

150 anos de investigação após a descoberta de Enrico Sertoli

Ana Margarida Calado

Resumo

A complexa morfologia das células de Sertoli, bem como as suas interações com as células germinativas tem sido foco de investigação desde que a sua descrição pela primeira vez em 1865 por Enrico Sertoli. Nos últimos anos, a investigação no âmbito das células de Sertoli vai muito além da morfologia, da fisiologia e tornou-se cada vez mais focada nas questões moleculares. O objetivo dos investigadores tem sido entender o papel das células de Sertoli na espermatogénese e aplicar essa informação em problemas relacionados à fertilidade masculina. Os numerosos e distintos complexos juncionais e especializações de membrana entre as células de Sertoli e as células germinativas proporcionam um microambiente para o desenvolvimento das células germinativas, definindo dois compartimentos anatómica e fisiologicamente distintos no túbulo seminífero. As células de Sertoli constituem uma população de células que não se dividem, mas que se encontra ativa durante a vida reprodutiva, alterando ciclicamente a sua morfologia e a expressão génica de forma a contribuírem para o início da onda espermática e cooperação com a espermatogénese. Esta revisão, destacaremos os principais avanços científicos relativos ao importante papel das células de Sertoli na espermatogénese, na diferenciação do testículo, na determinação do sexo e em questões clínicas que envolvem interação das células de Sertoli com células germinativas.

Palavras-chave: História da Ciência, Células de Sertoli, Enrico Sertoli, Espermatogénese, Testículo

Abstract

The complex morphology of Sertoli cells, as well as their interactions with germ cells, has been the focus of investigation since their first description in 1865 by Enrico Sertoli. In recent years, Sertoli cell research has gone far beyond morphology and physiology and has become increasingly focused on molecular issues. The researchers' goal has been to understand the role of Sertoli cells in spermatogenesis and to apply this information in problems related to male fertility. The numerous and distinct junctional complexes and membrane specializations between Sertoli cells and germ cells provide a microenvironment for germ cell development, defining two anatomically and physiologically distinct compartments in the seminiferous tubule. Sertoli cells constitute a population of cells that do not divide, but are active during reproductive life, cyclically changing their morphology and gene expression in order to contribute to the initiation of the sperm wave and cooperation with spermatogenesis. In this review, we will highlight the main scientific advances regarding the important role of Sertoli cells in spermatogenesis, testis differentiation, sex determination and clinical issues involving Sertoli cell interaction with germ cells.

Key Words: History of Science, Sertoli Cells, Enrico Sertoli, Spermatogenesis, Testis

A Vida e o Microscópio de Sertoli

Enrico Sertoli nasceu em 6 de junho de 1842, no seio duma família nobre na pequena cidade de Sondrio, localizada ao norte de Milão, ao longo da fronteira ítalo-suíça. Aos 18 anos ingressou no curso de medicina na Universidade de Pavia. Dois anos depois iniciou trabalho de investigação no laboratório do distinto fisiologista e histologista Eusebio Oehl (1827–1903), tendo sido colega do premiado Nobel, Camillo Golgi. Ambos concluíram a sua formação académica no ano de 1865.¹

Não conhecemos completamente as exigências da época, mas é possível que a aquisição de um microscópio fosse exigida para cada estudante de medicina ao ingressar em histologia. Em 1862 Enrico Sertoli comprou um microscópio Belthle após iniciar seus estudos sob a orientação do Professor Oehl. O microscópio Belthle era um instrumento ótico de última geração na época e era comercializado pelo Instituto Ótico Kellner em Wetzlar (Alemanha). Este Instituto construía microscópios compostos com três ou mais lentes, e cada um possuía lentes de ampliação de 10x - 20x e apresentavam um sistema de rosca para mover as lentes. A célula ramificada ou célula ramificada foi descoberta usando o microscópio pessoal de Enrico Sertoli (Figs. 1-2). A qualidade do microscópio Belthle e sua importância pessoal são bem evidentes pelo cuidado que Sertoli lhe dedicou e pelo estado de conservação que pode ser confirmado quando foi encontrado mais de 100 anos depois, no interior da caixa de armazenamento de madeira, bem como o documento original de garantia fornecido por Belthle do Instituto Ótico Kellner.²

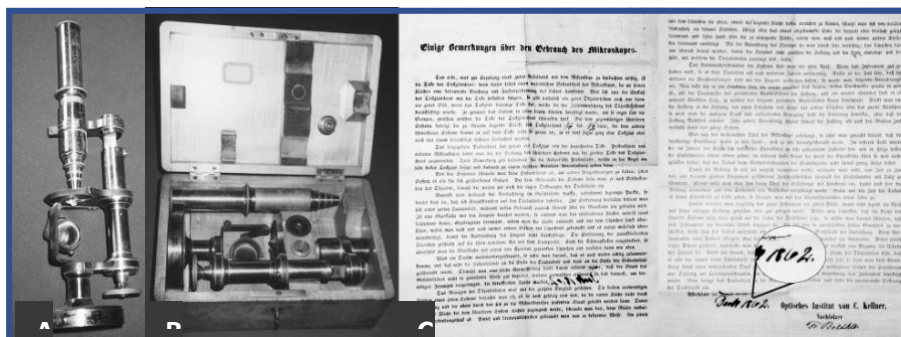


Figura 1. (A) O microscópio Belthle comprado por Sertoli em 1862 e com o qual fez a descoberta da célula de Sertoli; (B) Caixa de madeira original para armazenamento do microscópio que Sertoli manteve meticulosamente; (C) Documento original de duas páginas enviado junto com o microscópio da empresa alemã Belthle, que seria de garantia.³

A Descoberta

¹Hess, RA, & França, LR "History of the sertoli cell discovery", *Sertoli cell biology* (2005):3-13.

²Ibid

³Ibid

Aparentemente Sertoli trabalhou apenas com testículos humanos ao longo de sua investigação e estaria longe de imaginar que este é um excelente modelo para estudo das células de Sertoli. Isto porque no homem as células de Sertoli ocupam cerca de 37% do epitélio seminífero relativamente a células germinativas, enquanto noutras espécies ocupam apenas 15-20%. Esta maior proporção relativa de células de Sertoli no testículo humano é causada pela reduzida eficiência da espermatogénese. Enrico Sertoli recolhia os testículos que eram então preservados numa solução de amónia e cloreto mercúrico. É natural que tenha trocado impressões com Camilo Golgi e com outros estudantes sobre as últimas metodologias que estavam a ser testadas em histologia para melhorar a preservação do material biológico. Não há dúvida que Sertoli terá despendido horas intermináveis no laboratório ajustando o ângulo da luz solar para que as células aparecessem o mais claramente possível no seu campo de visão. É importante salientar que estas observações foram feitas sem o benefício de fixadores como o formaldeído, que apenas começou a ser usado para endurecimento de tecidos em 1868.^{4,5}

Inicialmente Sertoli descreveu a célula de Sertoli como uma célula idêntica a uma árvore, esguia e com longas extensões, que deixa cair o seu fruto à medida que a colheita amadurece. Para Sertoli era possível que esta célula, como o grande maestro de uma sinfonia, dirigisse a produção de espermatozoides no testículo e talvez os espermatozoides se desenvolvessem diretamente a partir da célula ramificada. Na primeira página de sua publicação o termo "células-mãe" é usado, o que sugere que suas observações eram bastante preceptivas e intuitivas sobre a verdadeira função da célula de Sertoli.⁶

Em 1863, era necessário desenhar as observações efetuadas ao microscópio. Sertoli foi o primeiro a reconhecer e a descrever gotículas de lipídios nesta célula e mencionou várias vezes que os lípidos poderiam exercer funções muito importantes na célula, uma

⁴Sertoli, E. "Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano", *Morgagni* 7 (1865): 31-40.

⁵Patriarca C et al., "Enrico Sertoli and the supporting cells of the testis", "Morphology is function", *Pathologica* 111 (2019):375-381. doi: 10.32074/1591-951X-32-19.

⁶Geyer CB. "A historical perspective on some "new" discoveries on spermatogenesis from the laboratory of Enrico Sertoli in 1878", *Biol Reprod.* 99(2018):479-481. doi: 10.1093/biolre/iox125.

função sobre a qual ainda sabemos pouco hoje. Ele também desenhou a célula como se fosse sincicial ou como uma célula multinucleada ramificada, com função de proteção de células germinativas (Fig. 2).⁷

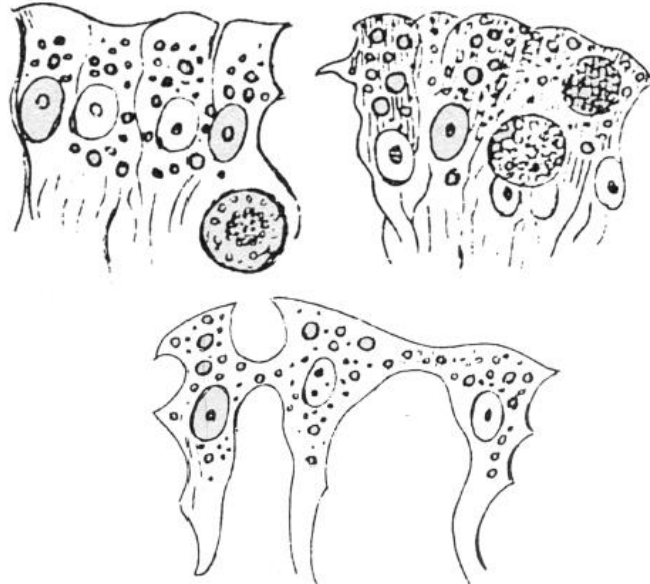


Figura 2. Desenhos retirados do artigo original de Sertoli.⁸

As descrições detalhadas de Sertoli são incríveis, considerando os equipamentos e as condições rudimentares com os quais ele trabalhava naquela época. Quando Sertoli publicou seu primeiro artigo em 1865, a maioria dos métodos de processamento histológico não existiam: fixação de tecidos, inclusão, corte com micrótomos e corantes histológicos. No ano em que Sertoli publicou seu último manuscrito como professor, em 1886, grandes avanços na técnica microscópica e instrumentação estavam surgindo, como a iluminação de Kohler e as lentes apocromáticas de Ernst Abbe, que se tornaram disponíveis pouco antes de Sertoli se aposentar. Apesar dessas limitações tecnológicas, Sertoli trabalhou com o que estava disponível e levou as observações aos limites da resolução microscópica da época. Portanto, devemos concluir que Sertoli era um estudante excepcional e determinado, com grande habilidade de observação e capaz de ter ideias originais que outros de sua época não estavam considerando.⁹

⁷Sertoli E. "The structure of seminiferous tubules and the development of [spermatids] in rats", *Biol Reprod.* 99 (2018):482-503. doi: 10.1093/biolre/iory134.

⁸ Ibid

⁹Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod.* 2018 Jul 1;99(1):87-100. doi: 10.1093/biolre/iory027.

Evolução da investigação nas células de Sertoli

Em 1865 Enrico Sertoli publicou o seu artigo original descrevendo a célula que atualmente é conhecida pelo seu nome e especulou que esta célula estaria associada à produção de espermatozoides. O conteúdo dessa publicação era totalmente descritivo e discutia as extensões celulares e os contatos dessa célula com as adjacentes. Mais de 100 anos depois, em 1967, haviam sido publicados apenas cerca de 35 artigos científicos sobre as células de Sertoli. Porém nos últimos 50 anos, milhares de publicações contendo o termo "Sertoli" no título ou no resumo contribuíram de forma significativa para o avanço da nossa compreensão acerca destas células.^{10,11}

O principal debate entre os cientistas que estudavam a espermatogénese no final do século XIX incidia em compreender se os gametas masculinos tinham origem nas células germinativas ou nas células de Sertoli. Enrico Sertoli liderou um grupo de cientistas que partilhava a visão anterior que agora sabemos ser a correta, de que as células germinativas masculinas progrediam através de um programa de desenvolvimento passo a passo que conduzia à produção de espermatozoides, propondo que esse processo era apoiado pelas células de Sertoli ou "células mãe" como ele as designou.^{12,13}

Um contemporâneo de Enrico, Victor von Ebner (1842-1925) pela primeira vez em 1888 referiu-se a estas células como "células de Sertoli", e a partir desse altura Sertoli viu seu nome definitivamente associado às células ramificadas dos túbulos seminíferos. Von Ebner defendia a visão de que as células de Sertoli originavam os espermatozoides, enquanto as células germinativas se desintegravam para produzir fluido seminal.¹⁴

Na descrição original de Sertoli é surpreendente a sofisticação e as observações claras e perspicazes dum investigador que realizou o seu todo o seu trabalho através do recurso dum microscópio de luz rudimentar, cuja fonte de luz era o sol e sem os beneficiar

¹⁰Flickinger C & Fawcett DW "The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium", *Anat Rec.* 158(1967):207-21. doi: 10.1002/ar.1091580210.

¹¹Clermont Y. "Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population", *Fertil Steril.* 17 (1966):705-721.

¹²Heller CG, Clermont Y "Spermatogenesis in man: an estimate of its duration", *Science.* 140(1963):184-6. doi: 10.1126/science.140.3563.184.

¹³Geyer CB "A historical perspective on some "new" discoveries on spermatogenesis from the laboratory of Enrico Sertoli in 1878", *Biol Reprod.* 99(2018):479-481. doi: 10.1093/biolre/iox125.

¹⁴Ibid

de um processamento histológico rotineiro. Nesta descrição original de Enrico Sertoli é clara a identificação de três etapas de desenvolvimento das células germinativas masculinas (mitótico, meiótico e pós-meioítico), que apenas foram esclarecidos quase 100 anos depois. Estas etapas são identificadas nos desenhos e nas legendas que acompanham as ilustrações e descrições de Sertoli. Lamentavelmente o trabalho original de Sertoli foi citado apenas algumas vezes, tendo sido ignorado durante várias gerações de investigadores.^{15, 16}

O interesse em compreender as células de Sertoli e as suas interações com as células germinativas começou a crescer em 1990 e a partir de 2012 passaram a ser publicados cerca de 500 artigos científicos por ano. Os temas dos artigos até a década de 1960 tratavam quase exclusivamente da morfologia complexa das células de Sertoli em várias espécies. A descrição morfológica foi-se tornando mais refinada relativamente ao manuscrito original de Sertoli, porém havia muito pouca compreensão acerca da função biológica dessas células. O aumento do interesse nas células de Sertoli e na sua morfologia foi ocasionado pela disponibilidade e melhoria da qualidade dos microscópios especialmente o eletrônico e o confocal, e os esquemas ilustrativos acerca da morfologia das células de Sertoli foi evoluindo, porém mantendo as principais características que constam na publicação original de Enrico Sertoli (Fig. 3).¹⁷ Esta primeira etapa na investigação das células de Sertoli está ilustrada na Figura 4A.

As células de Sertoli são essenciais no processo de desenvolvimento dos testículos e na produção de espermatozoides. Estas células sofrem alterações estruturais ao longo do desenvolvimento e ciclo do epitélio seminífero, interagem com várias outras células germinativas, modificando suas junções e estabelecendo conexões complexas. Além disso, produzem fluidos e proteínas e também realizam a fagocitose de porções citoplasmáticas de espermátides. Podemos citar investigadores importantes no estudo das células de Sertoli e das suas interações, destacando-se o papel de Lonnie Russell, que descreveu detalhadamente várias características das células de Sertoli, incluindo

¹⁵Russell LD. "Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region late spermatids of the rat", *Anat Rec.* 194 (1979):233-46. doi: 10.1002/ar.1091940205.

¹⁶Russell LD et al., "Reconstruction of a type-B configuration monkey Sertoli cell: size, shape, and configurational and specialized cell-to-cell relationships", *Am J Anat.* 175 (1986):73-90.

¹⁷Ibid

suas junções e relações com as células germinativas. Russell foi pioneiro ao apresentar a primeira representação tridimensional das células de Sertoli, fornecendo informações valiosas sobre sua estrutura e interações.^{18,19, 20}

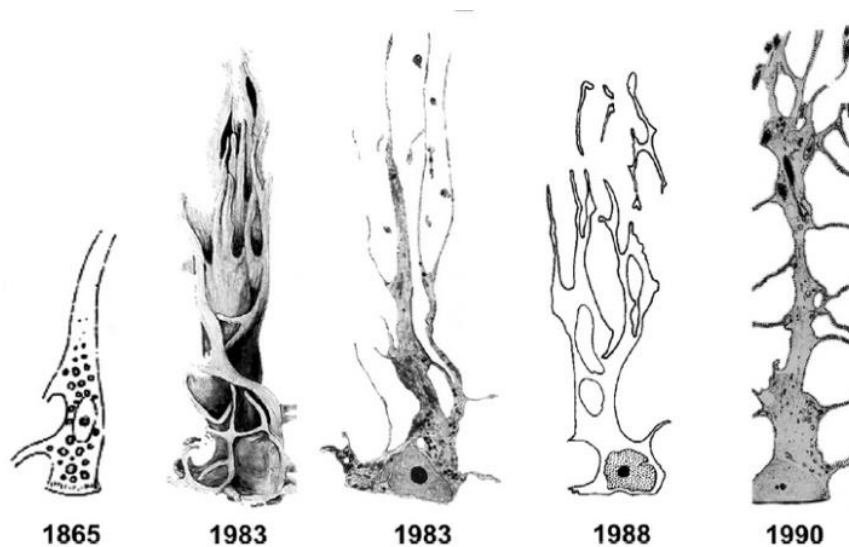


Figura 3. Evolução ao longo dos anos das ilustrações das células de Sertoli.²¹

A morfologia da célula de Sertoli representa uma das estruturas tridimensionais mais complexas da biologia celular e, no entanto, Enrico Sertoli fez suas observações históricas sem o benefício de um fixador adequado, sem o recurso de seções histológicas finas de tecido testicular incluído e sem a contrastação de corantes histológicos, atualmente imprescindíveis na rotina laboratorial. Mesmo com todas estas limitações, Sertoli foi capaz de descrever prolongamentos citoplasmáticos únicos que apoiavam e sustentavam o desenvolvimento das células germinativas, bem como descreveu com detalhe o núcleo com um grande nucléolo (característica morfológica importante que é utilizada para o reconhecimento celular). Sertoli sugeriu que essas células eram

¹⁸Luaces JP, et al., "What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology", *Front Cell Dev Biol.* 2023 doi: 10.3389/fcell.2023.1114769.

¹⁹Hess, RA & Vogl, AW. "Sertoli cell anatomy and cytoskeleton." In: Griswold, M., editor. *Sertoli Cell Biology.* Elsevier Academic Press; Oxford; 2015. p. 1-55.

²⁰Hogarth CA & Griswold MD. "Immunohistochemical approaches for the study of spermatogenesis", *Methods Mol Biol.* 927 (2013):309–320.

²¹Burgos MH & Fawcett DW. "Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*)", *J Biophys Biochem Cytol.* 1(1985):287–300.

individuais, mas outros afirmaram que eram um sincício, o que se tornou uma controvérsia duradoura que apenas foi esclarecida após 1955, quando a microscopia eletrônica revelou membranas celulares e complexos de junção.^{22,23}

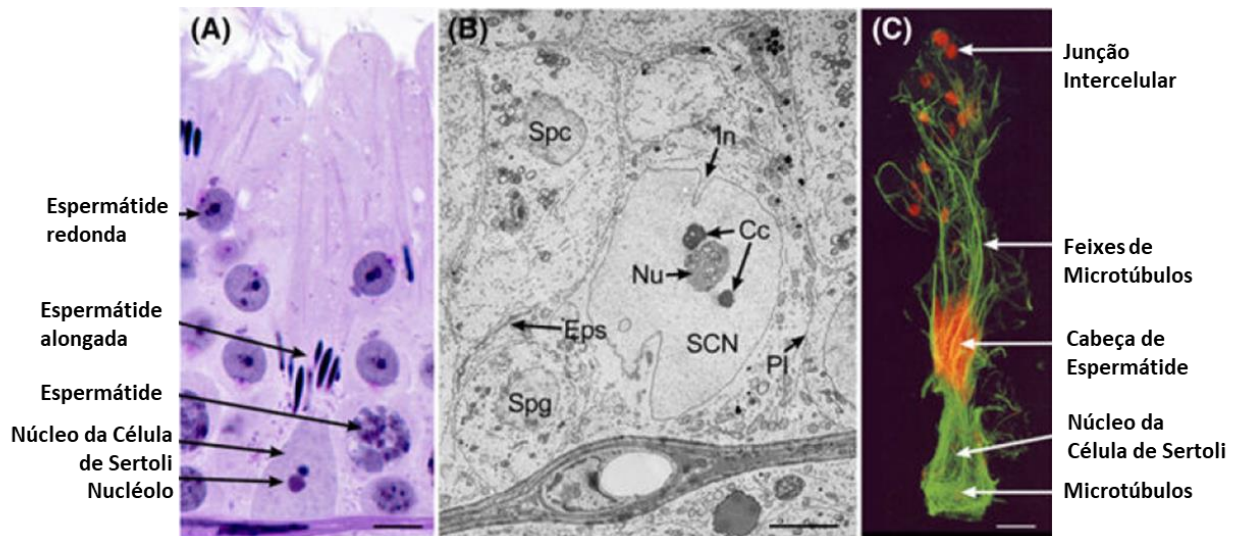


Figura 4. Etapas da Investigação da células de Sertoli. (a) Fase da Microscopia de Luz; (B) Fase da Microscopia Eletrônica de Transmissão e (C) Fase de Microscopia de Imunofluorescência. Spermatogônias (Spg); Espermatócito (Spc). A célula de Sertoli tem um núcleo altamente eucromático (SCN), um nucléolo grande (Nu) com dois cromocentros satélites (Cc) e uma indentação da membrana nuclear (In). Plasmalema (PI); Especialização ectoplasmática (Eps) na barreira sangue-testículo.^{24,25}

Ao longo dos anos numerosas revisões da morfologia da célula de Sertoli forneceram aperfeiçoamentos na percepção acerca das complexas interações das células no epitélio seminífero. Ao longo das duas últimas décadas, o progresso científico desvendou uma riqueza de informações acerca dos genes e proteínas expressos no testículo, em parte

²²Fawcett, DW. "Ultrastructure and function of the Sertoli cell". In: Hamilton, DW., Greep, RO., editors. Handbook of Physiology. Vol. 5. American Physiology Society; Washington, DC: 1975. p. 21-55.

²³Zebrun W & Mollenhauer HH. "Electron microscopic observations on mitochondria of rat testes fixed in potassium permanganate", *J Biophys Biochem Cytol.* 7(1960):311–314.

²⁴Ozaki-Kuroda K, et al., "Nectin couples cell cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions", *Curr Biol.* 12(2002):1145-50.

²⁵França LR, et al., "The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity", *Andrology* 4(2016):189-212. doi: 10.1111/andr.12165

devido à sequenciação do genoma. Esses dados genômicos possibilitaram a identificação de produtos génicos potencialmente cruciais, que, por sua vez contribuem para a produção de anticorpos que permitem localizar essas proteínas no interior do testículo. Assim, desde 2005, duas técnicas emergiram como fundamentais no estudo de morfologia reprodutiva. Em primeiro lugar, a imunohistoquímica tornou-se o método preferido para identificar e localizar proteínas intracelulares. A aplicação desta técnica contrinuiu para o aumento exponencial de publicações recentes que enfatizam especificamente o contributo das células de Seroli na espermatogénese. Em segundo lugar, o advento da microscopia confocal de varrimento e a imunofluorescência revolucionou a capacidade de visualizar tridimensionalmente as interações entre células de Sertoli e células germinativas.^{26,27,28,29,30}

Por outro lado, a hibridização in situ permitiu determinar a expressão de mRNA celular específico, bem o isolamento e cultura de células de Sertoli e germinativas. A incorporação destas várias abordagens é crucial para alcançar uma compreensão abrangente e precisa da localização subcelular de proteínas e dos seus papéis nos intricados processos da função da célula de Sertoli e da espermatogénese.^{31,32,33}

²⁶Xiao X et al., “Intercellular adhesion molecule-2 is involved in apical ectoplasmic specialization dynamics during spermatogenesis in the rat”, *J Endocrinol* 216 (2013):73 86.

²⁷Wan HT, et al., “P-FAK-Tyr(397) regulates spermatid adhesion in the rat testis via its effects on F-actin organization at the ectoplasmic specialization”, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305 (2013):E687 99.

²⁸Su L, et al. “Drug transporters and blood testis barrier function”, *J Endocrinol* 209(2011):337 51.

²⁹Aristaeus de Asis M et al., “A network of spectrin and plectin surrounds the actin cuffs of apical tubulobulbar complexes in the rat”, *Spermatogenesis* 3(2013):e25733.

³⁰Rainey MA, et al., “The endocytic recycling regulator EHD1 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice”, *BMC Dev Biol* 10 (2010):37

³¹Hogarth CA, et al., “EGR4 displays both a cell- and intracellular-specific localization pattern in the developing murine testis”, *Dev Dyn* 239 (2010):3106 14.

³²Li MW, et al., “Actin-binding protein drebrin E is involved in junction dynamics during spermatogenesis”, *Spermatogenesis* 1(2011):123 36.

³³Mok KW, et al., “rpS6 Regulates blood testis barrier dynamics by affecting F-actin organization and protein recruitment”, *Endocrinology* 153(2012):5036 48.

Podemos assim resumir a investigação das células de Sertoli em três etapas cronológicas completamente dependentes da evolução tecnológica da época, mas que coexistem na linha do tempo e que podem ser ilustradas pelas fotos da figura 4.^{34,35}

- a fase da Microscopia de Luz;
- a fase da Microscopia Eletrónica de Transmissão;
- fase de Microscopia de Imunofluorescência.

As figuras 5 e 6 resumem numa linha do tempo avanços científicos significativos no âmbito do conhecimento acerca das células de Sertoli, desde a sua descrição original até ao século XXI. Este quadro resumo contém apenas uma pequena amostra do enorme contributo de centenas de investigadores ao longo dos cerca de últimos 150 anos.³⁶

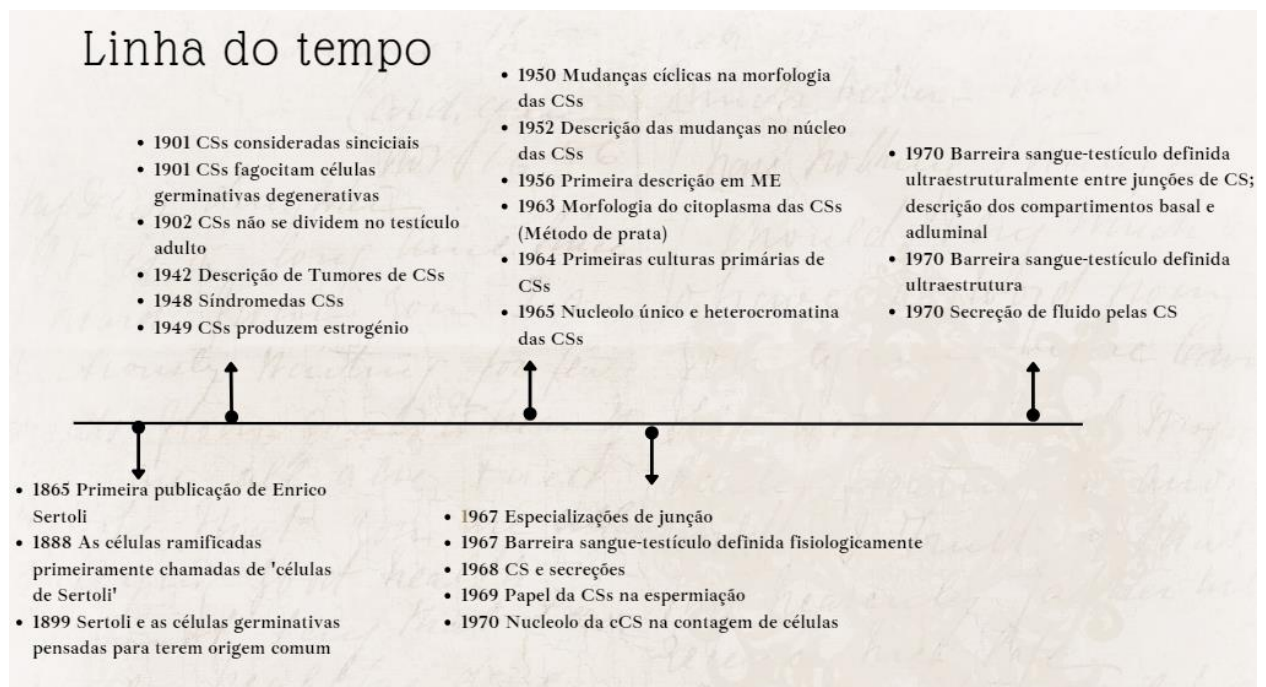


Figura 5. Linha do tempo de cerca de um século, desde a sua descrição por Enrico Sertoli em 1865 até 1970, com o registo resumido dos principais avanços científicos no âmbito do conhecimento acerca da célula de Sertoli de mamíferos.³⁷

³⁴Young JS & Vogl AW. "Focal adhesion proteins Zyxin and Vinculin are co-distributed at tubulobulbar complexes", *Spermatogenesis* 2(2012):63 8.

³⁵Du M et al., "A novel subcellular machine contributes to basal junction remodeling in the seminiferous epithelium", *Biol Reprod* 88(2013):60.

³⁶Ibid

³⁷Ibid

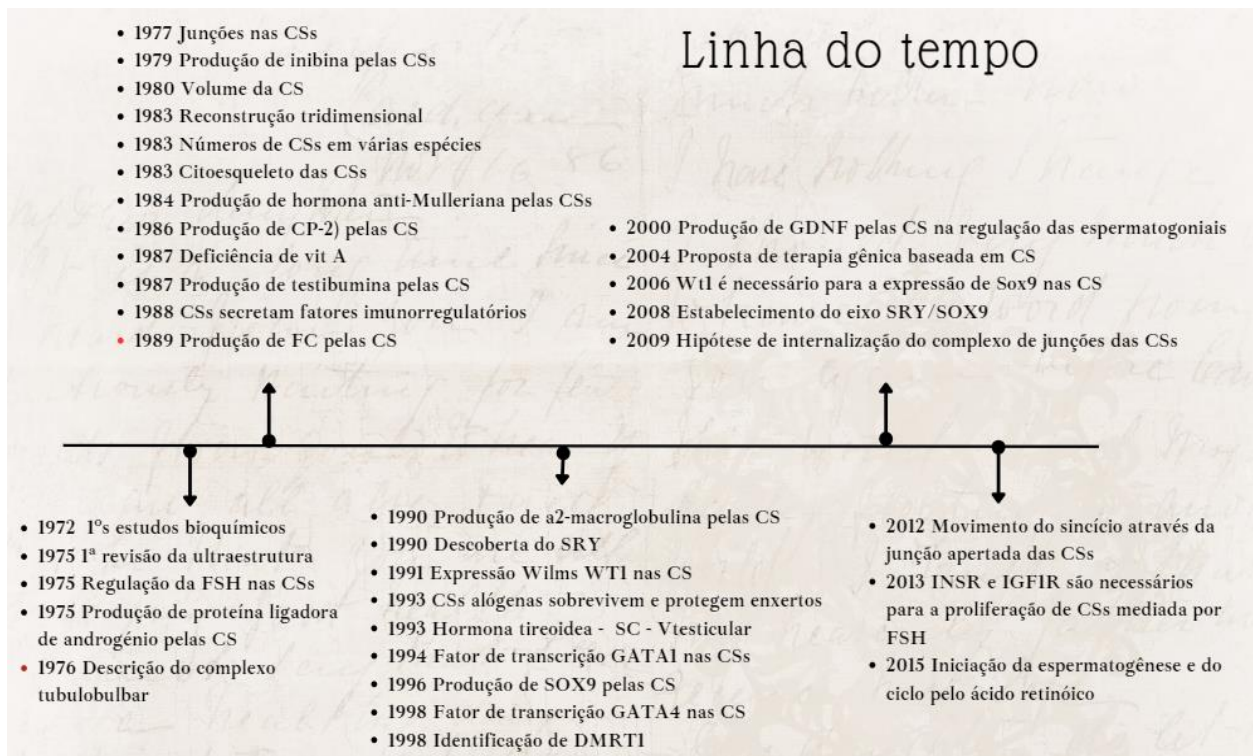


Figura 6. Linha do tempo desde a década de 70 do século XX até aos dias de hoje, com o registo resumido dos principais avanços científicos no âmbito do conhecimento acerca da célula de Sertoli de mamíferos.³⁸

Considerações Finais

A pesquisa sobre as células de Sertoli e as células germinativas avançou significativamente desde a segunda metade do século XX, porém ainda é necessário compreender melhor as várias interações para enfrentar os desafios da infertilidade e compreender as alterações no sistema reprodutor masculino. Ao refletir sobre o progresso científico percebemos a forma como a tecnologia impulsiona as abordagens de pesquisa. Desde 1967, a pesquisa básica sobre espermatogénese foi impulsionada por microscópios progressivamente mais sofisticados, pelo desenvolvimento de culturas de células primárias, pelo transplante de células germinativas, citometria de fluxo, matrizes de DNA e RNAseq, espectrometria de massa entre outros. A análise de expressão gênica de células individuais também é uma técnica em desenvolvimento

que terá impacto significativo na compreensão da expressão génica das células de Sertoli e germinativas.³⁹

Porém embora a tecnologia impulsiona as abordagens de pesquisa, muitas vezes são as necessidades sociais que alavancam o financiamento para investigação científica e consequentemente, os tópicos de pesquisa. Por exemplo, a recente meta-análise sobre a diminuição na contagem de espermatozoides gerou muito interesse público. Embora anteriormente já tenham sido efetuados relatórios acerca da diminuição na contagem de espermatozoides, foi essa análise de meta regressão, utilizando uma abordagem abrangente que relatou uma queda de 50 a 60% na contagem de espermatozoides entre 1973 e 2011 nos países desenvolvidos. Os autores afirmaram que "devido às implicações significativas para a saúde pública desses resultados, há necessidade urgente de investigação acerca das causas dessa queda contínua." Outros estudos relataram o aumento de casos de tumores testiculares e distúrbios do sistema reprodutor masculino, associaram essas patologias a alterações ambientais e/ou ao estilo de vida moderno. Uma maior compreensão das células de Sertoli e sua interação com as células germinativas será necessária para compreender os mecanismos subjacentes.⁴⁰

Sobre a Autora:

Ana Margarida Calado

anacalad@utad.pt

³⁹Weber JE, et al., "Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships", *Am J Anat* 167(1983):163-179.

⁴⁰Griswold MD. "50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells", *Biol Reprod.* 99(2018):87-100. doi: 10.1093/biolre/iroy027