



A influência da fixação na demonstração do glicogénio

Ana T. Gasalho¹, Joana M. Silva¹, Margarida S. Mendes¹, Carina A. Ladeira¹
1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Correspondência para Margarida Mendes - e-mail: fenix.msm@gmail.com

RESUMO

A fixação é fundamental para a preservação dos tecidos e é o primeiro passo de uma técnica histológica de rotina cujo objectivo final é obter uma boa visualização das estruturas e, no caso da anatomia patológica, um diagnóstico. Algumas substâncias presentes nos tecidos, como é o caso do glicogénio, necessitam de uma solução fixadora específica capaz de prevenir a dispersão das suas moléculas, sendo a fixação do glicogénio favorecida se essa solução contiver álcool ou ácido pícrico na sua constituição. A preservação do glicogénio é fundamental porque da sua identificação podem depender diagnósticos, utilizando-se colorações histoquímicas como o Periodic Acid Schiff (PAS) e o Carmim de Best para a sua visualização.

Este estudo pretende comparar a qualidade da demonstração do glicogénio com PAS e Carmim de Best, em tecidos fixados com diferentes soluções fixadoras.

O estudo foi efectuado a partir de cortes histológicos de fígados de porco, fixados em formol 10%, formol 10% tamponado, formol alcoólico, solução de Bouin e solução de Gendre, e procedeu-se à análise estatística das avaliações feitas às lâminas.

As soluções fixadoras que apresentaram melhores resultados para ambas as colorações foram o formol 10% tamponado e a solução de Gendre.

Foi possível concluir que numa fixação de 24 horas, o formol 10% tamponado pode ser utilizado com um risco mínimo de comprometer a preservação e demonstração do glicogénio. Em alternativa a esta solução fixadora, utilizada na rotina laboratorial, a solução de Gendre mostrou ser um fixador eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Fixação; Glicogénio; Periodic Acid Schiff (PAS), Carmim de Best.

INTRODUÇÃO

A fixação é um processo que tem como objectivo a preservação dos tecidos, evitando os avanços dos fenómenos de autólise e ataque bacteriano, sendo fundamental para a realização da técnica histológica e consequente obtenção de um diagnóstico. O fixador mais utilizado em histopatologia é o formaldeído, na forma de formol 10% tamponado, o qual pode também ser conjugado com outros reagentes, formando outras soluções, como é o caso do formol alcoólico em que se adiciona álcool, e o caso das soluções de Bouin e de Gendre em que se adiciona ácido pícrico. Na fixação de algumas substâncias pode ser necessária a utilização de uma solução fixadora específica com propriedades diferentes do fixador de rotina, que impeça a dispersão das suas moléculas e permita uma imagem histológica próxima do tecido *in vivo*. O glicogénio é um exemplo de uma substância susceptível à dispersão, onde a fixação com soluções aquosas pode originar perdas de 60-80% desta molécula. A sua

preservação é geralmente favorecida por fixadores que contenham álcool ou ácido pícrico, e que actuam sobre os grânulos de glicogénio tendendo a conferir-lhes um aspecto mais grosseiro do que após uma fixação com formol [1].

O glicogénio é um polissacarídeo que funciona como a principal forma de armazenamento de energia e é composto por múltiplas unidades de glicose, absorvidas e convertidas pelos hepatócitos [2]. Segundo uma das teorias da fixação do glicogénio, esta é conseguida com a remoção de moléculas de água pelos agentes fixadores, no entanto, a teoria mais conhecida considera que a preservação do glicogénio é alcançada através da fixação de proteínas associadas, retendo o glicogénio pela formação de uma matriz ou tornando-o insolúvel através do estabelecimento de ligações covalentes [1, 3].

Em cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina (HE), o glicogénio surge na forma de depósitos translúcidos que são identificados no citoplasma como espaços vazios de bordos irregulares, tornando a sua detecção

apenas possível com recurso a técnicas histoquímicas como o PAS ou o Carmim de Best [4]. O PAS é a técnica mais versátil e amplamente usada, apesar de não corar de magenta apenas o glicogénio, mas também muitas outras substâncias. O Carmim de Best é altamente selectivo mas não específico, corando o glicogénio de vermelho [1, 2].

A fixação influencia as colorações histoquímicas, na medida em que alguns fixadores aumentam ou inibem a absorção de corantes através da modificação das proteínas do tecido, isto é, a difusão do corante é afectada pelos radicais reactivos que são expostos ou mascarados pelo rearranjo proteico (desnaturação) que ocorre durante a fixação [5].

O objectivo geral deste estudo foi comparar a qualidade da demonstração histoquímica do glicogénio em tecidos fixados com diferentes soluções fixadoras, por se considerar que a fixação tem uma importância fundamental na adequada demonstração histoquímica do glicogénio, uma vez que perdas resultantes de uma má fixação podem condicionar, no caso específico do fígado, o diagnóstico de doenças do armazenamento do glicogénio, ou glicogenoses de tipo hepático (tipos I, III e VI), e a distinção de alguns tumores, como adenomas hepáticos [1, 6, 7].

Os objectivos específicos foram:

- Identificar qual dos fixadores - formol 10%, formol 10% tamponado, formol alcoólico, solução de Bouin e solução de Gendre - melhor se adequa à demonstração histoquímica do glicogénio em amostras de fígado coradas com PAS e Carmim de Best, avaliando a “Quantidade geral de glicogénio no tecido”, “Intensidade de coloração”, “Definição dos grânulos de glicogénio” e “Preservação da morfologia celular”;
- Identificar qual das colorações histoquímicas permite uma melhor distinção do glicogénio.

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica de amostragem do estudo foi não probabilística por conveniência, seleccionando-se três fígados de porco, pela necessidade de um órgão de fácil recolha, representativo da presença de glicogénio e com histologia semelhante à humana. Assim, de cada um dos fígados foram colhidos 5 fragmentos de dimensões 1,5cmx1,5cmx0,5cm, que totalizaram uma amostra de 15 fragmentos, distribuída pelos 5 fixadores. Após a fixação de 24 horas efectuou-se o processamento automático das amostras e a inclusão em

parafina, tendo-se obtido 4 cortes histológicos de 3µm a partir de cada bloco para as colorações HE, PAS, PAS com diastase e Carmim de Best. A coloração HE foi utilizada como controlo da fixação e arquitectura dos tecidos, enquanto o PAS com diastase serviu como controlo PAS negativo.

Estudaram-se as variáveis dependentes “Quantidade geral de glicogénio no tecido” (“QGG”), “Intensidade de coloração” (“IC”), “Definição dos grânulos de glicogénio” (“DG”) e “Preservação da morfologia celular” (“PM”), que estão definidas na Tabela I, bem como a variável dependente “Avaliação global” (“AG”), posteriormente criada.

Quantidade geral de glicogénio no tecido	• Maior ou menor presença de glicogénio nos hepatócitos e na generalidade do tecido
Intensidade de coloração	• Facilidade de distinção do glicogénio em relação ao contraste utilizado
Definição dos grânulos de glicogénio	• Aspecto e dimensão dos grânulos, de finos a grosseiros
Preservação da morfologia celular	• Conservação da arquitectura normal do tecido
↓	
Avaliação Global	• Qualidade da demonstração do glicogénio para as colorações de PAS e de Carmim de Best, e que resulta do somatório das outras variáveis dependentes

Tabela I - Definição das variáveis dependentes.

A fixação com diferentes tipos de soluções fixadoras – formol 10%, formol 10% tamponado, formol alcoólico, solução de Bouin e solução de Gendre – e a coloração histoquímica – PAS e Carmim de Best – foram as variáveis independentes.

As lâminas coradas com PAS e Carmim de Best foram entregues a três observadores independentes para avaliação cega com recurso à grelha de avaliação. A avaliação da marcação histoquímica elaborou-se em escala diferencial semântica para as variáveis “QGG”, “IC”, “DG” e “PM”.

No sentido de se proceder ao tratamento estatístico das avaliações foram atribuídos valores de 1 a 5 a cada item das grelhas, constituindo escalas de medida ordinal, considerando-se 1 o pior resultado e 5 o melhor da escala.

Introduziram-se os dados obtidos no programa informático SPSS 15.0, admitindo-se as avaliações dos observadores para cada lâmina como resultados independentes, e calcularam-se as modas e medianas de cada combinação de variáveis independentes para cada variável dependente.

Partindo das medianas realizaram-se gráficos de barras verticais em Microsoft Office Excel 2007

para cada coloração, demonstrando a relação entre os fixadores e os parâmetros avaliados, e entre os fixadores e a avaliação global das lâminas. Para verificar as diferenças entre os fixadores e os parâmetros de avaliação das lâminas nas colorações, foi aplicado às medianas o teste estatístico de Kruskal-Wallis, relacionando a variável independente nominal "Soluções fixadoras" com cada uma das variáveis dependentes ordinais, considerando-se $\alpha=0,05$ e $H_0 =$ "Não existe relação entre a solução fixadora utilizada e a variável dependente".

A partir das hipóteses nulas rejeitadas no teste anterior aplicou-se o teste de Mann-Whitney, relacionando para cada coloração as categorias da variável independente "Soluções fixadoras" com a variável dependente. Considerou-se $\alpha=0,05$ e $H_0 =$ "Não existe diferença entre as duas soluções fixadoras na variável dependente x para a coloração y".

RESULTADOS

Nas lâminas coradas com PAS (Gráfico I) e Carmim de Best (Gráfico II), os fixadores com melhores medianas na globalidade dos parâmetros avaliados, e conseqüentemente com melhor "AG" (Gráfico III), foram a solução de Gendre e o formol 10% tamponado.

Os piores resultados foram discordantes nas duas colorações realizadas. Enquanto na coloração de PAS foi o formol 10% com medianas mais baixas, na coloração de Carmim de Best foi o formol alcoólico.

Na coloração de PAS, o único parâmetro em que se verificou a existência de uma relação com a solução fixadora utilizada foi a "IC", observando-se uma diferença entre a utilização de formol 10% e as soluções de formol alcoólico e de Gendre. Já na coloração de Carmim de Best, verificou-se uma relação entre a solução fixadora utilizada e os parâmetros "QGG", "IC" e "AG", revelando que as soluções fixadoras com piores resultados, formol 10% e formol alcoólico, são significativamente inferiores em relação às restantes soluções.

A utilização de formol alcoólico demonstra ser inferior em relação a todas as outras soluções fixadoras em estudo no parâmetro "QGG" e em relação ao formol 10% tamponado, solução de Bouin e solução de Gendre nos parâmetros "IC" e "AG". Ainda na "IC", verifica-se que os resultados do formol 10% são inferiores em relação aos do formol 10% tamponado e aos da solução de Bouin.

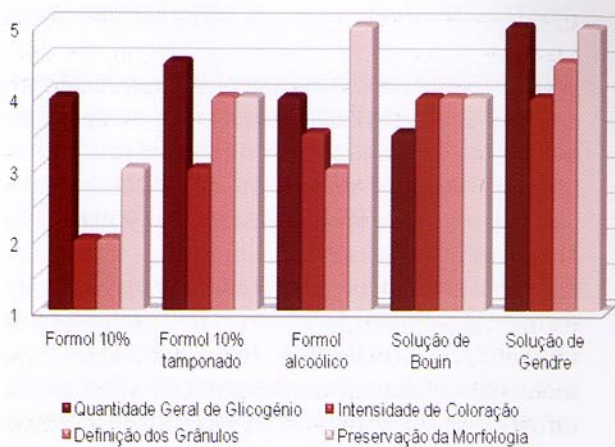


Gráfico I - Comparação das medianas dos resultados da coloração de PAS para cada parâmetro avaliado nas diferentes soluções fixadoras.

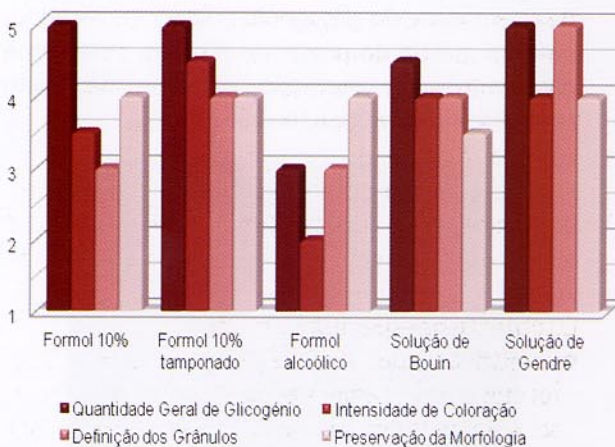


Gráfico II - Comparação das medianas dos resultados da coloração de Carmim de Best para cada parâmetro avaliado nas diferentes soluções fixadoras.

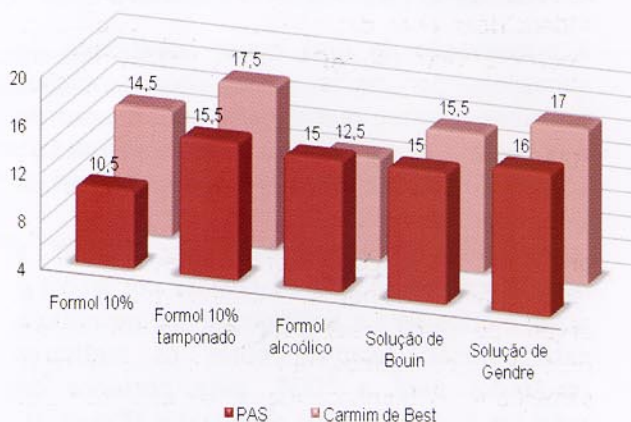


Gráfico III - Comparação das medianas da "Avaliação global" das lâminas, nas colorações de PAS e Carmim de Best, para as diferentes soluções fixadoras.

DISCUSSÃO

As soluções fixadoras que, de modo geral, apresentaram melhores resultados para ambas as colorações, com medianas mais elevadas nos parâmetros analisados no estudo, sobretudo na "QGG" e na "DG", foram o formol 10% tamponado e a solução de Gendre.

Os bons resultados verificados na solução de Gendre podem ser justificados por incluir na sua constituição formaldeído, álcool e ácido pícrico, que possibilitam a preservação de maior quantidade de glicogénio. A melhor preservação poder-se-á dever simultaneamente às duas teorias da fixação aceites, existindo extracção de água dos tecidos pelo componente alcoólico da solução e retenção do glicogénio a partir da fixação das proteínas associadas. Esta última teoria será aquela que permite ao formol 10% tamponado obter uma manutenção considerável da quantidade de glicogénio (Figura 1), retendo-o numa matriz de proteínas fixadas, resultante das pontes de metileno estabelecidas pelo formaldeído durante a fixação.

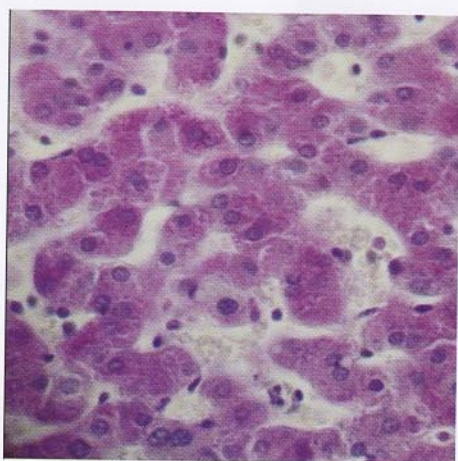


Figura 1 - Melhores resultados obtidos para a coloração de PAS (Formol 10% tamponado, 40x).

A preservação de uma maior quantidade de glicogénio por parte destas duas soluções fixadoras resultou numa maior conservação de estruturas reactivas e permitiu, conseqüentemente, bons resultados ao nível da intensidade de coloração.

De forma similar ao observado para a "QGG", a constituição da solução de Gendre por álcool e ácido pícrico será a justificação que permitiu a esta solução fixadora obter os melhores resultados para a "DG", pela presença de grânulos mais grosseiros e definidos (Figura 2). Estas observações em relação à solução de Gendre vão ao encontro do esperado, uma vez que esta solução fixadora já foi referida em outros estudos como sendo favorável à preservação e visualização do glicogénio.

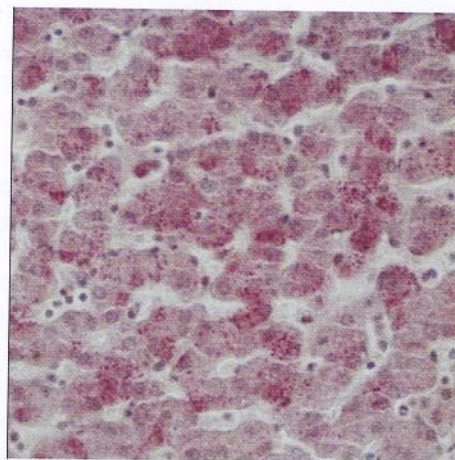


Figura 2 - Aspecto dos grânulos de glicogénio na coloração de Carmum de Best (Solução de Gendre, 40x).

Apesar de se verificar em ambas as colorações que os melhores resultados foram os do formol 10% tamponado e da solução de Gendre, observando o gráfico que compara as "AG", é visível que estas soluções têm avaliações superiores no Carmum de Best. Este facto pode possivelmente ser explicado pela maior facilidade de distinção da marcação histoquímica do Carmum em relação à cor magenta do PAS, devido ao contraste com as restantes estruturas coradas. No entanto, o Carmum de Best obriga ao manuseamento no interior da hotte por toxicidade dos reagentes, tendo uma utilização menos prática.

A análise dos piores resultados permite verificar que nem o formol 10% nem o formol alcoólico apresentam medianas abaixo do valor médio da escala para a "QGG", sendo relativamente bons; no entanto, os resultados na "IC" e "DG" reduzem as suas avaliações globais.

Tendo em conta a bibliografia consultada e o estudo realizado por Trott [8], os resultados do formol alcoólico na coloração de Carmum de Best são inesperados, devido à constituição da solução. O formaldeído e o álcool deveriam proporcionar uma boa retenção do glicogénio, sendo previstos resultados aproximados aos obtidos com a solução de Gendre, e ainda a observação de grânulos de glicogénio grosseiros e bem definidos, devido à componente alcoólica do fixador. Já o formol 10% não surpreende que apresente menor mediana na "DG", uma vez que é conhecido que na fixação com formol os grânulos se apresentam com aspecto mais fino. Apesar das limitações do estudo, devidas à propensão do glicogénio para sofrer alterações provocadas pela autólise, ao tempo decorrido até à fixação e ainda a não validação das grelhas de resposta para recolha das avaliações, e de

alguns resultados inesperados, foi possível concluir, através dos parâmetros analisados, que os fixadores que melhor se adequaram à demonstração histoquímica do glicogénio nas amostras de fígado foram o formol 10% tamponado e a solução de Gendre. Estas soluções fixadoras demonstraram um balanço positivo dos parâmetros de demonstração do glicogénio considerados necessários a um diagnóstico mais fiável de patologias associadas a este. Sendo já o formol 10% tamponado a solução fixadora de rotina laboratorial, é possível também concluir que, para uma fixação de 24 horas, este é adequado e pode ser utilizado com um risco mínimo de comprometer a preservação e demonstração do glicogénio. Por outro lado, a solução de Gendre demonstrou ser uma alternativa eficaz ao formol 10% tamponado, com resultados bastante elevados e equiparáveis, mas a ser evitada devido à sua maior toxicidade.

De futuro, seria interessante alargar esta investigação à aplicação destes e de outros fixadores a outros órgãos, com variações nos tempos de fixação, procurando verificar se os fixadores aferidos neste estudo para tecido hepático podem ser aplicados noutros tecidos contendo glicogénio, e se fixações prolongadas podem favorecer umas soluções em detrimento de outras, onde o glicogénio possa ser perdido ao longo do tempo.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos Paula Casimiro e Gilberto Matias pela valiosa contribuição através da observação e avaliação das lâminas histológicas. À professora Elisabete Carolino (ESTeSL) pela preciosa ajuda no tratamento estatístico dos resultados obtidos. À técnica Dora Pinto, do Hospital Curry Cabral, pelo apoio na idealização deste estudo.

Ainda à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e à Coordenadora da Área Científica de Anatomia Patológica, mestra Paula Mendonça, pela disponibilização do espaço e equipamento, bem como pela cedência de material e reagentes necessários à realização deste projecto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bancroft J., Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 5ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
2. Bancroft J., Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2008.
3. Leong A. Fixation and fixatives. In: Woods A. E., Ellis R. C. editors. Laboratory Histopathology: A Complete Reference. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.
4. Cormack D. Ham's Histology. 9º ed. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1987
5. Bancroft J., Cook H. Manual of histological techniques and their diagnostic application. 2ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.
6. Filipe M., Lake B. Histochemistry in Pathology. 2ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1990.
7. Kasper D. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16ª ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.
8. Trott J. An Evaluation of Methods Commonly Used for the Fixation and Staining of Glycogen. J Histochem Cytochem 1961; 9 (6): 703-710