

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

JÉSSICA YAN GONG

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE NUCLÉOLOS DAS ESPERMÁTIDES REDONDAS
DE CAMUNDONGOS BMAL1 WT E KO: UM ENFOQUE DURANTE O PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO

BAURU

2021

JÉSSICA YAN GONG

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE NUCLÉOLOS DAS ESPERMÁTIDES REDONDAS
DE CAMUNDONGOS BMAL1 WT E KO: UM ENFOQUE DURANTE O PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO

Monografia de iniciação científica
apresentado ao centro de ciência da saúde
do Centro universitário Sagrado Coração,
sob orientação da Prof.^a Dr.^a Rita Luiza
Peruquetti.

BAURU

2021

JÉSSICA YAN GONG

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

G635a	<p>Gong, Jessica Yan</p> <p>Análise ultraestrutural de nucléolos das espermátides redondas de camundongos Bmal1 wt e KO: um enfoque durante o processo de envelhecimento / Jessica Yan Gong. -- 2021. 20f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti</p> <p>Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Espermatogênese. 2. Ciclo circadiano. 3. Chromatoid body. 4. Camundongos geneticamente modificados. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.</p>
-------	---

RESUMO

O testículo é um órgão reprodutor que possui anatomia complexa por ser fonte de liberação de andrógenos na corrente sanguínea. A função deste órgão reprodutor inclui controle dos ritmos biológicos e produção de células germinativas masculinas. A espermatogênese é uma sequência de eventos desempenhado por células espermatogênicas, regulada pelo ciclo circadiano que controla o organismo de forma interna dentro de um período de 24h como reações metabólica, hormonais e proteínas associadas diretamente com a anatomia reprodutiva comandado pelo sistema nervoso central (SNC). A escolha das linhagens *Bmal1* WT e *Bmal1* KO para este estudo tem como fundamento avaliar a mudança morfológica do nucléolo assim como a influência das proteínas *BMAL1* e *CLOCK* ou ausência delas. Na microscopia eletrônica foi possível identificar com mais detalhes a organização celular, densidade, posição e tamanhos das organelas. Os camundongos geneticamente modificados (K.O), da linhagem *Bmal1*, apresentam modificações no metabolismo, espermatogênese, ciclo circadiano e fertilidade alterada. O envelhecimento saudável está associado à ritmicidade pelos genes relógio, principalmente *Clock* e *Bmal1*. A alteração da expressão dos genes relógio muda conforme a idade, mas a alteração molecular desses genes pode impulsionar o envelhecimento como acontece nos animais da linhagem *Bmal1* KO.

Palavras-chave: Nucléolo, *CLOCK* *BMAL1*, Camundongos geneticamente modificados, Envelhecimento.

SUMMARY

The testis is a reproductive organ that has a complex anatomy as it is a source of androgen release into the bloodstream. The function of this reproductive organ includes controlling biological rhythms and producing male germ cells. Spermatogenesis is a sequence of events performed by spermatogenic cells, regulated by the circadian cycle that controls the body internally within a 24-hour period, such as metabolic, hormonal and protein reactions directly associated with the reproductive anatomy commanded by the central nervous system (CNS) . The choice of *Bmal1* WT and *Bmal1* KO strains for this study is based on evaluating the morphological change of the nucleolus as well as the influence of *BMAL1* and *CLOCK* proteins or their absence. In electron microscopy it was possible to identify in more detail the cellular organization, density, position and sizes of the organelles. Genetically modified (KO) mice, of the lineage *bmal1*, show changes in metabolism, spermatogenesis, circadian cycle and altered fertility. Healthy aging is associated with rhythmicity by clock genes, especially *Clock* and *Bmal1*. The alteration in the expression of clock genes changes with age, but the molecular alteration of these genes can drive aging as it happens in animals of the *Bmal1* KO lineage.

Keyword: Nucleolus, *CLOCK* *BMAL1*, Genetically modified mice, Aging.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CICLO CIRCADIANO E ESPERMATOGÊNESE

Ciclos circadianos são ritmos biológicos que regulam o organismo de forma interna em um ciclo de 24h, controlando atividades celulares como reações metabólicas, hormonais e proteínas associadas diretamente com a fisiologia reprodutiva, comandados pelo sistema nervoso central (SNC) resultando no envelhecimento saudável. Estímulos provindo do ambiente como a luminosidade, desencadeia diversas respostas ao sistema nervoso central como a quantidade de melatonina, hormônio ligado ao ciclo circadiano que varia durante o dia e noite. (FARHUD & ARYAN, 2018).

O processo fisiológico da espermatogênese é a função primária do testículo, estrutura anatômica complexa regulada pelo ciclo circadiano, fatores intrínsecos e hormonais. A testosterona, neurotransmissores (substâncias neuroendócrinas), fatores de crescimento secretados pelas células do interstício, túbulos seminíferos e células de Sertoli são os elementos essenciais da espermatogênese. (SHARMA, R & AGARWAL, A., 2011).

A espermatogênese é a formação de células germinativas masculinas que ocorre dentro dos túbulos seminíferos, sendo o epitélio seminífero dividido em 12 etapas morfológicas (etapas I-XII) em diferentes estágios de desenvolvimento (ESTENBELFED & EDQVIST 1996); (ABE, k; SHEN, L. S; TAKANO, H., 1991). Logo, a espermatogênese é uma sequência de eventos que é composto por células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) que sofrem mudanças metabólicas, ciclo celular e morfológicas conforme ocorre a mitose e meiose, com participação ativa das células de Sertoli, células de suporte e intercalando com a ação dos hormônios masculinos (MONTEIRO *et al.*, 2010).

A organização morfológica do epitélio seminífero é dividida em 12 estágios que compreendem diversas etapas necessárias para a transformação das células tronco em espermatozóide maduro. O desenvolvimento do acrossoma, divisões meióticas, forma do núcleo e liberação do esperma no lúmen do túbulo seminífero são períodos indispensáveis para diferenciação celular em cada estágio. Neste presente estudo, os estágios 4 a 6 dos túbulos seminíferos são o foco da análise histológica pois é possível identificar espermatogônias tipo A, primeira geração de espermatócito, primeira geração de espermatócito secundário e primeira geração de espermátides na microscopia de luz. Na análise ultra estrutural é possível identificar

com clareza a posição e tamanho do Nucléolo e Chromatoid Body. (SHARMA, R & AGARWAL, A., 2011).

1.2 GENES RELÓGIO E DNA

O primeiro estudo acerca do ciclo circadiano em mamíferos foi realizado em 1988 por Ralph e Menaker. O estudo revelou que os cronotipos são responsáveis geneticamente pelo funcionamento do sistema de temporização e são modificados conforme as adaptações ambientais. Diante desta pesquisa, descobriu-se que a modificação de um único gene é responsável por alterar totalmente a ritmicidade do ciclo circadiano. (PEREIRA, D *et al* 2009).

O gene *Clock* (*circadian locomotor output cycleskaput*), *Bmal1* (*Mop3*), *Cryptochromes* (*Cry* e *Cry 2*), *Period 1* (*Per1*), *Period 2* (*Per2*) e *Period 3* (*Per3*) são denominados de genes relógio e possui função complexa devido a regulação do ciclo sono vigília, alimentação, ingestão hídrica, regulação da temperatura corporal e regulação da secreção hormonal. Também são conhecidos *Rev-erba* (reverse erythroblastosis virus α) e *ROR α* (retinoid-related orphan receptor delta) como genes controlados por *Clock*. Acreditava-se que essas moléculas biológicas estavam presente apenas no núcleo supraquiasmático (NSQ), um importante coordenador da expressão rítmica, localizado na região anterior do hipotálamo, mas estudos recentes comprovam que além da presença do oscilador central no NSQ, é encontrado também em tecidos periféricos como coração, fígado e rim. (SILVA, J. A., 2017).

Pesquisas realizadas em camundongos detalham que a mutação nos genes relógios causará uma regulação circadiana anormal e como consequência a variação de períodos endógenos mais curtos ou mais longos. Animais *knock-out* dispõem da regulação anormal do ciclo sono-vigília, desregulação da secreção hormonal e ritmos circadianos, enquanto que animais *Bmal1* possuem atividade locomotora prejudicada em condições normais de luminosidade. O mau funcionamento de um dos genes que atuam na engrenagem do relógio molecular pode acarretar avanço ou atraso no tempo biológico (PEREIRA, D *et al* 2009).

A mecânica molecular do relógio biológico é controlada pelos temporizadores *Clock* e *Bmal1* que modula a expressão das moléculas do tempo formando um heterodímero encarregado pela formação e transcrição gênica de *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*. As proteínas codificadas e sintetizadas por estes genes, formam o dímero PER-CRY no citoplasma e em determinada concentração retornam ao núcleo, bloqueando o heterodímero

CLOCK/BMAL1 na transcrição dos próprios genes e constituindo uma alça de retroalimentação negativa de transcrição e tradução, bloqueando a formação de novos de PERs e CRYs. A alça de retroalimentação negativa inclui toda a transcrição e tradução dos genes relógios, executando como reguladora do ciclo circadiano durante 24h. Os genes *Per1* e *Per2* exibem reações diferentes a pulsos de luz, enquanto que *Per3* é isento de reação (SOUZA, P. Q. P., 2011).

Em acréscimo a mecânica molecular, os genes *Clock* e *Bmal1* englobam o comando *basic-helix loop-helix* que permite a interação da molécula de DNA com outros genes relógio promovendo o fator de transcrição, conhecidos como genes controlados pelo relógio (SOUZA, P. Q. P., 2011).

1.3 ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL

O envelhecimento saudável está associado à ritmicidade, regulado pelos genes relógio como *Clock*, *Bmal1*, *Per* e *Cry* presente no núcleo supraquiasmático e também nos tecidos periféricos que em conjunto promovem a homeostase do metabolismo e funcionamento da fisiologia. A perda de ritmo é consequência do envelhecimento e enfraquecimento do ritmo circadiano devido a redução da capacidade dos relógios biológicos de se ajustarem ao meio ambiente e redução das expressões da maquinaria molecular. Os relógios periféricos são acionados por estímulos primordiais provindo do relógio central, mas também de fatores como alimentação, exercício e causas que independem do comando primário (NAKAMURA *et al.*, 2015).

A alteração da expressão dos genes relógio muda conforme a idade mas também, a alteração molecular desses genes pode impulsionar o envelhecimento. Vários estudos têm mostrado que o avançar da idade em camundongos impacta os ritmos de atividade neural no núcleo supraquiasmático e em modelo de animais como *Bmal1* e *knockout*, o envelhecimento é acelerado devido a falta de ritmicidade dos genes e como sintoma, redução da expectativa de vida, fisiologia nutricional desregulada, catarata, declínio nas funções do tecido e sarcopenia (NAKAMURA *et al.*, 2015).

O ciclo circadiano de modelo de animais especificamente *Bmal1* e *knockout*, o sistema circadiano é alterado drasticamente e essa mudança tem efeitos adversos na saúde uma vez que afeta a atividade locomotora, sono vigília, homeostase metabólica e menor capacidade de tolerar mudanças no horário de luz (CHATTERJEE, S & MA, K., 2016).

1.4 INFERTILIDADE EM CAMUNDONGOS BMAL1 KNOCKOUTS (KO)

A infertilidade em camundongos geneticamente modificados (Knout) é determinada pelos genes inativados no genoma que recai sobre características fisiológicas e metabólicas (YAN, W, 2009).

Camundongos geneticamente modificados não expressam proteínas imprescindíveis (CLOCK e BMAL1) para a espermatogênese da mesma forma que camundongos selvagens. A ausência ou modificação destas proteínas resulta na desregulação da espermatogênese e distúrbios no processo de diferenciação das células germinativas masculinas devido aos baixos níveis de testosterona e alta concentração de hormônio luteinizante (LH), em razão da deficiência das células de Leydig e metabolismo hormonal, prejudicando a liberação da testosterona (SANTOS, E. G., 2017).

Em resumo, fatores como nutrição, hormônios e metabólitos podem influenciar no equilíbrio do ciclo espermático (SHARMAN, R & AGARWAL, A., 2011).

A capacidade reprodutiva dos camundongos *Bmal1 knockouts* (KO) é alterada devido à expressão ausente da proteína BMAL1 em todos os tecidos, tornando esses animais estéreis. Avaliações macroscópica e microscópica da anatomia reprodutiva em ambas linhagens demonstram que esses camundongos possuem deficiência no processo de esteroidogênese. Esses animais apresentam particularidades, testículos com tamanho menor do que os animais que não apresentam defeito na expressão de BMAL1 em seus tecidos (*Bmal1 wild type*), alterações no comportamento sexual e reduzido número de espermatozoides. Ademais, esse modelo biológico (*Bmal1, KO*) manifesta artropatia progressiva no fenótipo de envelhecimento (SANTOS, E. G., 2017).

1.5 CB E NUCLÉOLO NOS K.O

O processo fisiológico da espermatogênese acontece nos túbulos seminíferos com a participação de estruturas importantes como células espermatogênicas, Leydig, Sertoli, Chromatoid body e Nucléolo. O *Chromatoid body* (CB) é uma estrutura altamente especializada e densa presente nas células germinativas masculinas, responsável por parte da espermatogênese e atua como um coordenador nas várias vias de processamento da tradução do RNA e controle do RNAm pós transcricional devido a presença de proteínas transientes e genes relógio como *clock* (*circadian locomotor output cycleskaput*) e *bmal1*. Essa organela

citoplasmática é importante para determinação da fertilidade, uma vez que a mutação nos genes presentes no CB pode levar a parada da espermatogênese e conseqüentemente a infertilidade (PERUQUETTI, R. *et al.*, 2012).

Diante do evento da espermatogênese, os estágios 4 a 6 do ciclo espermático são elementares na visualização da estrutura do CB como um grânulo único, na microscopia eletrônica para animais WT essa estrutura é descrita como forma redonda típica semelhante a esponja com diferentes densidades de elétron, distintivamente do CBs de KO que tinha formas alteradas e tamanhos variados. O Chromatoid body totalmente ativos são essenciais para a diferenciação das espermátides redondas em espermátides maduros e ainda, colaborar no desenvolvimento da cauda dos espermatozoides maduros (PERUQUETTI, R. *et al.*, 2012).

A diminuição da expressão das proteínas circadianas CLOCK e BMAL1 está relacionada a propriedades proteossomas e componentes específicos de CB, proporcionando a manutenção da fertilidade dos indivíduos e prevenir contra os efeitos do envelhecimento (BOISVERT *et al.*, 2007).

O nucléolo é uma organização sem membranas dentro do núcleo, sítio celular da biogênese de ribossomos que tem como principal função o processamento do precursor do pré-rRNA e montagem do rRNA com proteínas ribossomais. Os genes ativos de DNA nessa organela estão localizados nos loci denominados de regiões organizadoras do nucléolo e são transcritos por moléculas de RNA polimerase I e a regulação da síntese de rRNA é um fator essencial no crescimento celular e atividade metabólica (L. COMAI, 1998).

Além da biogênese de ribossomos, o nucléolo é uma maquinaria de natureza multifuncional e produz outras partículas como ribonucleoproteínas, incluindo vários outros fatores como splicing, grânulos de estresse, siRNA, maturação da telomerase, partícula de reconhecimento de sinal e envelhecimento. O tamanho nucleolar se relaciona inversamente com a longevidade, sendo assim, nucléolos menores e fibrilarina reduzida indicam uma longevidade maior (TIKU *et al.*, 2017)

Portanto, o nucléolo é considerado o centro de montagem e qualidade de RNA pois desempenha uma importante função na taxa de crescimento celular e atividade metabólica por meio da produção ribossomal que recebe estímulos e eventos de sinalização das proteínas SRP (partícula de reconhecimento de sinal) em diferentes estágios do ciclo celular, regulando aspectos específicos para progressão e proliferação celular para eventos como a espermatogênese e espermiogênese. (BOISVERT *et al.*, 2007).

A análise de envelhecimento saudável pode ser correlacionada com os biomarcadores causais como o gene *Clock* que fazem alterações em centenas de locais no genoma juntamente

com os aspectos fisiológicos e parâmetros metabólicos. Na linhagem *Bmal1* KO da faixa etária adultos e velhos, principalmente, ocorre alteração no tamanho do nucléolo afetando a sua fisiologia e também a sua fertilidade devido a repressão da proteína BMAL1 e CLOCK dando ênfase à heterogeneidade biológica (TIKU *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente projeto foi investigar o nucléolo dos camundongos geneticamente modificados da linhagem BMAL1 WT e BMAL1 K.O, *in vivo*, para entender a influência das proteínas BMAL1 no processo de organização do nucléolo das células germinativas durante o envelhecimento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MODELOS BIOLÓGICOS

Foram utilizados 16 camundongos machos BMAL1 WT e 15 camundongos machos BMAL1 KO, divididos por idade da seguinte forma: 3WT com 70-100 dias de idade e 4KO com 50-100 dias de idade (jovens); 8WT com 101-130 dias de idade e 5KO com 111-130 dias de idade (adultos); 5WT e 6KO acima de 131 dias de idade (velhos). Os tecidos (testículos) desses animais foram cedidos em parceria com o Prof. Dr. Paolo Sassone-Corsi, *Department of Biological Chemistry* - UCI (Irvine, CA, EUA). Os procedimentos experimentais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/USC), sob protocolo número 2088080817. A divisão dos grupos de trabalho está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupo de estudo de camundongos selvagens (WT) e geneticamente modificados (KO) em diferentes estágios de idade.

Grupos Experimentais					
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
(G4, n=3): Túbulos	(G5, n=8): Túbulos	(G6, n=5): Túbulos	(G7, n=4): Túbulos	(G8, n=5): Túbulos	(G9, n=6): Túbulos
seminíferos de camundongos BMAL1 WT com 70-100 dias (jovens).	seminíferos de camundongos BMAL1 WT com 101-130 dias (adultos).	seminíferos de camundongos BMAL1 WT com 131 dias (velhos).	seminíferos de camundongos BMAL1 KO com 50-100 dias (jovens).	seminíferos de camundongos BMAL1 KO com 111-130 dias (adultos).	seminíferos de camundongos BMAL1 KO com 131 dias (velhos).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foram utilizados segmentos de aproximadamente 0,5mm de túbulos seminíferos nos estágios do ciclo espermatogênico 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 espermatogênese, 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 ultrafinos, em ultramicrótomo. Os cortes ultrafinos 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.

4 RESULTADOS

A escolha dos grupos em diferentes faixas etárias permite uma visualização mais precisa sobre as diferenças morfológica dos túbulos seminífero como maturação, presença de lúmen celular e produção de espermatozoides, ademais, compreender eventos importantes como a espermatogênese e espermiogênese. Neste estudo, foi feita a análise da ultraestrutura do nucléolo em microscopia eletrônica na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), tanto de camundongos *Bmal1* selvagens (WT) e geneticamente modificados *Bmal1* KO quanto ao tamanho e distribuição de proteínas em relação a diferentes idades.

Na figura abaixo, está representado o nucléolo (N), *chromatoid body* (CB) e envoltório nuclear (E.N). A escolha das duas linhagens de estudo tem como fundamento avaliar a mudança morfológica do nucléolo assim como a influência das proteínas *BMAL1* e *CLOCK* ou ausência delas. Na microscopia eletrônica é possível identificar com mais detalhes a organização celular, densidade, posição e tamanhos das organelas. Diante disso, percebeu-se que a linhagem *BMAL1* WT apresentou uma compactação maior do nucléolo nas idades jovens, adultos e velhos em relação a outra linhagem. A posição da organela pode variar, sendo mais próximo ou mais distante do envoltório nuclear, foi observado que nos grupos de camundongos jovens a posição do nucléolo esteve mais distante do envoltório nuclear enquanto que em adultos e velhos houve uma aproximação.

A linhagem *BMAL1* KO exibiu diferenças morfológicas em relação a compactação do nucléolo, tanto nas idades jovens e adultos o nucléolo estava mais frouxo quando comparado a linhagem *BMAL1* WT, diferindo apenas nos animais velhos na qual estava semelhantemente denso. A posição da organela nos jovens e adultos estava mais próxima do envoltório nuclear, em contrapartida dos em animais velhos de WT, mas a posição do nucléolo nos animais *BMAL1* KO velhos se parece com jovens e adultos *BMAL1* WT.

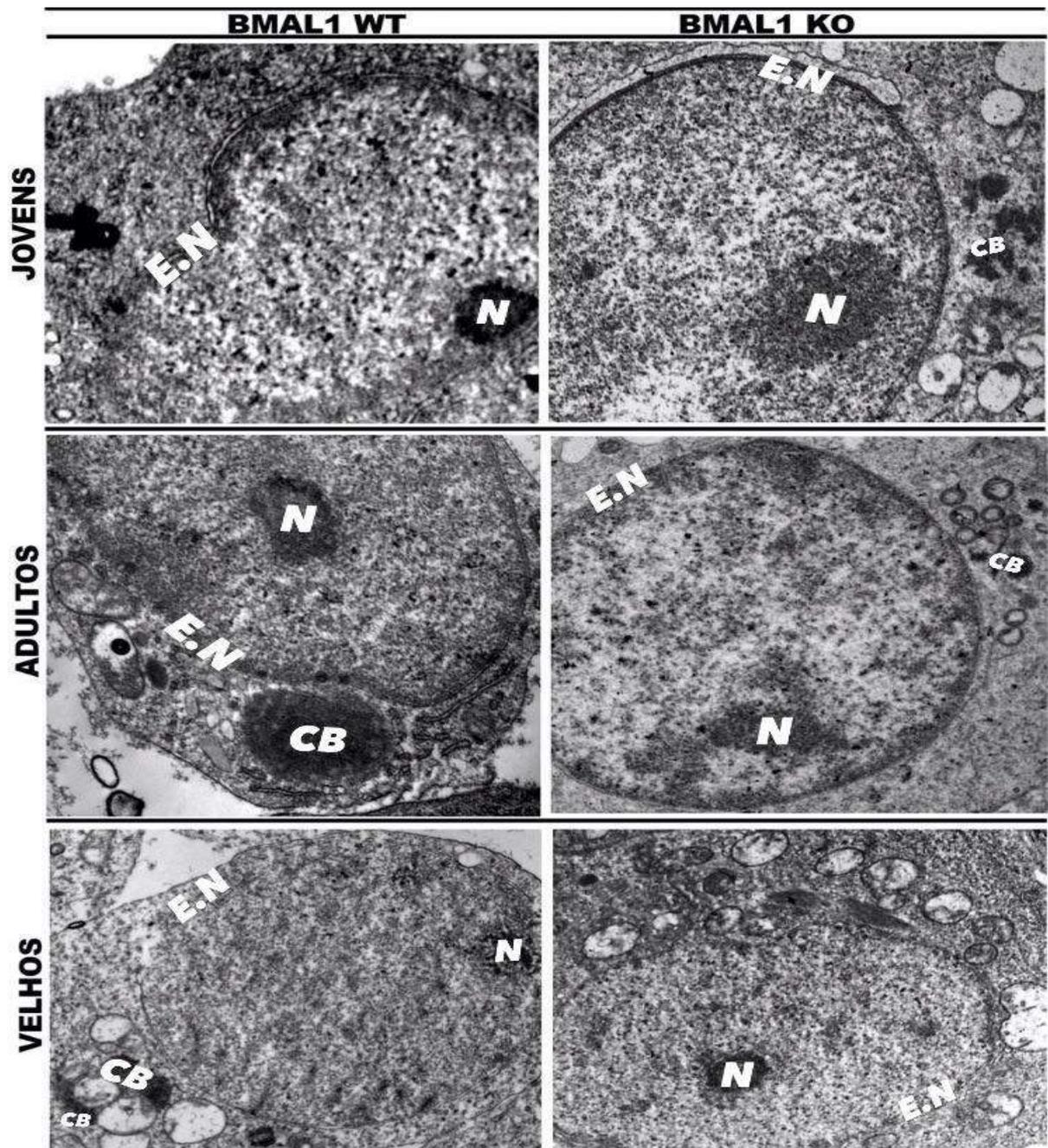


Figura 1: A análise ultra-estrutural foi utilizada para acompanhar, qualitativamente, a fragmentação do material nucleolar durante a espermatogênese dos modelos animais WT e KO. Na figura 1 pode-se observar a ultra-estrutura do nucléolo, chromatoid body, mitocôndria e envoltório nuclear nos diferentes estágios de desenvolvimento dos camundongos. Sugere-se que a mudança no tamanho do nucléolo assim como a posição próximo do envoltório nuclear das duas linhagens pode ser um indicativo de perda de ritmo circadiano e alteração das proteínas essenciais para o desenvolvimento. N=Nucléolo; CB=chromatoid body; E.N= envoltório nuclear.

5 DISCUSSÃO

A ação das proteínas relógios nas estruturas como *Chromatoid body* e Nucléolo tem uma grande relevância sobre a espermatogênese, espermiogênese e fertilidade porque essas duas estruturas estão associadas a formação de RNAs na transcrição e tradução de proteínas durante a formação da célula germinativa masculina. Animais de linhagem BMAL1 WT não apresentam alterações morfológicas devido a regulação do ciclo circadiano e também de genes responsáveis pelo amadurecimento das células germinativas e diferenciação das espermátides redondas em espermatozóide. Animais da linhagem BMAL1 KO geneticamente modificados sinalizam uma reorganização da estrutura morfológica de CBs e nucléolo dentro dos túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico devido a alteração das proteínas centrais do relógio como CLOCK e BMAL1, com conseqüente redução na viabilidade dos espermatozoides e deficiência na formação de espermátides redondas (PERUQUETTI, R. *et al.*, 2012).

A ausência de Bmal1 em células espermatogênicas testiculares de animais BMAL1 KO ou diminuição da expressão pode resultar no defeito direto da espermatogênese e converter-se em problemas de infertilidade. Isso ocorre devido ao desequilíbrio na organização da maquinaria CB associada ao silenciamento de mRNAs durante processos meióticos na diferenciação celular, provocando uma mudança no tamanho e compactação nuclear (PERUQUETTI, R. *et al.*, 2012).

O tamanho do nucléolo assim como a compactação pode indicar envelhecimento e longevidade. Nos animais BMAL1 WT foi observado nucléolos mais compactos e densos indicando alta ação da proteína fibrilarina que reduz o tamanho e estende a vida útil da organela e da célula. Nos animais BMAL1 KO foi constatado um nucléolo mais frouxo e mais disperso dentro do envoltório nuclear manifestando dispersão de proteínas e diferentes densidades em relação a centro fibrilar (FC), centro fibrilar denso (DFC) e componente granular (GC) (HUANG S, 2002).

O nucléolo é organizado em regiões de genes rRNA, denominado de regiões organizadora do nucléolo (NORs) ou região cromossômica e nele se subdivide em centro fibrilar, centro fibrilar denso e componente granular. Na microscopia eletrônica, a análise ultraestrutural dessas subdivisões possuem características específicas de coloração e fibrilas finas e densamente compactadas que se distribuem amplamente nas regiões centrais e periféricas da organela juntamente dos fatores de transcrição e componentes granulares enriquecidos com proteínas ribossomais e fatores de montagem (HUANG S, 2002).

A estrutura tripartida da organela composto por FC, DFC, GC pode estar sujeita ao estresse nucleolar que tem como características redução do tamanho e do volume do nucléolo, bloqueio da síntese de rRNA mediada pela Polimerase 1 e translocação nucleocitoplasmática de proteína relacionada ao estresse nucleolar. O estresse nuclear de padrão canônico é descrito como perturbação da biogênese ribossomal associada a distúrbios funcionais e estruturais que podem levar a ruptura da homeostase celular e possível morte celular. O estresse nuclear pode estar associado a diversos outros fatores, mas pesquisas recentes detalharam a existência do estresse reverso no nucléolo que consiste em inibição das funções nucleolares ou estimulação pode causar distúrbios na homeostase celular e conseqüentemente a morte. (LU, L. *et al.*, 2018).

Na Figura 1 da linhagem BMAL1 KO velhos presenciou-se o nucléolo mais denso em relação ao grupo jovem e adulto, diante disso, o fator de compactação pode estar mais relacionado ao fator de estresse da organela ao invés da longevidade uma vez que há perturbações fisio morfológicas e genéticas (LU, L. *et al.*, 2018).

Estudos publicados recentemente na revista Nature descreve que o tamanho do nucléolo está inversamente relacionada com a longevidade, sendo assim, nucléolos mais compactos e densos indicam maior longevidade e saúde metabólica juntamente da fibrilarina e biogênese do ribossomo reduzida. Diante disso, nossos resultados demonstram que características de nucléolos mais compactados está presente predominantemente na linhagem Bmal1 WT.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envelhecimento saudável e fertilidade masculina estão correlacionados com fatores genéticos e morfológicos das células germinativas assim como eventos de espermatogênese e espermiogênese. Neste presente estudo, foi analisado como a alteração dos genes relógios podem influenciar nas espermátides redondas e no processo de espermatogênese como um todo.

Em suma, animais *Bmal1* KO apresentam uma maior variação no tamanho do nucléolo e CBs quando comparado com animais WT, em decorrência da perda de ritmo circadiano no processo de formação das células germinativas masculinas e oscilações endógenas. A perda de ritmo no ciclo circadiano para animais *BMAL1* KO gera estresse nuclear e alteração na produção de proteínas essenciais para o desenvolvimento, além de prejudicar a saúde metabólica e homeostase celular.

REFERÊNCIAS

- ABE, K., SHEN, L. S., TAKANO, H. The cycle of the seminiferous epithelium and stages in spermatogenesis in dd-mice. **Hokkaido Igaku Zasshi**, v. 66, n. 3, p. 99-286, 1991.
- AMANN, R. P. Phisiology and endocrinology. **Equine reproduction**. Cap. 77, pag. 658-688, Pennsylvania, 1993.
- BITTMAN, E. L. Timing in the Testis. **Journal of biological rhythms**, v. 31, n. 1, p. 12-36, 2016.
- BOISVERT, F., VAN KONINGSBRUGGEN, S., NAVASCUÉS, J. et al. The multifunctional nucleolus. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 574–585, 2007.
- BROWN, P. S. J. Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. **American Society of Plant Biologists**, Department of Cell and Developmental Biology, v. 158, n. 1, p. 44-51, nov./2011.
- CHATTERJEE, Somik; MA, Ke. Circadian clock regulation of skeletal : muscle growth and repair. **NCBI**, Center for Diabetes Research, Department of Medicine, v. 5, n. 1549, p. 1-12, jul./2016.
- CMARKO, D. *et al.* Nucleolus: The ribosome factory. **Histology and Histopathology**, Institute of Cellular Biology and Pathology, First Faculty of Medicine, v. 23, n. 10, p. 1291-1298, abr./2008.
- COMAI, L.. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. **Braz J Med Biol** , SciELO, v. 32, n. 12, p. 1473-1478, dez./1999.
- DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and function of testis. Reproduction in mammals and man. Cap. 13, pag. 227-255, 1993.
- DAVIDSON, A. *et al.* CHRONIC JET-LAG : INCREASES MORTALITY IN AGED MICE. **NCHBI**, Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, v. 16, n. 21, p. 914-916, nov./2006.

FARHUD, D.; ARYAN, Z. Circadian Rhythm, Lifestyle and Health: A Narrative Review. **Iran J Public Health**, v. 47, n. 8, p. 1068-1076, 2018.

HADDAD, A., et al. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: **Editora Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (SBMM)**, 2007.

HUANG, Sui. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus?. **The Journal of Cell Biology**, Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University Medical School, v. 157, n. 5, p. 739-741, mai./2002.

KOTAJA, N.; CORSI, P. S. The chromatoidbody : A germ-cell-specific RNA-processing centre. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, Art. 2081, 2007.

LAM, Yun Wah; TRINKLE-MULCAHY, Laura. New insights into nucleolar: structure and function. **NCBI**, Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, v. 7, n. 48, p. 1-9, abr./2015.

LU, L. *et al.* Nucleolar stress: is there a reverse version?. **Journal of Cancer**, Hunan Normal University, v. 9, n. 20, p. 3723-3727, ago./2018.

MADUREIRA, V. R. et al. Efeitos do horário de desempenho de atividade laboral e de hábitos de vida sobre aspectos metabólicos e reprodutivos em uma população da cidade de Bauru-sp, Brasil. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo. v.10. n.57. p.145-159, 2016.

MONTEIRO, C.D., BICUDO, S.D. e TOMA, H.S. O papel das células de Sertoli na espermatogênese. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 855, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. Embriologia Básica. Traduzido por Fernando Simão

MURTA, D. V. F.; GOMES, V. C. L.; MARTINEZ, L. C. R. A organização celular dos testículos de mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 20, 2013.

NAKAMURA, T. J. *et al.* Age-Related Changes in the Circadian System: Unmasked by Constant Conditions. **eNeuro**, Department of Life Sciences, School of Agriculture, Meiji University, v. 2, n. 4, p. 1-10, ago./2015.

NETO, J. L.; BAHAMONDES, L.; CARREL, D. T.; CARVALHO, H. F. Espermatozóides. Em: CARVALHO, H. F.; BUZATO, B. C. Células, **Editora Manole**, cap.24, pág.302-325, Barueri-SP, 2005.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr.rev.**, v. 22, n.3, pag.289-318, 2001.

PEDERSON, T. The plurifunctional nucleolus. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 17, p. 3871-3876, 1998.

PEREIRA, D. S.; TUFÍ, S.; PEDRAZZOLI. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. **RevBras Psiquiatr.**, v.31, n.1, p. 63-71, 2009.

PEREIRA, Danyella Silva; PEDRAZZOLI, S. T. M. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. **Rev Bras Psiquiatr**, Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), v. 31, n. 1, p. 63-71, nov./2008.

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.; 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, e42695. 2012.

PERUQUETTI, Rita L.; MATEO, Sara De; SASSONE-CORSI, Paolo. Circadian Proteins CLOCK and BMAL1 in the Chromatoid Body: a RNA Processing Granule of Male Germ Cells. **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 7, n. 8, p. 42695, ago./2012.

SANTOS, E. G. Relação entre o envelhecimento e alterações estruturais em chromatoid bodies. **Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)** – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – São Paulo, 2017.

SCHLATT, S.; EHMCE, J. Regulation Of Spermatogenesis: An Evolutionary Biologists perspective. **Semin Cell Dev Biol**, 2014.

SHARMA, R., AGARWAL, A. Spermatogenesis: An Overview. **Springer Science**, v. 978, n. 1, p. 19-44, 2011.

TESES USP. **Ritmo circadiano em ratos ganglionectomizados e pinealectomizados: um estudo molecular e comportamental** . Disponível em:

https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42137/tde-14032018-104611/publico/JessicaAndradedaSilva_Corrigida_Doutorado_P.pdf. Acesso em: 11 set. 2021.

TIKU, V., JAIN, C., RAZ, Y. et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. **Nat Commun**, v. 8, 16083, 2017.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Relógio biológico e padrões de alimentação em camundongos normais e com sobrepeso**. Disponível em:

<https://www.bddd.uerj.br:8443/bitstream/1/12731/1/Priscila%20Queiroz%20Pires%20de%20Souza%20Dissertacao%20completa.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

YAN, Wei. Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. **Research Gate**, Department of Physiology and Cell Biology, University of Nevada School of Medicine, v. 306, n. 2, p. 24-32, jul./2009.

ZANQUETTA, M. M. *et al.* Body weight: metabolism and clock genes. **Part of springer nature**, Laboratory of Cellular and Molecular Endocrinology University of São Paulo Medical School, v. 2, n. 53, p. 2-10, ago./2010.