

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ELISA GOMES SANTOS

TAIS GONÇALVES BERBEL

**DETECÇÃO DA PROTEÍNA NUCLEOLAR
FIBRILARINA NA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DE
CHROMATOID BODIES E CARACTERIZAÇÃO DE
SEU PAPEL NA FISIOLOGIA DESTA ORGANELA
CITOPLASMÁTICA**

BAURU

2014

ELISA GOMES SANTOS
TAIS GONÇALVES BERBEL

**DETECÇÃO DA PROTEÍNA NUCLEOLAR
FIBRILARINA NA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DE
CHROMATOID BODIES E CARACTERIZAÇÃO DE
SEU PAPEL NA FISIOLOGIA DESTA ORGANELA
CITOPLASMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso do
Centro de Ciências da Saúde para obter o
título de Bacharel em Biomedicina sob a
orientação da Profa. Dra. Rita Luiza
Peruquetti.

BAURU

2014

Santos, Elisa Gomes.

S2374d

Detecção da proteína nucleolar fibrilarina na composição molecular de Chromatoid Bodies e caracterização de seu papel na fisiologia desta organela citoplasmática / Elisa Gomes Santos; Tais Gonçalves Berbel -- 2014.

23f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Chromatoid Body. 2. Nucléolo. 3. Fibrilarina. 4. Espermatogênese. 5. Fertilidade. I. Berbel, Tais Gonçalves. II. Peruquetti, Rita Luiza. III. Título.

ELISA GOMES SANTOS
TAIS GONÇALVES BERBEL

**DETECÇÃO DA PROTEÍNA NUCLEOLAR FIBRILARINA NA COMPOSIÇÃO
MOLECULAR DE *CHROMATOID BODIES* E CARACTERIZAÇÃO DE SEU
PAPEL NA FISIOLÓGIA DESTA ORGANELA CITOPLASMÁTICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciência da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profª Dr.ª Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora:

Profª Drª Rita Luiza Peruquetti
Universidade do Sagrado Coração (USC) (Orientadora)

Profº Drº Carlos Alberto Vicentini
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FC)

Profª Drª Juliana Elaine Perobelli
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Bauru, 04 de dezembro de 2014.

Elisa Gomes Santos e Taís Gonçalves Berbel

Dedicamos esse trabalho aos nossos pais, nossos irmãos
e nossas avós. Que são nossa fonte inesgotável de
amor, felicidade e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Elisa Gomes Santos

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais pelo apoio nessa caminhada, ao meu irmão, em especial a Prof^a Dr^a. Rita Luiza Peruquetti pelos ensinamentos e dedicação ao transmitir ensinamentos e, também, a Larissa Fiamengui de Pauli e Taís Berbel pela parceria neste trabalho.

Agradeço também a Fundação de Amparo a Pesquisa da USC (FAP/USC) pela bolsa de Iniciação Científica concedida no período de 2013-2014 para realização do projeto; a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização do projeto (Processo FAPESP 2012/22009-7); e também ao Wilson Aparecido Orcini e a Fernanda Pazotti Daher Arcangelo pelo apoio técnico nos trabalhos realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC.

Agradeço também ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FC), pelo empréstimo do microscópio fluorescência e também ao Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FC), pelo empréstimo das membranas para teste da técnica de Western Blot.

Taís Gonçalves Berbel

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais por me incentivarem, aos meus irmãos, em especial a Prof^a Dr^a. Rita Luiza Peruquetti pelos ensinamentos e dedicação e não me deixar desistir; e também a minha amiga Elisa Gomes Santos pela paciência e companherismo.

Agradeço também a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização do projeto (Processo FAPESP 2012/22009-7); e também ao Wilson Aparecido Orcini e a Fernanda Pazotti Daher Arcangelo pelo apoio técnico nos trabalhos realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC.

Agradeço também ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FC), pelo empréstimo do microscópio fluorescência e também ao Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FC), pelo empréstimo das membranas para teste da técnica de Western Blot.

“Quem se cala absorve
mais”.
(João Gomes).

Resumo

O *chromatoid body* (CB) é uma organela citoplasmática que tem sido indicada como possuindo um papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides. O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e também como centro de determinação dos destinos de RNAm, estando profundamente relacionado com a fertilidade dos organismos. Alguns estudos indicam que alguns componentes que constituem esse complexo macromolecular citoplasmático possuem origem nucleolar, como por exemplo a proteína fibrilarina (B36), que possui a função no metabolismo de RNAr que ocorre no CFD (componente fibrilar denso) do nucléolo. O presente trabalho acompanhou a expressão da proteína nucleolar fibrilarina em cada estágio do ciclo espermatogênico (I-III; IV-VI; VII-IX; X-XII) dos túbulos seminíferos, e também a distribuição da proteína nucleolar fibrilarina durante a formação de CBs em células germinativas nos túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico, para o teste de duas hipóteses que pretendem esclarecer a real participação da proteína nucleolar fibrilarina no metabolismo de CB. Para isso foram utilizadas técnicas de *Western blot* e imunofluorescência. Os resultados demonstraram uma maior expressão de fibrilarina no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico, e a interação da proteína nucleolar fibrilarina com MIWI (proteína que possui um papel no metabolismo de RNAs no CB) e, também, a interação da proteína nucleolar fibrilarina com HSP70 (proteína que possui papel proteossômico no CB). Desta maneira, nenhuma das duas hipóteses testadas no presente trabalho foi excluída. Para a possibilidade de confirmação de uma das duas hipóteses será realizada co-immunoprecipitação proteica entre fibrilarina e MIWI e entre fibrilarina e HSP70.

Palavras-chaves: *Chromatoid body*, nucléolo, fibrilarina, espermatogênese, fertilidade.

ABSTRACT

Chromatoid body (CB) is a typical cytoplasmic organelle of male germ cells, and it seems to be involved in RNA/protein accumulation for later germ-cell differentiation. Most recent studies focused on the molecular composition and functions of the CB suggest that this structure acts as a subcellular coordinator of different RNA-processing pathways and centralizes posttranscriptional mRNA control in the cytoplasm of haploid germ cells. It has been hypothesized that nucleolar proteins, such as fibrillarin (B36), which is found in the nucleolar CFD playing a role in the rRNA metabolism, may be found in the CBs molecular composition. The aim of the present study was to follow the expression of the nucleolar protein fibrillarin in the seminiferous tubules at different stages of the spermatogenic cycle (I-III; IV-VI; VII-IX; X-XII); and also to follow the distribution of the nucleolar protein fibrillarin during the CB assembly in seminiferous tubules at stages IV-VI testing two hypothesis aiming to elucidate the role that fibrillarin might play for the maintenance of CB physiology. The analyses were performed by Western blot and by immunofluorescence. Results showed a higher expression of fibrillarin at stage IV-VI and co-localization between fibrillarin and MIWI, a typical CB component which plays a role in the mRNA regulation and small-RNA mediated gene control; it was also shown the co-localization between fibrillarin and HSP70, a chaperone playing a role in the proteasome degradation in the CB. None of our original hypothesis was rejected and new experiments will be performed to achieve this goal.

Key-words: Chromatoid body, nucleolus, fibrillarin, spermatogenesis, fertility.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	11
1.1 <i>Chromatoid body</i>	11
1.2 Nucléolo.....	13
2. Justificativa.....	15
3. Objetivo geral.....	17
3.1 Objetivos específicos.....	17
4. Material e Método.....	17
4.1. <i>Squash preparations</i>	19
4.2. Imunofluorescência em <i>squash preparations</i>	19
4.3. Análise de co-localização – Coeficiente de Pearson’s.....	20
4.4 Extração de proteínas totais e <i>ImunoBlot</i>	20
5. Resultados	21
5.1. ImunoBlot	20
5.2. Imunofluorêscencia	22
6. Discussão	27
7. Conclusão.....	30
8. Referências.....	31
Anexo 1.....	36

1. Introdução

1.1. *Chromatoid body (CB)*

Toda célula germinativa do reino animal possui um acúmulo citoplasmático de material chamado “nuage”. O corpo polar dos oócitos de *Drosophila* é, provavelmente, o tipo mais bem conhecido de “nuage”. Em células germinativas a “nuage” é conhecida como *chromatoid body* (CB) (PARVINEN, 2005). O CB é uma organela citoplasmática que aparentemente possui um papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992). O CB começa a ser visualizado no citoplasma das células germinativas após a primeira meiose, como nos espermatócitos primário e secundário, e apresenta-se na sua forma final no citoplasma das espermátides iniciais, exercendo seu papel até a finalização da espermiogênese. Após a finalização da espermiogênese o CB é eliminado junto com os restos citoplasmáticos das espermátides finais (LOPES; ROELEN, 2010). O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e também como centro de determinação dos destinos de RNAm (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007). Devido a essas características, essa estrutura parece possuir funções importantes no processo de espermatogênese e espermiogênese, como por exemplo, comunicação celular entre as espermátides (VENTELÄ et al., 2003; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a), direcionamento de mitocôndrias para a região caudal da espermátide (onde auxilia na formação da bainha mitocondrial e flagelo do espermatozoide) (FAWCETT et al., 1970; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a) e auxílio na formação do acrossomo do espermatozoide (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; TANG et al., 1982; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a). Também tem sido demonstrado que alguns componentes moleculares que constituem o CB, como DNase, RNase, AcPs, Ubiquitina e HSP70, determinam que essa estrutura atue como um centro de degradação, onde DNAs, RNAs e proteínas,

que não seriam mais necessários para o processo da espermatogênese, seriam degradados (HARAGUCHI et al., 2005).

Alguns autores propõem que o CB se origine a partir de material nucleolar, que se fragmenta nas etapas iniciais da espermatogênese e migra para o citoplasma, formando pequenas “nuages”, que aos poucos se coalescem, originando esta estrutura denominada CB (COMINGS; OKADA, 1972; ANDERSEN, 1978; ANDONOV, 1990). A fragmentação do material nucleolar nas etapas iniciais da espermatogênese também foi demonstrada por Takeuchi e Takeuchi (1990) e Peruquetti et al. (2008, 2010 a,b, 2011, 2012a,b). Em um estudo recente onde os autores procuraram interrelacionar a fragmentação do material nucleolar durante a divisão meiótica com a formação do CB, foi detectada a presença na proteína nucleolar fibrilarina em uma posição citoplasmática perinuclear, que corresponde à posição onde o CB é observado no citoplasma das espermátides iniciais (SOUZA et al., 2012). Essa possível localização da fibrilarina na composição molecular do CB traz maiores indícios de que produtos nucleolares podem estar relacionados com a organização do CB durante a espermatogênese. Um outro estudo que analisou o ciclo nucleolar durante a gametogênese demonstrou que o reestabelecimento da morfologia nucleolar durante a gametogênese é um fator importante para remoção dos danos celulares induzidos pelo envelhecimento (UNAL et al., 2011). Portanto, poderíamos inferir que algumas proteínas nucleolares poderiam ser translocadas para o CB durante a espermatogênese, como parte do processo de reestabelecimento da morfologia nucleolar.

Outros autores, porém, afirmam que o CB origina-se a partir da aglomeração de um material inter-mitocondrial presente no citoplasma das células germinativas (FAWCETT et al., 1970; REUNOV et al., 2000). Independente de sua origem, a ação dessa estrutura citoplasmática parece ser muito importante para o processo de espermatogênese, pois, a presença de mutações ou até mesmo a ausência de algumas proteínas, que são constituintes do CB, como as proteínas TDR1/MTR-1, MVH e MIWI e no antígeno de histocompatibilidade OX3, causam esterilidade em ratos (HEAD; KRESGE, 1985; CHUMA et al., 2006; DENG; LIN, 2002; TOYOOKA et al., 2000). Portanto, devido ao fato de existirem muitas dúvidas sobre a origem e função do CB e, devido à aparente importância dessa estrutura para o evento

da espermatogênese, suas características precisam ser melhor esclarecidas em todas as classes animais.

1.2. Nucléolo

O nucléolo é um domínio territorial particular do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). É considerado um subcompartimento do núcleo, altamente organizado e não envolto por membrana, e, também, é o local da biogênese dos ribossomos (GERBI, 2003). O nucléolo interfásico encontra-se organizado ao redor de regiões cromossômicas denominadas “Regiões Organizadoras Nucleolares” (RONs). As RONs são locais dos cromossomos que possuem genes que determinam a transcrição de RNA ribossômico (RNAr), que são transcritos e processados em pré-ribossomos no interior do nucléolo. Os genes ribossomais estão presentes em seqüências altamente repetidas em *tandem*, existindo várias cópias de genes RNAr em cada RON (SUMMER, 1990). A transcrição dos genes RNAr é realizada pela RNA polimerase I (RNA pol I) e ocorre em seqüência, deixando a estrutura com um aspecto de “árvore de natal”, como observado, primeiramente, por Miller e Beatty (1969) e, posteriormente, por Scheer et al. (1997).

O transcrito primário RNAr 45S é processado em RNAr maduros 18S, 5,8S e 28S e, então, proteínas são adicionadas aos pré-ribossomos nascentes e, também, o RNAr 5S (sintetizado fora do nucléolo) é incorporado (THIRY; GOESSENS, 1996). As unidades de transcrição para o RNAr 45S são separadas por grandes espaços não transcritos ou regiões intergênicas (IGR), e dentro das unidades de transcrição encontram-se as regiões espaçadoras (TS), que possuem espaçadores externos nos finais (ETS) e espaçadores internos (ITS) dentro da unidade (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1993).

A formação do nucléolo é um processo dinâmico ao longo do ciclo celular sendo denominado nucleologênese. Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG), contudo, durante a nucleologênese, esses domínios desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular (ZATSEPINA et al., 1997). Os CFDs formam uma rede que liga os CFs. Essa organização espacial é similar à descrita para

nucléolos de plantas (JUNÉRA et al., 1995). O CF está em contato direto com a RON e na sua periferia ocorre a transcrição do RNAr 45S. O processamento do RNAr e sua reunião com as proteínas e o RNAr 5S, que irá formar as subunidades ribossômicas maduras, ocorrem no CFD e CG (THIRY; GOESSENS, 1996).

O nucléolo possui outras funções, como a ligação e maturação de vários outros tipos de RNAs (pequenos RNAs nucleares – snRNAs) (GERBI, 2003). Estes snRNAs complexam-se com proteínas formando pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) que representam uma classe estável de complexos RNA-proteínas encontrada no núcleo de todas as células eucarióticas (LÜHRMANN, 1990). Algumas dessas snRNPs possuem importante função no processamento do pré-RNAr 45S. Por exemplo, a snRNP denominada MRP é importante para a produção do RNAr 5,8S, e, em organismos superiores, a snRNP U8 é necessária para formar o RNAr 28S (GERBI, 2003). A mais estudada é a snRNP U3 que, provavelmente, está relacionada com a clivagem do pré-RNAr 45S no local situado entre o ITS1 e 5,8S. Foi sugerido que partículas de U3 sejam as marcações eletrondensas, conhecidas como “botões terminais”, observadas na extremidade 5' terminal das moléculas de RNAr pré-sintetizadas (HERNANDEZ-VERDUN, 1991).

Há aproximadamente 271 proteínas nucleolares envolvidas na síntese e no processamento de RNAr, porém existem outras proteínas que parecem possuir diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de snRNPs; biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (PEDERSON, 2002). Além disso, o nucléolo abriga proteínas que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular e possui uma proteína, denominada ARF, que é considerada supressora de tumor (CARMO-FONSECA et al., 2000).

A composição química do nucléolo é relativamente bem definida. É composto por DNAr e RNAr em seus três domínios (CF, CFD e CG). Possui várias proteínas classificadas como: histonas, proteínas acídicas e enzimas. As histonas estão presentes nos três domínios nucleolares por estarem complexadas com DNAr. As proteínas acídicas possuem localizações variadas. A fibrilarina (B36), que forma um complexo com o U3 e é um importante fator de processamento de RNAr, é encontrada no CF e no CFD. A nucleolina (C23),

que está relacionada com a transcrição de DNAr e com o processamento de RNAr, regulando a taxa de produção de pré-ribossomos, pode ser encontrada no CF e CFD. A numatrina (B23), responsável pelos estádios tardios de reunião de pré-ribossomos, é encontrada associada com RNP pré-ribossômicas maduras e está envolvida no transporte de pré-ribossomos para o citoplasma, sendo observada no CFD e CG. A ribogranulina (52kDa), assim como a fibrilarina, também está associada com U3 snRNA, importante para o processamento de RNAr, sendo encontrada no CG. As enzimas também possuem diferentes localizações: a RNA pol I, específica para a síntese de RNAr é localizada no CF e CFD; a DNA topoisomerase I, necessária para a descondensação do DNA no curso da transcrição, não é específica para DNAr e encontra-se no CF e CFD; a DNA topoisomerase II, também é responsável pela mudança na topologia da hélice de DNA e é encontrada somente no CFD do nucléolo (MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004a; THIRY; GOESSENS, 1996). Achados citológicos descrevem que as proteínas C23 e B23 são responsáveis pela impregnação pelos íons prata (OCHS; BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

Recentemente foi descrita a presença de mais de 10 micro-RNAs (miRNAs) em compartimentos nucleolares. De maneira interessante a presença desses miRNAs foi detectada independentemente da ação de Dicer e, também, da principal enzima nucleolar (RNA pol I) estando, portanto, não relacionado com a transcrição dos RNAs precursores das subunidades ribossomais (BAI et al., 2014). A presença desses miRNAs no nucléolo, ainda com função desconhecida, é um fato que pode ligar ainda mais a fisiologia nucleolar e a fisiologia dos CBs, visto que o funcionamento dos CBs está fortemente baseado nas vias de micro-RNAs existentes na composição molecular desta organela.

2. Justificativa

Tendo em vista a importância do ciclo nucleolar e da organização do CB, descritas anteriormente, para o processo da espermatogênese, estudos que busquem evidenciar a expressão, a localização e a distribuição de proteínas nucleolares, como a fibrilarina, no epitélio seminífero de mamíferos, a

localização da fibrilarina na composição molecular do CB, bem como, os componentes do CB que interagem fisicamente com a fibrilarina, são de extrema importância. Identificando os eventos citados, poderemos estabelecer como o ciclo nucleolar interfere na formação do CB e, principalmente, quais funções as proteínas nucleolares poderiam desempenhar para a manutenção da fisiologia do CB.

Considerando-se todas as evidências descritas na introdução, poderíamos formular duas hipóteses principais para elucidar a localização da fibrilarina na composição molecular do CB, bem como a função que essa proteína nucleolar desempenha nessa estrutura:

Hipótese 1: Com a fragmentação nucleolar no início da divisão meiótica, parte das proteínas nucleolares (entre elas a fibrilarina) seriam translocadas para o CB pois, após o término da divisão meiótica, pois o nucléolo que se reorganiza no núcleo das espermatídes iniciais possui uma menor área, devido à fatores como redução do número de RONS e redução da atividade sintética da célula. Por isso, essas proteínas excedentes não seriam necessárias para a reorganização da arquitetura nuclear, sendo encaminhadas para o CB para serem degradadas pelos componentes proteossômicos dessa estrutura. Se essa hipótese for verdadeira, a fibrilarina deverá ser observada em associação física com esses componentes proteossômicos, como DNase, RNase, Ubiquitina ou HSP70.

Hipótese 2: Com a fragmentação nucleolar no início da divisão meiótica, parte das proteínas nucleolares (entre elas a fibrilarina) seriam translocadas para o CB pois, ao se integrarem com outros componentes moleculares do CB os mesmos seriam responsáveis pelo controle das modificações pós-transcricionais de RNAm que serão utilizados no processo de espermiogênese, que haviam sido transcritos no início da divisão meiótica e armazenados/silenciados no CB, para que sejam traduzidos na etapa final da diferenciação das espermatídes em espermatozóides. Como a fibrilarina é uma proteína que age no metabolismo de RNAr, no CB esta proteína poderia estar fisicamente associada com outros componentes que realizam o controle

metabólico pós-transcricional de RNAm armazenados no CB, como as proteínas MVH, MIWI ou Dicer.

3. Objetivo geral

O objetivo geral da presente proposta será realizar extração de proteínas totais e visualizá-las por meio de *Imuno Blot* para análise da variação da expressão da proteína nucleolar fibrilarina nas células do epitélio germinativo de roedores em diferentes estágios do ciclo espermatogênico. Detectar se a proteína nucleolar fibrilarina apresenta relação com a formação dos CBs de espermátides iniciais, e se nesta relação a fibrilarina estaria mais associada com componentes de degradação ou com componentes de metabolismo ativo no CB.

3.1. Objetivos específicos

-Verificar em qual ciclo espermatogênico existe uma maior expressão da proteína nucleolar fibrilarina, correlacionando os níveis de expressão de fibrilarina com os estágios do ciclo espermatogênico dos túbulos seminíferos, verificando se as mais altas taxas de expressão de fibrilarina correspondem aos estágios onde encontramos CB ativos (estágios IV-VI);

-Aplicação de técnicas de imunofluorescência para detecção da proteína nucleolar fibrilarina, bem como de proteínas que são componentes moleculares de CBs (MIWI e HSP70), identificando possíveis interações que a proteína nucleolar fibrilarina pode apresentar com alguns dos componentes moleculares de CBs, como descritos acima, por meio de análises de co-localização.

4. Material e Métodos

Foram utilizados 10 camundongos machos (*Mus musculus*) com idade entre 4 a 6 meses, que foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante os experimentos os animais

receberam cuidados de acordo com as *Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2013)*, normalizada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração oferecidas *ad libitum*, com ambiente controlado (temperatura entre 21° a 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro). Ao final do período experimental os animais foram anestesiados por meio de injeção de barbitúricos e mortos por deslocamento cervical. Todos os procedimentos que foram utilizados estão de acordo com as *Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013)*. Após a obtenção dos túbulos seminíferos os mesmos foram separados de acordo com os estágios do ciclo espermatogênico (sendo que o estágio I-III tem uma cor clara, pois é o estágio onde as células são indiferenciadas; o estágio IV-VI possui uma cor mais intensa que a do anterior e é o de maior interesse pois é onde o CB está com função mais ativa; já o estágio VII-IX é o de cor mais intensa, no qual corresponde a maturação do espermatozoide; o estágio X-XII é onde ocorre a espermição, por isso não apresenta coloração), por meio da utilização de um microscópio de transiluminação (KOTAJA et al., 2004). Após o isolamento dos túbulos seminíferos de acordo com os estágios do ciclo espermatogênico, os diferentes segmentos foram submetidos às preparações descritas abaixo, com a finalidade de atingir os objetivos específicos descritos na presente proposta e as análises foram feitas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC), com câmera acoplada QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV). As análises de co-localização foram realizadas no software Image-Pro® Plus version 5.1.2 for Windows XP, baseando-se no coeficiente de Pearson's ($R_r = 1$).

O presente projeto aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), sob o protocolo no. 005/2013 (Anexo 1).

4.1. Squash preparations

As preparações foram realizadas segundo o protocolo de Kotaja et al., 2004. Foram utilizados segmentos de aproximadamente 0.5mm túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico. Os segmentos foram transferidos para uma lâmina, juntamente com aproximadamente 15 µl de PBS. Sob esse fragmento, foi colocada uma lamínula e realizada pequena pressão para que as células germinativas, gentilmente, deixassem o interior dos túbulos seminíferos. O excesso de PBS foi removido nas bordas da lamínula com o auxílio de um papel filtro. Quando o excesso de PBS estava bem removido, o conjunto, lâmina e lamínula, foi submerso em nitrogênio líquido e, em seguida, a lamínula foi removida. As lâminas foram secas ao ar, durante 4h, e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.2. Imunofluorescência em squash preparations

As lâminas contendo *squash preparations* foram imersas em 4%PFA/PBS, em gelo, por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em PBS e, posteriormente, imersas em 0.2%Triton X100/PBS, à temperatura ambiente, por 5 minutos. O bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com 5%BSA/PBS, por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente ao bloqueio, as amostras foram incubadas *overnight*, a 4o C, com os seguintes anticorpos primários: Anti-Fibrillarin [38F3] antibody ab4566; PIWIL1 (N-17): sc-22685; HSP 70 (K-20): sc-1060. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBST e, os anticorpos secundários de interesse, conjugado com diferentes agentes fluorescentes (Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody; Alexa Fluor® 594 Chicken Anti-Goat IgG (H+L)), foram diluídos em 5%BSA/PBS, e a incubação foi feita durante 1 hora, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em PBST e, em seguida, o material foi corado com solução DAPI, para marcações dos núcleos. Ao final, as lâminas foram lavadas em PBS, montadas com Ultra Cruz Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc.): sc-24941, e analisadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC), com câmera acoplada QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV).

4.3. Análise de co-localização – Coeficiente de Pearson's

As imagens de imunofluorescência foram feitas no software Image-Pro® Plus version 5.1.2 for Windows XP. Das imagens capturadas e analisadas foram utilizadas 9 espermátides iniciais onde a co-localização entre fibrilarina e MIWI foi demonstrada; e 5 espermátides iniciais onde a co-localização entre fibrilarina e HSP70 foi demonstrada, para cálculo do coeficiente de co-localização, de acordo com o coeficiente de Pearson's ($R_r = 1$), por meio da utilização do mesmo software.

4.4 Extração de proteínas totais e ImunoBlot

Seguimentos de aproximadamente 0.5mm túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo espermato gênico foram homogeneizados em 1ml de tampão RIPA, contendo inibidores (NaF 1M, Cocktail inibidor de protease completo – Roche Diagnostics e PMSF 0.1M). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 14000xg, por 15 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o supernatante foi removido e transferido para novos tubos. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada por espectrofotometria com Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). As proteínas foram diluídas em tampão RIPA com inibidores, para homogeneização das quantidades, e em seguida diluídas em 4x Laemmli Buffer e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para a realização do *imunoblot*, cerca de 25µg de extrato de proteínas foram separadas em gel 10% SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de polivinilideno por meio de *eletroblotting*. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBST e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, em leite desnatado 5%/PBST, para bloqueio de marcações inespecíficas. Após incubação, as membranas foram novamente lavadas em PBST e incubadas com anticorpos primários Anti-Fibrillarín [38F3] antibody ab4566; PIWIL1 (N-17): sc-22685; HSP 70 (K-20): sc-1060; e anti- α -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich) diluídos em leite desnatado 5%/PBST, e incubadas a 4°C, *overnight*. Após incubação com anticorpo primário as membranas foram novamente lavadas em PBST e, em seguida, incubadas com anticorpos secundários (HRP Rabbit anti-mouse-Invitrogen 616520; donkey anti-goat IgG-

HRP: sc-2020) diluídos em leite desnatado 5%/PBST, por 1 hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas em PBST, secas e reveladas por meio de filmes fotográficos.

5. Resultados

5.1. *Imunoblot*

Por meio da técnica de *Western blot* objetivamos detectar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico, onde verificou-se que a fibrilarina se expressa mais no estágio IV-VI e no testículo total, sua expressão é menos intensa no estágio VII-IX. Não foi detectada a expressão de fibrilarina nos estágios I-III e X-XII (Figura 1). Adicionalmente, também foi testada a expressão da proteína MIWI nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico. MIWI apresenta-se mais expressa nos estágios I-III, IV-VI e no testículo total, tendo sua expressão parcialmente reduzida nos demais estágios (Figura 1). Ao checar a expressão de HSP70 nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico, observa-se que HSP70 está altamente expressa nos estágios IV-VI e VII-IX, que sua expressão é reduzida no estágio X-XII, e que há uma ausência da expressão de HSP70 no estágio I-III (Figura 1). A proteína tubulina foi utilizada como controle da reação.

5.2. *Imunofluorescência*

A técnica de imunofluorescência foi realizada, co-localizando as proteínas Fibrilarina e MIWI, bem como as proteínas Fibrilarina e HSP70 (Figuras 1 e 2). Os resultados obtidos podem ser resumidos da seguinte maneira: 1) Fibrilarina foi detectada no nucléolo de espermátides iniciais pós-meioticas, porém também foi parcialmente localizada em associação com o *chromatoid body* (CB) (Figuras 2 e 3); 2) MIWI e Fibrilarina se co-localizaram, pois ambas foram detectadas no CB (Figuras 2 e 3); 3) HSP70 se apresentou difusa no citoplasma, portanto se tornou mais difícil observar sua concentração no CB. Entretanto, nas células onde HSP70 foi observada concentrada no CB,

também foi possível observar uma associação com a fibrilarina citoplasmática (Figuras 2 e 3). Com isso nenhuma das duas hipóteses citadas na justificativa deste trabalho será descartada.

Para obtenção de dados mais precisos sobre a co-localização entre as imunomarcações foi utilizada a análise do Coeficiente de Pearson's, e os resultados estão representados na Tabela 1. Analisando os dados obtidos na análise, notamos que tanto o coeficiente de Pearson's da relação MIWI:Fibrilarina quanto da relação HSP70:Fibrilarina foram superior a 50%, com a interação Fibrilarina:HSP70 sendo uma pouco maior. Uma conclusão óbvia seria afirmamos que HSP70 tem uma influência maior na constituição molecular do CB. Mas o resultado da influência da fibrilarina (K2) na co-localização com MIWI foi muito próximo à influência de fibrilarina na co-localização com HSP70 (Tabela 1), com isso o CB com MIWI podem ter uma maior afinidade comparado a proximidade dos resultados.

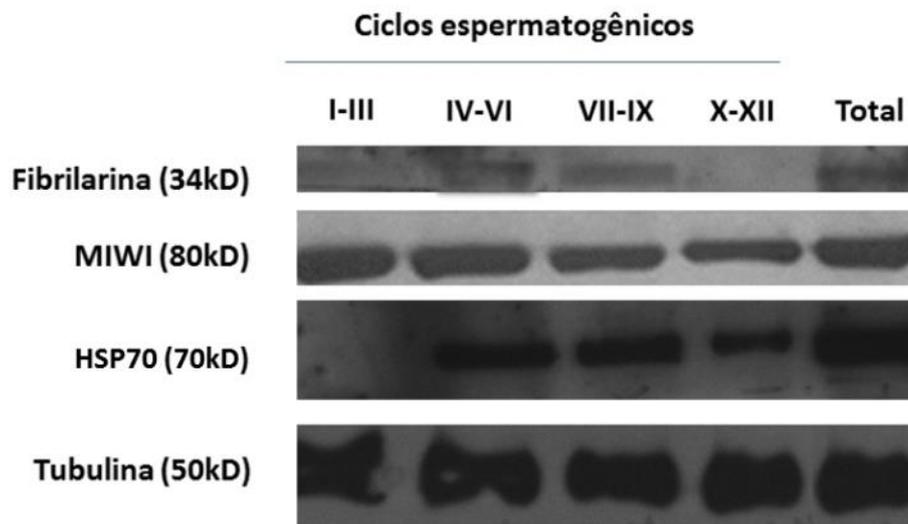


Figura 1: *Imunoblot* para detecção da expressão da proteína nucleolar fibrilarina, da proteína MIWI e da proteína HSP70 em diferentes estágios do ciclo espermatogênico de túbulos seminíferos (I-III; IV-VI; VII-IX; X-XII). Proteínas totais do tecido testicular total (Total) e a detecção da expressão de tubulina foram utilizadas como controle da técnica.

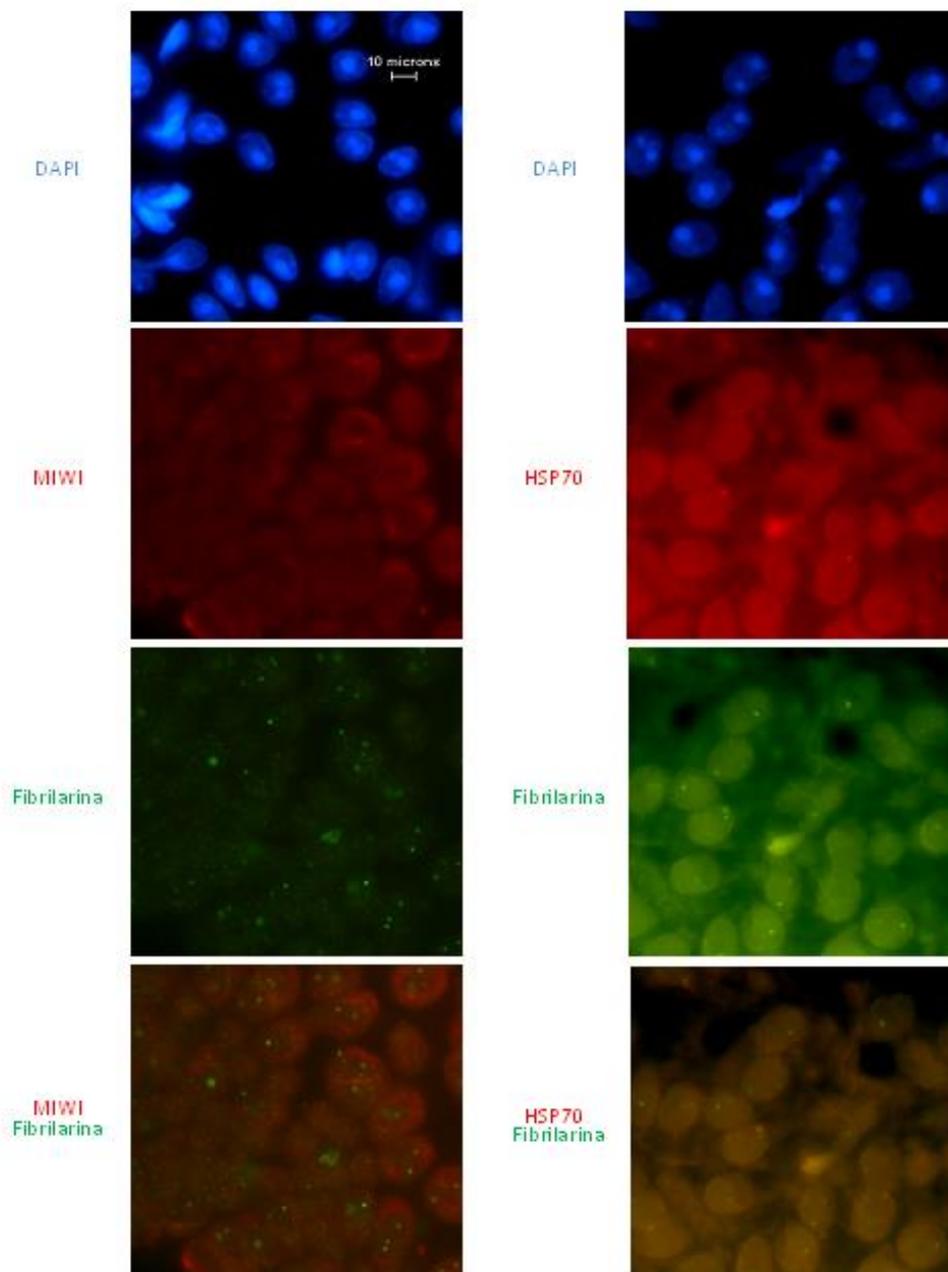


Figura 2: Detecção por imunofluorescência das proteínas Fibrilarina, HSP70 e MIWI em túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico. A detecção de HSP70 apresentou-se muito difusa no citoplasma, requerendo uma otimização do protocolo, porém a proteína MIWI foi bem identificada sendo amplamente depositada no CB. Fibrilarina foi detectada tanto no nucléolo quanto no CB.

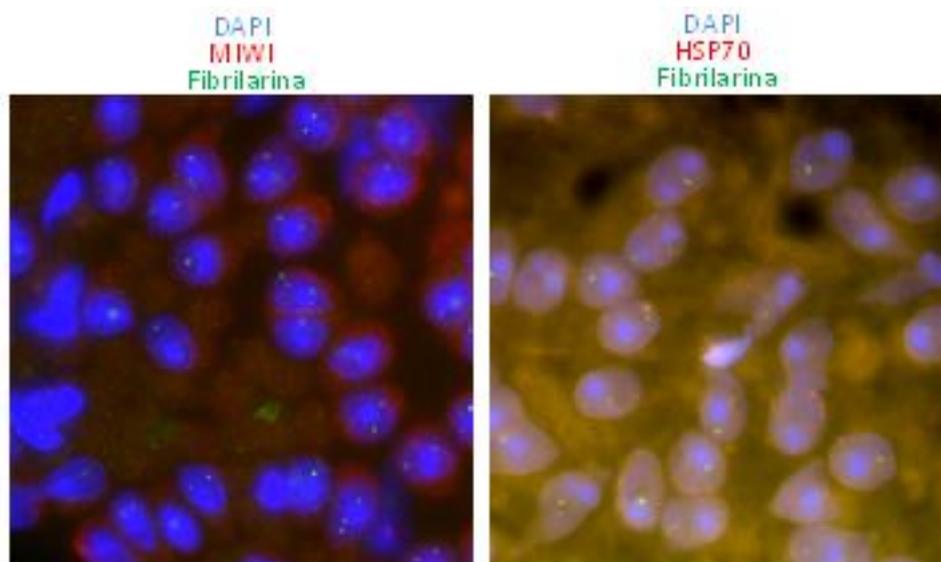


Figura 3: Detecção por imunofluorescência da co-localização das proteínas Fibrilarina e MIWI; e Fibrilarina e HSP70 em túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico.

Coefficiente de Pearson's	Co-localização	Resultados nos diferentes canais
Rr: 0,559314	Fibrilarina:MIWI	K1: 1,860
		K2: 0,584
Rr: 0,613395	Fibrilarina:HSP70	K1: 1,593
		K2: 0,593

Tabela 1: Valores do coeficiente de Pearson's obtido na análise de co-localização de imunofluorescências entre as proteínas Fibrilarina:MIWI e Fibrilarina:HSP70, realizadas em *squah preparations* em segmentos de túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico. K1: Influência do canal vermelho (MIWI ou HSP70) sobre o coeficiente de sobreposição; K2: Influência do canal verde (Fibrilarina) sobre o coeficiente de sobreposição.

6. Discussão

O *chromatoid body* (CB) é uma organela citoplasmática de células germinativas masculinas cuja principal função está relacionada com o estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992). Os CBs são localizados nas células germinativas primordiais e persistem ao longo de toda a vida do adulto (MAHOWALD, 2001). Análises realizadas durante a espermatogênese de camundongos relatam a presença de CB perto das vesículas do aparelho de Golgi. Também são observados na mesma posição em espermátides finais, o que nos permite entender que o CB pode auxiliar na formação da cauda do espermatozoide (PERUQUETTI et al., 2008, 2010a).

Muitos autores afirmam que o CB se origina a partir de proteínas nucleolares através da fragmentação do nucléolo durante a divisão meiótica (COMINGS; OKADA, 1972; ANDONOV, 1990; PERUQUETTI et al., 2008, 2010b). Devido à recente demonstração da presença de mais de 10 microRNAs (miRNAs) em compartimentos nucleolares (BAI et al., 2014), adicionado ao fato de miRNAs serem a principal via de silenciamento gênico e proteico utilizada pelos CBs (MEIKAR et al., 2014), a comparação entre fisiologia nucleolar e a fisiologia dos CBs durante a espermatogênese faz-se ainda mais necessária.

Por meio de análises de *Western blot*, no presente trabalho, pode-se detectar uma alta expressão das proteínas fibrilarina, HSP70 e MIWI no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico (Figura 1), estágio esse que contém um grande número de espermátides iniciais (CLERMONT, 1972), que são as células onde o CB se encontra completamente formado e exercendo suas funções de maneira mais efetiva (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007). Fibrilarina é uma proteína que faz parte do complexo box C/D and H/ACA snoRNP do nucléolo, que é um complexo responsável pelo processamento de pré-RNAr por meio de modificações pos-transcricionais, metilação-2'-O e pseudouridilação (revisado por MORIMOTO; BOERKOEL, 2013). MIWI é uma das proteínas mais abundantes e importantes na fisiologia do CB (MEIKAR et al., 2014), sendo uma proteína que é membro da família Argonauta, somente se expressando em células da linhagem germinativa para reprimir a expressão de elementos móveis do genoma das células da linhagem reprodutora (ENDER; MEISTER,

2010). Proteínas membros da família Argonata são conhecidas por participarem de processos de repressão da expressão gênica por meio da regulação da estabilidade do RNAm e/ou da tradução, via miRNAs e piRNAs (ENDER; MEISTER, 2010). A maioria das proteínas relacionadas com MIWI/piRNA presentes no CB tem sido apontadas com um papel ativo no controle da programação epigenética, no silenciamento de transposons, na integridade do DNA da linhagem germinativa, na diferenciação das células da linhagem germinativa, bem como, na manutenção das células tronco gametogênicas (revisado por KLOC et al., 2013). As HSPs são um grupo de proteínas funcionalmente relacionadas, que são classificadas primariamente de acordo com o seu peso molecular: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e pequenas HSPs (HARTL et al., 2011). A função básica das HSPs é reconhecer seletivamente proteínas em sua conformação não nativa. A função destas chaperones na compactação correta de proteínas já está bem estabelecida. Porém, as chaperones também participam dos processos de degradação terminal de proteínas fora de sua conformação original, facilitando o reconhecimento da maquinaria de ubiquitinação à estas proteínas, além de direcionar os substratos ubiquitinados para o proteossoma (SHIBER; RAVID, 2014). HSP70 já foi descrita desempenhando esse papel no CB (HARAGUCHI et al., 2005).

Como os eventos de reativação da atividade nucleolar (PERUQUETTI et al., 2012b), de participação do CB na reativação da atividade transcricional/traducional celular (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007) e, também, na degradação proteossômica (HARAGUCHI et al., 2005) são fortemente desempenhados nas células que compõem o estágio IV-VI do ciclo espermatogênico, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura.

No presente trabalho foi demonstrada, por meio de técnicas de imunofluorescência, a distribuição da proteína nucleolar fibrilarina em espermátides iniciais (pós-meióticas) bem como sua co-localização com proteínas que estão localizadas no CB, destas mesmas células (Figuras 2 e 3), e que desempenham funções diferenciadas nesta estrutura: 1) MIWI desempenhando papel no controle das modificações pós-transcricionais de RNAm transcritos no início da divisão meiótica e armazenados/silenciados no

CB, para que sejam traduzidos na etapa final da diferenciação das espermátides em espermatozóides (DENG; LIN, 2002) e ; 2) HSP70 que age como um componente proteossômico nesta estrutura (HARAGUCHI et al., 2005).

A presença da proteína nucleolar fibrilarina já havia sido descrita previamente em CBs de insetos triatomíneos (SOUZA et al., 2012) e, agora, esta presença foi confirmada para CBs de mamíferos. Essa localização da fibrilarina na composição molecular do CB traz maiores indícios de que produtos nucleolares podem estar relacionados com a organização do CB durante a espermatogênese. Um estudo que analisou o ciclo nucleolar durante a gametogênese demonstrou que o reestabelecimento da morfologia nucleolar durante a gametogênese é um fator importante para remoção dos danos celulares induzidos pelo envelhecimento (UNAL et al., 2011), sendo possível que a fibrilarina nucleolar possa ser translocada para o CB durante esse processo.

Na tentativa de elucidar as possíveis funções desempenhadas pela fibrilarina para a manutenção da fisiologia do CB a co-localização entre fibrilarina e as proteína MIWI e HSP70 (marcadores de CB) foi testada, sendo testadas desta maneira as duas hipóteses iniciais do presente trabalho. Nas análises das imunomarcações por fluorescência a fibrilarina se co-localiza parcial ou totalmente com as duas proteínas testadas (Figuras 2 e 3), comprovando sua relação com o CB mas impossibilitando a aceitação ou a rejeição das hipóteses propostas no trabalho. Para as análises serem realizadas de forma com que o resultado ficasse mais confiável, ou seja, por meio de realização de análises quantitativas, foram feitas merges das imagens capturadas em cada etapa citada acima, e também foi utilizada a análise de co-localização por meio do coeficiente de Pearson's, que é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas (ZAR, 1999). Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui (ZAR, 1999). Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. No presente trabalho obtivemos um coeficiente de Pearson's de 0,559314 para a co-

localização entre fibrilarina e MIWI e de 0,613395 para a co-localização entre fibrilarina e HSP70 (Tabela 1). Analisando os dados obtidos nesta análise, notamos que tanto o coeficiente de Pearson's da relação MIWI:Fibrilarina quanto da relação HSP70:Fibrilarina foram superior a 50%, com a interação Fibrilarina:HSP70 sendo um pouco maior. Uma conclusão óbvia seria afirmamos que HSP70 tem uma influência maior na constituição molecular do CB. Mas o resultado da influência da fibrilarina (K2) na co-localização com MIWI foi muito próximo à influência de fibrilarina na co-localização com HSP70 (Tabela 1), com isso o CB com MIWI podem ter uma maior afinidade comparado a proximidade dos resultados.

Levando em consideração que durante a meiose a fibrilarina, que tem participação ativa na biogênese do ribossomo atuando nas modificações e processamentos de pré- rRNA (UESHIMA et al., 2013), parece migrar até o citoplasma passando a fazer parte da constituição molecular do CB (PERUQUETTI et al., 2012b), a fibrilarina poderia desempenhar um papel no processamento de RNAm, atuando junto com a Argonauta MIWI. Porém, se fibrilarina for translocada para o CB por não possuir mais papel na biogênese de ribossomos, fibrilarina poderia se associar a HSP70, que tem função em várias etapas da degradação proteossômica, como por exemplo antes da ubiquitinação e durante o seu sequenciamento (SHIBER et al., 2014).

Portanto, ainda não foi possível afirmar se a fibrilarina está associada a MIWI ou HSP70, mas com o presente estudo visualizamos que a fibrilarina está próxima ao CB nos permitindo afirmar que ela tem alguma relação com essa estrutura.

7. Conclusão

Em conclusão sobre este presente trabalho, afirmamos que a fibrilarina está associada ao CB, e que a mesma possui uma correlação semelhante com MIWI e HSP70. A realização da co-imunoprecipitação proteica entre fibrilarina e MIWI e entre fibrilarina e HSP70, que será realizada na sequência deste trabalho, irá auxiliar a responder essa questão.

8. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, K. Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Veterinaria Scandinavica* (Denmark), v. 19(2), p. 229-242, 1978.

ANDONOV, M. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, v. 104, p. 46-54, 1990.

BAI, B.; LIU, H.; LAIHO, M. Small RNA expression and deep sequencing analyses of the nucleolus reveal the presence of nucleolus-associated microRNAs. *FEBS Open Bio*, v.4, p. 441-449, 2014.

CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS, I. To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biology*, v. 2, p.E107-E112, 2000.

CASSEB-HASSAN, P. M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. *HB Científica*, v.6(3), p. 172-178, 1999.

CHUMA, S.; HOSOKAWA, M.; KITAMURA, K.; KASAI, S.; FUJIOKA, M.; HIYOSHI, M.; TAKAMUNE, K.; NOCE, T.; NAKATSUJI, N. *Tdrd1/Mtr-1*, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *PNAS*, v.103, p. 15894-15899, 2006.

CLERMONT Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236, 1972.

COMINGS, D. E.; OKADA, T. A. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *Journal Ultrastructure Research*, v. 39(1), p. 15-23, 1972.

CONCEA - Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA 2013. Manual de regras para eutanásia. Brasília, DF, 2013.

DENG, W.; LIN, H. *Miwi*, a murine homolog of *piwi*, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental Cell*, v. 2, p. 819-830, 2002.

ENDER, C., AND MEISTER, G. Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* v.123, p.1819-1823, 2010.

FAWCETT, D. W.; EDDY, E. M.; PHILLIPS, D. M. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v.2(1), p. 129-153, 1970.

GERBI, S. A.; BOROVJAGIN, A. V.; LANGE, T. S. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, p. 318-325, 2003.

HARAGUCHI, C.M.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; SHODA, T.; HOSHI, K.; AKASAKI, K.; YOKOTA, S. Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J Histochem Cytochem*, v.53, p. 455-465, 2005.

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, v. 475, p. 324–332, 2011.

HEAD, J.R.; KRESGE, C.K. Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. *Biol. Reprod*, v.33, p. 1001-1008, 1985.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. *Journal of Cell Science*, v. 99, p. 465-471, 1991.

JUNÉRA, H.R.; MASSON, C.; GÉRAUD, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 3427-3441, 1995.

KOTAJA, N.; KIMMINS, S.; BRANCORSINI, S.; HENTSCH, D; VONESCH, J.; DAVIDSON, I.; PARVINEN, M.; SASSONE-CORSI, P. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Meth*, v.1, p. 249-254, 2004.

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cell specific RNA-processing centre. *Nature reviews – Molecular Cell Biology*, v.8, p. 85-90, 2007.

KLOC, M., GHOBRIAL, R.M., AND KUBIAK, J.Z. Recent advances in the understanding of germ cell-specific organelles and their function. In 'Recent Advances in Germ Cells Research' (Ed A Perrote) p. 41-70, 2013. (Nova Science Publishers: New York, NY).

LOPES, S.M.C.S., ROELEN, B.A.J., 2010. An overview on the diversity of cellular organelles during the germ cell cycle. *Histol. Histopathol*, v.25, p. 267-276.

LÜHRMANN, R. Functions of U-snRNPs. *Molecular Biology of Reproduction*, v. 14, p. 183-192, 1990.

MAHOWALD, A.P. Assembly of the Drosophila germ plasm. *Int. Rev. Cytol.* 203,187–213, 2001.

MEIKAR O, VAGIN VV, CHALMEL F, SÔSTAR K, LARDENOIS A, HAMMELL M, JIN Y, DA ROS M, WASIK KA, TOPPARI J, HANNON GJ, KOJOTAN. An atlas of chromatoid body components. *RNA* 2014; 20:1-3.

MILLER, O. L.; BEATTY, R. R. Visualization of nucleolar genes. *Science*, v.164, p. 955-957, 1969.

MORIELLE, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular. Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, para exame Geral de Qualificação de Doutorado. UNESP - São José do Rio Preto - SP, 34p., 2004.

MORIMOTO; BOERKOEL, The Role of Nuclear Bodies in Gene Expression and Disease. *Journal Biology Mdpi*, v.2, p. 973-1033, 2013.

OCHS, R. L.; LISCHWE, M. A.; SHEN, E.; CARROL, R. E.; BUSCH, H. Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, v.92, n.5, p.330-336, 1985.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, v. 28, p. 189-201, 2005.

PEDERSON, T. Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 27(3), p. 111-112, 2002.

PERUQUETTI, R.L.; ASSIS, I.M.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron*, v. 39, p. 419-425, 2008.

PERUQUETTI, R. L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of Mongolian Gerbil Chromatoid Bodies and Their Correlation with Nucleolar Cycle During Spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.399 - 406, 2010a.

PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar Cycle and Its Correlation with Chromatoid Bodies in the *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae) Spermatogenesis. *The Anatomical Record*, v.293, p.900 – 910, 2010b.

PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., SANTOS, L.R.S., OLIVEIRA, C., AZEREDO OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: Is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? *Micron*, v.42, p.87 - 96, 2011.

PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., CABRAL, S.R.P., OLIVEIRA, C., AZEREDOOOLIVEIRA, M.T.V. Relationship between the nucleolar cycle and

chromatoid body formation in the spermatogenesis of *Phrynos geoffroanus* (Reptilia Testudines). *Anim Cells Syst*, v.16, p. 104-113, 2012a.

PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Morphological changes of mammalian nucleoli during spermatogenesis and their possible role in the chromatoid body assembling. *ISRN Cell Biology*, v.2012, p.1 - 12, 2012b. doi:10.5402/2012/829854

REUNOV, A.; ISAEVA, V.; AU, D.; WU, R. Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Development Growth & Differentiation*, v. 42, p. 139-143, 2000.

SAUNDERS, P. T. K.; MILLAR, M. R.; MAGUIRE, S. M.; SHARPE, R. M. Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, p. 385-391, 1992.

SCHEER, U.; XIA, B.; MERKERT, H.; WEISENBERGER, D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma*, v.105, n. 7-8, p. 470-80, 1997.

SCHWARZACHER, H. G.; WACHTLER, F. The nucleolus. *Anatomy and Embryology*, v. 188, p. 515-536, 1993.

SHIBER, A.; RAVID, T. Chaperoning Proteins for Destruction: Diverse Roles of Hsp70 Chaperones and their Co-Chaperones in Targeting Misfolded Proteins to the Proteasome, *Biomolecules*, v. 4, p. 704-724, 2014.

SÖDERSTRÖM, K.; PARVINEN, M. Incorporation of [³H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *The Journal of Cell Biology*, v. 70, p. 239-246, 1976.

SILISTINO-SOUZA, R., PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). *Micron*, v.xxx, p.1 - 7, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.017>

SUMMER, A. T. Chromosome banding. Unwin Human London, 434 p., 1990.

TAKEUCHI, I. K.; TAKEUCHI, Y. K. Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *Journal of Structural Biology*, v. 103, p. 104-112, 1990.

TANG, X. M.; LALLI, M. F.; CLERMONT, Y. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *The American Journal of Anatomy*, v. 163, p. 283-294, 1982.

THIRY, M.; GOESSENS, G. The nucleolus during the cell cycle. Springer, 146p., 1996.

TOYOOKAA, Y.; TSUNEKAWAA, N.; TAKAHASHIC, Y.; MATSUIC, Y.; SATOHA, M.; NOCEA, T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*, v.93, p. 139-149, 2000.

UESHIMA, S.; NAGATA, K.; OKUWAKI, M. Upstream binding factor-dependent and pre-rRNA transcription-independent association of pre-rRNA processing factors with rRNA gene. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, v. 443, p.22-27, 2013.

ÜNAL, E.; KINDE, B.; AMON, A. Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. *Sci*, v.332, p. 1554-1557, 2011.

VENTELÄ, S.; TOPPARI, J.; PARVINEN, M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, p. 2768-2780, 2003.

ZAR JH.1999. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall.

ZATSEPINA, O. V.; DUDNIC, O. A.; TODOROV, I. T.; THIRY, M.; SPRING, H.; TRENDELENBURG, M. F. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma*, v. 105, n. 7-8, p. 418-30, 1997.

Anexo 1



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



CEEPA-Proc. Nº 005/2013

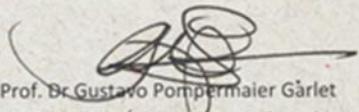
Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que após análise por um relator e, tendo sido atendida a solicitação dessa Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o projeto de pesquisa **Descrição da distribuição da proteína nuclear fibrilarina no epitélio seminífero de mamíferos e caracterização do seu papel na manutenção da fisiologia de chromatoid bodies**, de sua autoria, foi novamente avaliado pelo relator e considerado **APROVADO**, por esta Comissão em reunião realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Gärlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Rita Luiza Peruquetti
Docente do Departamento de Ciências da Saúde da USC

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>