

Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero

Effective strategy of the testis fixation in Wistar rat to evaluate the morphological and morph metric parameters of seminiferous epithelium

Marta Aparecida Pannocchia¹; Maria Inês Borella²; Antonio Carlos Martins de Camargo³; Joyce Meire Gilio⁴; Carlos Alberto da Silva⁵

¹ Iniciação Científica do CAT/Cepid – Instituto Butantan

² Pesquisadora e docente do departamento de biologia celular e do desenvolvimento – ICB/USP

³ Diretor e Pesquisador do CAT/Cepid – Instituto Butantan

⁴ Mestranda do programa de pós-graduação em Biologia molecular da UNIFESP e Centro de Toxinologia Aplicada, CAT/Cepid – Instituto Butantan

⁵ Diretoria de Ciências da Reabilitação – Uninove

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Carlos Alberto da Silva
Centro de Pós-Graduação - Diretoria do Mestrado em Ciências da Reabilitação
Av. Francisco Matarazzo, 612 - Água Branca
05001-100 - São Paulo - SP [Brasil]

E-mail:

lescovar@uninove.br

RESUMO

O testículo de mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese, e a análise dos túbulos seminíferos (parâmetros morfológicos e morfométricos) é uma estratégia simples para avaliar alterações nesse processo. Assim, as estratégias de coleta, fixação e coloração da amostra biológica (tecido) são fundamentais para preservar as características morfológicas e garantir a eficácia da análise e precisão do diagnóstico. Entretanto, a fixação do material biológico é uma das etapas mais críticas na preparação histológica, principalmente no testículo. O objetivo, neste trabalho, foi avaliar diferentes estratégias de fixação do testículo para padronizar uma técnica adequada às análises morfológicas do epitélio seminífero de ratos. Ratos da linhagem Wistar foram sacrificados, e os testículos, coletados em diferentes protocolos de fixação. A perfusão com glutaraldeído 4% e inclusão do tecido pela técnica de historesina foram considerados os métodos mais apropriados para realizar o processamento histológico, pois a morfologia dos túbulos seminíferos e o compartimento intersticial foram preservados.

Descritores: Agentes fixadores; Epitélio seminífero; Espermatogênese; Glutaraldeído 4%; Testículo.

ABSTRACT

Testis of mammals is a susceptible organ to environmental toxic or therapeutic agents that compromise spermatogenesis process, and seminiferous tubules analysis (morphological and morph metric parameters) is a simple strategy to evaluate changes in the process. Therefore, strategies for collection, fixation and staining of the biological sample (tissue) are essential to preserve the morphological characteristics and ensure the effectiveness of the analysis and accuracy of diagnosis. However, the fixation of biological material is one of the most critical steps in histological preparing, mainly in the testis. Thus, the objective of this study was to evaluate different strategies for fixing the testis to an appropriate technique for the analyses of the morphological seminiferous epithelium of rats. Wistar rats were sacrificed and the testis collected according to various protocols for fixation. The perfusion with glutaraldehyde 4% and inclusion by historesin technique were the most appropriate methods to achieving histological processing, as the seminiferous tubules morphology and interstitial compartment were preserved.

Key Words: Fixation; Glutaraldehyde 4%; Seminiferous epithelium; Spermatogenesis; Testis.

INTRODUÇÃO

A organização estrutural do testículo é altamente conservada entre os mamíferos e nela são encontrados dois compartimentos principais: o tubular, avascular, sem inervações e constituído pela túnica própria (células mióides, fibras colágenas e a membrana basal), epitélio seminífero e lúmen; e o intersticial ou intertubular em que se localizam as células de Leydig produtoras de esteróides, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibroblastos, fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, mastócitos¹.

O epitélio seminífero, revestindo a superfície interna dos túbulos seminíferos, é formado por dois tipos celulares distintos: as células da linhagem germinativa e as de Sertoli, de linhagem somática, responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas². No compartimento tubular, as células germinativas estão dispostas de forma concêntrica, o que faz com que as células imaturas fiquem próximas da membrana basal em outro compartimento: o basal (CB), e as mais maduras, no adluminal (CA) que termina no lúmen do túbulo seminífero³.

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado e complexo que ocorre nos túbulos seminíferos e passa por três fases essenciais: a primeira, a proliferativa, em que as células sofrem sucessivas e rápidas divisões mitóticas; a segunda, a meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado; por fim, a espermiogênica, em que células haplóides (espermatídes) se diferenciam em espermatozóides – célula altamente especializada e estruturalmente equipada para alcançar e fertilizar o oócito¹.

As células espermatogênicas encontram-se arranjadas nos túbulos seminíferos, de forma organizada e bem definida, constituindo associações celulares que caracterizam estádios do ciclo do epitélio seminífero. Na maioria dos mamíferos, o arranjo dos estágios desse ciclo é segmentado, e normalmente existe apenas

um estágio por corte transversal do túbulo⁴. O conjunto dos diferentes estágios do ciclo ao longo dos túbulos seminíferos, conhecido nos mamíferos como onda espermatogênica, está relacionado, por exemplo, à liberação constante de espermatozóides, à redução da congestão de espermatozóides, se a espermiogênese ocorresse sem sincronização, e à manutenção do fluxo constante de fluido do túbulo seminífero⁵.

A identificação dos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese. É importante para a compreensão da espermatogênese normal bem como para a determinação de fases específicas do processo que possam ser afetadas por um determinado tratamento ou droga⁶. A duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente constante para uma determinada espécie, entretanto varia entre espécies diferentes; por exemplo, em ratos são 14 estágios. Para um ciclo completo são necessários 13 ciclos⁴.

O testículo humano é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese por diferentes mecanismos, como alterações na espermiogênese, indução da apoptose nas células gaméticas, azoospermia e até infertilidade⁷. Na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de diferentes substâncias ou das disfunções na espermatogênese, a análise histopatológica do testículo é considerada uma das estratégias mais tradicionais para analisar os parâmetros morfológicos (aspecto qualitativo do epitélio seminífero) e morfométricos (aspecto quantitativo do epitélio seminífero) dos túbulos seminíferos em condições patológicas ou de diferentes tratamentos em comparação com os indivíduos normais⁴. Nesse contexto, as estratégias de coleta, fixação e coloração da amostra biológica (tecido) são fundamentais para preservar as características morfológicas e garantir a eficácia da análise e precisão do diagnóstico.

Considerando o modelo de estudo para avaliar possíveis alterações nos processos envolvidos na espermatogênese⁸ dos ratos, a análise

dos parâmetros morfológicos e morfométricos do compartimento tubular no testículo revela-se uma estratégia simples e efetiva no diagnóstico. Entretanto, a fixação do material biológico é uma das etapas mais críticas na preparação histológica, principalmente no testículo. O testículo de mamíferos é recoberto externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, e o grande espaço linfático no interior do testículo do rato dificulta a fixação desse órgão⁴, exigindo uma metodologia específica de fixação para sua preservação; por isso, o objetivo, neste trabalho, foi avaliar diferentes estratégias de fixação do testículo para padronizar uma técnica adequada às análises morfológicas do epitélio seminífero de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos machos, da linhagem Wistar, pesando de 270 – 350g (n=15), fornecidos pelo Biotério Central convencional com barreiras sanitárias do Instituto Butantan, foram utilizados para a realização dos ensaios. Os animais foram mantidos com livre acesso à alimentação e à água e sob fotoperíodo a um ciclo luz-escuro (12 horas cada), em estante ventilada com exaustão (ALESCO), no Biotério de Experimentação Convencional de Mamíferos, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), do Instituto Butantan.

ESTRATÉGIAS DE FIXAÇÃO DOS TESTÍCULOS

Imersão em Líquido de Bouin e inclusão em parafina

Ratos adultos machos, da linhagem Wistar, foram sacrificados com superdosagem de Xilazina® e Ketamina® (1:1) na dose de 0,6ml/300g da massa corpórea do animal, de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e, em segui-

da, submetidos a uma incisão abdominal (laparotomia longitudinal mediana retroumbilical) para expor os testículos à cavidade abdominal e coletá-los. Os testículos foram coletados e fixados em Líquido de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%) por 4,5 horas, seccionados transversalmente com o auxílio de um bisturi e mantidos por mais 4,5 horas no mesmo fixador. Na seqüência, os testículos foram lavados em água destilada para retirar o excesso de fixador e colocados por 24 horas no etanol 70%. Após a desidratação em concentrações alcoólicas crescentes (etanol 70% - 99%), o material foi incluído em parafina⁹. Os cortes histológicos (5 µm de espessura), obtidos por meio de micrótomo automático LEICA RM 2155 e corados pela técnica de Tricrômico de Mallory¹⁰, sendo, posteriormente, desidratados, diafanizados e montados em lâmina aderida à lâmina de vidro com bálsamo do Canadá^{11,12}. Os preparados histológicos foram analisados, e as imagens, capturadas em fotomicroscópio Zeiss Axioskop².

Imersão em glutaraldeído 4% e inclusão em parafina

Os animais foram sacrificados de acordo com a descrição do item Imersão em Líquido Bouin e inclusão em parafina, e seus testículos, fixados em glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,3, por 24 horas, sendo seccionados transversalmente após quatro horas de imersão. O material foi incluído, e os cortes histológicos, obtidos de acordo com o item anterior.

Perfusão com Líquido de Bouin e inclusão em parafina

Os animais foram anestesiados com Ketamina/ Xilazina 4:1, 0,6 ml por 300g de massa do animal e passaram por perfusão intracardíaca com salina 0,9%, por aproximadamente 25 minutos. Em seguida, a salina foi substituída pelo fixador Líquido de Bouin por mais 25 minutos e, depois, coletados e recortados os testículos, inseridos, por 24 horas, no mesmo fixador e lavados. O material foi

incluído, e os cortes histológicos, obtidos de acordo com o primeiro item destas estratégias.

Perfusão com glutaraldeído 4% e inclusão em parafina

Os animais foram anestesiados com Ketamina/ Xilazina 4:1, 0,6 ml por 300g de massa do animal e passaram por perfusão intracardíaca com salina 0,9%, por aproximadamente 25 minutos. Em seguida, a salina foi substituída pelo fixador glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,3, por mais 25 minutos. Na seqüência, coletaram-se e recortaram-se os testículos, sendo incluídos no mesmo fixador por 24 horas. O material foi inserido, e os cortes histológicos, obtidos de acordo com o primeiro item destas estratégias.

Perfusão com glutaraldeído 4% e inclusão em historesina

Os animais foram anestesiados com Ketamina/ Xilazina 4:1, 0,6 ml por 300g de massa do animal e passaram por perfusão intracardíaca com salina 0,9%, por aproximadamente 25 minutos. Em seguida, a salina foi substituída pelo fixador glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,3, por mais 25 minutos. Após esse período, foram coletados e recortados os testículos e inseridos no mesmo fixador por 24 horas e, após serem desidratados em concentrações alcoólicas crescentes (álcool 70% ao álcool 99%), incluídos no procedimento de historesina. Os cortes histológicos (2 µm de espessura) foram obtidos do micrótomo automático LEICA RM 2155 com navalha de vidro. Em seguida, foram lavados em água destilada (temperatura ambiente) para serem colhidos em lâminas de vidro. Os cortes corados, por meio do método de Hematoxilina/ Eosina¹³, foram desidratados, diafanizados e montados em lamínula aderida à lâmina de vidro com bálsamo do Canadá^{11, 12} e, por fim, os preparados histológicos foram analisados e as imagens capturadas em fotomicroscópio Zeiss Axioskop 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A geração de novos métodos contraceptivos masculinos não-hormonais tem ocupado grande destaque nos estudos da reprodução humana. Alguns enfocam a inibição da espermatogênese, a maturação das espermátides, a motilidade dos espermatozoides, a alteração dinâmica dos complexos juncionais presentes na barreira hematotesticular ou no bloqueio da capacidade de o espermatozóide fecundar o ócito^{14, 15}.

As alterações nas dinâmicas das junções celulares, presentes na barreira hematotesticular de mamíferos, podem alterar todo o processo de espermatogênese, levando até a degeneração de células germinativas¹⁴. O estudo de moléculas que alteram a dinâmica das junções celulares presentes na barreira hematotesticular abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos com propriedades contraceptivas em animais, incluindo humanos, por esse motivo, inicialmente, estudam-se os aspectos morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero nos cortes histológicos provenientes dos testículos de ratos tratados pela via de administração intratesticular e intraperitoneal. Este estudo descreve algumas estratégias para a fixação e preparação histológica do testículo de ratos como ferramenta para avaliação das substâncias que interferem na espermatogênese.

Nos laboratórios de análises clínicas são realizados periodicamente exames histopatológicos que recorrem à histologia para avaliar, por observação microscópica, os aspectos morfológicos de diferentes tecidos provenientes de autópsia, cirurgia ou biópsia. Vários são os métodos de estudo dos tecidos, variando do estudo dos tecidos *in vivo* até aqueles que utilizam os tecidos mortos. O método mais utilizado em histologia é o preparado histológico permanente (lâmina histológica), e as principais etapas para a obtenção de lâminas histológicas são: coleta da amostra, fixação, processamento, desidratação, diafanização, inclusão, microtomia, colagem do corte à lâmina, coloração e

montagem¹⁶, sendo a fixação do tecido uma das etapas mais críticas do protocolo, pois os tratamentos do material biológico com fixadores inadequados podem alterar as características morfológicas do tecido, não preservando a integridade das células, comprometendo, assim, o diagnóstico. De fato, como pode ser visualizado na Figura 1, a utilização de diferentes fixadores inadequados alteraram significativamente os aspectos morfológicos dos testículos.

O primeiro método de fixação utilizado foi a imersão em Líquido de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%), seguida da inclusão do material em parafina. Como ilustra a Figura 1 (A e A1), o compartimento intersticial não foi preservado após esse procedimento. Da mesma forma, na utilização do glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,3 por imersão e emblocamento em parafina, a fixação foi insatisfatória, pois o espaço linfático e as características morfológicas das células germinativas não foram preservadas com o glutaraldeído 4% (Figuras 1 -B e B1).

A perfusão prévia do animal com salina 0,9% antes da coleta dos testículos, seguida da utilização de um fixador (Líquido de Bouin ou glutaraldeído 4%) também não foram satisfatórias. A primeira tentativa foi com Líquido de Bouin e inclusão em parafina. Apesar de obter melhores resultados, pois foi possível visualizar as de células de Leydig no compartimento intersticial, os cortes não foram fixados de forma uniforme (Figura 1 – C e C1). Da mesma forma, a fixação através de perfusão com glutaraldeído 4% e o tecido emblocado em parafina também não foram satisfatórios, pois houve incompatibilidade do fixador com a parafina (Figura 1 – D e D1), como descrito na literatura³.

Por outro lado, a perfusão com glutaraldeído 4% e inclusão do tecido pela técnica de historesina foi o método mais adequado para realizar o processamento histológico, pois a morfologia dos túbulos seminíferos e o compartimento intersticial foram preservados (Figura 2). Como ilustra a Figura 3, observaram-se a integridade

das células germinativas em desenvolvimento (espermatogônias e espermatócitos primários) no compartimento basal (CB) e as células germinativas mais maduras (espermatócitos secundários, espermatídes circulares e alongadas) no compartimento adluminal (CA), características fundamentais para a avaliação morfológica e morfométrica do epitélio seminífero.

A análise dos parâmetros morfométricos dos testículos são de extrema importância, pois confirmam quantitativamente as características morfológicas. Nesta análise, são necessários 30 túbulos seminíferos circulares no estágio VII/VIII do ciclo do epitélio germinativo, selecionados aleatoriamente³, para caracterizar o diâmetro dos túbulos seminíferos (em μm), altura do epitélio germinativo (em μm) e o diâmetro do lúmen dos túbulos seminíferos (em μm). Além disso, para análise quantitativa dos diferentes tipos celulares são utilizadas as mesmas imagens utilizadas no estudo da morfometria¹⁷, assim como, para avaliação da capacidade de suporte das células de Sertoli¹⁸. Feitas essas observações, verifica-se que o protocolo de perfusão com glutaraldeído 4% e a inclusão do tecido pela técnica de historesina proporcionarão, em estudos futuros, a avaliação de substâncias de interesse durante a espermatogênese com relação aos parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero de ratos.

CONCLUSÃO

A perfusão com glutaraldeído 4% e inclusão do tecido pela técnica de historesina foi o método mais adequado para realizar o processamento histológico, pois foram preservadas tanto a integridade das células germinativas em desenvolvimento no compartimento basal quanto as células germinativas mais maduras no compartimento adluminal, características fundamentais para a avaliação morfológica e morfométrica do epitélio seminífero. Por isso, o protocolo descrito proporcionará, em estudos

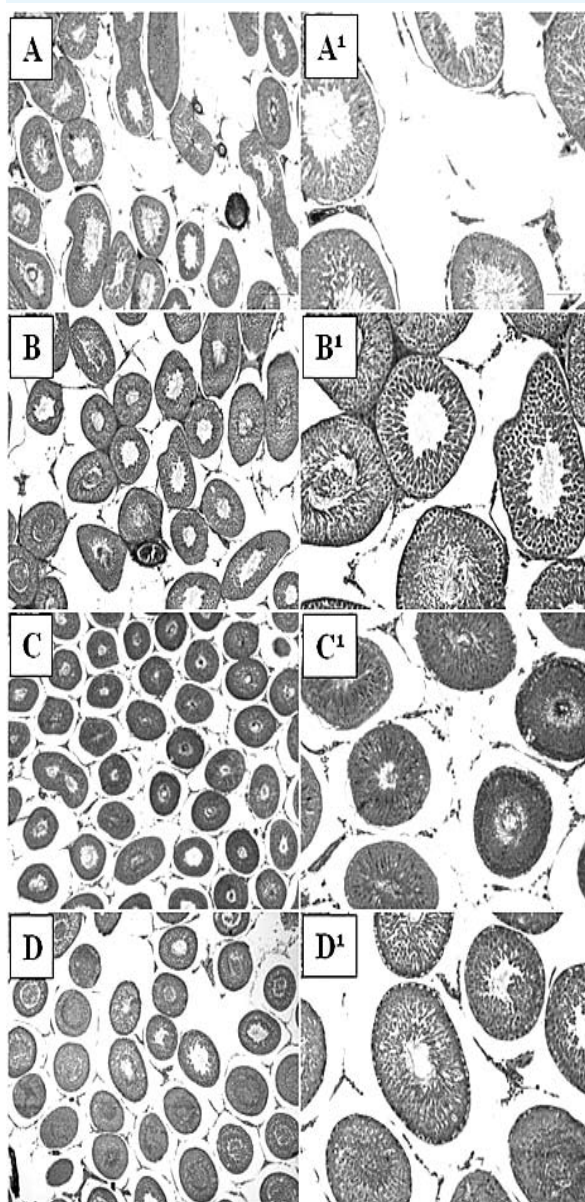


Figura 1: Aspectos morfológicos do compartimento intersticial e dos túbulos seminíferos dos testículos de ratos Wistar com diferentes estratégias de fixação. A) Testículo fixado por imersão em Bouin e incluído em parafina (aumento de 40x e 100x); B) Testículo fixado por imersão em glutaraldeído 4% e incluído em parafina (aumento de 40x e 100x); C) Testículo fixado por perfusão com Bouin e incluído em parafina (aumento de 40x e 100x); D) Testículo fixado por perfusão com glutaraldeído 4% e incluído em parafina (aumento de 40x e 100x)

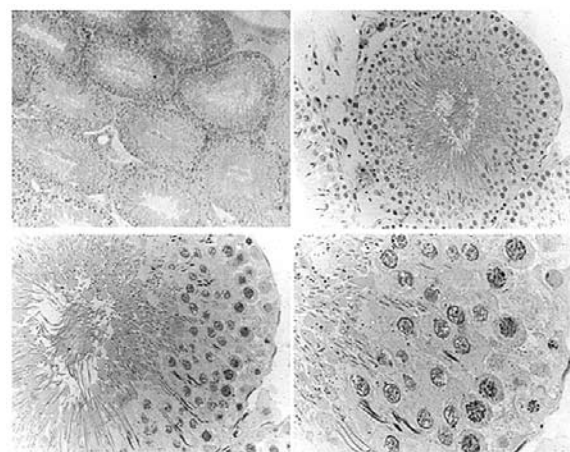


Figura 2: Fotomicrografias de testículo de rato da linhagem Wistar fixado por perfusão com glutaraldeído 4% e incluído pela técnica de historesina. a) aumento em 40x; b) aumento em 100x; c) aumento em 200x; d) aumento em 400x. observar a preservação do compartimento intersticial e as células germinativas

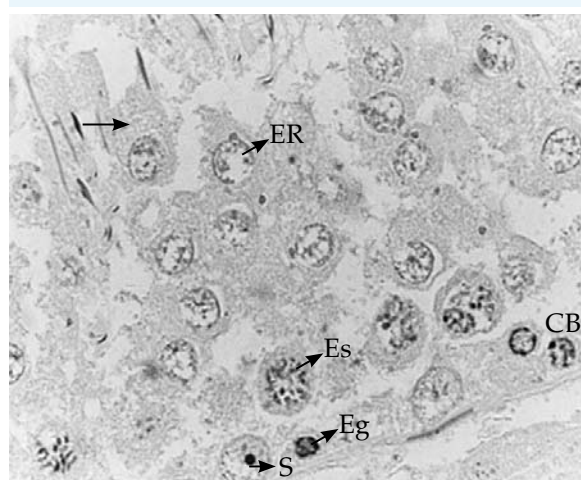


Figura 3: Aspectos morfológicos do epitélio seminífero do testículo de ratos da linhagem Wistar fixado após por perfusão com glutaraldeído 4% e incluído pela técnica de historesina. Os compartimentos e as células estão preservados. Compartimento basal (CB), compartimento adluminal (CA), lúmen (LU), célula de Sertoli (S), espermatogônia (Eg), espermatócito (Es), espermatíde arredondada (ER), espermatíde alongada (EA)

futuros, a avaliação de substâncias de interesse que interferem na espermatogênese.

REFERÊNCIAS

- Pelletier MR, Vitale LM. Las uniones oclusivas de las barreras hematotisulares del testículo, epidídimo y conducto deferente. Sociedad Argentina de Andrologia. Dec. 2003; Buenos Aires; 12(4):53-72.
- França LR, Garcia CH. Célula de Sertoli. In: Carvalho, H. F; Buzato, C. B. Células: uma abordagem multidisciplinar. 1. ed. Barueri: Manole, 2005:302-324.
- Yan HH, Mruk DD, Cheng CY. Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Curr Top Dev Biol.* 2008;80:57-92.
- Russel DL; Ettlin AR, Hikim SPA, Clegg DE. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1990, Cache River Press. 1990; 119-161.
- Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy research and technique.* Set. 1995; Hoboken; 32:385-422.
- Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci May.* 1977;44 (5): 818-33.
- Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005; (34):6-8.
- Amann RP. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Toxicol.* Jan-Feb. 1982;2(1):13-26.
- Pesce CM. The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. *Semin. Diagn. Pathol. Nov.* 1987;4(4):264-74.
- Junqueira LCU. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciênc. & Cult.* 1995. São Paulo; 47:92-5.
- Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1976. São Paulo: Edusp, p. 255.
- Michelani J. Operações Fundamentais da técnica histológica. In: Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: E.P.U. 1980:22-31.
- Cooper G, Schuller AL. Anatomy of the guinea pig. Cambridge, Mass. Harvard: University Press. 1975:417.
- Lee NP, Mruk DD, Wong CH, Cheng CY. Regulation of Sertoli-Germ Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis via the Nitric Oxide Synthase/Cyclic Guanosine 5'- Monophosphate/Protein Kinase G/ β -Catenin Signaling Pathway: An In Vitro and In Vivo Study. *Biol Reprod. Sep.* 2005;73:458-471.
- Sitruk-Ware, R. Delivery options for contraceptives. *Drug Discov Today.* Jul. 2005;10(14):977-85.
- Kierszenbaum AL. Histology and cell biology - an introduction to pathology. 1^a ed. Mosby; 2002.
- Medina CM, Souza CL, Caperuto CL, Anhô FG, Amanso MA, Teixeira APV, Bordin S, Carpinelli RA, Brito GRL, Barbieri LR, Borella IM, Carvalho ORC. Dehydroepiandrosterone increases β -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Letters, Heidelberg.* Jan. 2006;580(1):285-290.
- França LR, Godinho MR. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod. May.* 2003;68(5):1554-61.



