

Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica

[*Effect of formalin and Bouin fixation upon the mare's endometrial biopsies embedded in plastic resin*]

D. Amaral¹, H. Chiarini-Garcia^{2*}, V.R. Vale Filho¹, W.R. Allen³

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - Escola de Veterinária da UFMG

²Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Caixa Postal 486

31270-910 – Belo Horizonte, MG

³Department of Clinical Veterinary Medicine - Equine Fertility Unit - University of Cambridge, UK

RESUMO

Biópsias do endométrio de 16 éguas sexualmente maduras, em estro e diestro, foram processadas para microscopia de luz utilizando-se fixação em formalina ou Bouin e inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Análises morfológicas de 46 biópsias demonstraram que o epitélio de revestimento do endométrio, o epitélio glandular, as fibras do tecido conjuntivo e os diferentes tipos celulares presentes na lâmina própria, tais como fibroblastos, plasmócitos, mastócitos e macrófagos, apresentaram-se melhor preservados quando os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina. O epitélio de revestimento mostrou grau mais acentuado de retração tecidual nas biópsias fixadas em Bouin, independente da fase do ciclo estral. A fixação em formalina aliada à inclusão em resina plástica resultou em melhor resolução das células ao microscópio de luz, permitindo um estudo citológico mais acurado do endométrio equino.

Palavras-chave: égua, endométrio, biópsia, glicol metacrilato, formalina, Bouin

ABSTRACT

Endometrial biopsies were performed in 16 mares at estrus and diestrus and tissues were processed for light microscopy using formalin or Bouin fixatives and plastic resin glycol methacrylate for embedding. Results of the tissue processing demonstrated that the luminal and glandular epithelium, connective tissue fibers and many cell types present in the lamina propria such as fibroblasts, plasmocytes, mast cells and macrophages were best preserved in formalin fixed samples. The luminal epithelium showed increased shrinkage in Bouin fixed specimens when compared to formalin fixed ones. Those morphological findings were present throughout the estral cycle. The formalin fixation procedure associated with plastic resin embedding yielded increased tissue resolution as seen by light microscopy, and allowed a more accurate cytological study of the endometrium of the mare.

Keywords: mare, endometrium, biopsies, glycol methacrylate, formalin, Bouin

Financiado, em parte, pelo CNPq, com bolsa de doutorado para o primeiro autor.

Recebido para publicação em 12 de novembro de 2002

Recebido para publicação, após modificações, em 8 de outubro de 2003

*Autor para correspondência

E-mail: chiarini@icb.ufmg.br

INTRODUÇÃO

Na espécie eqüina, a análise histopatológica de biópsias do endométrio é indicada como método auxiliar no diagnóstico de lesões uterinas, algumas das quais dificilmente observadas no exame clínico ginecológico de rotina. As informações obtidas são de grande importância na avaliação do potencial reprodutivo, sendo portanto indicada no exame ginecológico de qualquer égua não gestante em um programa de reprodução assistida. Por meio de uma única biópsia é possível chegar ao diagnóstico preciso das condições uterinas e ao prognóstico quanto à capacidade do endométrio de suportar a gestação (Kenney, 1978). A biópsia do endométrio é de fácil execução, segura, pode ser realizada pelo veterinário de campo com um mínimo de equipamento e não afeta as taxas de concepção, desde que sejam tomadas medidas adequadas de higiene (Watson, Sertich, 1992).

O endométrio da égua é composto pelo epitélio de superfície ou epitélio luminal e pela lâmina própria. O epitélio de superfície reveste internamente o lume uterino e é caracterizado principalmente pela presença de células secretoras e ciliadas. A lâmina própria estende-se da membrana basal ao miométrio e caracteriza-se pela presença de células e fibras do tecido conjuntivo, glândulas endometriais, vasos sanguíneos e numerosos vasos linfáticos. O número, estado funcional e o aspecto morfológico dos vários componentes do endométrio da égua são influenciados diretamente pela época do ano e pelas fases do ciclo estral (Kenney, 1978). Durante a estação fisiológica de reprodução o endométrio apresenta alterações morfológicas cíclicas em resposta aos níveis circulantes de esteróides gonadais. Segundo Ricketts (1975), o período mais adequado para a coleta das biópsias é o diestro, quando o endométrio encontra-se relativamente quiescente e os achados são mais facilmente interpretados.

Além do período adequado de coleta, outro cuidado a ser observado é a escolha do fixador e do método de inclusão das biópsias de endométrio. As técnicas de processamento de tecidos biológicos têm sido as mesmas desde a segunda metade do século XIX, e incluem basicamente a fixação dos tecidos em solução de Bouin e a inclusão em parafina. Vários estudos

sobre a histopatologia do endométrio da égua utilizaram biópsias fixadas em Bouin e incluídas em parafina (Kenney, 1978; Ricketts et al., 1978; Kenney, Doig, 1986).

A técnica de fixação em Bouin e inclusão em parafina tem sido substituída pela fixação em formalina e inclusão em glicol metacrilato (GMA). A associação formalina/GMA preserva melhor os detalhes das células de forma que os tecidos apresentem menos artefatos e melhor resolução ao microscópio de luz (Cole, Sykes, 1974; Junqueira, 1995). A inclusão de tecidos biológicos em resina plástica mostra vantagens já amplamente conhecidas (Bennett et al., 1976; Woodruff, Greenfield, 1979) quando comparada à inclusão em parafina e, portanto, constitui a técnica de escolha no processamento de amostras teciduais para estudos morfológicos. Quanto ao tipo de fixador a ser empregado, os estudos são ainda inconclusivos.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos dos fixadores formalina e Bouin em fragmentos de endométrio eqüino incluídos em resina plástica.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido durante a estação fisiológica de reprodução de 1997/1998, no plantel experimental da *Equine Fertility Unit – Thoroughbred Breeders' Association*, em Newmarket, UK. O plantel era constituído por éguas Puro Sangue Inglês (PSI) sexualmente maduras e aptas à reprodução.

Foram utilizadas 16 éguas PSI e em momentos determinados do ciclo estral (estro ou diestro), as éguas foram submetidas a sessões de histeroscopia, conforme descrito por Bracher e Allen (1992). Durante esse procedimento, uma pinça de biópsia do tipo “boca de jacaré” foi inserida através da cérvix e guiada até a base de um dos cornos uterinos onde era feita a biópsia.

As biópsias de endométrio foram feitas durante o estro (n= 30), isto é, um a oito dias antes da ovulação e concentração sérica de progesterona menor que 1ng/ml, e durante o diestro (n = 16), ou seja, um a 16 dias após a ovulação e concentração sérica de progesterona maior que 1ng/ml.

Os fragmentos de endométrio foram processados utilizando-se como solução fixadora a formalina e o Bouin (Ricketts et al., 1978; Kenney, Doig, 1986) por 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação as amostras foram conservadas em álcool 70° GL à 4°C, desidratadas em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato¹. Cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos com navalhas de vidro no micrótomo Reichert Jung². Um a cada 10 cortes obtidos em série foi distendido em água destilada, aderido em lâmina histológica, seco em chapa quente à 60°C e, em seguida, corado com azul de toluidina-borato de sódio, totalizando cinco cortes por fragmento.

Na avaliação morfológica foram comparados os componentes teciduais de biópsias fixadas em formalina e em Bouin, levando-se em consideração a preservação de detalhes das células epiteliais e glandulares, além de células e fibras do tecido conjuntivo. Na avaliação morfométrica estudou-se o efeito da formalina e do Bouin sobre o endométrio, medindo-se a altura do epitélio de revestimento. A medida do epitélio foi feita em microscópio de luz, utilizando-se uma régua graduada acoplada a uma das oculares do microscópio e aferida em micrômetros com o auxílio de lâmina micrométrica da Leitz. A altura do epitélio foi medida em cinco campos aleatórios por corte histológico.

Os resultados quantitativos (altura do epitélio) foram analisados segundo delineamento inteiramente ao acaso. As médias obtidas foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls utilizando-se o programa Statistica 3.11³ para Windows. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aldeídos, como a formalina, por serem fixadores não coagulantes, fazem com que as proteínas celulares assumam aspecto de gel transparente. Este aspecto é resultante das ligações cruzadas formadas entre as moléculas do fixador e as macromoléculas dos tecidos.

Dessa forma, após o processo de fixação, muitas moléculas de água permanecem ligadas aos tecidos e às macromoléculas tissulares às quais a água normalmente se encontra associada, resultando em maior estabilização estrutural e, conseqüentemente, em melhor preservação histológica (Fox et al., 1985; Sesso, 1998). Os fixadores coagulantes, como a solução de Bouin, causam despolimerização das proteínas tissulares, fazendo com que as células e tecidos se apresentem com aspecto não homogêneo, o que dificulta a observação de detalhes citológicos (Cole, Sykes, 1974; Locquin, Langeron, 1983).

As biópsias fixadas em formalina forneceram informações mais detalhadas da citologia do endométrio e, principalmente, do epitélio de revestimento, uma vez que a superfície apical das células epiteliais apresentou-se melhor preservada, favorecendo a identificação precisa de células secretoras e ciliadas (Fig. 1A). Na lâmina própria, feixes de fibras colágenas estavam dispostos de maneira ordenada. Nas biópsias fixadas em Bouin, a identificação das células ciliadas no epitélio de revestimento tornou-se difícil devido à preservação inadequada dos cílios. Além disso, na lâmina própria os feixes de fibras colágenas apresentaram-se em disposição desordenada (Fig. 1B). A morfologia do nucleoplasma e do citoplasma dos diversos tipos celulares também foi nitidamente influenciada pelo tipo de fixador utilizado. Após fixação em formalina o nucléolo apresentou-se bem evidente e a heterocromatina em grumos bem definidos, aderidos ou não à porção interna da membrana nuclear (Fig. 1C). Nas biópsias fixadas em Bouin, o nucléolo apresentou-se relativamente evidente e o nucleoplasma com aspecto bastante flocoento (Fig. 1D). As diferenças entre fixadores também foram evidentes quando foram comparados os diferentes tipos celulares presentes na lâmina própria. Após fixação com formalina, vasos sanguíneos e linfáticos apresentaram células endoteliais bem preservadas (Fig. 2A), mastócitos com individualização de grânulos citoplasmáticos (Fig. 1C, 2A, 2E), plasmócitos com morfologia nuclear típica e região perinuclear correspondente ao complexo de Golgi bem evidente (Fig. 2C), além de macrófagos com limites celulares bem definidos e citoplasma repleto de grânulos citoplasmáticos (Fig. 2E). Após fixação em Bouin, os detalhes citológicos dos diferentes tipos celulares citados

¹ Historesin – Leica, Heidelberg, Alemanha

² mod. 1140 / *autocut*, Viena, Austria

³ Stat Soft, Inc; Tulsa, Oklahoma, EUA

acima não foram bem evidenciados (Fig. 2B e 2D). Estudos prévios também demonstraram que o tipo de fixador utilizado pode preservar

diferentemente detalhes morfológicos dos mais variados tipos de órgão e células (Bennett et al., 1976; Ferreira, Chiarini-Garcia, 1992).

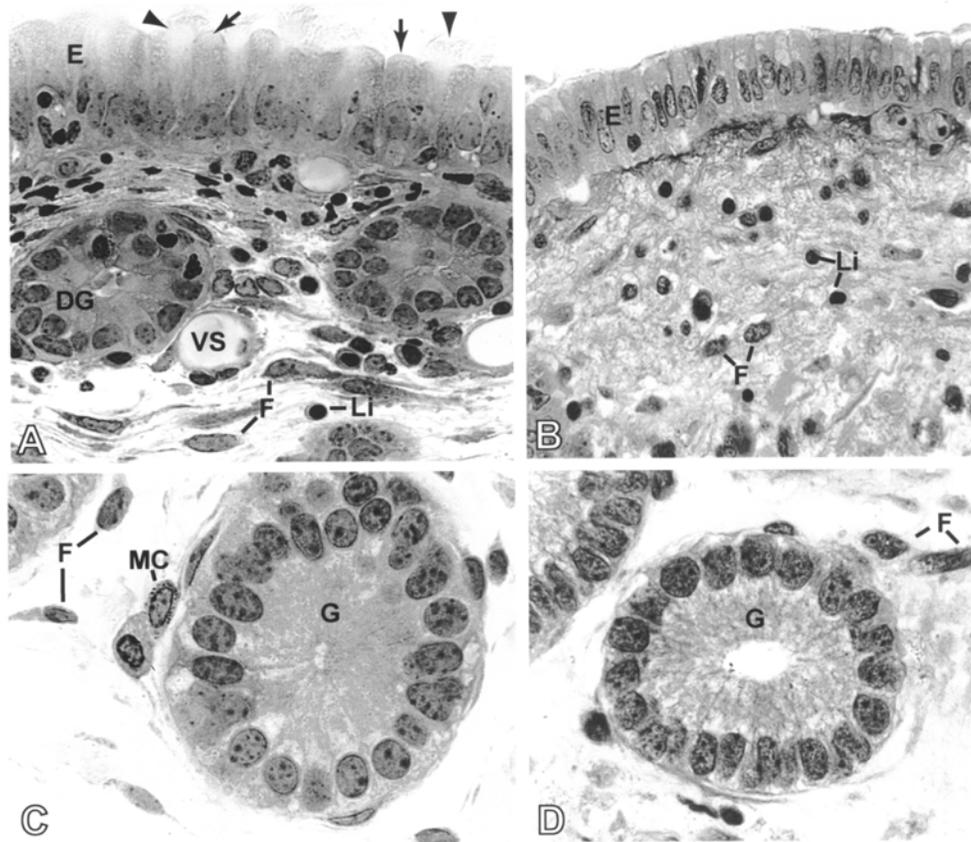


Figura 1. Fotomicrografias de biópsia do endométrio de éguas em diestro, fixadas em formalina (A e C) e Bouin (B e D), incluídas em resina plástica e coradas com azul de toluidina-borato de sódio. A – No epitélio de revestimento (E), células secretoras (setas) e células ciliadas (cabeças de seta) são distintamente observadas. Na lâmina própria, os feixes de fibras colágenas se dispõem ordenadamente no mesmo sentido do núcleo dos fibroblastos (F). B – Células secretoras e ciliadas não são distinguíveis no epitélio de revestimento (E) devido à ausência de cílios. Na lâmina própria, feixes de fibras colágenas e fibroblastos (F) estão dispostos desordenadamente. C e D mostram cortes transversais de glândulas endometriais (G). Notar em C que a heterocromatina e o citoplasma encontram-se mais homogêneos que em D. DG, ductos de glândulas endometriais; VS, vasos sanguíneos; Li, linfócitos; MC, mastócito. A e B, 520x; C e D, 1.000x.

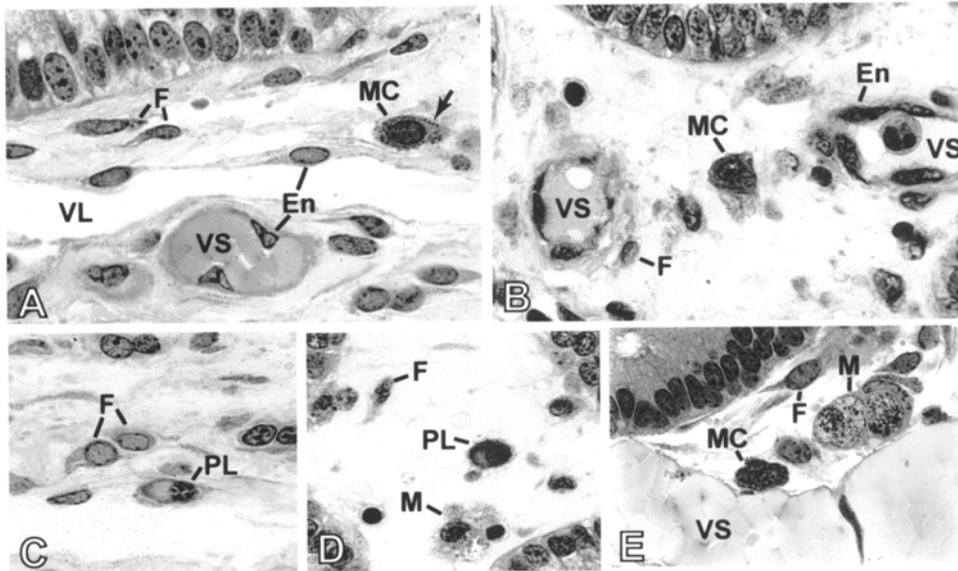


Figura 2. Fotomicrografias comparando a preservação citológica de constituintes da lâmina própria do endométrio de éguas em diestro após fixação em formalina (A, C e E) e em Bouin (B e D). Notar em A que os feixes de fibras colágenas e os fibroblastos (F) estão ordenados, os núcleos das células endoteliais (En) bem preservados e o mastócito (MC) apresenta grânulos citoplasmáticos bem evidentes (seta), ao contrário do observado em B. Em C, um plasmócito (PL) é facilmente identificado, ao contrário do observado em D. Em D, observa-se também a presença de um macrófago (M) com limites celulares pouco definidos, enquanto em E os limites celulares são bem definidos e o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos citoplasmáticos. VS, vaso sanguíneo; VL, vaso linfático. A – D, 1.000×; E, 700×.

Outro fator metodológico que influenciou os resultados obtidos foi a utilização de um meio de inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (GMA). O GMA é hidrossolúvel e de fácil manipulação, além de apresentar uma série de vantagens sobre os métodos usuais à base de parafina (Feder, O'Brien, 1968; Cole, Sykes, 1974; Bennett et al., 1976; Woodruff, Greenfield, 1979; Fox et al., 1985). O processamento de tecidos biológicos para microscopia de luz utilizando-se a parafina como meio de inclusão apresenta algumas desvantagens: é necessário o emprego do xilol, que é um solvente da parafina altamente prejudicial à célula, e o uso de temperaturas elevadas durante o processo, o que prejudica a definição histológica do material em estudo. A fixação de tecidos com paraformaldeído e a sua inclusão em GMA melhora a resolução das imagens ao microscópio de luz, tornando-as semelhantes às imagens

obtidas com pequenos aumentos na microscopia eletrônica de transmissão (Junqueira, 1995).

O grau de retração tecidual foi outro fator relacionado ao tipo de fixador utilizado. A altura média do epitélio de revestimento obtida nas biópsias fixadas em Bouin foi 28% menor ($P < 0,05$) do que nas biópsias fixadas em formalina, independente da fase do ciclo estral (Tab.1). Este achado confirma a melhor estabilização estrutural de tecidos fixados em formalina através de uma amarração que as moléculas fixadoras fazem sobre as macromoléculas tissulares, ao contrário da solução de Bouin que precipita e altera a configuração das proteínas, levando à retração do tecido (Sesso, 1998).

Embora a microscopia de luz não permita a utilização de grandes aumentos para estudo da biologia das células e tecidos, a inovação das

técnicas de processamento histológico tem possibilitado maior resolução dos detalhes celulares. Amaral (2002) obteve resultados morfológicos e morfométricos bastante acurados no estudo do endométrio da égua processado com formalina/GMA, em função da qualidade final do material analisado.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que os constituintes celulares e teciduais do endométrio da égua, observados em fragmentos incluídos em resina plástica, apresentam melhor resolução para estudos citológicos pormenorizados ao microscópio de luz quando são fixados em formalina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D. *Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI*. 2002. 65f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BENNETT, H.S.; WIRINCK, A.D.; LEE, S.W. et al. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol.*, v.51, p.71-97, 1976.
- BRACHER, V.; ALLEN, W.R. Videoendoscopic examination of the mare's uterus, I: findings in normal fertile mares. *Equine Vet. J.*, v.24, p.274-278, 1992.
- COLE, M.B.; SYKES, S.M. Glycol methacrylate in light microscopy: a routine method for embedding and sectioning animal tissue. *Stain Technol.*, v.49, p.387-400, 1974.
- FEDER, N.; O BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.*, v.55, p.123-142, 1968.
- FERREIRA, R.M.A.; CHIARINI-GARCIA, H. Efeito da fixação e do meio de inclusão na preservação histológica do intestino da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *Rev. Bras. Ciênc. Morfol.*, v.9, p.32-37, 1992.
- FOX, C.H.; JOHNSON, F.B.; WHITING, J. et al. Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.33, p.845-853, 1985.
- JUNQUEIRA, L.C.U. Histology revisited – Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciênc. Cult.*, v.47, p.92-95, 1995.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on equine early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.172, p.241-262, 1978.
- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. 1143p.
- LOCQUIN, M.; LANGERON, M. *Handbook of microscopy*. London: Butterworths, 1983. 322p.
- RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J. Reprod. Fertil. (Supl.)*, v.23, p.341-345, 1975.
- RICKETTS, S.W.; ROSSDALE, P.D.; SAMUEL, C.A. Endometrial biopsy studies of mares with contagious equine metritis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.160-166, 1978.
- SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual Norte Fluminense, 1998. p.1-17, cap. I.
- WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.201, p.438-440, 1992.
- WOODRUFF, B.A.; GREENFIELD, S.A. Advantages of glycol methacrylate embedding systems for light microscopy. *J. Histotechnol.*, v.2, p.167-167, 1979.