

**MEMORIAS**  
**DO**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

---

Tomo XXVIII

Julho—1934

Fasciculo 3

---

**Sobre a distribuição da nucleína no  
virus tuberculoso (\*)**

por

**A. FONTES**

(Professor e Chefe de Serviço no Instituto Oswaldo Cruz)

(Com a estampa LIX)

---

**Técnica:**

Reagentes: Alcool a 96°.

Benzol.

A — Solução normal de HCl.

B — Líquido de Feulgen (ácido-fucsina sulfuroso).

**Preparação:**

Dissolver 1 gr. de fucsina básica em 200 cc. de água fervente. Quando a temperatura baixar a 50.° C. filtrar em papel. Juntar ao filtrado 20 cc. da solução normal de HCl.

Quando a temperatura do filtrado baixar mais ou menos a 25.° C. juntar 1 gr. de bisulfito de sódio anidro (pro-analise). Deixar em frasco fechado, ao menos 24 horas, em lugar escuro, á temperatura ambiente.

---

(\*) Recebido para publicação a 10 de Novembro de 1933.

C — Solução de  $\text{SO}_2$ . (Convem ser recentemente preparada).

A 200 cc. de agua juntar 10 cc. de uma solução de bisulfito de sódio a 10 % e adicionar 10 cc. de solução normal de HCl.

**Procedimento:**

Pequenos fragmentos de cultura em véo em meio de Sauton, de bacillo da tuberculose do tipo humano, com 45 dias de idade, foram depositados cuidadosamente em laminas e esfregados brandamente com o fim de obter o espalhamento mais perfeito possivel. As laminas foram imediatamente imersas em alcool a 96°, onde permaneceram durante 48 horas, para fixação do preparado.

Após êsse prazo foram imersas em benzol onde permaneceram durante 3 a 4 dias.

Procedeu-se, depois, á hidrólise das purinas imergindo as preparações durante 5 minutos em solução normal de HCl, aquecida á temperatura de 60° C. e em seguida á reação nucleal imergindo as preparações no liquido de Feulgen (B) durante 1 hora.

Os preparados depois foram passados sucessivamente em 3 « becherglas » cheias de solução de  $\text{SO}_2$  e posteriormente lavados durante 10 minutos em agua corrente.

Preparações identicas, feitas ao mesmo tempo, foram retiradas do benzol e submetidas á coloração pela solução de Giemsa, durante 24 horas, empregada na dóse de 1 gota e meia por cc. de agua.

\*\*

A observação microscopica de um fragmento de cultura de tuberculose em péle, córada pelo methodo de Ziehl-Fontes, mostra a electividade diversa de tres substancias constituintes da colonia, que traduz a diferença da natureza quimica dessas substancias.

O preparado se mostra com um fundo córado em azul palido, constituido por uma substancia com aspéto alveolar, sôbre a qual se dispõem bastonetes, córados em vermelho rubí, em cujo corpo se vêm granulações córadas em violeta escuro. Assim observámos a existencia de uma substancia cianófila sem estrutura bacteriana, que serve aparentemente de sustentação ou de material colageno, unitivo, aos bastonetes acido-resistentes córados em vermelho rubí, fucsinófilos, portanto, em cujo corpo as granulações gramófilas são evidenciadas.

Por meus estudos iniciais demonstrei que as granulações bacillares gramófilas deveriam ser consideradas como centros de reprodução bacilar e que eram elas o elemento vivo infectante na tuberculose.

Atribuí-lhes então a constituição química de uma para-nucleoalbumina que procurei identificar á mesma substancia que Auclair e Paris denominaram bacilo-caseína.

Meus estudos, por essa ocasião, haviam-me levado á conclusão da filtrabilidade do virus tuberculoso. Este fenomeno foi interpretado como decorrente da passagem da fórmula granular através as vélas porósas. Posteriormente pude, por observações feitas em bacterias diversas, principalmente em bacterias do grupo coli-disenterico, estabelecer a existencia de uma fase no ciclo de desenvolvimento da vida das bacterias, em que a materia viva se resolve em particulas tão pequenas e tão dispersas que escapam á observação com os nossos atuais aparelhos de investigação microscopica.

No que concerne á tuberculose essa verificação foi confirmada objetivamente por Morton Kahn e por Broeck e a extensa bibliografia sôbre o ultra-virus tuberculoso já existente, baseia suficientemente a veracidade do fenomeno. Seria, entretanto, interessante aduzir alguma prova química, capaz de, ainda que de modo indireto, mostrar a possibilidade da existencia da substancia nuclear dispersa na colonia do virus tuberculoso. Até certo ponto esta prova corroboraria a hipótese de uma substancia ativa difusa com capacidade regenerativa e em estado coloidal, ainda não organizada sob a fórmula bacteriana, ou em outras palavras, existindo em estado de finissima poeira micelar.

Tal reação micro-química demonstraria a natureza química do ultra-virus.

A química da substancia nuclear é complexa. Na constituição do nucleo entram diversas substancias das quais a mais importante e a mais característica é denominada cromatina, em virtude da propriedade que ela apresenta de se deixar tingir pelos corantes basicos.

Esta propriedade pertence tambem ás nucleinas tomadas isoladamente.

A cromatina seria, pois, a expressão histologica da nucleína, attribuindo as reações de coloração aos ácidos nucleicos que a constituem.

Estas reações de coloração não são, entretanto, rigorosamente especificas, e só uma reação micro-química na verdadeira acepção do termo poderia estabelecer a exata qualidade da substancia cromatica.

Este objetivo foi conseguido com a *Reação nucleal de Feulgen*.

Basea-se esta reação na hidrólise dos ácidos nucleicos e na obtenção da reação de Schiff, que traduz a existencia de grupos de aldeídos verdadeiros, pela síntese de um corante quando em combinação com o ácido fucsina-sulfuroso.

Assim quando um preparado microscopico contendo nucleos com

acido timo-nucleico é imerso em acido fucsina-sulfuroso, o preparado fica incolôr. Si, porém, êste preparado fôr préviamente sujeito a uma hidrólise muito branda, os corpos de purina serão desdobrados do conjunto do acido timo-nucleico, e os grupos de reação semelhantes ao aldeído são postos em liberdade, mas sendo uma parte integrante do nucleo do acido-nucleico, ficam com êste *in situ* e ligam-se, si o preparado fôr imerso em acido fucsina-sulfuroso, com o reativo formando um corante violeta.

Dêsse modo se produz uma sintese do corante nos pontos em que está o acido nucleico, expressão quimica fundamental da nucleina.

Si se compara, entretanto, a reação microquimica nucleal, com uma coloração nuclear feita por corantes basicos, nota-se grande semelhança nos quadros óticos. A razão consiste em que na coloração pelos corantes basicos o acido nucleico é, provavelmente, aquele que retém o corante, e na coloração nucleal de Feulgen os acidos nucleicos hidrolisados são certamente responsaveis, á custa dos grupos de aldeídos respectivos, pela sintese do corante que se prende á mesma molecula organica (Feulgen).

Assim, em um preparado microscopico, a imagem fornecida pela reação nucleal determinará exatamente os pontos em que a nucleina existiu, tendo sido neles fixada; por outras palavras, *a reação positiva nesses preparados dará a imagem topografica da localização da nucleina*. Os preparados que obtive mostram por seu estudo comparado, sujeitos uns á reação nucleal e outros á coloração pelo corante de Giemsa a exata correspondencia das imagens coradas.

Nos preparados corados pelo Giemsa a substancia cianófila de aspeto alveolar se apresenta em determinados pontos corada em tom violaceo, com matizes vermelho-tijôlo mais acentuados, indicando um provavel mistura da substancia cianófila com a cromatina em estado difuso, traduzida essa mistura pela coloração violeta vermelha, proveniente da superposição dos corantes azul-eosina. Granulações já perfeitamente esboçadas, outras completamente organizadas, livres ou em bastonetes diferenciados, se apresentam coradas em vermelho tijôlo.

Partes do preparado mostram a organização de fórmias bacilares delgadas, coradas em violeta, em cujo interior se observam pequenissimos granulos mais escuros. Granulações mais desenvolvidas e ainda em vermelho mais acentuado mostram-se como séde de um processo de divisão, interpretado assim, pelo aspeto de diplococos que apresentam.

Nos preparados sujeitos á reação de Feulgen, a coloração violeta coincide com a localização da substancia cianófila polvilhada de finissima poeira, mais reconhecivel nos pontos espessos do preparado, onde

os pequenos granulos vistos traduzem o *reliquat* das granulações bacilares, representado pelo acido nucleico, nucleo da substancia cromatica que as compõe.

Em um preparado mal diferenciado foram vistas imagens muito interessantes. Os bacilos corados em violeta mostravam em seu interior granulações coradas em vermelho. As imagens eram identicas ás obtidas pelo corante de Giemsa, apesar de se tratar de lamina sujeita á reação nucleal.

A explicação do fáto consiste em que não tendo sido completa a diferenciação pelo acido sulfuroso, têrmo final da reação de Feulgen, houve regeneração do corante basico (fucsina) nos pontos em que a cromatina (no caso nucleína) era mais condensada. Prova-se assim, por um contraste mais nitido, que a nucleína existe *em todo corpo do bastonete*, em estado difuso.

Podemos concluir que o virus tuberculoso, em cultura, é constituído por substancia fundamental onde a nucleína existe em estado difuso, organizando-se no seio dessa substancia as fórmias visiveis granulares que evoluem para as fórmias em bastonetes ou bacilares.

Pode-se crêr que o ultra-virus tuberculoso tenha sua expressão quimica na nucleína que em estado difuso se mescla á substancia fundamental e que em estado micelar, em particular solução coloidal, conserve suas propriedades regenerativas.

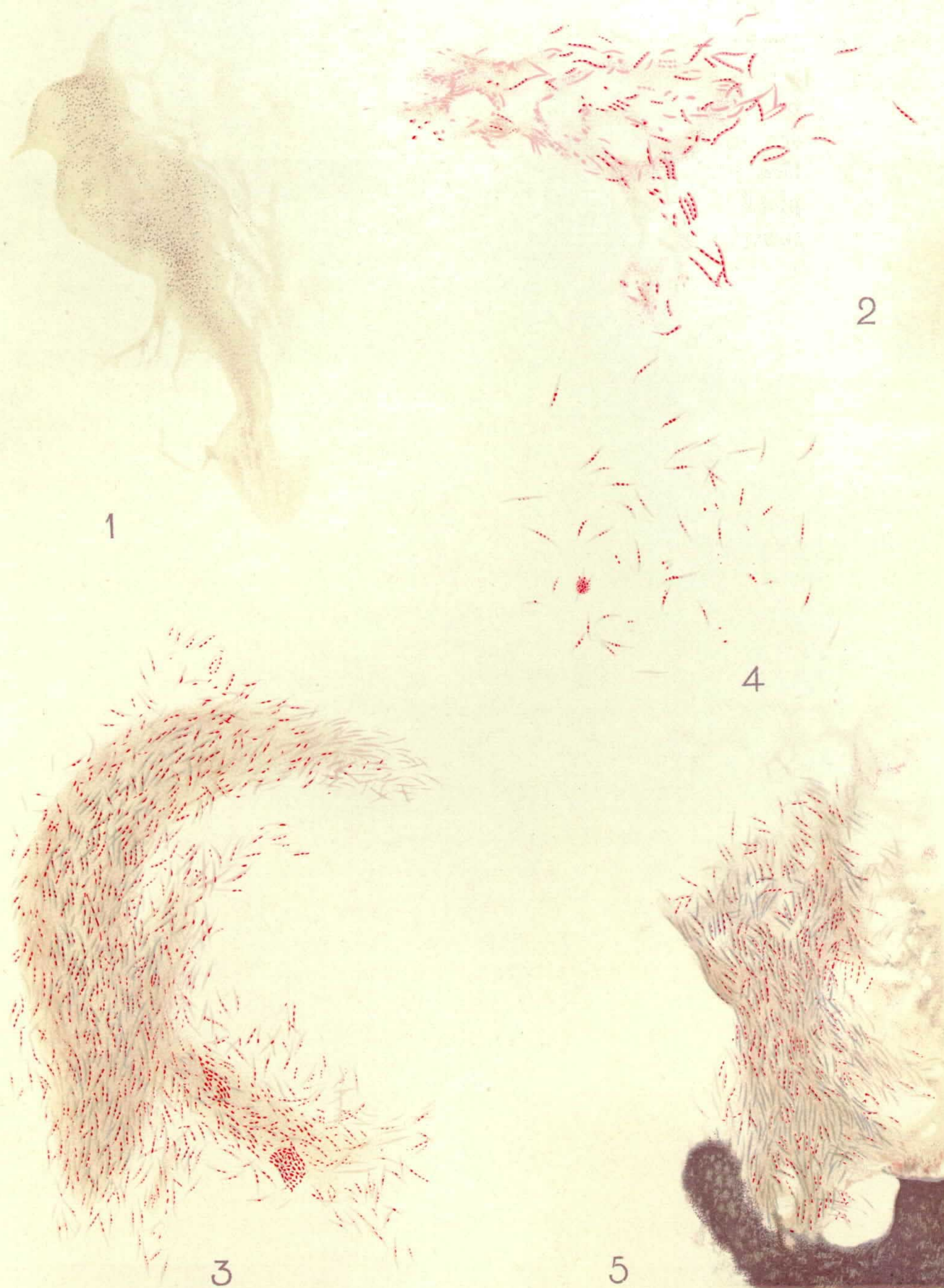
#### EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA LIX

Fig. 1 — Imagem obtida em uma preparação de um fragmento de cultura em véo de tuberculose do tipo humano, com a idade de 45 dias submetida á reação nucleal. Observa-se finissima poeira corada (Feulgen positiva) distribuida por toda a massa do preparado, inclusive na substancia unitiva, alveolar.

Fig. 2 — Imagem obtida em um preparado gêmeo do n.º 1, corado pelo metodo de Giemsa. Observa-se a distribuição da cromatina em notavel correspondencia com a reação nucleal obtida no preparado n.º 1. A cromatina mostra-se neste preparado intimamente mesclada á substancia cianófila alveolar.

Figs. 3 e 5 — Fragmentos de véos corados pelo corante de Giemsa nos quais os bacilos se acham já organizados e a cromatina neles distribuida sob a fórmula de granulos. O tom violaceo dos corpos dos bacilos indica a superposição dos corantes azul e vermelho da solução de Giemsa, o que concorda com a noção de intima mistura da substancia cromatica (cromatina) com a substancia cianófila (primordialmente unitiva).

Fig. 4 — Preparação submetida á coloração nucleal (Fneulgen) em que a diferenciação ulterior pela solução  $\text{SO}_2$  foi incompleta, permitindo a regeneração da fucsina nos pontos em que a cromatina era mais condensada (granulações bacilares). Nos pontos em que a cromatina era menos densa a reação foi positiva (corpos bacilares), indicando por consequencia que a substancia nucleinica existe em todo o corpo do bastonete.



A. Fontes: Sobre a distribuição da nucleína no vírus tuberculoso.  
Sur la distribution de la nucleïne dans le virus tuberculeux