

**VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA  
Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

**Evidência imunohistoquímica da presença do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e seus receptores (TNFR-I/TNFR-II) em folículos ovarianos bovinos.**

<sup>1</sup>José Jackson do Nascimento Costa; <sup>2</sup>Anderson Weiny Barbalho Silva; <sup>3</sup>Francisco Taiã Gomes Bezerra; <sup>4</sup>José Renato de Sousa Passos; <sup>5</sup>Katianne Freitas dos Santos; <sup>6</sup>José Roberto Viana Silva<sup>2</sup>

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi investigar através da técnica de imunohistoquímica a presença das proteínas do sistema TNF- $\alpha$  nos diferentes compartimentos foliculares, bem como nas diferentes categorias foliculares. Para alcançar esses objetivos, ovários (n=10) bovinos foram coletados em abatedouros e fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato salino – PBS, pH 7,4) e inclusos em parafina, em seguida, foram realizadas secções seriadas de 5  $\mu$ m, montadas em lâminas revestidas com uma camada de poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. As secções foram incubadas à 4°C por 18 horas com anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (1:50); anticorpo primário monoclonal anti-TNFR I (1:50) e anti-TNFR II (1:50), lavadas e a incubadas com anticorpo secundário biotinizado. As secções foram coradas com diaminobenzidina por 7 minutos e contracoradas com hematoxilina. Os resultados demonstraram uma forte reação para TNF- $\alpha$  em oócitos de folículos primordiais e primários, marcação moderada em folículos secundários, pequenos folículos antrais (<3mm) e em folículos antrais grandes (3-6 mm). Para o TNFR I, foi observada uma forte imunomarcação no oócito de folículos primordiais e primários, enquanto a marcação foi moderada nos oócitos dos folículos secundários, e em pequenos folículos antrais (<3mm) uma fraca reação foi identificada. Para o TNFR II, a marcação foi fraca nos oócitos de folículos primordiais e primários, moderada em folículos secundários, fraca em folículos antrais pequenos (<3 mm) e grandes (3-6 mm). Em conclusão, o sistema TNF-  $\alpha$  é expresso das diferentes categorias foliculares (pré-antrais e antrais), na espécie bovina.

**Palavra-chaves:** Fator de Necrose Tumoral, imunohistoquímica, ovário.

**Introdução**

As citocinas são sintetizadas por uma ampla gama de tipos de células, incluindo as células de ovário e são capazes de estimular ou inibir o crescimento de células, regular a diferenciação celular, induzir quimiotaxia de células e modular a expressão de outras citocinas. As citocinas exercem várias funções no ovário, estando envolvida nos processos de crescimento folicular,

## VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação

esteroidogênese, recrutamento e ativação de leucócitos necessários para a ovulação e remodelação tecidual durante a luteinização, ovulação, e luteólise (BUSCHER *et al.*, 1999). A ovulação em mamíferos pode ser considerada uma reação inflamatória e os folículos ovarianos representam um local de síntese, recepção e ação do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (ROBY *et al.*, 1990; BRANNSTROM *et al.*, 1994) e da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (BRANNSTROM *et al.*, 1993). Esses peptídeos afetam diretamente a função secretora das células da teca e/ou das células da granulosa com efeito estimulante ou inibitório sobre a biossíntese de prostaglandinas e esteroidogênese (OTANI *et al.*, 1996).

O TNF- $\alpha$  é uma proteína com 17,3 kDa que foi identificada nos ovários de vários animais, incluindo coelhas (BAGAVANDOSS *et al.*, 1990), vacas (ROBY *et al.*, 1989) e os seres humanos (ROBY *et al.*, 1990). Em ovário de ratas os sítios de localização do TNF- $\alpha$  incluem, oócitos (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1994), células da granulosa (ROBY *et al.*, 1989), células do corpo lúteo e macrófagos (SANCHO-TELLO *et al.*, 1993). Já foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  inibe a secreção de estradiol, bem como a secreção de progesterona em células da granulosa de ratos, suínos, bovinos e humanos (VELDHUIS *et al.*, 1991; RICE *et al.*, 1996; SPICER, 1998).

O TNF- $\alpha$  age ligando-se a um de seus dois subtipos de receptores distintos: receptor do tipo I (TNFR1), que tem aproximadamente 60 kDa (p60) e o receptor do tipo II (TNFR2). Os receptores são proteínas transmembranares com porções citoplasmáticas que iniciam a transdução de sinal a partir da ligação ao TNF- $\alpha$ . O oócito e as células do cúmulus em humanos expressam tanto o RNAm quanto a proteína para TNF- $\alpha$  e seu receptor do tipo II (TNFR2) (NAZ *et al.*, 1997). A expressão de receptores para TNF- $\alpha$  também foi determinada nas células da granulosa em bovinos (SPICER, 2001). Em ovários de ratas foram identificados os RNAs mensageiros para os receptores do tipo I (TNFR1) e do tipo II (TNFR2) (BALCHAK *et al.*, 1999). Além disso, o TNF- $\alpha$  imunorreativo está presente em folículos bovinos durante o desenvolvimento folicular (SPICER, 1998). Em humanos, a expressão do TNF- $\alpha$  aumenta gradativamente durante as fases foliculares, atingindo o nível máximo em todo do período pré-ovulatório (ZOLTI *et al.*, 1992). Portanto, é provável que o TNF- $\alpha$  produzido localmente no ovário desempenhe um papel importante na regulação do desenvolvimento folicular ovariano em várias espécies.

Os efeitos do TNF- $\alpha$  em células da granulosa cultivadas e células da teca incluem alterações na esteroidogênese e na morfologia celular (ZACHOW *et al.*, 1992). Além de seus efeitos sobre a esteroidogênese, o TNF- $\alpha$  pode também afetar a proliferação celular e apoptose ovariana. Recentemente, foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  induz tanto a proliferação celular quanto a morte celular em cultivo de células da granulosa de grandes folículos antrais suínos (PRANGE-KIEL *et*

**VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA**  
**Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

*al.*, 2001). Em adição, estudos apontam que o TNF- $\alpha$  em associação a progesterona (P4) pode interagir na regulação do crescimento de folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2006). Em síntese, o TNF- $\alpha$  tem uma variedade de efeitos sobre a foliculogênese em mamíferos. Estes efeitos incluem: (1) modulação da esteroidogênese pelas células da granulosa, teca e luteais, (2) envolvimento na regressão luteal, (3) envolvimento na ruptura do folículo ovariano, e (4) envolvimento na apoptose ovariana (CHUN e HSUEH, 1998). No entanto, estudos *in vitro* afirmam que a exposição de oócitos suínos a TNF- $\alpha$  (200ng/mL) causa uma redução na maturação oocitária (CAI-HONG *et al.*, 2010). Em bovinos, ainda existem relativamente poucas informações acerca do sistema TNF- $\alpha$  e suas funções no ovário. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença e a distribuição do TNF- $\alpha$  e seus receptores nos folículos ovarianos desta espécie.

**Material e métodos**

Para esta finalidade, ovários (n=10) bovinos foram coletados em abatedouros e transportados até o laboratório em um período máximo de 1 hora. No laboratório, os ovários foram fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato salino – PBS, pH 7,4) e inclusos em parafina. O estudo imunohistoquímico para localização do Fator de Necrose Tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e seus receptores (TNFR1 e TNFR2) foi realizado em secções seriadas de 5  $\mu$ m. Estas secções foram montadas em lâminas revestidas com uma camada de poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. A atividade da enzima peroxidase endógena foi bloqueada por meio da incubação das secções desparafinizadas em uma solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 10 minutos. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS (pH 7,4) e colocadas em tampão citrato 0,01M (pH 6,0), onde os epítomos foram ativados por meio da ebulição do tampão por sete minutos em micro-ondas. Após este tratamento, as secções foram lavadas em PBS contendo 0,05 de *Tween 20* (PBS-T, Merck, Darmstadt, Germany) antes de serem incubadas por 30 minutos em 5% de soro normal caprino em PBS para minimizar as ligações inespecíficas. As secções foram incubadas à 4°C por 18 horas nas diluições apropriadas para cada anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (1:50); anticorpo primário monoclonal anti-TNFR1 (1:50) e anti-TNFR2 (1:50). Em seguida, todas as demais incubações e lavagens foram realizadas em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 45 minutos no anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo IgG - Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as secções foram lavadas em PBS antes de serem incubadas por 45 minutos com o complexo avidina-biotina (1:600, Vectastain Elite ABC kits; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). As secções foram, em seguida, lavadas

## **VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA** **Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

e coradas com diaminobenzidina (DAB; 0.05% DAB em Tris/HCl, pH 7.6, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Sigma tablets, St. Louis, MO, USA) por 7 minutos. As secções foram lavadas em PBS e contracoradas com hematoxilina por 10 segundos. Finalmente, as secções foram lavadas por 10 minutos em água corrente, desidratadas em etanol e xilol, e montadas em bálsamo do Canadá. A intensidade da reação para cada anticorpo nas diferentes categorias foliculares será classificada como ausente (-), ocasionalmente presente (- / +), fraca (+), moderada (+ +), ou intensa (+ + +).

Os controles para reações inespecíficas foram realizados da seguinte forma: (1) substituição do anticorpo primário com IgG da mesma espécie em que o anticorpo específico foi produzido e na mesma concentração; (2) incubação somente com diaminobenzidina para excluir a possibilidade de atividade da peroxidase endógena não suprimida e (3) pré-absorção do anticorpo primário com o peptídeo utilizado para sua síntese em uma concentração cinco vezes maior do que a do anticorpo primário, à 4°C por 18 horas.

Os folículos ovarianos foram classificados como pré-antrais (primordiais, primários e secundários) de acordo com o número de camada de células da granulosa, bem como em folículos antrais pequenos (0,5 - 1 mm em diâmetro), médios (1 - 3 mm) ou grandes (>3 mm). Os folículos também foram classificados como normais ou degenerados de acordo com a morfologia do oócito e das células da granulosa. Os folículos foram considerados normais se apresentassem um oócito intacto, rodeado por células da granulosa, que eram bem organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleos picnóticos. Folículos atrésicos foram definidos como folículos com um oócito retraído, núcleo picnóticos e/ou de células da granulosa desorganizadas destacadas da membrana basal.

### **Resultados e discussão**

Os resultados demonstraram uma intensa reação para TNF- $\alpha$  em oócitos de folículos primordiais e primários. Em folículos secundários, revelou-se uma moderada marcação para este anticorpo em oócitos e células da granulosa. Já em pequenos folículos antrais (<3mm), uma moderada marcação foi identificada em oócitos, células do cúmulus e células da granulosa murais, no entanto, nas células da teca não houve reação. Por outro lado, folículos antrais grandes (3-6 mm) apresentaram moderada marcação positiva para TNF- $\alpha$  em toda estrutura folicular, estando ausente apenas nas células da teca nesta categoria folicular. A análise feita para o TNFR1, uma intensa imunomarcação foi observada no oócito de folículos primordiais e primários. Em folículos secundários evidenciou-se uma moderada imunomarcação para TNFR1 em células da granulosa e oócito. Já em pequenos folículos antrais (<3mm) uma fraca reação foi identificada na zona pelúcida, em oócitos, nas células do cúmulus, nas células da granulosa e da teca. Ademais, em

## VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação

grandes folículos antrais (3-6 mm) uma moderada imunomarcção foi observada na zona pelúcida, em oócitos e células da granulosa. Para o receptor do tipo II (TNFRII), os resultados mostraram uma fraca imunomarcção em oócitos de folículos primordiais e primários, enquanto que em folículos secundários uma marcção moderada em observada em oócitos e células da granulosa. Já em folículos antrais pequenos (<3 mm) e grandes (3-6 mm) uma fraca imunomarcção foi identificada em oócitos, células do cúmulus e células da granulosa murais, estando ausente em células da teca.

O TNF- $\alpha$  tem sido amplamente estudado em sua relação com os processos reprodutivos, especialmente a ovulação. Para Murdoch (1985), a ovulação é um processo complexo, envolvendo a ruptura da parede de um folículo ovariano, permitindo a expulsão de seu oócito maturo, em resposta a um processo inflamatório agudo. No entanto, o presente trabalho relata pela primeira vez a localização do sistema TNF- $\alpha$  no ovário bovino antes da ovulação. O TNF- $\alpha$  e seus receptores também estão presentes no corpo lúteo bovino, com as maiores expressões na luteólise (SKARZYNSKI *et al.*, 2005; OKANO *et al.*, 2006), sendo um potente estimulador das prostaglandinas luteais e da endotelina-1, em uma ação luteotrófica na fase luteal inicial (SAKUMOTO e OKUDA, 2004; ACOSTA *et al.*, 2007). Zhao *et al.* (1998), trabalhando com corpos lúteos suínos, observaram que as citocinas, particularmente o TNF- $\alpha$ , têm efeitos inibitórios sobre a produção de progesterona das células luteais, mas, contrariamente, nos estágios luteais iniciais, o TNF- $\alpha$  pode ter um efeito luteotrófico. Conforme conclusões de Okano *et al.* (2006), o TNF- $\alpha$  tem um importante papel na função do corpo lúteo de muitas espécies mamíferas, através da indução de apoptose por fragmentação do DNA das células luteais durante o ciclo estral.

### Conclusão

Em conclusão, as proteínas para TNF-  $\alpha$  e seus receptores do tipo I e II são expressas em folículos ovarianos pré-antrais e antrais bovinos em todos os estágios de desenvolvimento, o que é um indicativo de que o TNF-  $\alpha$  está envolvido no sistema intrafolicular que controla a foliculogênese.

### Referências

ACOSTA, T. J.; YOSHIOKA, S.; KOMIYAMA, J.; LEE, S. H.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Effects of storage and passage of bovine luteal endothelial cells on endothelin-1 and prostaglandin F2 $\alpha$  production. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 473-480, 2007.

**VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA**  
**Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

BAGAVANDOSS, P.; WIGGINS, R. C.; KUNKEL, S. L.; REMICK, D. G.; KEYES, P. L. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 367–376, 1990.

BALCHAK, S. K.; MARCINKIEWICZ, J. L. Evidence for the Presence of Tumor Necrosis Factor Alpha Receptors During Ovarian Development in the Rat. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1506–1512, 1999.

BRANNSTROM, M.; NORMAN, R. J.; SEAMARK, R. F.; ROBERTSON, S. A. Rat ovary produces cytokines during ovulation. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 88–94, 1994.

BRANNSTROM, M.; WANG, L.; NORMAN, R. J. Ovulatory effect of interleukin- 1 beta on the perfused rat ovary. **Endocrinology**, v. 132, p. 399–404, 1993b.

BUSCHER, U.; CHEN, F. C.; CHEN, H.; KENTENICH, H.; SCHMIADY, H. “Cytokines in the follicular fluid of stimulated and nonstimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction?” **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 162–166, 1999.

CAI-HONG, M.; LI-YING, Y.; QIAO, J.; SHA, W.; LI, L.; YUAN, C.; QING-YUAN, SUN. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 920–926, 2010.

CHUN, S.Y.; HSUEH, A. J. W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, p. 63-75, 1998.

MARCINKIEWICZ, J. L.; KRISHNA, A.; CHEUNG, C. M.; TERRANOVA, P. F. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal rat ovary and throughout follicular development in the adult rat. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1251-1260, 1994.

MURDOCH, W. J. Follicular determinants of ovulation in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 2, n. 3, p. 105-21, 1985.

NAZ, R. K.; ZHU, X.; MENGE, A. C. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors type I and type II in human oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 127–133, 1997.

NILSSON, E. E.; STANFIELD, J.; SKINNER, M. K. Interactions between progesterone and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the regulation of primordial follicle assembly. **Reproduction**, v. 132, p. 877–886, 2006.

OKANO, A.; KISHI, H.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis in cultured porcine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 301-306, 2006.

**VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA**  
**Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

OTANI, H.; YAMOTO, M.; FUJINAGA, H.; NAKANO, R. Presence and localization of endothelin receptor in the rat ovary and its regulation by pituitary gonadotropins. **European Journal of Endocrinology**, v. 135, p. 449–454, 1996.

PRANGE-KIEL, J.; KREUTZKAMM, C.; WEHREBERG, U.; RONE, G. M. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 928–935, 2001.

RICE, V. M.; WILLIAMS, V. R.; LIMBACK, S. D.; TERRANOVA, P. F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits follicle stimulating hormone induced-granulosa cell oestradiol secretion in the human: dependence on size of follicles. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1256–1261, 1996.

ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in the rat and bovine ovary using immunohistochemistry and cell blot: evidence for granulosa production. In: Hirshfield AN (ed.), *Growth Factors and the Ovary*. New York: Plenum Publishing Corporation; 273–278, 1989.

ROBY, K. F.; WEED, J.; LYLES, R.; TERRANOVA, P. F. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- $\alpha$ . **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, p. 1096–1102, 1990.

SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Possible actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  in ovarian function. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 39-46, 2004.

SANCHO-TELLO, M.; TASH, J.; ROBY, K.; TERRANOVA, P. F. Effects of lipopolysaccharide on ovarian function in the pregnant mare serum gonadotropin- treated immature rat. **Endocrine Journal**, v.1, p. 503–511, 1993.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 340-346, 2005.

SPICER, L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inhibits steroidogenesis of bovine ovarian granulosa and thecal cells in vitro. Involvement of TNF- $\alpha$  receptors. **Endocrine**, v. 8, p. 109–115, 1998.

SPICER, L. J. Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor- $\alpha$  are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. **Animal Reproduction Science**, p. 45–67, 2001.

VELDHUIS, J. D.; GARMEY, J. C.; URBAN, R. J.; DEMERS, L. M.; AGGARWAL, B. B. Ovarian actions of Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ): pleiotropic effects of TNF $\alpha$  on differentiated functions of untransformed swine granulosa cells. **Endocrinology**, v. 129, p. 641–648, 1991.

ZACHOW, R. J.; TASK, J. S.; TERRANOVA, P. F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces clustering in ovarian theca-interstitial cells in vitro. **Endocrinology**, v. 131, p. 2503-2513, 1992.

**VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA**  
**Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação**

ZHAO, Y.; BURBACH, J. A.; ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F.; BRANNIAN, J. D. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the porcine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1385-1391, 1998.

ZOLTI, M.; BIDER, D.; SEIDMAN, D. S.; MASHIACH, S.; BEN-RAFAEL, Z. Cytokine levels in follicular fluid of polycystic ovaries in patients treated with dexamethasone. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 501-504, 1992.

<sup>1</sup>Doutorando em Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC. jackson.costa@hotmail.com;

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC. andersonweiny@hotmail.com;

<sup>3</sup>Mestrando em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará - UFC – *campus* Sobral. taian\_2@hotmail.com;

<sup>4</sup>Mestrando em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará - UFC – *campus* Sobral. jrenatopassos@hotmail.com;

<sup>5</sup>Graduada em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú á – UVA. katiannefreitas@hotmail.com;

<sup>6</sup>Orientador Prof. Dr. do Curso de Odontologia – Universidade Federal do Ceará – UFC - *campus* Sobral. roberto\_viana@yahoo.com;