

M E M Ó R I A S
D O
I N S T I T U T O O S W A L D O C R U Z

Tomo 55

Fascículo 2

Dezembro de 1957

**Microscopia Eletrônica de Granulações em
Proteus vulgaris tratado com Cloreto de
Trifeniltetrazólio¹**

Milton Thiago de Mello, Niber da Paz M. Silva e Hans Muth

(Com 34 figuras no texto)

Vários autores têm procurado demonstrar a presença, no corpo bacteriano, de zonas de atividade enzimática óxido-redutora, as quais corresponderiam às mitocôndrias das células dos organismos superiores.

As granulações individualizadas nas microbactérias, conhecidas desde KOCH (3), que as chamou de “esporos”, apresentaram, segundo os trabalhos de MUDD & COLS. (9) e outros pesquisadores, características morfológicas, citoquímicas e tintoriais semelhantes às das mitocôndrias, o que os levou a considerá-las como tal. Observações feitas em germes de diversos gêneros bacterianos, como *Escherichia*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pneumococcus*, *Corynebacterium* (2, 10, 11) têm confirmado essa hipótese. SOROURI & MUDD (12) estudaram bactérias do gênero *Proteus* e reconheceram, dentro do mesmo critério experimental, que as granulações citoplasmáticas possuíam as propriedades essenciais das mitocôndrias, quando submetidas a tratamento com reagente de Nadi, verde Janus B e sais de tetrazólio. Provaram, também, por meio de colorações específicas, o aparecimento simultâneo de material nuclear.

O assunto foi bem revisto por MUDD, em 1953 e 1954 (7, 8). Contudo, interpretações diferentes podem surgir, quanto a serem ou não essas granulações mitocôndrias, conforme assinalam WIDRA (14) e ALEXANDER (1).

O uso dos sais de terazólio tem permitido a diversos autores, além dos citados nos trabalhos acima referidos, evidenciar pontos de intensa

¹ Trabalho da Secção de Bacteriologia. Recebido para publicação em 7-1-57.

redução à formazana, em muitas outras bactérias e cogumelos, conforme assinalaram MELLO & SILVA (6) ao descreverem suas observações com amostras do gênero *Brucella*.

No presente trabalho, procuramos focalizar, através da microscopia eletrônica, aspectos morfológicos de *Proteus vulgaris*, tratado com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). É sabido que este composto, quando reduzido por células vivas apresenta-se depositado intracelularmente em zonas de atividade desidrogenásica, transformado em formazana insolúvel e corada. Facilmente evidenciadas ao microscópio ótico, tais zonas apresentaram, ao microscópio eletrônico, peculiaridades interessantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos amostra de *P. vulgaris* (coleção da Secção de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz), cultivada em caldo simples ou em água peptonada. Depois de 4 horas de incubação a 37°C, a cultura foi distribuída em vários tubos e a cada um juntada solução aquosa, estéril, a 1 %, de cloreto de trifeniltetrazólio ("Synthetical Laboratories", Chicago, U.S.A.), de modo a dar a concentração final de 0,1 %. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C, acompanhados de tubos-testemunhas contendo a cultura, sem TTC.

Em parte das provas, após o contacto de 30 minutos com o TTC, eram feitas centrifugações, lavagens e preparações, sem fixar. Noutras, a redução em formazana corada, pelos germes, observada macroscopicamente nos tubos, foi estabilizada, com intervalos de 5 minutos, por meio de duas gotas de formol, seguindo-se rápido abaixamento da temperatura por imersão dos tubos em gelo partido. Após 24 horas de conservação em geladeira, foram centrifugadas as suspensões, desprezados os sobrenadantes e lavados os sedimentos de cada uma, duas vezes, com água destilada estéril. Posteriormente, em alguns tubos, fêz-se a extração da formazana do interior das células bacterianas, por meio de acetona, seguindo-se nova centrifugação e lavagem em água destilada. O material era conservado em refrigerador, dum dia para outro, até serem feitas as preparações para a microscopia eletrônica, as quais consistiram na montagem do material em membrana de paralódio e dessecamento por meio de calor, segundo a técnica usual. Empregou-se o microscópio eletrônico RCA tipo EMU-2C, pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz. Sombreamento por meio de cromo, sob ângulo de 10°.

Prèviamente as preparações foram observadas com auxílio do microscópio ótico (contraste de fase) evidenciando-se zonas coradas dentro dos corpos bacilares, semelhantes às escritas por SOROURI & MUDD (12).

RESULTADOS

Pela observação ao microscópio eletrônico verificamos, além da permanência dos cílios em todos os preparados, apesar das diversas

manifestações sofridas pelos germes (tratamento com TTC, formol e acetona, centrifugações, lavagens, etc.), o seguinte:

1.º) TESTEMUNHAS

a) *Germes não fixados com formol.* Examinados com sombreamento, viam-se corpos bacilares isolados e em pequenas cadeias, bem definidos; retração da massa citoplasmática deixando perceber, em alguns pontos, a parede celular e a membrana citoplasmática; aspecto heterogêneo de conteúdo celular e presença de zonas claras, provavelmente vacúolos, com localização central e periférica (Figs. 1 a 3). Sem o sombreamento, os vacúolos eram mais nítidos (Figs. 4 e 5). Condensações do citoplasma freqüentes e presença de pontos mais escuros, às vezes salientes, com distribuição polar, subpolar e periférica (Figs. 1 e 2) mas sem deformarem muito o contorno celular.

b) *Germes fixados com formol.* Por meio do sombreamento, viam-se os corpos bacilares bem definidos e em curtas cadeias (Fig. 6). Não se individualizavam a parede celular e a membrana citoplasmática, talvez por falta e retração do citoplasma. Este apresentava aspecto mais homogêneo e opaco deixando entrever zonas ainda mais densas, que se refletiam na linha sinuosa formada pela "sombra"; essas granulações, porém, não deformavam muito o contorno da célula.

2.º) PROVAS

a) *Germes tratados com TTC, durante 5 minutos e fixados com formol.* Dentro do citoplasma tenso e homogêneo, notavam-se granulações mais escuras (Fig. 7), que se destacavam na sombra, semelhantes às das testemunhas (Fig. 6). Se os germes, após essa exposição de 5 minutos ao TTC eram lavados com acetona, o conteúdo citoplasmático perdia a homogeneidade surgindo pontos claros intercalados com zonas escuras (Fig. 8). Observou-se, também, que o corpo bacilar conservava, ainda, o seu aspecto geral semelhante ao da testemunha (Fig. 6).

b) *Germes tratados com TTC, durante 10 minutos e fixados com formol.* Aumentando o tempo de contacto das bactérias com o TTC, surgiram alterações morfológicas. Verificou-se, pelo sombreamento, que muitas células perderam a uniformidade do contorno e o conteúdo celular apresentava-se desorganizado (Fig. 9). Sem o sombreamento, percebiam-se zonas de condensação, intercaladas com espaços que lembravam vacúolos, porém maiores e mais nítidos, situados, em geral, periféricamente (Fig. 10).

c) *Germes tratados com TTC, durante 20 minutos e fixados com formol.* As modificações no corpo bacilar acentuaram-se, aparecendo grânulos grosseiros, ressaltados pelo sombreamento, entremeados de citoplasma irregular. A parede celular perdeu sua uniformidade (Figs.