

## HEMOPHILUS DUCREYI: ALGUNS ASPECTOS METABÓLICOS E MORFOLÓGICOS PESQUISADOS PELO EMPREGO DE PRECURSORES RADIOATIVOS E MICROSCOPIA ELECTRÔNICA

Eunice Almeida CAZARRÉ (1) e Teresinha Moraes BARRETO (2)

### RESUMO

Foi pesquisada a incorporação de arginina, ácido glutâmico e timidina marcados com trício ( $^3\text{H}$ ) em *Hemophilus ducreyi*, analisando-se os resultados pela radiometria e pela microscopia electrônica da autorradiografia. Nas presentes condições experimentais, a arginina- $^3\text{H}$  foi bem incorporada, servindo para a marcação do bacilo. Houve incorporação relativa de ácido glutâmico e quase nula de timidina.

### INTRODUÇÃO

A presente pesquisa visou obter conhecimentos mais exatos do metabolismo e da morfologia do *Hemophilus ducreyi*, agente etiológico do cancro mole. Não foram abordados aspectos clínicos ou epidemiológicos da moléstia. O *H. ducreyi* pertence ao grupo de bactérias hemofílicas que exigem para o seu crescimento, a presença de hemoglobina ou de seus derivados no meio de cultura.

Pesquisas anteriores feitas por diversos Autores<sup>2, 4, 9, 12</sup> procuraram determinar quais as melhores condições de cultura destes bacilos, e quais as frações de sangue necessárias ao seu crescimento. GOMES<sup>5</sup> descreve um novo meio de cultura para isolamento do *H. ducreyi* que produz crescimento acentuado não somente desta mas também de outras espécies do gênero *Hemophilus*. Usamos essencialmente este meio de cultura na presente pesquisa.

HERRIOT<sup>7</sup> empregou a timidina marcada com  $^3\text{H}$  no estudo de transformações genéticas do *H. influenzae*, verificando a incorporação desta no DNA em diversas condições.

Vários Autores<sup>3, 8, 13</sup> estudaram a incorporação de amino ácidos ou nucleótidos marcados com  $^3\text{H}$  em microrganismos, utilizando autorradiografias preparadas para análise ao microscópio electrônico.

Estudos quantitativos em relação à água ou substâncias orgânicas triciadas e incorporadas por diversos microrganismos, foram feitos por vários Autores<sup>1, 6, 10</sup> utilizando a radiometria pelo cintilador líquido.

A experiência dos Autores citados foi utilizada na presente pesquisa, visando conhecer melhor o *H. ducreyi*, bacilo ainda pouco conhecido do ponto de vista metabólico e morfológico.

### MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *H. ducreyi* usadas na presente pesquisa, foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Secção de Culturas Bacterianas.

O controle de pureza e a cultura das amostras foram feitos pela técnica de GOMES<sup>5</sup>.

Trabalho realizado no Centro de Medicina Nuclear (Diretor Dr. Têde Eston) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Secção de Microscopia Electrônica do Instituto Adolfo Lutz da Secretaria da Saúde Pública de São Paulo.

- (1) Farmacêutica-Bioquímica do Instituto de Física da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
- (2) Farmacêutica-Bioquímica do Centro de Medicina Nuclear, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Meio de cultura** — Os compostos marcados com trício ( $^3\text{H}$ ) (arginina, ácido glutâmico e timidina) foram adicionadas ao meio de cultura GOMES<sup>5</sup> individualmente. A técnica desenvolvida foi a seguinte: os tubos contendo 7 ml de meio de cultura foram autoclavados a 120°C durante 30 minutos e resfriados até atingir a temperatura de 55°C. A 3 ml de sangue desfibrinado de coelho foram adicionados 1 ml da solução de composto triciado, na concentração de 100  $\mu$  Ci/ml. O sangue foi vagorosamente misturado ao meio de cultura e os tubos colocados em posição inclinada pelo espaço de 2 horas. A cultura de *H. ducreyi* foi repicada em superfície e levada à estufa a 32°C durante 7 dias.

**Medida da incorporação dos precursores triciados** — Foram feitas duas séries de experiências para comparação. Na primeira os germes que se desenvolveram em superfície foram colhidos e emulsionados em água destilada e lavados 4 vezes com 3 ml de água, separando-se o sobrenadante por centrifugação. O sobrenadante foi recolhido por decantação para controle dos compostos marcados apenas adsorvidos na superfície e não incorporados. Na segunda experiência os germes foram emulsionados e lavados de maneira semelhante com solução fisiológica.

Depois de lavados, os germes foram preparados para a radiometria no detector de

contilação líquida de acordo com a técnica de CAMARGO & HUNDT (\*).

**Microscopia eletrônica** — Os cortes ultrafinos das colônias de *H. ducreyi* desenvolvidas em superfícies foram preparados da seguinte maneira: fixação segundo PALADE<sup>11</sup>, inclusão em resina Crystic Araldite segundo WEIGL & KISIELIUS<sup>15</sup>, e coloração segundo WATSON<sup>14</sup>.

**Autorradiografia** — As telinhas contendo cortes já selecionados ao microscópio eletrônico, foram preparadas para autorradiografias cobrindo-se as com emulsão Ilford L<sub>4</sub> de grãos de 0,12  $m\mu$ . Usamos tempos de exposição variáveis de 12 a 46 dias, dependendo da atividade específica do material.

A revelação foi feita com o revelador Microdol X-Kodak e, em seguida, procedeu-se ao exame e fotografia ao microscópio eletrônico.

## RESULTADOS

### Radiometria das culturas de *H. ducreyi*

A Tabela I resume os resultados obtidos com a radiometria das culturas, no meio GOMES<sup>5</sup>, ao qual foram acrescentados diversos precursores triciados.

TABELA I

Incorporação de compostos triciados em culturas de *H. ducreyi*

Compostos	Amostras emulsificadas			
	Em H <sub>2</sub> O		Em NaCl 0,9%	
R	Incorporado	Adsorvido	Incorporado	Adsorvido
Arginina- <sup>3</sup> H	3.385 ± 304	2.913	27.959 ± 1.655	2.517
Ácido glutâmico- <sup>3</sup> H	510 ± 28	233	2.568 ± 189	342
Timidina- <sup>3</sup> H	282 ± 6	0	103 ± 18	258

R = taxa de contagem líquida em impulsos por minuto

(\*) CAMARGO, E. E. & HUNDT, G. F. — Comunicação verbal. São Paulo, 1970.

Nas Tabelas II e III estão relacionadas as atividades das águas de lavagens, a fim de permitir avaliação da quantidade de com- postos marcados retidos apenas por adsorção, sem que houvesse realmente incorporação ao germe.

TABELA II

Radiometria das águas de lavagem de culturas de *H. ducreyi* após incorporação de compostos triciados

Compostos	Águas de lavagem				
	1. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup>	4. <sup>a</sup>	Total
Arginina- <sup>3</sup> H	920	776	539	678	2.913
Ácido glutâmico- <sup>3</sup> H	159	37	26	11	233
Timidina- <sup>3</sup> H	0	0	0	0	0

TABELA III

Radiometria da solução fisiológica usada na lavagem de culturas de *H. ducreyi* após incorporação de compostos triciados

Precusores	NaCl 0,9% usado na lavagem						
	1. <sup>o</sup>	2. <sup>o</sup>	3. <sup>o</sup>	4. <sup>o</sup>	5. <sup>o</sup>	6. <sup>o</sup>	Total
Arginina- <sup>3</sup> H	1.184	463	216	378	262	14	2.517
Ácido glutâmico- <sup>3</sup> H	213	45	14	24	39	7	342
Timidina- <sup>3</sup> H	79	37	20	44	24	54	258

Os resultados das medidas radioativas revelam que, nas presentes condições experimentais, a arginina-<sup>3</sup>H foi bem incorporada ao *H. ducreyi* servindo portanto de traçador do mesmo. Para o ácido glutâmico a incorporação foi menor e muito restrita no caso da timidina.

Os germes emulsificados com solução fisiológica apresentam radioatividade mais elevada do que os emulsificados em água, o que poderia ser devido a alterações da estrutura do germe durante o processo de emulsificação em água. Entretanto, as medidas das águas de lavagem que foram feitas especificamente para verificar o material apenas adsorvido ou perdido durante a manipulação,

não revelaram diferenças acentuadas entre os dois processos.

#### *Microscopia eletrônica e autorradiografia*

As Figs. 1 e 2 mostram o aspecto de cortes do *H. ducreyi* ao microscópio eletrônico. Podemos observar sua seqüência em cadeias curtas, com extremidades arredondadas, parede celular, membrana celular, estrutura citoplasmática e zonas claras de conteúdo do genoma.

As Figs. 3 e 4 mostram autorradiografias ao microscópio eletrônico, obtidas de germes que incorporam arginina-<sup>3</sup>H, e as 5 e 6 dos que incorporam ácido glutâmico-<sup>3</sup>H. Os

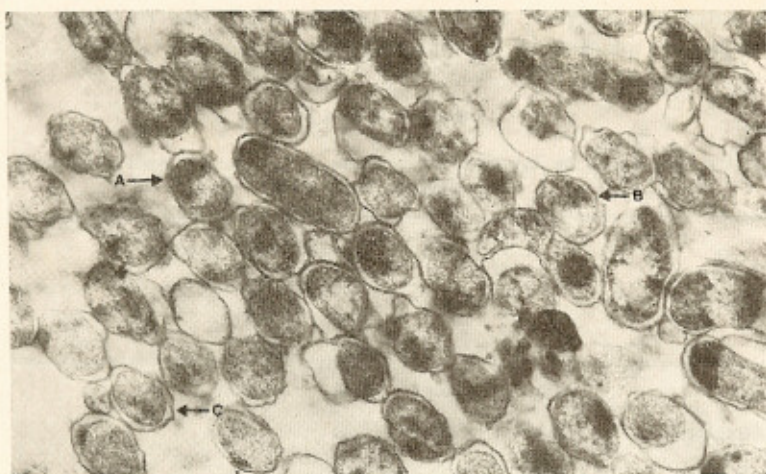


Fig. 1 — Fotomicrografia electrónica de corte transversal do *H. ducreyi*, verificando-se as seqüências de cadeias curtas (A) com extremidades arredondadas (B) e nitida parede celular (C). 42.000 x.

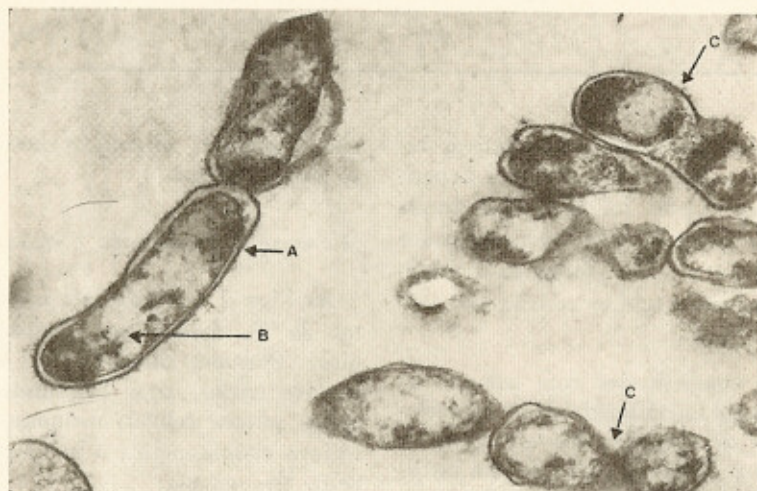


Fig. 2 — Fotomicrografia electrónica de corte transversal e horizontal do *H. ducreyi*, observando-se a parede celular (A) zonas claras de conteúdo do genoma (B), e alguns estágios de divisão bacilar (C). 48.000 x.



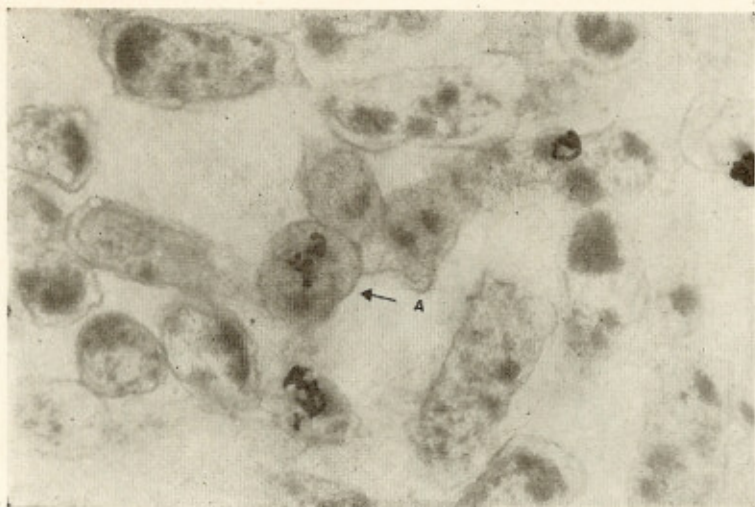


Fig. 3 — Autorradiografia ao microscópio electrónico do *H. ducreyi*, apresentando faixas pretas de configurações variadas, correspondentes a zonas de incorporação de Arginina-<sup>3</sup>H. 30.000 x.

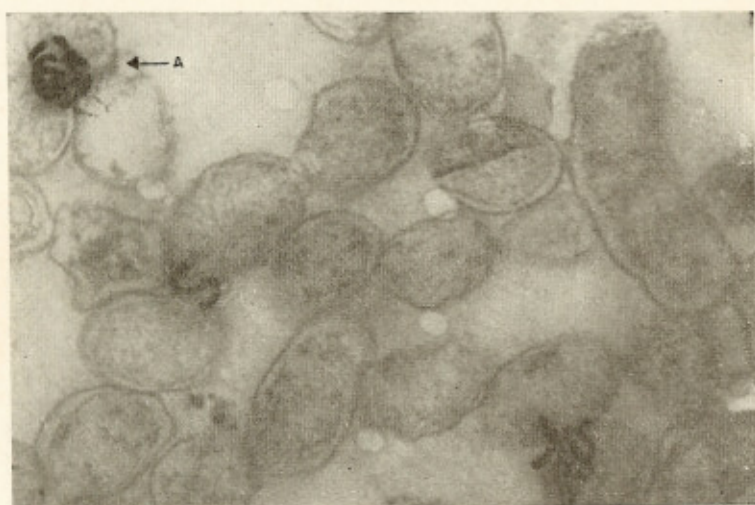


Fig. 4 — Autorradiografia ao microscópio electrónico do *H. ducreyi*, apresentando faixas pretas de configurações variadas, correspondentes a zonas de incorporação de Arginina-<sup>3</sup>H. 30.000 x.

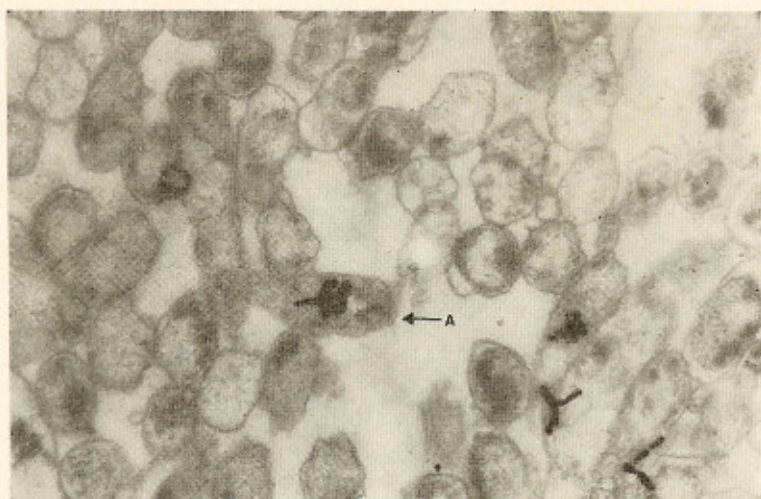


Fig. 5 — Autorradiografia ao microscópio electrónico do *H. ducreyi*, apresentando faixas pretas de configurações variadas, correspondentes a zonas de incorporação do ácido-glutâmico-<sup>3</sup>H. 30.000 x.

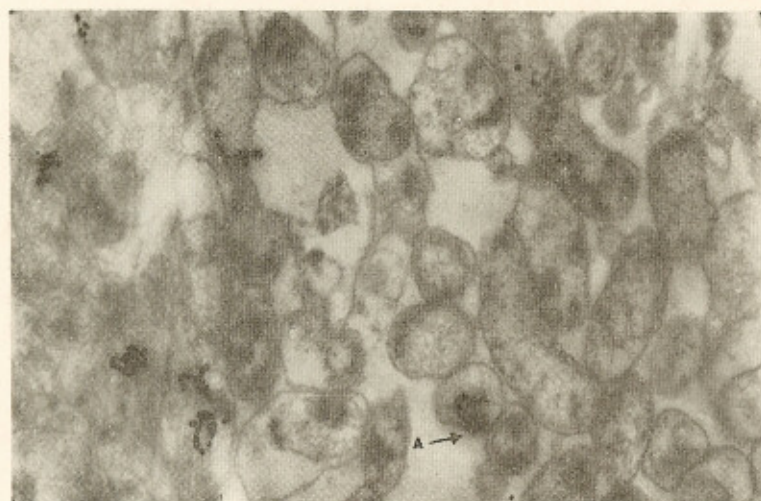


Fig. 6 — Autorradiografia ao microscópio electrónico do *H. ducreyi*, apresentando faixas pretas de configurações variadas, correspondentes a zonas de incorporação do ácido-glutâmico-<sup>3</sup>H. 30.000 x.

grãos de prata precipitados pela radiação beta do trício, apresentam-se como faixas pretas sinuosas, aspecto habitualmente encontrado na microscopia electrónica de autorradiografias.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O *Hemophilus ducreyi*, cultivado pela técnica de GOMES<sup>5</sup>, em meio ao qual foram acrescentados metabólicos triciados, incorpora certa quantidade de arginina, menos ácido glutâmico e quase nada de timidina. HERRIOT<sup>7</sup> verificou, em células hemofílicas, a presença de uma enzima que degrada todos os nucleósidos, incluindo a timidina, sendo provavelmente uma transferase, ou fosforilase. Parece não se tratar de enzima extracelular, mas antes de um aumento da digestão da concentração celular, o que poderia explicar a falta de incorporação de timidina.

As autorradiografias do *Hemophilus ducreyi* por nós obtidas apresentam aspecto muito semelhante ao observado por CARO & TUBERCEN<sup>3</sup> em *Bacillus subtilis* marcados com uridina-<sup>3</sup>H ou com timidina-<sup>3</sup>H.

A presente pesquisa visava elucidar alguns elementos da fisiologia e morfologia do *Hemophilus ducreyi*, verificando-se que o microorganismo incorpora mais facilmente a arginina e o ácido glutâmico, possibilitando a marcação do mesmo com estes precursores radioativos.

#### SUMMARY

*Hemophilus ducreyi*: some metabolic and morphologic aspects investigated by means of radioactive precursors and electron microscopy

The incorporation of tritium-labeled arginine, glutamic acid and thymidine, by *Hemophilus ducreyi* was analysed by liquid scintillation counting and electron microscopy of the autoradiographies obtained. Under the present experimental conditions, arginine-<sup>3</sup>H was well incorporated and may be useful for labelling the microorganism. The incorpo-

ration of glutamic-acid was lower, and that of thymidine almost absent.

#### AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à Comissão Nacional de Energia Nuclear que nos concedeu bolsa de estudos, permitindo a elaboração do presente trabalho. À Professora Dra. Verônica Rapp de Eston, nossa orientadora. Aos Diretores das seguintes Instituições: Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, Instituto Butantan, ambos da Secretaria da Saúde Pública de São Paulo, permitindo acesso aos seus laboratórios, à D. Filomena de Barros Magaldi, Chefe da Seção Técnica de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, pela valiosa colaboração técnica.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APELGOT, S. & DUQUESNE, M. — Méthode de scintillation en milieu liquide appliquée à la mesure quantitative du tritium fixé dans les bactéries. *J. Chem. Phys.* 58:774-777, 1961.
2. BEESON, P. B. — Studies on chancroid. IV — The Ducrey Bacillus: growth requirements and inhibition by antibiotic agents. *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N.Y.) 61:81-85, 1946.
3. CARO, L. G. & VAN TUBERCEN, R. P. — High-resolution autoradiography. I — Methods. *J. Cell Biol.* 15:173-188, 1962.
4. DAVIS, D. J. — Food accessory factors (vitamins) in bacterial culture with special reference to hemophilic bacilli I. *J. Infect. Dis.* 21:392-403, 1917.
5. GOMES, L. S. — Sobre um meio de cultura para o *Haemophilus Ducreyi*; alguns dados técnicos referentes ao isolamento desse bacilo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* (São Paulo) 20: 161-176, 1960.
6. HASH, J. H. — Determination of tritium in whole cells and cellular fractions of *Bacillus megaterium* using liquid scintillation techniques. *Analyt. Biochem.* 4:257-267, 1962.
7. HERRIOTT, R. M. — Genetic transformation in *Hemophilus influenzae*; Annual Progress Report, September 15, 1966 — September 14, 1967. 14 p. (NYO-1371-52).

8. KUHN, N. O. & HARFORD, C. G. — Electron microscope autoradiography of bacteria labeled with iodine-125. *Science* 141:355-356, 1963.
9. LWOFF, A. & PIROSKY, I. — Détermination du facteur de croissance pour *Hemophilus ducreyi*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 124:1169-1171, 1937.
10. NEUJAHN, H. Y. & EWALDSSON, B. — Counting of weak  $\beta$ -emitters in bacterial cells by means of the liquid scintillation method. *Analyt. Biochem.* 8:487-494, 1964.
11. PALADE, G. E. — A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95:285-298, 1952.
12. TEAGUE, O. & DEIBERT, O. — The value of the cultural method in the diagnosis of chancroid. *J. Urol. (Baltimore)* 4:543-550, 1920.
13. VAN TUBERGEN, R. P. — The use of radioautography and electron microscopy for the localization of tritium label in bacteria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:219-222, 1961.
14. WATSON, M. L. — Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:475-478, 1958.
15. WEIGL, D. R. & KISIELIUS, J. — A inclusão em Crystic-Araldite na microscopia eletrônica. *Ci. e Cult.* 20:657-660, 1968.

Recebido para publicação em 27/7/1973.