

## COLORAÇÃO DE MAXIMOW APLICADA AOS CORPÚSCULOS DE NEGRI <sup>(a)</sup>

### THE MAXIMOW'S STAIN FOR NEGRI BODIES

ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI <sup>(b)</sup>

MARGARIDA FRANZOSI <sup>(b)</sup>

NILZA BAPTISTA <sup>(b)</sup>

#### SUMMARY

Paraffin-embedded sections of Ammon's horn from the brain of men and animals infected with rabies virus or from inoculated animals were stained by Maximow's procedure for bone marrow, slightly modified. Fixation was made either by Carnoy method or with sublimate-alcohol. Slides were stained either by Harris or Erlich hematoxylin (the latter with better results), and then with Maximow's stain. The use of CO<sub>2</sub>-free solution prevents precipitation, permitting differentiation in 95% alcohol. Negri bodies, even the smaller ones, appeared neatly stained and with sharply defined structure.

#### INTRODUÇÃO

Em virtude de os corpúsculos de Negri serem corados pelos compostos azur-eosina e, conseqüentemente, poder-se esperar que fôsem êles igualmente corados pela solução utilizada por MAXIMOW<sup>1</sup>, na técnica que leva seu nome, para medula óssea, foi experimentada a técnica de MAXIMOW, adaptada por BLOCK<sup>2</sup> e, posteriormente, por HUMANSON<sup>3</sup>, para sua coloração.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cornos de Ammon retirados de animais infectados pelo vírus rábico de rua e de animais inoculados com material positivo de vírus rábico humano.

#### Reagentes

##### 1. *Fixadores*

a) *Álcool-sublimado* — mistura de solução aquosa saturada a quente de bicloreto de mercúrio e álcool absoluto (2:1, v/v).

ou

b) *Fixador de Carnoy* — ácido acético glacial, álcool absoluto e clo-rofórmio (10:60:30, v/v).

##### 2. *Corantes*

a) *Hematoxilina de Harris ou de Erlich*, ambas de fórmulas conhecidas, não necessitando de corantes de marcas especiais para sua preparação.

b) *Corante de Maximow*, preparado como segue:

(a) Trabalho realizado na Secção de Anatomia Patológica da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

*Solução A* — 0,2 g de eosina Y em 100 cm<sup>3</sup> de água destilada desmineralizada e fervida durante 30 minutos.

*Solução B* — 0,1 g de azur II\* em 100 cm<sup>3</sup> de água destilada, desmineralizada e fervida durante 30 minutos. Em ambas as soluções foi passada corrente de nitrogênio, durante 10 minutos.

*Solução corante* — 15 cm<sup>3</sup> da solução A adicionada a 85 cm<sup>3</sup> de água destilada, desmineralizada e fervida durante 30 minutos, juntando-se, sob agitação, 10 cm<sup>3</sup> de solução B. Não deve ser filtrada.

c) *Álcool-ácido* — ácido clorídrico a 0,5% em álcool etílico a 70%.

d) *Xilol-fenicado* — ácido fênico (ácido carbônico) dissolvido em banho-maria e xilol (1:3, v/v).

### Técnica

1) Desparafinizar e hidratar as preparações da maneira habitual.

2) Se o fixador empregado foi álcool-sublimado, mergulhar as preparações em lugol, durante 5 minutos, lavá-las em água corrente e mergulhá-las em hipossulfito de sódio a 2%, até clareamento. Empregando-se o fixador de Carnoy, dispensa-se este item.

3) Lavar em água corrente durante 5 minutos.

4) Corar pela hematoxilina de Harris de 1/2 a 1 minuto, ou de Erlich, durante 4 minutos.

5) Lavar em água corrente durante 5 minutos.

6) Diferenciar em álcool ácido (4 mergulhos para a hematoxilina de Harris, 2 mergulhos para a de Erlich).

7) Lavar em água corrente, durante 5 minutos.

8) Colocar em água destilada *desmineralizada e previamente fervida* durante 15 minutos.

9) Deixar na solução corante de Maximow, de 6 a 24 horas.

10) Despejar álcool a 95% sobre a lâmina para retirar o excesso do corante e colocar a lâmina em um frasco de Borrel com álcool a 95% até que a preparação se torne rósea.

11) Desidratar e clarear: duas mudas de álcool absoluto, xilol fenicado durante 3 minutos e lavagem em xilol.

12) Montar as lâminas em bálsamo do Canadá diluído em toluol.

### RESULTADOS

Os núcleos e as membranas citoplasmáticas das células nervosas e os núcleos da glia apresentaram-se corados de azul intenso; o citoplasma, em cinza bem claro. A substância branca do tecido nervoso corou-se de tom rosa claro e as hemácias, de vermelho. Os corpúsculos de Negri apareceram geralmente corados de vermelho vivo, apresentando no seu interior vários pontos basófilos. Em certos casos, verificou-se o aparecimento de diferentes tonalidades de vermelho na coloração dos corpúsculos de Negri, fato esse que se constata igualmente utilizando outros métodos, o que já foi referido por ANDRAL & GENTILE<sup>4</sup>. Pelo emprego da técnica ora apresentada, mesmo pequenos corpúsculos aparecem bem evidenciados, por se destacarem no citoplasma corado de cinza claro.

### DISCUSSÃO

Entre os fixadores usados, verificamos que o que dá melhores resultados é o de Carnoy, pois não somente facilita o trabalho, dispensando o uso de lugol e, portanto, de hipossulfito de sódio, como também pelo fato de as células não se apresentarem retraídas.

Substituímos a hematoxilina de Harris pela de Erlich por determinar melhor coloração das células e preparações isentas de precipitados.

As modificações feitas na preparação do corante de Maximow foram baseadas em ROMEIS<sup>5</sup>, que usa água destilada e fervida durante 15 minutos para a mis-

(\*) Foi empregado azur II (Grübler).

tura final do corante de Maximow, e em HUMANSON<sup>3</sup> que recomenda que as soluções sejam recentes.

Pelas medidas acima, complementadas pela passagem de nitrogênio nas soluções, removeu-se o gás carbônico dissolvido, que determinava o precipitado que aparece quando da mistura final dos componentes do corante.

Recomendamos o uso de xilol fenicado após desidratação, porque favorece a completa desidratação da lâmina. O bálsamo do Canadá, dissolvido em toluol, determina a secagem mais rápida da preparação.

### CONCLUSÕES

A técnica de coloração de Maximow pode ser utilizada para evidenciação dos corpúsculos de Negri.

É obtido melhor resultado com as modificações sugeridas.

Por outro lado, a técnica em questão permite também o uso dos dois fixadores experimentados — Carnoy e álcool - sublimado — o que facilita o trabalho.

### RESUMO

Cortes histológicos de corno de Ammon, procedentes de pacientes infectados por raiva, de animais portadores de vírus rábico de rua ou de animais inoculados com material positivo para raiva foram corados pelo método de Maximow, ligeiramente modificado.

Os cornos de Ammon foram fixados em álcool-sublimado ou em fixador de Carnoy e as lâminas coradas por hematoxilina de Harris ou, preferivelmente, por hematoxilina de Erlich e, em seguida, pelo corante de Maximow.

Usando-se soluções isentas de CO<sub>2</sub>, não ocorre precipitado algum na preparação da mistura final, conseguindo-se

assim uma mais rápida diferenciação em álcool a 95%.

Os corpúsculos de Negri, mesmo aqueles de pequeno tamanho, aparecem bem corados e sua estrutura bem evidenciada.

**Agradecimentos** — Agradecemos ao Dr. Evandro Pimenta de Campos, diretor da Diretoria de Patologia, ao Dr. Antônio James Brandi, chefe da Secção de Anatomia Patológica, à Dra. Yolanda Tavares, chefe do Laboratório de Bioquímica, às Dras. Adela Roth e Irena Malachowska, ambas do Laboratório de Vírus Dermatológicos, à Dra. Clélia Helena de Oliveira Martinez, do Laboratório de Culturas de Tecido da Secção de Virulogia e ao Dr. Waldomiro Pregnolato, chefe da Secção de Química Biológica e Espectrografia pela orientação e colaboração prestadas.

Agradecemos também ao Dr. Morris D. Schneider, do Illinois Institute of Technology, pelo fornecimento de material infectado.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MAXIMOW, A. — Über zweckmäßige Methoden für cytologische und histogenetische Untersuchungen am Wirbeltierembryo, mit spezieller Berücksichtigung der Celloïdschnittserien. Z. Wissen Mikr. 26(2):177-190, 1909.
2. BLOCK, M., SMALLER, V. & BROWN, J. — An adaptation of the Maximow technique for preparation of sections of hematopoietic tissue. J. Lab. Clin. Med. 42:145-151, 1953.
3. HUMASON, G. L. — Animal tissue techniques. S. Francisco, Cal., Freeman, c 1962. p. 227-229.
4. ANDRAL, L. & GENTILE, A. — Une méthode simplifiée de coloration des corps de Negri. Bull. Soc. Path. Exot. 49(6):1114-1115, 1956.
5. ROMEIS, B. — Mikroskopische Technik. München, Leibnis Verlag, 1948. p. 326: 1396.

Recebido para publicação em 21 de setembro de 1964

