

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA MARIA CARDOSO

Bloqueio da atividade nucleolar em células germinativas masculinas e suas consequências
para a espermatogênese.

BAURU

2020

JULIANA MARIA CARDOSO

Bloqueio da atividade nucleolar em células germinativas masculinas e suas consequências para a espermatogênese.

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

BAURU

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD

Cardoso, Juliana Maria

C268b

Bloqueio da atividade nucleolar em células germinativas
masculinas e suas consequências para a espermatogênese /
Juliana Maria Cardoso. -- 2020.

36f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração -
UNISAGRADO - Bauru - SP

1. Espermatogênese. 2. Nucléolo Celular. 3. Corpo
Cromatoide. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.

JULIANA MARIA CARDOSO

Bloqueio da atividade nucleolar em células germinativas masculinas e suas consequências para a espermatogênese.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti (Orientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Profa. Dra. Andréa Mendes Figueiredo
Centro Universitário Sagrado Coração

Dedico este trabalho a minha família e amigos, em especial minha mãe Leni, por todo esforço e dedicação para que tudo isso fosse possível.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”. (Carl G. Jung).

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.DESENVOLVIMENTO	17
2.1.Delineamento experimental.....	17
2.2 Análise da expressão proteica de proteínas nucleolares (Fibrilarina) e de componentes do CB (MVH, CLOCK e BMAL1) – <i>Western blot</i>	19
2.3. Quantificação relativa da expressão proteica de CLOCK e BMAL1.....	19
2.4. Análise por impregnação de íons de prata (AgNOR)	20
2.5 Imunofluorescência	20
2.6.RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE 1	36

Bloqueio da atividade nucleolar em células germinativas masculinas e suas consequências para a espermatogênese.

Juliana Maria Cardoso¹ (jujumcardoso@hotmail.com), Luane Fernandes Pereira¹ (Luane.fernandes.pereira@gmail.com), Wilson Aparecido Orcini³ (worcini@me.com), Rita Luiza Peruquetti^{1,2,3} (ritaperuquetti@gmail.com)

¹ Centro Universitário Sagrado Coração (UNISAGRADO), Bauru, São Paulo, Brasil.

² Centro de Saúde, Centro Universitário Sagrado Coração (UNISAGRADO), Bauru, São Paulo, Brasil.

³ Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética, Centro Universitário Sagrado Coração (UNISAGRADO), Bauru, São Paulo, Brasil

Palavras-chave: Espermatogênese. Nucléolo Celular. Corpo cromatóide.

Financiamento: FAPESP (2016/04580-0) e CNPq (PIBIC-Unisagrado, 2018-2019; 2019-2020).

(Este artigo foi escrito nas normas da revista Micron - The International Research and Review Journal for Microscopy - ISSN: 0968-4328)

RESUMO

A espermatogênese é o processo em que uma célula germinativa passa até se transformar em espermatozoide. O corpo cromatóide (CB) é uma estrutura típica de células germinativas masculinas localizado próximo ao núcleo celular com função de estocar RNA e proteínas que atuarão na espermiogênese. Uma das principais proteínas presentes no CB é chamada MVH (*Mouse Vasa Homologue*), entre outras. No núcleo há uma estrutura conhecida como nucléolo a sua principal função que é sintetizar RNAr e montar ribossomos, sendo a fibrilarina uma proteína presente no seu componente fibrilar denso e importante para que o nucléolo desempenhe esse papel. CBs e nucléolo tem papéis cruciais na espermatogênese. No presente estudo foi bloqueada a atividade do nucléolo com a droga BMH-21 para observar o desenvolvimento do CB e, assim, verificar a importância de uma estrutura para com a outra. Com cultivo *in vitro* de túbulos seminíferos obteve-se o material de estudo. As culturas foram analisadas por três métodos: *Western blot* (WB), para avaliar a expressão das proteínas MVH, Fibrilarina, CLOCK (*circadian locomotor output cycles protein kaput*) e BMAL1 (*brain and muscle ARNT-Like 1*); Impregnação por nitrato de prata, para analisar nucléolos; e imunofluorescência (IF), para analisar a morfologia das estruturas estudadas e a intensidade de marcação das proteínas. Por WB foi observado que nos grupos controles a proteína MVH e fibrilarina mostraram relação, enquanto uma diminuía a outra aumentava. Nos grupos tratados com a droga BMH-21 ocorreu o bloqueio nucleolar e este bloqueio faz com que, independente da suplementação, a célula tenha um acúmulo de MVH e BMAL1, evidenciando uma relação entre o bloqueio nucleolar e corpo cromatóide. A redução da atividade nucleolar também afetou a fisiologia e a organização dos CBs, o que por sua vez, pode ter influenciado negativamente a capacidade reprodutiva das células germinativas dos grupos tratados com BMH-21. Estudos já comprovaram que os genes CLOCK e BMAL1 codificam proteínas que ao serem sintetizadas, se unem formando um heterodímero. Esse heterodímero ativa uma cascata de reações metabólicas e o funcionamento de outros genes necessários para a manutenção do ciclo virgília-sono. Uma vez que um desses genes não atue na produção como deveriam de suas proteínas, essa cascata de reação não ocorre gerando um desequilíbrio fisiológico e conseqüentemente outras alterações, incluindo no CB, sendo que já encontraram acúmulo de proteína desses dois genes nesta estrutura e que o bloqueio do gene BMAL1 ocasionou diversas alterações morfológicas.

Palavras-chave: Espermatogênese. Nucléolo Celular. Corpo cromatóide.

ABSTRACT

Spermatogenesis is the process in which a germ cell passes until it transforms into sperm. The chromatoid body (CB) is a typical structure of male germ cells located near the cell nucleus with the function of stocking RNA and proteins that will act on spermiogenesis. One of the main proteins present in CB is called MVH (Mouse Vasa Homologue), among others. In the nucleus there is a structure known as nucleolo its main function which is to synthesize RNAr and assemble ribosomes, fibrillin being a protein present in its dense fibrillar component and important for the nucleolo to play this role. CBs and nucleolo have crucial roles in spermatogenesis. In the present study, the activity of the nucleolo with the drug BMH-21 was blocked to observe the development of BC and, thus, to verify the importance of one structure to the other. With in vitro cultivation of seminiferous tubules, the study material was obtained. The cultures were analyzed by three methods: Western blot (WB), to evaluate the expression of proteins MVH, Fibrillar, CLOCK (circadian locomoter output cycles protein kaput) and BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1); Impregnation by silver nitrate, to analyze nucleola; and immunofluorescence (IF), to analyze the morphology of the structures studied and the intensity of protein marking. By WB it was observed that in the control groups the protein MVH and fibrillin showed relationship, while one decreased the other increased. In the groups treated with the drug BMH-21, nucleolar block occurred and this blockade causes, regardless of supplementation, the cell has an accumulation of VhM and BMAL1, evidencing a relationship between nucleolar block and chromatoid body. The reduction of nucleolar activity also affected the physiology and organization of BCs, which in turn may have negatively influenced the reproductive capacity of germ cells in groups treated with BMH-21. Studies have already proven that the CLOCK and BMAL1 genes encode proteins that, when synthesized, come together forming a heterodimer. This heterodimer activates a cascade of metabolic reactions and the functioning of other genes necessary for the maintenance of the virgilia-sleep cycle. Since one of these genes does not act in the production as they should of their proteins, this reaction cascade does not occur generating a physiological imbalance and consequently other alterations, including in the CB, and that they have already found accumulation of protein of these two genes in this structure and that the blockade of the BMAL1 gene caused several morphological changes.

Keywords: Spermatogenesis. Cell Nucleole. Chromatoid body.

1. INTRODUÇÃO

A reprodução humana se inicia a partir de um evento denominado fecundação, que é a união de dois gametas, um ovócito e um espermatozoide. Os órgãos reprodutores, masculinos e femininos, são responsáveis pela produção e pelo transporte das células germinativas das gônadas até o as tubas uterinas, onde ocorre a fecundação. Cada um desses gametas carrega metade das informações genéticas que vieram dos pais, que darão as futuras características ao indivíduo que irá se formar. Assim, essa nova célula, agora denominada de zigoto, irá se desenvolver para os futuros estágios embrionários. (MOORE et al., 2008).

A maturação das células sexuais, masculinas e femininas, é denominada gametogênese. Essas células altamente especializadas sofrem uma redução no número de cromossomos durante a meiose, ficando com metade do material genético necessário, ou seja, cada um possui 23 cromossomos, que ao se unirem na fecundação resultarão no total de 46 cromossomos. (MOORE et al., 2008). Tal processo de maturação, espermatogênese para os homens e ovogênese nas mulheres, ocorre de forma semelhante em ambos os sexos. (BRADY, 1973)

A espermatogênese é o processo de transformação onde as espermatogônias se transformam em espermatozoides. Iniciam-se no embrião, por conta da divisão celular mitótica, quando na diferenciação das células germinativas primitivas, algumas formam os túbulos seminíferos, enquanto outras formam as espermatogônias. (MOORE et al., 2008). Esses gametas masculinos primitivos irão crescer e se desenvolver nos túbulos seminíferos do embrião, ficando inativos após o nascimento até o período da puberdade. (MOORE et al., 2012).

Essa diferenciação do espermatozoide ocorre em três fases diferentes, sendo cada fase caracterizada pela presença de diferentes classes de células germinativas. (PERUQUETTI; ORCINI 2018). Em cada uma dessas três fases se identifica mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular. Na fase proliferativa, mitótica, as células troncos se dividem e dão origem a duas células filhas, sendo que uma delas terá o papel de renovar a população de células tronco e a outra provavelmente entrará no processo espermatogênico. As células que entram neste processo dão origem a espermatogônia intermediária (A), e esta por sua vez se dividirá e formará as espermatogônias B que passarão por mais uma divisão originando células que entrarão em uma longa fase meiótica (RUSSELL, 1980).

Na espermatogônia A existe uma elevação da síntese de RNA, seguindo em declínio até se tornarem espermatogônias B e espermatócitos na meiose. Ao final da espermiogênese não

há síntese de RNA, portanto os espermatozoides ejaculados também não sintetizam novos RNAs ou não o fazem em grande quantidade (KIERSZENBAUM; TRES, 1975; SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; KLEENE, 2001; GRUNEWALD *et al.*, 2005).

Durante o período fetal as espermatogônias permanecem adormecidas nos túbulos seminíferos dos testículos, tendo seu número aumentado durante a puberdade, sofrendo varias divisões mitóticas, fazendo com que essas células cresçam e se modifiquem. Nessa transformação as espermatogônias tornam-se espermatócitos primários, sendo as maiores células germinativas nos túbulos seminíferos, que irão sofrer a primeira divisão meiótica, formando dois espermatócitos secundários haploides, possuindo cerca de metade do tamanho do espermatócito primário. Logo após a primeira divisão meiótica, os espermatócitos secundários sofrem uma segunda divisão reducional, formando quatro espermátides haploides, com aproximadamente metade do tamanho dos espermatócitos secundários, que futuramente se transformarão em quatro espermatozoides maduros. Esse processo de amadurecimento leva cerca de dois meses para completar e é conhecido como espermiogênese, que quando completada, os espermatozoides entram na luz dos túbulos seminíferos, que é revestido pelas células de Sertoli dando suporte e nutrição para as células germinativas, até seu transporte passivo para o epidídimo, onde ficarão armazenados até seu amadurecimento funcional. O espermatozoide maduro é adaptado em suas funções de transporte e entrega de material genético paterno no processo de fecundação (JOHNSON *et al.*, 2011). É formado por uma cabeça, colo e a cauda (peça intermediária da cauda, bainha mitocondrial, peça principal da cauda, peça terminal da cauda), essa é a forma em que a célula se encontra ativamente móvel. (MOORE *et al.*, 2012).

Há muitos estudos relacionados com a espermatogênese, assim como a oogênese, pesquisas referentes às estruturas dessas células germinativas, com destaques em algumas relacionadas à biologia da reprodução, como o corpo cromatóide, sendo uma estrutura citoplasmática que reserva os RNAs que serão traduzidos em proteínas específicas que atuando na diferenciação dos espermatozoides, além do controle pós-transcricional em células germinativas haploides, direcionamento de mitocôndrias nas espermátides, auxílio na formação do acrossomo, da bainha mitocondrial e do flagelo do espermatozoide. (BORGUETI, 2013).

O corpo cromatóide tem sua origem durante a espermatogênese e a atividade transcricional dada pela persistência nucleolar na meiose, intensifica a formação desta estrutura (BORGUETI *et al.*, 2015).

O genoma das células germinativas é transcrito durante a espermatogênese para a produção de mRNAs. A regulação de RNA é mediada por grânulos de ribonucleoproteína (RNP), o que garante a qualidade e a expressão correta das transcrições necessária. Espermátides haploides são descritas por um único grânulo citoplasmático anormalmente grande, o *Chromatoid body* (corpo cromatóide), que surge durante a troca entre as fases meióticas e pós-meióticas da espermatogênese. (MEIKAR et al., 2014).

O *Chromatoid body* (CB) é um filamento fino e lobulado, localizado no citoplasma das células germinativas masculinas. (NAGAMORI et al., 2008). Ele surge em espermatócitos fracos e condensa-se em um único grânulo perinuclear grande (0,5 a 1 μm), realizando movimentos não aleatórios e contatos frequentes com o envelope nuclear e o sistema Golgi-acrossômico. (MEIKAR et al., 2014).

Sua composição é complexa, pois envolve a agregação de derivados nucleares, nucleolares e mitocondriais formados na primeira divisão meiótica, entre outros como proteínas altamente cruciais a esta estrutura como MVH (Mouse Vasa Homologue), por exemplo, e proteínas transientes, como CLOCK (*circadian locomoter output cycles protein kaput*) e BMAL1 (*brain and muscle ARNT-Like 1*), responsáveis pelo controle direto do ciclo circadiano e cujo bloqueio causa alterações morfológicas nos CBs (PARVINEN, 2005; KOTAJA 2006; PERUQUETTI et al., 2012). Está localizado taticamente próximo ao envoltório nuclear, sendo que uma de suas principais funções é estocar RNA e proteínas que atuarão na espermiogênese (PERUQUETTI et al., 2008, 2012). É considerado um coordenador subcelular de diferentes vias de processamento do RNA (PARVINEN, 2005; KOTAJA et al., 2006; KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007) e sua natureza macromolecular faz com que esta estrutura possa desempenhar outras funções como, por exemplo, controle pós transcricional em células germinativas haploides, destino de RNAm, direcionamento de mitocôndrias nas espermátides, auxílio na formação do acrossomo, da bainha mitocondrial e do flagelo do espermatozoide (PERUQUETTI et al., 2008, 2012). Durante a espermiogênese o nucléolo suspende a atividade transcricional e esta atividade é totalmente mediada pelo corpo cromatóide (BORGUETTI et al., 2015). O acúmulo de RNA mostra que o controle da tradução é feito por esta estrutura quando o núcleo está inativo (PARVINEN, 2005; KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007).

A biossíntese do corpo cromatóide não foi totalmente elucidada. Há indícios que o núcleo tenha uma grande participação no processo, porém suas funções e composições ainda estão em análises. Existem relatos que o material nucleolar se fragmente e uma fração desse material possa migrar para o citoplasma dos espermatócitos primários. Ao final da meiose

ocorre uma reorganização do nucléolo nas espermatídes, porém o material que migrou para o citoplasma poderia ter participado da formação do corpo cromatóide. Por conter muitas proteínas em seu interior há indicação de que o corpo cromatóide possua multiaplicabilidade (PERUQUETTI *et al.*, 2008, 2012; SILISTINO-SOUZA *et al.*, 2012).

Em resumo, acredita-se que em machos, o corpo cromatóide atue intrinsecamente na espermiogênese, como comunicador celular e formador do sistema acrossômico (ALEVI *et al.*, 2013), e sua maior contribuição é no metabolismo de RNAs. Uma grande parte do RNA produzido durante a meiose é reservado neste corpo durante a diferenciação, sendo chamado RNA de longa-vida, que será utilizado posteriormente no final da espermatogênese, quando o genoma desta célula estiver inativo. Além disso, o corpo cromatóide também pode armazenar proteínas pré-sintetizadas, para posterior modificação em estruturas próprias (PIRES, 2008).

A nucleologênese é o processo ativo durante o ciclo celular que consiste na formação do nucléolo, possuindo três domínios: os centros fibrilares (CFs) que são sítios de armazenamento de genes ribossômicos não transcritos; o componente fibrilar denso (CFD) atuando como sítio de transcrição desses genes e os componentes granulares (CGs) local de maturação e armazenamento de subunidades ribossômicas. Ainda há divergências na literatura sobre o local de transcrição sendo que alguns dizem ser nos CFs, no limite entre CFs e CFD ou somente CFD (FISCHER *et al.*, 1991; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; ZATSEPINA *et al.*, 1997).

O nucléolo é uma seção nuclear altamente ativa, com variadas funções e pronto para suprir as necessidades das células em diferentes status fisiológicos. Seu tamanho e complexidade variam de acordo com seu grau de atividade (MALATESTA *et al.*, 2011). Com sua localização bem demarcada no núcleo está vinculado em demarcar as funções nucleares desempenhando várias funções, sendo que a principal delas é atuar como local da síntese de RNAr e montagem de ribossomos, também exercendo funções no metabolismo celular. Entre suas características principais, se destaca o fato de que o nucléolo não é envolto por membrana e é altamente organizado. (HERNANDEZ-VERDUN, 1991; GERBI, 2003; MARTIN *et al.*, 2015).

A reorganização nucleolar após mitoses e meioses é essencial para a reativação da transcrição e tradução nas novas células (LEFÈVRE, 2008). Na gametogênese é essencial este ciclo, pois elimina danos causados por idade (ÜNAL *et al.*, 2011).

A estruturação do nucléolo interfásico está em regiões cromossômicas chamadas Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Essas RONs são locais do cromossomo com

genes que definem a transcrição de RNAr que são processados dentro do nucléolo. Existem várias cópias de genes RNAr em cada RON (SUMMER, 1990).

Estima-se que cerca de 270 proteínas nucleolares estão envolvidas na síntese e processamento do RNAr. Também se encontram no nucléolo outras proteínas com funções diferenciadas, como por exemplo: modificações de nucleotídeos de snRNPs (spliceossoma de ribonucleoproteínas), biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas, captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (PEDERSON, 2002). Outras proteínas que também são armazenadas no nucléolo são as proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular e as proteínas supressoras de tumor (ARF) (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000). DNAr e RNAr é o que compõe maioritariamente os três domínios (CF, CFD e CG) e outras proteínas também são encontradas entre eles: histonas, presente nos três domínios por estar ligada intimamente ao DNAr, proteínas ácidas, com localização variada e enzimas com diferentes localizações (THIRY; GOESSENS, 1996; MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004).

Há também a presença de micro-RNAs em compartimentos nucleolares, mas nem todos estão relacionados com a transcrição de RNAs, e sua presença sugere ligação com a fisiologia nucleolar e com a fisiologia do corpo cromatóide, já que o mesmo necessita das vias de micro-RNAs para funcionamento e composição molecular. Os RNAs não-codificadores expressos no citoplasma maduros de forma curta, com cerca de 21 a 22 nucleotídeos, são denominados micro-RNAs (miRNA). São espécies conservadas em cadeia única de RNA, formado por de cadeia simples, implicadas em uma ampla gama de processos fisiológicos e de desenvolvimento. (BAI *et al.*, 2014).

Uma das proteínas com funções enzimáticas mais bem descritas no nucléolo é a fibrilarina. A fibrilarina foi inicialmente observada em *Physarum polycephalum* e chamada de B36, com peso molecular de 34,0-38,0 kDa e se trata de uma proteína ácida. (CHRISTENSEN *et al.*, 1977).

A fibrilarina está localizada no componente fibrilar denso do nucléolo e é uma das proteínas ácidas com função enzimática mais descrita no nucléolo, estando ligadas a pequenos RNAs nucleolares (snoRNA), U3, U8 e U13 (NICOL *et al.*, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 1977; NICOL *et al.*, 2000).

Várias pesquisas indicam sua presença em plantas, ratos, insetos, vírus e em vários tipos celulares (NEWTON *et al.*, 2003; MAKIMOTO *et al.*, 2006; PERUQUETI *et al.*, 2008; SILISTINO-SOUZA *et al.*, 2012; MELÉN *et al.*, 2012).

Ela possui grande importância no desenvolvimento embrionário precoce e significância na atividade do nucléolo, visto que o pré-RNAr necessita dessa proteína para processamento, modificação e montagem bem como os ribossomos também necessitam desta proteína para sua montagem. (NEWTON et al., 2003; TOLLERVEY et al., 1993).

Estudos buscaram a associação entre a fibrilarina e o CB, sendo possível constatar nas espermátides iniciais as marcações de fibrilarina nucleolar fazendo contato através da membrana nuclear, com regiões conectadas ao corpo cromatóide, indicando atividades fisiológicas executadas pelo mesmo, no metabolismo dos RNAs armazenados (de PAULI et al., 2017).

Em estudo para verificação da formação do corpo cromatóide, anteriormente descritos, durante a espermatogênese, foi observado a existência de duas proteínas CLOCK e BMAL1, responsáveis pelo controle direto do ciclo circadiano, onde percebeu-se que quando a expressão da proteína BMAL1 era bloqueada o corpo cromatóide apresentava diversas alterações morfológicas. (PERUQUETTI et al., 2012).

O ciclo circadiano ou ritmo circadiano são ritmos biológicos caracterizados por ser dividido em duas partes, dia (claro) e noite (escuro), que variam em torno de vinte e quatro horas, acompanhando os organismos vivos desde os primórdios, fazendo com que fosse possível o desenvolvimento de ritmos diários intrínsecos em processos celulares, comportamentos e metabolismo. (BOTHWELL et al., 2018).

O equilíbrio e a conservação do organismo de elementos fisiológicos e metabólicos acontecem através de um mecanismo intracelular organizado, denominado relógio biológico, preparando o organismo conforme os estímulos ambientais fazendo com que flua a sincronização com o metabolismo corporal. (MOTA, 2010).

Os eventos fisiológicos acometidos pelo ritmo circadiano são controlados por diversos genes, como o *Clock*, *Bmal1*, *Timeless (tim)*, *Period (Per)*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Criptocromos (Cry)*, *Cry1*, *Cry2*, *casein quinase epsilon 1 (Ck 1E)*, *Dec1*, *Dec2*, *Rev-erb E*, sendo os genes *CLOCK (circadian locomotor output cycles protein kaput)* e *BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1)* responsáveis por codificarem proteínas, que quando sintetizadas, formarão um heterodímero que irá ativar uma cascata de reações metabólicas e o funcionamento de outros genes necessários para a manutenção do ciclo virgília-sono. (TUFIK et al., 2008).

Levando em consideração que o corpo cromatóide é uma estrutura fundamental para a progressão da espermatogênese e visando a busca de respostas sobre a infertilidade masculina, o presente trabalho analisa a interação do nucléolo e o corpo cromatóide que estão, aparentemente, ligadas fisiologicamente entre si, em suas funções e atividades. Desejando

assim entender o efeito do bloqueio do nucléolo nas células germinativas, suas consequências, tendo em vista chegar a resultados para futuras condutas solucionáveis para o problema.

Com isso, neste estudo foi bloqueada a atividade do nucléolo em fragmentos de túbulos seminíferos de camundongos, por meio de experimentos *in vitro*, para observar o desenvolvimento do corpo cromatóide sem a presença da atividade nucleolar e verificar a alteração das proteínas produzidas pelos genes que codificam CLOCK e BMAL1, comprovando assim a importância de uma estrutura para a atividade da outra.

2. DESENVOLVIMENTO

Foram utilizados 07 camundongos machos da linhagem *Swiss* com idades entre 10 a 120 dias. Os animais foram mantidos no biotério do Unisagrado, alocados em gaiolas de polietileno (43x30x15cm) com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C). Os animais receberam água e ração para roedores à vontade. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto possui autorização de execução, fornecida pela Comissão de Ética Em Pesquisa Animal (CEUA/USC) (Parecer n.º. 2088080817) (APÊNDICE 1).

2.1. Delineamento experimental

Para coleta de túbulos seminíferos os animais foram eutanasiados por injeção de anestésicos Cetamina + Xilazina, intraperitoneal, respectivamente nas dosagens 80-100mg/kg e 10mg/kg, seguido por exsanguinação. Os túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico foram coletados segundo Kotaja et al. (2004) e a cultura do tecido foi mantida segundo Gohbara et al. (2010). Fragmentos de túbulos seminíferos nos estágios de interesse do ciclo espermatogênico foram isolados utilizando-se um microscópio estereoscópio e foram colocados sobre blocos de agarose 1.5%, como dimensões de 22mm×22mm×1cm. O blocos foram alocados no interior de placas de cultura celular de 6 poços contendo o meio de cultivo. O meio de cultura consistiu de α -Minimum Essential Medium (α -MEM). Foi adicionado ao meio 10% (v/v) de *fetal bovine serum* (FBS) (Invitrogen; 12657-011) e 5% (v/v) Penicilina/Streptomicina (PS). Os blocos de agarose estavam embebidos no meio de cultivo por mais de 24h, para absorção da solução de cultivo pelo gel de agarose, antes de

receberem os fragmentos de túbulos seminíferos. Em cada pedaço de gel foi colocado 3 fragmentos de túbulos seminíferos no estágio do ciclo espermatogênico de interesse. O meio em cada poço da placa estava na borda de cada pedaço de gel e foi trocado no prazo de 7 dias. O incubador estava configurado para suplementar o ambiente com 5% de dióxido de carbono, 95% de oxigênio e a temperatura foi mantida a 37°C.

As culturas foram montadas com os túbulos seminíferos coletados desses 07 camundongos e tratadas de acordo com os 6 grupos experimentais (n=18 fragmentos túbulos seminíferos/grupo) especificados na Tabela 1, em experimentos realizados em triplicata.

Redução da suplementação do meio foi utilizada como um estressor celular para que a inibição da atividade da RNAPolII e, conseqüentemente, para que o bloqueio da atividade nucleolar seja facilitada por ocasião do tratamento com o composto BMH-21, visto que este é um composto com ação preferencial em células tumorais (PELTONEN et al., 2014; COLIS et al., 2014). Ao final de um período de 14 dias de tratamento foram coletados os materiais obtidos a partir do cultivo dos túbulos seminíferos e houve a preparação do material biológico para cada uma das análises propostas nos itens 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5, a seguir.

Tabela 1 – Grupos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS
Grupo 1 (G1): Controle negativo. Receberão veículo apenas (tampão Citrato) e suplementação normal do meio.
Grupo 2 (G2): Controle negativo. Receberão veículo apenas (tampão Citrato) e meio contendo redução de 3% de nutrientes.
Grupo 3 (G3): Controle negativo. Receberão veículo apenas (tampão Citrato) e meio contendo redução de 10% de nutrientes.
Grupo 4 (G4): 2µM BMH-21 em tampão Citrato em 2% DMSO. Suplementação normal do meio.
Grupo 5 (G5): 2M BMH-21 em tampão Citrato em 2% DMSO. Redução de 3% dos nutrientes do meio.
Grupo 6 (G6): 2µM BMH-21 em tampão Citrato em 2% DMSO. Redução de 10% dos nutrientes do meio

Fonte: elaborado pela autora.

2.2 Análise da expressão proteica de proteínas nucleolares (Fibrilarina) e de componentes do CB (MVH, CLOCK e BMAL1) – Western blot

Os fragmentos dos grupos experimentais, nos períodos de bloqueio e pós-bloqueio nucleolar, foram coletados e homogeneizados em 300µl de tampão RIPA com inibidores (NaF 1M, Cocktail inibidor de protease completo – Roche Diagnostics e PMSF 0.1M). Logo após, o homogeneizado foi centrifugado a 14000xg por 15 minutos a 4°C. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada por espectrofotometria pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000® (Thermo Scientific®). 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.

Na 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 Fibrillarín (F-6) antibody sc-166000 1:100; BMAL1 (H-170): sc-48790 1:200; CLOCK (H-276): sc-25361 1:200; e anti- α -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich) 1:15000 diluídos em BSA 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; mouse anti Rabbit IgG-HRP: sc-2357) diluídos em BSA 5% / PBST, por 1 hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas em PBST, secas e reveladas por meio de filmes fotográficos.

2.3. Quantificação relativa da expressão proteica de CLOCK e BMAL1

Após a revelação do *Western blot* foi realizada medidas dos 6 grupos de proteínas de cada dos genes CLOCK, BMAL1 e Tubulina. A análise foi feita com o auxílio do software ImageJ das formas fixas e variáveis. Essas medidas foram repetidas cinco vezes e anotadas todas as variações. Assim que todas as proteínas foram medidas foi feito a média dos valores, sendo comparados e gráficos foram traçados. Foi realizada análise estatística para verificar a variação da expressão de CLOCK e BMAL1 dentro de cada grupo experimental, utilizando-se o Test-t de Student. Análises estatísticas foram realizadas na plataforma R (RStudio Version 1.1.456 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

2.4. Análise por impregnação de íons de prata (AgNOR)

As lâminas foram colocadas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada e tratadas com uma gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1:100). Sobre essa gota foi acrescentado duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% e, posteriormente, coberta com uma lamínula. As lâminas foram incubadas em estufa a 60°C, por um período de aproximadamente 5-10 minutos, e retiradas da solução corante quando apresentaram coloração marrom-escuro. Após esse procedimento as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, todas as lâminas foram montadas em Permount Mounting Medium e recoberta em seguida com lamínula para serem analisadas ao fotomicroscópio (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC), com câmera acoplada (QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV) as imagens foram obtidas com auxílio de um software, Image-Pro®Plus, versão 5.1.2, para Windows XP.

2.5 Imunofluorescência

Para a preparação das lâminas que foram utilizadas na imunofluorescência pegou-se o bloco de agarose e foi realizado decalque com arraste, formando um esfregaço com o bloco, estas lâminas foram submersas em etanol 90% por 5 minutos para fixação do material na lâmina, aguardou-se a secagem destas lâminas e as mesmas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

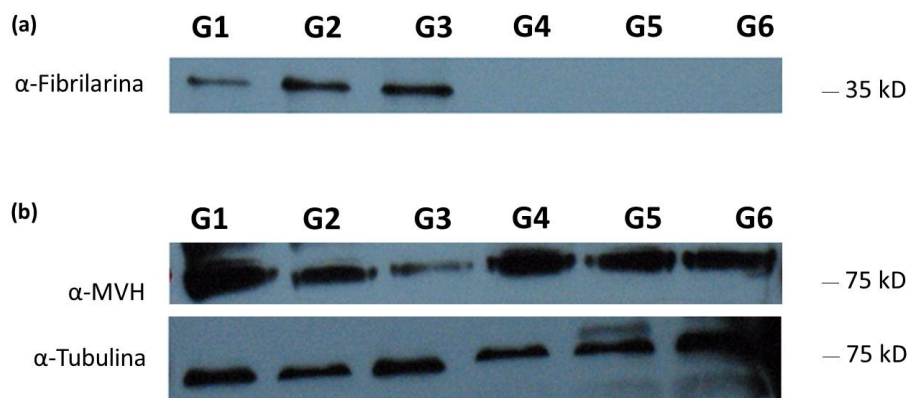
As lâminas fixadas foram imersas em 4%PFA/PBS, em gelo, por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em PBS e, posteriormente, imersas em 0.2% Triton X100/PBS, à temperatura ambiente, por 5 minutos. O bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com 5%BSA/PBS, por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente ao bloqueio, as lâminas serão incubadas overnight, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Anti Fibrillarin [38F3] antibody ab4566; Anti-DDX4/MVH (MABCAM27591). Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBST e, o anticorpo secundário de interesse, conjugado com agentes fluorescentes, Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG (H + L) secondary antibody (A-11017, LifeTechnology, Sao Paulo, Brazil), foi diluído 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 (sc-24941 Santa Cruz Biotechnology, Inc.), e analisadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC) anexado a uma câmara (QIMAGING Micropublisher 3.3 RTV), as imagens foram obtidas com auxílio de um software, Image-Pro®Plus, versão 5.1.2, para Windows XP.

2.6. Resultados e Discussão

Foi realizado o bloqueio nucleolar para visualização da formação do corpo cromatóide, a técnica *Western blot* foi utilizada para verificar se a droga BMH – 21 foi efetiva para tal ação. A proteína Fibrilarina presente no componente fibrilar denso (NICOL *et al.*, 2000), foi o marcador utilizado para observar a presença de proteínas do nucléolo e constatar o bloqueio nucleolar nos grupos tratados BSN, BS-3, BS-10. Com esta técnica também se verificou a expressão de outras três proteínas, MVH (Figuras 1 a e b), CLOCK e BMAL1 (Figuras 2 a e b), que se acumulam no corpo cromatóide com funções importantes na fisiologia do mesmo e observar se o bloqueio nucleolar poderia afetar estas proteínas.

Figura 1: Imunoblot para verificação das proteínas de interesse em cada grupo experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

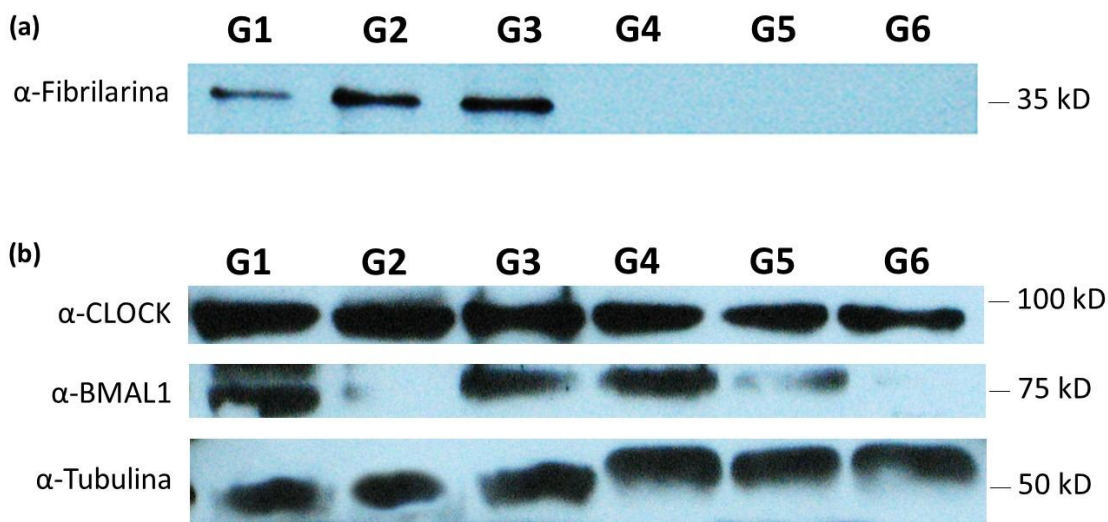
Em condições normais a proteína MVH associada ao processo de espermatogênese se apresenta em quantidade considerável (PERUQUETTI *et al.* 2012) e conforme a suplementação foi sendo reduzida sua presença. Já com a proteína fibrilarina que está associada à atividade nucleolar ocorre o contrário, sua presença é baixa e conforme há redução do meio suas quantidades se elevam. Isso indica que a célula diminuiu a divisão celular e permitindo maiores quantidades de nucléolos ativos. Com a adição da droga BMH-21 no meio de cultura ocorre o bloqueio nucleolar, fazendo com que, independente da

suplementação, a célula tenha um acúmulo de MVH não necessariamente relacionado à eficiência espermatogênica da célula.

Foi verificado também se o bloqueio nucleolar afetaria as proteínas CLOCK e BMAL1, que também fazem parte da fisiologia do corpo cromatóide (Figura 2 b). Essas proteínas responsáveis pelo ciclo circadiano, CLOCK e BMAL1, quando sintetizadas formam um heterodímero que irá ativar uma cascata de reações metabólicas e o funcionamento de outros genes necessários para a manutenção do ciclo virgília-sono, sendo, portanto, proteínas chaves para o controle circadiano. (TUFIK et al, 2008). Essas proteínas tornaram-se alvo deste estudo uma vez que também foram associadas à formação do *chromatoid body* (PERUQUETTI et al., 2012), assim como a proteína nucleolar fibrilarina, que foi bloqueada experimentalmente neste estudo (de PAULI et al., 2017). Já a tubulina foi usada como controle da reação (*Western blot*).

Na revelação do *Western blot* foi possível observar que a expressão de CLOCK foi sempre maior do que a expressão de BMAL1 em todos os grupos experimentais, porém nos grupos G2, G5 e G6 essa diferença era mais evidente (Figura 2b). Essa mudança pode indicar que o estresse celular causado pela falta de suplementação alimentar, juntamente com a adição da droga, afetou o balanço proteico sugerindo danos ao ciclo circadiano celular e, possivelmente, à formação do *chromatoid body*.

Figura 2: Imunoblot para verificação das proteínas de interesse em cada grupo experimental.

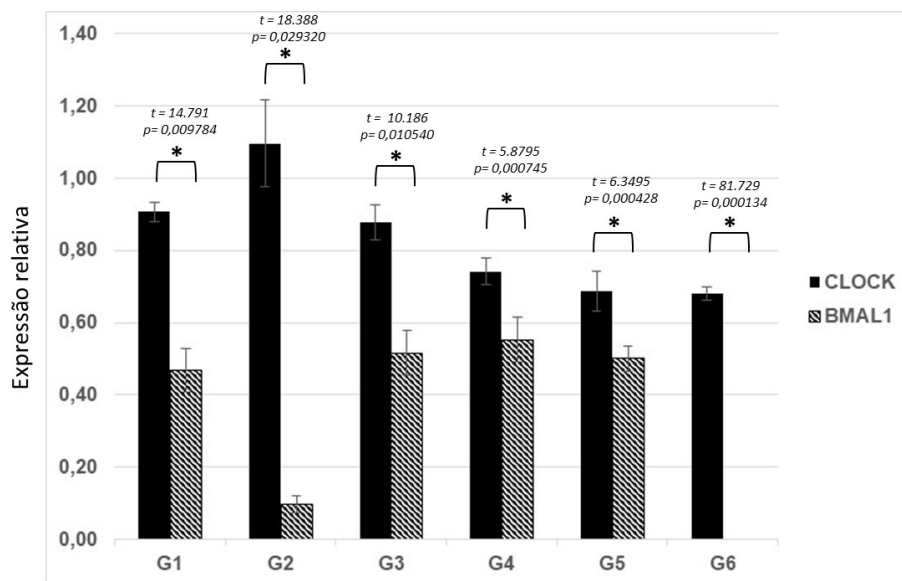


Fonte: Elaborado pela autora.

Após a revelação do *Western blot*, foi feita a quantificação das amostras dos 6 grupos dos genes CLOCK e BMAL1 e analisados os resultados da intensidade da densidade/área de expressão, comparando seus valores, como é possível observar na Figura 3.

A comparação dos resultados não foi feita de um grupo para outro, mas sim a diferença nas proporções das proteínas de cada proteína dentro de um mesmo grupo. Ao analisar o gráfico com os resultados obtidos em cada um dos 6 grupos, aparentemente, observou-se uma constante na proporção das proteínas dos genes CLOCK e BMAL1 em todos os grupos, sendo que em todos houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de CLOCK e BMAL1, com a proteína CLOCK sendo relativamente mais expressa do que BMAL1. Uma vez que as proteínas desses genes devem atuar em conjunto, a alteração entre elas pode ser um indicativo para algum desequilíbrio fisiológico entre os grupos. Essa diferença de expressão faz parte da fisiologia natural da ocorrência dos eventos circadianos, uma vez que para que para controle dos genes sob comando da formação do heterodímero CLOCK e BMAL1 é necessária a degradação proteolítica destas proteínas e BMAL1 pode estar sendo o primeiro alvo desta degradação, apresentando-se em menor quantidade em todos os grupos (MOTA, 2010).

Figura 3: Representação da expressão relativa das proteínas CLOCK e BMAL1, obtida por *Western blot*, em cada grupo experimental. Esta expressão relativa foi calculada baseando-se na razão da expressão obtida entre as proteínas de interesse pela expressão relativa da proteína utilizada como controle do experimento (Tubulina). (*) Indica diferença estatística entre as expressões de cada proteína de interesse dentro do grupo experimental.



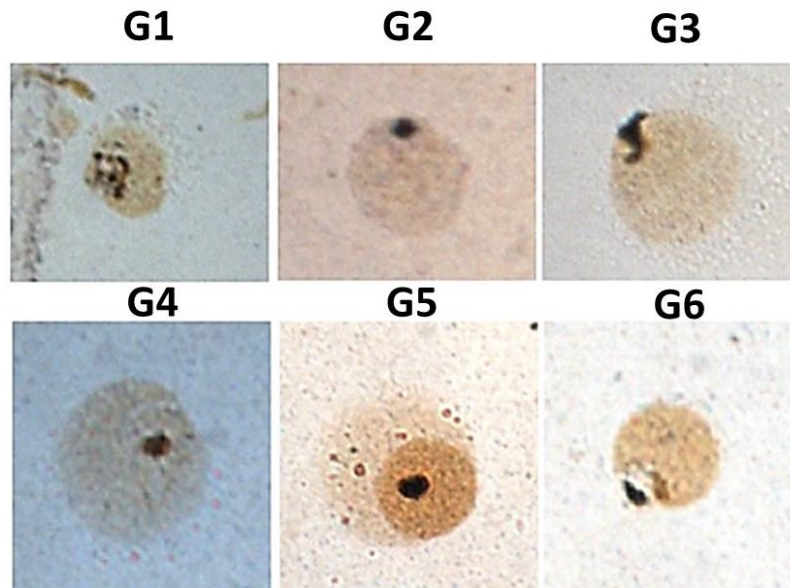
Fonte: Elaborada pela autora.

Houve uma desproporção desta diferença no grupo G3 (grupo com atividade nucleolar e redução da suplementação nutricional do meio em 3%) e nos grupos G5 e G6 (grupos sem atividade nucleolar e com redução de suplementação nutricional do meio em, respectivamente, 3 e 10%) (Figuras 1b e 2). Essa redução da expressão de BMAL1 não foi consistente nos grupos onde a atividade nucleolar não foi interrompida/reduzida. Porém, nos grupos onde a alteração da atividade nucleolar foi aliada à estresse da redução nutricional a expressão de BMAL1 atingiu níveis muito baixos, estando completamente ausente no grupo G6 (sem atividade nucleolar e com 10% de redução nutricional de meio) (Figuras 1b e 2). Estes resultados indicam que a atividade nucleolar pode estar relacionada à manutenção da atividade circadiana e, também, à formação do corpo cromatóide, uma vez que a proteína BMAL1, que foi afetada por esta condição experimental, é parte integrante destes dois eventos fisiológicos citados.

Dado que o bloqueio nucleolar funcionou e o corpo cromatóide foi afetado, outras técnicas foram utilizadas para verificar qualitativamente os danos causados na morfologia do nucléolo e do corpo cromatóide, como impregnação por prata e imunofluorescência.

Como citado anteriormente na revisão bibliográfica as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) são regiões cromossômicas que estão ativas na transcrição de RNAr dentro do nucléolo, desta forma o número de nucléolos aparentes está intimamente ligado ao número de RONs ativas nas células, assim como seu tamanho e seu formato, pois quanto mais RONs ativas próximas, maior o tamanho e o delineamento do formato do nucléolo, outra característica importante é o local em que o nucléolo se posiciona, por ser uma organela responsável por enviar RNAr para o restante da célula sua posição é de extrema importância para sua função, quanto mais próximo à margem mais facilitado é o transporte de seu material (PERUQUETTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 2013). Abaixo na figura 4 podemos observar o nucléolo nas espermatídes iniciais.

Figura 4: Espermátides iniciais coradas com nitrato de prata (AgNOR).

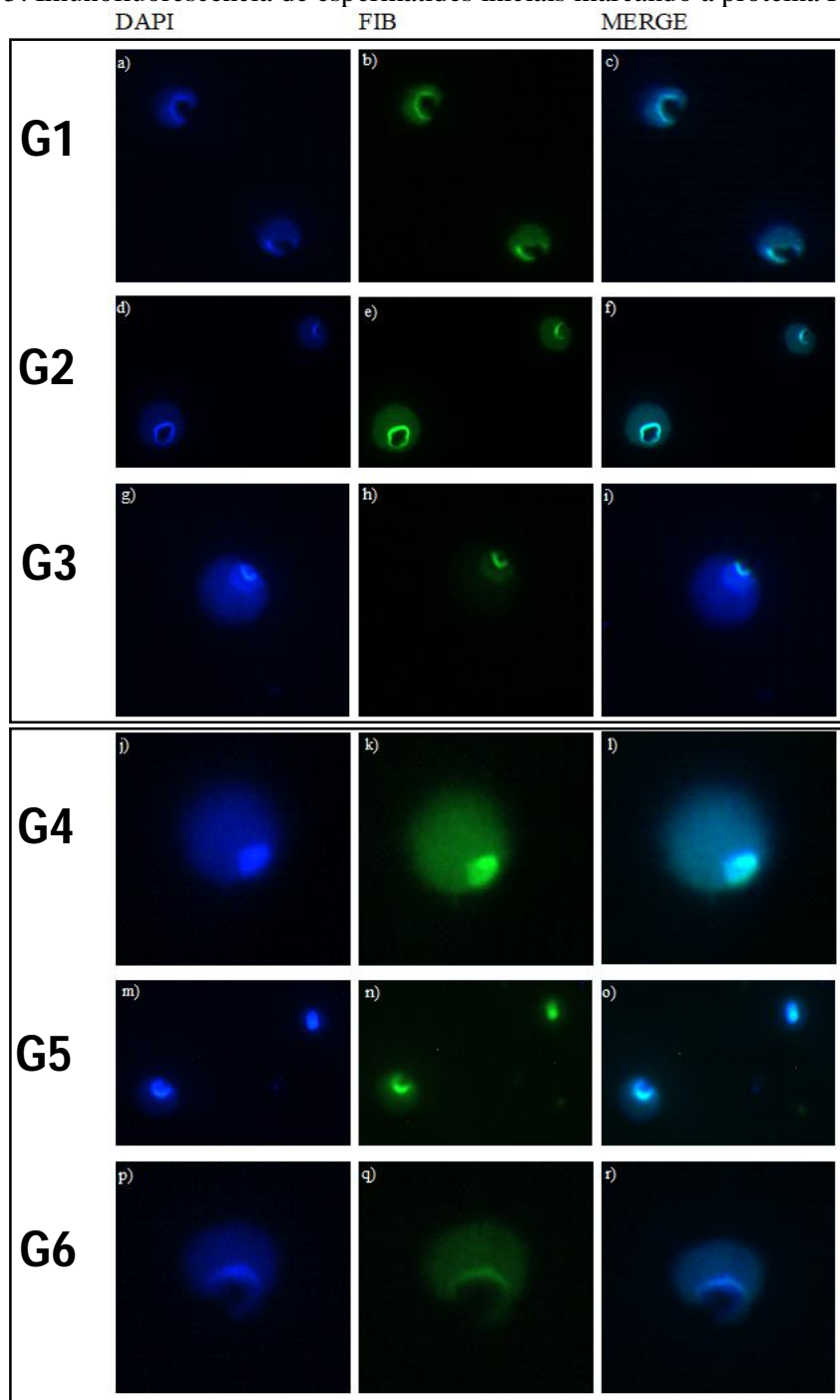


Fonte: Elaborado pela autora

Pode-se observar que em meio controle com suplementação normal há vários nucléolos e com pouca proximidade da borda, enquanto em meio controle com suplementação deficiente como o G2 e o G3 o nucléolo se mostra mais condensado e próximo à borda do núcleo celular, outra observação importante é que em baixíssima suplementação como G3 há deformação da estrutura, indicando que houve um estresse celular, fazendo com que a célula se modifique para melhor realizar suas funções. No meio acrescido da droga BMH-21, mesmo com suplementação normal (G4) já se nota um nucléolo condensado evidenciando estresse celular, porém a célula ainda consegue manter a posição nucleolar mostrada no G1, o mesmo ocorre com o meio G5, já no meio G6 o nucléolo se apresenta extremamente na periferia e alongado evidenciando um estresse celular extremo a célula.

A fibrilarina como descrito na introdução é uma proteína associada com os RNAs nucleolares e compõe o componente fibrilar denso do nucléolo, por isto sua presença indica a localização do nucléolo, na figura 5 se observa o comportamento da fibrilarina nos grupos testes.

Figura 5: Imunofluorescência de espermatídeos iniciais marcando a proteína Fibrilarina.



Fonte: Elaborada pela autora

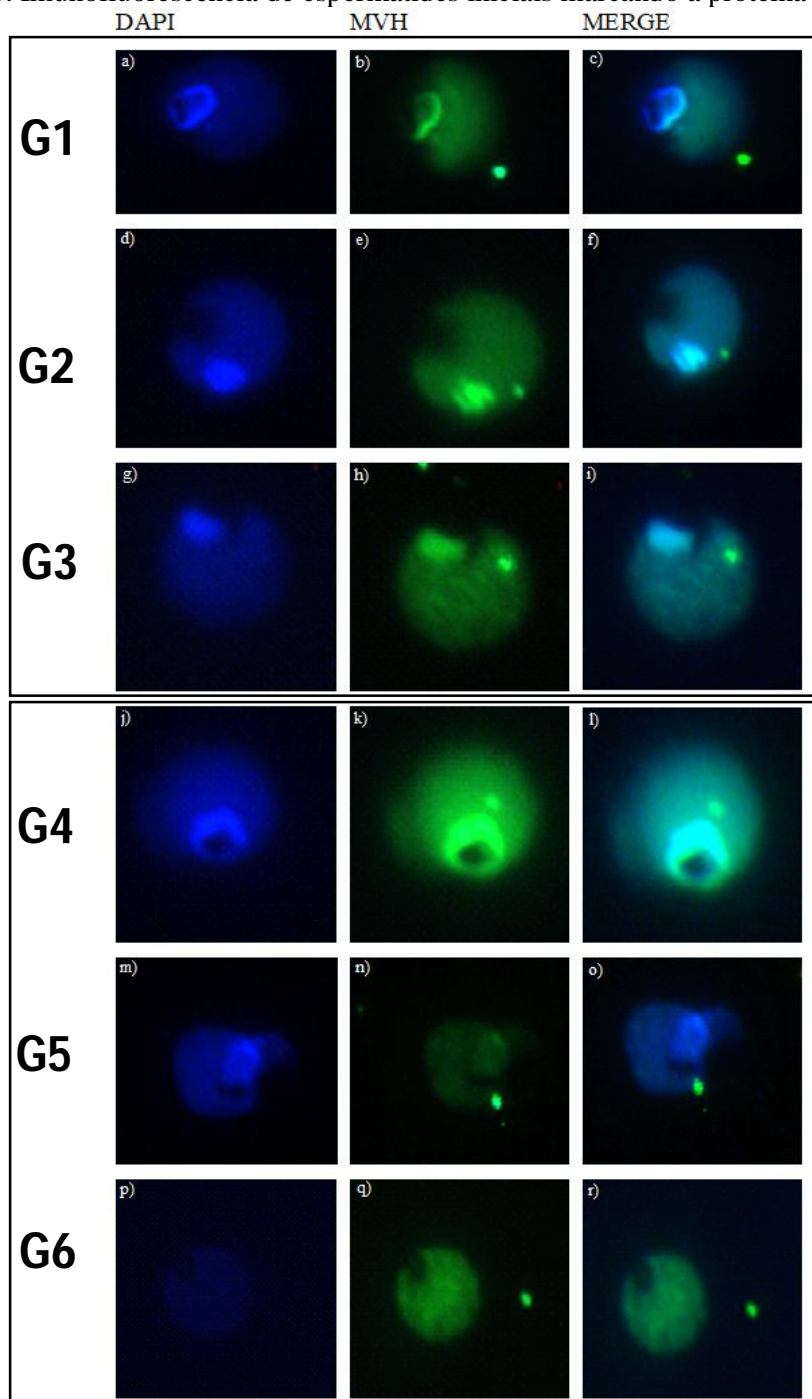
Na imunofluorescência a marcação da fibrilarina evidencia sua localização envolta do nucléolo em condições normais (G1), formando um meio círculo, assim como na técnica de impregnação por íons prata, reafirmando seu formato adequado. No meio controle com menos 3% de suplementação (G2) observa-se a formação de um círculo total e a marginalização do

mesmo, mostrando que já houve um estresse celular, já no meio com menos 10% da suplementação (G3) o estresse celular é nítido, pois se observa a condensação do material e que se encontra extremamente periférico na célula.

No grupo tratado com a droga BMH-21 nota-se um estresse celular desde o grupo com meio totalmente suplementado até o grupo com maior redução da suplementação, assim como no G3 a proteína do G4 se encontra marginalizada e condensada, no grupo G5 a proteína ainda se apresenta condensada, porém ela tenta com dificuldade formar o semicírculo que seria o adequado, já no grupo G6 por mais que a proteína esteja marcada, sua marcação é fraca e periférica, mostrando que o estresse celular foi tão grande que afetou a formação do componente fibrilar denso, porém não houve bloqueio da proteína fibrilarina por parte da droga.

O corpo cromatóide está localizado taticamente próximo ao núcleo e sua função é estocar RNA e proteínas que atuarão na diferenciação celular após a meiose, na figura 6 a seguir pode-se analisar o comportamento desta organela.

Figura 6: Imunofluorescência de espermatídes iniciais marcando a proteína MVH.



Fonte: Elaborada pela autora

No grupo G1 observa-se a estrutura do corpo cromatíde como descrita na literatura, próxima ao núcleo, enquanto nos grupos G2, G3 e G4 a organela se encontra dentro do núcleo evidenciando um comportamento não natural, sua aproximação com as regiões de heterocromatina apontam uma troca de material, já no grupo G5 esta estrutura tenta se afastar,

porém ainda continua próxima a heterocromatina, por último no grupo G6 a organela se mostra longe até mesmo do núcleo caracterizando alguma alteração, pois também se observa a falta de heterocromatina delineada.

O corpo cromatóide tem a habilidade em se mover ativamente para todas as direções no citoplasma em espermatídes redondas, durante esses movimentos o CB faz contato frequentes com o núcleo celular, com a heterocromatina através de poros nucleolares (PARVINEN 2005). O corpo cromatóide funciona como um reservatório para componentes do miRNA centralizando o controle pós-transcricional das células germinativas masculinas haploides (KOTAJA 2006).

3. CONCLUSÃO

Concluindo que a droga BMH-21 foi efetiva para o bloqueio do nucléolo, pois reduziu o volume de Fibrilarina e afetou a organização nucleolar nas células tratadas. Esta redução da atividade nucleolar também afetou a fisiologia e a organização dos CBs, o que por sua vez, pode ter influenciado negativamente a capacidade reprodutiva das células germinativas dos grupos tratados com BMH-21. Esta evidência entre a associação da fisiologia nucleolar e do CB regulando a fertilidade pode indicar o nucléolo como um futuro alvo terapêutico para tratamento de certos casos de infertilidade. Além disso, estudos já comprovaram que os genes CLOCK e BMAL1 codificam proteínas que ao serem sintetizadas, se unem formando um heterodímero. Esse heterodímero ativa uma cascata de reações metabólicas e o funcionamento de outros genes necessários para a manutenção do ciclo virgília-sono. Uma vez que um desses genes não atue na produção como deveriam de suas proteínas, essa cascata de reação não ocorre gerando um desequilíbrio fisiológico e conseqüentemente outras alterações, incluindo no corpo cromatóide, sendo que já encontraram acúmulo de proteína desses dois genes nesta estrutura e que o bloqueio do gene BMAL1 ocasionou diversas alterações morfológicas.

Agradecimento

Agradeço a Dr^a Rita Luiza Peruquetti pelas orientações, oportunidades, confiança e experiências únicas cultivadas; ao Centro Universitário Sagrado Coração; ao Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética, em especial ao amigo Wilson que tanto me ensinou e me deu suporte para chegar até aqui; aos órgãos de fomento; aos velhos amigos que acompanharam cada dificuldade enfrentada e conquistas comemoradas; aos novos amigos que o Unisagrado me trouxe e tenho tanto carinho; aos meus mestres e familiares.

REFERÊNCIAS

- ALEVI, K. C. C.; CASTRO, N. F. da C.; OLIVEIRA, M. T. V. de A. **Presence of Cytoplasmic Organelle Chromatoid body in Class Insecta.** Entomology, Ornithology & Herpetology. São José do Rio Preto, SP, v. 2, n. 2, 2013.
- 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, Baltimore, USA, v.4, p. 441-449, abr. 2014.
- BORGUETI, A.O., ALEVI, K.C.C., SILISTINO-SOUZA, R., ROSA, J.A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. **Immunofluorescence and ultrastructural analysis of the chromatoid body during spermatogenesis of Triatoma platensis and T. rubrovaria (Hemiptera, Triatominae),** Micron, v. 74, p. 44-46, 2015.
- BORGUETI, Adauto de Oliveira. **Estudo citogenético e imunocitoquímico em Triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae).** 2013. 78 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013.
- BOTHWELL, M.Y; GILLETTE, M.U., **Circadian redox rhythms in the regulation of neuronal excitability.** Free Radical Biology and Medicine. 2017.
- BRADY, R.J. **Reprodução na Espécie Humana.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1973.
- CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS, I. **To be or not to be in the nucleolus.** Nature Cell Biology, v. 2, p.107-112, jun. 2000.
- CASSEB-HASSAN, P. M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. **Estrutura Nucleolar e Impregnação por Íons Prata.** HB Científica, v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999
- CHRISTENSEN, M.E., BEYER, A.L., WALKER, B., LESTROURGEON, W.M. **Identification of NG, NG-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower**

eukaryote Physarum polycephalum homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 74, n. 2, p. 621–629, 1977.

COLIS, L. *et al.* **DNA intercalator BMH-21 inhibits RNA polymerase I independent of DNA damage response.** Oncotarget. v. 5, p. 4361-4369, 2014.

DE PAULI, L.F., SANTOS, E.G., DAHER, F.P.D., ORCINI, W.A., PERUQUETTI, R.L., 2017. **Differential expression of the nucleolar protein fibrillarin during mammalian spermatogenesis and its probable association with chromatoid body components.** Micron. 94, 37-45.

FISCHER, D.; WEISENBERGER, D.; SCHEER, U. **Assigning functions to nucleolar structures.** Chromosoma Focus. Wfirzburg, U.sheerv. v. 101, n. 3, p. 133-140, 1991.

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.

GOHBARA, A. *et al.* **In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system.** Biol. Rep. v. 83, p. 261-267, 2010

GRUNEWALD, S. *et al.* **Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA.** Andrologia, v.37, p.69-71, 2005.

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

JOHNSON, G. D. *et al.* **The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix.** Reproduction, Detroit, USA, v.141, p.21-36, 2011.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.** J Cell Biol v.65, p.258-270, 1975.

KLEENE, K. C. **A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells.** *Mech Dev*, v.106, p.3-23, 2001.

KOTAJA, N. *et al.* **Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis.** *Nat. Meth*, v. 1, p. 249-254, 2004.

KOTAJA, N. *et al.* **The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components.** *The National Academy of Sciences of the USA, New York*, v. 103, n. 8, p. 2647-2652, fev. 2006.

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, jan. 2007.

LEFÈVRE, B. **The nucleolus of the maternal gamete is essential for life.** *BioEssays*, Fontenay-aux-Roses, v. 30, n. 7, p. 613-616, 2008.

MAKIMOTO, Y. *et al.* **Molecular cloning and gene expression of a fibrillarlin homolog of tobacco BY-2 cells.** *Protoplasma*, Matsuyama, v. 229, p. 53-62, 2006.

MALATESTA, M.; ZANCANARO, C.; BIGGIOGERA, M. **Immunoelectron microscopic characterization of nucleolus-associated domains during hibernation.** *Microscopy Research and Technique*, Verona, v. 74, n. 1, p. 47-53, 2011.

MARTIN, R. M. *et al.* **Principles of protein targeting to the nucleolus.** *Nucleus*, v.6:4, p. 314-325, 2015.

MEIKAR, O.; ROS, M.; WASIK, K.A.; TOPPARI, J.; HANNON, G.J.; KOTAJA, N. **An atlas of chromatoid body components.** *RNA*. 20, 1-3. 2014.

MELÉN, K. *et al.* **Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2 /NoLS to nucleolin and fibrillarlin.** *Virology Journal Helsinki*, v. 9, p.167, 2012.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**.7º ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 365 p.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N.; TOCHIA, M.G. **Embriologia Clínica**.9º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MORIELLE, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. **Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera)**. *Caryologia*, São José do Rio Preto, SP, 57:1 p.31-37, 2004.

MOTA, D.P.N. **Importância dos ciclos circadianos na nutrição e metabolismo**. 2010. p.1-2.

NAGAMORI, I.; SASSONE-CORSI, P. **The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway**. *Cell Cycle*. 2008 Nov 15;7(22):3503-8.

NEWTON, K., PETFALSKI, E., TOLLERVEY, D., CÁCERES, J.F. **Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse**. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n 23, p.8519-8527 Dez. 2003.

NICOL, S. M.; CAUSEVIC, M.; PRESCOTT, A. R.; FULLER-PACE, F. V. **The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase**. *Experimental Cell Research*, Dundae, v. 257, n. 2, p. 272-280, 2000.

PARVINEN M. **The chromatoid body in spermatogenesis**. *International journal of andrology*,Turku, v.28, p.189-201, 2005.

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

PELTONEN, K. *et al.* **A Targeting Modality for Destruction of RNA Polymerase I that Possesses Anticancer Activity**. *Cancer Cell* v. 25, p. 77–90, 2014.

PERUQUETTI, R. L. *et al.* **Meiotic nucleolar cycle and chromatoid bodies formation during the rat (*Ratus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis.** *Micron*, v.39, p. 419-425, 2008.

PERUQUETTI, R. L.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. **Chromatoid Body Assembling and Nucleolar Cycle: Two Important Physiological Events for the Spermatogenesis in Vertebrates.** *Recent Advances in Germ Cells Research*. 1 ed. New York - NY : Nova Science Publishers, 2013, p. 133-148.

PERUQUETTI, R. L.; DE MATEO, S., SASSONE-CORSI, P. **Circadian Proteins CLOCK and BMAL1 in the Chromatoid Body, a RNA Processing Granule of Male Germ Cells.** *PLoS ONE*, California, v. 7, ago 2012.

PERUQUETTI, R.L.; ORCINI, W.A. **Spermatogenesis.** *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, Springer International Publishing AG, Cham, SZ. 2018.

PIRES, W. L. **Estudo Citogenético Comparativo entre *T. maculata* e *T.pseudomaculata* (Heteroptera: Triatominae)** São José do Rio Preto, 68 f, 2008.

RUSSEL, L.D. **Sertoli-germ cell interrelations: a review.** *Gamete Research*, Carbondale, v. 3, p. 179-202, 1980.

SILISTINO-SOUZA, R. *et al.* **Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae).** *Micron*, v. 43, p.954-60, 2012.

SÖDERSTRÖM, K. O.; PARVINEN, M. **RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.5, p.181-199, 1976.

SUMMER, A. T. **Chromosome banding.** *Unwin Human London*, p.187-190, 1990.

THIRY, M.; GOESSENS, G. **The nucleolus during the cell cycle.** *Springer*, p.13-36, 1996.

TOLLERVEY, D.; LEHTONEN, H.; JANSEN, R.; KERN, H.; HURT, E. **Temperature sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in prerRNA processing, pre-rRna methylation, and ribosome assembly.** Cell. Germany, v. 72, p. 443–457, fev. 1993.

TUFIK, S., **Medicina e biologia do sono.** 1 ed. Barueri: Manoele Ltda, 2008. 483 p.

ÜNAL, E.; KINDE, B.; AMON, A. **Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast.** Science, Cambridge, v. 332, n. 6037, p. 1554-1557, jun. 2011.

ZATSEPINA, O. V. *et al.* **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. 418-430, 1997.

APÊNDICE 1



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desvendando o papel de proteínas transitórias na composição molecular de Chromatoid Bodies de mamíferos: Fibrilarina (proteína nucleolar) e CLOCK/BMAL1 (controle do ciclo circadiano).", protocolada sob o CEUA nº 2088080817, sob a responsabilidade de **Rita Luiza Peruquetti** - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) na reunião de 10/10/2017.

We certify that the proposal "Decifring the role of transient proteins in the chromatoid bodies molecular composition: Fibrillarln (nucleolar component) and CLOCK/BMAL1 (circadian proteins).", utilizing 65 Heterogenics mice (65 males), protocol number CEUA 2088080817, under the responsibility of **Rita Luiza Peruquetti** - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 10/10/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2018](#) a [06/2018](#)

Área: [Pró-Reitora de Pesquisa E Pós-Graduação](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [30 a 180 dias](#)

N: [65](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 40 g](#)

Resumo: 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: a proteína nucleolar fibrilarina (rRNA 2'-O-methyltransferase), e a proteínas CLOCK (circadian locomoter output cycles protein kaput) e BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1) componentes moleculares do controle circadiano. O nucléolo é um subcompartimento do núcleo que possui a função principal de realizar a biogênese de ribossomos e estudos vêm demonstrando que o ciclo nucleolar durante a gametogênese contribui para o reestabelecimento da morfologia nucleolar durante a gametogênese, sendo um fator importante para remoção dos danos celulares induzidos pelo envelhecimento. Dessa maneira, o CB poderia estar participando desse ciclo nucleolar abrigando algumas proteínas que estariam sendo reorganizadas neste ciclo. Além disso, a identificação das proteínas CLOCK e BMAL1 na composição molecular de CBs; o 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 duas hipóteses iniciais por meio da realização de experimentos que nos permitam evidenciar se a atividade nucleolar influencia na organização de CBs pós-meióticos e; 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.

Local do experimento: [Biotério Central/USC](#) e [Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética \(LBMC/USC\)](#).

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

Prof. Dra. Andréia Silva
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração