UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA
UNOESTE
PRESIDENTE PRUDENTE - SP

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AgNOR EM CÉLULAS SAUDÁVEIS DE TESTÍCULO DE OVINOS

DANIEL BOABAID IBRAHIM

Presidente Prudente – SP
2012

UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA
UNOESTE
PRESIDENTE PRUDENTE - SP

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AgNOR EM CÉLULAS SAUDÁVEIS DE TESTÍCULO DE OVINOS

DANIEL BOABAID IBRAHIM

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

Presidente Prudente – SP
2012

636.308 2 IBrahim Daniel Boabaid
I14a Avaliação da técnica de coloração AgNOR em células saudáveis de testículo de ovinos / Daniel Boabaid Ibrahim – Presidente Prudente, 2012.
27f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP, 2012.
Bibliografia.
Orientador: Marcelo George Mungai Chacur.

1. Ovinos. 2.Técnica AgNOR. 3. Testículo. 4. Proliferação de céIulas. 5. Matadouros. Título.

DANIEL BOABAID IBRAHIM

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AgNOR EM CÉLULAS SAUDÁVEIS DE TESTÍCULO DE OVINOS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente,13 de abril de 2012

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

_____
Prof[a]. Dr[a]. Caliê Castilho Silvestre
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

_____
Prof. Dr. Dr. Carlos Antonio de Miranda Bomfim
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Araçatuba-SP

DEDICATÓRIA

A DEUS, por guiar meu caminho e estar sempre presente em minha vida me fortalecendo nas minhas horas de fraqueza.

Aos Meus Pais Eliane e Ronaldo, que me proporcionaram uma vida digna onde eu pudesse crescer e acreditar que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação continua em nossas vidas; que sonhar e caracterizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.

Ao meu irmão Lucas, pela amizade que nos mantém unidos hoje e sempre.

A minha companheira de todos os dias, a qual chegou para dar a direção certa em minha vida, pela sua honestidade, pela alegria proporcionada em minha vida e por esta ter me ajudado a mudar em muito minha pessoa para ser melhor, à minha enteada que é uma filha para mim a qual a amo e ao meu filho que está por chegar sendo a minha maior inspiração para lutar cada vez mais pelos meus objetivos.

Ao meu Professor e Orientador Dr. Marcelo George Mungai Chacur pela compreensão constante, pela confiança, pelo incentivo e generosidade de partilhar sua sabedoria e conhecimento. Obrigado pela oportunidade e honra de ser seu orientado.

A minha amiga Thaís que me ajudou em muito.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Programa de mestrado em Ciência Animal e ao Curso de Medicina Veterinária.

Ao Frigorífigo Marfrig pelo apoio nesse trabalho.

Aos Professores Dra. Eunice Oba, Dr. Luciana Machado Guaberto, *Dr. Rogério Giuffrida e Dr. Osimar Sanches.*

A colega de mestrado e amiga Thais Arrebola Arrebola, obrigado pela colaboração, incentivo e apoio para com o meu trabalho.

Aos professores do curso de Mestrado em Ciência Animal da Unoeste, pelos ensinamentos oferecidos.

À amiga Cléo, pela presteza e paciência em ajudar.

Aos funcionários do frigorífico pela colaboração para que o meu trabalho pudesse ser executado com êxito.

“[...]Ninguém se desanime, nem pela falta de prêmio, nem pela baixeza do nascimento, cada um é capaz de fazer-se nobre, este é o segundo nascimento que depende do próprio valor, e em que se nasce, não para uma vida breve, mas sim para a eternidade de um grande nome.[...]”.
Domingo Loreto Couto,1981, p. 140.

RESUMO

Avaliação da técnica de coloração AgNOR em células saudáveis de testículo de ovinos

A coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico, avaliando a proliferação em células normais ou neoplásicas. O objetivo do trabalho foi estudar em testículos de ovinos obtidos em matadouro a validade do uso da técnica de coloração AgNOR na proliferação de células saudáveis da linhagem espermatogênica. Utilizou-se 43 pares de testículos de ovinos mestiços entre seis e 10 meses de idade. Testes de Wilcoxon e Spearman foram empregados, com nível de 5%. As médias das NORs nas células das gônadas direita e esquerda foram respectivamente: espermatogônia (8,77±1,14 e 9,04±0,96), espermatócito (4,99±2,00 e 6,20±2,07; $P<0,05$), Leydig (8,05±2,82 e 7,89±2,29) e Sertoli (8,07±1,88 e 7,61±2,16; $P<0,05$). Houve correlação ($P<0,05$) entre os lados para o número de NORs: espermatócito x Leydig (0,49); espermatócito x Sertoli (0,49) e Leydig x Sertoli (0,96). Conclui-se ser válido o emprego da técnica AgNOR para avaliar o potencial proliferativo das células saudáveis em testículos de ovinos com prática execução e baixo custo.

Palavras-chave: Ovinos; Testículo, Proliferação de células; Técnica AgNOR, Matadouros.

ABSTRACT

Evaluation of AgNOR staining method in healthy cells of ovine testicle

The silver staining technique for AgNOR nucleolar organizer regions (NORs) is characterized by marking proteins linked to the ribosomal ribonucleic acid, evaluating cell proliferation. The aim was to study the validity of the AgNOR staining technique in the testicular cell proliferation in crossbred ovine. Was used treis pairs forty crossbred sheep testes between six and ten months old.Wilcoxon and Spearman tests were used with a significance level of 5%. The mean NORs count in cells of the gonads right and left were respectively: spermatogonia (8.77±1.14 and 9.04±0.96), spermatocyte (4.99±2.00 and 6.20±2.07, $P<0.05$), Leydig (8.05±2.82 and 7.89±2.29) and Sertoli cells (8.07±1.88 and 7.61±2.16; $P<0.05$). There was a correlation between the mean values for right and left sides for the number of NORs ($P<0.05$) between Leydig x spermatocytes (0.49); spermatocytes x Sertoli (0.49) and Sertoli x Leydig (0.96). The study demonstrates that the AgNOR staining technique is indicated to evaluate the cell proliferative potential in ovine testis with practical implementation and low cost.

Keywords: Sheep; Testis; Cell Proliferation; NOR, slaughterhouse; Abattoirs.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	**11**
2 REVISÃO DE LITERATURA	**12**
2.1**.** Desenvolvimento do Testículo	**12**
2.1.2 Características gerais dos testículos	**12**
2.2. Anatomia do Aparelho Reprodutor Masculino	**12**
2.3.Compartimentos dos Testículos	**13**
2.4. O Epidídimo	**13**
2.5. Histologia Funcional dos Testículos dos Mamíferos	**14**
2.5.1. Características histológicas	**14**
2.6. Desenvolvimento e Descida dos Testículos	**15**
2.7. Puberdade	**15**
2.8 Técnica de Coloração AgNOR	**16**
REFERÊNCIAS	**18**
3 ARTIGO CIENTÍFICO	**20**

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira, predominante na região Nordeste do país, tem se expandido bastante com a demanda para a produção de carne e peles (SIMPLICIO; SALLES; SANTOS, 2002).

Segundo o Anuário da Pecuária Brasileira (2010), no ano de 2008 havia um rebanho de 453.261 mil cabeças de ovinos no estado de São Paulo dentro de 16.628.571 milhões no Brasil, em comparação com o ano de 2000, com 233.681 mil no estado paulista e de 14.784.958 milhões no país, mostrando uma crescente expansão com cerca de 52% no período de oito anos.

As biotécnicas da esfera reprodutiva podem se beneficiar com o conhecimento da anatomia e da histologia dos ovários (TRALDI, 2006).

Os órgãos genitais femininos responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos são os ovários. Na ovelha, as gônadas têm forma de amêndoa com cerca de 1,5cm de comprimento e peso em torno de 3 a 4 g (SISSON, 1986), são constituídos por epitélio germinativo escamoso ou cubóide simples que circunda a córtex (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A estrutura e proliferação celular dos folículos em desenvolvimento, presentes na córtex, é diferente para cada estádio e podem variar em tamanho de 40µm a 5,5mm de diâmetro (HEMAMALINI et al., 2003).

A técnica de AgNOR, consiste em corar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) com a prata (Ag), a fim de obter um precipitado de grumos de nucléolo denominadas regiões organizadoras de nucléolos (NORs) (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989). Essas proteínas são sintetizadas durante a intérfase do ciclo celular e possuem afinidade pela prata formando as NORs, que podem ser observadas e contadas ao microscópio óptico, a técnica avalia as NORs de cromossomos ativos e mostram a atividade proliferativa celular (MURRAY, 2004).

A revisão a seguir tem o objetivo de explicar sobre a anatomia e histologia ovariana, bem como sobre a utilização da técnica de coloração AgNOR na proliferação celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A gônada do macho, o testículo, têm duas funções principais: produzir gametas (espermatozóides) que transmitem os genes do macho para a prole e, produzir androgênios, que conferem ao indivíduo do sexo masculino as características sexuais secundárias e a libido (DUKES, 1993).

2.1 Desenvolvimento do Testículo

2.1.2 Características gerais dos testículos

Muito embora no embrião os testículos se desenvolvam a partir das gônadas indiferenciadas, situadas no abdômen, eles migram a fim de se localizar durante a vida extra-uterina, no escroto. Da mesma forma que os ovários, os testículos têm dupla função: produzem células germinativas e secretam hormônio sexual. As células germinativas ou gametas masculinos são chamados *espermatozóides* (*sperma* = semente; *zoon* = animal). Denominam-se genericamente *androgênios* (*aner* = homen; *gennao* = produto) essas substâncias possuem atividade de hormônios sexuais masculinos (DUKES, 1993).

As gônadas masculinas (testículos) situam-se fora do abdômen, no escroto, uma estrutura semelhante à uma bolsa, derivada da pele e da fáscia da parede abdominal. O testículo localiza-se dentro do processo vaginal, uma extensão separada do peritônio, o qual atravessa a parede abdominal pelo canal inguinal. Os espermatozóides deixam o testículo pelos ductos eferentes e vão em direção ao ducto espiralado do epidídimo, que continua com o ducto deferente. As glândulas acessórias eliminam seus conteúdos no ducto deferente ou na porção pélvica da uretra (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.2 Anatomia do Aparelho Reprodutor Masculino

No carneiro reprodutor, o pênis se caracteriza pelo apêndice vermiforme. O carneiro tem os maiores testículos por unidade de peso corporal entre os animais domésticos. O divertículo prepucial do carneiro é bem desenvolvido e geralmente contêm células epiteliais em degeneração e urina (DUKES, 1993).

2.3 Compartimentos dos Testículos

Há quatro compartimentos nos testículos que são: compartimento vascular e intersticial, externos aos túbulos seminíferos; e internos aos túbulos constituídos pelos compartimentos basal e adluminal. As espermatogônias indiferenciadas estão no compartimento basal, com as células germinais em diferenciação localizadas na parte adluminal do túbulo seminífero. As populações celulares intertubulares e intratubulares estão separadas por uma barreira formada pela membrana basal, que contêm células miódes e fibrócitos. Dentro dos túbulos os complexos *tight junctional* das células de Sertoli controlam tanto a passagem de moléculas como o desenvolvimento das células germinais. A barreira, formada principalmente pelas células de Sertoli, é conhecida como barreira hematotesticular (DUKES, 1993). A barreira hematotesticular tem duas funções principais. A primeira permite a criação de um meio ambiente adluminal em que é controlado o metabolismo dos espermatozóides; e a segunda é que a barreira hematotesticular impede que os espermatozóides adentrem no interstício dos testículos (DUKES, 1993).

2.4 O Epidídimo

Os epidídimos são compostos de um único túbulo enovelado, originados dos ductos de Wolff (THIBAULT; LEVASSEUR, 1991), que se inicia nos cones eferentes da *reti testis* possuindo uma matriz densa e fibrosa, o lúmen revestido por uma camada basal de células pequenas e uma camada superficial de epitélio colunar ciliado (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O epidídimo é importante para a maturação como para o armazenamento dos espermatozóides. A presença de uma proteína de motilidade no epidídimo permite que o espermatozóide se torne móvel. A maturação posterior do acrossoma ocorre no epidídimo, o que permite que o espermatozóide penetre no oócito (DUKES, 1993).

Lesões obstrutivas no epidídimo afetam o testículo de forma indireta, dependendo do ponto da obstrução. Se a lesão estiver na cabeça do epidídimo, ocorre a degeneração do testículo por meio do acúmulo de líquido e desenvolvimento de pressão dentro dos túbulos seminíferos. Se a lesão for na

cauda, o testículo pode parecer normal porque o líquido pode ser absorvido pela cabeça do epidídimo. Ambas as condições resultam em infertilidade do animal afetado (DUKES, 1993).

Hafez e Hafez (2004) destacam como as principais funções do epidídimo em relação aos espermatozóides são: (1) transporte, com a condução dos epermatozóides recém formados no testículo para a cauda do epidídimo devido às contrações do ducto epididimário e epitélio ciliado dos ductos eferentes, (2) maturação, onde os espermatozóides recém liberados dos túbulos seminíferos ainda não são férteis nem maduros, ocorrendo, portanto, a maturação durante a passagem (transporte) dos espermatozóides no epidídimo, onde a motilidade aumenta à medida que estes entram no corpo do epidídimo, a capacidade de fertilização amplia-se quando os espermatozóides entram em contato com o ambiente da cauda do epidídimo e somente termina com o contato dos espermatozóides no trato genital da fêmea e (3) armazenamento, onde na cauda do epidídimo pode conter cerca de 75% dos espermatozóides epididimários, a habilidade de armazenamento depende da termorregulação e dos hormônios sexuais masculinos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.5 Histologia Funcional dos Testículos dos Mamíferos

2.5.1 Características histológicas

Abaixo seguem as descrições sumarizadas das estruturas testiculares segundo Hafez e Hafez (2004): Túnica albugínea: cápsula branca, espessa, de tecido conjuntivo que envolve os testículos; formada principalmente de séries entrelaçadas de fibras colágenas. Túbulos seminíferos: aparecem como grandes estruturas isoladas, com perfil arredondado ou oblongo; aparência varia devido ao complexo enovelado dos túbulos em muitos ângulos e níveis diferentes. Entre os túbulos localizam-se massas de células intersticiais (Leydig) que produzem o hormônio sexual masculino. Espermatogônia: situa-se na região mais externa do túbulo; núcleos arredondados aparecem como uma camada irregular dentro do tecido conjuntivo circundante. Os núcleos são pequenos e de coloração escura devido à presença de um grande número de grânulos de cromatina. Espermatócitos primários: localizados exatamente no interior de uma camada irregular de

espermatogônias e células de Sertoli; os núcleos são maiores e mais claros que os da espermatogônias.

Espermatócitos secundários: divisões de maturação e espermatócitos secundários normalmente não são visualizados no túbulo devido à curta duração desses estágios. Espermátides: localizados internamente em relação aos espermatócitos primários. A camada de espermátides pode conter várias células em espessura. Os espermatozóides situam-se ao longo da margem do lúmen. As cabeças dos espermatozóides estão alojadas em profundas pregas na superfície das células de Sertoli. Células de Sertoli: grandes e relativamente claras, exceto pelo nucléolo proeminente e negro. O citoplasma é difuso e seus limites são indefinidos.

2.6 Desenvolvimento e Descida dos Testículos

O testículo se desenvolve no abdômen, medialmente ao rim embrionário (mesonéfro). O plexo dos ductos testiculares se desenvolve conectado aos túbulos mesonéfricos para formar o epidídimo, o ducto deferente e a glândula vesicular. A próstata e a glândula bulbouretral se formam a partir do seio urogenital embrionário e o pênis forma-se da tubulação e do alongamento do tubérculo genital que se desenvolve a partir do orifício do seio urogenital (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.7 Puberdade

A puberdade nos ovinos inicia-se por volta de 15 semanas de idade. Como a espermatogênese e subseqüente maturação dos espermatozóides requerem pelo menos 2 meses, o carneiro não entra na puberdade, definida como a capacidade de liberar células germinais maduras, até a idade de cerca de 30 semanas. Em geral a idade na puberdade é um processo mais gradual no carneiro em relação às fêmeas ovinas (DUKES, 1993). A secreção de testosterona pelas células de Leydig está sob o controle do LH. A secreção do LH, por sua vez, é controlada pela liberação episódica do hormônio liberador de gonodatropina (GnRH). Ocorrem até 12 liberações episódicas de LH, durante as 24 horas do dia, nos machos ovinos (DUKES, 1993).

2.8 Técnica de Coloração AgNOR

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são alças de ácido desoxirribonucléico (DNA) responsáveis por sintetizar ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) durante a intérfase, período de síntese protéica e de aumento de volume, tamanho e número de organelas da célula (VANDELAER; THIRY; GOESSENS, 1999).

O ciclo celular compreende as fases de meiose, interfase e mitose. A duplicação do cromossomo ocorre especificamente na fase de interfase, sendo essa dividida em 3 partes: fase G1 (intensa produção de proteínas e RNA), fase S (síntese do DNA) e fase G2 (período de duplicação de centríolo). As células que param de se replicar encontram-se em fase G0, que acontece imediatamente antes do início da síntese de DNA (MURRAY, 2004). É no nucléolo, localizado no núcleo celular, que há armazenamento e produção de RNAr, que ligados à várias proteínas irão formar os ribossomos (LEE et al., 1999).

Proteínas não histonas possuem sítio de ligação com RNAr (AgNOR) e tem afinidade pela prata e com isso, elas precipitam formando grumos de nucléolo, isolados ou agrupados, que podem ser observados à microscopia óptica (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989). As proteínas mais conhecidas e também as mais presentes (60-75%) em células em proliferação são a C23 (nucleolina) e a B23 (nutramina) (SIRRI; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUM, 2000).

A técnica AgNOR avalia as NORs de cromossomos ativos durante o ciclo celular e o número ou área das NORs mostram essa atividade proliferativa, a partir da fase G1 até o máximo na fase S do ciclo (MURRAY, 2004).

Células no período de síntese protéica e de aumento de volume estão em atividade independente de existência de proliferação celular, ou seja, células ativas, mas não em mitose, possuem pontos de NORs (UNDERWOOD, 1995)

As proteínas que são coradas pela prata aparecem ao microscópio como pontos pretos dentro dos nucléolos, que podem ser contados de acordo com o número de pontos por célula diretamente ao microscópio ou avaliados quanto a morfometria em analisador de imagem, sendo esse último um método mais rápido e preciso. A capacidade de corar os NORs pela prata é influenciada por vários fatores, como métodos de fixação e duração da exposição a diferentes temperaturas (TRERÈ, 2000).

Smith et al. (1988), avaliando várias técnicas de fixadores, chegaram à conclusão de que o fixador alcoólico foi o que gerou melhor marcação AgNOR, os tecidos possuem uma alta sensibilidade à oxidação. Em um estudo sobre melhores técnicas para coloração AgNOR.

Serakides et al. (1999), corando células da tireóide de bovinos verificou que a técnica AgNOR foi eficiente para diferenciar os diferentes graus de hiperplasia da tireóide, observando um grande número e pequeno tamanho de NORs marcados devido à proliferação das células.

Esse modelo de marcação AgNOR possui um grande valor para diagnóstico e prognóstico de tumores, pois quanto maior o grau de malignidade, maior o número e menor o tamanho de AgNORs presentes dentro do núcleo (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989).

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - Anualpec. São Paulo: AgraFNP, 2010. 273 p.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs? proposals for a standardized approach. **Journal of Pathology,** v.158, p.185-188, 1989.

DUKES, H. H. Pocessos reprodutivos do macho. In: DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos.** 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 603-614.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 3-12.

HEMAMALINI, N. C. et al. Influence of transforming growth factor-α, insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of pre antral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, p. 11-22, 2003.

LEE, W. et al. AgNOR of Human Interphase Cells in Relation to Acrocentric Chromosomes. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 113, p. 13-18, 1999.

MURRAY, A. W. Recycling the cell cycle: cyclings revisited. **Cell.**, v. 116, p. 221-234, jan. 2004.

SERAKIDES, R. et al. Histomorphometry and Quantification of Nucleolar Organizer Regions in Bovine Thyroid Containing Methylthiouracil Residues. **Vet. Pathol.,** v. 36, p. 574-582, 1999.

SIMPLICIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, Supl., p. 17-27, 2002.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUM, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron.,** v. 31, p. 121-126, 2000.

SISSON, S. Aparelho Urogenital do Ruminante. In: SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1: p. 879-895.

SMITH, P. J. et al. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **Journal of Pathology**, v. 155, p. 109-112, 1988.

THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. L. La reproduction chez les mammiferes et l' home. **Inra,** p. 768, 1991.

TRALDI, A. de S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: FEINCO - FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 3., 2006. São Paulo. **Anais…** São Paulo: [s.n.], 2006, 98p.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron.**, v. 31, p. 127-131, 2000.

UNDERWOOD, J. C. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, n. 5, p. 239-240, 1995.

VANDERLAER, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G. AgNOR proteins from morphologicaly intact isolated nucleoli. **Life Sciences,** v. 64, n. 22, p. 2039-2047, 1999.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos

[Evaluation of AgNOR staining method in ovine testicle]

D.B. *Ibrahim*[1] , T.A.H. *Arrebola*[1], M.G.M. *Chacur*[2*], O.C. *Sanches*[3], R. *Giuffrida*[4]

[1]Discentes do Mestrado em Ciência Animal (UNOESTE), Pres. Prudente-SP.

[2]Lab. Reprodução Animal (FCA-UNOESTE, Campus II), Rod. Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, CEP:19.067-175, Pres. Prudente-SP/Brasil.

Fone:(18)3229-2077, Fax:(18)3229-2036, chacur@unoeste.br

[3,4]Patologia Veterinária (FCA-UNOESTE)

Resumo

A coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico, avaliando a proliferação em células normais ou neoplásicas. O objetivo do trabalho foi estudar em testículos de ovinos obtidos em matadouro a validade do uso da técnica de coloração AgNOR na proliferação de células saudáveis da linhagem espermatogênica. Utilizou-se 43 pares de testículos de ovinos mestiços entre seis e 10 meses de idade. Testes de Wilcoxon e Spearman foram empregados, com nível de 5%. As médias das NORs nas células das gônadas direita e esquerda foram respectivamente: espermatogônia (8,77±1,14 e 9,04±0,96), espermatócito (4,99±2,00 e 6,20±2,07; $P<0,05$), Leydig (8,05±2,82 e 7,89±2,29) e Sertoli (8,07±1,88 e 7,61±2,16; $P<0,05$). Houve correlação ($P<0,05$) entre os lados para o número de NORs: espermatócito x Leydig (0,49); espermatócito x Sertoli (0,49) e Leydig x Sertoli (0,96). Conclui-se ser válido o emprego da técnica AgNOR para avaliar o potencial proliferativo das células saudáveis em testículos de ovinos com prática execução e baixo custo.

Palavras-chave: *Ovis aries*, testículo, proliferação celular, NOR, abatedouro.

Abstract

The silver staining technique for AgNOR nucleolar organizer regions (NORs) is characterized by marking proteins linked to the ribosomal ribonucleic acid, evaluating cell proliferation.

The aim was to study the validity of the AgNOR staining technique in the testicular cell proliferation in crossbred ovine. Forty-three pairs of ovine testicle between 6 and 10 months old were collected. Wilcoxon and Spearman tests were used with a significance level of 5%. The mean NORs count in cells of the gonads right and left were respectively: spermatogonia (8.77±1.14 and 9.04±0.96), spermatocyte (4.99±2.00 and 6.20±2.07, P<0.05), Leydig (8.05±2.82 and 7.89±2.29) and Sertoli cells (8.07±1.88 and 7.61±2.16; P<0.05). There was a correlation between the mean values for right and left sides for the number of NORs (P<0.05) between Leydig x spermatocytes (0.49); spermatocytes x Sertoli (0.49) and Sertoli x Leydig (0.96). The study demonstrates that the AgNOR staining technique is indicated to evaluate the cell proliferative potential in ovine testis with practical implementation and low cost. Keywords: *Ovis aries*, testicle, celular proliferation, NOR, slaughterhouse.

Introdução

No ano de 2008 havia um rebanho de 453.261 cabeças de ovinos no estado de São Paulo dentro de 16.628.571 no Brasil, em comparação com o ano de 2000, com 233.681 nesse estado e de 14.784.958 no país, mostrando uma crescente expansão da ovinocultura paulista (Anuário..., 2010).

A patologia veterinária aplicada na área da clínica vem ampliando o interesse no estudo da proliferação celular, com emprego de técnicas de coloração para fins de estimar o prognóstico e tratamento para as afecções do aparelho reprodutor (Madewell, 2001). A coloração das proteínas argirofílicas, presentes nos cromossomos no estadio de interfase, relacionadas às regiões organizadoras de nucléolo (NORs) pode ser obtida pela técnica denominada de AgNOR, usada em preparações citológicas ou histológicas para a obtenção da taxa de proliferação celular (Crocker et al., 1989; Lindner, 1993) onde em células normais, as NORs são usualmente organizadas de forma clara em número igual ou maior a um, restritas ao nucléolo e em células neoplásicas as NORs se desagregam do nucléolo e tendem a se dispersar pelo núcleo (Ofner e Schmid, 1996).

A técnica de coloração histológica pela prata, denominada de AgNOR, na área da reprodução animal, foi relatada e indicada para a mensuração da proliferação celular em seminoma canino, onde um maior número de NORs está presente em neoplasias metastáticas em relação às não metastáticas (de Vico et al., 1994b). No tumor venéreo transmissível, a técnica colabora com a terapêutica, onde o elevado número de NORs está relacionado com a

pobre resposta frente à quimioterapia (Harmelin et al., 1995). Para o carcinoma das células escamosas em cães, o escore das NORs distingue os tumores benignos dos malignos (de Vico et al., 1994a).

O presente estudo justifica-se, pois vale salientar que há escassez de informações na literatura, relacionada ao emprego da técnica de coloração AgNOR com enfoque na proliferação celular das estruturas testiculares saudáveis na espécie ovina. Dessa forma, trazendo informações adicionais e colaborando na avaliação andrológica na espécie ovina. O objetivo do trabalho foi estudar em testículos de ovinos obtidos em matadouro a validade do uso da técnica de coloração pela prata (AgNOR) na identificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) em células saudáveis da linhagem espermatogênica.

Material e métodos

Um total de 43 pares de testículos de ovinos mestiços, com idade entre seis e 10 meses, foram coletados em abatedouro pertencente ao município de Promissão-SP, Brasil (altitude: 426m, latitude: 21°32'12"S, longitude: 49°51'29"O), no período de março a maio de 2010, correspondendo para o hemisfério Sul ao final do verão e parte do outono. As gônadas foram identificadas quanto ao lado em testículo direito (TD) e esquerdo (TE), embaladas aos pares, armazenadas e transportadas em solução salina a 25ºC para o posterior processamento histológico.

Os fragmentos dos testículos medindo 0,5cm de espessura foram imersos na solução fixadora de Davidson composta por: 20mL de formol, 30mL de álcool 95%, 10mL de ácido acético e 30mL de água destilada, por 24 a 48 horas e em seguida lavadas em água corrente por 1 hora e transferidas para solução de álcool 70%, sendo desidratadas em série alcoólica crescente (álcool 80%, 96% e 100%), permanecendo 40 minutos em cada um deles. Foi realizada a diafanização (clareamento) utilizando quatro banhos de 40 minutos, sendo o primeiro no álcool + xilol (1:1) e os outros três banhos em xilol. Procedeu-se o processamento para microscopia óptica para inclusão das amostras em parafina montando os blocos, cortados com 5µm de espessura (Micrótomo rotativo, mod. 820, American Optical N-45387, USA), onde se procedeu à retirada de três cortes: o primeiro para corar com a técnica de hematoxilina – eosina (HE), o segundo para a técnica da AgNOR e o terceiro ficando de reserva. Posteriormente, foram desparafinizadas em xilol por 5 minutos (por três vezes), hidratadas passando lentamente em álcool absoluto por três vezes e lavadas com água por 5 minutos. Os cortes, em lâmina, ficaram incubados ao abrigo de luz em câmara úmida durante

40 minutos a 60ºC em solução de nitrato de prata, obtida utilizando-se 1g de gelatina incolor, 0,5mL de ácido fórmico e 50mL de água deionizada (solução A) e 12,5 g de nitrato de prata e 25mL de água deionizada (solução B), sendo uma parte de solução A para duas partes de solução B (1 sol. A : 2 sol. B) conforme Plóton (1986), modificada por Sanches (2010).

As amostras foram retiradas da solução corante quando apresentaram coloração marrom-escura e lavadas em água deionizada morna a 45ºC para retirar o precipitado formado pela gelatina. Após esse procedimento, as lâminas passaram em solução de tiossulfato de sódio a 5% durante 5 minutos para retirar a prata reduzida depositada sobre as células. As amostras foram desidratadas (álcool 96% e 100% - 3 vezes, lentamente; xilol - 3 vezes lentamente), os cortes foram contra-corados em Van Gieson ("verde luz") por 3 minutos, em seguida os cortes foram montados com lamínula e resina sintética (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A contagem das NORs foi realizada observando os pontos de coloração negra no interior dos nucléolos em cada um dos tipos celulares: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e nas células de Leydig e Sertoli, por meio de microscopia óptica na magnitude de (1000x).

O padrão de contagem das NORs foi realizado considerando-se 10 células/campo de cada tipo celular, repetindo-se em 10 campos microscópicos aleatórios, totalizando a contagem em 100 células de cada um dos tipos celulares, conforme Sanches (2010) adaptado de Löhr et al. (1997).

Para cada testículo avaliado foi calculada a média aritmética do número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) em relação aos 100 campos avaliados, individualmente, para cada tipo celular. Sequencialmente, os conjuntos de valores obtidos no procedimento anterior foram testados pelo método de Kolmogov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados. Neste procedimento, apenas a variável “contagem média de NORs/campo para as células de Leydig do testículo direito” foi considerada como paramétrica ($P<0,10$). Por esta razão, optou-se pelo uso de testes não paramétricos para efetuar as comparações estatísticas (Pagano e Gauvreau, 2004).

A comparação entre as contagens do número de NORs observadas nos testículos direito e esquerdo foi realizada mediante o teste não paramétrico dos postos de Wilcoxon. A correlação existente entre o número das NORs observadas para os quatro tipos celulares estudados foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman, com estimativas por ponto e por intervalo com 95% de confiança, separadamente para os testículos direito e esquerdo. Os coeficientes de Spearman calculados foram testados

estatisticamente para a hipótese de que diferem significativamente do valor zero. Para detectar a presença de valores influentes *"outliers"* recorreu-se a avaliação gráfica por meio da construção de gráfico do tipo *"Box-plot"*. As análises foram realizadas utilizando o pacote computacional Bioestat segundo Ayres et al. (2007) com nível de significância de 5%.

Resultados

A análise microscópica dos testículos revelou integridade do arcabouço e desenvolvimento do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, o qual apresentou entre cinco e seis camadas de células, desde a membrana basal até a luz tubular (Fig.1).

A histologia testicular pela técnica de coloração com uso da prata está representada na Fig.2, onde se pode visualizar as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) em forma de grânulos escuros, distribuídos no núcleo das células do epitélio espermatogênico sadio, os quais puderam ser identificados, individualizados e contados perante a microscopia óptica.

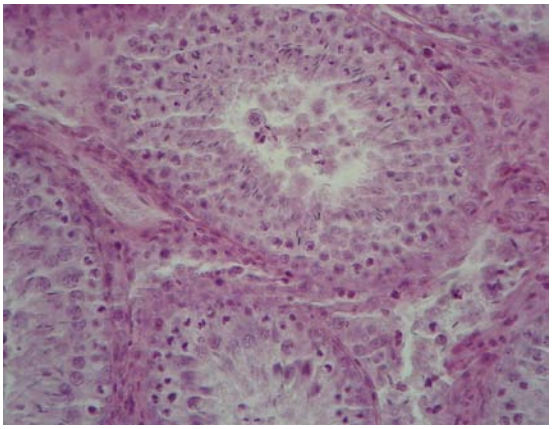

Figura 1 – Testículo de carneiro: técnica de coloração (HE), túbulos seminíferos e epitélio germinativo íntegros, presença de espermatozóides na luz tubular, magnitude (400x).

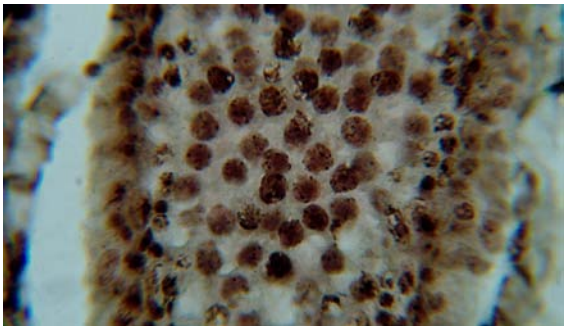

Figura 2 – Testículo de carneiro: técnica de coloração pela prata (AgNOR), epitélio germinativo íntegro. Os pontos negros nos núcleos são as regiões organizadoras de nucléolo (NORs), magnitude (1000x).

Na tabela 1, estão descritos as médias e desvios-padrão das contagens de NORs/campo e respectivos desvios-padrões observados para os tipos celulares para o testículo direto e esquerdo. Na tabela 2, estão descritas as análises de correlação entre as médias das NORs, agrupando-se os tipos celulares dois a dois, individualmente para cada testículo.

Tabela 1- Média e desvio-padrão do número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) no núcleo dos diferentes tipos de células de testículos esquerdo (TE) e direto (TD) em ovinos mestiços.

variável	TE (n=43)	TD (n=43)	Soma dos postos de Wilcoxon	*p*
Espermatogônia	9,04 ± 0,96	8,77 ± 1,14	90	0,5904
Espermatócito	6,20 ± 2,07	4,99 ± 2,00	790	< 0,0001*
Células de Leydig	7,89 ± 2,29	8,05 ± 2,82	-182	0,2744
Células de Sertoli	7,61 ± 2,16	8,07 ± 1,88	-428	0,0098*

*P<0,05

Tabela 2- Coeficientes de correlação de Spearman (R) para as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) no núcleo das células de testículos esquerdo (TE) e direito (TD) estimados por ponto e intervalo com 95% de confiança (IC95%) em ovinos mestiços.

variável	TE (n=43)			TD (n=43)		
	R	IC95%	*p*	R	IC95%	*p*
Espermatogônia x Espermatócito	-0,446	-0,664 / -0,160	0,0027*	-0,282	-0,543/ 0,0286	0,0663
Espermatogônia x Leydig	-0,680	-0,817/ -0,471	< 0,0001*	0,258	-0,0550 /0,525	0,0948
Espermatogônia x Sertoli	-0,593	-0,762/ -0,348	< 0,0001*	0,605	0,364 /0,770	< 0,0001*
Espermatócito x Leydig	0,645	0,421 / 0,795	< 0,0001*	0,326	0,0201 /0,577	0,0324*
Espermatócito x Sertoli	0,586	0,339 / 0,758	< 0,0001*	-0,0677	-0,368 /0,246	0,6658
Leydig x Sertoli	0,922	0,858 / 0,958	< 0,0001*	0,834	0,708/0,909	< 0,0001*

*P<0,05

Na Figura 3, podem ser observadas as representações gráficas do tipo "*Box-plot"* separadamente para o número de NORs para cada tipo celular cada população celular, segundo o testículo avaliado. Foram classificadas como valores influentes "*outliers"*, duas observações referentes ao testículo esquerdo dentro da população celular de espermatogônias e uma observação para a população celular de espermatócitos do testículo direito. A remoção destes valores não influenciou significativamente os resultados estatísticos observados e por esta razão optou-se por mantê-los na análise.

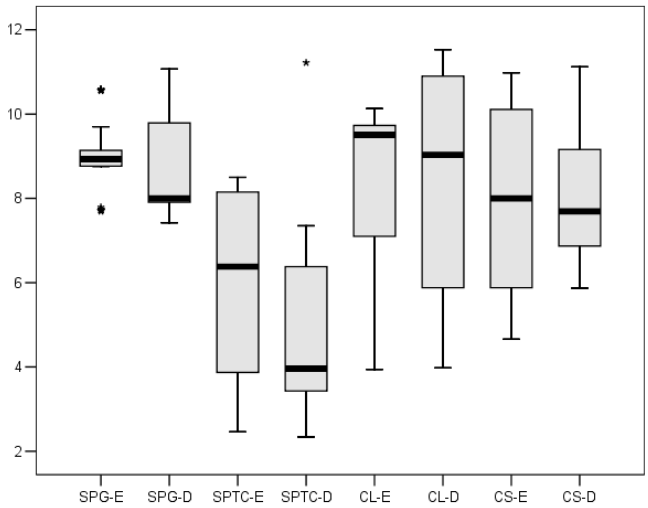

Figura 3 - Comparação das contagens do número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) no núcleo das células de testículos esquerdo (E) e direito (D) dos tipos celulares: espermatogônias (SPG-E e SPG-D), espermatócitos (SPCT-E e SPCT-D), células de Leydig (CL-E, CL-D) e células de Sertoli (CS-E e CL-D). As linhas no interior dos boxes denotam o segundo quartil (50% dos dados - mediana), as linhas superiores, o terceiro quartil (75% dos dados) e as inferiores o primeiro quartil (25% dos dados). As linhas aplicadas indicam os limites dos valores extremos e os pontos externos a elas indicam os "*outliers"*.

Discussão

Vale destacar que na presente discussão, optou-se por comparações quanto a utilidade da técnica de coloração pela prata (AgNOR) em distintas espécies animais, incluindo o ser humano, devido a escassez de informações na literatura relativa a proliferação celular pelo emprego dessa técnica, diretamente relacionada com o aparelho reprodutor masculino.

Dessa forma, perante a observação microscópica do material corado pela técnica de HE, se revelou a integridade histológica dos túbulos seminíferos (Figura 1), assegurando a representatividade do material processado e analisado para fins de estudar a viabilidade e utilidade da técnica de coloração AgNOR para o epitélio germinativo testicular íntegro.

Relato esse da integridade histológica pela HE, similar ao descrito por Castrillejo et al. (1995) como representativo em estudos de espermatogênese em ovinos da raça Corriedale a partir de 6 meses de idade, criados extensivamente no Uruguai, indicando que nessa faixa etária os ovinos podem ser utilizados para estudos nessa linha. No presente trabalho, se tratando de animais mestiços e jovens, o desenvolvimento histológico testicular foi adequado.

Outro ponto, diz respeito à qualidade do material processado, a qual se mostrou adequada para a visualização e contagem do número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), nos distintos tipos celulares avaliados, corroborando Müller et al. (1994) e Ohyama et al. (1995) que recomendaram a técnica de coloração, em humanos, para o diagnóstico do carcinoma testicular, devido a facilidade e rapidez na execução da mesma, aliada a qualidade quanto a coloração do material que pode ser fixado em formalina e emblocado em parafina, além do baixo custo agregado para a realização da técnica. Xu et al. (1997) complementaram esse raciocínio, ao descrever que a coloração oferece um indicador adicional para o prognóstico de tumores no testículo em seres humanos.

Nos cortes histológicos, o número de NORs contadas nos tipos celulares avaliados: espermatogônia, espermatócito, células de Leydig e de Sertoli, apresentou uma distribuição homogênea nos campos microscópicos, concordando com os achados de Holstein e Lauke (1996) em humanos para testículos saudáveis, e que na ocorrência de células tumorais, as mesmas se concentram em regiões focais dos túbulos seminíferos.

Houve diferença significativa para as médias do número de NORs entre os lados direito e esquerdo para espermatócitos e células de Sertoli (Tabela 1), sugere-se para fins de comparação das taxas de proliferação celular, realizar contagens das NORs para os distintos tipos celulares em ambas as gônadas. A taxa de proliferação celular pode oscilar em relação à gônada contralateral, de forma independente para o mesmo tipo celular em questão. Essa diferença observada entre os lados pode estar relacionada com a individualidade metabólica de cada gônada, bem como pelo efeito compensatório entre elas para fins de manutenção das células da linhagem espermatogênica para a produção de gametas.

Em humanos com carcinoma testicular, o número médio de NORs/núcleo foi de 26,86±2,68 para as células tumorais, mas inferior nas células sadias, sendo nas espermatogônias: 8,18±2,20 e nas células de Sertoli: 12,96±2,44 (Müller et al., 1994). A despeito da grande diferença filogenética entre ovinos e humanos, no presente estudo com ovinos machos, a média de NORs/núcleo foi similar para as espermatogônias, porém inferior para as células de Sertoli, quando comparadas às células também sadias do estudo supracitado de Müller et al. (1994).

As correlações significativas entre espermatócito x células de Leydig, espermatócito x células de Sertoli e entre as de Leydig e Sertoli (Tabela 2), podem ser explicadas pelo conceito da *"regulação local"* (Ergün et al., 1994) entre os túbulos seminíferos e o tecido intersticial pois segmentos dos túbulos vizinhos são supridos por vasos sanguíneos em comum. Seguindo esse conceito, as células de um túbulo podem influenciar as de outros túbulos adjacentes por meio de um microambiente em comum, modulados por fatores de crescimento.

Perante as informações acima descritas, recomenda-se a validade do uso da técnica de coloração pela prata (AgNOR) para avaliar a proliferação de células testiculares sadias e não apenas em processos tumorais como mostrou Pich et al. (2000) em revisão de literatura sobre o aparelho reprodutor humano, onde quanto maior o número de NORs, maior a atividade proliferativa das células.

Em virtude da técnica de AgNOR, relacionada ao estudo da proliferação celular de testículos saudáveis nos animais domésticos e em especial nos ovinos, não trazer informações na literatura consultada, recomenda-se que novos estudos sejam realizados para fins de somatória de resultados com o uso da técnica de coloração e contagem de NORs utilizada. Vale salientar que o presente resultado e as informações relatadas no respectivo estudo podem servir como base para futuros procedimentos e análises da atividade espermatogênica na espécie ovina em exames de citologia testicular.

Conclusões

O estudo em questão demonstra que a técnica de coloração histológica pela prata (AgNOR) é indicada para a avaliação do potencial proliferativo das células testiculares saudáveis em ovinos. A coloração AgNOR revelou qualidade na identificação e individualização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) propiciando a contagem numérica das mesmas nos diferentes tipos celulares analisados. Estiveram presentes a vantagem quanto ao uso da técnica devido à praticidade de execução e o baixo custo econômico. A técnica pode ser empregada agregando informação como exame complementar para a área da andrologia veterinária na espécie ovina.

Referências bibliográficas

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - Anualpec. São Paulo: AgraFNP, 2010. 273p.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A. BIOESTAT –Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas, Ong Mamiraua, Belém, PA,, 2007

CASTRILLEJO, A.; MORANÃ, A.; BIELL, A. et al. Onset of spermatogenesis in Corriedale ram lambs under extensive rearing conditions in Uruguay. *Act Vet. Scand.*, v.38, n.2, p.161-173, 1995.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathol*., v.158, p.185-188, 1989.

De VICO, G.; AGRINI, U.; MAIOLINO, P. Nucleolar size and mitotic índex in basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) of canine skin. *J. Vet. Med. Ser. A.*, v.41, n.76-79, 1994a.

De VICO, G.; PAPPARELLA, S.; Di GUARDO, G. Number and size of silver-stained nucleoli (AgNOR clusters) in canine seminomas: correlatio with histological features and tumour behavior. *J. Comp. Pathol.*, v.110, p.267-273, 1994b.

ERGÜN, S.; STINGL, J.; HOLSTEIN, A.F. Segmental angioarchicteture of lobules testis in man. *Andrologia*, v.26, p.143-150, 1994.

HARMELIN, A.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. Correlation of AgNOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour, *J. Comp. Pathol.*, v.112, p.429-433, 1995.

HOLSTEIN, A.F.; LAUKE, H. Histologic diagnostics of early testicular germ-cell tumor. *Int J. Urol.*, v.3, p.165-172, 1996.

LINDNER, L.E. Improvements in the Silver-staining Technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *J. Histochem. Cytochem.*, v.41, n.3, p.439-445, 1993.

MADEWELL, B.R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J. Vet. Intern. Med.*, v.15, p.334-340, 2001.

MÜLLER, M.; LAUKE, H.; HARTMANN, M. The value of the AgNOR staining method in identifying carcinoma in situ of the testis. *Pathol. Res. Pract.*, v.190, p.429-435, 1994.

OFNER, D.; SCHMID, K.W. Standardized AgNOR analysis: Its use-fulness in surgical oncology. *Histochem. Cell Biol., v.*106, p.193-196, 1996.

OHYAMA, O.; ITO, A.; TOKUYAMA, S.; SUZUKI, K. et al. Clinical significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in testicular tumors, v.86, n.10, p.1543-1551, 1995.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística, 2 ed, São Paulo: Pioneira Thomson Learneing, 2004.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORS in tumor pathology. *Micron.*, v.31, p.133-141, 2000.

SANCHES, O.C. *Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica*. 2010. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

XU, J.; ZHENG, J; QIAN, S., Video image analysis of AgNORs distribution in the testicular tumor. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, v.35, n.2, p.738-741, 1997.