

A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos

Variation of nitric oxide levels are related in the control of the complex junction dynamics of mice testis seminiferous epithelium

Joyce Meire Gilio¹; Maria Inês Borella²; Antonio Carlos Martins de Camargo³; Carlos Alberto da Silva⁴

¹ Mestranda do programa de pós-graduação em Biologia Molecular – Unifesp e do Centro de Toxinologia Aplicada – CAT/Cepid/Instituto Butantan.

² Pesquisadora e Docente do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP.

³ Diretor e Pesquisador do Centro de Toxinologia Aplicada – CAT/Cepid/Instituto Butantan.

⁴ Pesquisador e Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação – Uninove.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

São Paulo – SP [Brasil]
joycegilio@butantan.gov.br

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento do óxido nítrico (NO) na dinâmica da barreira hematotesticular, regulando as Junções de Oclusão (JO) via cGMP/proteína kinase G e as Junções Aderentes (JA), em parte, pela via de sinalização da Nitrous Oxido System ou óxido nítrico *sintetase* (NOS). Esses estudos demonstram claramente o interessante papel da NOS e NO na reestruturação das JAs, particularmente pela via de regulação da adesão celular no complexo de proteínas caderina2/catenina B (CDH2/CATNB)/actina, presentes no epitélio seminífero. Neste estudo, demonstramos que as variações dos níveis de NO no testículo de animais tratados com L-Name (inibidor da óxido nítrico sintase) e nitroprussiato de sódio (doador de NO) poderiam ser a justificativa para as alterações observadas no testículo e na espermatogênese, como descrito na literatura. Esses resultados confirmam a hipótese de que o NO regula a dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero.

Descritores: Epitélio seminífero; Espermatogênese; Óxido nítrico.

ABSTRACT

A molecular mechanism of action for NO in spermatogenesis has been proposed in recent studies showing that NO is likely to regulate Tight Junction (TJ) dynamics in the testis via the cGMP/protein kinase G and Adherens Junctions (AJ), in part, via the NOS signaling pathway. These studies have clearly illustrated the interesting role of NOS and NO in Sertoli-germ cell AJ restructuring, particularly in the way it regulates the cell adhesion of the CDH2/CATNB/actin protein complex in the seminiferous epithelium. In this work, we demonstrated that changes NO levels in the testes of mice treated with L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) and Sodium nitroprusside (NO donor) might be the cause for testes damage and disturbances of spermatogenesis as described in the literature. It confirms the hypothesis that NO regulates the junction complex dynamic in seminiferous epithelium.

Key words: Nitric oxide; Seminiferous epithelium; Spermatogenesis.

INTRODUÇÃO

Epitélio seminífero em mamíferos

O epitélio seminífero, presente nos túbulos seminíferos, é formado basicamente por dois tipos celulares distintos: as células da linhagem germinativa e as de Sertoli, responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas¹. As células germinativas estão dispostas de forma concêntrica, de modo que as imaturas se encontrem próximas da membrana basal em um Compartimento Basal (CB), e as células mais maduras, no Compartimento Adluminal (CA)². Já no intertubular, espaços entre os túbulos seminíferos, estão localizadas as células de Leydig (produtoras de esteróides), os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibroblastos, fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, mastócitos³.

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado e complexo que ocorre no epitélio seminífero e que passa por três fases essenciais. A primeira é a fase proliferativa que ocorre quando as células passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; a segunda é a fase meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado, e, por fim, ocorre a fase espermiogênica, na qual as células haplóides, no caso das espermátides, se transformam em espermatozóides, células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o oócito².

As células espermatogênicas ou germinativas se encontram 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 desses estádios é segmentado e, normalmente, existe apenas um estádio por corte transversal do túbulo³.

O epitélio seminífero apresenta diferentes estádios do ciclo ao longo dos túbulos seminíferos, conhecido nos mamíferos como

onda espermatogênica. A origem desse evento é desconhecida, mas parece ser resultado de uma sincrônica, mas não simultânea divisão de espermatogônias tronco em segmentos tubulares adjacentes⁴. Segundo Russel e colaboradores³, as funções dessa onda são: assegurar a liberação constante de espermatozóides; reduzir a competição por hormônios e metabólitos usados em um dado estágio e a congestão que poderia ocorrer ao longo do túbulo se a espermiogênese ocorresse simultaneamente; assegurar o fluxo constante de fluido do túbulo seminífero, mantendo o veículo para o transporte de espermatozóides e hormônios utilizados pelo epitélio do epidídimo, e facilitar a maturação dos espermatozóides no epidídimo por um fluxo constante de espermatozóides e fluidos vindos do testículo.

A identificação dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese. Além disso, 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 droga⁵. A duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente constante para determinada espécie; entretanto varia entre espécies. Para camundongos, por exemplo, são 12 estádios e, para um ciclo completo, são necessários 13 ciclos⁶.

Junções celulares e sua função na barreira hematotesticular

A barreira hematotesticular é constituída por um complexo juncional protéico que mantém a oclusão entre os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e permite que as células germinativas permaneçam em um ambiente imunoprivilegiado². A dinâmica dos complexos juncionais (abertura e fechamento) possibilita a migração das células primordiais (espermatócitos) do CB para o CA, por meio da barreira hematotesticular, assim como o impedimento da passagem de macromoléculas no-

civas ao processo espermatogênico⁷⁻⁸. Recentes estudos *in vivo/in vitro* relataram que o controle dos níveis de óxido nítrico (NO) produzido pelas células de Sertoli está diretamente envolvido na dinâmica das junções celulares da barreira hematotesticular⁷.

Considerando a importância do NO na dinâmica dos complexos juncionais, nesta pesquisa, objetivou-se avaliaram-se os efeitos da variação dos níveis de NO (aumento ou redução), com relação aos parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero de camundongos machos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamento

Camundongos da linhagem Swiss de 30-35g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, foram anestesiados com Xilazina® e Ketamina® (3:1) a cada 30g da massa corpórea do animal. Em seguida, os animais foram submetidos à incisão abdominal (laparotomia longitudinal mediana retro umbilical), e os testículos esquerdo (TE) e direito (TD) expostos à cavidade abdominal. Em seguida, foram administradas diretamente no parênquima testicular as seguintes soluções: salina 0,9% (20µL), no TD (controle); *Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-Name, inibidor da óxido nítrico sintase) ou Nitroprussiato de sódio (Nitro, doador de NO) no TE. Depois da cirurgia, os animais tiveram, por uma semana, acesso livre à alimentação e água, sob fotoperíodo, a um ciclo de luz-escuro (12 horas cada), no Biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada. Após esse período, os animais foram sacrificados e os testículos coletados para análise histológica. A utilização de animais, como descrito, foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais, do Instituto Butantan (CEUIB), protocolo n. 369/07.

Parâmetros morfológicos do epitélio seminífero de camundongos

As amostras dos testículos foram imersas em solução fixadora de Bouin (Formaldeído 4% com ácido pícrico), por 8h. Em seguida, o material foi desidratado em concentrações alcoólicas crescentes (álcool 70% ao álcool 95%), infiltrado e embocado em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos em 4µm de espessura por meio do micrótomo automático LEICA RM 2155 com navalha de aço. Na seqüência, os cortes foram lavados em água destilada (35°C) para serem colhidos em lâminas de vidro. Depois da desparafinização em estufa a 60°C, por 12 horas, foram hidratados em soluções alcoólicas decrescentes (álcool 99% ao álcool 70%) e corados por método de Tricrômico de Mallory (análise morfológica) e PAS – Hematoxilina (análise morfométrica)³. Os cortes foram diafanizados em Xilol 100% e montados com lamínula aderida à lâmina, com bálsamo do Canadá.

Parâmetros morfométricos do epitélio seminífero de camundongos

Para a morfometria, quatro túbulos seminíferos circulares nos estádios I, V, VII/VIII, e XII do ciclo do epitélio germinativo foram selecionados aleatoriamente, utilizando a metodologia do sistema acrossomal³. Os parâmetros morfométricos (diâmetro do lúmen, diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero) foram avaliados por meio do *software* Sigma Scan Pro 5 (Jandel Scientific Corporation, EUA). Os tipos celulares contados foram: espermatogônia, espermatócitos (paquíteno; pré-leptóteno e zigóteno), espermatídes circulares e células de Sertoli, pela metodologia descrita por Medina et al⁹. A eficiência da célula de Sertoli foi calculada para cada estágio de acordo com Russel e Peterson¹⁰.

Avaliação dos níveis de NO no extrato total protéico do testículo

A liberação de NO foi avaliada pelo acúmulo de nitrato e nitrito no extrato total de proteínas do testículo. Utilizaram-se camundongos machos da linhagem Swiss, com 30-35g (n=6). Inicialmente, os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca, e os testículos, coletados e homogeneizados em tampão gelado contendo Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, β -mercaptoethanol 12 mM e phenylmethylsulphonyl fluoride 1M (pH 7,4). Os homogenatos foram incubados por 1 hora com Nitro (1mM) e L-Name (1mM) para o volume final de 500 μ l. Em seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 1% a 4°C por 20 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g, por 7 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e alíquotas de 100 μ L, utilizadas para dosagem de NO. Após a redução de nitrato e nitrito, com uma solução saturada de Cloreto de Vanádio (VCl₃), em HCl 1 M, a 90°C, a concentração de NO foi determinada por quimiluminescência em fase gasosa, por meio da reação de NO com ozônio, usando o analisador de NO (NOA^{TM280}, Sievers Inc.). A concentração de nitrato foi determinada pela curva padrão de NaNO₃, utilizando o *Bag Program software 2.2* (Sievers Instruments Inc.)¹¹.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo método ANOVA, utilizando o teste de Bonferroni ou o T-student, quando necessário (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, Incorporation). Os critérios para o significado estatístico foram ajustados para P<0.05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Lee et al⁷ demonstraram o envolvimento do óxido nítrico (NO) na dinâmica da barreira hematotesticular, relatando que o NO regula a dinâmica das junções de oclusão (JO) via cGMP/

proteína quinase G, enquanto as junções aderentes (JA) são controladas, em parte, por meio de sinalização do NOS. Esses estudos demonstraram claramente o interessante papel do NOS e NO na reestruturação das JAs, particularmente pela regulação da adesão celular ao complexo de proteínas CDH2/CATNB/actina, presentes no epitélio seminífero⁷.

Neste estudo, observamos que o tratamento com o Nitro desorganizou o epitélio seminífero, promovendo o deslocamento de agregados celulares para o lúmen dos túbulos seminíferos no TE (Figura 1C e D), em comparação aos aspectos morfológicos observados no TD (controle) (Figura 1A e B). Além disso, observou-se degeneração de células germinativas, túbulos seminíferos atrofiados e hipoespermatogênicos. Não foram observadas alterações nas células de Leydig (Figura 1C e D). Por outro lado, o tratamento com o L-Name promoveu a redução do lúmen dos túbulos seminíferos, ruptura parcial do epitélio seminífero e desorganização das células germinativas (Figura 1E e F), em comparação ao controle (Figura 1A e B). Não se observaram modificações nos compartimentos basal e intertubular dos túbulos seminíferos. Dessa forma, os efeitos do Nitro (doador de NO) e L-Name (inibidor do NOS e, conseqüentemente, da produção de NO) no epitélio germinativo confirmam a importância do NO na dinâmica dos complexos juncionais, como descrito na literatura¹².

Os efeitos do Nitro e L-Name no epitélio seminífero também foram avaliados, levando em consideração os parâmetros morfométricos, para complementar a análise morfológica. De fato, os parâmetros morfométricos no TE/ Nitro apontam a redução significativa no número de células germinativas que residem no compartimento adluminal como os espermátócitos paquitênicos e espermátides circulares nos estádios I, V e VII/VIII, sendo mais evidente nos dois últimos estádios (Tabela 1). A altura do epitélio e o diâmetro do lúmen e dos túbulos seminíferos não foram determinados,

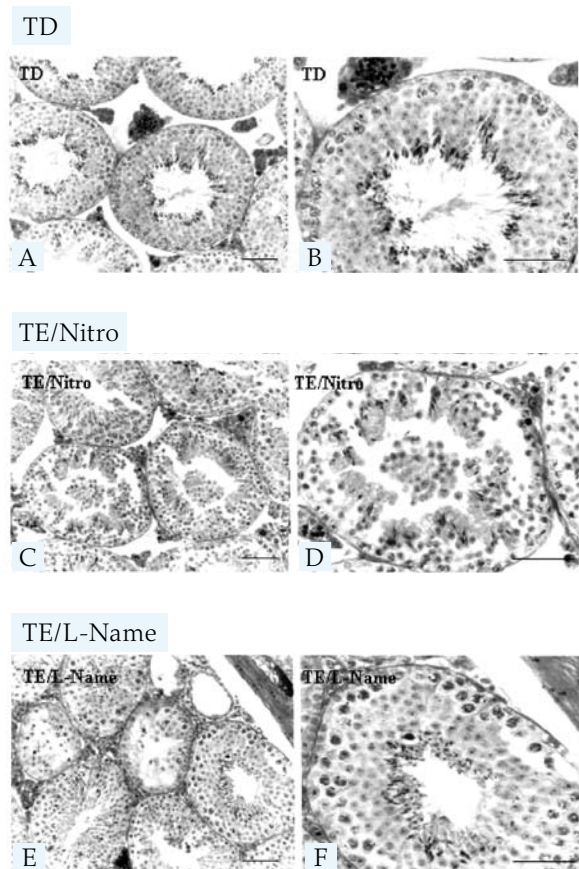


Figura 1: Fotomicrografia dos túbulos seminíferos dos grupos L e N Testículos direitos (TD) e esquerdos (TE); (A e B) Epitélio seminífero do TD; (C e D) Epitélio seminífero do TE tratado com Nitro: observar rupturas no epitélio, células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos; (E e F) Epitélio seminífero do TE tratado com L-Name e a redução do lúmen dos túbulos seminíferos, ruptura parcial no epitélio seminífero e túbulos seminíferos hipoespermatogênicos e atrofiados. Barras= 50µm.

em razão das grandes alterações observadas no epitélio.

Entretanto, os números de espermátócitos paquítenicos e espermátides circulares aumentaram significativamente nos estádios I, V e VII/VI do epitélio seminífero no TE/L-Name, em relação ao TD (Tabela 2). Além disso, observou-se aumento na altura do epitélio e redução do lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 2A e B). Não foram observadas alterações no diâmetro dos túbulos (Figura 2C).

As células de Sertoli são somáticas colunares que desempenham inúmeras funções no epitélio seminífero, como controle da espermatogênese, formação da barreira hematotesticular, nutrição e suporte mecânico das células germinativas^{13, 14}. Existem indícios de que a eficiência das células de Sertoli está limitada ao número de células germinativas que podem suportar. Essa eficiência é controlada por um mecanismo de regulação de densidade celular por processo apoptótico¹. A capacidade de suporte das células de Sertoli no tratamento com L-Name foi extrapolada nos estádios I, V e VII/VIII do ciclo do epitélio (Tabela 3) e reduzida nos mesmos estádios, no tratamento com Nitro. Esses estádios possuem espermátócitos em paquíteno, espermátides circulares, e a análise quantitativa das células germinativas nos dois tratamentos (Tabela 1 e 2) explica a extrapolação e redução da capacidade de suporte nesses estádios.

A análise dos parâmetros morfométricos confirmaram os aspectos morfológicos observados nos tratamentos com Nitro e L-Name, o que leva o aumento do NO a proporcionar a abertura dos complexos juncionais e, conseqüentemente, o deslocamento de aglomerados celulares do epitélio seminífero para o lúmen dos túbulos, enquanto a redução dos níveis de NO propicia o fechamento dos complexos juncionais e o aumento do número de células germinativas do epitélio. Esses resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que os níveis de NO produzidos no epitélio seminífero estão envolvidos no controle (abertura e o fechamento) dos complexos juncionais para permitir a migração das células germinativas do compartimento basal para o adluminal, durante a espermatogênese^{7, 12}.

A avaliação dos níveis de NO no extrato total de proteínas do testículo incubado com Nitro e L-Name confirmam a hipótese do envolvimento do NO no controle dos complexos juncionais e no desenvolvimento das células germinativas. Como ilustrado na Figura 3, os níveis de NO no extrato protéi-

Tabela 1: Análise quantitativa das células germinativas no TD e TE/Nitro

Células Germinativas	Estágio I		Estágio V		Estágio VII/VIII		Estágio XII	
	TD	TE	TD	TE	TD	TE	TD	TE
CS	5,0 ± 0,9	5,2±0,4	5,0 ± 1,0	5,5±0,7	5,2 ± 0,4	4±1,29	4,5 ± 0,7	5,0±0,7
EG (A)	4,7 ± 1,0	6,0±1.2						
EG (B)			7,0 ± 1,5	6,0±0,7				
EC (PL)					13,5 ± 2,1	11,6±1,4 ¹		
EC (Z)							14,5 ± 2,5	12,1±1,50
EC (P)	16,5 ± 5,5	11,0±1.3 ¹	24,2 ± 5,6	13,7±2,94 ²	30,0 ± 4,1	15,4±2,0 ²		
EC (S)							7,75 ± 3,2	4,75±0,95
EP(C)	26,5 ± 7,6	11,0±1.3 ²	27,5 ± 3,6	13,7±2,94 ²	26,5 ± 4,3	15,4±2,0 ²		
FM							7,75 ±3,2	5,75±1,50

Observar a redução das células germinativas no compartimento adluminal. CS – Célula de Sertoli; EG – espermatogônia (tipo A e tipo B.); EC – espermatócito (pré-leptóteno, PL; zigóteno, Z; paquíteno, P; secundário, S.); EP (C) – espermátide circular; FM – Figuras meióticas. (¹P<0.01; ²P<0.001).

Tabela 2: Análise quantitativa das células germinativas no TD e TE/L-Name

Células Germinativas	Estágio I		Estágio V		Estágio VII/VIII		Estágio XII	
	TD	TE	TD	TE	TD	TE	TD	TE
CS	5,0 ± 0,9	5,4±0,7	5,0 ± 1,0	5,3±0,7	5,2 ± 0,4	5,5±0,9	4,5 ± 0,7	5,1±0,7
EG (A)	4,6 ± 0,9	4,3±0,6						
EG (B)			7,5 ± 1,5	6,0±0,7				
EC (PL)					15,2 ± 2,1	14,6±1,4		
EC (Z)							15,7 ± 2,5	18,1±1,50
EC (P)	20,3 ± 3,5	30,0±1.3 ¹	24,2 ± 5,6	30,7±2,94 ²	26,0 ± 4,1	35,4±2,0 ²		
EC (S)							7,7 ± 3,2	8,7±0,95
EP (C)	20,5 ± 7,6	31,0±1.3 ²	23,5 ± 3,6	29,7±2,94 ²	24,5 ± 4,3	33,4±2,0 ²		
FM							7,75 ±3,2	5,75±1,50

Observar aumento das células germinativas que residem no compartimento adluminal. CS – Célula de Sertoli; EG – espermatogônia (tipo A e tipo B.); EC – espermatócito (pré-leptóteno, PL; zigóteno, Z; paquíteno, P; secundário, S.); EP (C) – espermátide circular; FM – Figuras meióticas. (¹P<0.01; ²P<0.001).

Tabela 3: Capacidade de suporte (CS) das células de Sertoli no epitélio seminífero de camundongos tratados com L-Name, Nitro ou salina (controle)

Capacidade de suporte das células de Sertoli

	Estádios			
	I	V	VII / VIII	XII
Controle	9±0,6	9,7±0,8	10,7±1,0	6,5±0,8
L-Name	11±0,9 ²	11,9±0,7 ¹	12,6±0,5 ¹	5,7±0,4
Nitro	5,1±0,8 ²	5,3±0,4 ²	6,5±0,6 ²	5,0±0,7

A CS é calculada pela razão entre o número total de células germinativas e células de Sertoli por estágio. (n=3, ¹P<0,01; ²P<0,001).

co total incubado com Nitro aumentou em relação aos níveis basais (326 µM e 18,6 µM, respectivamente). Por outro lado, no extrato protéico do testículo incubado com L-Name, observou-se redução dos níveis de NO em relação aos níveis basais (2,03 µM e 18,6 µM, respectivamente).

CONCLUSÃO

Vários estudos têm demonstrado que as alterações na dinâmica das junções celulares presentes na barreira hematotesticular de ma-

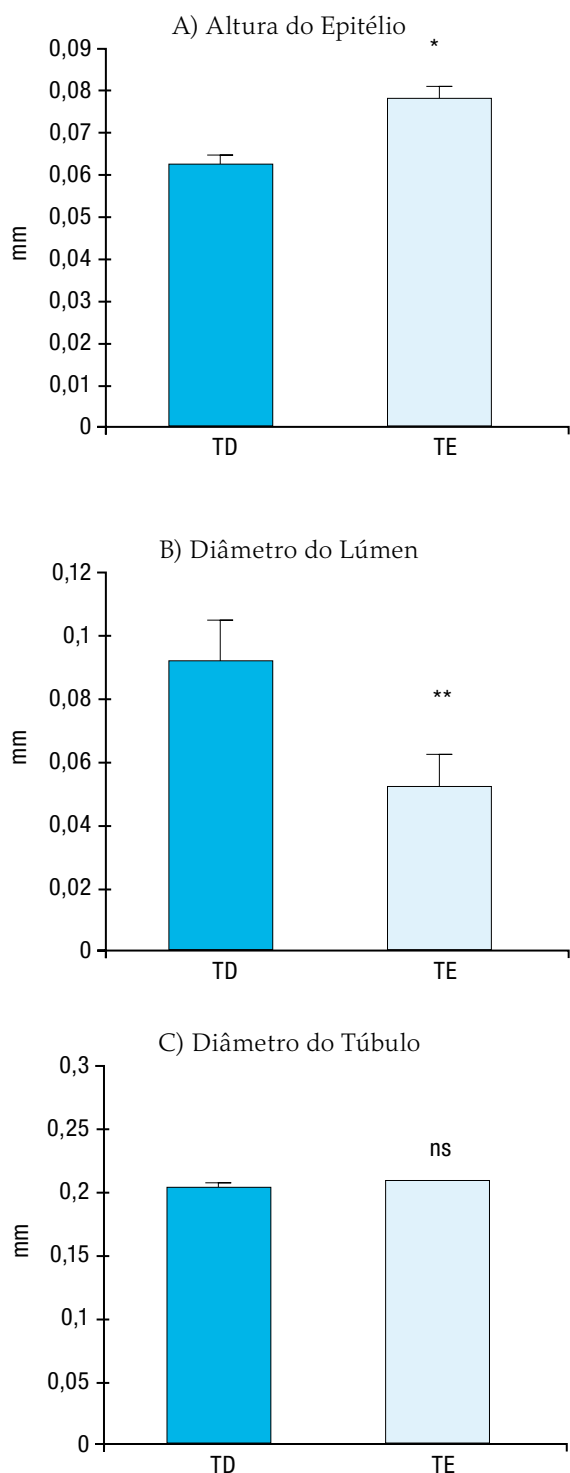


Figura 2: Análise morfométrica dos túbulos seminíferos dos animais submetidos ao tratamento com L-Namee (A) altura do epitélio, (B) diâmetro do lúmen do túbulo seminífero, (C) diâmetro dos túbulos seminíferos. (n=3; TD: testículo direito; TE: testículo esquerdo; * P<0,01; ** P<0,001).

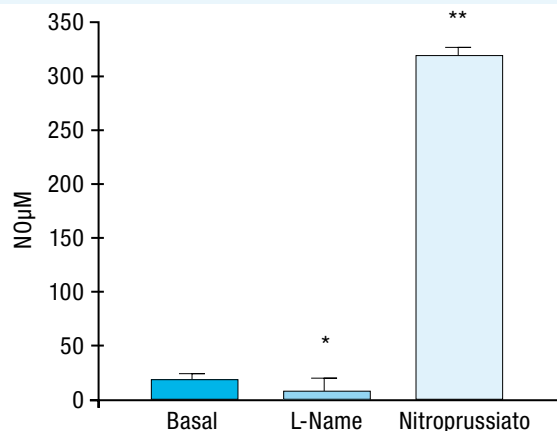


Figura 3: Avaliação dos níveis de NO no extrato protéico total do testículo de camundongos após incubação com Nitro (1 mM) e L-Name (1 mM). Observar o aumento significativo dos níveis de NO no extrato protéico total do testículo incubado com Nitro (*P<0,01; **P<0,001).

míferos podem alterar todo o processo espermatogênico, levando até a degeneração de células germinativas⁷. Neste estudo, os resultados obtidos demonstraram que os níveis de NO produzidos no epitélio seminífero estão diretamente relacionados com a dinâmica (abertura e o fechamento) dos complexos juncionais que permitem a migração das células germinativas do compartimento basal para o adluminal durante o processo espermatogênico.

REFERÊNCIAS

1. França LR, Garcia CH. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Buzato CB. Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri: Ed. Manole, 2005. p. 302-24.
2. Pelletier MR, Vitale LM. Las uniones oclusivas de las barreras hematotissulares del testículo, epidídimo y conducto deferente. Sociedad Argentina de Andrologia. 2003;12:53-72.
3. Russel DL, Ettl AR, Hikim SPA, Clegg DE. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990.
4. Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biol Reprod. 1995;52:211-16.
5. Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J Anim Sci. 1977;44(5):818-33.

6. De Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Pathol*. 1998; 79:67-80.
7. 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*. 2005;73(3):458-71.
8. Lui WY, Mruk D, Lee MW, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2003;68:1087-97.
9. Medina CM, Souza CL, Caperuto CL, Anê FG, Amanso MA, Teixeira APV, et al. Dehydroepiandrosterone increases β -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett*. 2006; 580:285-90.
10. Russel DL, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil*. 1984;70:635-41.
11. Wu CC, Yen MH. Higher level of plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1999;12:476-82.
12. Lee NP, Cheng CY. Adaptors, junction dynamics, and spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2004;71(2):392-404.
13. Taranta A, Teti A, Stefanini M, D'Agostino A. Immediate cell signal induced by laminin in rat Sertoli cells. *Matrix Biol*. 2000;19:11-8.
14. Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech*. 1995; 32:385-422