sua presença em algumas preparações (Fig. 5B). As melhores evidenciações das placas esqueléticas são obtidas com o emprego de soluções a base de iodo (CHARDEZ 1983; VAN HOVEN 1975, 1983), apesar de serem preparações provisórias.

Para os entodiniomorfos de maiores dimensões como os dos gêneros *Ostracodinium*, *Polyplastron* Dogiel, 1927 e outros, o emprego do protargol é restrito pela excessiva impregnação destes organismos, observada mesmo com a redução do tempo de imersão no proteinato de prata. Em algumas preparações, entretanto, nota-se a nítida impregnação do macronúcleo e das zonas de sincília, protraídas ou não (Fig. 5A, C), como as observadas em *Ostracodinium* sp. Com os organismos de outros gêneros deste grupo não foram obtidos bons resultados.

Dentre as poucas referências à esta técnica para entodiniomorfos, OGIMOTO & IMAI (1981) citam uma variante do protargol como um dos métodos para montagem permanentes de ciliados. Os autores não apresentaram, contudo,

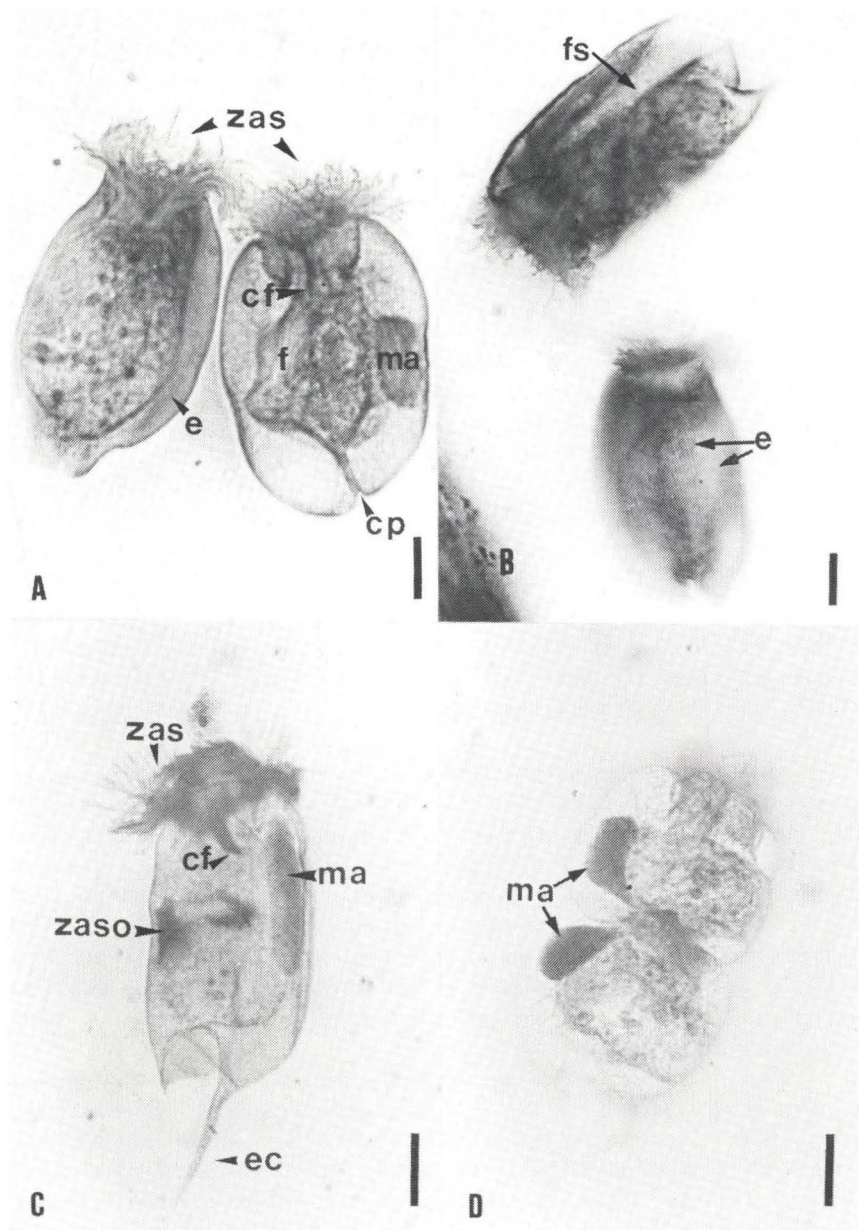


Fig. 1. Micrografias de *Entodinium* spp. em Protargol (A, B, C) e reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), Zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma) em divisão na letra D, citofaringe (cf), fagossoma (f), citoprocto (cp), estrias (e), fenda superior (fs), espinho caudal (ec). Barra = 10 μ m.

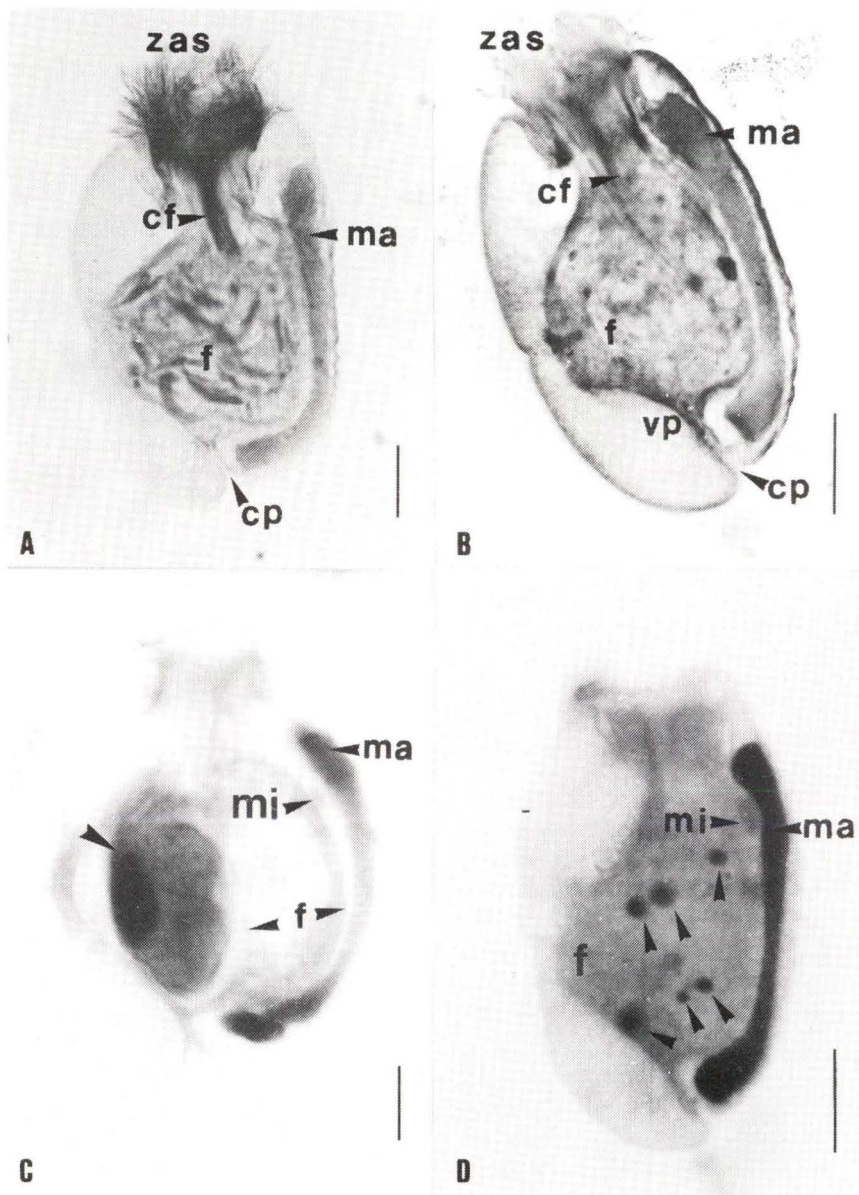


Fig. 2. Micrográfias de *Entodinium longinucleatum*, em Protargol (A, B) e reação de Feulgen (C, D). Zona adoral de sincélia (zas), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), fagossoma (f), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp); (C) predação de um congênere (seta); (D) restos de material nuclear de um congênere parcialmente digerido (setas). Barra = 10µm.

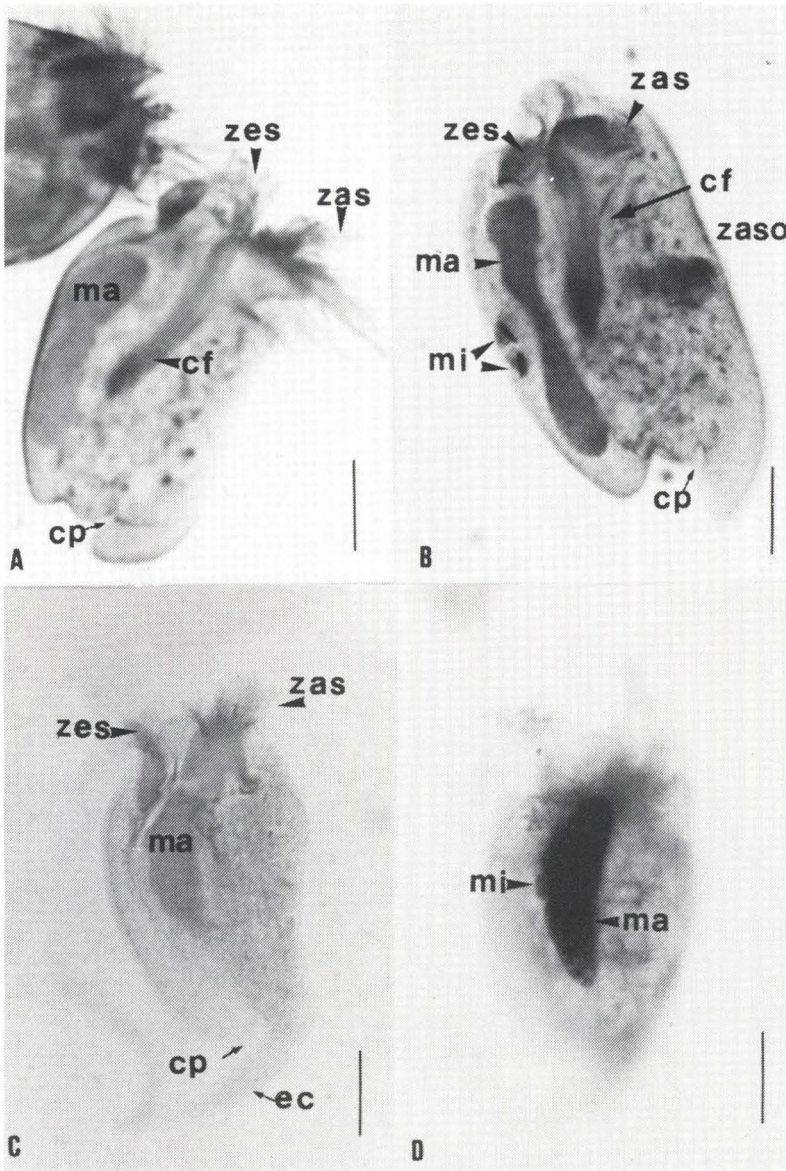


Fig. 3. Micrografias de *Eodinium* sp. em Protargol (A, B) e de *Eudiplodinium rostratum* em protargol (C) e reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), zona esquerda de sincília do opisto em formação (zeso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), citofaringe (cf), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp), opérculo (o). Barra = 10µm.

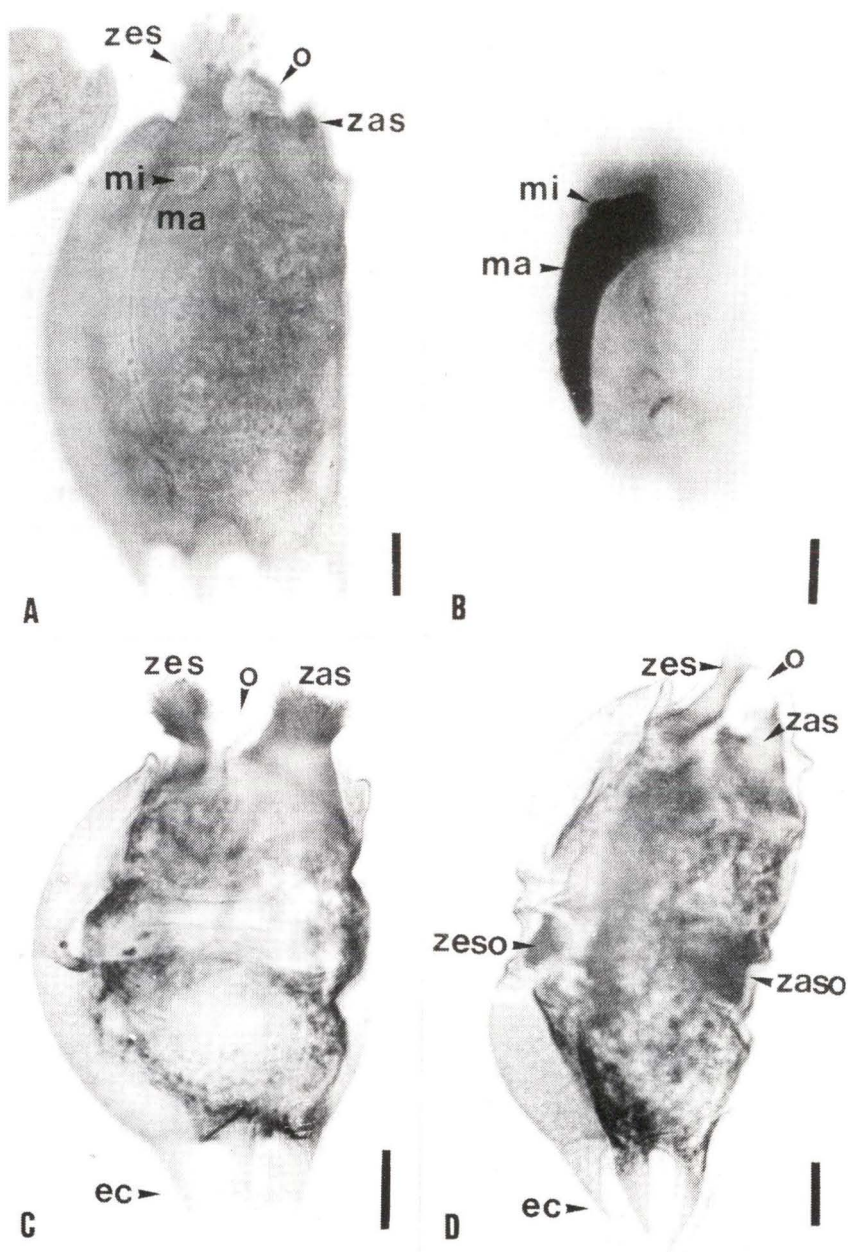


Fig. 4. Micrografias de *Diplodinium dentatum* em protargol (A, C, D) e reação de Feulgen (B). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), espinhos caudais (ec), opérculo (o). Barra = 10 μm.

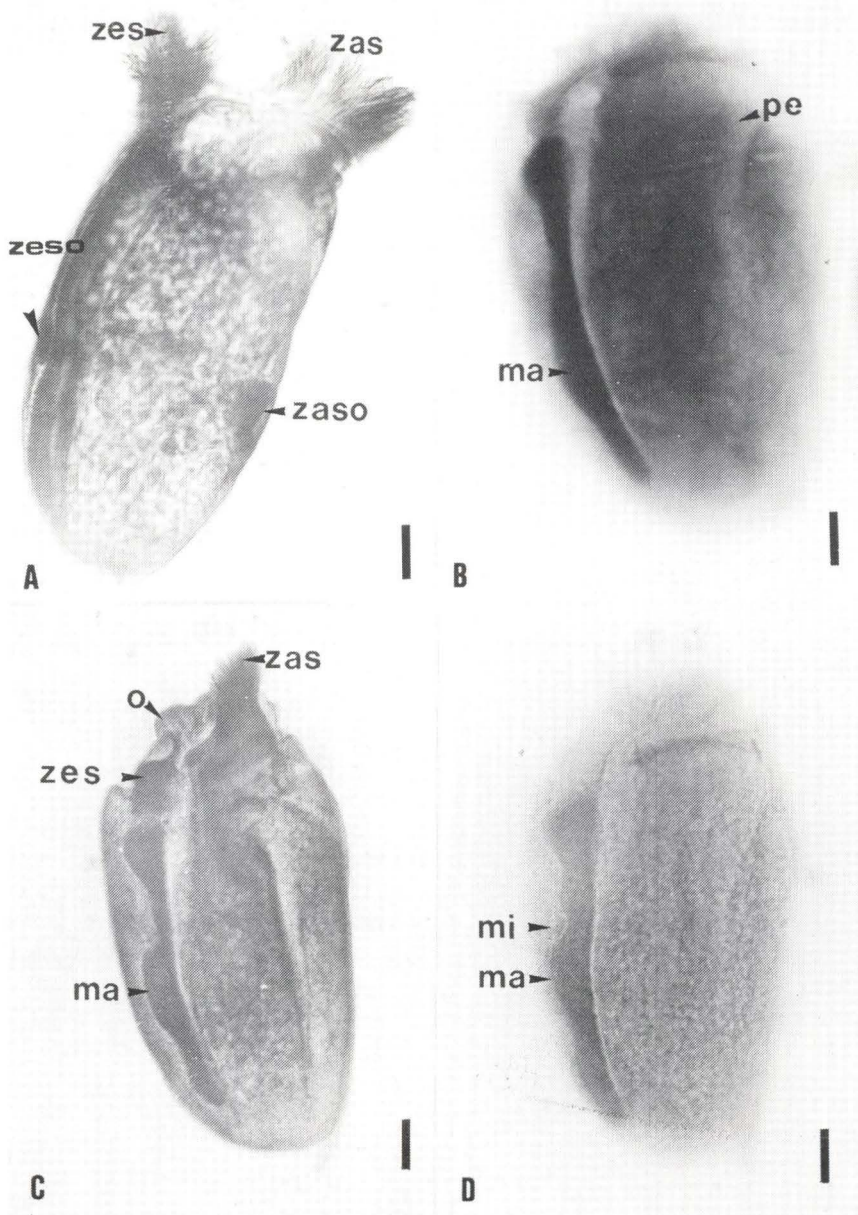


Fig. 5. Micrografias de *Ostracodinium* sp. em protargol (A, C) e reação de Feulgen (B, D). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes) protraída em A e retraída em C, zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), zona esquerda de sincília do opisto em formação (zeso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), opérculo (o), vestígio de placa esquelética (pe). Barra = 10µm.

resultados do seu emprego. Em estudo de organismos da família Ophryoscolecidae, especialmente de *Entodinium dubardi* Buisson, 1923 de cervídeo, ZIELYK (1961) utilizou técnicas de impregnação pela prata de KLEIN (1958) e de CHATTON-LWOFF (1930) assinalando não ter observado a impregnação da infraciliatura. O autor concluiu que material fixado com formalina é inadequado a esta impregnação. A impregnação da infraciliatura de entodiniomorfos com carbonato de prata com piridina foi obtida por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) e por FERNANDEZ-GALIANO (1958), sem o emprego de piridina, em método que chamou de impregnação rápida. Este autor realizou estudo sobre *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa, 1925), ressaltando ter obtido bons resultados. Nos resultados obtidos no presente trabalho, em concordância com o observado por ZIELYK (1961), não houve a impregnação da infraciliatura.

Nas preparações em que se utilizou a reação de Feulgen (Figs 1D; 2C, D; 3D; 4B; 5B, D) nota-se que o objetivo da técnica, que é a evidenciação das estruturas nucleares, foi atingido sendo possível a observação do macro e do micronúcleo. Até mesmo nos grandes entodiniomorfos os resultados foram bastante relevantes como os demonstrado em *Ostracodinium* sp. (Fig. 5B, D).

Credita-se à conservação prolongada do material em formalina a dificuldade de se obter a completa hidrólise do citoplasma, observando-se, em muitos organismos, uma coloração discreta do mesmo, o que não é comum nesta técnica. Com o emprego da reação de Feulgen destacou-se ainda o hábito de predação de outros ciliados, aqui registrado para *Entodinium longinucleatum* Dogiel, 1925 com outro organismo do mesmo gênero no interior de um fagossomo (Fig. 2C) e resto de material nuclear de ciliado já digerido (Fig. 2D). Graças à especificidade desta reação, pôde-se identificar como nucleares as estruturas observadas nestes fagossomos.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que, apesar do longo tempo decorrido entre a obtenção das amostras e o emprego das técnicas de impregnação e de coloração, é possível a sua utilização. Ressalta-se ainda, a importância de se preparar lâminas permanentes que sirvam de material de referência para o estudo destes ciliados, sobretudo quando novas espécies são descritas, a despeito da possibilidade de se observar algumas de suas estruturas em preparações não coradas ou temporárias.

As duas técnicas empregadas evidenciaram particularmente bem as seguintes estruturas: núcleos (macro e micronúcleo), zonas de sincília, citofaringe, citoprocto e fagossoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHARDEZ, D. 1983. Sur la variabilité de deux espèces d'Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorphida). **Bull. Rech. Agron. Gembloux 18**: 257-264.
- CHATTON, E. & A. LWOFF. 1930. Impregnation, par diffusion argentine de

- l'infaciliatura des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. **C.R. Soc. Biol.** **104**: 834-836.
- CLARKE, R.T.J. 1964. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). **N.Z.J. Agric. Res.** **7**: 248-257.
- DAS-GUPTA, M. 1935. Preliminary observations on the protozoan fauna of the rumen of the indian goat, *Capra hircus* Linn. **Arch. Protist.** **85**: 153-172.
- DEHORITY, B.A. 1974. Rumen ciliate fauna of alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibos moschattus*) and dall mountain sheep (*Ovis dalli*). **J. Protozool.** **21**: 26-32.
- FERNANDEZ-GALIANO, D. 1958. La infraciliación en *Polyplastron multivesiculatum* y su génesis durante la división del ciliado. **Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Secc. Biol.)** **56**: 89-108.
- FRANKEL, J. & K. HECKMANN. 1968. A simplified Chatton-Lwoff silver impregnation procedure for use in experimental studies with ciliates. **Trans. Amer. Microsc. Soc.** **87**: 317-321.
- FEULGEN, R. 1926. Die nuclealfarburg abderharden's. 1926. **Haudb. biol. Arbets, meth Abt.** **5**: 1055.
- FOISSNER, W. 1991. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliate protozoa. **Europ. J. Protistol.** **27**: 313-330.
- GRUBY, D. & O. DELAFOND. 1843. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. **Compt. Rend. Acad. Sci.** **17**: 1304-1308.
- IMAI, S. 1988. Ciliate protozoa in the rumen of kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. **J. Protozool.** **35**: 130-136.
- KLEIN, B. M. 1958. The "dry" silver method and its proper use. **J. Protozool.** **5**: 99-103.
- KOFOID, C.A. & J.F. CHRISTENSON. 1934. Ciliates from *Bos gaurus*. **Univ. Calif. Publ. Zool.** **39**: 341-391.
- KOFOID, C.A. & R.F. MACLENNAN. 1930. Ciliates from *Bos indicus* Linn. I. The genus *Entodinium* Stein. **Univ. Calif. Publ. Zool.** **33**: 471-544.
- . 1932. Ciliates from *Bos indicus* Linn. II. A revision of *Diplodinium* Schuberg. **Univ. Calif. Publ. Zool.** **37**: 53-152.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. 1960. Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. **Ann. Sci. Nat. Zool.** **2**: 527-718.
- OGIMOTO, K. & S. IMAI. 1981. **Atlas of rumen biology**. Tokio, Scientific Societies Press, VIII + 231p.
- TUFFRAU, M. 1964. Quelques variantes techniques de l'impregnation des ciliés par le Protéinate d'argent. **Arch. Zool. Exp.** **104**: 186-190.
- . 1967. Perfectionnement et pratique de la technique d'impregnation au Protargol des infusoires ciliés. **Protistologica** **3**: 91-98.
- VAN HOVEN, W. 1975. Rumen ciliates of the tsessebe (*Damaliscus lunatus lunatus*) in South Africa. **J. Protozool.** **22**: 457-462.
- . 1983. Rumen ciliates with description of two new species from three

- african reedbuck species. **J. Protozool.** **30**: 688-691.
- WERTHEIM, P. 1935. A new ciliate, *Entodinium bovis* n. sp., from the stomach of *Bos taurus* L. with the revision of *Entodinium exiguum*, *E. nanellum*, *E. simplex*, *E. dubardi dubardi* and *E. parvum*. **Parasitology** **27**: 226-230.
- ZIELYK, M.W. 1961. Ophryoscolecid fauna from the stomach of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*), and observations on the division of *Entodinium dubardi* Buisson, 1923 (Ciliata Entodiniomorpha). **J. Protozool.** **8**:33-41.

Recebido em 15.III.1993; aceito em 22.IV.1994.