

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**DAYANA DE SALES SILVA**

**MICROSCOPIA CONFOCAL E *WIDEFIELD*: QUAL O  
MELHOR MÉTODO PARA DETECÇÃO DE CO-  
LOCALIZAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DE *CHROMATOID*  
*BODIES* DE ESPERMÁTIDES INICIAIS DE MAMÍFEROS  
POR IMUNOFLUORESCÊNCIA?**

BAURU

2016

**DAYANA DE SALES SILVA**

**MICROSCOPIA CONFOCAL E *WIDEFIELD*: QUAL O  
MELHOR MÉTODO PARA DETECÇÃO DE CO-  
LOCALIZAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DE *CHROMATOID*  
*BODIES* DE ESPERMÁTIDES INICIAIS DE MAMÍFEROS  
POR IMUNOFLUORESCÊNCIA?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

BAURU

2016

S5861m

Silva, Dayana de Sales

Microscopia Confocal e Widefield: Qual o melhor método para detecção de co-localização entre proteínas de chromatoid bodies de espermátides iniciais de mamíferos por imunofluorescência? / Dayana de Sales Silva. -- 2016.

39f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

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

1. Microscopia widefield. 2. Microscopia confocal. 3. Chromatoid body. 4. MVH/MIWI. 5. BMAL1. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.

**DAYANA DE SALES SILVA**

**MICROSCOPIA CONFOCAL E *WIDEFIELD*: QUAL O MELHOR  
MÉTODO PARA DETECÇÃO DE CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE  
PROTEÍNAS DE *CHROMATOID BODIES* DE ESPERMÁTIDES  
INICIAIS DE MAMÍFEROS POR IMUNOFLORESCÊNCIA?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti (Orientadora)

Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini

Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 28 de novembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus avós maternos Juverci Francisco Sales e Natalina Silva Sales e à minha bisavó Maria Mendes que além dos meus pais, sempre estão presentes em minha vida e que são um dos maiores exemplos de persistência que carrego comigo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as coisas boas que tenho vivido. Sem Sua graça em minha vida, já teria desistido de muitas oportunidades por simplesmente ter medo de tentar e não conseguir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti, por todo o conhecimento transmitido e materiais compartilhados, pela ajuda para que esse trabalho pudesse ser realizado e por ser a primeira pessoa que me mostrou realmente como é belo esse “mundo da pesquisa científica”.

À mestranda Elisa Gomes Santos, que com paciência me ensinou as técnicas de obtenção dos túbulos seminíferos, *squash preparations* e imunofluorescência utilizadas em sua pesquisa e que compartilhou todo o seu material para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus pais e irmã, Daniel Laurentino da Silva, Roselaine de Sales e Chrishinau Thays, pelo amor, dedicação e incentivo para que eu nunca desista dos meus objetivos e sonhos. Sem eles, eu nada seria.

Ao meu namorado, Cesar Modelli, por estar presente nesta etapa da minha vida, por ser um ótimo ouvinte de ensaios de apresentações e por ter me ajudado em tudo o que foi possível. Que o futuro seja repleto de grandes coisas para nós!

Por fim, agradeço às minhas amigas Estefani e Rafaella, que durante todo esse último ano da graduação estiveram ao meu lado, compartilhando dos mais variados sentimentos e que aguentaram as minhas reclamações. Que nossa amizade vá além do fim da universidade!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na  
beleza dos seus sonhos.”

(Eleanor Roosevelt)

## RESUMO

Na microscopia de luz de fluorescência *widefield*, a imagem é formada a partir da observação de estruturas pontuais das células, enquanto que, na microscopia de luz confocal, por ser um segmento aperfeiçoado do *widefield*, é possível a observação com maior detalhamento de estruturas subcelulares podendo-se obter imagens de planos específicos ou cortes ópticos, que podem ser utilizados em reconstruções 3D ou 2D de uma estrutura. O *chromatoid body* (CB) é uma organela citoplasmática que possui papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides e que começa a ser visualizada no citoplasma das células germinativas após a meiose I, nos espermatócitos I, apresentando-se na sua forma final no citoplasma de espermátides iniciais, exercendo seu papel até a finalização da espermiogênese. Mutações ou ausência de proteínas alocadas no CB durante a espermatogênese causam infertilidade em ratos. O presente estudo teve como objetivos comparar qual das microscopias de luz citadas acima é o melhor método para detecção por imunofluorescência da co-localização entre uma proteína residente (MVH/MIWI) e uma proteína transiente (BMAL1) de CBs em espermátides iniciais de mamíferos. Na metodologia deste estudo, foram analisadas lâminas com *squash preparations* de túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico provenientes de 4 camundongos *Mus musculus* adultos e imunomarcadas com os anticorpos  $\alpha$ -MVH e  $\alpha$ -BMAL1, analisadas pela microscopia *widefield*. O mesmo tipo de preparação também foi utilizado para obtenção de imagens em microscopia confocal. Os valores de co-localização entre as proteínas analisadas foram calculados pelo Coeficiente de Pearson's (Rr), sendo que os valores de Rr, k1 e k2 obtidos pela análise em cada uma das microscopias foram comparados pelo teste U (Mann-Whitney). Como resultados obteve-se que a distribuição dos valores de Rr da co-localização entre as proteínas marcadas e analisadas pela microscopia *widefield* estavam entre 0,75 e 0,97 (relação linear forte). Para a microscopia confocal os valores estavam entre 0,20 e 0,50 (relação linear fraca). O teste U (Mann-Whitney) demonstrou que todas as comparações entre os valores de Rr, k1 e k2 obtidos pelas duas microscopias apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Como a análise de co-localização foi realizada entre uma proteína residente e uma proteína transiente do CB, sendo proteínas que nem sempre devem se co-localizar nesta estrutura, conclui-se que a microscopia confocal demonstra-se mais eficiente para este tipo de análise, pois demonstrou um coeficiente de sobreposição mais baixo.



**Palavras-chave:** Microscopia *widefield*. Microscopia confocal. *Chromatoid body*. MVH/MIWI. BMAL1.

## ABSTRACT

Images are formed from the observation of specific structures of the cells in the widefield fluorescence light microscopy, whereas in confocal light microscopy - an improved segment of the widefield - it is possible to observe better details of subcellular structures because it obtain images of specific planes or optical cuts, which can be used in 3D or 2D reconstructions of a structure. The chromatoid body (CB) is a cytoplasmic organelle that has a role in the storage of RNA and proteins for the final differentiation of spermatozoa. It is first visualized in the cytoplasm of the germ cells after meiosis I. This structure is in its final form in the cytoplasm of the initial spermatids and it will play its role until the end of the spermiogenesis. Mutations or absence of CB-specific proteins can cause infertility in rats. The present study aimed to compare which of the light microscopies cited above is the best method for detecting the co-localization between a resident protein (MVH / MIWI) and a transient protein (BMAL1) of CBs in initial spermatids by immunofluorescence. Squash preparations slides of seminiferous tubules at stages IV-VI of the spermatogenic cycle were analyzed from 4 adult mice (*Mus musculus*). They were immunolabelled with  $\alpha$ -MVH and  $\alpha$ -BMAL1 antibodies and analyzed by widefield microscopy. The same type of preparation was also used to obtain images in confocal microscopy. The overlap values were calculated between the analyzed proteins by the Pearson's Coefficient (Rr), and the values of Rr, k1 and k2 obtained by the analysis in each of the microscopies were compared by the U-test (Mann-Whitney). Distribution of the Rr values obtained by widefield microscopy ranged between 0.75 and 0.97 (strong linear relationship). For confocal microscopy the values ranged between 0.20 and 0.50 (weak linear relation). The U-test (Mann-Whitney) showed that all comparisons between the Rr, k1 and k2 values obtained by the two microscopies presented statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ). As the co-localization analysis was herein performed between a resident protein and a transient protein of CBs, which are proteins that should not always overlap in this structure, it was concluded that confocal microscopy is more efficient for this type of analysis, because it showed a lower overlap coefficient.

**Key words:** Widefield microscopy. Confocal microscopy. Chromatoid body. MVH / MIWI. BMAL1.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BSA – Albumina de soro bovino

CB – *Chromatoid body*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PBS – Tampão fosfato-salino

PBST – Tampão fosfato-salino com triton

PFA – Paraformaldeído

RNA – Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 MICROSCOPIA DE LUZ DE FLUORESCÊNCIA ( <i>WIDEFIELD</i> ).....	10
1.2 MICROSCOPIA DE LUZ CONFOCAL.....	11
1.3 ESPERMATOGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM OS <i>CHROMATOID BODIES</i> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	17
3.2 OBTENÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	18
3.3 <i>SQUASH PREPARATIONS</i> .....	20
3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM <i>SQUASH PREPARATIONS</i> .....	21
3.5 ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO: COEFICIENTE DE PEARSON'S.....	21
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23
4.1 CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MVH/MIWI E BMAL1.....	23
4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>ANEXO A – Documento de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração para o projeto “Envelhecimento: Relação entre esta condição fisiológica e alterações estruturais em <i>chromatoid bodies</i> de mamíferos”.</b> ....	37

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MICROSCOPIA DE LUZ DE FLUORESCÊNCIA (*WIDEFIELD*)

A microscopia de luz de fluorescência ou *widefield* depende das propriedades físicas de alguns componentes absorverem luz em um determinado comprimento de onda e de emitirem luz em outros comprimentos de onda maiores e níveis energéticos mais baixos, quando excitados por uma fonte de luz. Esses componentes podem ser células ou moléculas naturalmente fluorescentes ou podem ser componentes que se ligam a substâncias fluorescentes denominados fluorocromos. (TABOGA, 2001).

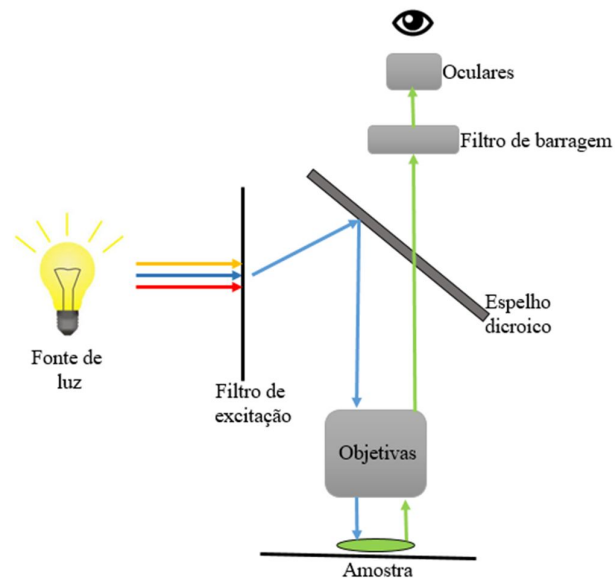
O microscópio de luz de fluorescência permite a visualização de estruturas pontuais das células, onde o modo mais comum de visualizar essas estruturas é através da marcação por anticorpos específicos acoplados à fluorocromos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; MAFRA, 2014a).

Diferentemente das outras microscopias, o microscópio de luz de fluorescência necessita de um sistema óptico que interaja pouco com a luz. Por isso, como componentes, possui uma luz alimentadora de mercúrio de alta pressão com picos característicos entre 312 nm a 579 nm, que emite uma luz ultravioleta excitadora; um sistema de filtro de excitação que se localiza entre a saída da fonte de luz e antes do condensador ou detector que seleciona o comprimento de onda desejado e um sistema de filtro de barragem que se localiza entre as lentes objetivas e oculares que permite apenas a passagem da luz fluorescente emitida pelo material analisado, barrando a luz excitadora. Ainda, estes sistemas de filtro permitem a detecção do brilho do material analisado contra um fundo negro. (TABOGA, 2001).

O funcionamento do microscópio de luz de fluorescência ocorre com a fonte de luz emitindo todos os tipos de comprimentos de onda que passam pelo sistema de filtro de excitação. O filtro de excitação seleciona o comprimento de onda específico desejado. O comprimento de onda escolhido é refletido pelo espelho dicróico, chegando ao material a ser analisado e que será excitado por essa luz. Por ser um material condicionado à fluorescência, este absorverá a luz refletida pelo espelho dicróico no comprimento de onda escolhido e emitirá uma luz em um outro comprimento de onda. O espelho dicróico não reflete as luzes que são emitidas pelos materiais analisados em outros comprimentos de onda, diferentemente do que ocorre com o comprimento de onda escolhido inicialmente, assim, permite a passagem da luz emitida pelo material que chegará até o sistema de filtro de barragem. O sistema de filtro de barragem ampliará a leitura da imagem formada e passará pelas lentes oculares até

chegar a um detector que transmitirá a imagem à um computador (Figura 1). (MAFRA, 2014a).

Figura 1 - Esquema de funcionamento da formação da imagem na microscopia de luz de fluorescência *widefield*



Fonte: Elaborada pela autora.

## 1.2 MICROSCOPIA DE LUZ CONFOCAL

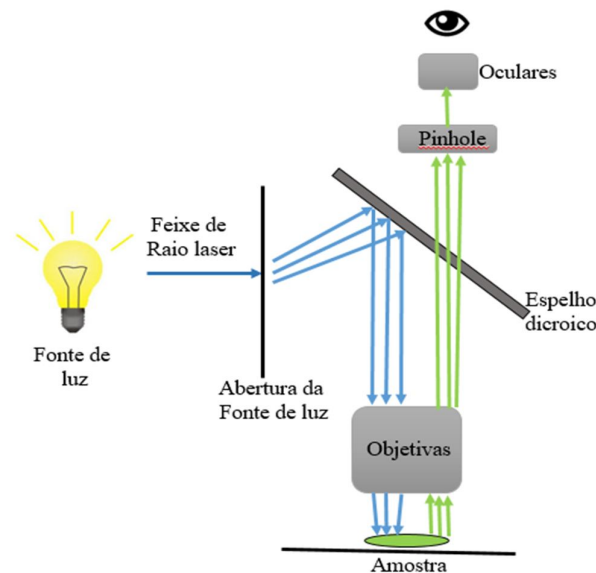
A microscopia de luz confocal é um segmento aperfeiçoado da microscopia de luz de fluorescência e permite a observação de materiais mais espessos, sem coloração prévia, vivos ou pré-fixados e com maior detalhamento de estruturas subcelulares que não apresentam limite de resolução compatível ao microscópio de luz de fluorescência convencional, mas que também se baseia no uso de compostos fluorescentes. (TABOGA, 2001; COSTA, 2014; MAFRA, 2014b).

A microscopia de luz confocal pode obter imagens de planos específicos ou cortes ópticos que podem ser guardados em um computador e ser utilizados na reconstrução tridimensional ou bidimensional de uma estrutura, além de possibilitar a visualização de estruturas celulares como um todo. Tal microscopia trabalha com a mesma óptica do microscópio de luz de fluorescência, mas como luz alimentadora de sistema possui delgados feixes de laser que fazem a iluminação em pequenos pontos e varrem os cortes ópticos formando as imagens de acordo com as estruturas que estão nesse plano de varredura e com qualidade nítida e digital. Nesta microscopia, as imagens fora de foco que contribuem para a imagem final da

microscopia de luz de fluorescência, são eliminadas. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TABOGA, 2001; MAFRA, 2014b).

Apesar de seu funcionamento ser um pouco complexo, a ideia central é bem simples. A fonte de luz emite um raio laser que através da abertura da fonte de luz será dividido em vários feixes e que serão refletidos pelo espelho dicróico, que de acordo com seu ângulo de posicionamento, pode modificar as direções em que esses feixes de laser serão incididos em diversos pontos do material analisado, permitindo a formação de imagens tridimensionais. O material analisado, assim como na microscopia de luz de fluorescência, por possuir fluorocromos, absorverá a luz desses feixes de laser em um determinado comprimento de onda e emitirá outra luz com um outro comprimento de onda que passará pelo espelho dicróico e não será refletida, chegando até o pinhole, um tipo de detector, que permitirá a focalização de apenas um plano focal. Através da mudança de focalização, a detecção de detalhes será maior e melhor será a formação das imagens captadas (Figura 2). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TABOGA, 2001; MAFRA, 2014b).

Figura 2 - Esquema de funcionamento da formação da imagem na microscopia de luz confocal



Fonte: Elaborada pela autora.

### 1.3 ESPERMATOGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM OS *CHROMATOID BODIES*

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular em que as células germinativas masculinas entram em proliferação celular através de mitoses, diferenciação e meioses para originar espermátides iniciais haploides que por fim, se diferenciam em espermatozoides. (O'DONNEL et al., 2001). Esse processo ocorre em túbulos seminíferos, o qual na maioria das espécies, é o principal componente do parênquima testicular. (NUNES et al., 2013).

Em seres humanos, a espermatogênese tem início ainda na fase de desenvolvimento embrionário e em camundongos, inicia-se após o nascimento e envolve uma série de eventos. Inicialmente, células germinativas primordiais ou espermatogônias indiferenciadas, passam a sofrer sucessivas divisões mitóticas, originando assim, numerosas espermatogônias diferenciadas que podem seguir dois caminhos: continuar a intensa divisão mitótica ou passar por modificações, aumentando de tamanho e se diferenciando, formando outro tipo celular diploide denominado espermatócito primário ou espermatócito I que será o tipo celular que sofrerá a primeira divisão meiótica. (SACHETIM, 1999).

A meiose, por sua vez, tem como função reduzir o número de cromossomos das células germinativas e diploides para o estado haploide. Os espermatócitos I entram em meiose e ao final da meiose I formam-se os espermatócitos secundários ou espermatócitos II, que são células haploides com “n” cromossomos duplicados. Essas células entram em meiose II e darão origem às espermátides iniciais, que também, são células haploides. Após isso, as espermátides iniciais entram em uma fase de diferenciação celular denominada espermiogênese e originarão os espermatozoides. (STANBENFELDT; EDQVIST, 1996).

Durante o processo de espermatogênese, corpos nucleares, citoplasmáticos e/ou grânulos germinativos típicos de células germinativas parecem desempenhar papéis importantes durante o processo de gametogênese. Uma das mais intrigantes estruturas citoplasmáticas germinativas masculinas é denominada *chromatoid body* (CB). (PERUQUETTI et al., 2012). Por definição, o CB seria um acúmulo citoplasmático de material presente em todas as células germinativas do reino animal e que em outras espécies diferentes dos mamíferos, é denominada “nuage”. A “nuage” mais bem conhecida, provavelmente, é o corpo polar dos oócitos de *Drosophila*. (PARVINEN, 2005).

O CB é uma organela citoplasmática que aparentemente possui papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992), que começa a ser visualizada no citoplasma dos espermatócitos primários no início da meiose I e apresenta-se na sua forma final no



citoplasma de espermatídes iniciais, exercendo seu papel até a finalização da espermiogênese e, após este processo, o CB é eliminado junto com os restos citoplasmáticos das espermatídes finais. (LOPES; ROELEN, 2010).

O CB é considerado um complexo macromolecular altamente especializado que atua como coordenador subcelular de várias vias de processamento de RNA e do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haploides e também atua como centro de determinação dos destinos de RNAm. (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007; PERUQUETTI et al., 2012). Devido a essas características, essa estrutura parece possuir funções importantes no processo de espermatogênese e espermiogênese, como por exemplo, comunicação celular entre as espermatídes (VENTELÄ et al., 2003; PERUQUETTI et al., 2008, 2010), direcionamento de mitocôndrias para a região caudal da espermatíde (onde auxilia na formação da bainha mitocondrial e flagelo do espermatozoide) (FAWCETT et al., 1970; PERUQUETTI et al., 2008, 2010) e auxílio na formação do acrossomo do espermatozoide. (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; TANG et al., 1982; PERUQUETTI et al., 2008, 2010).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para demonstrar a verdadeira origem desta organela, já que ainda não há um consenso. Outros estudos, porém, têm focado em descobrir quais componentes estão presentes no CB. Segundo Meikar et al. (2014), as proteínas mais abundantes no CB são MIWI, MVH (marcadores da presença de CB), DDX25, TDRD6, TDRD7 (proteínas de domínio Tudor) e as proteínas menos abundantes seriam BMAL1, CLOCK, DCP1a, Dicer, proteínas de domínio Tudor como TDRD1, TDRD3, TDRD5, RNF17, STK31, dentre outras. Ainda, alguns componentes moleculares que constituem o CB são DNase, RNase, AcPs, Ubiquitina, HSP70 e estes componentes determinam que o CB atue como centro de degradação, onde DNAs, RNAs e proteínas que não seriam mais necessárias para o processo de espermatogênese seriam degradados. (HARAGUCHI et al., 2005).

MIWI e MVH são as proteínas mais abundantes e importantes na fisiologia do CB. (MEIKAR et al., 2014). MIWI (*mouse Argonaute/PIWI Family RNA-binding proteins*) é pertencente à família das proteínas PIWI (que contém outros dois genes, além de Miwi: Mili e Miwi2) e que desempenham papéis essenciais e fundamentais no desenvolvimento das células da linhagem germinativa, incluindo a manutenção de células-tronco da linhagem germinativa e meiose. (CHENG et al., 2014). Esse tipo de proteína da família Argonauta é conhecido por participar 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). Já a proteína MVH (*mouse VASA homologue*) é uma proteína da família de RNA

helicase DEAD-box ATP-dependente com função essencial para a progressão da espermatogênese).(TOYOOKA et al., 2000; KIM et al., 2015). MVH possui como uma de suas características principais, a capacidade de regular ativamente a transcrição de RNAs estocados no CB durante a espermiogênese (NAGAMORI et al., 2011).

A proteína BMAL1 é uma proteína transiente, encontrada principalmente nos núcleos das Células de Leydig, mas que durante alguma fase da espermatogênese, que ainda não foi definida, uma pequena quantidade de BMAL1 pode migrar para os CBs e para os citoplasmas das células, sendo encontrada em menor quantidade nesta organela. BMAL1 pode ser encontrado sublocalizado em células germinativas pós-meióticas e acumulado no CB interagindo com as proteínas MVH/MIWI de modo temporário, e sua retirada, gera alterações morfológicas significantes nos CBs. (PERUQUETTI et al., 2012).

Estudos já revelaram que a ação desta organela citoplasmática é importante para o processo de espermatogênese, pois a presença de mutações ou a ausência de algumas proteínas essenciais como MIWI, MVH, TDR1/MTR-1 causam infertilidade em ratos. (HEAD; KRESGE, 1985; CHUMA et al., 2006; DENG; LIN, 2002; TOYOOKA et al., 2000).

Considerando a complexidade e todos os eventos que cercam a espermatogênese e a sua relação com o CB, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer características, funções, origem, composição desta organela em todas as classes animais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi analisar qual microscopia de luz (de fluorescência ou confocal) é o melhor método de detecção de co-localização entre proteínas de *chromatoid bodies* (CBs) de espermátides iniciais de mamíferos por imunofluorescência.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar a técnica de imunofluorescência em lâminas contendo *squash preparations* de túbulos seminíferos no estágio de IV-VI, para marcação e detecção da co-localização das proteínas residentes MVH/MIWI e da proteína transitente BMAL1 presentes em CBs de espermátides iniciais de mamíferos.

- Obter os valores dos Coeficientes de Pearson's,  $k_1$  e  $k_2$  através da análise de co-localização dessas proteínas presentes em CBs de cada uma das espermátides iniciais analisadas e selecionadas por animal através da obtenção de imagens pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* e pela microscopia de luz confocal.

- Comparar estatisticamente as variáveis obtidas e determinar qual microscopia é a mais eficiente para este tipo de análise.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise de co-localização entre as proteínas constituintes dos CBs (MVH/MIWI e BMAL1) de espermátides iniciais foram utilizadas imagens obtidas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* e 23 imagens obtidas pela microscopia de luz confocal. As imagens obtidas pelas microscopias continham imagens de lâminas com *squash preparations* de túbulos seminíferos no estágio de IV-VI.

As imagens das lâminas com *squash preparations* obtidas pela microscopia de luz *widefield* (fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments, INC), com câmera acoplada (QIMAGING Micropublisher Cybernetics, INC) possuíam material de 4 camundongos machos (*Mus musculus*) com idade aproximadamente de 45 dias.

As imagens das lâminas com *squash preparations* obtidas pela microscopia de luz confocal (microscópio Leica Application Suíte – Advanced Fluorescence (LAF AF) 1.8.2 Build 1465 (1997-2007); software TCS SP5) possuíam material de 5 camundongos machos (*Mus musculus*) com idade aproximadamente de 45 dias. Apesar das imagens captadas por esta microscopia já estarem prontas e o material animal ser diferente, a preparação do material foi a mesma.

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os 4 camundongos (*Mus musculus*) utilizados para a obtenção do material analisado pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* foram fornecidos pelo biotério da Universidade do Sagrado Coração para o projeto “Envelhecimento: Relação entre esta condição fisiológica e alterações estruturais em *chromatoid bodies* de mamíferos” que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião em 09 de setembro de 2015 (ANEXO A). Os materiais de origem animal utilizados pelo projeto citado acima foram os mesmos utilizados pelo presente trabalho de conclusão de curso.

Durante os experimentos, os animais receberam os cuidados de acordo com as *Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Didáticos – DBCA* (2015), normalizadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração oferecidas *ad libitum* com ambiente controlado (temperatura entre 21°C 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 eutanasiados por deslocamento cervical.

Todos os procedimentos que foram utilizados neste trabalho estão de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2015).

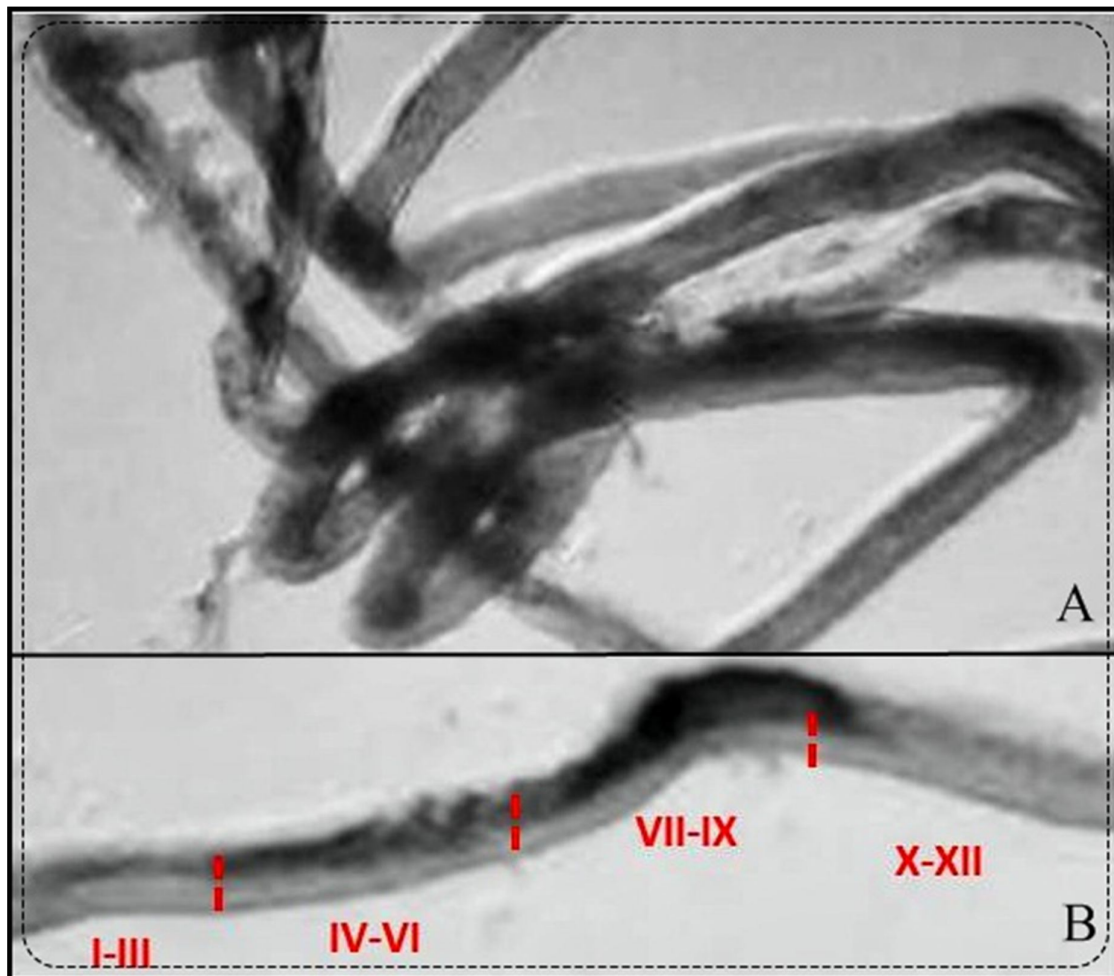
As imagens obtidas pela microscopia de luz confocal foram provenientes de resultados do trabalho de pós-doutorado da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti, financiado pela FAPESP (2009/14090-6). O número de seguro de Boas Práticas Animais da Universidade da Califórnia (UCI) é A3416-01. O referido projeto foi aprovado pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (número de protocolo IACUC: 2006/2699).

### 3.2 OBTENÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Todo o procedimento de isolamento dos túbulos seminíferos foi realizado de acordo com o protocolo de Kotaja et al. (2004).

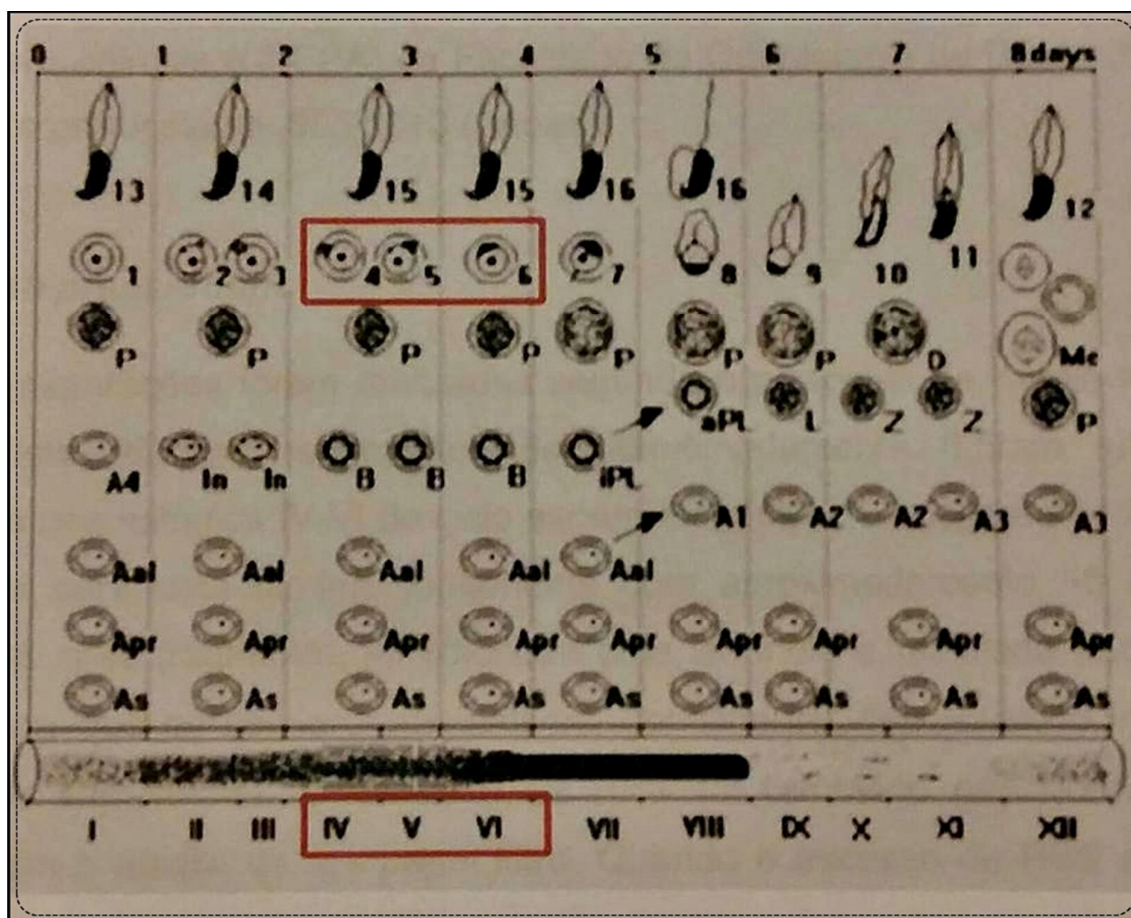
Para obtenção dos túbulos seminíferos, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se um corte na região abdominal, para a remoção dos testículos e os mesmos serem retirados. Foi removido o excesso de tecido adiposo dos testículos e em seguida, realizados dois pequenos cortes nas laterais para a retirada da túnica albugínea e liberação dos túbulos. Após esse procedimento, os túbulos seminíferos foram separados de acordo com os estágios do ciclo espermatogênico (o estágio I-III possui uma coloração clara, pois há a presença de células indiferenciadas; o estágio IV-VI possui coloração mais intensa que o estágio anterior e é o de maior interesse, pois é onde o CB está mais ativo e as proteínas estão exercendo mais as suas funções; o estágio VII-IX possui uma coloração mais intensa do que os outros estágios e corresponde ao estágio onde ocorre a maturação dos espermatozoides; e o estágio X-XII não apresenta coloração, pois é o estágio em que ocorre a espermição) (Figuras 3 e 4) através da utilização de um microscópio de transiluminação.

Figura 3 - Túbulos seminíferos observados em microscópio de transiluminescência. (A) Túbulos seminíferos ainda emaranhados. (B) Segmentos dos túbulos seminíferos com os estágios (I-III, IV-VI, VII-IX e X-XII) separados. Estágio de interesse: IV-V. Neste estágio, o CB está mais ativo e as proteínas exercendo mais as suas funções



Fonte: Silva (2016).

Figura 4 - Descrição dos estágios do ciclo espermatogênico de camundongos. As células presentes no estágio de interesse IV-VI são as espermátides iniciais



Fonte: Modificado a partir de Rooij; Grootegoed (c1998, p. 694-701).

### 3.3 SQUASH PREPARATIONS

As preparações foram realizadas de acordo com o protocolo de Kotaja et al. (2004). Foram utilizados segmentos de aproximadamente 0.5mm de túbulos seminíferos nos estágios de IV-IV do ciclo espermatogênico. Esses segmentos foram transferidos para lâminas (identificadas com a numeração e a idade do animal, estágio do ciclo espermatogênico ao qual pertencia o segmento e a data), junto com aproximadamente 15  $\mu$ L de PBS. Sobre esses segmentos foram colocadas lamínulas e realizada pequena pressão para que as células germinativas deixassem o interior dos túbulos seminíferos. O excesso de PBS foi removido das bordas das lamínulas com o auxílio de papel filtro. Posteriormente, o conjunto de lâminas e lamínulas foram submergidos em nitrogênio líquido e em seguida, as lamínulas foram

retiradas. As lâminas foram secas ao ar durante 4 horas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### 3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM *SQUASH PREPARATIONS*

As lâminas contendo *squash preparations* foram imersas em 4% PFA/PBS, em gelo, durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 1x e depois, imersas em 0,2% TRITON 100x/PBS em temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS 1x e secas com papel filtro com cuidado para não retirar o material. Em seguida, as lâminas foram transferidas para câmara úmida e o bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com 5% BSA/PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente ao bloqueio, as amostras foram incubadas *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  e em câmara úmida com os seguintes anticorpos primários: PIWIL (N-17): sc-22685 ou  $\alpha$ -DDX4/MVH (ab27591) e  $\alpha$ -BMAL1 (ab93806). Após a incubação as lâminas foram lavadas em PBST 1x por três vezes seguidas. Os anticorpos secundários de interesse, conjugados com diferentes agentes fluorescentes Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit e Alexa Fluor® 532 Goat Anti-Mouse foram diluídos em 5% BSA/PBS, foram distribuídos nas lâminas, as quais foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após isso, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBST 1x e em seguida, os materiais presentes nas lâminas foram corados com a solução DAPI para a marcação dos núcleos celulares das células germinativas. Ao final, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 10 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, secas e protegidas com uma gota do Ultra Cruz Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc.): sc-24941 e analisadas ao microscópio de luz de fluorescência *widefield*. As imagens fornecidas pela professora Dra. Rita Luiza Peruquetti foram obtidas e analisadas pelo microscópio de luz confocal.

### 3.5 ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO: COEFICIENTE DE PEARSON'S

O Coeficiente de Pearson's (Rr), 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.

Para cálculo do Coeficiente de Pearson's, as imagens de imunofluorescência foram obtidas e analisadas pelo software Image-Pro® Plus (Version 5.1.2.59 for Windows 2000/XP



Professional 1993-2005© Medial Cybernetics, INC) na microscopia de luz de fluorescência *widefield*; e na microscopia de luz confocal, as imagens de imunofluorescência foram obtidas pelo software TCS SP5 e analisadas software Image-Pro® Plus (Version 5.1.2.59 for Windows 2000/XP Professional 1993-2005© Medial Cybernetics, INC). Das imagens capturadas e analisadas pela microscopia de luz de fluorescência, foram escolhidas 133 espermátides iniciais onde a co-localização entre MVH/MIWI e BMAL1 foi demonstrada e, das imagens capturadas e analisadas pela microscopia de luz confocal, foram escolhidas 68 espermátides iniciais onde a co-localização entre MVH/MIWI e BMAL1 foi também demonstrada para o cálculo do coeficiente de co-localização de acordo com o Coeficiente de Pearson's ( $R_r=1$ ) de cada uma das espermátides iniciais escolhidas.

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre os valores de Coeficiente de Pearson's ( $R_r$ ), bem como os valores do canal 1 ( $k_1$ ) e do canal 2 ( $k_2$ ) para determinação do coeficiente de sobreposição para as imagens obtidas nos dois diferentes tipos de microscopia foram realizadas pelo teste U (Mann-Whitney), utilizando o software StatSoft Inc. (2011) STATISTICA (data analysis software system), version 10. As análises estatísticas foram baseadas em Zar (1999) e a diferença estatística foi considerada quando  $p \leq 0,05$ .

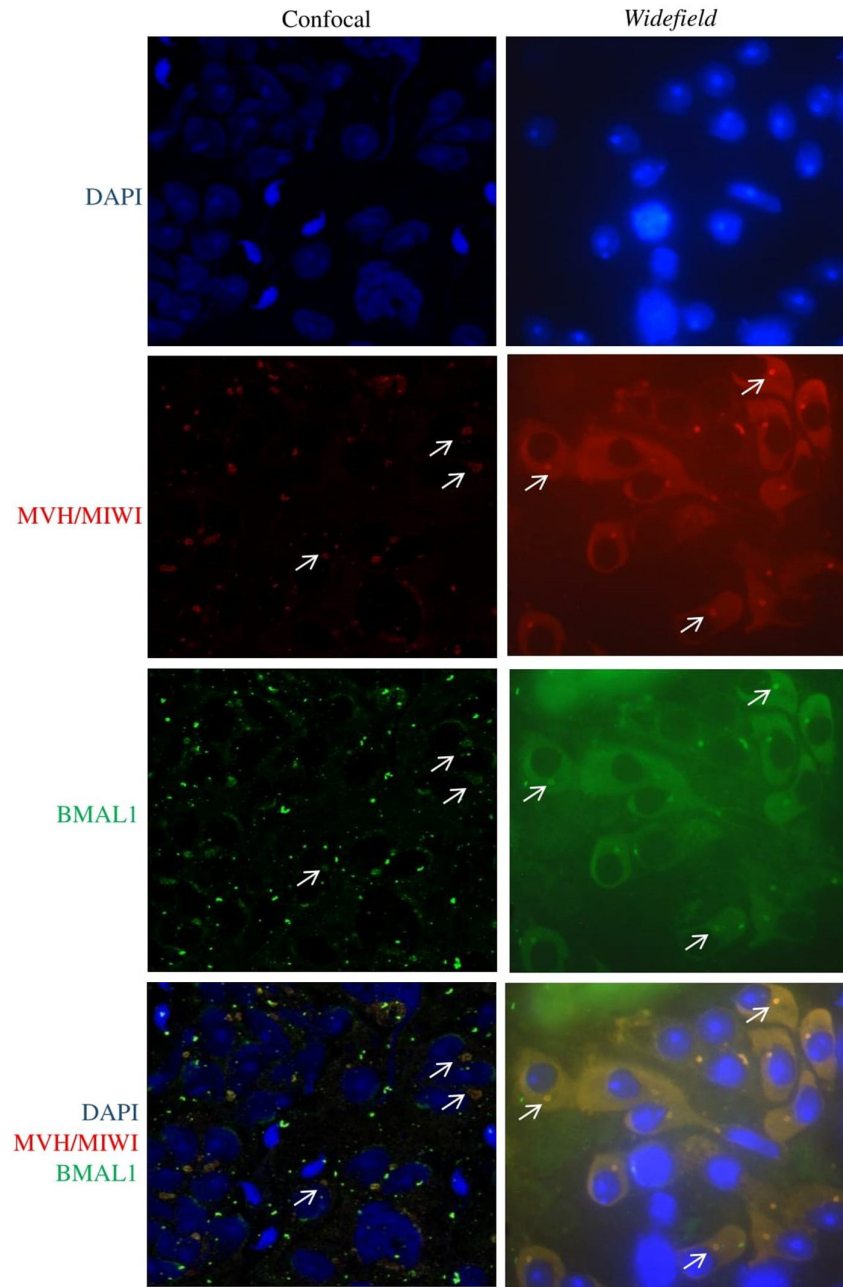
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MVH/MIWI E BMAL1

A técnica de imunofluorescência foi realizada com o intuito de marcar a co-localização das proteínas MVH/MIWI e BMAL1, que são detectadas nos CBs ou próximas a eles, ou seja, o quanto a marcação feita pelo MVH/MIWI se sobrepôs com a marcação feita pelo BMAL1 (Figura 5).

Analisando os dados obtidos entre a relação MVH/MIWI:BMAL1 foi possível observar, que o Coeficiente de Pearson's na detecção da co-localização entre essas proteínas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* demonstrou que a distribuição da maioria das marcações das proteínas detectadas nos CBs de espermátides iniciais possuíam valores de Rr que estavam entre 0,75 e 0,97. Isto sugere, inicialmente, que houve uma relação linear forte entre a co-localização dessas proteínas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* (Figura 6a). Entretanto, pela microscopia de luz confocal, os valores de Rr obtidos estavam entre 0,20 e 0,50 sugerindo uma relação linear fraca entre a co-localização dessas proteínas (Figura 6b).

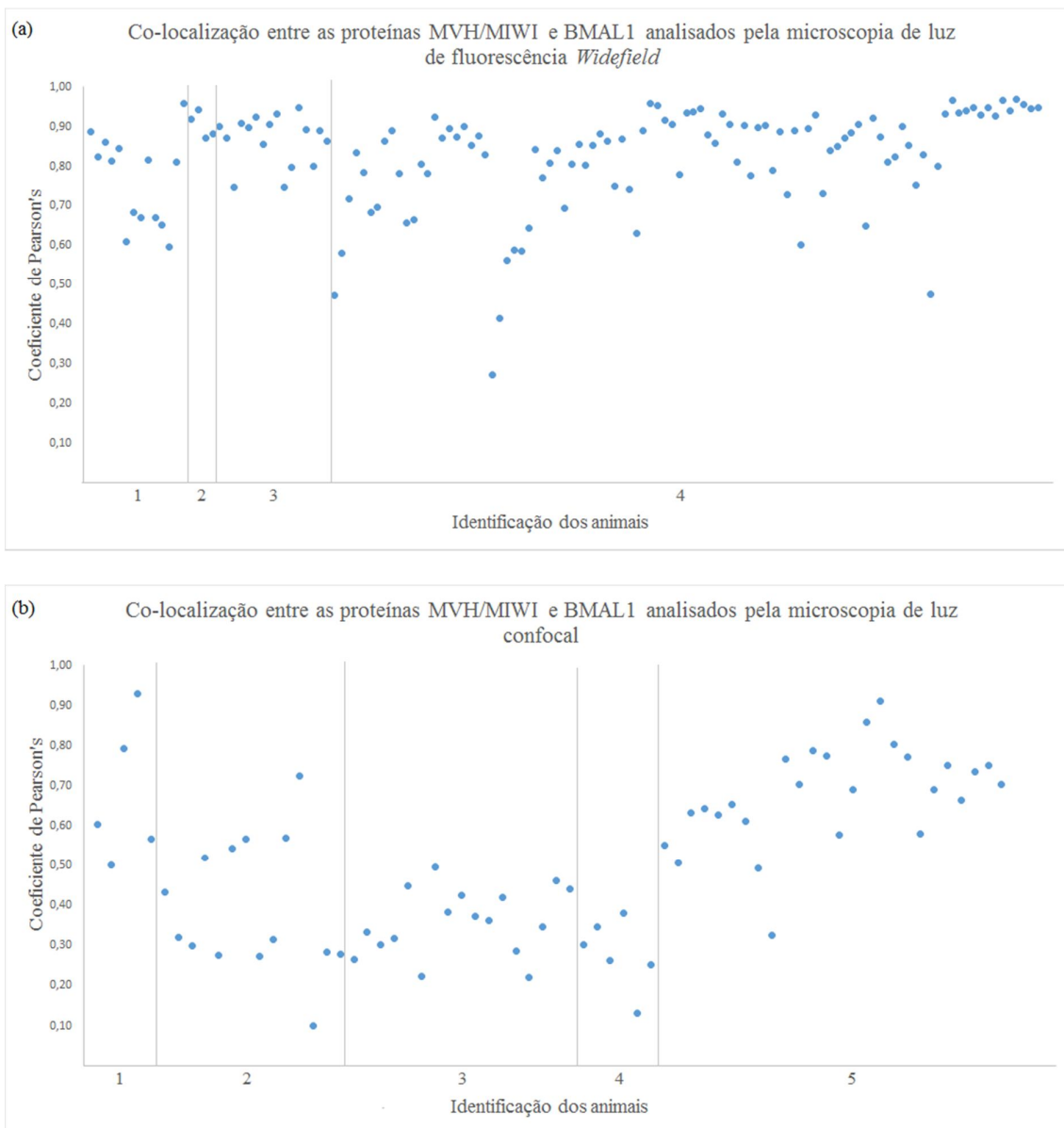
Figura 5 - Detecção por imunofluorescência da marcação dos núcleos celulares pela coloração DAPI e das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 (setas) presentes em CBs de espermatídes iniciais de túbulos seminíferos no estágio de IV-VI do ciclo espermatogênico



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: Detecção da imunofluorescência pela microscopia de luz confocal (Coluna 1); Detecção da imunofluorescência pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* (Coluna 2); Sobreposição das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 resulta na coloração amarela situada próxima ao núcleo das células; Nas imagens captadas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* pode-se observar ao redor dos núcleos a fluorescência captada dos backgrounds/artefatos.

Figura 6 - Gráficos de dispersão. (a) - Distribuição dos valores do Coeficiente de Pearson's a partir da co-localização das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 presentes nos CBs de espermátides iniciais de cada um dos animais analisados pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* indicando forte relação linear. (b) - Distribuição dos valores do Coeficiente de Pearson's a partir da co-localização das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 presentes nos CBs de espermátides iniciais de cada imagem obtida pela microscopia de luz confocal indicando fraca relação linear



Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após as análises de distribuição dos Coeficientes de Pearson's obtidos através da colocalização entre as proteínas MVH/MIWI e BMAL1, foram realizadas as análises estatísticas entre os valores de Rr, canal 1 (k1 – BMAL1) e canal 2 (k2 – MVH/MIWI) obtidos pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* e pela microscopia de luz confocal. Essas análises estatísticas foram feitas pelo teste U (Mann-Whitney) devido a distribuição não-paramétrica dos dados e que compara duas variáveis de grupos de amostras independentes. O teste U (Mann-Whitney) demonstrou que todos os valores comparados foram estatisticamente diferentes onde  $p \leq 0,05$ .

Primeiramente, o teste U foi utilizado para comparar os valores das médias dos Coeficientes de Pearson's obtidos pelas microscopias. A média do Coeficiente de Pearson's entre as proteínas MVH/MIWI e BMAL1 pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* apresentou um valor de 0,82 e a média do Coeficiente de Pearson's apresentada pela microscopia de luz confocal foi de 0,50 (Figura 7a).

Foi comparado, também, as médias dos valores do canal 1 (k1), que correspondem ao quanto que a proteína BMAL1 influenciou na interação da determinação de cada Coeficiente de Pearson's obtidos pelas microscopias. As médias dos valores de influência do canal 1 pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* foi de 1,44 e pela microscopia de luz confocal foi de 0,68, ou seja, a microscopia de luz de fluorescência *widefield* captou mais marcações da proteína BMAL1 (Figura 7b). A mesma comparação foi feita entre as médias dos valores do canal 2 (k2), que correspondeu ao quanto que a proteína MVH/MIWI influenciou na interação da determinação dos Coeficientes de Pearson's obtidos. As médias dos valores de influência do canal 2 pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* foi de 0,74 e pela microscopia de luz confocal foi de 0,86. Neste caso, a microscopia de luz confocal captou mais marcações pela proteína MVH/MIWI. (Figura 7c).

Figura 7 – (a) Comparação entre as médias dos Coeficientes de Pearson's (Rr) obtidos por cada microscopia. (b) Comparação entre as médias obtidas dos valores de influência do canal 1 (k1) na participação da determinação dos valores de Rr ou o quanto que a proteína BMAL1 participou dessa interação em cada uma das microscopias (continua)

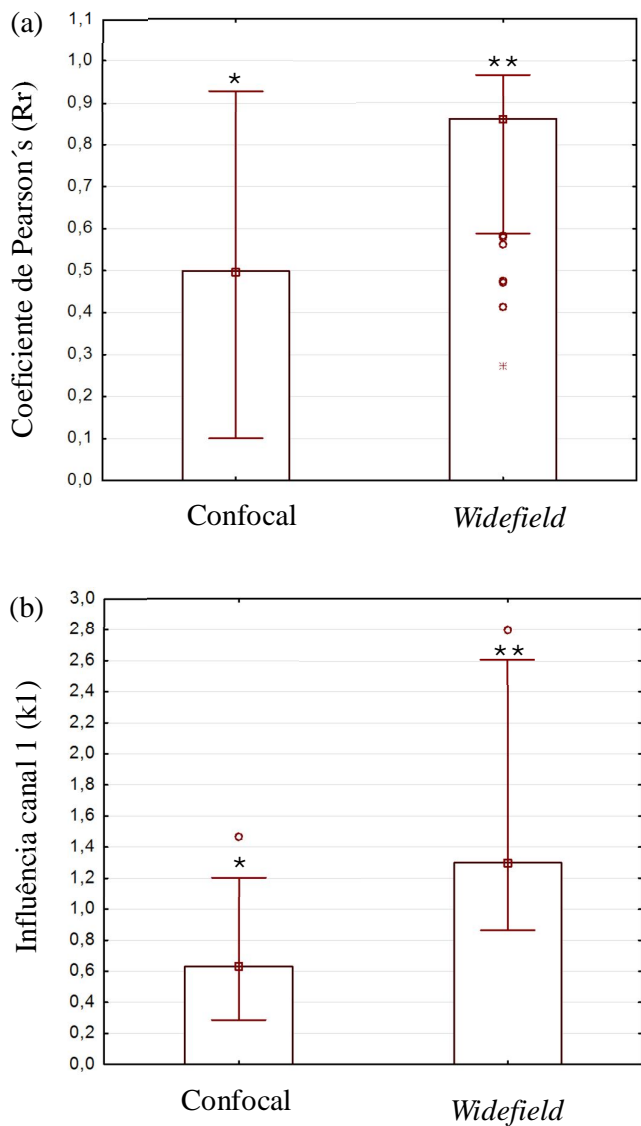
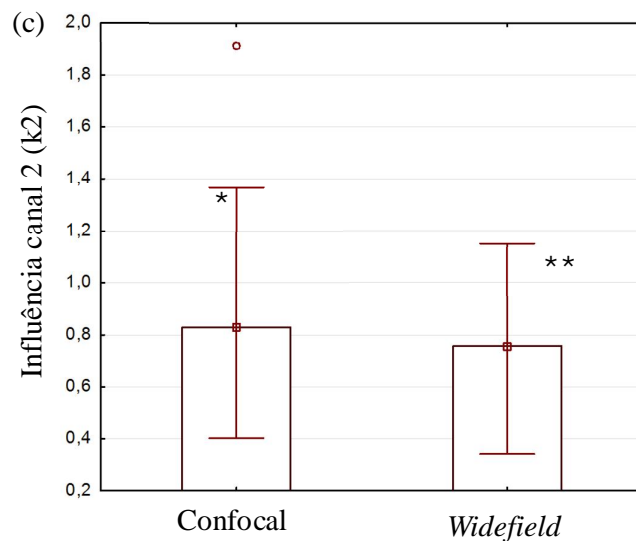


Figura 7 – (conclusão) (c) Comparação entre as médias obtidas dos valores de influência do canal 2 (k2) na participação da determinação dos valores de Rr ou o quanto que a proteína MVH/MIWI participou dessa interação em cada uma das microscopias



□ Média  
| Desvio padrão  
◊ Outliers

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (\* e \*\*) Variáveis estatisticamente diferentes;

Outliers: pico de imunofluorescências muito altos detectados.

#### 4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, através da técnica de imunofluorescência em *squash preparations* e as análises do Coeficiente de Pearson's, relativas à sobreposição das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 em imagens obtidas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* e microscopia de luz confocal, foi possível determinar qual destas duas microscopias é o método mais recomendado para estudar a localização das proteínas encontradas em CBs de espermátides iniciais.

Inicialmente, os valores elevados da co-localização das proteínas MVH/MIWI e BMAL1 demonstrados pelo Coeficiente de Pearson's e sua distribuição (Figura 6a) com relação linear forte, obtidos pela microscopia de luz de fluorescência *widefield*, sugerem que esta microscopia seria melhor e mais eficiente, quando comparados aos valores do Coeficiente de Pearson's e sua distribuição (Figura 6b) com relação linear fraca, obtidos pela microscopia de luz confocal, e que podem, ser também observados na Figura 7a, onde a média do valor do Coeficiente de Pearson's foi maior na microscopia de luz de fluorescência *widefield*.

A comparação entre as médias dos valores do canal 1 ( $k_1$ ), que seria o quanto que a proteína BMAL1 influenciou na interação da determinação dos Coeficientes de Pearson's obtidos, foi essencial para a determinação de qual microscopia seria o melhor método para a detecção da co-localização entre proteínas de CBs de espermátides iniciais de mamíferos através da técnica de imunofluorescência. Neste caso, a microscopia de luz confocal obteve média de captação dessa interação menor que a média obtida na microscopia de luz de fluorescência *widefield*. (Figura 7b). Seguindo o conceito de que a proteína BMAL1 é uma proteína transiente, que migra do núcleo para o citoplasma e para o CB e é encontrada em pequenas quantidades co-localizada com a proteína MVH/MIWI nesta organela (PERUQUETTI et al., 2012), a microscopia de luz confocal foi o método de detecção mais fiel e eficiente, ao obter uma média de influência do canal 1 ( $k_1$ ) baixa.

Quando comparamos as médias dos valores do canal 2 ( $k_2$ ), que seria o quanto que a proteína MVH/MIWI influenciou na interação da determinação dos Coeficientes de Pearson's obtidos, a microscopia de luz confocal obteve média de captação dessa interação maior que a microscopia de luz de fluorescência *widefield*, sendo considerada melhor e mais eficiente neste tipo de captação (Figura 7c).

Alguns dos fatores que podem ter contribuído para que a média de captação da influência do canal 1 ( $k_1$ ) pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* fosse maior do que a média de captação da microscopia de luz confocal podem estar relacionados à formação e captação de imagens nestes tipos de microscopias. (POLIZELLI, 2008). Diferentemente da



microscopia de luz confocal em que as imagens são formadas a partir de reconstruções de planos específicos ou cortes ópticos e a iluminação é feita em apenas pequenos pontos do plano de varredura, na microscopia de luz de fluorescência *widefield*, os objetos que estão fora de foco participam da formação da imagem final e todo o campo de varredura é iluminado. Na Figura 5, pode-se observar que nas imagens captadas pela microscopia de luz confocal, apenas a fluorescência emitida pelas espermátides iniciais e seus respectivos CBs estão sendo bem marcados, as imagens apresentam pouca sujeira, coloração inespecífica ou poucos artefatos (*background*) ao redor das células e uma qualidade bem nítida da imagem. Na coluna de imagens obtidas pela microscopia de luz de fluorescência *widefield* (Figura 5), podemos observar que a lâmina está mais suja ou com mais artefatos e coloração inespecífica ao redor das espermátides iniciais, a qualidade da imagem é mais inferior e que além dos CBs, estes artefatos, também emitiram uma fluorescência que foi captada pela microscopia de luz de fluorescência *widefield*. Assim, essa fluorescência captada dos artefatos acabou influenciando nos valores finais de co-localização (Rr) e k1 entre as proteínas MVH/MIWI e BMAL1. Isso explica o porquê dos valores mais altos terem sido obtidos pela microscopia de luz de fluorescência *widefield*. Seria errôneo, também, afirmar que esta microscopia é melhor do que a confocal, já que a confocal é um segmento aperfeiçoado da microscopia *widefield*. (TABOGA, 2001; COSTA, 2014; MAFRA, 2014b).

## 5 CONCLUSÃO

A intenção deste estudo foi determinar qual microscopia de luz (de fluorescência ou confocal) seria a mais ideal para estudos envolvendo a co-localização de proteínas presentes em *chromatoid bodies* de espermátides iniciais de mamíferos por imunofluorescência. Após todas as análises realizadas, conclui-se que a microscopia de luz confocal é o melhor método para este tipo de análise.

## REFERÊNCIAS

- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Microscopia confocal a laser. In: TABOGA, S. R. **A célula**. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 2001. p. 9-11.
- CHENG, E. C. et al. Piwi proteins are dispensable for mouse somatic development are reprogramming of fibroblasts into pluripotent stem cells. **PLoS ONE**. v. 9, n. 9, p. 1-11, 2014. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097821>>. Acesso em: 28. out. 2016.
- CHUMA, S. et al. Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. **PNAS**, v. 103, n. 43, p. 15894-15899, oct. 2006. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/103/43/15894.long>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- COSTA, L. B. Microscópio confocal de varredura a laser. **Instituto de Biociências**, 2014. Disponível em: <<http://www.ibb.unesp.br/#!/unidades-auxiliares/centro-de-microscopia-eletronica---cme/parque-de-equipamentos/confocal/>>. Acesso em: 19 mar. 2016.
- DENG, W.; LIN, H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. **Developmental Cell**, v. 2, n. 6, p. 819-830, jun. 2002. Disponível em: < [http://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807\(02\)00165-X](http://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807(02)00165-X)>. Acesso em: 12 out. 2016.
- ENDER, C.; MEISTER, G. Argonaute proteins at a glance. **J. Cell Sci**. v. 123, n. 11, p. 1819-1823, 2010. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/joces/123/11/1819.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2016.
- ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO MACHO. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias**, c2016. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/macho.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2016.
- FAWCETT, D. W. et al. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 129-153, feb. 1970. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/2/1/129.long>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- FILHO, D. B. F.; JÚNIOR, J. A. S. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, Pernambuco, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009. Disponível em: < <http://www.revista.ufpe.br/politica/hoje/index.php/politica/article/viewFile/6/6>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- HARAGUCHI, C. M. et al. Chromatoid bodies: aggressive-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. **J Histochem Cytochem**, Japan, v. 53, n. 4, p. 455-465, apr. 2005. Disponível em: < <http://jhc.sagepub.com/content/53/4/455.full>>. Acesso em: 12 out. 2016.

HEAD, J. R.; KRESGE, C. K. Reaction of the chromatoid body with monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. **Biol. Reprod**, Texas (US) , v. 33, n. 4, p. 1001-1008, nov. 1985. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/33/4/1001.long>>. Acesso em: 12 out. 2016.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Tecnologia da Biologia Celular e Molecular: Alguns Exemplos. In \_\_\_\_\_. **Biologia Celular e Molecular**. 7.ed. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2012. cap 2, p. 22-24; 28-29.

KIM, J. Y. et al. VASA (DDX4) is a Putative Marker for Spermatogonia, Spermatocytes and Round Spermatids in Stallions. **Reprod Dom Anim**. V. 50, n. 6, p. 1032-1038, 2015. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12632/abstract;jsessionid=D07FC6451D640B148FDF9EE78CA14829.f04t02>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

KOTAJA, N. et al. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 249-254, dec. 2004. Disponível em: < <http://www.nature.com/nmeth/journal/v1/n3/full/nmeth1204-249.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ specific RNA-processing centre. **Nature reviews – Molecular Cell Biology**, v.8, p. 85-90, jan. 2007. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n1/full/nrm2081.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.

LOPES, S. M. C. S.; ROELEN, B. A. J. An overview on the diversity of cellular organelles during the germ cell cycle. **Histol. Histopathol**, Urecht (The Netherlands), v. 25, n. 2, p. 267-276, feb. 2010. Disponível em: < [http://www.hh.um.es/pdf/Vol\\_25/25\\_2/de-Sousa-Lopes-25-267-276-2010.pdf](http://www.hh.um.es/pdf/Vol_25/25_2/de-Sousa-Lopes-25-267-276-2010.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2016.

MAFRA, F. F. P. **MICROBIOLOGIA: AULA – 7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**, 2014a. Disponível em:

<<https://www.youtube.com/watch?v=6x6uk6f1fb0>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

MAFRA, F. F. P. **MICROBIOLOGIA: AULA – 8 MICROSCOPIA CONFOCAL**, 2014b. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=GC9hEdRbc0w>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

MAHOWALD, A. P. Assembly of the *Drosophila* germ plasm. **Int. Rev. Cytol.** v. 203, p. 187-213, 2001. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131516> >. Acesso em: 28 out. 2016.

MEIKAR, O. et al. An atlas of chromatoid body components. **RNA**, v. 20, n. 4, p. 1-13, feb. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964910/>>. Acesso em: 12 out. 2016.

NAGAMORI, I. et al. Regulation of na RNA granule during spermatogenesis: acetylation of MVH in the *chromatoid body* of germ cells. **J Cell Sci**. v. 124, n. 24, p. 4346-4355, 2011. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/124/24/4346>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

NUNES, A. K. R. et al. Análise morfológica e funcional do processo espermatogênico em cobaias (*Cavia porcellus*) da pré-puberdade até a pós-puberdade. **Revista de pesquisa veterinária brasileira**, Mato Grosso, v.1, n. 33, p. 1-7, dez. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2013001300001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013001300001)>. Acesso em: 12 out. 2016.

O'DONNELL, L. et al. Estrogens and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, U.S.A, v. 22, n .3, p. 289-318, apr. 2001. Disponível em: <[http://download.springer.com/static/pdf/73/art%253A10.1007%252FBF03034410.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2FBF03034410&token2=exp=1476324946~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F73%2Fart%25253A10.1007%25252FBF03034410.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252FBF03034410\\*~hmac=2e7e90cc3cae13d1c8f20fbb6c8e0b4141e7d2c48bb4e44e69d25607b7154e48](http://download.springer.com/static/pdf/73/art%253A10.1007%252FBF03034410.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2FBF03034410&token2=exp=1476324946~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F73%2Fart%25253A10.1007%25252FBF03034410.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252FBF03034410*~hmac=2e7e90cc3cae13d1c8f20fbb6c8e0b4141e7d2c48bb4e44e69d25607b7154e48)>. Acesso em: 12 out. 2016.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, Turku (FIN), v. 28, n. 4, p. 189-201, jul. 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2005.00542.x/full>>. Acesso em: 12 out. 2016.

PAULI, L. F. **Descrição da expressão da proteína nucleolar fibrilarina em túbulos seminíferos de mamíferos em diferentes estágios de desenvolvimento e suas interações físicas com componentes moleculares de chromatoid bodies**. 2015. 44f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade do Sagrado Coração, Centro de Ciências da Saúde, Bauru – SP, 2015.

PERUQUETTI, R. L. et al. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 419-425, jun. 2008. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/6319267\\_Meiotic\\_nucleolar\\_cycle\\_and\\_chromatoid\\_body\\_formation\\_during\\_the\\_rat\\_Rattus\\_norvegicus\\_and\\_mouse\\_Mus\\_musculus\\_spermiogenesis](https://www.researchgate.net/publication/6319267_Meiotic_nucleolar_cycle_and_chromatoid_body_formation_during_the_rat_Rattus_norvegicus_and_mouse_Mus_musculus_spermiogenesis)>. Acesso em: 12 out. 2016.

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, jun. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

PERUQUETTI, R. L. et al. Circadian proteins CLOCK and BMAL1 in the chromatoid body, a RNA processing granule of male germ cells. **PLoS one**, Califórnia (US), v. 7, n. 8, p. 1-10, aug. 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042695>>. Acesso em: 12 out. 2016.

POLIZELLI, M. L. T. M. **Manual prático de Biologia Celular**. Editora: Holos, 2.ed., 163p., 2008.

ROOIJ, D. G.; GROOTEGOED, J. A. Spermatogonial stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 694-701, 1998. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067498801099>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SACHETIM, R. L. M. Desenvolvimento do testículo de camundongo da fase fetal até a idade adulta. **Revista Acta Scientiarum**, Paraná, v. 21, n. 1, p. 353-357, jun. 1999. Disponível em:<  
[https://www.google.com.br/search?q=SACHETIM%2C+R.+L.+M.+Desenvolvimento+do+test%C3%ADculo+de+camundongo+da+fase+fetal+at%C3%A9+a+idade+adulta&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe\\_rd=cr&ei=jOz-V6ODEc7M8Aelv4jQDw](https://www.google.com.br/search?q=SACHETIM%2C+R.+L.+M.+Desenvolvimento+do+test%C3%ADculo+de+camundongo+da+fase+fetal+at%C3%A9+a+idade+adulta&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&ei=jOz-V6ODEc7M8Aelv4jQDw)>. Acesso em: 12 out. 2016.

SAHAR, S.; SASSONE-CORSI, P. Metabolism and Cancer: The circadian clock connection. **Nature Reviews: Cancer**. V. 9, n. 9, p. 886-896, 2009. Disponível em: <  
<http://www.nature.com/nrc/journal/v9/n12/full/nrc2747.html>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

SANTOS, E. G.; BERBEL, T. G. **Deteção da proteína nucleolar fibrilarina na composição molecular de *chromatoid bodies* e caracterização de seu papel na fisiologia desta organela citoplasmática**. 2014. 23f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração, Centro de Ciências da Saúde, Bauru – SP, 2014.

SAUNDERS, P. T. K. et al. 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 ripoprobe. **Molecular Reproduction and Development**, Edinburgh (UK), v.33, n. 4, p. 385-391, dec. 1992. Disponível em:  
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1080330404/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SILVA, M. A. **Alterações morfológicas em *chromatoid bodies* de mamíferos: Evento relacionado com a expressão da proteína circadiana BMAL1 ou consequência do envelhecimento?**. 2016. 30f. Monografia de iniciação científica (Bacharel em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração, Centro de Ciências da Saúde, Bauru-SP, 2016.

SÖDERSTRÖM, K.; PARVINEN, M. Incorporation of [3H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. **The Journal of Cell Biology**, Turku (FIN), v. 70, n. 1, p. 239-246, jul. 1976. Disponível em: < <http://jcb.rupress.org/content/jcb/70/1/239.full.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2016.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. **Dukes – fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. cap 35, p. 603-614.

TANG, X. M. et al. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6124118>>. Acesso em: 12 out. 2016.

TOYOOKA, Y. et al. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. **Mechanisms of Development**, v. 93, n. 1-2, p. 139-149, may. 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477300002835>>. Acesso em: 12 out. 2016.

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, n. 7, p. 2768-2780, jul. 2003. Disponível em: < <http://www.molbiolcell.org/content/14/7/2768.long>>. Acesso em: 12 out. 2016.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. USA: Ed. Prentice Hall., 1999, 929pp.

**ANEXO A – Documento de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração para o projeto “Envelhecimento: Relação entre esta condição fisiológica e alterações estruturais em *chromatoid bodies* de mamíferos”.**



PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ENVELHECIMENTO: RELAÇÃO ENTRE ESTA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS EM CHROMATOID BODIES DE MAMÍFEROS", protocolado sob o CEUA nº 1192290515, sob a responsabilidade de **Rita Luiza Peruquetti e equipe; Elisa Gomes Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 09/06/2015.

We certify that the proposal "AGING: THE RELATIONSHIP BETWEEN THIS PHYSIOLOGICAL CONDITION AND STRUCTURAL ALTERATIONS OF MAMMAL'S CHROMATOID BODIES.", utilizing 15 Heterogenics mice (15 males), protocol number CEUA 1192290515, under the responsibility of **Rita Luiza Peruquetti and team; Elisa Gomes Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 06/09/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 06/2017

Área: Pró Reitoria De Pesquisa E Pós-graduação

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Swiss

Gênero: Machos

idade: 120 dias

N: 5

Peso: 50g

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Swiss

Gênero: Machos

idade: 45 dias

N: 5

Peso: 50g

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Swiss

Gênero: Machos

idade: 6 meses

N: 5

Peso: 50g

Nota: O chromatoid body (CB) é estrutura citoplasmática de células germinativas masculinas que possui um papel na regulação da transcrição de RNAm durante a espermatogênese, além de participar no controle da expressão gênica por meio do comando da ação de pequenos RNAs não codificantes (RNAmi e RNApi). Estudos recentes tem demonstrado que todo esse metabolismo de RNAm mediado por pequenos RNAs não codificantes executado pelo CB é crucial para que o processo de espermatogênese progrida de maneira apropriada, garantindo a formação da célula reprodutora masculina madura. A análise proteômica completa desta estrutura identificou a presença abundante dos seus marcadores moleculares clássicos (MVH, MIWI, DDX25, TDRD6 e TDRD7), porém também identificou um grande número de proteínas transientes, ou seja, proteínas que possuem função/localização nuclear e que temporariamente se alojam no CB. Proteínas transientes que tem chamado a atenção de nosso grupo são: CLOCK (circadian locomoter output cycles protein kaput) e BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1), que são componentes moleculares do controle circadiano. A identificação das proteínas CLOCK e BMAL1 na composição molecular de CBs aliada ao fato de camundongos BMAL1 apresentarem esterilidade e alterações morfológicas no CB das células pós-meióticas são evidências que nos levam a tentar correlacionar o papel destas duas proteínas na fisiologia de CBs. Portanto, o objetivo do presente trabalho será testar a hipótese inicial por meio da realização de experimentos que nos permitam verificar se as alterações morfológicas observadas em CBs de células pós-meióticas em camundongos BMAL1 KO foram realmente produzidas pela ablação de BMAL1 no organismo ou se estavam relacionadas com o processo de envelhecimento acelerado que esta ablação promove.

Bauru, 09 de setembro de 2015





UNIVERSIDADE DO  
**SAGRADO  
CORAÇÃO**  
A Universidade da sua vida

PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Sagrado Coração