

COLORAÇÃO DO NÚCLEO DA *TORULOPSIS UTILIS*

Oswaldo de Arruda BEHMER (1), Antonio Geraldo FREITAS Neto (2) e
Maria Dalva L. SCALABRINI (3)

RESUMO

Os Autores apresentam estudo comparativo entre métodos de coloração para o núcleo de *Torulopsis utilis*, baseados nos métodos tintoriais de Giemsa, verde de metila e fucsina básica. Pelas técnicas modificadas dos métodos de Giemsa e Unna-Pappenheim os núcleos são corados em vermelho e o citoplasma em azul. Estes são os métodos indicados pelos seus resultados mais constantes e preparações que se prestam mais para o estudo do núcleo em microfotografia.

INTRODUÇÃO

O estudo microscópico dos cogumelos têm adquirido ultimamente, importância muito grande, principalmente com referência à sua multiplicação. Portanto, é do maior interesse o conhecimento do seu núcleo. Para tanto, vários métodos foram analisados, visando adaptar os processos clássicos de coloração, à *Torulopsis utilis*.

Diferentes Autores têm dedicado maior atenção ao estudo do *Saccharomyces cerevisiae*, para o qual foram propostas várias técnicas de coloração do seu núcleo. Algumas técnicas foram baseadas em variações do GIEMSA⁹, (GANESAN⁶, GANESAN & SWAMINATHAN⁷, ROBINOW & MARAK¹⁰, LINDEGREEN¹¹); outras nos trabalhos originais de BRACHET³, usando verde de metila-pironina (UNNA-PAPPENHEIM¹², KURNICK¹⁰, FORD⁵); outras na reação de FEULGEN, com emprego do reativo de SCHIFF, DELAMATER⁴ e GO-

MORI⁸ e algumas pela fucsina básica (LINDGREEN¹¹, BEAUVERIE¹, BIANCHI²).

Em nossos estudos procuramos adaptar êsses tipos gerais de coloração à *Torulopsis utilis*.

MÉTODO

1) *Giemsa (Modificado)*

Este método de coloração é o mais indicado, porquanto dá resultados constantes e uniformes e, preparações suficientemente nítidas para serem fotografadas com objetiva de imersão.

A seqüência desse método é a seguinte:

1) Se a cultura fôr em caldo, centrifugase e colhe-se o sedimento com pipeta de Pas-

Trabalho realizado no Grupo de Experimentação da Disciplina de Técnica Cirúrgica Geral da Faculdade de Medicina da U.S.P. (Prof. Dr. Américo Nasser) — Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da U.S.P. — Prof. Eurico da Silva Bastos e Prof. E. J. Zerbiní, São Paulo, Brasil

- (1) Chefe da Secção de Patologia da Disciplina de Técnica Cirúrgica Geral
- (2) Professor Assistente da Faculdade de Medicina da U.S.P. — Chefe do Grupo de Experimentação da Disciplina de Técnica Cirúrgica Geral e do Grupo de Pesquisa da 1.ª Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da U.S.P., Brasil
- (3) Técnica de Laboratório

teur, com a qual prepara-se o esfregaço. Se em placa, o esfregaço é feito diretamente.

2) O esfregaço é sêco em estufa a 50°C por 30 minutos.

3) Fixa-se pela formalina neutra (a 10%) durante 30 minutos.

4) Põe-se em cuba com água de torneira, durante 5 minutos, trocando-se por 3 vezes a água.

5) Põe-se em cuba com água destilada por 5 minutos, trocando-se por 3 vezes a água.

6) Lavagem rápida com HCl 5 N, à temperatura ambiente.

7) Hidrólise em temperatura ambiente com HCl 5 N, durante 20 minutos.

8) Põe-se em água de torneira por 5 minutos, com 3 mudanças de água.

9) Põe-se em água destilada por 5 minutos, com 3 mudanças de água.

10) Põe-se em solução tamponada fosfatada a pH 7,0 por 5 minutos.

11) Cora-se pelo Giemsa (Diluído 0,1 ml em 4 ml de solução tamponada fosfatada a pH 7,0), durante 30 minutos.

12) Escorre-se o excesso de corante e passa-se rapidamente na mistura álcool-éter 1:1.

13) Desidrata-se rapidamente pelo álcool absoluto.

14) Clareia-se em 3 cubas consecutivas de Toluol.

15) Monta-se em Bálsamo do Canadá.

Quando se deseja apenas estudar o núcleo, sem determinação nítida do citoplasma pode-se tratar pela soda (NaOH N/1) durante uma hora, em temperatura ambiente, logo depois de fixada a lâmina (entre os tempos 4 e 5). Esse tratamento elimina toda proteína citoplasmática, tornando o núcleo mais evidente. Com a mesma finalidade pode-se também empregar a pepsina ou papaína, com resultado pouco inferior.

Resultado: O núcleo cora-se em vermelho e o citoplasma em azul.

2) Verde de Metila — Pironina

Vários Autores recomendam os métodos de coloração baseados no verde de metila para corar o DNA e a pironina para corar o RNA e o DNA.

Os métodos mais empregados foram os baseados nos estudos de Brachet e Unna-Pappenheim.

A constituição das soluções corantes variam um pouco na proporção dos diferentes elementos, entretanto, de modo geral, pode-se ter a seguinte constituição:

Verde de metila	0,50 g
Pironina Y	0,05 g
Álcool absoluto	5 ml
Glicerina	10 ml
Fenol (0,5%) qs	100 ml

Kurnick propôs variante mais aprimorada em que os diferentes elementos são corados separadamente. Cora-se com solução de verde de metila (purificada com clorofórmio para retirar cristais de violeta) 0.2% em solução tamponada de acetato pH 4.2. Lava-se com álcool butílico e cora-se com solução saturada de pironina em acetona. Teoricamente, essa seria a coloração ideal. Nós só a conseguimos, quando fixamos o material com solução saturada de bicloreto de mercúrio durante 30 minutos, seguida por lavagem em água corrente por 30 minutos. Os preparados mostram o núcleo corado em verde claro brilhante, em fundo vermelho. Estas lâminas não dão boas microfotografias, nem se prestam para estudo cuidadoso do núcleo.

Usamos modificação do método de Ford, com ótimos resultados, embora estes não tenham sido constantes.

O método consiste em fixação em bicloreto de mercúrio e lavagem em água corrente. Coloração durando 20 minutos em:

Cristal de violeta	0,060 g
Pironina Y	0,200 g
Álcool (95%)	20 ml
Glicerina	20 ml
Fenol	2 ml
Água destilada neutra qs ..	100 ml

A lâmina é então descorada em álcool-ácido acético 1:3 ou em solução fraca de ácido clorídrico. Segue-se desidratação rápida em álcool absoluto, clareamento em toluol e montagem em bálsamo do Canadá.

Os núcleos são corados do mesmo modo que no método de Giemsa.

3) Reação de Feulgen

Há várias técnicas propostas para a coloração do núcleo pelo reativo de Schiff ou com a leucofucsina, precedidas pela hidrólise em ácido clorídrico.

Em tôdas as variantes por nós experimentadas, sempre o núcleo ficou corado em

vermelho claro, em fundo variando do azul ao verde, conforme o contra-corante. Não deu nitidez suficiente para microfotografia ou estudo detalhado do núcleo.

4) Fucsina Básica

Várias técnicas de coloração foram propostas empregando a fucsina básica fenica-

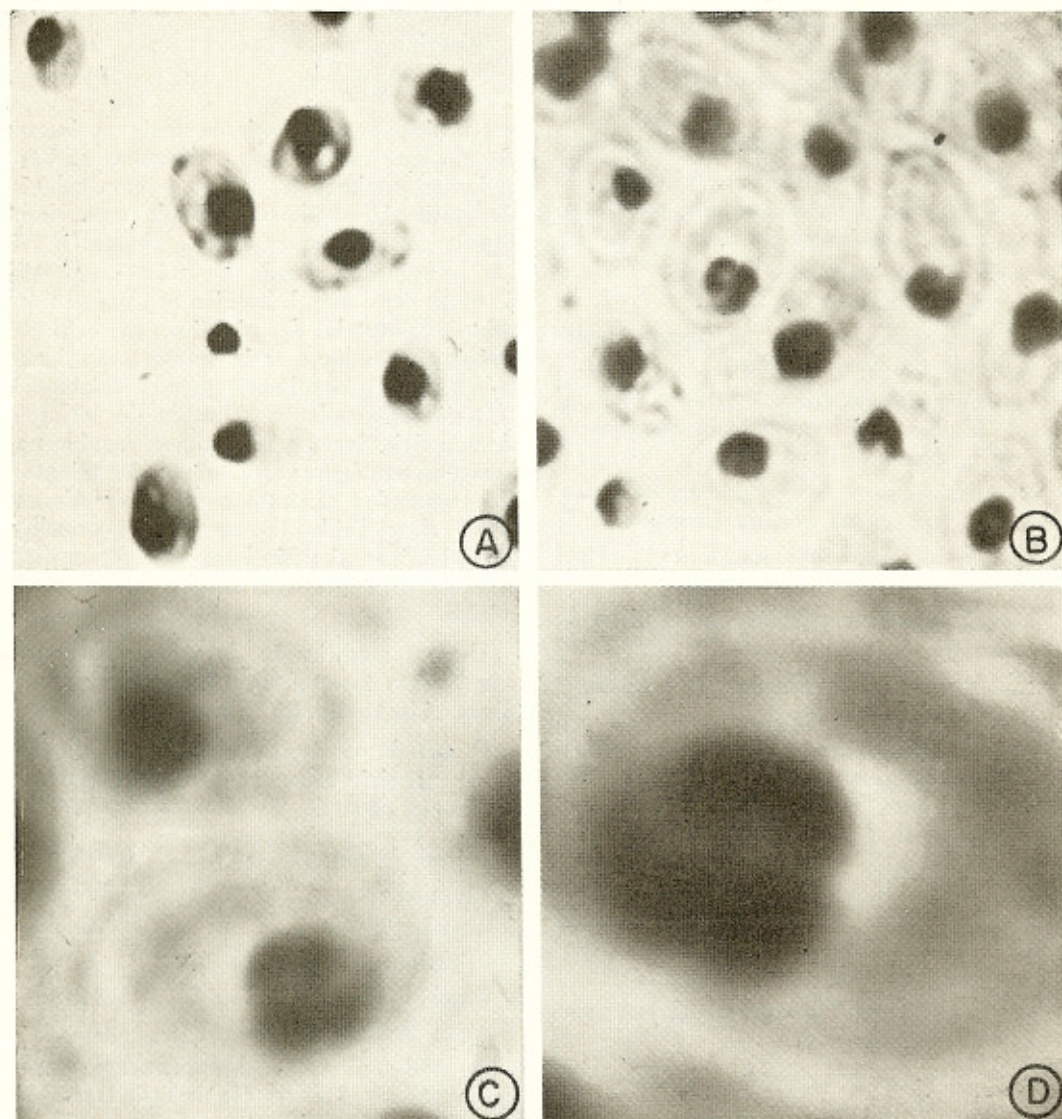


Fig. 1 — A) *Torulopsis utilis* corados pelo Giemsa modificado, mostrando o núcleo bem corado. 8.000 X (sem tratamento pela NaOH). B) *Torulopsis utilis* corados pelo Giemsa modificado, mostrando o núcleo bem corado. 14.000 X (tratados pela NaOH). C) *Torulopsis utilis* corados pelo Giemsa modificado, mostrando o núcleo bem corado. 28.000 X (tratados pela NaOH). D) *Torulopsis utilis* corados pelo Giemsa modificado, mostrando o núcleo bem corado. 60.000 X (tratados pela NaOH)

da para corar o núcleo. Estes preparados, posteriormente, são descorados por solução de ácido acético, nítrico ou sulfúrico na concentração 1:3. Em seguida, os preparados são contra-corados com verde de metila ou azul de metileno.

Experimentamos várias destas técnicas e não conseguimos preparações suficientemente boas para microfotografias ou exame apurado do núcleo.

RESULTADOS

Os melhores resultados, sobretudo mais constantes, foram obtidos com a modificação do método de Giemsa. Entretanto, com a variante de Ford modificada, obtivemos preparações suficientemente nítidas, que permitiram microfotografias com grande aumento (imersão — 1.000x). O núcleo cora-se em vermelho e o citoplasma, em azul, mostrando certa diferenciação intranuclear.

SUMMARY

Staining methods for the nucleus of Torulopsis utilis

The Authors present a comparative study of the staining methods of the nucleus in *Torulopsis utilis* by the techniques of Giemsa, Methyl-Green and Basic Fuchsin.

The modified method of Giemsa and Unna-Pappenheim, stains the nucleus in red and the cytoplasm in blue. These methods give constant results and provide good photomicrographies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAUVERIE, J. — Quelques propriétés des ascospores de levures. Technique pour leur différenciation. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 80: 5, 1917.
2. BIANCHI, D. E. — Differential staining of yeast for purified cell, walls, broken cells, and whole cells. *Stain. Technol.* 40: 79-82, 1965.
3. BRACHET, J. — *Arch. Biol.* (Paris) 53:204, 1942. Apud por PEARSE, A. G. E. — In *Histochemistry Theoretical and Applied*. London, J. & A. Churchill, págs. 114-129, 1953.
4. DELAMATER, E. D. — The nuclear cytology of the diplophase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 60:321-332, 1950.
5. FORD, A. — *Text Book of Bacteriology*, 1927.
6. GANESAN, A. T. — The nucleus of Yeast Cell. A study of fine day old fermenting cultures. *Cytologia* 21:124-134, 1956.
7. GANESAN, A. T. & SWAMINATHAN, M. S. — Staining the nucleus in Yeasts. *Stain Technol.* 33:115-121, 1958.
8. GOMORI, G. — The periodic-acid Schiff stain. *Amer. J. Clin. Path.* 22:277-281, 1952.
9. GIEMSA, G. — Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenazur — Methylenblau-Eosin — Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky — Nochts chen Chromatinfärbung. *Zentralbl. f. Bakt.* 37: 308-311, 1904.
10. KURNICK, N. B. — Histological staining with Methyl Grenn-Pyronin. *Stain Technol.* 27:233-242, 1952-1953.
11. LINDEGREEN, C. C. — *The cell its Genetic and Cytology*. Sant Louis, Educational Publisher, 1949.
12. PAPPENHEIM, A. — *Virchows Arch.* 157: 19, 1899. Apud por PEARSE, A. G. E. — In *Histochemistry Theoretical and Applied*. London, J. & A. Churchill, págs. 113-130, 1953.
13. PEARSE, A. G. — *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London, J. & A. Churchill, 1953.
14. ROBINOW, C. F. — Mitosis in the Yeast *Lipomyces Lipofer*. *J. Biophys. Biochem. Cytologia* 9:879-892, 1961.
15. ROBINOW, C. F. & MARAK, J. — A fiber apparatus in the nucleus on the yeast cells. *J. Cell. Biol.* 29:129-151, 1966.

Recebido para publicação em 18/4/1968.