

MONTAGEM DE HELMINTHOS E PEQUENOS ARTHROPODOS

Novo methodo, simples e eficiente

POR

P. DE TOLEDO ARTIGAS

Em trabalho recentemente publicado, C. Pereira e Z. Vaz (1) mostraram quantas dificuldades encontram os helminthologos na confecção de preparados permanentes de nematoïdes, montados entre lamina e laminula. Esses dois auctores, depois de fazerem uma revisão dos methodos empregados na technica da toto-montagem dos nemathelminthos, terminam sua publicação, descrevendo um methodo original, com o qual conseguem bellos preparados de nematoïdes, em balsamo do Canada.

Do mesmo modo que áquelles nossos collegas, preocupava-nos desde muito tempo esse serio problema de technica parasitologica, que é a obtenção de preparados permanentes de nematoïdes. De sua solução dependem a conservação definitiva do material, sobretudo typos das especies novas, e a organização das collecções destinadas a fins didacticos.

Na epocha da publicação do trabalho de Pereira e Vaz (dezembro de 1934), tinhamos observações bem adiantadas, relativas a um methodo original de toto-montagem. Tendo ultimado as pesquisas que vinhamos realizando neste assumpto, pareceu-nos util trazer a publico a technica por nós imaginada, que se caracteriza por sua extrema simplicidade e pela segurança de seus resultados.

Technica

Em nossos trabalhos rotineiros de exame de material helminthologico, costumavãmos seguir a technica utilizada por Travassos (2 e 3) que consiste em tratar o nematoïde, fixado no formol-physiologico ou no formol-physiologico-acetico, pelo acido acetico e, em seguida, pelo phenol. Essas substancias permitem uma clarificação tal que o exame microscopico do helmintho é feito

com toda a commodidade e segurança. Posteriormente, por iniciativa pessoal, passámos a usar frequentemente, em vez de phenol, o creosoto de faia. Com esta pequena variação de technica sempre obtivemos optimos resultados, além de encontrarmos commodidade no emprego do reagente, por ser o creosoto menos caustico e não determinar dolorosas queimaduras, frequentes quando se trabalha com phenol durante a manipulação do material, nas tentativas de se collocar em uma boa posição na platina do microscopio o exemplar que se examina.

Do emprego dessas substancias, phenol e creosoto, alliadas ao acido acetico, permittindo uma clarificação perfeita, sem acarretar nenhuma deformação estructural do helmintho, é que nos veiu a lembrança de procurar uma substancia resinosa, que, sendo soluvel no creosoto e no phenol, permitisse a inclusão immediata do material, sem necessidade de uma deshydratação difficil e demorada.

Nesse sentido, realizámos experiencias com a resina de *Pistacia lentiscus* (resina mastique), que facilmente pode ser dissolvida em phenol ou creosoto.

As nossas primeiras tentativas de montagem foram feitas com mastique-phenol, isto é, com liquido obtido pela dissolução da resina no phenol, na proporção de 10 gs. de mastique para 20 cc. de phenol. Os resultados não foram uniformemente satisfactorios, pois com frequencia verificámos o encarquilhamento dos nematoides.

Melhores resultados obtivemos nas experiencias levadas a effeito com o mastique-creosoto, preparado nas condições do phenol-mastique. Conseguimos então bons preparados, usando a seguinte technica e utilizando material fixado em formol-physiologico ou formol-physiologico-acetico:

1. Tratamento do nematoide pelo acido acetico.
2. Tratamento pelo acido acetico e creosoto em partes iguaes.
3. Tratamento pelo creosoto puro.
4. Tratamento pelo creosoto-mastique (creosoto 3 partes, mastique 1 parte).

Encontrámos, nessa occasião, duas grandes difficuldades: a demora da solidificação da resina e o apparecimento de numerosos globulos de natureza colloidal que enfeiavam os preparados. Pareceu-nos, a principio, possivel afastar esses dois inconvenientes pelo aquecimento do preparado na platina de Malassez. Com esta pratica a resina se solidificava em toda a borda da laminula e os globulos colloidaes desapareciam. O desaparecimento destas particulas colloidaes era, porém, temporario, pois com a volta á temperatura ambiente, num periodo mais ou menos longo, frequentemente reaparecia o estado colloidal.

Conseguimos sanar este defeito, fabricando o meio de montagem nas seguintes condições:

Juntam-se a 10 gs. de resina secca, bem pulverizada por trituração em gral, 30 cc. de alcool a 95°. Essa mistura é levada á estufa

de parafina, regulada a 55°C., e ahi permanece 24 horas. Ao fim desse tempo, a resina está perfeitamente dissolvida e o liquido, obtido, claro e transparente, á temperatura da estufa. Com o resfriamento forma-se um precipitado que é facilmente sedimentado por centrifugação. Elimina-se o precipitado por decantação e, si fôr preciso, repete-se a centrifugação.

Nessas condições, obtem-se um mastique alcoolico limpido e transparente. A esse mastique alcoolico junta-se creosoto na mesma quantidade, em volume, de alcool utilizado (30 cc. para 10 gs. de mastique). A mistura é levada á estufa de 55°, onde permanece até a completa evaporação do alcool, com consequente redução do volume do liquido.

Obtem-se, desta maneira, um mastique-creosoto de consistencia xaroposa, isento de particulas colloidaes em suspensão, limpida e transparente.

Com o decorrer das nossas experiencias, chegámos á conclusão de que eram prescindiveis, si bem que não fossem prejudiciaes, os tempos de 2 e 4 do primitivo methodo adoptado. Verificámos que o nematoide, depois de tratado pelo acido acetico e submettido á acção do creosoto, adquire, em virtude da sua impregnação por esta ultima substancia, uma notavel resistencia á deformação por agentes physicos. Mesmo quando submettido ao aquecimento até á ebulição do mastique-creosoto, conserva integralmente suas particularidades morphologicas.

Tivemos occasião de observar que mesmo especies muito frageis, como *Enterobius vermicularis* (L., 1758), *Habronema megastoma* (RUD., 1819) e outras podem ser submettidas, sem inconveniente, á acção successiva do acido acetico, do creosoto e do mastique-creosoto, sem mostrar alteração somatica.

Passámos, á vista desses resultados, a adoptar a seguinte technica de evidente simplicidade:

1. Tratamento pelo acido acetico, num periodo que pode variar de 1 a 25 minutos, conforme o tamanho e a espessura do nematoide.
2. Tratamento pelo creosoto de faia; a impregnação pelo creosoto prolonga-se até a perfeita transparencia do nematoide, não havendo inconveniente em se prolongar a acção do creosoto quanto tempo se desejar.
3. Montagem em mastique-creosoto, entre lamina e laminula.

Em nosso trabalho corrente, utilizamo-nos de pequenas capsulas de Petri ou de godés de porcelana, contendo acido acetico e creosoto. Passamos successivamente pelos diversos recipientes os nematoides a serem montados. A montagem definitiva, isto é, o tempo 3, é feita directamente na lamina, em cuja superficie se collocam algumas gottas de mastique-creosoto em quantidade sufficiente. Si, nessa occasião, o nematoide apresenta alguma retracção, é possivel evitar o defeito, aquecendo cuidadosamente a lamina na chamma do bico

de Bunsen. A seccagem do preparado é feita numa estufa regulada entre 50° e 55°, pois assim os preparados de espessura media apresentam, ao fim de 2-3 dias, nos bordos da lamina, uma perfeita solidificação, permittindo as manipulações indispensaveis para o exame microscopico. Nos preparados muito espessos, á medida que se dá a solidificação do mastique-creosoto e concomitante deseccação de material que se evapora, verifica-se uma diminuição no volume da resina, como que uma retracção; esse facto obriga a addição de mais algumas gottas de mastique-creosoto, operação sem inconveniente.

Para a obtenção de preparados corados temo-nos servido do carmim chlorhydrico ou do carmim acetico de Semichon, preparados segundo as indicações de Langeron (4). Com os dois corantes obtivemos bons resultados. O carmim chlorhydrico tem, porém, um poder maior de penetração e córa os helminthos mais rapidamente. O tempo de coloração antecede os demais tempos da technica de montagem e sua duração varia conforme o tamanho, espessura e permeabilidade dos nematoídes. Nos casos de super-coloração, a differenciação pode ser levada a effeito com agua chlorhydrica a 1% ou alcool chlorhydrico (HCl a 1% em alcool de 70°). Frequentemente submettemos os exemplares a corar á acção previa do acido acetico, que nos parece permeabilizar de algum modo a cuticula do helmintho, facilitando a penetração do corante, do mesmo modo que o creosoto. Os exemplares corados não se descoram pela acção do acido acetico e, depois de clarificados pelo creosoto, apresentam, na montagem definitiva, um aspecto muito elegante e de notavel nitidez.

Com o emprego da technica acima pormenorizada, fizemos preparados de *Enterobius vermicularis* (L., 1758), *Oesophagostomum* (*Proteracrum*) *columbianum* CURTICE, 1890, *Strongylus* (*Delafondia*) *vulgaris* (Looss, 1900), *Aspidodera raillieti* TRAV., 1913, *Heterakis gallinae* (GMELIN, 1790), *Habronema megastoma* (RUD., 1819).

Nas especies pequenas, em geral se observa com toda a nitidez a disposição dos differentes órgãos internos. Nas especies maiores e de organização interna complexa, embora não se possam analysar as minucias morphologicas dos órgãos cavitarios, resaltam sempre as particularidades dos órgãos genitales externos (bolsa copuladora, raios da bolsa, espiculos, gubernaculo) e os da região cephalo-esophageana (cavidade buccal, dentes, franjas buccales, vestibulo, esophago, valvulas esophageanas). As estrias cuticulares e formações da cuticula em geral se conservam de modo integral.

Além de nematoídes, effectuamos com bons resultados a montagem de plathelminthos (Cestoides e trematoídes). Do mesmo modo verificámos que a mon-

tagem de pequenos arthropodos (Siphonapteros, Pediculideos, Estreblideos, etc.) pode ser realizada em condições analogas.

Parece-nos, em vista dos resultados que temos conseguido, que o methodo de montagem pelo mastique-creosoto, embora não seja ainda o ideal e de resultados perfectos, permite a conservação, em um meio solidificavel, de nematoides com a maioria dos caracteres morphologicos geralmente invocados na classificação. A essa qualidade allia-se a da simplicidade do methodo e a da segurança com que se pode submitter á montagem o material em estudo.

RESUMO

Neste trabalho descreve-se um methodo de toto-montagem de nematoides, que tambem pode ser utilizado com plathelminthos e pequenos arthropodos.

O meio de montagem é constituído por um liquido obtido á custa da dissolução da resina mastique (*Pistacia lentiscus*) em creosoto de faia.

O mastique-creosoto prepara-se nas seguintes condições: a 10 gs. de mastique pulverizado juntam-se 30 cc. de alcool a 95°. Deixa-se a mistura na estufa a 55° durante 24 horas. Retira-se em seguida esse mastique alcoolico, que é centrifugado, depois de resfriado. Decanta-se o deposito resultante de centrifugação e, si for preciso, repete-se a operação. Ao mastique alcoolico juntam-se 30 cc. de creosoto e a mistura mastique-alcool-creosoto é levada novamente á estufa a 55° até a evaporação total do alcool. O liquido resultante é de consistencia xaroposa, perfectamente transparente. Solidificando-se, adquire uma coloração que tende para o amarellado.

A technica de montagem, muito simples, resume-se nos seguintes tempos:

1. Tratamento pelo acido acetico. Esta phase pode-se prolongar de 1 a 15 minutos, conforme o tamanho e espessura do nematoide, podendo-se considerar como terminada com a clarificação do nematoide.
2. Tratamento pelo creosoto. No creosoto o nematoide permanece até ficar totalmente impregnado pelo reactivo. O material pode ficar durante horas sem inconveniente neste reactivo.
3. Montagem, entre lamina e laminula, no mastique-creosoto.
4. Solidificação na estufa a 50-55°.

Desejando-se preparados coloridos, deve-se previamente submitter o nematoide á acção do carmin chlorhydrico ou carmin acetico de Semichon (preparados segundo indicações de Langeron). O tempo de coloração varia conforme o tamanho e espessura dos exemplares. A super-coloração é eliminada por meio de differenciação á custa de agua ou alcool chlorhydrico a 1%.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Pereira, C. & Vaz, Z.* — Toto-montagem de nematoides; nova e simples technica para a montagem em balsamo — Arch. Inst. Biol. S. Paulo V: 77-86. 1934.
2. *Travassos, L.* — Contribuição para o conhecimento dos Paramphistomoidea, com uma nota sobre o emprego do fenol em parasitologia — Brasil Medico XXXV(I): 357. 1921.
3. *Travassos, L. & Vogelsang, E.* — Pesquisas helminthologicas realizadas em Hamburgo. X. Contribuição ao conhecimento das especies de *Oesophagostomum* dos primatas — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXVI (3): 251-328. 1932.
4. *Langeron, M.* — Précis de microscopie (5.^a edição, Masson & Cie., Paris, 1934).

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan, recebido em janeiro de 1936. Dado á publicidade em maio de 1937).