

Um methodo de coloração cytologica pela hemateina ferrea *

por

Gilberto de Freitas

Dado o valor fundamental do methodo de Heidenhain como coloração cytologica, numerosas modificações lhe foram introduzidas com o fim de livral-o dos defeitos que apresenta.

É assim que, no methodo original de Heidenhain, os melhores resultados, mesmo para coloração da chromatina, são obtidos após longa permanencia do material em soluções aquosas do mordente e do corante; isto além de tornar o methodo longo na sua applicação, causa, como refere Dobell, uma maceração das estruturas.

Entre essas modificações salientam-se as de Dobell e a de Kofoid e Swezy. Infelizmente, se ellas supplantam o methodo original na rapidez ou na conservação das estruturas, não garantem a constancia resultados ou a generalisação de applicação. Se a primeira não fornece bons resultados na coloração dos cystos dos Protozoarios, a perfeição da segunda modificação depende muito da natureza do material.

Baseados em certos factos relacionados com a coloração pela hemateina ferrea, iniciamos um estudo com o fito de trazer algumas contribuições para este problema.

Iniciado quando o nosso grande mestre Prof. Carlos Chagas era ainda vivo, d'elle recebemos todo apoio moral e technico, e a elle consagramos a nossa profunda gratidão. Cumpre-nos agradecer, tambem, aos Drs. Eurico Villela, Aristides Marques da Cunha e Olympio da Fonseca pelo generoso interesse e valiosa critica. Agradecemos igualmente ao Dr. Carneiro Felipe, pelos esclarecimentos que nos proporcionou nas questões de Chimica physica relacionadas com as colorações cytologicas.



A analyse do effeito das variações na concentração e no pH das soluções, mostra uma perfeita analogia entre as colorações pela hemateina ferrea e os processos de adsorpção.

* Recebido para publicação a 23 de Dezembro de 1935 e dado a publicidade em Setembro de 1936.

A natureza adsorptiva das colorações histologicas, já foi de ha muito declarada por A. Fischer. Sem adoptarmos integralmente esta theoria que parece prejudicada pela generalização, nos limitamos a acceital-a neste caso particular, e como uma hypothese apenas. Passamos então a admittir os phenomenos de adsorpção como determinantes das colorações pela hemateina ferrea, assim se explicando o respeito á equação de Freundlich, e o notavel eclectismo corante d'esta substancia. Se tal hypothese não poude ser demonstrada em virtude da impossibilidade technica de se excluir a idéa de uma reacção isothermica, ella comtudo se mostrou valiosa na sua applicação pratica, permittindo a realisação de um methodo que em nossas mãos tem dado resultados integralmente satisfactorios. Respeitando a equação de Freundlich, usamos soluções muito diluidas do corante e do mordente, tendo as soluções alcoolicas se mostrado superiores ás aquosas.

Verificamos ter singular importancia o pH da solução corante. Aliás, já de ha muito, Breinl e Rosenbuch aconselhavam empiricamente a addição de carbonato de lithio ás soluções alcoolicas de hematoxylina, realisando um methodo rapido de coloração. Este processo, que éra preconisado para Trypanosomideos e outros organismos de dimensões exiguas, dava resultados inconstantes em virtude da impossibilidade de avaliação da quantidade optima de alcali a ser adicionada. A importancia da concentração em iontes hydrogenio nas colorações pela hemateina ferrea, já havia sido salientada por Oliveira-Castro. Este autor prepara suas soluções segundo a formula original de Heidenhain, substituindo a agua pelo systema regulador phosphato monopotassico-phosphato disodico com o pH igual a 7. Preparada a solução, elle junta phenol na proporção de 0,5 %. Facto interessante e inexplicavel, a solução pode ser usada 24 horas depois; conserva-se durante um mez.

A experiencia nos demonstrou que, dentro de um certo limite, quanto mais se progride na alcalinidade, mais perfeita é a coloração das estruturas periphericas dos Protozoarios, com prejuizo para aquellas que estão internamente situadas. Taes factos apresentaram-se particularmente demonstrativos; em *Cyathodinium conicum*, a coloração pelo methodo a seguir descripto, mostrava, quando o pH da solução de de hemateina era igual a 7,9, um effeito simulando o aspecto obtido com as impregnações metallicas pelo methodo de Da Fano. Taes verificações demonstram como uma simples variação no pH das soluções pode ser a causa de mudanças fundamentaes na actividade corante da hemateina.

O conhecimentos de tal influencia, nos induzio á necessidade de introduzir o emprego de soluções reguladoras, para que o trabalho se

processe sempre em condições idênticas. Inicialmente, nós usamos o sistema phosphato monopotássico-soda M/5. Actualmente porém, segundo uma sugestão do Dr. Carneiro Felipe, trabalhamos com uma solução a 1% de phosphato di-potássico cujo pH é levado ao valor de 7,6 com ácido chlorhídrico N/I; realizamos esta operação no momento do emprego. Como indicador, o vermelho de phenol fornece bons resultados, dispensando o uso de comparadores desde que se tenha alguma prática da sua tonalidade nesta zona da escala. Embora de extrema simplicidade, é este método suficientemente preciso.

Na diferenciação, os melhores resultados, foram obtidos com o ácido picrico em solução no álcool a 95%. Introduzida como diferenciadora após o método de Heidenhain por Masson, foi esta substância preconizada por vários autores para o mesmo fim (Tuan, 1930, Nelson, 1934).

O mecanismo é ainda desconhecido. Aqui a tensioactividade desta substância, não deve ser a causa primordial da diferenciação, por isso que sua propriedade descorante é directamente proporcional á concentração. É certo que em solução aquosa o ácido picrico apresenta uma forte dissociação, a qual lhe confere uma acidez capaz de decompor carbonatos; assim sendo, é provável que esta acidez determine a diferenciação, sendo conhecida a actividade descorante das soluções ácidas. Soluções de ácido chlorhídrico já foram empregadas por alguns autores como Dobell (1914), Cunha e Muniz (1930).

Menos provável é que deste modo se passe a diferenciação com a solução fortemente alcoólica; ali processos outros parecem se affectuar, em virtude da fraca dissociação do ácido picrico em álcool a 95%. A idéa de que neste caso predominam processos de substituição, não seria, pelo menos a primeira vista, desprezível. Esta hypothese é corroborada pelo facto de ser o ácido picrico, como um phenol, capaz de formar lacas com os sais ferricos. Ainda um outro facto que falla em favor de tal hypothese, é o da propriedade descorante de outros phenóis como o resorcinol e o pyrogallol.

O método que apresentamos se effectua do seguinte modo:

- A) Fixação: — Este método já foi applicado após os seguintes fixadores: Sublimado-álcool de Schaudinn, sublimado-álcool segundo a modificação de Wenrich, sublimado — ácido acético, Zenker, Zenker-Helly e picroformol de Bouin. Destes salientou-se o de Bouin, pelos seus efeitos benéficos sobre a coloração.
- B) Após lavagem indicada para o fixador, o material é posto no mordente.

C) Colocar durante 1 hora o material numa solução de alumem de ferro a 0,5 % no alcool a 70 %. Esta solução, que deve ser confeccionada no momento do emprego, prepara-se do seguinte modo: Dissolve-se 0,5 gr. de alume de ferro em 30 cc. de agua distillada, e junta-se, agitando, 70 cc. de alcool absoluto. Por vezes, a solução apresenta no momento em que está sendo preparada, um aspecto opalescente que logo desaparece com a perfeita mistura dos dois liquidos. É inutil salientar a absoluta necessidade da pureza do alume, que deve se apresentar em crystaes grandes e violetas. Esta solução entretanto não se conserva.

D) Corar, durante uma hora na seguinte solução:

Hemateina em solução a 1 % no alcool a 70 % 2 partes

Solução reguladora com pH 7,6 1 parte

Usamos a hemateina fornecida por Merck ou pelo Dr. Hollborn.

A respeito da solução reguladora, já informamos no decorrer do trabalho; deve ser ella preparada no momento do emprego, o que facilmente se leva a cabo, juntando gotta a gotta a solução N/1 de acido chlorhydrico sobre a de phosphato di-sodico contida num tubo de ensaio. A solução de hemateina conserva-se indefinidamente.

Em virtude dos factos relativos á influencia do pH, acima mencionados, tencionavamos preconisar a coloração em duas zonas diferentes da escala de pH, conforme se desejasse uma coloração das estruturas periphericas ou profundas do material. O trabalho com o ph 7,6 nos convenceu da desnecessidade de tal complicação, por isso que esta concentração ionica já nos permite obter uma boa coloração de ambas estruturas. Uma excepção deve ser feita, na coloração das formas cysticas dos protozoarios, que deve ser realisada com $\text{pH} = 7$. De qualquer modo, conhecedor do sentido desta influencia, poderá o tecnico escolher o pH que mais lhe convier.

E) Após a coloração, lavar o preparado na agua da bica, e differenciar numa solução saturada de acido picrico no alcool a 95 %, diluida em 1 ou 2 volumes de alcool a 95 %, de accordo com o material. Usamos a solução diluida na proporção de 1:1, quando trabalhamos com ciliados ou outros organismos de maior talhe. A diluição de 1:2, nós a empregamos nos flagellados, rhizopodes e outros organismos menores. Para os cortes, nos quaes o methodo dá o mesmo resultado, a diluição é de 1:2. Insistimos na pureza

do ácido picrico para obtenção de bons resultados; usamos o ácido picrico « puro » ou puríssimo de Merck. Logo após o contacto com o diferenciador, o preparado começa a desprender corante; para controlar a diferenciação, retira-se o preparado do diferenciador e immerge-se em água da bica, onde elle retoma rapidamente a cor azul-negra. Se a diferenciação desejada ainda não foi attingida, leva-se novamente o preparado ao diferenciador, após se ter inclinado a lamina ou laminula sobre um papel de filtro para livral-a o mais possível da água.

F) Após a diferenciação, lavar cuidadosamente o preparado n'água corrente, para eliminar o ácido picrico; essa lavagem póde ser de alguns minutos apenas, pois o ácido picrico se desprende com relativa facilidade.

G) Deshydratar, clarear no xylol e montar no balsamo do Canadá. Como clarificador, póde tambem ser usado o terpineol, alcool benzylico ou mesmo a essencia de madeira de cedro; nesta porém, os preparados não deverão permanecer por muitos dias, sendo necessario laval-os com xylol. Referimos esses factos, porque o uso destas essencias é extremamente commodo.

O methodo que acabamos de apresentar, supera o methodo original de Heidenhain na rapidez e na pureza de coloração, possuindo a mesma susceptibilidade de applicação. O facto foi comprovado em organismos uni- ou pluricellulares, vegetaes ou animaes. Excepção deve ser feita para os componentes cellulares de natureza lipoide, para os quaes a eficiencia do methodo somente poderá ser restabelecida após numerosas verificações, dada a heterogeneidade do comportamento de taes componentes.

É além do mais um methodo cujo determinismo é sufficientemente bem estabelecido para permittir ao tecnico o conhecimento da causa de qualquer discrepancia nos resultados, e consequentemente, prevenil-as.

BIBLIOGRAPHIA CITADA.

LITERATURE CITED

CUNHA, A. M. & MUNIZ, J.

1930. Do phenomeno de endomixis em ciliados do genero *Balantidium*. Mem. Inst. O. Cruz, **23**.

DOBELL, C.

1914. Cytological studies on three species of *Amoeba* — *A. lacertae*, Harman, *A. glebae* n. sp., *A. fluvialis* n. sp. Arch. f. Protistenk., **34**.

KOFOID, C. A. & SWEZY, O.

1915. Mitosis and multiple fission in trichomonad flagellates. *Proc. Amer. Acad. Arts. and Sciences*, **51**.

LANGERON, M.

1934. *Précis de Microscopie*. 5.^a ed.

NELSON, E. C.

1934. Observations and experiments on conjugation of the *Balantidium* from the chimpanzee. *Am. J. Hyg.*, **20** (1).

TUAM, H. C.

1930. Picric acid as a destaining for iron-haematoxylin. *Stain Technol.*, **5**