

Análise da expressão de TGF α (*Transforming Growth Factor Alpha*) nas células germinativas e a frequência de células de sertoli em touros de raças sintéticas com alteração na qualidade seminal

Marilise Mesquita HORN¹
José Carlos Ferrugem
MORAES²
Maria Isabel Albano
EDELWEISS¹

1 - Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre – RS
2 - Embrapa Pecuária Sul, Bagé - RS

Correspondência para:
MARILISE MESQUITA HORN
Centro de Pesquisas
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350, 1º andar
CEP 90035-903 - Porto Alegre - RS
mmhorn@uol.com.br

Recebido para publicação: 30/08/2004
Aprovado para publicação: 23/08/2005

Resumo

O fator de crescimento transformante alfa (TGF α) é uma molécula da família dos fatores de crescimento transformantes, que tem sido apontado como provável regulador do desenvolvimento testicular. A hipótese do presente estudo foi de que touros de raças sintéticas com deficiente qualidade seminal apresentam um padrão de expressão de TGF α e uma frequência média de células de Sertoli, diferentes quando comparados aos touros com adequada qualidade seminal. Foram utilizados para o estudo, testículos de seis touros Braford e oito touros Brangus-Ibagé com e sem problemas na qualidade seminal. A técnica de imuno-histoquímica foi empregada para determinar a expressão de TGF α no epitélio seminífero e também para marcar o núcleo das células de Sertoli, com o uso do anticorpo monoclonal TGF α (Ab-2; Calbiochem) e anticorpo policlonal anti-proteína S100 (DAKO). A média geral de espermatogônias marcadas pelo anticorpo foi diferente para raça: 9.2 ± 0.4 para Braford e 11.0 ± 0.3 para Brangus-Ibagé ($P < 0.05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as fases analisadas. A média de células de Sertoli foi similar entre as raças de touros. Porém houve uma interação significativa ($P < 0.05$) entre raça e condição reprodutiva, representada por uma menor frequência de células Sertoli nos touros Brangus-Ibagé considerados aptos à reprodução. Este achado que pode ser um indicador de que a origem da menor qualidade de sêmen nestes animais de raças sintéticas deve estar desvinculada da fase embrionária ou neonatal, já que é nesta fase que o número de células de Sertoli é estabelecido para o indivíduo adulto. O entendimento das interações celulares do epitélio seminífero, envolvendo os fatores de crescimento no controle parácrino da espermatogênese, requer não somente a identificação do local de expressão destes fatores, como também o seu significado *in vivo*.

Palavras-chave:

Fatores de crescimento.
Degeneração testicular. Qualidade seminal.
Raças sintéticas.
Bovinos.

Introdução

A constatação de animais com alterações na qualidade do sêmen, mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo que outros com perfeitas condições reprodutivas, motiva a busca de conhecimento sobre a origem da variabilidade quanto a aptidão reprodutiva. Exemplos são os estudos sobre

a correlação entre as características e a predição da fertilidade^{1,2,3,4,5,6}. O controle local da espermatogênese inclui interações entre as células de Sertoli, células germinativas e mióides e entre as células de Leydig e macrófagos^{7,8}. Adicionalmente moléculas de sinalização intercelular denominados fatores de crescimento têm sido verificados em testículos de ratos recém nascidos e

prepúberes e também participam na regulação da puberdade e desenvolvimento da espermatogênese, estimulando a proliferação celular, por mediação da ação do FSH⁹. A expressão de oito fatores de crescimento, entre eles o TGF α , foi detectada em testículos de cervo em diferentes estações do ano¹⁰. A identificação imuno-histoquímica do TGF α em testículos de ratos de várias idades já foi descrita¹¹. Em ratos recém nascidos foi observada intensa reação imunoistoquímica nas células de Leydig, o mesmo ocorreu com ratos com 21 dias e em ratos adultos. Porém, o gene do TGF α predominou nas fases precoces do desenvolvimento testicular e regrediu durante a puberdade. A identificação do fator de crescimento TGF α no testículo, foi descrita além dos ratos^{7,9,12}, em camun-dongos¹³, cervos¹⁰ e humanos¹⁴. Embora estes estudos comprovem que o testículo é um local de produção de TGF α , o papel potencial deste fator é ainda incerto, pois ainda são necessárias evidências conclusivas *in vivo*.

A população de células de Sertoli é definida no final da gestação e logo após o nascimento^{15,16}, constituindo uma população fixa em tamanho após a puberdade e diretamente relacionada à população de células germinativas¹⁷. As células de Sertoli produzem fatores essenciais à maturação das células germinativas *in vitro* relacionados à síntese de RNA e DNA¹⁸. As células de Sertoli secretam inúmeros fatores e apresentam imunoreatividade às proteínas vimentina, citoqueratina, hormônio anti-muleriano¹⁹ e proteínas S100a e b²⁰. Esta imunoreatividade facilita a identificação destas células permitindo sua avaliação quantitativa.

Os objetivos são: verificar a presença do TGF α no epitélio seminífero de bovinos adultos, e, estando presente, investigar sua utilidade como um indicador da função testicular em touros de raças sintéticas. E adicionalmente investigar a população de células de Sertoli em touros aptos e inaptos à reprodução.

Materiais e métodos

Foram utilizados testículos de seis touros

Braford e oito Brangus-Ibagé, de dois anos de idade, provenientes de duas propriedades localizadas em Uruguaiana e Dom Pedrito no Rio Grande do Sul. Os animais foram previamente classificados em aptos e inaptos à reprodução de acordo com a qualidade seminal, nas propriedades de origem, segundo as recomendações da Portaria n° 26 de 05/09/1996, www.agricultura.gov.br. Os animais incluídos neste estudo como aptos à reprodução foram descartados por aspectos zootécnicos e os inaptos à reprodução por má qualidade de sêmen, sendo abatidos em um frigorífico. Logo após o abate, foram coletadas amostras de um testículo de cada animal, colocadas em fixador de Bouin por 24 horas, seguido de tratamento padrão para confecção de blocos de parafina. Os cortes com a espessura média de 4mm foram colados em lâminas que receberam um tratamento prévio de água corrente e imersão em uma solução aquosa de 15% de goma de caseína. Foram utilizados dois anticorpos primários, o anticorpo monoclonal anti-TGF α (Ab-2; Calbiochem) e o policlonal anti-proteína S100 (DAKO), em uma diluição de 1:20 e 1:300 respectivamente. Os controle positivos do TGF α e S100 foram respectivamente pele humana e tecido neuronal. Os controles negativos foram o mesmo corte de testículo, porém sem o anticorpo primário. Os cortes foram desparafinizados e rehidratados. A recuperação antigênica foi realizada através de irradiação por forno de microondas em solução tampão citrato pH 6, em potência máxima. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através de banhos em solução de 5% de peróxido de hidrogênio. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado através da imersão das lâminas em leite desnatado a 5% em PBS. Na seqüência, foi colocado o anticorpo primário, que foi deixado durante a noite em câmara úmida escura a 4 °C. Após este período foi colocado o anticorpo secundário por 30 minutos em câmara úmida escura, e após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com estreptoavidina por mais 30

minutos (Kit LSAB, DAKO). A revelação da reação foi realizada com solução substrato de diaminobenzidina (Kit DAB, DAKO). As lâminas foram contrainformadas com solução de Hematoxilina de Mayer por 20 segundos.

A análise histológica do ciclo espermatogênico foi realizada empregando-se uma classificação proposta por Horn, Moraes e Edelweiss, et al⁶. Neste sistema o estágio I é caracterizado pelas mitoses das espermatogônias em pré-leptoteno e espermatócito leptoteno e espermatídes arredondadas ou levemente alongadas; o estágio II é caracterizado pela fase meiótica, quando ocorrem as divisões celulares reducionais e as células passam de espermatócitos para espermatídes jovens e o estágio III é representado pela fase da maturação onde ocorre a transformação das espermatídes em espermatozoides.

Foram observados 528 túbulos, para identificar e quantificar as células imunoreativas ao anticorpo TGF α , e o respectivo estágio de cada túbulo seminífero. Foram observados 440 cortes de túbulos, para quantificar as células de Sertoli que foram marcadas com a utilização do anticorpo S100, e a frequência em cada estágio do túbulo seminífero. O diâmetro dos túbulos variou entre 2-9 mm, tendo sido medido com uma régua milimetrada ao microscópio. O número de células marcadas pelo TGF α e o número de células de Sertoli identificados pelo S100 foi submetido à análise de variância considerando-se os fatores raça, condição reprodutiva e estágio do ciclo espermatogênico, ajustados para o diâmetro dos túbulos (co-variável). As análises foram efetivadas empregando-se o programa estatístico NCSS 6.0.²¹

Resultado e Discussão

Dentre todos os tipos de células germinativas no epitélio seminífero, apenas as espermatogônias expressaram o fator de crescimento TGF α . Considerando as duas raças, a média geral de espermatogônias

marcadas pelo anticorpo foi diferente ($P < 0.05$). Para a Braford foi de $9,2 \pm 0,4$ e para a raça Brangus-Ibagé $11,0 \pm 0,3$. Porém, considerando-se a classificação dos touros quanto à qualidade seminal, os touros aptos e inaptos não apresentaram diferença quanto à expressão de TGF α . Para os Braford a média dos touros aptos e inaptos foi respectivamente de $9,4 \pm 0,7$ e $8,9 \pm 0,5$ e para os Brangus-Ibagé de $11,1 \pm 0,6$ e $11 \pm 0,4$.

A média de espermatogônias que expressaram TGF α nos diferentes estádios do ciclo espermatogênico foi diferente ($P < 0.05$). Os estádios I, II e III apresentaram médias de respectivamente $12,4 \pm 0,5$; $7,0 \pm 0,5$ e $10,9 \pm 0,4$. Além disso, foi observada uma interação significativa entre raças e estádios que está apresentada na figura 1.

A utilização do anticorpo S100 foi eficaz para marcar o núcleo das células de Sertoli e facilitar a contagem destas células nos diferentes túbulos nos touros aptos e inaptos, evitando-se equívocos. As médias entre raças Braford e Brangus-Ibagé foram respectivamente $15,9 \pm 0,3$ e $15,6 \pm 0,3$ e para os animais aptos e inaptos respectivamente $15,6 \pm 0,3$ e $16 \pm 0,2$. Tendo sido constatada uma interação significativa ($P < 0.05$) entre raça e condição reprodutiva (figura 2):

A marcação do TGF α , dentro dos túbulos seminíferos, ficou claramente definida nas espermatogônias (figura 3). No entanto, foi observada marcação para TGF α no citoplasma das células de Sertoli, notadamente nos túbulos em degeneração (figura 4). O S100 marcou as células de Sertoli, diferenciando-as das demais células da base do epitélio do túbulo seminífero (figura 5).

O presente estudo demonstra que o TGF α está presente nos testículos de bovinos, especificamente nas espermatogônias e, ainda que se encontra em frequência similar nos animais com qualidade seminal normal ou alterada. Os presentes resultados incluem os bovinos no rol das espécies em que a identificação do fator de crescimento TGF α já foi descrita nos testículos, tais como ratos^{7,12}, camundongos¹³, cervos¹⁰ e humanos¹⁴. A busca de alguma associação

entre a identificação do fator de crescimento TGF e alterações na qualidade seminal não têm sido alvo de estudo em mamíferos. A maior expressão de TGF α foi observada nos estádios I e III, e a menor expressão no estágio II onde ocorrem as meioses e uma menor frequência de espermatogônias está presente na base do epitélio. As espermatogônias marcadas pelo TGF α estiveram em maior frequência, portanto, nos estágio proliferativo e de maturação, reiterando as conclusões de Wong et al.²² sobre a população celular em proliferação, que seria o alvo potencial para identificação da expressão de fatores de crescimento.

A diferença significativa observada entre raças, demonstra que a raça Braford apresenta menor média de espermatogônias expressando o TGF α quando comparada com a raça Brangus. De acordo com prévios estudos sobre a classificação quanto à qualidade seminal, foi demonstrado que a raça Braford apresenta um percentual maior de descarte por alterações na qualidade seminal que a raça Brangus⁴. Uma menor expressão de fatores de crescimento no

testículo desta raça, pode ser uma explicação para a detecção de alterações qualitativas no sêmen, uma vez que estes fatores são produzidos pela ativação de determinados genes, que estimulam a proliferação celular, meiose e diferenciação, além de atuarem no controle da puberdade e espermatogênese^{10,23}. A interação observada entre raças e estádios demonstrada na figura 1 indica um comportamento diferencial na expressão do TGF α nos três estádios para cada grupo genético de touros. Os touros Brangus apresentaram maiores médias de expressão do TGF α no estágio I, e os Braford no estágio III. Estas diferenças indicam que os estádios do ciclo espermatômico, onde se concentram as proliferações espermatogoniais com expressão de TGF α , foram diferentes entre os genótipos de touros.

A frequência de células de Sertoli não foi diferente nos touros aptos e inaptos à reprodução. No entanto a figura 2 demonstra a interação entre raça e condição reprodutiva, sendo a média de células de Sertoli semelhante entre os touros Braford aptos e inaptos, porém superior nos touros

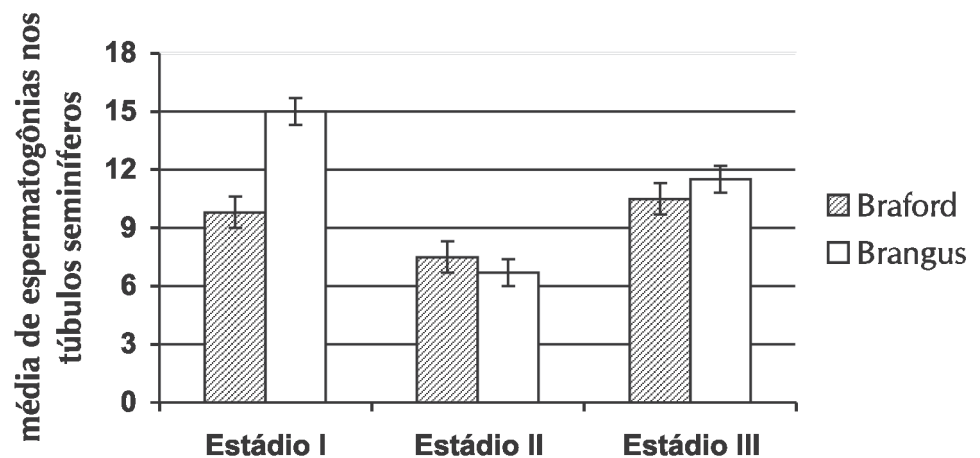


Figura 1- Número médio de espermatogônias expressando TGF α nos três estádios do ciclo espermatogênico nas duas raças sintéticas

	Apto	Inapto
Braford	16,2	15,7
Brangus-lbagé	15	16,3

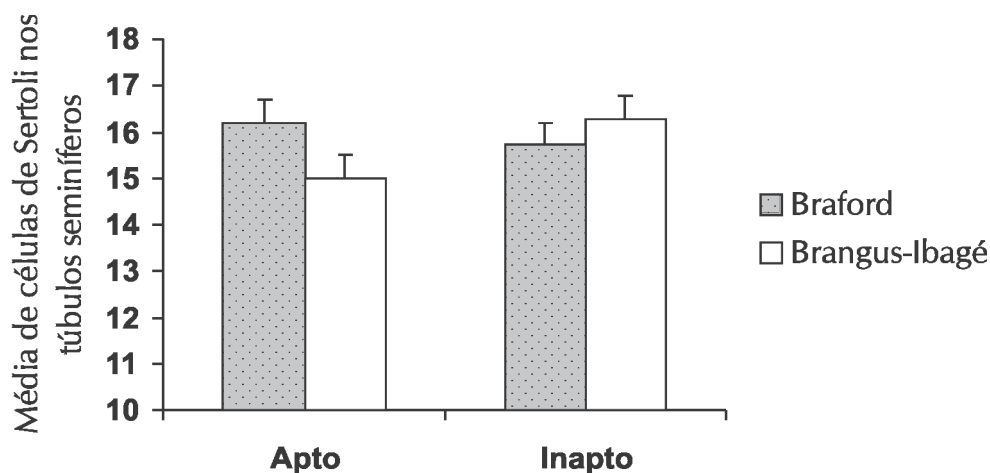


Figura 2 - Freqüência média das células de Sertoli nas duas raças de touros aptos e inaptos à reprodução

Raça	Estádio I	Estádio II	Estádio III
Braford	9,8	7,5	10,5
Brangus	15	6,7	11,5

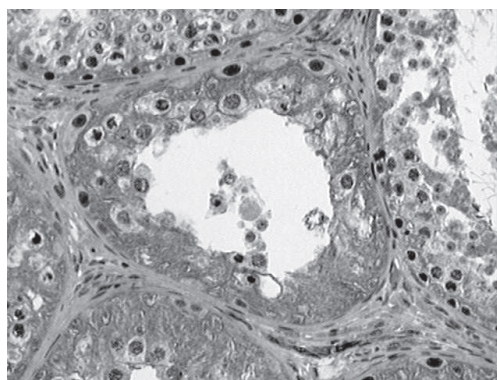


Figura 3 - Espermatogônias expressando TGF α (aumento de 200x)

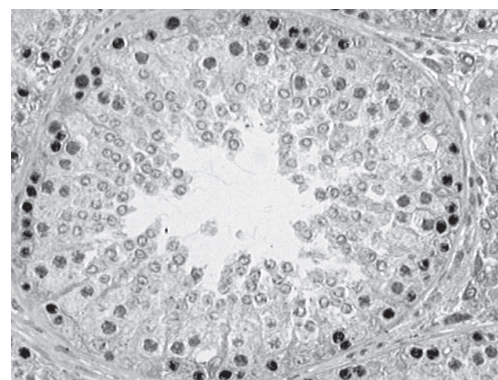


Figura 4 - Expressão de TGF α em corte de túbulo seminífero degenerado (aumento de 200x)

Brangus-Ibagé inaptos. As células de Sertoli são incapazes de multiplicação na fase adulta, e sua fase divisional se dá no período pré-natal ou pós-natal recente, ou seja, antes da primeira onda espermatogênica. A divisão destas células está regulada por dois fatores, o FSH e peptídeos opiáceos de origem testicular²⁴. Orth, Gunsalus e Lamparti¹⁷ observaram em ratos, que quando a população de células de Sertoli foi reduzida pela aplicação de um fármaco logo após o nascimento, o percentual de espermátides

redondas também diminuiu, o que pode ser reflexo de uma redução no recrutamento de espermatogônias ou degeneração das células germinativas, em função da população reduzida de células de Sertoli. Mesmo considerando a pequena diferença apenas para raça Brangus-Ibagé quanto ao número de células de Sertoli entre os touros aptos e inaptos, possivelmente a alteração relacionada à baixa qualidade seminal em touros inaptos, deve estar desvinculada da fase gestacional ou pós-natal.

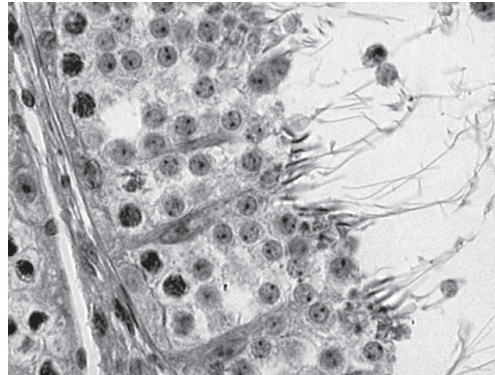


Figura 5 - Expressão da proteína S100 nas células de Sertoli (aumento de 200x)

Quanto aos detalhes dos achados imuno-histoquímicos, a figura 3 mostra que as únicas células germinativas do epitélio seminífero que expressaram TGF α foram as espermatogônias. As células em fase de pré-leptóteno na prófase meiótica não expressaram este fator. A figura 4 demonstra a expressão de TGF α no citoplasma das células de Sertoli, mais fortemente nos túbulos degenerados. Estes achados estão em concordância com os de Nakazumi et al.¹⁴, que encontraram em humanos, maior

expressão de TGF α no citoplasma das células de Sertoli de pacientes com distúrbios na espermatogênese. Este fato poderia estar relacionado a um efeito compensatório na expressão de TGF α , ou inapropriada inibição deste fator, em virtude de um desajuste local no epitélio seminífero. A figura 5 mostra a marcação da proteína S100 nas células de Sertoli. Esta marcação torna-se interessante no estudo das células de Sertoli, uma vez que estas células apresentam uma morfologia muito variada e complexa²⁵. Também as proteínas S100 regulam processos intracelulares como o ciclo celular, transcrição e diferenciação e são secretadas por células que exercem atividades extracelulares com efeitos parácrinos. Os genes do S100 foram identificados no cromossomo humano 1q21, onde anormalidades cromossômicas que resultam em uma alteração na expressão destes genes, estão associadas com neoplasias, incluindo ainda cardiomiopatias, desordens neurodegenerativas e câncer²⁶. As proteínas S100 são envolvidas em processos mediadores de Ca²⁺ mas o exato papel biológico delas ainda não está totalmente esclarecido²⁰.

Analysis of the TGF α (transforming growth factor alpha) expression in germinative cells and the frequency of Sertoli cells in bulls of synthetic breed with deficient seminal quality

Abstract

The transforming growth factor alpha (TGF α) is a molecule from the family of the transforming growth factors and has been pointed out as a probable regulator of testicular development. The hypotheses in the present study was that bulls from synthetic breeds with deficient seminal quality presented different TGF α expression and average number of Sertoli cells when compared to normal bulls. Testicles from six Braford and eight Brangus-Ibagé bulls with and without problems in semen quality were used. The immunohistochemical technique was employed to determine the TGF α expression in seminiferous epithelium and to mark the nucleus of the Sertoli cells with the use of respectively of monoclonal antibody anti-TGF α (Ab-2; Calbiochem) and anti-S100 protein polyclonal antibody (DAKO). The general average of spermatogonia marked by the antibody was different for each breed: 9.2 ± 0.4 for Braford and 11.0 ± 0.3 for Brangus-Ibagé. No difference regarding the expression of TGF α was found between sound and unsound bulls. The average number of Sertoli

Key-words:

Growth factors.
Testicular degeneration.
Semen quality.
Synthetic breeds.
Bovine

cells was similar between bull breeds. A smaller Sertoli cell population was found in the sound Brangus-Ibagé bulls, which may be an indication that the origin of the low seminal quality in synthetic bulls should be detached from the embryonic or the early newborn phase when the total number of such cells in adults is established. The understanding of cell interaction in the seminiferous epithelium, involving growth related factors, requires not only the identification of the expression site but also the *in vivo* meaning to spermiogenesis. The study of the growth factors in the testicle in adult bulls is worth further research in order to understand the regulation of spermiogenesis at the paracrine level in adult animals.

Referências

- 1 AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls: IV: spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 110, p. 69-78, 1962.
- 2 SAACKE, R. G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON AI AND ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1970, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1970. p.17-30.
- 3 SULLIVAN, J. J. Sperm numbers required for optimum breeding efficiency in cattle. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 3.,1970, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1970.p.36-43.
- 4 MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO, A. Avaliação andrológica em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, 1998.
- 5 FITZPATRICK, L.A. et al. Bull selection and use in northern Australia: Part 2: Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 39-49, 2002.
- 6 HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; EDELWEISS, M. I. Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com qualidade de sêmen normal e alterada. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p.1111-1115, nov.-dez. 2003.
- 7 SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 45-77, 1991.
- 8 GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. **Endocrine Reviews**, v 18, p. 541-609, 1997.
- 9 LEVINE, E. et al. Role of transforming growing factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 477-490, 2000.
- 10 WAGENER, A; BLOTTNER, S.; GÖRITZ, F.; FICKEL, J. Detection of growth factors in the testis of roe deer (*Capreolus capreolus*). **Animal Reproduction Science**, v.64, n.1-2, p.65-75, 2000.
- 11 TEERDS, K. J.; ROMMERTS, F. F. G.; DORRINGTON, J. H. Immunohistochemical detection of transforming growth factor-a in Leydig Cells during the development of the rat testis. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 69, R1-R6, 1990.
- 12 PETERSEN, C. Transforming growth factor-a stimulates proliferation of rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 181, p. 221-227, 2001.
- 13 TAJIMA, Y. et al. Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. **Internacional Journal of Andrology**, v. 18, n. 1, p. 8-12, 1995.
- 14 NAKAZUMI, H. et al. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human testis obtained from biopsy and castration: immunohistochemical study. **Tohoku Journal Experimental Medicine**, v. 178, p. 381-388, 1996.
- 15 CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**, v. 100, p. 241-267, 1957.
- 16 STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo in organ culture. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 84-87, 1971.
- 17 ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, p. 787-794, 1988.
- 18 RIVAROLA, M.; SANCHEZ, P.; SAEZ, J. Stimulation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis in spermatogenic cells by their coculture with Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 117, p. 1796, 1985.
- 19 STEGER, K.; REY, R.; KLIESCH, S.; LOUIS, F.; SCHLEICHER, G.; BERGMANN, M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell

markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 2, p.122-128, 1996.

20 CRUZANA, B. C. et al. Differential localization of immunoreactive a and b-subunits of S-100 protein in feline testis. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, v. 29, n. 2, p. 83-87, 2000.

21 HINTZE, J. L. NCSS 6.0. User´s guide. Kaysville, Utah,1996. 2204 p.

22 WONG, R. W.;et al. Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. **Journal Biology Chemical**, v. 275, p. 18297-18302, 2000.

23 ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 139-151, 2001.

24 ORTH, J. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by b-endorphin produced in the testis. **Endocrinology**, v. 119, p. 1876, 1986.

25 RUSSEL, L. D.; TALLON-DORAN, M.; WEBER, J.E.; WONG, V.; PETERSON, R. N. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. III. A study of specific cellular relationships. **American Journal of Anatomy**, v. 167, p. 181, 1983.

26 HEIZMANN, C. W.; FRITZ, G.; SCHAFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1356-1368, 2002.

27 SYED, V.; HECHT, N. B. Disruption of germ cell-Sertoli cell interations leads to spermatogenic defects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, p. 155-157, 2002.