

## **Capítulo 5**

### **TÉCNICA GERAL**

A captura de nematódeos de vida livre é feita de diversos modos de acordo com o material que se deseja estudar. O material marinho do plancton é capturado em redes próprias. Estas são constituídas por um saco cônico, de seda muito fina, com um aro circular que mantém a abertura bem distendida e no vértice do qual é adaptado um bocal metálico onde se prende a vasilha coletora. No aro da boca são presas 3 cordas, que se reúnem a um cabo, pelo qual se arrasta a rede que deve ficar apenas imersa. A distância que a rede deve percorrer para ser recolhido o material, que se vem depositar no vértice do saco, depende da riqueza do plancton no lugar pesquisado. A rapidez com que a rede é arrastada deve ser limitada pela resistência da seda ou mesmo pela velocidade da embarcação que a reboca. O cabo do reboque deve ser bastante longo para não se fazer sentir na rede o deslocamento da água feito pela hélice, quando se tratar de embarcação a motor.

Há vários tipos de redes para estudo de plancton, algumas muito grandes e complexas que são protegidas externamente por uma outra, de corda, para evitar que a seda da rede interna se rompa com a tração. De um modo geral, para pesquisas mais elementares e em zonas costeiras de rico plancton, redes de 20 a 30 centímetros de diâmetro são suficientes.

Os nematódeos que se localizam junto às algas ou outras formações existentes no oceano são recolhidos agitando-se fortemente estes objetos em recipiente bastante amplo, de modo que se desprendam e caiam no fundo do mesmo. Pode-se também coletar os nematódeos colocando-se o material sobre uma tela fina disposta sobre um recipiente de boca larga, tal qual um grande cálice de fundo cônico, e sobre o material colocado em cima da tela fazer agir um jato forte de água do mar. Os animais, acarretados pela água, serão conduzidos para o recipiente sobre o qual está disposta a tela. As espécies que vivem no lodo são isoladas por tamisações sucessivas de modo a retirar os resíduos maiores até que fiquem convenientemente isoladas. O material contido nos vasos coletores é concentrado por decantação e examinado em vida ou fixado em massa.

Os nernatódeos de rios e lagos são coletados por processo idêntico bem como o dos musgos e terrenos úmidos. As espécies parasitas são procuradas no habitat, isto é, nos hospedadores, vegetais ou animais. As larvas das espécies monoxenas que têm uma parte da vida larvar no solo úmido ou mesmo no plancton, como sucede com cercárias e miracídios de alguns trematódeos, podem ser procuradas pelo processo dos nernatódeos de vida livre.

Os parasitos vegetais são procurados examinando-se diretamente ao microscópio binocular os tecidos que se supõem parasitados, podendo-se, deste modo, isolar alguns exemplares em boas condições e, sobretudo, observar o modo porque se dispõem nos tecidos. Quando se quer colher material mais escasso, principalmente de raizes, pode-se empregar o processo referido para a lavagem das algas sobre tela fina, examinando-se, assim, material mais abundante. Os parasitos nelas contidos são concentrados por decantação. E' sempre conveniente, durante a lavagem, desagregar o mais possível o material. Como esta lavagem deve ser feita sobre tela metálica relativamente larga, pelas malhas da qual passam muitos fragmentos que perturbam as pesquisas do sedimento, passa-se o líquido da lavagem por outra tela de malhas bastante estreitas de maneira a serem retiradas as partículas que possam perturbar .

Para o isolamento deve-se recorrer a uma pipeta de vidro de ponta bastante fina e na qual se recolhem os exemplares, um a um, ao microscópio entomológico. Esta colheita pode ser feita com material vivo, ou, como é mais prático, após fixação. Os nematódeos parasitos de insetos ou outros invertebrados são obtidos pela dissecação dos hospedadores, de preferência ao microscópio entomológico. As formas larvares e algumas espécies já na fase adulta se localizam na cavidade geral, onde devem ser procuradas dilacerando-se os tecidos por meio de agulha histológica e ao microscópio, pois em geral são de dimensões muito reduzidas. Para facilitar o achado convém colocar sobre o material a ser dilacerado uma grande gota de água fisiológica (água distilada com 0,8' < de cloreto de sódio) .

Na cavidade geral dos invertebrados, principalmente dos artrópodos e dos grandes oligoquetas, podem ser encontradas larvas e adultos de nematódeos, larvas de cestódeos, de trematódeos, de acantocéfalos e, também, gordiáceos. No intestino destes animais são encontrados exemplares adultos de nematódeos de várias espécies.

A técnica mais aconselhável para a colheita de nematódeos do tubo digestivo dos artrópodos consiste em retirar o aparelho digestivo, sem rompê-lo, e colocar sobre a lâmina de microscopia (no caso de artrópodos grandes em uma pequena placa de Petri de 5 cm. de diâmetro), lançar sobre o intestino algumas gotas de solução fisiológica e dilacerar o tubo digestivo com duas agulhas, ao microscópio entomológico.

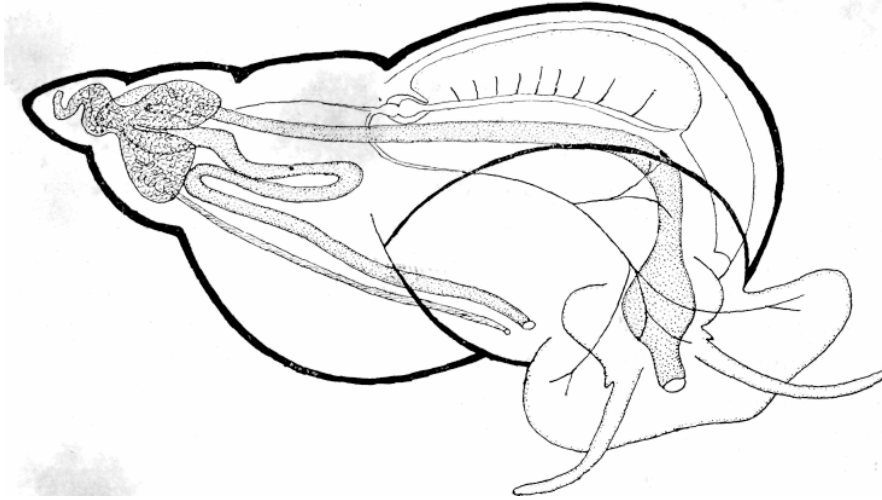


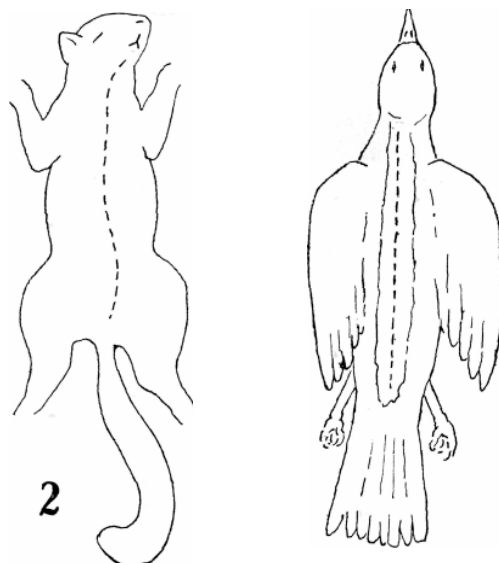
Fig. 1—Esquema da morfologia interna de um gasterópodo, adaptado de Paust.

Por esse modo são vistos os exemplares em sua localização e se evita que sejam traumatizados pelas agulhas. Uma vez encontrados, os nematódeos são passados para outra lâmina, onde previamente se tenha colocado uma gota de solução fisiológica. Para transportá-los de uma lâmina para outra deve-se usar uma agulha fina, um pincel bem delicado e de poucos pêlos ou mesmo uma pipeta fina, no caso de exemplares muito pequenos.

Nos moluscos, além de nematódeos adultos, comensais ou parasitos, são encontradas larvas diversas e partenitas de trematódeos. Estas partenitas em fase inicial se localizam no pé ou nas antenas; a 2.<sup>a</sup> geração, porém, se localiza sempre no hêpato-pâncreas, onde devem ser procuradas (fig. 1),

Os nematódeos, sempre que possível, devem ser examinados a fresco entre lâmina e lamínula. Quando em pequeno número ou de dimensões muito reduzidas devem ser conservados sempre entre lâmina

e lamínula. Para isto, estas devem ser fixadas àquelas por meio de 4 gotas de lacre próprio (Lacre de Koenig: cera virgem 2 partes, colofonio, 8 partes; lacre de du Noyer: lanolina anídrica 20 g., colofonio 80 g.) ou mesmo com parafina. Quando forem muito abundantes e de dimensões facilmente visíveis a olho desarmado poderão ser fixados e conservados em pequenos tubos de vidro.



Figs. 2 e 3 — Necropsia de pequenos animais (a linha pontilhada indica a incisão). Original.

A pesquisa de helmintos nos vertebrados é feita do modo seguinte: O animal deve ser necropsiado logo em seguida à morte, de preferência ainda quente quando se tratar de animal homeotermo. A primeira pesquisa a se realizar é no sangue, se este ainda não tiver coagulado, para verificar a presença de "microfilarias"; caso existam estes embriões, no sangue e na linfa, a pesquisa deve ser cuidadosa para que sejam encontrados os adultos, uma vez que podem estar em qualquer parte do organismo, desde o tecido conjuntivo subcutâneo, bainhas dos tendões, entre os músculos, entre as meninges, nas cavidades serosas ou nos gânglios linfáticos. Examina-se em seguida a cavidade bucal e os olhos, sob cujas pálpebras podem se localizar nematódeos e trematódeos.

Para a abertura do cadáver, procede-se de acordo com o tamanho do animal. Os pequenos répteis, batráquios e mamíferos (fig. 2) são

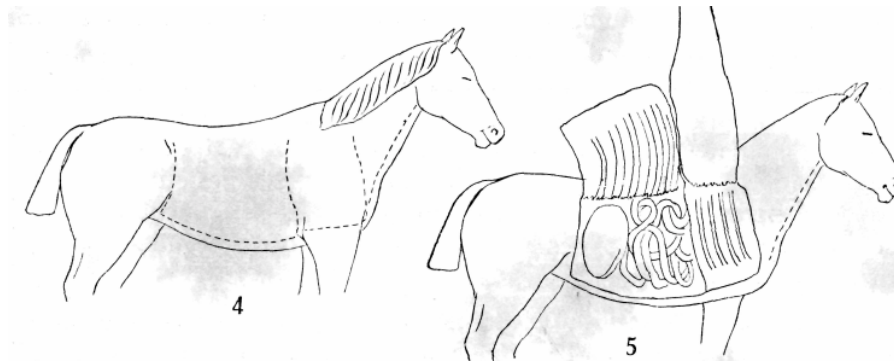
fixados em uma bandeja ou táboa, em decúbito dorsal, e pratica-se uma incisão da pele, do mento ao púbis; retira-se cuidadosamente a pele quando houver indicação da presença de filarídeos. Estes nematódeos, quando no tecido subcutâneo, estão geralmente nas regiões abdominal, axilar e inguinal. Em seguida aprofunda-se a incisão, de maneira a serem abertas as cavidades tóraco-abdominal, nos répteis e batráquios, ou a cavidade abdominal, nos mamíferos. Nestas cavidades podem existir filarídeos e filometrídeos.

Para ser aberta a cavidade torácica dos mamíferos seccionam-se as costelas; aprofunda-se a incisão ao longo do pescoço até atingir a traquéia; seccionam-se a traquéia e o esôfago na parte mais anterior e, segurando-se suas extremidades com pinça forte, faz-se tração para retirá-los, enquanto com a tesoura se desfazem as aderências, até destacar completamente o conjunto de órgãos, devendo ficar na carcassa os aparelhos renal e reprodutor.

Este conjunto é colocado em recipiente raso para se proceder a separação dos diversos órgãos: aparelho respiratório, coração, fígado, pâncreas e o tubo digestivo. A traquéia é aberta, bem como se praticam incisões ao longo dos brônquios mais volumosos para a pesquisa de nematódeos, linguatulídeos ou outros helmintos que geralmente se alojam aí. Os répteis e batráquios têm o pulmão sacciforme, sendo neles bem mais fácil a pesquisa. O coração também deve ser aberto, bem como os grossos vasos que dele emergem. O fígado deve ser cuidadosamente pesquisado, iniciando-se o exame pela vesícula biliar; nele praticam-se cortes paralelos, de maneira a dividi-lo em fatias, que serão espremidas dentro de recipiente com água fisiológica. Procede-se da mesma maneira com o pâncreas. O tubo digestivo deve ser aberto em toda a extensão, desde o esôfago até o reto. O aparelho renal deve ser também examinado, principalmente a vesícula urinaria e os ureteres. As fossas nasais devem ser examinadas. Nos répteis de grande porte, como os jacarés, essa abertura é difícil e deve ser praticada com forte faca, de maneira a retirar a parte superior do focinho para pôr a cavidade a descoberto; nos mamíferos serra-se o focinho transversalmente, logo abaixo dos olhos, e procuram-se os parasites nas duas metades.

Nas aves (fig. 3) deve-se preferir praticar a abertura do corpo pela face dorsal, paralelamente à coluna vertebral, a fim de ser evitada a grande massa dos músculos do vôo. Nestes animais deve-se ter cuidado em procurar trematódeos que se alojam nos sacos aéreos.

Nos grandes vertebrados, que não podem ser colocados em decúbito dorsal, a abertura do corpo é feita do modo seguinte (figs. 4 e 5): Praticam-se uma incisão ventral do fim do esterno até a região perineal, desloca-se o membro posterior incisando-se o couro e os músculos da região inguinal. Abre-se a cavidade abdominal pela linha mediana e



Figs. 4 e 5 — Necrópsia de grandes animais (na fig. 4 o pontilhado indica as incisões; a fig. 5 mostra o modo de levantar a parede tóraco-abdominal e quarto anterior). Original.

praticam-se duas incisões normais a esta, uma acompanhando a margem da implantação da coxa e outra paralela à implantação do membro anterior, junto à inserção do diafragma. Levanta-se o retalho limitado por estas três incisões, depois de se desprender do esterno as últimas costelas, que são quebradas junto à coluna vertebral. Desta maneira ficam a descoberto os órgãos contidos na cavidade abdominal; sendo eles muito volumosos, principalmente o estômago e o intestino grosso, podem ser separados em setores, tendo-se o cuidado de praticar a incisão entre duas ligaduras, para que se não derrame o conteúdo.

Para abrir a cavidade torácica incisa-se profundamente a pele e os ligamentos da axila, de modo a poder deslocar o membro anterior para a face dorsal do animal (fig. 5). Seccionam-se as costelas pelas cartilagens, junto ao esterno; secciona-se o diafragma, ao longo da cavidade torácica e então dobram-se as costelas para cima. Nos animais do porte de um carneiro as costelas se partem facilmente junto à coluna vertebral; nos bovídeos, ou em outros animais de porte equivalente, convém parti-las junto à coluna vertebral com auxílio de machadinha.

Levantando-se a parede do tórax os órgãos situados nesta cavidade ficam a descoberto. Quanto a outros detalhes pratica-se como foi referido para os animais de pequeno porte.

A pesquisa de helmintos em peixes, de modo geral, é praticada como nos animais de pequeno porte. Deve-se pesquisar cuidadosamente a cavidade bucal; as brânquias devem ser retiradas, lavadas, e cuidadosamente examinadas. A cavidade geral deve ser aberta por uma incisão paralela à linha mediana ventral, do nível do ânus até o nível das nadadeiras peitorais; secciona-se o curto esôfago e retira-se o conjunto de órgãos que constituem o aparelho digestivo. Deve-se abrir cuidadosamente a vesícula biliar e examinar o fígado. Muitos peixes apresentam alguns ou numerosos divertículos pilóricos, situados na porção inicial do intestino delgado, que devem ser cuidadosamente examinados, pois neles freqüentemente se alojam nematódeos e trematódeos. Os rins também devem ser examinados. Na vesícula natatória se podem encontrar larvas de nematódeos ou de linguatulídeos e na vesícula urinaria, nas poucas espécies em que este órgão existe, encontram-se também trematódeos.

O material retirado do corpo do hospedador deve ser lavado em água fisiológica antes da fixação, como também não deve nunca ser colocado nágua pura nem secar, nem mesmo parcialmente. A lavagem dos espécimes médios ou grandes é muito fácil, dos pequenos espécimes, que não podem ser colhidos um a um, ou mesmo dos médios, quando forem em grande número, a lavagem será feita por agitação forte em frasco fechado. Deixa-se decantar, substitui-se a solução fisiológica e agita-se novamente. Deste modo os exemplares ficam desembaraçados das mucosidades aderidas ao corpo e podem ser fixados sem que estas prejudiquem o estudo posterior. A fixação dos helmintos varia para os diversos grupos e será estudada a seguir.

### NEMATÓDEOS

De um modo geral qualquer bom fixador histológico, bem penetrante serve para a fixação, tanto dos nematódeos como de qualquer outro helminto. O formol é o fixador de escolha por ser de fácil manejo, fixar os tecidos em boas condições e ter grande penetração; tem, porém, o inconveniente de endurecer muito os exemplares, o que, aliás, pode ser facilmente corrigido. Usamos de preferência a fórmula seguinte: Formol do comércio — 5 cc.; ácido acético glacial — 2 cc.; solução fisiológica — 93 cc..

Esta solução, além de fixar os animais de modo inteiramente satisfatório, corrige, pela ação do ácido acético, o endurecimento excessivo; torna-os bastante transparentes e serve como líquido conservador defi-

nitivamente. Os autores mais antigos usavam o álcool a 70°; é um bom fixador e conservador havendo nos museus europeus material fixado e conservado nesta substância há mais de cem anos. E' também aconselhável o emprego do picro-formol de Bouin que tem a seguinte fórmula: Solução aquosa saturada de ácido pícrico — 30 vol.; formol do comércio (40%) — 10 vol.; ácido acético glacial — 2 vol. LANGERON aconselha ajuntar o ácido acético somente no momento do emprego; não é ele conservador e deve ser substituído pelo álcool a 70° dentro de 1 a 3 dias.

O modo de proceder a fixação varia com as dimensões dos espécimes e o fim especial a que se tenha em vista. Para que os nematódeos fiquem distendidos e possam ser melhor examinados deve-se aplicar o fixador aquecido a mais de 70°. Para isto decanta-se o material a fixar, de maneira a ficar com a menor porção de líquido possível, e então lança-se bruscamente sobre ele o fixador aquecido em volume bastante grande, para não ser resfriado pelo líquido que restar junto aos nematódeos, nem pelo recipiente que os contenha.

Quando possível, obtém-se ótimos resultados colocando-se o fixador em uma placa de Petri que é aquecida em placa térmica até o desprendimento de vapores, sendo então os nematódeos lançados nesta, um a um.

Quando se deseja fixar determinada parte do nematódeo em posição favorável ao estudo (ornamentos da extremidade anterior ou posterior, tais como asas cefálicas, asas caudais, bolsa copuladora dos *Strongyloidea*, etc.) devem tais partes ser colocadas na posição escolhida, entre lâmina e lamínula, sendo esta presa à lâmina por algumas gotas de lacre. Uma vez assegurado estar o espécime em posição, faz-se agir o fixador, por capilaridade, até que o material esteja endurecido e deste modo se conserve de maneira apropriada.

Em casos como este, é conveniente empregar como fixador o carmim acético de Semichon: Ácido acético glacial — 1 parte; água — 1 parte; carmim até saturação em banho-maria; este líquido fixa e cora, dando preparações excelentes.

O ácido acético com 0,1% de azul algodão permite igualmente obter ótimas preparações de raios bursais (este corante, muito usado em micologia sob a forma de lacto-fenol com 0,5% de azul algodão, foi introduzido em nematologia por Goodey.

Após a fixação, os nematódeos, para serem estudados, devem ser diafanizados. O processo clássico de diafanização pela glicerina de



Looss, não só é muito lento como não permite observação tão apurada como processos mais modernos. A marcha do estudo que julgamos mais prática e de melhores resultados é a seguinte: Material conservado em meio aquoso ou alcoólico é colocado entre lâmina e lamínula (ou em pequena placa de Petri de 5 cm. de diâmetro), onde se introduz, por capilaridade, ácido acético glacial. O material assim tratado fica perfeitamente transparente e em muito boas condições de exame, principalmente das formações celulares. Em seguida substitui-se o ácido acético por fenol, aspirando com um fragmento de papel de filtro em um lado da lamínula, enquanto se coloca do outro uma gota de fenol. Este reagente dá uma transparência de vidro aos nematódeos tornando perfeitamente visíveis as formações quitinosas. Para observar convenientemente as estruturas celulares é preciso regular bem a iluminação. Pode-se, com vantagem, substituir o fenol pelo creosoto vegetal (creosoto de faia do comércio), que dá diafanização tão boa quanto o fenol, é menos cáustico para os dedos do operador e permite a substituição pelo bálsamo do Canadá sem prejudicar o material. (A substituição do creosoto vegetal pelo bálsamo do Canadá, para não prejudicar a estrutura dos nematódeos, deve ser feita muito lentamente: à proporção que o creosoto existente entre a lâmina e a lamínula se vai evaporando adicionam-se pequenas quantidades de bálsamo bem fluidificado com creosoto até a substituição completa; assim, em nosso clima, se obtêm, em alguns dias, ótimas preparações). O único inconveniente deste processo é o escurecimento da preparação que, contudo, não perde a nitidês. Em regra, não se usa coloração nos nematódeos e nem são montados definitivamente antes de completado o estudo, para que possam ser rolados entre a lâmina e a lamínula e desse modo examinados em diversos ângulos.

Para se distender a bolsa dos strongilídeos, principalmente os de dimensões muito pequenas, deve-se colocá-los entre lâmina e lamínula e, ao microscópio, com o menor aumento compatível com a dimensão do espécime, movimentar a lamínula com os dedos até que fiquem na posição desejada. No material vivo esta operação é relativamente fácil; no material fixado é indispensável diafanisá-los, não só para que se tornem visíveis os raios bursais como, principalmente, porque os diafanisadores (ácido acético, fenol, creosoto vegetal) os tornam mais flexíveis e menos friáveis. O creosoto vegetal é o diafanizador que mais flexibilidade dá ao material e é menos cáustico que o fenol e ácido acético para os dedos do operador. O ácido acético permite observar bem os raios bursais, mas é excessivamente cáustico. O fenol e o creosoto

de faia tornam o material muito transparente e somente quem tiver prática fará bons preparados. É conveniente corar levemente a bolsa copuladora para melhor se poder acompanhar as manobras de distensão.

Distender a bolsa copuladora dos pequenos tricostrongilídeos fixados é operação difícil, que requer muita prática. É preciso fazer movimentos muito pequenos da lamínula sobre a lâmina, observando ao microscópio. Como estes movimentos são muito pequenos, além de ser necessário uma certa compressão sobre a lamínula, é indispensável apoiar os dedos indicadores sobre a lâmina e lamínula simultaneamente para executá-los com segurança; a consequência deste modo de proceder é a produção de queimaduras fortes dos dedos. Nos casos de material raro, em que se deve trabalhar muito pacientemente, a operação dura algumas vezes mais de 30 minutos e as queimaduras produzidas podem impossibilitar o pesquisador de trabalhar durante 2 ou 3 dias. Contra a ação do ácido acético, nada se pode fazer. A ação do fenol pode ser neutralizada, esfregando-se freqüentemente durante a operação o ponto do dedo atingido em um algodão embebido em álcool com 50 % de glicerina. O creosoto é pouco cáustico e sua ação pode ser neutralizada também pelo álcool glicerinado.

O emprego do carmim acético ou do azul acético permite obter preparações ótimas que, depois de estudadas no creosoto, podem ser definitivamente montadas em bálsamo. Para o estudo citológico ou mesmo a interpretação de estruturas anatômicas menos fáceis de serem vistas em preparados totais, principalmente nas grandes espécies, é útil a prática de cortes seriados após a inclusão em parafina ou parafina-celoidina; a inclusão em parafina, quando feita cuidadosamente, dá ótimos resultados. Aconselhamos a seguinte técnica: Desidratação até álcool a 95° (pelos métodos usuais em histologia); passar essência de cedro e colocar na estufa a 40° até completa diafanização (é aconselhável a supressão do álcool absoluto que determina retrações) . Passar para novo recipiente com essência de cedro durante algumas horas na estufa; em seguida, levar para outro recipiente com essência de cedro contendo cerca de 20% de parafina e colocar na estufa a 58°; passar para uma primeira parafina pura, depois para uma segunda pelo menos durante 2 horas a 58°, finalmente fazer a inclusão em nova parafina pelos processos de rotina histológica. A grande vantagem do uso da essência de cedro é permitir a penetração da parafina nos órgãos quitinosos sem deformá-los. A essência de cedro pode ser usada inde-

finidamente pois o álcool e a água que possa absorver são eliminados pela permanência durante algumas horas na estufa a 40".

Quando não se pode dispor de essência de cedro, deve-se fazer a impregnação pela parafina usando-se misturas progressivamente concentradas de fenol e clorofórmio; é processo mais lento e que não dá os bons resultados do anterior.

O emprego da parafina-celoidina para inclusão, feita com o objetivo de impedir que segmentos do corte que fiquem isolados se destaquem, não nos parece vantajoso não só por ser lento como também por facilitar a perda de cortes pela atração destes pela navalha do micrótomo, em virtude da eletricidade estática que se forma pelo atrito do gume da navalha na celoidina (os cortes seriados de nematódeos, em geral, são muito numerosos e muito pequenos e se houver qualquer fragmentação da fita de cortes, no ato destes serem feitos, é muito difícil que não se percam vários) .

Os cortes para estudos de anatomia fina devem ser corados pelos processos elementares de histologia: para coloração simples, hematoxilina; para dupla, hematoxilina e eosina ou a tríplice coloração pelo Van Gieson. Quando se tratar de séries numerosas, que ocupam muitas lâminas, usamos cora-las alternadamente com dupla e tríplice coloração.

Em geral os manuais de técnica aconselham, para material destinado a cortes histológicos, o emprego de fixadores à base de sublimado corrosivo. E' desnecessário o emprego deste fixador para fins de estudos de anatomia fina; o formol neutro dá ótimos resultados.

Em muitos casos é indispensável praticar-se a dissecação de exemplares, principalmente quando se trata de espécimes muito volumosos. A dissecação pode ser feita antes da fixação, o que tem a vantagem do material estar menos friavel, ou após fixação ou mesmo após coloração; é ela feita sob lupa simples ou microscópio entomológico, com auxílio de agulhas, lancetas, tesouras e pinça histológica; prestam ótimo serviço as pinças de aço muito finas, usadas pelos relojoeiros.

O material a ser dissecado deve ser colocado sobre uma lâmina de microscopia, se bastante pequeno, ou em uma placa de Petri bastante funda, na qual se tenha colocado uma camada de parafina enegrecida, com espessura de 3 a 4 mm., de modo a se poder fixar, com alfinetes, o espécime e as diversas partes que convier serem afastadas.

## GORDIÁCEOS

Nestes animais empregam-se de um modo geral, as mesmas técnicas dos nematódeos.

## TREMATÓDEOS, POLÍSTOMOS, CESTÓDEOS

A técnica de fixação e estudo destes helmintos é, em linhas gerais, a dos nematódeos. Estes platelmintos devem, porém, ser fixados comprimidos entre duas superfícies planas, entre lâmina e lamínula quando pequenos, entre duas lâminas quando de tamanho médio e entre duas placas de fotografia quando grandes.

Nos exemplares pequenos a lamínula é fixada por algumas gotas de lacre ou deposita-se sobre ela um objeto pesado antes de se introduzir o fixador (é muito prático usar como peso um pequeno frasco de fundo chato contendo chumbo de caça; deste modo se obtém pesos de vários valores a serem usados de acordo com as dimensões do espécime) . É bastante conservar o peso durante duas horas de ação do fixador para que se obtenham preparados semelhantes a cortes histológicos espessos e que permitam um completo estudo anatômico. Um processo muito prático para usa em pesquisas no campo, e mesmo no laboratório, é

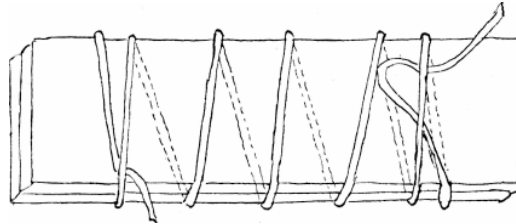


Fig. 6 — Esquema do processo de compressão entre duas lâminas por meio de um cordel. Original.

manter as duas lâminas ajustadas por um cordel macio em que a primeira volta prende a ponta do cordel e a última é insinuada por baixo da penúltima com uma pinça fina ou com a ponta de um bisturi (fig. 6). Em seguida coloca-se o material no recipiente com o fixador. Quando se quiser desfazer a preparação puxa-se com a pinça a extremidade do cordel insinuada por baixo da outra e desenrola-se o mesmo das lâminas . Pode-se fazer a compressão com elásticos ou pinças de mola. Nestes processos há a desvantagem de não ser possível regular a compressão.

Para o estudo dos platelmintos é indispensável o emprego de corantes. São muito aconselhados os que têm como base a hematoxilina e o carmim. Preferimos aqueles à base de carmim, a saber: Carmim clorídrico-alcoólico, cuja fórmula é a seguinte: Carmim 5 g., ácido clorídrico 5 cc.; água 5 cc.; triturar e deixar em repouso durante cerca de uma hora. Adicionar 200 cc. de álcool a 90° e aquecer em banho-maria durante pelo menos uma hora; se houver muita evaporação completar o volume com mais álcool a 90°. Este corante pode ser empregado puro ou diluído em álcool a 90°. A marcha da coloração é a seguinte: Material conservado em meio aquoso passar para o álcool a 70° durante cerca de 30 minutos; aquele, em álcool, vai diretamente para o corante colocado em um vidro de relógio ou, melhor, em uma pequena placa de Petri de 5 cm. de diâmetro. O corante deve atuar durante 20 a 40 minutos. Lavar em álcool a 70°. Caso fiquem os espécimes muito corados diferenciar em álcool a 70° com 0,5% de ácido clorídrico. Lavar em álcool a 70°. Passar ao álcool a 90°, a 95° ou mesmo absoluto, rapidamente, e colocar no creosoto, tendo o cuidado de mantê-lo todo imerso nesta substância (se os espécimes ficarem na superfície pode haver penetração de bolhas de ar que só dificilmente saem; para mantê-los no fundo é suficiente colocar sobre eles uma lamínula). Uma vez corados e diafanizados resta estudá-los e montar no bálsamo, que deve ser fluido. Pode-se diluir o carmim no álcool a 90°, de maneira a ficar com coloração bastante atenuada. Neste caso o material deve permanecer no corante durante muitas horas. É um processo prático para quando se tem em andamento muitos exemplares, pois o material em estudo é guardado em pequenos frascos cilíndricos onde, sem risco de secar, pode permanecer vários dias. Este processo geralmente dispensa a diferenciação. Usa-se também, com grande vantagem em espécies pequenos, a fixação entre lâmina e lamínula pelo carmim acético e em seguida a conservação em álcool; este método abrevia muito o estudo, pois os exemplares são fixados e corados ao mesmo tempo.

Pode-se também corar pelo carmim acético diluído em álcool a 90°. Por este processo se obtêm preparações muito boas, devendo-se empregar o corante bem diluído e por muitas horas. Quando a coloração não ficar bastante forte e suficiente, imergir no líquido corante, durante alguns segundos, uma agulha ou outro qualquer objeto de ferro um pouco oxidado para que o exemplar adquira uma bela coloração arroxeada.

Os grandes trematódeos e cestódeos não se prestam à compressão sob pena de se romperem. Estes, quando são muito volumosos, podem

ser estudados em preparações totais, mas de regra devem ser cortados no micrótomo de congelação, quando apenas se quer obter cortes grosseiros, ou então incluídos em parafina, pelo processo referido a propósito dos nematódeos. Como estes animais têm algumas estruturas que somente em cortes histológicos seriados podem ser bem apreciadas, devem-se conservar exemplares fixados sem compressão (os espécimes fixados comprimidos não se prestam a cortes, por ficarem muitos detalhes anatómicos achatados ou mesmo rompidos). A fim de facilitar os cortes a serem praticados mais tarde, os espécimes devem ser fixados sobre uma superfície plana (lâmina ou placa fotográfica), sem compressão, de tal modo que permita uma boa orientação na ocasião da inclusão. Dos grandes cestódeos, que não podem ser incluídos em um só bloco de parafina, devem-se tomar fragmentos de diversas partes da cadeia, de maneira a ser possível observar a evolução dos órgãos de reprodução.

#### ACANTOCÉFALOS

Os processos de estudo deste grupo de animais são, de modo geral, semelhantes aos dos trematódeos. Deve-se ter cuidado, ao retirá-los do intestino onde geralmente estão fortemente fixados, para que não se rompam. Algumas espécies têm a tromba esférica seguida de pescoço delgado (*Filicollis*); nelas, para que o pescoço não se rompa, é indispensável dissecar a parede do intestino com tesoura muito fina ou com agulhas cortantes. Os espécimes médios ou pequenos devem ser comprimidos entre duas superfícies planas a fim de que a tromba fique extrovertida e deste modo possam os ganchos, aí existentes, serem bem estudados, bem como a bolsa copuladora dos machos e órgãos internos, principalmente o aparelho reprodutor masculino. Nas espécies de tromba globular, que não é invaginada, esta deve ficar para fora da lâmina compressora, pois do contrário se romperá.

Podem ser estudados simplesmente diafanizados, porém corando pelo carmim, com a técnica indicada atrás, obtém-se ótimas preparações. A estrutura do corpo só pode ser bem estudada em cortes histológicos, obtidos pelos processos referidos anteriormente. Os espécimes volumosos, ou os médios, não fixados sob compressão, devem ser dissecados sob lupa simples ou microscópio entomológico. As formas larvares, enquistadas no interior dos organismos, devem ser desembaraçadas dos quistos e comprimidas, para que a tromba seja desinvaginada.

## LINGUATULÍDEOS

Os processos de fixação dos linguatulídeos são os mesmos usados para os nematódeos. Para as espécies pequenas, as larvas e algumas das espécies maiores, de corpo macio ou chato, é aconselhável a prática da fixação sob compressão. A maioria porém não permite o uso deste recurso. Para o estudo das espécies menores deve-se usar a diafanização. A coloração branda pelo carmim também auxilia a interpretação da anatomia. As espécies maiores de um centímetro devem ser dissecadas sob lupa simples ou microscópio entomológico. Algumas espécies introduzem a parte anterior entre os anéis da traquéia e somente podem ser daí retiradas, sem rutura, dissecando-se a parede do órgão. O estudo anômico mais fino deve ser feito em cortes seriados, obtidos pelo processo indicado a respeito dos nematódeos.