

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**LARISSA FIAMENGUI DE PAULI**

**DESCRIÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
NUCLEOLAR FIBRILARINA EM TÚBULOS  
SEMINÍFEROS DE CAMUNDONGOS MACHOS (*Mus  
musculus*) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE  
DESENVOLVIMENTO E SUAS INTERAÇÕES FÍSICAS  
COM COMPONENTES MOLECULARES DE  
*CHROMATOID BODIES***

BAURU

2015

**LARISSA FIAMENGUI DE PAULI**

**DESCRIÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
NUCLEOLAR FIBRILARINA EM TÚBULOS  
SEMINÍFEROS DE CAMUNDONGOS MACHOS (*Mus  
musculus*) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE  
DESENVOLVIMENTO E SUAS INTERAÇÕES FÍSICAS  
COM COMPONENTES MOLECULARES DE  
*CHROMATOID BODIES***

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

BAURU

2015

P327d

Pauli, Larissa Fiamengui de

Descrição da expressão da proteína nucleolar fibrilarina em túbulos seminíferos de camundongos machos (*Mus musculus*) em diferentes estágios de desenvolvimento e suas interações físicas com componentes moleculares de chromatoid bodies / Larissa Fiamengui de Pauli. -- 2015. 44f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Chromatoid body. 2. Nucléolo. 3. Fibrilarina. 4. Espermatogênese. 5. Fertilidade. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.

**LARISSA FIAMENGUI DE PAULI**

**DESCRIÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NUCLEOLAR  
FIBRILARINA EM TÚBULOS SEMINÍFEROS DE  
CAMUNDONGOS MACHOS (*Mus musculus*) EM DIFERENTES  
ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO E SUAS INTERAÇÕES  
FÍSICAS COM COMPONENTES MOLECULARES DE  
*CHROMATOID BODIES***

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

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Marina Trevizan Guerra  
UNESP/Botucatu

Bauru, 09 de dezembro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela paciência e saúde que me deste durante todo este ano para concluir a graduação.

Ao corpo docente desta Universidade, que muito contribuiu, passando os seus ensinamentos e experiências de trabalho e vida para a minha formação.

À minha orientadora, Prof. Dra. Rita Luiza Peruquetti, por ter me aceitado como sua orientada, pelos seus ensinamentos e experiências vividas, conseguindo me fazer compreender a importância do aluno participar ativamente de um projeto, trabalhando diretamente na bancada do laboratório, e também por toda a paciência e carinho, fazendo com que chegássemos ao final do projeto com sucesso.

À minha família, destacando, principalmente, meus pais, pelo apoio emocional e também financeiro, que conseguiram transmitir valores de suma importância para o meu crescimento durante todos esses anos. Sem eles nada disso teria acontecido.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC, por proporcionar que meu trabalho fosse desenvolvido, e também à equipe de colaboração deste trabalho, Wilson Aparecido Orcini, Fernanda Pazotti Daher Arcangelo, Renata Pereira de Amorim, Gabrielly Rodrigues Sarria, Elisa Gomes Santos, Taís Gonçalves Berbel e Isabela Pazotti Daher.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do presente trabalho sob a forma de bolsa de Iniciação Científica (Processo FAPESP nº 2013/14102-0).

Ao Prof. Dr. Fábio Foresti, do Departamento de Ciências Biológicas (UNESP/FC – Bauru/SP), pelo uso do Microscópio de Fluorescência.

Ao Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (UNESP/FC – Bauru/SP), pelo empréstimo das membranas de nitrocelulose para a parte inicial dos experimentos.

## RESUMO

O corpo cromatóide (CB) é uma estrutura citoplasmática de células germinativas masculinas que tem sido descrito como tendo um papel no armazenamento de RNA e de proteína para a diferenciação final dos espermatozoides. Estudos recentes indicam que alguns destes componentes citoplasmáticos de complexos macromoleculares têm origem nucleolar, tais como a proteína nucleolar Fibrilarina (B36), que tem uma função no componente fibrilar denso (CFD nucleolar) e controlar o metabolismo do RNAr. Os objetivos do presente estudo foi o de controlar a expressão da proteína nucleolar Fibrilarina em túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo espermatogênico (I-III; IV-VI, VII-IX, X-XII); e para verificar a distribuição da proteína nucleolar Fibrilarina durante a montagem do CB no citoplasma das células germinativas em túbulos seminíferos nos estágios IV-VI, e também sua interação com dois marcadores de CB bem conhecidos (MIWI e HSP70) que desempenham papéis distintos para a manutenção da fisiologia do CB. Túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo de espermatogênese foram isolados por microscopia de transluminescência (I-III: segmentos mais claros; IV-VI: segmentos de cores médias, VII-IX: segmentos de coloração mais intensa; X-XII: segmentos transparentes) a partir de testículos de 10 camundongos machos adultos (*Mus musculus*). A expressão da Fibrilarina e também a co-localização entre Fibrilarina e MIWI / HSP70 foram realizadas por *Western blot* (WB) e por imunofluorescência (IF). O total de proteínas a partir de testículos de 05 ratos adultos machos foram utilizados para realizar a co-imunoprecipitação de proteínas (CO-IPP). Os resultados demonstraram uma maior expressão da Fibrilarina em túbulos seminíferos nas fases IV-VI do ciclo espermatogênico (WB), e uma co-localização parcial da proteína nucleolar Fibrilarina com MIWI (uma proteína que tem um papel ativo no metabolismo de RNA no CB) , e também com HSP70 (uma proteína que tem um papel no dobramento proteossômico no CB) (IF). Também foi realizada uma CO-IPP entre Fibrilarina e MIWI; e entre Fibrilarina e HSP70 e com o objetivo de encontrar uma melhor resposta para a existência de uma interação física entre esses componentes do CB e a proteína nucleolar Fibrilarina. Encontramos MIWI no precipitado através da CO-IPP, mas não conseguimos precipitar HSP70. Os nossos resultados mostram que a proteína nucleolar Fibrilarina participa nas atividades fisiológicas realizadas por CB, interagindo com CB componentes que têm um papel no metabolismo de RNA (como, por exemplo, proteína MIWI). Portanto, é provável que a associação entre MIWI e Fibrilarina possa estar relacionada com a atuação destas duas proteínas em eventos relacionados à modificações epigenéticas que regulam a transcrição de RNAm e RNAr em células da linhagem germinativa masculina, controlando portanto dois eventos importantes para a diferenciação dos espermatozoides, que são a formação do CB e o ciclo nucleolar.

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

## ABSTRACT

The chromatoid body (CB) is a cytoplasmic organelle of male germ cells that has been indicated as having a role in the RNA and protein storage for the final differentiation of spermatozoa. Recent studies have indicated that some of this cytoplasmic macromolecular complex components have nucleolar origin, such as the nucleolar protein fibrillarin (B36) having a function in the nucleolar CFD (dense fibrillar component) and controlling the rRNA metabolism. The aims of the present study was to monitor the expression of nucleolar protein fibrillarin in seminiferous tubules at different stages of the spermatogenic cycle (I-III; IV-VI, VII-IX, X-XII); and to check the nucleolar protein fibrillarin distribution during the CB assembly in the cytoplasm of germ cells in seminiferous tubules at stages IV-VI and also its interaction with two well-known CB markers (MIWI and HSP70) playing distinct roles for the maintenance of the CB physiology. Seminiferous tubules at different stages of the spermatogenic cycle were isolated by transillumination microscopy (I-III: lighter segments; IV-VI: medium color segments; VII-IX: darker segments; X-XII: transilluminant segments) from testis of 10 adult male mice (*Mus musculus*). Fibrillarin expression and also co-localization between fibrillarin and MIWI/HSP70 were performed by Western blot (WB) and by immunofluorescence (IF). Total proteins from testis of 05 adult male mice were used to perform the co-immunoprecipitation (Co-IPP) experiments. The results demonstrated a higher fibrillarin expression in seminiferous tubules at the stages IV-VI of the spermatogenic cycle (WB), and a partial co-localization of nucleolar protein fibrillarin with MIWI (a protein that has a role in RNA metabolism in the CB), and also with HSP70 (a protein that has a role in the proteasome folding in the CB) (IF). We also performed a Co-IPP between fibrillarin and MIWI; and between fibrillarin and HSP70 aiming to find a better response for the existence of a physical interaction between those CB components and the nucleolar protein fibrillarin. We have found MIWI in the Co-IPP precipitate but not HSP70. Our results show that the nucleolar protein fibrillarin participates in the physiological activities performed by CB by interacting with CB components that have a role in the RNA metabolism (as for example, MIWI protein). It is therefore likely that the association between MIWI and fibrillarin may be linked to the performance of these two proteins in events related to epigenetic modifications that regulate the transcription of RNAm and RNAr in the male germ line cells, controlling therefore two important events for the differentiation of spermatozoa which are the formation of CB and nucleolar cycle.

Keywords: *Chromatoid body*, nucleolus, fibrillarin, spermatogenesis, fertility.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Centro fibrilar = CF

*Chromatoid body* = CB

Componente fibrilar denso = CFD

Componente granular = CG

DNA metiltransferase 1 = Dnmt1

DNA ribossômico = DNAr

Espaçadores externos = ETS

Espaçadores internos = ITS

Fibrilarina = B36

*Heat Shock Proteins* = HSP70

Lisina 16 Histona 4 = H4K16

Micro-RNA = miRNA

Numatrina = B23

Pequenos RNAs = piRNA

Pequenos RNAs nucleares = snRNAs

Proteína nucleolar nucleolina = C23

Regiões espaçadoras = TS

Regiões Organizadoras Nucleolares = RONS

RNA mensageiro = RNAm

RNA polimerase I = RNA pol I

RNA ribossômico = RNAr

*Small Nuclear Ribonucleoprotein* = snRNP



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
1.1 <i>CHROMATOID BODY</i> .....	08
1.2 NUCLEOLO.....	10
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 <i>SQUASH PREPARATIONS</i> .....	21
4.2 IMUNOFLOURESCÊNCIA EM <i>SQUASH PREPARATIONS</i> .....	21
4.3 ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO – COEFICIENTE DE PEARSON'S.....	22
4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E <i>IMUNOBLOT</i> .....	22
4.5 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNA ( <i>Co-IPP</i> ) .....	23
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NUCLEOLAR FIBRILARINA.....	25
5.2. CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE FIBRILARINA E COMPONENTES DO CB .	25
5.3. CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO ENTRE FIBRILARINA E COMPONENTES DO CB.....	26
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>48</b>

## 1. Introdução

### 1.1. *Chromatoid body*

Toda célula germinativa masculina do reino animal possui um acúmulo citoplasmático de material chamado “nuage”. O corpo polar dos oócitos de *Drosophila* é, provavelmente, o tipo mais bem conhecido de “nuage”. Em células germinativas de mamíferos a “nuage” mais bem conhecida é denominada *chromatoid body* (CB) (PARVINEN, 2005). O CB é uma estrutura citoplasmática que aparentemente possui um papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992). Além disso, o CB é uma estrutura do tipo grânulos de células germinativas masculinas, que contém muitas proteínas e RNAs, desempenhando papel importante para a espermatogênese. Contudo, os mecanismos moleculares que regem a formação e o desempenho das funções do CB ainda são pouco evidentes. O CB pode ser detectado no citoplasma de espermatócitos I no início da meiose, sendo caracterizado neste tipo celular como estrutura fibrosa-granular formada entre as mitocôndrias. Ao final da meiose, o CB maduro deixa de ter o aspecto de estrutura fibrosa-granular sendo compactado em um grânulo filamentosos e lobulado, transferindo-se em torno na superfície do núcleo da espermátide redonda. Esta estrutura mantém-se no citoplasma da espermátide até o momento em que o núcleo começa a prolongar-se e, finalmente, desaparece no final da espermiogênese (WANG et al., 2015).

O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e também como centro de determinação dos destinos de RNAm (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007). Devido a essas características, essa estrutura possui funções importantes no processo de espermatogênese e espermiogênese, como por exemplo, comunicação celular entre as espermátides (VENTELÄ et al., 2003; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a), direcionamento de mitocôndrias para a região caudal da espermátide (onde auxilia na formação da bainha mitocondrial e flagelo do espermatozoide) (FAWCETT et al., 1970; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a) e auxílio na formação do acrossomo do espermatozoide

(SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; TANG et al., 1982; PERUQUETTI et al., 2008, 2010a). Também tem sido demonstrado que alguns componentes moleculares que constituem o CB, como DNase, RNase, AcPs, Ubiquitina e HSP70, determinam que essa estrutura atue como um centro de degradação, onde DNAs, RNAs e proteínas, que não seriam mais necessários para o processo da espermatogênese, seriam degradados (HARAGUCHI et al., 2005).

Alguns autores propõem que o CB se origine a partir de material nucleolar, que se fragmenta nas etapas iniciais da espermatogênese e migra para o citoplasma, formando pequenas “nuages”, que aos poucos se coalescem, originando esta estrutura denominada CB (COMINGS; OKADA, 1972; ANDERSEN, 1978; ANDONOV, 1990). A fragmentação do material nucleolar nas etapas iniciais da espermatogênese também foi demonstrada por Takeuchi e Takeuchi (1990) e Peruquetti et al. (2008, 2010 a,b, 2011, 2012a,b). Em um estudo recente onde os autores procuraram interrelacionar a fragmentação do material nucleolar durante a divisão meiótica com a formação do CB, foi detectada a presença na proteína nucleolar fibrilarina em uma posição citoplasmática perinuclear, que corresponde à posição onde o CB é observado no citoplasma das espermátides iniciais em insetos triatomíneos (SOUZA et al., 2012). Essa possível localização da fibrilarina na composição molecular do CB de insetos traz maiores indícios de que produtos nucleolares podem estar relacionados com a organização do CB durante a espermatogênese. Além disso, a proteína nucleolar nucleolina (C23) foi detectada no CB de mamíferos após uma extensa análise proteômica desta estrutura (MEIKAR et al., 2014). Um outro estudo que analisou o ciclo nucleolar durante a gametogênese demonstrou que o reestabelecimento da morfologia nucleolar durante a gametogênese é um fator importante para remoção dos danos celulares induzidos pelo envelhecimento (UNAL et al., 2011). Portanto, poderíamos inferir que algumas proteínas nucleolares poderiam ser translocadas para o CB durante a espermatogênese, como parte do processo de reestabelecimento da morfologia nucleolar.

Outros autores, porém, afirmam que o CB origina-se a partir da aglomeração de um material inter-mitochondrial presente no citoplasma das células germinativas (FAWCETT et al., 1970; REUNOV et al., 2000). A proximidade com as mitocôndrias pode não estar diretamente ligada com o

direcionamento destas organelas para a região caudal dos espermatozoides, como proposto anteriormente, mas sim com o fato de as mitocôndrias participarem da via de miRNA (ERNOULT-LANGE et al., 2012) altamente presente no CB.

Independente de sua origem, a ação dessa estrutura citoplasmática abrange o controle de processos importantes para a espermatogênese, pois, a presença de mutações ou até mesmo a ausência de algumas proteínas, que são constituintes do CB, como as proteínas TDR1/MTR-1, MVH e MIWI e no antígeno de histocompatibilidade OX3, causam esterilidade em ratos (HEAD; KRESGE, 1985; TOYOOKA et al., 2000; DENG; LIN, 2002; CHUMA et al., 2006). Portanto, devido ao fato de existirem muitas dúvidas sobre a origem e função do CB e, devido à evidente importância dessa estrutura para o evento da espermatogênese, suas características precisam ser melhor esclarecidas em todas as classes animais.

## **1.2. Nucléolo**

O nucléolo é um domínio territorial particular do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). Além de ser a marca da compartimentalização nuclear o nucléolo também exerce várias funções no metabolismo celular, além da sua função principal como o lugar da síntese de RNAr e montagem de ribossomos (MARTIN et al., 2015). É considerado um subcompartimento do núcleo, altamente organizado e não envolto por membrana, e, também, é o local da biogênese dos ribossomos (GERBI, 2003). O nucléolo interfásico encontra-se organizado ao redor de regiões cromossômicas denominadas “Regiões Organizadoras Nucleolares” (RONs). As RONs são locais dos cromossomos que possuem genes que determinam a transcrição de RNA ribossômico (RNAr), que são transcritos e processados em pré-ribossomos no interior do nucléolo. Os genes ribossomais estão presentes em seqüências altamente repetidas em *tandem*, existindo várias cópias de genes RNAr em cada RON (SUMMER, 1990). A transcrição dos genes RNAr é realizada pela RNA polimerase I (RNA pol I) e ocorre em seqüência, deixando a estrutura com

um aspecto de “árvore de natal”, como observado, primeiramente, por Miller e Beatty (1969) e, posteriormente, por Scheer et al. (1997).

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

A formação do nucléolo é um processo dinâmico ao longo do ciclo celular sendo denominado nucleologênese. Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG), contudo, durante a nucleologênese, esses domínios desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular (ZATSEPINA et al., 1997). Os centros fibrilares (CF) abrigam o DNAr no centro nucleolar e estão rodeados pelos componentes fibrilares densos (CFD), contendo os RNAr recém-transcritos. O componente granular (CG) é preenchido com partículas pré-ribossomais compostas de RNAr e proteínas, estendendo-se para dentro do núcleo e rodeado por cromatina (MARTIN et al., 2015).

Os CFDs formam uma rede que liga os CFs. Essa organização espacial é similar à descrita para nucléolos de plantas (JUNÉRA et al., 1995). O CF está em contato direto com a RON e na sua periferia ocorre a transcrição do RNAr 45S. O processamento do RNAr e sua reunião com as proteínas e o RNAr 5S, que irá formar as subunidades ribossômicas maduras, ocorrem no CFD e CG (THIRY; GOESSENS, 1996).

O nucléolo possui outras funções, como a ligação e maturação de vários outros tipos de RNAs (pequenos RNAs nucleares – snRNAs) (GERBI, 2003). Estes snRNAs complexam-se com proteínas formando pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) que representam uma classe estável de complexos RNA-proteínas encontrada no núcleo de todas as células eucarióticas (LÜHRMANN, 1990). Algumas dessas snRNPs possuem importante função no processamento do pré-RNAr 45S. Por exemplo, a snRNP

denominada MRP é importante para a produção do RNAr 5,8S, e, em organismos superiores, a snRNP U8 é necessária para formar o RNAr 28S (GERBI, 2003). A mais estudada é a snRNP U3 que, provavelmente, está relacionada com a clivagem do pré-RNAr 45S no local situado entre o ITS1 e 5,8S. Foi sugerido que partículas de U3 sejam as marcações eletrondensas, conhecidas como “botões terminais”, observadas na extremidade 5' terminal das moléculas de RNAr pré-sintetizadas (HERNANDEZ-VERDUN, 1991).

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

A composição química do nucléolo é relativamente bem definida. É composto por DNAr e RNAr em seus três domínios (CF, CFD e CG). Possui várias proteínas classificadas como: histonas, proteínas acídicas e enzimas. As histonas estão presentes nos três domínios nucleolares por estarem complexadas com DNAr. As proteínas acídicas possuem localizações variadas. A fibrilarina (B36), que forma um complexo com o U3 e é um importante fator de processamento de RNAr, é encontrada no CF e no CFD. A nucleolina (C23), que está relacionada com a transcrição de DNAr e com o processamento de RNAr, regulando a taxa de produção de pré-ribossomos, pode ser encontrada no CF e CFD. A numatrina (B23), responsável pelos estádios tardios de reunião de pré-ribossomos, é encontrada associada com RNP pré-ribossômicas maduras e está envolvida no transporte de pré-ribossomos para o citoplasma, sendo observada no CFD e CG. A ribogranulina (52kDa), assim como a fibrilarina, também está associada com U3 snRNA, importante para o processamento de RNAr, sendo encontrada no CG. As enzimas também possuem diferentes localizações: a RNA pol I, específica para a síntese de RNAr é localizada no CF e CFD; a DNA topoisomerase I, necessária para a descondensação do DNA no curso da transcrição, não é específica para DNAr e encontra-se no CF e CFD; a DNA topoisomerase II, também é responsável

pela mudança na topologia da hélice de DNA e é encontrada somente no CFD do nucléolo (MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004a; THIRY; GOESSENS, 1996). Achados citológicos descrevem que as proteínas C23 e B23 são responsáveis pela impregnação pelos íons prata (OCHS; BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

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

## 2. Justificativa

Tendo em vista a importância do ciclo nucleolar e da organização do CB, descritas anteriormente, para o processo da espermatogênese estudos que busquem evidenciar a expressão, a localização e a distribuição de proteínas nucleolares, como a fibrilarina, no epitélio seminífero de mamíferos, a localização da fibrilarina na composição molecular do CB, bem como, os componentes do CB que interagem fisicamente com a fibrilarina, são de extrema importância. Identificando os eventos citados, poderemos estabelecer como o ciclo nucleolar interfere na formação do CB e, principalmente, quais funções as proteínas nucleolares poderiam desempenhar para a manutenção da fisiologia do CB.

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

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

*Hipótese 2:* Com a fragmentação nucleolar no início da divisão meiótica, parte das proteínas nucleolares (entre elas a fibrilarina) seriam translocadas para o CB pois, ao se integrarem com outros componentes moleculares do CB os mesmos seriam responsáveis pelo controle das modificações pós-transcricionais de RNAm que serão utilizados no processo de espermiogênese



e que haviam sido transcritos no início da divisão meiótica e armazenados/silenciados no CB, para que sejam traduzidos na etapa final da diferenciação das espermatídes em espermatozóides. Como a fibrilarina é uma proteína que age no metabolismo de RNAr, quando localizada no CB esta proteína poderia estar fisicamente associada com outros componentes que realizam o controle metabólico pós-transcricional de RNAm armazenados no CB, como as proteínas MVH, MIWI ou Dicer.

### 3. Objetivo geral

O objetivo geral da presente proposta foi analisar a variação da expressão da proteína nucleolar fibrilarina nas células do epitélio germinativo de roedores em diferentes estágios do ciclo espermatogênico. Também foi objetivo do presente trabalho detectar se a proteína nucleolar fibrilarina apresenta relação com a formação dos CBs de espermátides iniciais, e se nesta relação a fibrilarina estaria mais associada com componentes de degradação ou com componentes de metabolismo ativo no CB.

#### 3.1. Objetivos específicos

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

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

-Aplicação de técnicas de co-imunoprecipitação de proteínas para confirmação de resultados obtidos pela imunofluorescência (co-localização) e para detecção da interação física entre a proteína nucleolar fibrilarina com os marcadores de CBs utilizados no presente trabalho (MIWI e HSP70).

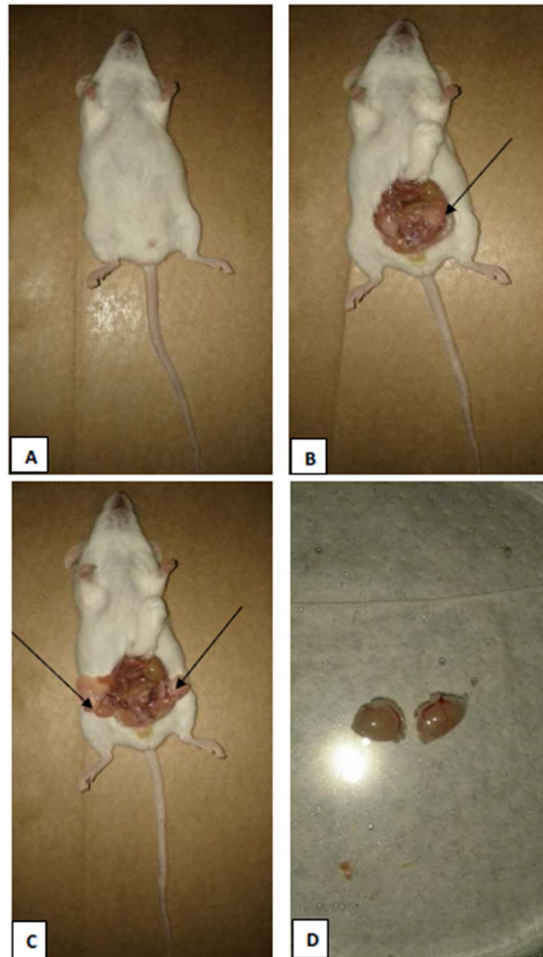
- Aplicação de técnicas de *Western Blot* para detectar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina, da proteína MIWI e da proteína HSP70 em diferentes estágios do ciclo espermatogênico de túbulos seminíferos (I-III; IV-VI; VII-IX; X-XII).

#### 4. Material e Métodos

Foram utilizados 15 camundongos machos (*Mus musculus*) com idade entre 4 a 6 meses, que foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante os experimentos os animais receberam cuidados de acordo com as *Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2013)*, normalizada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração oferecidas *ad libitum*, com ambiente controlado (temperatura entre 21° a 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro). Ao final do período experimental os animais foram anestesiados por meio de injeção de barbitúricos e mortos por deslocamento cervical (Figura 1).

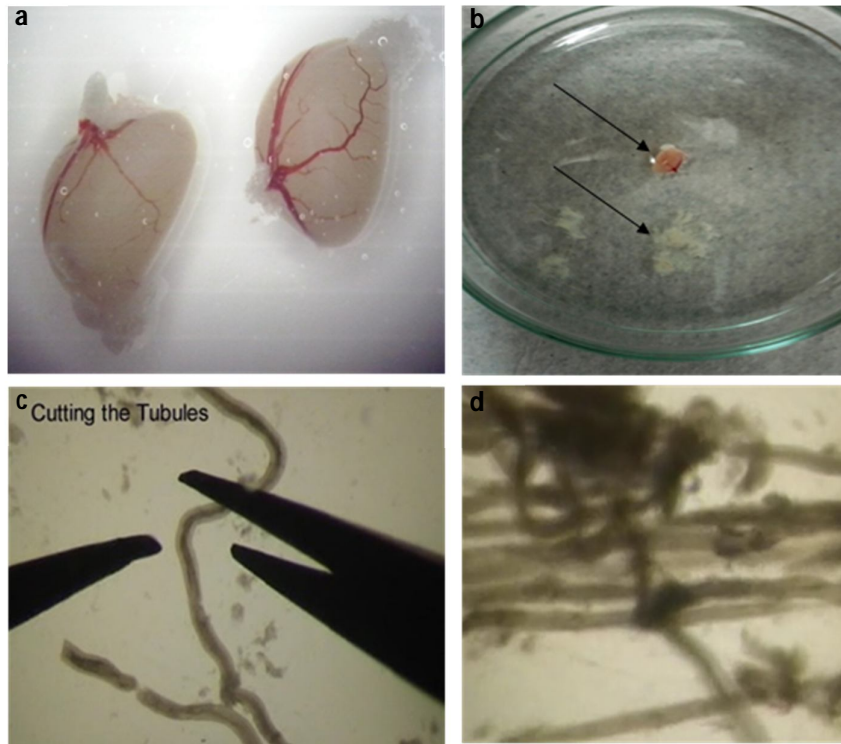
Todos os procedimentos que foram utilizados estão de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013). Após a obtenção dos túbulos seminíferos os mesmos foram separados de acordo com os estágios do ciclo espermato gênico determinados pela observação em microscópio de transluminescência (KOTAJA et al., 2004) (Figura 2 e Figura 3).

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



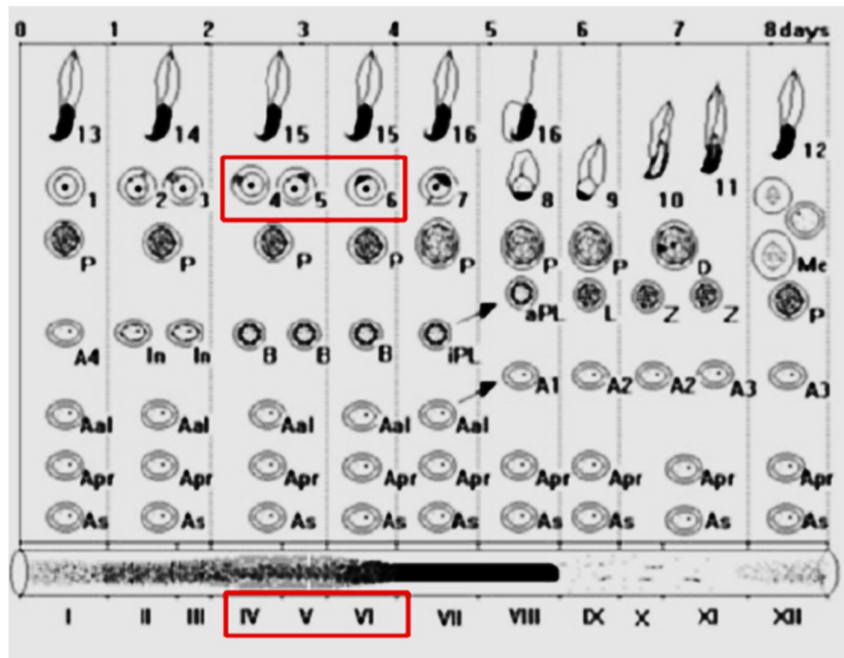
**Figura 1: Etapas do procedimento cirúrgico.** (a) Animal em decúbito dorsal. (b) Animal em decúbito dorsal com a cavidade abdominal exposta, destacando o testículo direito envolto por gordura (seta). (c) Animal em decúbito dorsal com a cavidade abdominal exposta e com os dois testículos isolados (setas). (d) Testículos isolados na placa de Petri com cápsula.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 2: Descrição do procedimento.** (a) Testículos isolados em placa de Petri com cápsula. (b) Testículos isolados em placa de Petri com cápsula e sem cápsula (setas), com túbulos seminíferos dispersados. (c) Estágios específicos de desenvolvimento dos túbulos seminíferos diferenciados de acordo com o padrão de sombras produzida pela translucência. (d) Separação dos túbulos seminíferos em estágios específicos de desenvolvimento.

Fonte: (a) e (b): Elaborada pela autora. (c) e (d): Adaptado de KOTAJA et al., 2004.



**Figura 3: Descrição dos estágios do ciclo espermatogênico de camundongos.** Estágio I-III tem uma cor clara, pois é o estágio onde as células são indiferenciadas; Estágio IV-VI possui uma cor mais intensa que a do anterior e é o de maior interesse para o presente estudo pois é onde o CB está com função mais ativa (quadros); Estágio VII-IX é o de cor mais intensa, no qual corresponde a maturação do espermatozóide; Estágio X-XII é onde ocorre a espermição, por isso não apresenta coloração.

Fonte: Adaptado de ROOIJ; GROOTEGOED, 1998.

Após o isolamento dos túbulos seminíferos de acordo com os estágios do ciclo espermatogênico, os diferentes segmentos foram submetidos às preparações descritas abaixo, com a finalidade de atingir os objetivos específicos descritos na presente proposta e as análises foram feitas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC), com câmera acoplada QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV). As análises de co-localização foram realizadas no software Image-Pro® Plus version 5.1.2 for Windows XP, baseando-se no coeficiente de Pearson's ( $R_r = 1$ ).

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

#### **4.1. Squash preparations**

As preparações foram realizadas segundo o protocolo de Kotaja et al., 2004. Foram utilizados segmentos de aproximadamente 0,5mm túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico. Os segmentos foram transferidos para uma lâmina, juntamente com aproximadamente 15 µl de PBS1x. Sob esse fragmento, foi colocada uma lamínula e realizada pequena pressão para que as células germinativas, gentilmente, deixassem o interior dos túbulos seminíferos. O excesso de PBS foi removido nas bordas da lamínula com o auxílio de um papel filtro. Quando o excesso de PBS estava bem removido, o conjunto, lâmina e lamínula, foi submergido em nitrogênio líquido e, em seguida, a lamínula foi removida. As lâminas foram secas ao ar, durante 4h, e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

#### **4.2. Imunofluorescência em *squash preparations***

As lâminas contendo *squash preparations* foram imersas em 4%PFA/PBS, em gelo, por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em PBS e, posteriormente, imersas em 0.2%Triton X100/PBS, à temperatura ambiente, por 5 minutos. O bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com 5%BSA/PBS, por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente ao bloqueio, as amostras foram incubadas *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Anti-Fibrillarín [38F3] antibody ab4566, na concentração 1:100; PIWIL1 (N-17): sc-22685, na concentração 1:100; HSP 70 (K-20): sc-1060, na concentração 1:100. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBST e, os anticorpos secundários de interesse, conjugado com diferentes agentes fluorescentes (Alexa Fluor® 488 F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, na concentração 1:100; Alexa Fluor® 594 Chicken Anti-Goat IgG (H+L)), na concentração 1:50 foram diluídos em 5% BSA/PBS, e a incubação foi feita durante 1 hora, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em PBST e, em seguida, o material foi corado com solução DAPI, para marcações dos núcleos. Ao final, as lâminas foram lavadas em PBS, montadas com Ultra Cruz Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc.): sc-24941, e analisadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse

80i, Nikon Instruments INC), com câmera acoplada QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV).

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

As imagens de imunofluorescência foram feitas no software Image-Pro® Plus version 5.1.2 for Windows XP. Das imagens capturadas e analisadas foram utilizadas 10 espermátides iniciais onde a co-localização entre fibrilarina e MIWI foi demonstrada; e 10 espermátides iniciais onde a co-localização entre fibrilarina e HSP70 foi demonstrada, para cálculo do coeficiente de co-localização, de acordo com o coeficiente de Pearson's ( $R_r = 1$ ), por meio da utilização do mesmo software.

#### **4.4 Extração de proteínas totais e *ImunoBlot***

Seguimentos de aproximadamente 0,5mm túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo espermatogênico foram homogeneizados em 300µl de tampão RIPA, contendo inibidores (NaF 1M, Cocktail inibidor de protease completo – Roche Diagnostics e PMSF 0.1M). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 14000xg, por 15 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para novos tubos. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada por espectrofotometria o 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.

Para a realização do *imunoblot*, cerca de 25µg de extrato de proteínas foram separadas em gel 10% SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de polivinilideno por meio de *eletroblotting*. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBST e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, em leite desnatado 5%/PBST, para bloqueio de marcações inespecíficas. Após incubação, as membranas foram novamente lavadas em PBST e incubadas com anticorpos primários Anti-Fibrillarín [38F3] antibody ab4566 1:100; PIWIL1 (N-17): sc-22685 1:100; HSP 70 (K-20): sc-1060 1:100; e anti- $\alpha$ -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich) 1:10000 diluídos em leite desnatado



5%/PBST, e incubadas a 4°C, *overnight*. Após incubação com anticorpo primário as membranas foram novamente lavadas em PBST e, em seguida, incubadas com anticorpos secundários (HRP Rabbit anti-mouse-Invitrogen 616520; donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020) diluídos em leite desnatado 5%/PBST, por 1 hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas em PBST, secas e reveladas por meio de filmes fotográficos.

#### **4.5 Co-imunoprecipitação de proteína (Co-IPP)**

Para os ensaios de co-imunoprecipitação, lisados de túbulos seminíferos totais (1 ou 2 testículos/ensaio), foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo de imunoprecipitação (IP) de interesse (Fibrillarin (F-6): sc-166000). Após a incubação foram adicionados 30µl-60 µl de proteína G agarose ao lisado (Protein G PLUS-Agarose: sc-2002), e as mesmas foram deixadas em rotação à temperatura ambiente por 2h. Após esta incubação os lisados foram centrifugados e as *beads* de proteína G presentes no *pellet* foram lavadas 3x em RIPA Buffer com inibidores e diluídas em 4x Laemmili Buffer. O lisado total inicial foi utilizado com controle da reação, o sobrenadante obtido após o tratamento com as *beads* de proteína G foi utilizado como *input* da reação, e as proteínas presentes no *pellet* de *beads* de proteína G foram detectadas para verificação da Co-IPP. Em seguida foi realizado o *immunoblotting* para detecção de quais proteínas que estão sendo analisadas se co-imunoprecipitaram com o anticorpo de IP utilizado. O *immunoblotting* foi realizado de acordo com o descrito anteriormente, sendo utilizados os seguintes anticorpos primários Anti-Fibrillarin [38F3] antibody ab4566, na concentração 1:100; PIWIL1 (N-17): sc-22685, na concentração 1:100; HSP 70 (K-20): sc-1060, na concentração 1:100; Fibrillarin (F-6): sc-166000, na concentração 1:100; e os seguintes anticorpos secundários: HRP Rabbit anti-mouse Invitrogen 616520, na concentração 1:4000; donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020, na concentração 1:500.

## **5. Resultados**

### **5.1. Expressão da proteína nucleolar fibrilarina**

Por meio da técnica de *Western blot* objetivamos detectar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico, onde verificou-se que a fibrilarina se expressa mais no estágio IV-VI e no testículo total, sua expressão é menos intensa no estágio VII-IX. Não foi detectada a expressão de fibrilarina nos estágios I-III e X-XII (Figura 4). Adicionalmente, também foi testada a expressão da proteína MIWI nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico. MIWI apresenta-se mais expressa nos estágios I-III, IV-VI e no testículo total, tendo sua expressão parcialmente reduzida nos demais estágios (Figura 4). Ao checar a expressão de HSP70 nos diferentes estágios do ciclo espermatogênico, observa-se que HSP70 está altamente expressa nos estágios IV-VI e VII-IX, que sua expressão é reduzida no estágio X-XII, e que há uma ausência da expressão de HSP70 no estágio I-III (Figura 4). A proteína tubulina foi utilizada como controle da reação.

Por meio de análise de imunofluorescência em túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico foi possível acompanhar a expressão da fibrilarina nos diferentes tipos celulares que compõe esse estágio. Em espermatogônias foi possível observar um único e grande nucléolo central com fibrilarina amplamente expressa no CFD (componente fibrilar denso) dos nucléolos (Figura 5). Em espermatócitos primários observamos pequenas marcações de fibrilarina na periferia do DNA, demonstrando a desorganização nucleolar nesta etapa da divisão e distribuição da fibrilarina pelo citoplasma celular (Figura 5). Em espermátides iniciais pode-se observar pequenas marcações de fibrilarina em posições centrais e periféricas do núcleo. As marcações periféricas frequentemente fazem contato com a membrana nuclear (Figura 5).

### **5.2. Co-localização entre Fibrilarina e componentes do CB**

A técnica de imunofluorescência foi realizada, co-localizando as proteínas Fibrilarina e MIWI, bem como as proteínas Fibrilarina e HSP70 (Figuras 6 e 7). Os resultados obtidos podem ser resumidos da seguinte maneira: 1) Fibrilarina foi detectada no nucléolo de espermátides iniciais pós-

meióticas, porém também foi parcialmente localizada em associação com o *chromatoid body* (CB) (Figuras 5 e 6); 2) MIWI e Fibrilarina se co-localizaram, pois ambas foram detectadas no CB ou próximas a ele (Figuras 6 e 7); 3) HSP70 se apresentou difusa no citoplasma, portanto se tornou mais difícil observar sua concentração no CB. Entretanto, nas células onde HSP70 foi observada concentrada no CB, também foi possível observar uma associação com a fibrilarina citoplasmática (Figuras 6 e 7). Com isso nenhuma das duas hipóteses citadas na justificativa deste trabalho foi, até o momento, descartada.

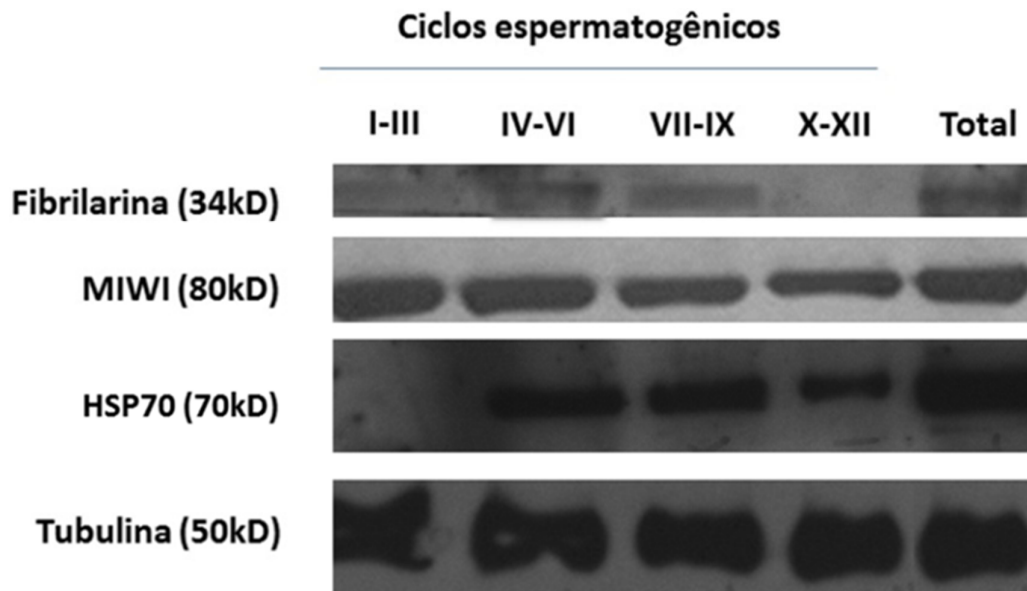
Para obtenção de dados mais precisos sobre a co-localização entre as imunomarcações foi utilizada a análise do Coeficiente de Pearson's, e os resultados estão representados na Tabela 1. Analisando os dados obtidos notamos que tanto o coeficiente de Pearson's da relação MIWI:Fibrilarina quanto da relação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

Por meio das observações realizadas propõe-se um modelo esquemático para representar a interação existente entre importantes componentes do CB e a proteína nucleolar Fibrilarina (Figura 8).

### **5.3. Co-imunoprecipitação entre Fibrilarina e componentes do CB**

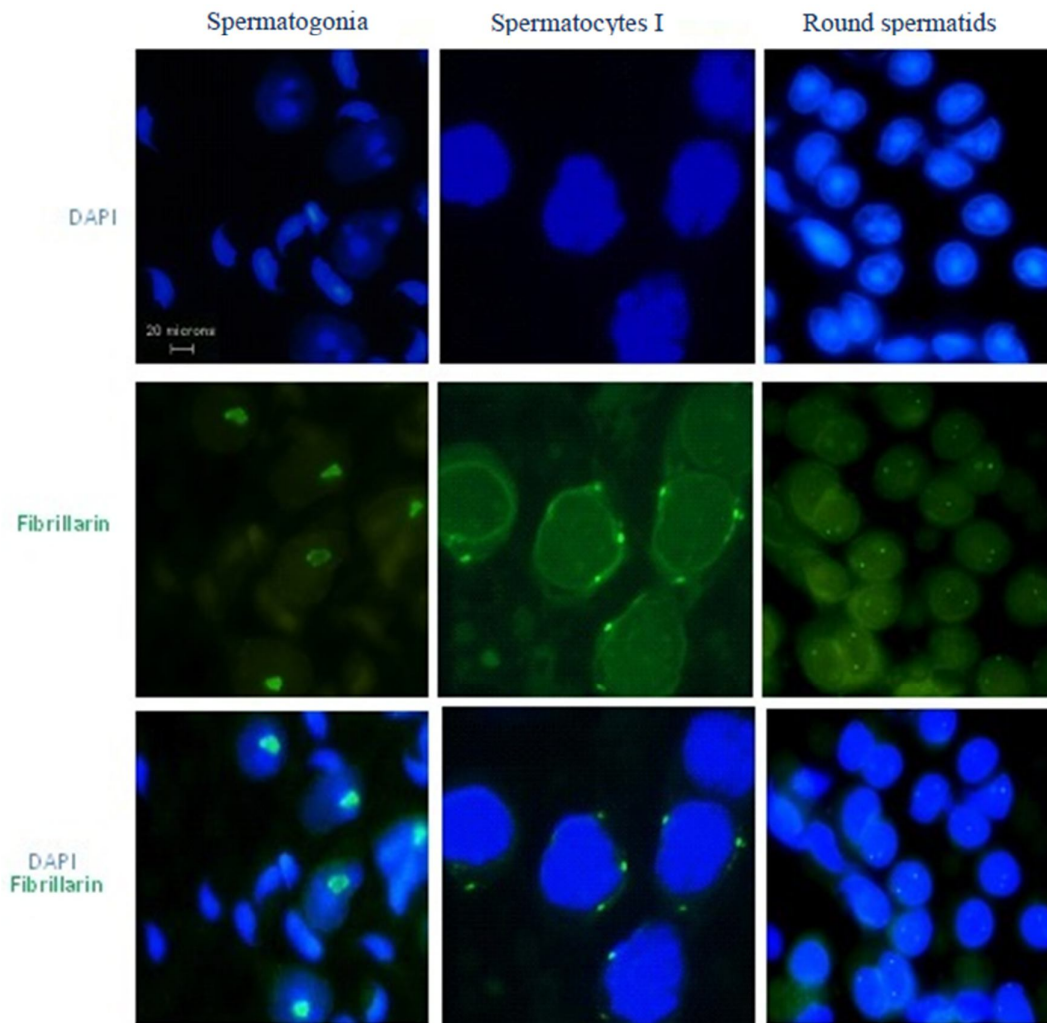
Foram realizados 5 experimentos onde utilizou-se o anticorpo Fibrilarina para detecção de MIWI e/ou HSP70 no precipitado (Figura 9). A eficiência da técnica de Co-IPP pode ser comprovada pela grande concentração de fibrilarina no precipitado e pela redução da concentração desta proteína no *input* (Figura 9). Com relação as proteínas de interesse não foi possível identificar a proteína HSP70 no precipitado da Co-IPP, sendo que a concentração desta proteína continuou muito intensa no *input* (Figura 9). Já com a proteína MIWI também foi detectado uma alta concentração da mesma no *input*, porém foi possível detectar uma pequena marcação desta proteína no

precipitado (Co-IPP), o que sugere uma possível associação física entre MIWI e Fibrilarina.



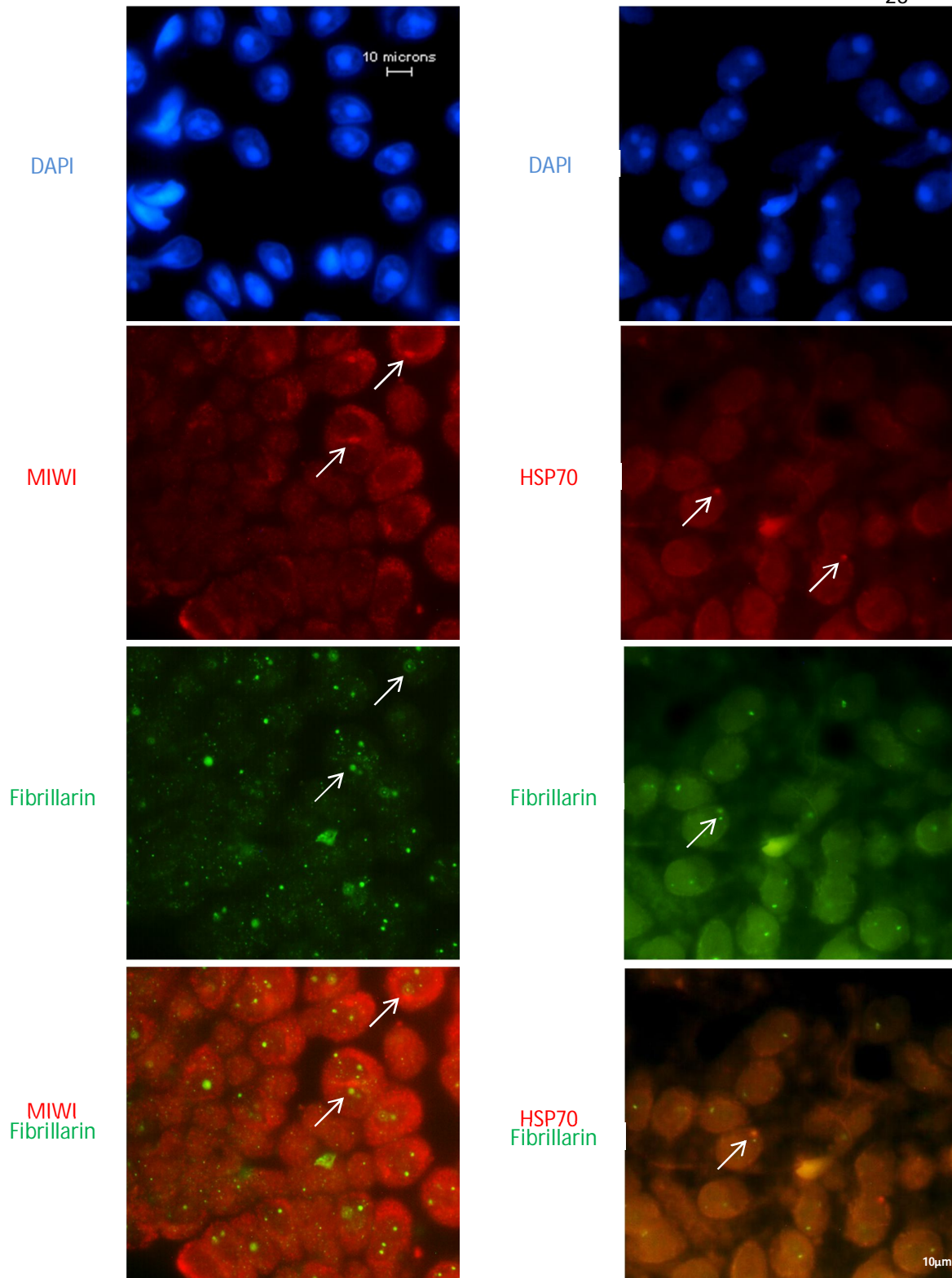
**Figura 4:** *Imunoblot* para detecção da expressão da proteína nucleolar fibrilarina, da proteína MIWI e da proteína HSP70 em diferentes estágios do ciclo espermatogênico de túbulos seminíferos (I-III; IV-VI; VII-IX; X-XII). Proteínas totais do tecido testicular total (Total Protein) e a detecção da expressão de tubulina foram utilizadas como controle da técnica.

Fonte: Elaborada pela autora.



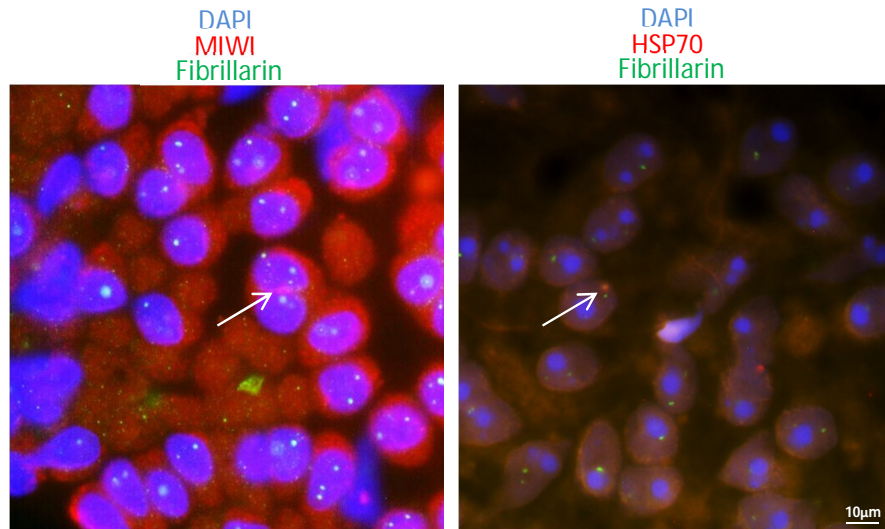
**Figura 5:** Detecção por imunofluorescência da distribuição da proteína nucleolar fibrilarina em células de túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico: espermatogônias (Coluna 1); espermatócitos primários (Coluna 2); e spermátides iniciais (Coluna 3).

Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 6:** Detecção por imunofluorescência das proteínas Fibrilarina, HSP70 e MIWI (setas) em túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 7:** Detecção por imunofluorescência da co-localização das proteínas Fibrilarina e MIWI (seta); e Fibrilarina e HSP70 (seta) em túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico.

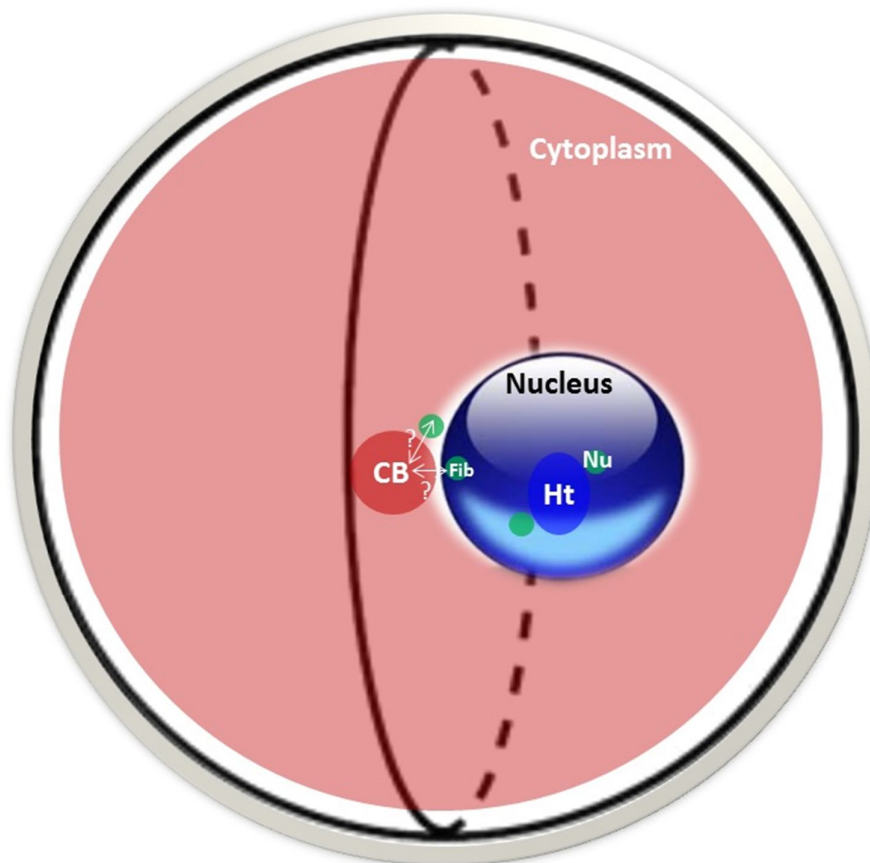
Fonte: Elaborada pela autora.

Co-localização	Número por células (n)	Coefficiente de Pearson	Resultados por canal
Fibrilarina:MIWI	10	Rr: 0.559314	K <sub>1</sub> : 1.860 K <sub>2</sub> : 0.584
Fibrilarina:HSP70	10	Rr: 0.613395	K <sub>1</sub> : 1.593 K <sub>2</sub> : 0.593

**Tabela 1:** Valores do coeficiente de Pearson's obtido na análise de co-localização de imunofluorescências entre as proteínas Fibrilarina:MIWI (n=10 células) e Fibrilarina:HSP70 (n=10 células), realizadas em *squah preparations* em segmentos de túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico. K1: Influência do canal vermelho (MIWI ou HSP70) sobre o coeficiente de sobreposição; K2: Influência do canal verde (Fibrilarina) sobre o coeficiente de sobreposição.

Fonte: Elaborada pela autora.

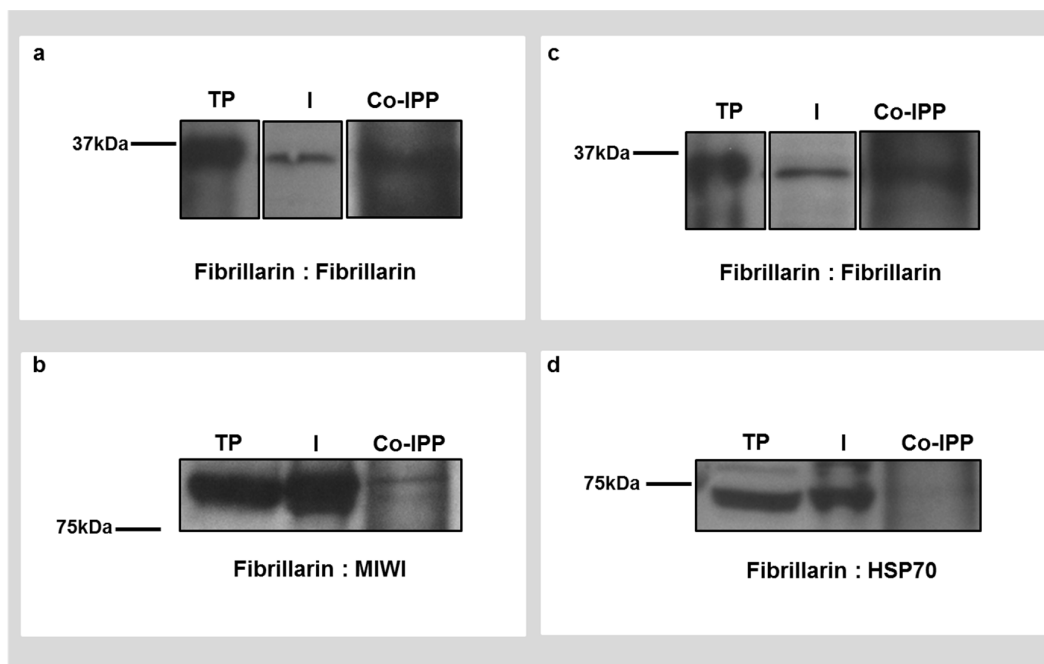




**Figura 8:** Representação esquemática da interação detectada por imunofluorescência entre a proteína nucleolar fibrilarina (verde) e componentes do CB (MIWI ou HSP70 – vermelho) em espermátides iniciais de túbulos seminíferos no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico. A fibrilarina é frequentemente observada em marcações nucleares centrais, no nucléolo (Nu) geralmente associada com heterocromatina nucleolar (Ht). Porém também é possível observar com relativa frequência marcações na periferia nuclear em regiões que adjacentes ao CB. Na maioria das vezes essa marcação de fibrilarina que faz contato com o CB encontra-se no núcleo, porém também foi possível observar algumas marcações de fibrilarina citoplasmática em íntimo contato com o CB. Em microscopia de fluorescência essa identificação de proximidade e/ou co-localização pode somente identificar estruturas que estão a 200nm ou mais de distância o que torna difícil afirmar, por esta técnica, o real grau de interação entre estes componentes.

Fonte: Elaborada pela autora.





**Figura 9:** Experimentos de CO-IPP com fibrilarina para detecção de Fibrilarina (34kD) (Fibrillarín/Fibrillarín) (a) e para detecção de MIWI (80 kD) (Fibrillarín/Miwi) (b) e experimentos de CO-IPP com fibrilarina para detectar fibrilarina (34kD) (Fibrillarín/Fibrillarín) (c) e para detectar HSP70 (70 kD) (Fibrillarín/HSP70) (D), no controle (TP), *input* (I), e precipitado (Co-IPP).

Fonte: Elaborada pela autora.

## 6. Discussão

O *chromatoid body* (CB) é uma estrutura citoplasmática de células germinativas masculinas cuja principal função está relacionada com o estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992). Os CBs são localizados nas células germinativas, desde o início da gametogênese masculina e persistem ao longo de toda a vida do adulto (MAHOWALD, 2001). Análises realizadas durante a espermatogênese de camundongos relataram a presença de CB perto das vesículas do aparelho de Golgi. Também são observados na mesma posição em espermátides finais, o que nos permite entender que o CB pode auxiliar na formação da cauda do espermatozoide (PERUQUETTI et al., 2008, 2010a). Muitos autores afirmam que o CB se origina a partir de proteínas nucleolares através da fragmentação do nucléolo durante a divisão meiótica (COMINGS; OKADA, 1972; ANDONOV, 1990; PERUQUETTI et al., 2008, 2010b). Devido à recente demonstração da presença de mais de 10 micro-RNAs (miRNAs) em compartimentos nucleolares (BAI et al., 2014), adicionado ao fato de miRNAs serem a principal via de silenciamento gênico e protéico utilizada pelos CBs (MEIKAR et al., 2014), a comparação entre fisiologia nucleolar e a fisiologia dos CBs durante a espermatogênese faz-se ainda mais necessária.

Por meio de análises de *Western blot*, no presente trabalho, pode-se detectar uma alta expressão das proteínas Fibrilarina, HSP70 e MIWI no estágio IV-VI do ciclo espermatogênico, estágio esse que contém um grande número de espermátides iniciais (CLERMONT, 1972; ROOIJ; GROOTEGOED, 1998), que são as células onde o CB se encontra completamente formado e exercendo suas funções de maneira mais efetiva (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007). A Fibrilarina é uma proteína que faz parte do complexo box C/D and H/ACA snoRNP do nucléolo, que é um complexo responsável pelo processamento de pré-RNAr por meio de modificações pós-transcricionais, metilação-2'-O e pseudouridilação (MORIMOTO; BOERKOEL, 2013; BIZARRO et al., 2014). Proteínas PIWI (uma família de proteínas que contém outros três genes: *Miwi*, *Mili* e *Miwi2*) desempenham papéis essenciais e fundamentais no desenvolvimento das células da linhagem germinativa, incluindo a manutenção

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

Como os eventos de reativação da atividade nucleolar (PERUQUETTI et al., 2012b); de participação do CB na reativação da atividade transcricional/traducional celular (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007); e, também, na degradação proteossômica (HARAGUCHI et al., 2005) são fortemente desempenhados nas células que compõe o estágio IV-VI do ciclo espermatogênico, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura. A distribuição a fibrilarina pelas células do epitélio germinativo (espermatogônias, espermatócitos I e espermátides iniciais) de túbulos

seminíferos no referido estágio do ciclo espermatogênico seguiu o padrão do ciclo nucleolar sumarizado por Peruquetti e Azeredo-Oliveira (2013), confirmando o padrão do ciclo nucleolar durante a espermatogênese de mamíferos e indicando que a marcação de fibrilarina observada no presente trabalho foi extremamente específica.

No presente trabalho foi demonstrada, por meio de técnicas de imunofluorescência, a distribuição da proteína nucleolar fibrilarina em espermátides iniciais (pós-meióticas) bem como sua co-localização com duas proteínas que estão localizadas no CB, destas mesmas células, e que desempenham funções diferenciadas nesta estrutura. Os marcadores de CB utilizados foram: (1) MIWI que desempenha um papel no controle das modificações pós-transcricionais de RNAm transcritos no início da divisão meiótica e armazenados/silenciados no CB, para que sejam traduzidos na etapa final da diferenciação das espermátides em espermatozóides (DENG; LIN, 2002) e ; (2) HSP70 que age como um componente proteossômico nesta estrutura (HARAGUCHI et al., 2005).

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

Na tentativa de elucidar as possíveis funções desempenhadas pela fibrilarina para a manutenção da fisiologia do CB a co-localização entre fibrilarina e as proteína MIWI e HSP70 (marcadores de CB) foi testada, sendo testadas desta maneira as duas hipóteses iniciais do presente trabalho. Nas análises das imunomarcações por fluorescência a fibrilarina se co-localizou parcialmente com as duas proteínas testadas, comprovando sua relação com o CB mas impossibilitando a aceitação ou a rejeição das hipóteses propostas no

trabalho. Para que as análises fossem realizadas de forma com que o resultado ficasse mais confiável, ou seja, por meio de realização de análises quantitativas, foram feitas merges das imagens capturadas em cada etapa citada acima, e também foi utilizada a análise de co-localização por meio do coeficiente de Pearson's, que é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas (ZAR, 1999). Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui (ZAR, 1999). Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. No presente trabalho obtivemos um coeficiente de Pearson's de 0,559314 para a co-localização entre fibrilarina e MIWI e de 0,613395 para a co-localização entre fibrilarina e HSP70. Analisando os dados obtidos, notamos que tanto o coeficiente de Pearson's da relação MIWI:Fibrilarina quanto da relação HSP70:Fibrilarina foram superior a 50%, com a interação Fibrilarina:HSP70 sendo uma pouco maior.

Apesar de serem informativos esses resultados de co-localização obtidos no presente trabalho devem ser considerados com cautela. É preciso levar em consideração que a formação da imagem na microscopia de luz, mais precisamente na microscopia *widefield* utilizada no presente trabalho, ocorre por uma combinação da difração da luz na amostra, pela interferência desses raios de luz sobre a amostra e pela captura desses raios refletidos pela lente objetiva utilizada. O limite de resolução máximo que uma objetiva com 1.4NA reside em distinguir objetos que estão a no máximo 222nm de distância, de outra maneira esses objetos somente seriam evidenciados como um objeto único (VERDAASDONK et al., 2014).

Como as co-localizações observadas no presente trabalho foram parciais, isso significa que a localização de fibrilarina e de MIWI/HSP70 pode representar pontos a 200nm de distância ou mais, nas células analisadas. Como já destacado, a fibrilarina, que tem participação ativa na biogênese do ribossomo atuando nas modificações e processamentos de pré- rRNA (UESHIMA et al., 2013), parece migrar até o citoplasma passando a fazer parte da constituição molecular do CB (PERUQUETTI et al., 2012b), sendo que neste processo a fibrilarina poderia desempenhar um papel no processamento

de RNAm, atuando junto com a Argonauta MIWI. Porém, se fibrilarina for translocada para o CB por não possuir mais papel na biogênese de ribossomos, fibrilarina poderia se associar a HSP70, que tem função em várias etapas da degradação proteossômica, como por exemplo antes da ubiquitinação e durante o seu silenciamento (SHIBER et al., 2014). Levando em consideração que os resultados aqui apresentados trarão importantes esclarecimentos sobre o possível papel da fibrilarina durante a meiose, esse viés sobre a real co-localização entre os componentes testados neste trabalho deve ser minimizado.

Para comprovar as análises de co-localização foram realizados experimentos de Co-IPP para detectar a interação física entre fibrilarina e as proteínas de interesse testadas no presente trabalho (MIWI e HSP70). A partir dessas precipitações, pudemos observar que houve uma interação mais evidente entre Fibrilarina/MIWI, indicando que a fibrilarina se associa mais à proteína MIWI, podendo desempenhar um papel ativo no metabolismo de RNAs que ocorre no interior desta organela (MEIKAR et al., 2014). Como MIWI é expressa em células germinativas masculinas e crescentes evidências indicam que a família de proteínas PIWI influenciam o desenvolvimento da linha germinativa e na determinação da manutenção da célula para a espermatogênese, em vários grupos animais (CHENG et al., 2014), é possível que ao associar-se com MIWI Fibrilarina possa participar de processos de metabolismo de RNAs durante a espermiogênese.

MIWI, como já destacado, é um membro da família de proteínas Argonauta e expresso especificamente em células da linhagem germinativa, além de possuir um papel no silenciamento de RNAm citoplasmáticos mediado por pequenos RNAs (piRNA) também parece possuir um papel na regulação da transcrição nuclear. Estudos demonstraram que a metilação de alguns genes específicos é Dicer e Argonauta-dependente e vinculado a metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9) (ENDER; MEISTER, 2010). Metilação de DNA e modificações de histonas são eventos que regulam a transcrição tanto de RNAm quanto de RNAr. É interessante observar que a orientação da organização dos territórios cromossômicos nucleares sempre privilegia que os genes ativos eucromáticos sejam distribuídos na região central do núcleo, em regiões periféricas ao nucléolo interfásico. Esse fato evidencia que além de

regular a transcrição de RNAr os compartimentos nucleolares podem estar ligados ao controle da transcrição e *splicing* de genes não ribossomais a ele associados (BÁRTOVÁ et al., 2010). A integridade do nucléolo é mantida pelo estado epigenético dos genes RNAr, dado principalmente pela ação de enzimas modificadoras de histonas e por DNA metiltransferase, que agem simultaneamente em complexos de remodelamento de cromatina envolvidos na síntese de RNAr (BÁRTOVÁ et al., 2010). Como exemplo da importância de eventos epigenéticos para a organização estrutural do nucléolo podemos citar experimentos onde o silenciamento do gene *Dnmt1* (DNA metiltransferase 1) reduziu os níveis de metilação e aumentou os níveis de acetilação em genes RNAr, principalmente na lisina 16 da histona H4 (H4K16), o que reduziu o nível de recrutamento da deacetilase de histona NAD<sup>+</sup> dependente (SIRT1) e culminou com a desorganização dos compartimentos nucleolares, com dispersão de proteínas nucleolares como a fibrilarina e pKi-67 (ESPADA et al., 2007; HARNIČAROVÁ et al., 2006; KREJČÍ et al., 2008). Portanto, é provável que a associação entre MIWI e Fibrilarina possa estar relacionada com a atuação destas duas proteínas em eventos relacionados à modificações epigenéticas que regulam a transcrição de RNAm e RNAr em células da linhagem germinativa masculina, controlando portanto dois eventos importantes para a diferenciação dos espermatozoides, que são a formação do CB e o ciclo nucleolar.

## **7. Considerações Finais**

Desta maneira, podemos concluir que a proteína nucleolar fibrilarina tem participação nas atividades fisiológicas desempenhadas pelo CB, estando em maior associação com componentes do CB que possuem papel no metabolismo de RNAs (como por exemplo, a proteína MIWI). Porém, para caracterização detalhada da via de integração entre estes componentes de dois compartimentos subcelulares distintos serão necessários experimentos específicos. Portanto, as conclusões do presente trabalho nos permitem aceitar a 2ª hipótese, em que a fibrilarina se associa com o CB para ter um papel no metabolismo de RNAs, se associando a MIWI, apresentada na justificativa e rejeitar a 1ª hipótese, que consiste na fibrilarina se associar com o CB para ser degradada, se associando a HSP70.



## Referências Bibliográficas

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

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

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

BÁRTOVÁ, E., HORÁKOVÁ, A.H., UHLÍŘOVÁ, R., RAŠKA, I., GALIOVÁ, G., ORLOVA, D., KOZUBEK, S. Structure and Epigenetics of Nucleoli in Comparison With Non-nucleolar Compartments. *J.Histochem. Citochem.*, v. 58, n. 5, p. 391-403, 2010.

BIZARRO, J., CHARRON, C., BOULON, S., WESTMAN, B., PRADET-BALADE, B., VANDERMOERE, F., CHAGOT, M.E., HALLAIS, M., AHMAD, Y., LEONHARDT, H., LAMOND, A., MANIVAL, X., BRANLANT, C., CHARPENTIER, B., VERHEGGEN, C., BERTRAND, E. Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J. Cell Biol.*, v. 207, n. 4, p. 463-480, 2014.

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

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

CHENG, E.C.; KANG, D.; WANG, Z.; LIN, H. Piwi Proteins Are Dispensable for Mouse Somatic Development and Reprogramming of Fibroblasts into Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, v.9, p.1-11, 2014.

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

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

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

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

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

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

ERNOULT-LANGE, M.; BÉNARD, M.; KRESS, M.; WEIL, D. P-bodies and mitochondria: Which place in RNA interference? p. 1-6, 2012.

ESPADA, J., BALLESTAR, E., SANTORO, R., FRAGA, M.F., VILLAR-GAREA, A., NÉMETH, A., LOPEZ-SERRA, L. Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p.2191-2198, 2007.

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

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

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

HARNIČAROVÁ, A., KOZUBEK, S., PACHERNÍK, J., KREJČÍ, J., BÁRTOVÁ, E. Distinct nuclear arrangement of active and inactive c-myc genes in control and differentiated colon carcinoma cells. *Exp Cell Res.*, v. 312, p. 4019-4035, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

KREJČÍ, J., HARNIČAROVÁ, A., KŮROVÁ, J., UHLÍŘOVÁ, R., KOZUBEK, S., LEGARTOVÁ, S., HÁJEK, R. Nuclear organization of PML bodies in leukaemic and multiple myeloma cells. *Leuk Res.*, v.32, p.1866-1877, 2008.

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

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

MARTIN, R.M.; TER-AVETISYAN, G.; HERCE, H.D.; LUDWIG, A.K.; LÄTTIG-TÜNNEMANN, G.; CARDOSO, C. Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus*, v.6:4, p. 314-325, 2015.

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

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

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

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

- OCHS, R. L.; LISCHWE, M. A.; SHEN, E.; CARROL, R. E.; BUSCH, H. Nucleogenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, v.92, n.5, p.330-336, 1985.
- PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, v. 28, p. 189-201, 2005.
- PEDERSON, T. Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 27(3), p. 111-112, 2002.
- PERUQUETTI, R.L.; ASSIS, I.M.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron*, v. 39, p. 419-425, 2008.
- PERUQUETTI, R. L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of Mongolian Gerbil Chromatoid Bodies and Their Correlation with Nucleolar Cycle During Spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.399 - 406, 2010a.
- PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar Cycle and Its Correlation with Chromatoid Bodies in the *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae) Spermatogenesis. *The Anatomical Record*, v.293, p.900 – 910, 2010b.
- PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., SANTOS, L.R.S., OLIVEIRA, C., AZEREDO OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: Is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? *Micron*, v.42, p.87 - 96, 2011.
- PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., CABRAL, S.R.P., OLIVEIRA, C., AZEREDOOOLIVEIRA, M.T.V. Relationship between the nucleolar cycle and chromatoid body formation in the spermatogenesis of *Phrynosoma macleayi* (Reptilia Testudines). *Anim Cells Syst*, v.16, p. 104-113, 2012a.
- PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Morphological changes of mammalian nucleoli during spermatogenesis and their possible role in the chromatoid body assembling. *ISRN Cell Biology*, v.2012, p.1 - 12, 2012b. doi:10.5402/2012/829854
- PERUQUETTI, R.L, AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Chromatoid Body Assembling and Nucleolar Cycle: Two Important Physiological Events for the Spermatogenesis in Vertebrates. In 'Recent Advances in Germ Cells Research' (Ed A Perrote ) p. 133-148, 2013. (Nova Science Publishers: New York, NY).

- REUNOV, A.; ISAEVA, V.; AU, D.; WU, R. Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Development Growth & Differentiation*, v. 42, p. 139-143, 2000.
- DE ROOIJ, D.G., GROOTEGOED, J.A. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 10, n.6, p. 694-701, 1998.
- SAUNDERS, P. T. K.; MILLAR, M. R.; MAGUIRE, S. M.; SHARPE, R. M. Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, p. 385-391, 1992.
- SCHEER, U.; XIA, B.; MERKERT, H.; WEISENBERGER, D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma*, v.105, n. 7-8, p. 470-80, 1997.
- SCHWARZACHER, H. G.; WACHTLER, F. The nucleolus. *Anatomy and Embryology*, v. 188, p. 515-536, 1993.
- SHIBER, A.; RAVID, T. Chaperoning Proteins for Destruction: Diverse Roles of Hsp70 Chaperones and their Co-Chaperones in Targeting Misfolded Proteins to the Proteasome, *Biomolecules*, v. 4, p. 704-724, 2014.
- SÖDERSTRÖM, K.; PARVINEN, M. Incorporation of [<sup>3</sup>H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *The Journal of Cell Biology*, v. 70, p. 239-246, 1976.
- SILISTINO-SOUZA, R., PERUQUETTI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). *Micron*, v.xxx, p.1 - 7, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.017>
- SUMMER, A. T. Chromosome banding. Unwin Human London, 434 p., 1990.
- TAKEUCHI, I. K.; TAKEUCHI, Y. K. Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *Journal of Structural Biology*, v. 103, p. 104-112, 1990.
- TANG, X. M.; LALLI, M. F.; CLERMONT, Y. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *The American Journal of Anatomy*, v. 163, p. 283-294, 1982.
- THIRY, M.; GOESSENS, G. The nucleolus during the cell cycle. Springer, 146p., 1996.
- TOYOOKAA, Y.; TSUNEKAWAA, N.; TAKAHASHIC, Y.; MATSUIC, Y.; SATOHA, M.; NOCEA, T. Expression and intracellular localization of mouse

Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*, v.93, p. 139-149, 2000.

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

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

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




VERDAASDONK, J.S., STEPHENS, A.D., HAASE, J., BLOOM, K. Bending the Rules: Widefield Microscopy and the Abbe Limit of Resolution. *J Cell Physiol.*, v. 229, n. 2, p.132-138, 2014.

WANG, G.; ZHANG, H.; WANG, L.; WANG, Y.; HUANG, H.; SUN, F. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Promotes Interplay of Proteins in Chromatoid Body of Male Germ Cells. *Sci. Rep.* 5, 12126; doi: 10.1038/srep12126, 2015.

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

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

**Anexo****Parecer Comitê de Ética**

	<b>Universidade de São Paulo</b> <b>Faculdade de Odontologia de Bauru</b> <b>Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais</b>	
<b>CEEPA-Proc. Nº 005/2013</b>		
Bauru, 20 de agosto de 2013.		
Senhora Professora,		
Informamos Vossa Senhoria que após análise por um relator e, tendo sido atendida a solicitação dessa Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o projeto de pesquisa <b>Descrição da distribuição da proteína nuclear fibrilarina no epitélio seminífero de mamíferos e caracterização do seu papel na manutenção da fisiologia de chromatoid bodies</b> , de sua autoria, foi novamente avaliado pelo relator e considerado <b>APROVADO</b> , por esta Comissão em reunião realizada no dia <b>19 de agosto de 2013</b> .		
Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.		
Atenciosamente,		
 Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Gârlet Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais		
<b>Profª Drª Rita Luiza Peruquetti</b> Docente do Departamento de Ciências da Saúde da USC		
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73 e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356 <a href="http://www.fob.usp.br">http://www.fob.usp.br</a>		