

UNISAGRADO
CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

MARINA BRASIL MATTOS

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CHROMATOID BODIES
EM CAMUNDONGOS BMAL1 WT E KO:
UMA INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO
SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA**

Bauru

2021

MARINA BRASIL MATTOS

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CHROMATOID BODIES
EM CAMUNDONGOS BMAL1 WT E KO:
UMA INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO
SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA**

Monografia de pesquisa parcial do curso de Biomedicina apresentado ao Programa Institucional de Iniciação Científica da UNISAGRADO (Edital 2020/2021), sob orientação da Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Bauru

2021

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

M435a	Mattos, Marina Brasil Análise ultraestrutural de chromatoid bodies em camundongos BMAL1 WT e KO: uma investigação dos efeitos do envelhecimento sobre a fertilidade masculina / Marina Brasil Mattos. -- 2021. 30f. : il. Orientadora: Prof. ^a Dra. Rita Luiza Peruquetti Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP 1. Espermatogênese. 2. Chromatoid body. 3. Ciclo circadiano. 4. Envelhecimento. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.
-------	--

Elaborado por Lidyane Silva Lima - CRB-8/9602

Dedico esta monografia aos meus avós maternos Neusa Renda Brasil e Mario Antônio Brasil por nunca desistiram de mim e sempre me incentivaram. Espero que estejam orgulhosos pela minha trajetória universitária.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela minha vida e pela permissão de chegar até aqui. Mesmo com as dificuldades que a vida nos trouxe nesse momento tão complicado, Sua presença sempre foi primordial para a garantia do meu conhecimento e experiência no ambiente universitário.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Rita Luiza Peruquetti, por todo apoio e paciência durante esse um ano de convivência, mesmo sendo remota. Sua contribuição científica para comigo foi essencial para a elaboração desta pesquisa me auxiliando a compreender ainda mais sobre o tema e me fazendo ficar apaixonar pela reprodução humana.

Ao Prof. Dr. Leandro de Andrade Holgado por me apresentar o lado mais lindo da genética em sua aula de embriologia clínica ministrado ainda em meu primeiro ano de faculdade. Suas aulas ficarão para sempre em minha memória.

Aos funcionários do Centro Universitário Sagrado Coração (UNISAGRADO), em especial a aqueles me auxiliaram no laboratório Wilson Aparecido Orcini e Fabiane Bortolucci dos quais me receberam com tanto acolhimento nesse momento complicado. Agradecimento especial à direção da UNISAGRADO por me proporcionar essa pesquisa com todo o apoio e disponibilidade possível.

À minha veterana Alicia Fontes Rocha, por todo apoio e auxílio na montagem do meu projeto, sempre disposta quando eu lhe enviava dúvidas e sempre muito clara com as suas dicas.

Às minhas colegas de iniciação científica, Jéssica Gong e Marina Molina que estiveram ao meu lado desde o início do projeto, sempre dispostas a ajudar e a compartilhar conhecimentos.

Aos meus familiares, em particular, aos meus avós maternos Sr. Mario Antônio Brasil e Sra. Neusa Renda Brasil, que lutaram e batalharam para que eu fosse a pessoa mais feliz do mundo e tivesse todo apoio, seja ele psicológico ou financeiro. Agradeço imensamente por nunca deixarem de acreditar em mim, até quando eu mesma já não acreditava. Sem vocês dois eu não seria nada.

Aos meus avós paternos, especialmente a Sr. Nair da Silva Mattos que mesmo de longe sei que orava por mim e pela minha vitória.

Agradeço também aos meus pais Fabiana Renda Brasil Mattos e Ronaldo Mattos, a minha irmã mais nova Clara Brasil Mattos e aos meus tios, em especial, minhas tias Fernanda e Karoline e meus tios Mario Jr. e Roberto por todo apoio e auxílio durante essa pequena jornada.

Aos meus primos Laura e Rafael que por muitas vezes me tiraram boas risadas quando tudo parecia estar ruim. E a minha afilhada Livia, que a cada sorriso me deixava ainda mais forte para continuar.

À um membro que chegou em minha vida no início da redação deste projeto, uma amiga irreparável com um amor inigualável. Obrigada minha cachorra Jade, pela sua fiel companhia em todas as madrugadas em claro redigindo esse projeto, sem a sua presença tudo seria completamente sem graça.

À todas as minhas amigas da UNISAGRADO, que fizeram parte dessa trajetória e souberam com muita destreza me acalmar e me orientar quando as coisas ficavam difíceis. Andressa Pitaguary Zorzetto, Carolina Fernandes Benites e Maria Vitória Unzer Campanucci, meus sinceros agradecimentos a vocês.

Ao meu namorado Igor, por estar presente mesmo que indiretamente na escrita desse projeto me incentivando sempre a ser uma boa estudante e futura profissional biomédica.

E por fim agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Projeto Regular FAPESP Associado 2016/04580-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro, permitindo assim que o presente projeto fosse estudado e redigido com eficiência e fidedignidade.

RESUMO

A espermatogênese é o processo para a formação dos espermatozoides e ocorre na puberdade masculina, nessa fase as células germinativas masculinas passam por diversas modificações celulares com base na sua morfologia e no seu aspecto bioquímico, ou seja, essas células sofrem várias divisões meióticas até se tornarem espermatozoides maduros. Ao decorrer da espermatogênese pode ser identificado a formação de uma organela citoplasmática conhecida como *chromatoid body*, da qual executa papéis de extrema importância para a formação dos espermatozoides, como a regulação do RNA mensageiro, o controle de expressão gênica por pequenos RNAs e a comunicação celular entre as espermatides redondas. Foi constatado que na formação de *chromatoid bodies* em camundongos BMAL1 KO não expressam a proteína BMAL1, de extrema importância para a determinação do ciclo circadiano. Este ciclo tem a função de controlar a homeostasia do organismo e a perda de sua consistência está altamente relacionado com o envelhecimento, pois essa fase está diretamente associada com as alterações fisiológicas que ocorrem no organismo, como por um exemplo na fertilidade masculina. Para a execução do presente trabalho foram utilizados túbulos seminíferos provenientes de: 16 camundongos machos da linhagem Swiss BMAL1 WT e 15 camundongos machos da linhagem Swiss BMAL1 KO, divididos em grupos de acordo com a idade: jovens, adultos e velhos. Nos resultados foi possível observar a presença das estruturas citoplasmáticas masculinas, os *chromatoid bodies*, em microscopia eletrônica de transmissão, havendo uma única lâmina para cada faixa etária de uma determinada espécie em diversos estágios do desenvolvimento. Portanto, essa análise possibilitou concluir que nos camundongos WT adultos o CB ocorre com a morfologia esperada e nos velhos observa-se certa desorganização, já nos camundongos KO essa desorganização estrutural do CB é observada já no citoplasma das espermatides dos animais adultos, sendo que nos velhos a desorganização é quase total, deixando evidente que a proteína BMAL1 é essencial para o processo de organização dos CBs e sua ausência pode levar o comprometimento dessa estrutura ao decorrer do desenvolvimento.

Palavras-chave: *espermatogênese, chromatoid body, ciclo circadiano e envelhecimento.*

ABSTRACT

The spermatogenesis is a process for sperms formation, and it occurs in male puberty, in this phase the male germ cells go through various cell modifications based on their morphology and their biochemical aspect, meaning, these cells suffer diverse meiotic divisions until they became mature sperms. During spermatogenesis it can be identified the formation of a cytoplasmic organelle, known as *chromatoid body*, which executes a role of extreme importance for the formation of the sperms, like the regulation of the messenger RNA, the gene expression's control for small RNAs and the cell communication between the round spermatids. It was verified that on the *chromatoid bodies* formation in BMAL1 Ko rats it doesn't express the BMAL1 protein, of extreme importance for the determination of the circadian rhythm. This rhythm has the function of controlling the organism homeostasis and the loss of its consistency is highly related to aging, because this phase is directly associated to physical changes that happens in the organism, for example in the male fertility. To the execution of the current study, It was used seminiferous tubules from: 16 male rats of the Swiss BMAL1 WT lineage and 15 male rats of the BMAL1 KO lineage, divided in groups according with the age: young, adult and old. On the results it was possible observing the presence of male cytoplasmic structures, the *chromatoid bodies*, in electron microscopy transmission, having a single slide for each age group of a certain species in various development stages. Therefore, this analysis enables concluding that on the WT adult rats the CB occurs with the expected morphology and on the old ones it's noticed this certain disorganization, whereas on the KO rats this structural disorganization of CB is early noticed on the cytoplasm of the adult animals' spermatids, when on the old ones this disorganization is almost complete, making it evident that the BMAL1 protein is essential for the CBs organization progress and its absence can lead to the commitment of this structure during its development.

Keywords: *spermatogenesis, chromatoid body, circadian rhythm, and aging.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA.....	10
1.1	ESPERMATOGÊNESE E <i>CHROMATOID BODY</i>	10
1.2	CICLO CIRCADIANO E ENVELHECIEMNTO.....	11
1.3	ENVELHECIMENTO E FERTILIDADE MASCULINA	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	MODELOS BIOLÓGICOS.....	14
2.2	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE CB E ESPERMÁTIDES INICIAIS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	14
3	RESULTADOS	16
3.1	ANÁLISE DAS LÂMINAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	16
4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	18
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

1.1 ESPERMATOGÊNESE E *CHROMATOID BODY*

A espermatogênese é a fase para a formação dos espermatozoides e possui como células iniciais as espermatogônias. O início desta fase ocorre na puberdade masculina, quando o número de espermatogônias aumentam e sofrem diversas divisões mitóticas, se transformando então em espermatócitos primários. Logo após essa primeira divisão, as células só sofrerão divisões meióticas – divisão exclusiva de células germinativas - da qual é responsável por reduzir o número de cromossomos pela metade e originar células haploides, até que se tornem espermatozoides maduros (MOORE & PERSAUD, 1995).

As espermatogônias são encontradas no órgão sexual masculino, mais precisamente nos testículos, dos quais é subdividido em compartimento intertubular e tubular. A divisão intertubular é composta em sua maioria por células de Leyding, das quais possuem a importante função de secretar o hormônio testosterona. Já divisão tubular é formada pelos túbulos seminíferos, cuja em suas paredes são encontradas células germinativas em diversos estágios de desenvolvimento, além das células de Sertoli (MURTA; GOMES; MARTINEZ, 2013).

Estas células germinativas, conhecidas como células de Sertoli, são encontradas em vários pontos da base do túbulo ao lúmen, e possuem funções que agregam o processo da espermatogênese, como por um exemplo, nutrem as células germinativas no decorrer do seu desenvolvimento (HESS, 1999).

De acordo com Sharma e Agarwal (2011), essa fase é iniciada através dos controles hormonais provenientes do hipotálamo, uma importante região no diencéfalo que possui a função de homeostasia entre o sistema nervoso e o sistema endócrino. O principal hormônio liberado por essa região, é o hormônio liberador de gonadotrofina, mais conhecido também como GnRH, do qual estimula a adeno-hipófise – parte anterior da glândula hipófise - a liberar o hormônio folículo estimulante (FSH) que irá agir nos testículos impulsionando a proliferação das células de Sertoli.

Em alguns vertebrados como pássaros e mamíferos, é um processo que ocorre dentro do tecido germinativo, que pode ser organizado na forma de estruturas tubulares chamados de túbulos seminíferos que está armazenado dentro dos testículos (PERUQUETTI; ORCINI, 2018).

Uma característica importante típica da espermatogênese é a presença de uma estrutura citoplasmática nos gametas masculinos, conhecida como *chromatoid body* (CB). Esta organela

é observada no citoplasma de espermatócitos primários na prófase I da meiose, mais precisamente no estágio tardio do paquíteno e durante o início da espermatogênese é visto próximo ao complexo de Golgi (PARVINEN 2005).

Segundo o estudo de Peruquetti (2009), ainda existem muitas incertezas sobre qual é a verdadeira função do CB e qual seria a sua real origem. No estudo, é proposto que esta organela se origina, possivelmente, de um material presente no nucléolo do qual migra para o citoplasma formando pequenas “nuages” que se unem fortemente umas às outras, e outra proposta seria que, o CB é oriundo de um material existente entre um aglomerado de mitocôndrias presentes nas células germinativas.

Contudo Peruquetti (2015) realizou um estudo onde foi concluído que o CB executa papéis de extrema importância nos passos para a geração dos espermatozoides, como a regulação do RNA mensageiro, o controle do gene por pequenos RNAs e a comunicação celular entre as espermátides redondas. Além do mais, com o uso de técnicas histoquímicas, foi identificado a presença de inúmeras proteínas no CB, além de miRNA, piRNA e mRNA.

Foi constatado que na formação dos *chromatoid bodies* em camundongos BMAL1 KO, duas proteínas transientes (CLOCK E BMAL1), possuem distribuição intrigante durante a espermatogênese, das quais se alojam em CBs. Além do mais, observaram que os animais cujo sofreram um bloqueio da proteína BMAL1, tiveram alterações morfológicas em seus CBs (PERUQUETTI; DE MATEO; SASSONE-CORSI, 2012).

1.2 CICLO CIRCADIANO E ENVELHECIMENTO

Existem ritmos biológicos que são controlados por sincronizadores externos, como a luz, a alimentação e entre outros. Esses ritmos variam em torno de vinte e quatro horas, do qual ocorrem fenômenos fisiológicos, bioquímicos e até mesmo comportamentais que são essenciais para a nossa sobrevivência. O evento descrito é mais conhecido como ciclo circadiano ou ritmo circadiano (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2008).

Vitaterna et. al (2001) relata que, os ciclos circadianos são controlados pelas proteínas, CLOCK (*circadian locomotor output cycle proteins kaput*) e BMAL1 (*brain and muscle ARNT-Like 1*), que foram descobertas através de uma experiência, no qual camundongos foram submetidos a agentes mutagênicos, resultando assim em uma mudança no ritmo circadiano desses animais, ou seja, descontrolando as proteínas em questão.

Os mesmos autores citam que, no cruzamento entre esses camundongos mutantes, foi notado que a modificação estava localizada em um gene, cujo poderia ser responsável por equilibrar o comportamento circadiano, este gene é denominado CLOCK. Após a descoberta do primeiro gene, foi também evidenciado o gene BMAL1 que faz parte da temporização de mamíferos, isto é, na regulação dos ritmos circadianos, da temperatura e da secreção hormonal.

Este ciclo colabora no controle homeostático, do qual comanda diversas ações fisiológicas e metabólicas, com isso é altamente associado à várias doenças como diabetes tipo dois, distúrbios de sono e alimentares, Alzheimer, obesidade e distúrbios psiquiátricos. É notado que a perda de consistência do ciclo circadiano, está relacionado com as características do envelhecimento e é destacado eventos durante o ritmo que estão relacionados com o metabolismo de lipídeos, a sensibilidade à insulina, o controle do ciclo celular e o reparo de DNA, que são essenciais para a promoção de um envelhecimento saudável (OROZCO; SASSONE-CORSI, 2014).

Os ritmos circadianos diminuem com o processo de envelhecimento mesmo com a ausência de uma patologia, pois o envelhecimento causa uma atenuação no controle desses ciclos, que por sua vez podem afetar na diminuição da taxa da atividade celular (CORNELISSEN; OTSUKA, 2016; OROZCO-SOLIS; SASSONE-CORSI, 2014).

1.3 ENVELHECIMENTO E FERTILIDADE MASCULINA

A evolução do envelhecimento é progressiva e a sua gravidade varia de indivíduo a indivíduo, com base nisso é notado que o envelhecimento biológico está relacionado diretamente ao envelhecimento orgânico, ou seja, nas alterações fisiológicas como a diminuição da funcionalidade de alguns órgãos, podendo chegar até a falência completa destes (SANTOS, 2015). O mesmo autor identifica que a fertilidade masculina se mantém ao longo da vida, contudo há uma diminuição na função, devido às modificações no organismo. Uma dessas modificações é a escassez da produção de testosterona, especialmente após os quarenta e cinco anos.

O envelhecimento envolve alterações neurobiológicas estruturais, funcionais e químicas. Também é de grande influência sobre o organismo os fatores ambientais e socioculturais, como o estilo de vida, alimentação e exercícios que são relacionados ao envelhecimento sadio ou patológico. A prevenção primária para um envelhecimento saudável

se refere à atenção sob os riscos ambientais e pessoais que podem desencadear doenças, como fatores genéticos e idade (SANTOS; ANDRADE; BUENO, 2009).

De acordo com a OMS (2015) o envelhecimento no nível biológico está relacionado com a abundância de danos moleculares e celulares e esse danos levam a perda gradual nos processos fisiológicos do organismo.

Alvarez et al. (2003) evidenciaram que uma determinada geração de ratos machos BMAL1 se apresentam estéreis devido deficiências na esteroidogênese. Outro dado interessante sobre esses modelos biológicos é que eles possuem um fenótipo de envelhecimento precoce. Peruquetti et al. (2012), descreveram as alterações morfológicas que ocorrem no *chromatoid body* das espermátides redondas encontradas nessa geração, questionavam se esses defeitos na organização molecular dos CBs poderiam ser a causa provável para a infertilidade e, também, se isso teria alguma relação com o processo de envelhecimento precoce.

Contudo, Silva et al. (2012) em suas pesquisas analisaram a possibilidade de a infertilidade masculina estar de fato relacionada ao envelhecimento, no estudo é destacado que para os homens a produção de gametas é contínua, isto é, acontece ao longo da vida. No entanto ainda há dúvidas em relação parâmetros sobre a formação dos gametas e a idade avançada, pois muitos estudos ainda se contradizem ao relatarem os casos.

O objetivo do presente trabalho é a realização de experimentos *in vivo* com segmentos de túbulos seminíferos, para análise de parâmetros relacionados ao *chromatoid body* (CB), de acordo com o seu tamanho, número e forma, em camundongos BMAL1 KO e BMAL1 WT em diferentes idades. Podendo assim verificar se o envelhecimento e/ou a ausência da proteína BMAL1 interferem na organização morfológica dos CBs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MODELOS BIOLÓGICOS

Foram analisadas 9 lâminas da espécie de camundongos BMAL1 WT e 7 lâminas da espécie de camundongos BMAL1 KO, divididos por idade da seguinte forma: 3WT com 70-100 dias de idade e 2KO com 50-100 dias de idade (jovens); 3WT com 101-130 dias de idade e 3KO com 111-130 dias de idade (adultos); 3WT e 2KO acima de 131 dias de idade (velhos), utilizando a microscopia ótica no aumento de 40x.

Após a análise total das 16 lâminas contendo cortes semi-finos corados com Azul de Toluidina, foi feita uma triagem para a escolha do melhor corte das lâminas e anotações sobre as características dos túbulos seminíferos que se apresentavam maduros.

A divisão dos grupos analisados está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Representação dos grupos analisados no presente projeto.

<i>GRUPOS ANALISADOS</i>
Grupo 1 (n=3): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 WT com 70-100 dias (jovens).
Grupo 2 (n=3): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 WT com 101- 130 dias (adultos).
Grupo 3 (n=3): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 WT com > 131 dias (velhos).
Grupo 4 (n=2): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 KO com 50-100 dias (jovens).
Grupo 5 (n=3): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 KO com 111-130 dias (adultos).
Grupo 6 (n=2): Lâminas de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 KO com > 131 dias (velhos).

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE CB E ESPERMÁTIDES INICIAIS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Nessa etapa do presente projeto ocorreram as análises morfológicas de CB e espermátides iniciais, onde foram utilizados segmentos de aproximadamente 0,5mm de túbulos seminíferos nos estágios do ciclo espermato gênico IV-VI, pois são os estágios onde

encontramos espermátides iniciais em maior quantidade, identificados com microscópio de transiluminação. No caso dos túbulos seminíferos dos animais BMAL1 KO foram coletados fragmentos aleatórios, pois os mesmos não possuem diferenciação de estadiamento de ciclos espermatogênicos, devido à ausência de espermatogênese completa.

Posteriormente, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 3% e ácido tânico a 0,25% em tampão Miloning, pH 7,3, durante 2 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%), durante 2 horas em geladeira, e em seguida, essas amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas, em baterias de acetona em ordem crescente de concentração e passarão por uma infiltração em araldite pura por 2 horas, a 37°C. Desses fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos (cujas análises preliminares já se encontram descritas no item 3.2) e ultra-finos, em ultramicrotomo. Os cortes ultra-finos foram coletados em grids e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e, depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1N, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) se apresentam documentados por eletromicrografias obtidas com sistema analisador de imagens.

Em cada grupo experimental foram analisados parâmetros como: (1) Tamanho de CBs; (2) Número de CBs; (3) Forma de CBs.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DAS LÂMINAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise ultra-estrutural foi utilizada para acompanhar a formação do *chromatoid body* (CB) durante a espermatogênese de ratos das espécies BMAL1 WT e BMAL1 KO, considerando que as células germinativas masculinas usadas estão em diversos estágios do desenvolvimento. A organela citoplasmática masculina conhecida como CB, geralmente está localizada no citoplasma das células germinativas, próxima a área externa do envoltório nuclear, dependendo da fase de desenvolvimento. As faixas etárias, quanto as espécies de camundongos estão destacados na figura 1, havendo uma única lâmina para cada faixa etária de uma determinada espécie. Nas figuras 1A, 1C e 1E, pode-se observar a ultra-estrutura das espermátides redondas pertencentes as espécies BMA1 WT, onde é possível perceber a presença da molécula CB nos diversos estágios de desenvolvimento, porém, possuindo diversos formatos. Nas figuras 1A e 1E o CB aparece fragmentado, pequeno e na região oposta ao nucléolo, sendo possível observar a presença adjacente de um aglomerado de mitocôndrias (Figura 1E). O CB aparece integro, grande e próximo ao envoltório nuclear, com a presença de algumas mitocôndrias ao seu redor (1C). Nas figuras 1B, 1D e 1F, pode-se analisar a ultra-estrutura das espermátides redondas pertencentes as espécies BMAL1 KO, onde não é possível observar a presença de CB em um formato inteiro, mas sim somente em fragmentos próximos a mitocndrias (Figuras 1B e 1D). Não há vestígio da molécula CB no citoplasma celular (Figura 1F), sendo perceptível somente a presença de um aglomerado de mitocôndrias ao redor do envoltório nuclear. É possível perceber que as células jovens das espécies WT e KO apresentam o CB fragmentado, contudo a molécula na espécie WT está na posição contrária ao do nucléolo e sem nenhuma presença de mitocôndrias, diferente da outra espécie, onde a molécula se encontra próxima ao nucléolo e a um aglomerado de mitocôndrias (Figuras 1A e 1B). Na fase de desenvolvimento intermediário, denominado como adultos, o CB está em um formato globuloso e grande e bem próximo ao envoltório nuclear na espécie WT, já na espécie KO a molécula se apresenta bem pequena, fragmentada e distante do nucléolo (Figuras 1C e 1D). Nas figuras 1E e 1F pode-se observar células germinativas no seu último estágio de desenvolvimento, possuindo um CB fragmentado, próximo a um aglomerado de mitocôndrias e na posição antagônica ao nucléolo.

Figura 1: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de camundongos BMAL1 WT e KO. A, B e E: Espermátides redondas com *chromatoid bodies* (CB) fragmentados (setas), sendo possível observar a presença de mitocôndrias (asterisco) nas regiões adjacentes aos CBs e aos envoltórios nucleares, possuindo um distanciamento da organela em relação ao nucléolo (nu). C: Espermátide redonda com a presença de um CB globuloso e compacto (seta) próximo ao envoltório nuclear, podendo-se observar mitocôndrias (asterisco) próximas ao envoltório e a organela. D: Célula germinativa com a presença de um CB fragmentado, pequeno (seta) e próximo a mitocôndrias (asterisco), o mesmo se encontra localizado na posição oposta ao nucléolo (nu). F: Espermátide não contém a organela CB em sua ultra-estrutura, possuindo somente mitocôndrias (asterisco) aos arredores do envoltório nuclear.

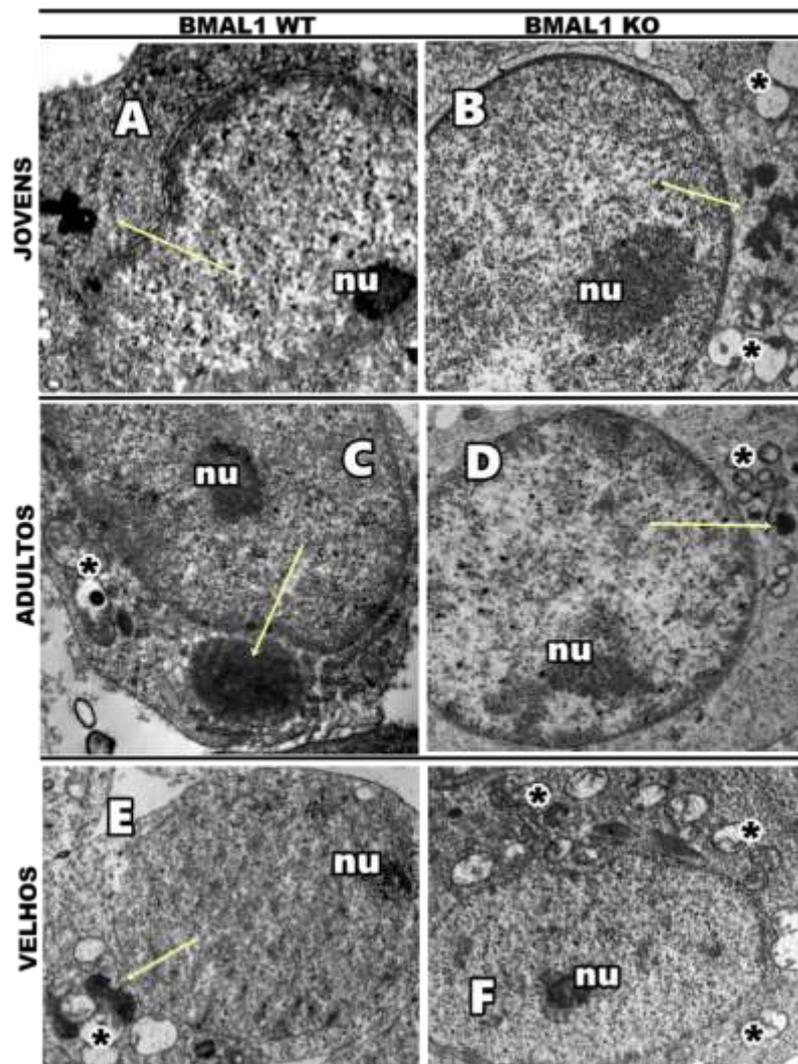


Figura 1: Elaborado pela autora.

4 DISCUSSÃO

O evento iniciado na puberdade masculina, também conhecido como espermatogênese, tem como função transformar as espermatogônias, das quais são as células germinativas iniciais, em espermatozoides maduros (MOORE & PERSAUD). Os mesmos autores ainda frisam que, as divisões meióticas sofridas pelas células iniciais ocorrem dentro do testículo masculino, mais precisamente no epidídimo, pela ajuda das Células de Sertoli das quais irão nutrir as células germinativas em seus diferentes estágios de desenvolvimento.

De acordo com Peruquetti (2009) em toda célula germinativa do reino animal, existe uma estrutura conhecida como *chromatoid body* ou corpo cromatóide (CB), da qual sua real origem é algo incerto. Contudo, foram descobertas diversas funções das quais o CB pode atuar, como na comunicação celular entre as espermátides ou até mesmo coordenar o controle pós-transcricional de produtos gênicos nas células germinativas.

No entanto, para os mamíferos a chave mestra para um bom funcionamento de todas as funções metabólicas do corpo, é conhecida como ciclo circadiano. Esse ritmo biológico possui diversos mecanismos dos quais regulam a homeostasia do organismo controlando o consumo de energia e as despesas produzidas. As engrenagens centrais desse evento fisiológico são as proteínas BMAL1 e CLOCK, e se porventura essas macromoléculas sofrerem algum tipo de perturbação, é indubitável que ocorrerá um desencadeamento de alterações metabólicas, incluindo a formação de novas células (OROZCO-SOLIS et al., 2016).

Com isso, fica mais que evidente que o CB é uma importante estrutura citoplasmática que pode ser responsável pela determinação da fertilidade masculina na espermatogênese. Deste modo, é possível relacionar os defeitos na fertilidade com as proteínas centrais do ciclo circadiano, caso não tenham sido produzidas corretamente (PERUQUETTI; DE MATEO; SASSONE-CORSI, 2012).

Além disso, essas estruturas proteicas possuem um bom desempenho quando o homem está na fase adulta de seu desenvolvimento, pois com o processo do envelhecimento ocorre uma diminuição no controle dos ritmos circadianos, que por consequência podem afetar na diminuição de toda atividade celular (CORNELISSEN; OTSUKA, 2016).

Em uma pesquisa realizada por Peruquetti et al (2012) camundongos das espécies WT, BMAL1 KO e Clock KO foram submetidos a análise de suas espermatogônias para a detecção de seus CBs. Foi concluindo que, os roedores que não possuíam a proteína CLOCK em suas células germinativas, como os WT e *Clock* KO, portavam uma deficiência da proteína

BMAL1 em seus testículos, acontecimento do qual está ligado a integridade do CB, isto é, a ausência da proteína BMAL1 causa infertilidade em camundongos WT e *Clock* KO.

Em outro estudo feito por Alvarez et al. (2008) com base em camundongos, é relatado que os animais, tanto machos quanto fêmeas, que não possuíam em seu organismo a proteína BMAL1 apresentavam infertilidade. Além disso, cita os defeitos de fertilidade em camundongos BMAL1 KO, dos quais apresentavam baixa testosterona e altas concentrações de LH sugerindo assim uma deficiência na células que expressam a proteína BMAL1, as células de Leydig.

Como resultado, as análises do presente projeto demonstram que não há diferença significativa na organização do CB entre os camundongos BMAL1 WT e KO jovens. Contudo, nos animais WT adultos a organização do CB ocorre com a morfologia esperada e já nos velhos observa-se uma moderada desorganização. Nos camundongos KO essa desorganização é observada já no citoplasma das espermátides dos animais adultos, sendo que nos velhos a desorganização é quase total. Conclui-se que a proteína BMAL1 pode afetar a organização dos CBs e sua ausência pode levar ao comprometimento dessa estrutura no decorrer do processo de envelhecimento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises demonstram que não há diferença relevante na organização do CB entre animais BMAL1 WT e KO jovens, no entanto, fica evidente que a organização do CB nos WT adultos ocorre com a morfologia esperada e nos velhos observa-se certa desorganização. Nos camundongos KO essa desorganização estrutural do CB é observada já no citoplasma das espermatídes redondas dos animais adultos, sendo que nos velhos a desorganização é quase absoluta. Dessa maneira, pode-se concluir que a proteína BMAL1 pode afetar a organização da organela citoplasmática masculina, *chromatoid body*, e sua ausência pode levar prejuízo a essa estrutura no processo do envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, J. D. *et al.* The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice. **Journal Of Biological Rhythms**, [S.I], v. 23, n. 1, p. 26-36, 01 fev. 2008. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0748730407311254>. Acesso em: 12 out. 2021.
- ALVAREZ, J.D., CHEN, D., STORER, E., SEHGAL, A., 2003. **Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis**. *Biol. Rep.* 69, 81–91.
- CORNELISSEN, G; OTSUKA, K. Chronobiology of Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016.
- HESS, REX A. **Spermatogenesis, Overview**. 1999. 8 f. University Of Illinois At Urbana, Illinois, 1999.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. Traduzido por Fernando Simão Vugman. 4ª ed. Ed. Guanabara Koogan. 1995, p.17.
- MURTA, Danillo Velloso Ferreira; GOMES, Viviane Cristine Leite; MARTINEZ, Lorena Catalina Rodriguez. A Organização Celular dos Testículos de Mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 20, jan. 2013. Semestral. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/0PbEOM8vhpKbA8V_2013-6-21-15-52-4.pdf. Acesso em: 18 jul. 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde**. Genebra, 2015. 28p.
- OROZCO-SOLIS, R; SASSONE-CORSI, P. Circadian clock: linking epigenetics to aging. **Curr Opin Genet Dev.**, v.26, p.66-72, 2014.
- OROZCO-SOLIS, Ricardo *et al.* The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. **Cellpress: Cell Metabolism**, [S.I], v. 23, n. 3, p. 467-478, 08 mar. 2016. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131\(16\)30051-1](https://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131(16)30051-1). Acesso em: 20 out. 2021.
- PARVINEN, MARTTI. **The chromatoid body in spermatogenesis**. 2005. p.189-201. Department Of Anatomy, University Of Turku, Finland, 2005.
- PEREIRA, DANYELLA SILVA; TUFIK, SERGIO; PEDRAZZOLI, MARIO. **Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos**. 2008. p.63-71. Revista Brasileira de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PERUQUETTI, R.L., ORCINI, W.A. **Spermatogenesis**. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, xxxx, 2018.
- 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.** 7, e.42695. 2012.

PERUQUETTI, Rita Luiza. Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de alguns vertebrados. 2009. 127 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/102725>

SANTOS, FLÁVIA HELOÍSA dos; ANDRADE, VIVIAN MARIA; BUENO, ORLANDO FRANCISCO AMOEDO. **Envelhecimento: um processo multifatorial**. 2009. v. 14, n.1, p.3-10. Maringá, 2009.

SANTOS, J.T.C., **Fertilidade masculina e envelhecimento**. 2015. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina). Universidade de Coimbra.

SHARMA, Rakesh; AGARWAL, Ashok. **Spermatogenesis: An Overview**. 2011. 24 f. Cleveland Clinic, Cleveland, 2011.

SILVA, Liliane Fi *et al.* Idade masculina: qualidade do sêmen e fertilidade: idade masculina x qualidade seminal. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**. Ribeirão Preto, p. 91. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287324912_Male_age_Semen_quality_and_fertility_Age_X_male_semen_quality. Acesso em: 09 set. 2021.

VITATERNA, MARTA HOTZ; TAKAHASHI, JOSEPH S.; TUREK, FRED W. **Overview of circadian rhythms**. 2001. p.85-93.