

JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA

**ALTERAÇÕES NA CONFORMAÇÃO DA CROMATINA
DE CÉLULAS DE SERTOLI CAUSADAS POR
TRATAMENTO COM RETINOL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Ciências **BIOQUÍMICA**.

**CURITIBA
1995**

JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA

**ALTERAÇÕES NA CONFORMAÇÃO DA CROMATINA
DE CÉLULAS DE SERTOLI CAUSADAS POR
TRATAMENTO COM RETINOL**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em
convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do
Grau de Doutor em Ciências BIOQUÍMICA.**

**CURITIBA
1995**

"A três dias de distância, caminhando em direção ao sul, encontra-se Anastácia, cidade banhada por canais concêntricos e sobrevoada por pipas. Eu deveria enumerar as mercadorias que aqui se compram a preços vantajosos: ágata ônix crisópraso e outras variedades de calcedônia; deveria louvar a carne do faisão dourado que aqui se cozinha na lenha seca da cerejeira e se salpica com muito orégano; falar das mulheres que vi tomar banho no tanque de um jardim e que s vezes convidam - diz-se - o viajante a despir-se com elas e persegui-las dentro da água. Mas com essas notícias não falaria da verdadeira essência da cidade: porque, enquanto a descrição de Anastácia desperta uma série de desejos que deverão ser reprimidos, quem se encontra uma manhã no centro de Anastácia será circundado por desejos que se despertam simultaneamente. A cidade aparece como um todo no qual você faz parte, e, uma vez que aqui se goza tudo o que não se goza em outros lugares, não resta nada além de resistir desse desejo e se satisfazer. Anastácia, cidade enganosa, tem um poder, que s vezes se diz maligno e outras vezes benigno: se você trabalho oito horas por dia como minerador de ágatas ônix crisóprastos, a fadiga que dá forma aos seus desejos toma dos desejos a sua forma, e você acha que está se divertindo em Anastácia quando não passa de seu escravo."

*Retirado de :
As Cidade Invisíveis
Italo Calvino
Companhia da Letra
1991*

*Dedicada a
Rafaela
dezembro de 1994*

AGRADECIMENTOS

A profa. Elena Aida Bernard pelo carinho, amizade e a dedicação constante com que tem me ensinado a ser um pesquisador consciente, crítico e persistente.

A Dayse e José Manoel, meus pais, que com seu amor, carinho e dedicação permitiram que tudo se realizasse.

A meus irmãos, tios e primos pelo seu carinho e atenção.

A Adriana Brondani que foi mais do que uma amiga, uma grande companheira, pois este trabalho teria sido quase impossível sem seu carinho, dedicação e amor.

A Andréa Regner pelo seu carinho e amizade, que podem ser percebidos pela beleza dos desenhos com que me presenteou e que constam desta tese.

A Fátima Guma, Vera Treis, Regina Guaragna e Lia Gamalho que foram excelentes colegas, muito me estimularam e apoiaram em momentos cruciais da elaboração deste trabalho.

A Débora, Felipe, Luciano, Gustavo, Paulo, Isabel, Emerson, Vanessa, Renata e Tiago que na sala de cultura com muito carinho prestaram imensa colaboração, sem a qual eu dificilmente conseguiria terminar este trabalho em tempo.

A Isabel, Cláudia, Roselir, Cléia, Sandra e Liliane que com apoio nas secretarias do departamento de Bioquímica e da Pós-graduação permitiram que eu me dedicasse as tarefas da tese.

A Ana e Cleci pelo auxílio e paciência.

A Lúcia, Cristiane e demais integrantes do grupo do Prof. Rodnigh pelo apoio com o fósforo e a paciência.

Aos demais colegas do departamento de Bioquímica pelo apoio.

A Clóvis Wannmacher e Maria Lúcia Wortmann pela amizade e inspiração.

A Heloísa, Marcos, Iuri, Vanessa, Sandra, Liane e Elda pelo carinho e constante amizade.

Ao CNPq, FINEP, FAPERGS e PROESP/UFRGS pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1.Célula de Sertoli.....	1
I.1.1.Retinol, espermatogênese e célula de Sertoli.....	7
I.2.Cromatina.....	8
I.2.1.Proteínas nucleares.....	10
I.2.1.1.Histonas.....	10
I.2.1.1.1.Nucleossomos.....	12
I.2.2.Proteínas não-histonas.....	15
I.2.3.A cromatina ativa.....	16
I.2.3.1.A sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I.....	17
I.2.3.2.Proteínas da cromatina durante a ativação gênica	18
I.2.4.Interações entre histonas e HMGs.....	20
I.2.4.1.Histona H1.....	21
I.2.4.2.Histonas H2a e H2b.....	24
I.2.4.3.Histonas H3 e H4.....	25
I.2.4.4.Proteína 14-3-3.....	25
I.2.4.5.HMG1 e HMG2.....	26
I.2.4.6.HMG 14 e HMG 17.....	27
I.2.5.Receptores nucleares de retinol.....	28
I.2.5.1.Proteínas ligadoras de retinol.....	29
I.2.5.2.Proteínas celulares ligadoras de retinol.....	30
I.2.5.3.Receptores nucleares de retinol.....	31
I.2.5.5.Mecanismo de ação da vitamina A mediado por receptores nucleares de retinol.....	32
I.2.5.6.Metabolismo da vitamina A em células de Sertoli.....	34
I.3.Poliaminas.....	37

I.3.1.L-Ornitina descarboxilase (EC 4.1.1.17).....	38
I.3.2.Atividade de <i>ornitina descarboxilase</i> e retinol.....	39
I.3.3.Regulação da ornitina descarboxilase.....	41
I.4.Objetivos.....	42
II.MATERIAL E MÉTODOS.....	43
II.1.Materiais.....	43
II.1.1.Soluções salinas e meio de cultura utilizados.....	44
II.1.1.1.Solução salina fosfato tamponada (PBS-1).....	44
II.1.1.2.Solução salina tamponada (PBS-2).....	44
II.1.1.3.Solução salina tamponada sem calcio e magnésio (CMF-PBS).....	45
II.1.2.Soluções utilizadas nas extrações protéicas e ensaios enzimáticos.....	45
II.1.2.1.Tampão A com triton.....	45
II.1.2.2.Tampão A.....	45
II.1.2.3.Tampão B.....	45
II.1.2.4.Tampão de amostra I.....	46
II.1.2.5.Tampão de amostra II.....	46
II.1.2.6.Tampão 1.....	46
II.1.2.7.Tampão 2.....	46
II.1.2.8.Tampão para <i>ornitina descarboxilase</i>	47
II.1.3.Géis utilizados para separa histonas e HMGs extraídas.....	47
II.1.3.1.Gel utilizado para separar histonas.....	47
II.1.3.1.1.Gel de entrada.....	47
II.1.3.1.2.Gel de corrida.....	47
II.1.3.1.3.Tampão de corrida.....	47
II.1.3.2.Gel utilizado para separar HMGs.....	47
II.1.3.2.1.Gel de entrada.....	47
II.1.3.2.2.Gel de corrida.....	48

II.1.3.2.3. Tampão de corrida.....	48
II.2. Métodos.....	49
II.2.1. Obtenção de células de Sertoli.....	49
II.2.2. Cultura primária de células de Sertoli.....	49
II.2.3. Determinação da pureza das culturas de células de Sertoli.....	50
II.2.4. Tratamento das culturas de células de Sertoli com retinol.....	50
II.2.5. Incubação com precursores radioativos.....	51
II.2.5.1. Incubação com [³² P].....	51
II.2.5.2. Incubação com [metil- ³ H] timidina ou [³ H] timidina.....	53
II.2.6. Coleta e rompimento das células.....	53
II.2.7. Determinação de DNA.....	53
II.2.8. Extração de proteínas nucleares.....	53
II.2.8.1. Extração de histonas.....	53
II.2.8.2. Extração de HMGs.....	56
II.2.9. Eletroforeses.....	57
II.2.9.1. Gel de poliacrilamida/uréia/ácido acético para separar as sub-famílias de Histonas.....	57
II.2.9.2. Gel de poliacrilamida/SDS/uréia para separar sub-famílias de HMGs.....	57
II.2.10. Determinação da sensibilidade da cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol à ação da DNase tipo I.....	57
II.2.10.1. Efeito da 1,10 fenantrolina sobre a ação da DNase tipo I em cromatina de células de Sertoli tratadas.....	58
II.2.10.2. Efeito da hidróxi-uréia sobre a incorporação de timidina à cromatina de células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol.....	59
II.2.11. Determinação da atividade da <i>ornitina descarboxilase</i> em células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol.....	59
II.2.12. Determinação de radioatividade.....	60
II.2.12.1. Determinação da radioatividade nas bandas do gel.....	60

II.2.12.2. Cintilação líquida.....	60
II.2.13. Análise estatística.....	61
III. RESULTADOS.....	62
III.1. Efeito do retinol sobre a fosforilação das proteínas nucleares.....	62
III.1.1. Histonas.....	65
III.1.1.1. Determinação do período de incubação com [³² P].....	65
III.1.1.2. Fosforilação das histonas.....	65
III.1.1.2.1. Efeito do tempo de cultura sobre a fosforilação das histonas.....	65
III.1.1.2.2. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação das histonas.....	66
III.1.1.3. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H1.....	66
III.1.1.4. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H3.....	67
III.1.1.5. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H2a.....	71
III.1.1.6. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H2b.....	71
III.1.1.7. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H4.....	72
III.1.2. HMGs.....	77
III.1.2.1. Efeito do tempo de cultura sobre a fosforilação de HMGs isoladas.....	77
III.1.2.2. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação das HMGs.....	77
III.1.2.3. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da HMG 1.....	83
III.1.2.4. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da HMG 2.....	83
III.1.2.5. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da HMG 14.....	84
III.1.2.6. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da HMG 17.....	84
III.2. Efeito do retinol sobre a estrutura da cromatina.....	90
III.2.1. Efeito do tratamento com retinol sobre a sensibilidade da cromatina à ação de DNase tipo I.....	90
III.2.2. Efeito do tratamento com 1,10 fenantrolina sobre a sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I induzida por retinol.....	91
III.2.3. Efeito da 1,10 fenantrolina sobre a ação das endonucleases.....	92

III.3.Efeito da hidróxi-uréia sobre a incorporação de timidina à cromatina de células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol.....	93
III.4.Efeito do retinol sobre a atividade da <i>ornitina descarboxilase</i>	99
IV.DISSCUSSÃO	101
V.CONCLUSÕES	115
VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

I.1.Representação esquemática da estrutura dos testículos em mamíferos.....	3
I.2.Representação esquemática da organização da cromatina.....	9
I.3.Modelo do envolvimento da fosforilação/defosforilação da H1 na condensação da cromatina.....	23
I.4.Modelo das rotas de ação do retinol nos testículos.....	36

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1.Processo de obtenção de células de Sertoli.....	52
II.2.Método de extração de histona.....	54
II.3.Método de extração de HMGs.....	56

III. RESULTADOS

III.1.Gel de poliacrilamida/uréia mostrando a separação das sub-famílias de histonas.....	63
III.2.Determinação do tempo de incubação com [³² P].....	64
III.3.Efeito do tempo de tratamento com retinol sobre a fosforilação de histonas isoladas..	68
III.4.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação das histonas de células de Sertoli.....	69
III.5.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de histona H1 isoladas de células de Sertoli cultivadas.....	70
III.6.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de histona H3 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	73
III.7.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de histona H2a isolada de células de Sertoli cultivadas.....	74
III.8.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de histona H2b isolada de células de Sertoli cultivadas.....	75

III.9.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de histona H4 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	76
III.10.Gel de poliacrilamida/SDS/ureia mostrando a separação das sub-famílias de HMGs isoladas de células de Sertoli cultivadas.....	79
III.11.Efeito do tempo de cultura sobre a fosforilação das HMGs isoladas de células de Sertoli cultivadas.....	80
III.12. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de HMGs isoladas de células de Sertoli cultivadas.....	81
III.13.Perfil de fosforilação de histonas e HMGs isoladas de células de Sertoli tratadas com retinol.....	82
III.14. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de HMG 1 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	86
III.15. Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de HMG 2 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	87
III.16.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de HMG 14 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	88
III.17.Efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação de HMG 17 isolada de células de Sertoli cultivadas.....	89
III.18.Aumento da sensibilidade da cromatina a ação da DNase tipo I em células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol.....	95
III.19.Efeito da 1,10 fenantrolina sobre sensibilidade da cromatina de células de Sertoli cultivadas e tratadas com retinol, à ação da DNase tipo I.....	96
III.20.Efeito da 1,10 fenantrolina sobre a sensibilidade da cromatina de células de Sertoli cultivadas e tratadas com retinol, à ação de endonucleases endógenas.....	97
III.21.Efeito do tratamento com hidróxi-uréia sobre a incorporação de [³ H] timidina a cromatina de células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol.....	98

III.22.Efeito do tratamento com retinol sobre a atividade da enzima <i>ornitina descarboxilase</i> em células de Sertoli.....	100
---	-----

LISTA DE TABELAS

I.INTRODUÇÃO

I.1. Proteínas secretadas pelas células de Sertoli.....	4
---	---

II.MATERIAL E MÉTODOS

II.1.1.1. Solução salina fosfato tamponada (PBS-1).....	44
II.1.1.2. Solução salina fosfato tamponada (PBS-2).....	44
II.1.1.3. Solução salina fosfato tamponada sem cálcio e sem magnésio (CMF-PBS)...	45
II.1.2.1. Tampão A com triton X-100.....	45
II.1.2.2. Tampão A.....	45
II.1.2.3. Tampão B.....	45
II.1.2.4. Tampão de amostra I.....	46
II.1.2.5. Tampão de amostra II.....	46
II.1.2.6. Tampão de amostra para o gel de poli(acrilamida)/SDS/uréia.....	46
II.1.2.7. Tampão 1.....	46
II.1.2.8. Tampão 2.....	46
II.1.2.9. Tampão de incubação da <i>Ornitina Decarboxilase</i>	47
II.1.3.1.1. Gel de entrada para o sistema poli(acrilamida)/uréia/ácido acético.....	47
II.1.3.1.2. Gel de corrida para o sistema poli(acrilamida)/uréia/ácido acético.....	47
II.1.3.1.3. Tampão de corrida para o sistema poli(acrilamida)/uréia/ácido acético	47
II.1.3.2.1. Gel de entrada para o sistema poli(acrilamida)/SDS/uréia.....	47
II.1.3.2.2. Gel de corrida para o sistema poli(acrilamida)/SDS/uréia.....	48
II.1.3.2.3. Tampão de corrida para o sistema poli(acrilamida)/SDS/uréia.....	48

III.RESULTADOS

III.1. Incorporação de [metil- ³ H] timidina na cromatina de células de Sertoli cultivadas (III.2.1).....	91
III.2. Incorporação de [metil- ³ H] timidina na cromatina de células de Sertoli cultivadas (III.2.2).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

Além das abreviaturas rotineiramente utilizadas, como ions metálicos, unidades de tempo e métricas, cabe listar algumas outras empregadas neste trabalho.

ABP - proteína carregadora de andrógenos

CPM - contas por minuto

CRABP - proteína celular carregadora de ácido retinóico

CRBP - proteína celular carregadora de retinol

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

EPM - erro padrão médio

FSH - hormônio folículo estimulante

GPx - glutatíão peroxidase

GR - glutatíão redutase

GST - Glutatíão-S-transferase

H - histonas

HMG - proteínas nucleares de alta mobilidade

LH - hormônio luteinizante

LRAT - lecitina : retinol-acil-transferase

LRP - proteína receptora de LDL

mRNA - ácido ribonucléico mensageiro

O¹₂ - oxigênio singleto

O⁻₂ - superóxido

ODC - ornitina descarboxilase

OH - radical hidroxila

ROOH - peróxido orgânico

pb - par de base

PBS - solução salina fosfato tamponada
PCA - ácido perclórico
PKC - proteína quinase C
PMSF - fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RAR - receptor nuclear para ácido retinóico
RARE - elemento responsivo ao ácido retinóico
RE - ester de retinol
RBP - proteína plasmática carregadora de retinol
RNA - ácido ribonucléico
RXR - receptor nuclear para retinol
RXRE - elemento responsivo ao retinol
SFB - soro fetal bovino
Se-GPx - Selênio glutatião peroxidase
SOD - superóxido dismutase
TCA - ácido tri-cloroacético
TTR - transtirretina

RESUMO

Com o objetivo de solucionar questões surgidas durante o desenvolvimento de vários trabalhos em nosso grupo de pesquisa decidimos averiguar os possíveis efeitos do retinol sobre a conformação da cromatina em células de Sertoli cultivadas. Foram isoladas células de Sertoli de ratos Wistar de 15 dias de vida e mantidas em cultura. Estas culturas eram tratadas com retinol 10 mM por 6h, 24h e 48 h; seis horas antes do final destes períodos de incubação as culturas recebiam ^{32}P na concentração de 10 $\mu\text{Ci/ml}$. As histonas e HMGs destas células eram então isoladas, quantificadas e contadas em cintilador líquido. As amostras destas proteínas foram submetidas a separação eletroforética para determinarmos os efeitos do retinol sobre o padrão de fosforilação das proteínas nucleares como um todo e os efeitos sobre cada sub-família de histonas ou HMGs. Os resultados indicaram que o retinol alterava o padrão de fosforilação das proteínas nucleares e que esta alteração se modificava com o tempo de tratamento. Para que fosse esclarecida qual a consequência destas alterações nos padrões de fosforilação das proteínas nucleares sobre a conformação da cromatina decidimos realizar alguns testes descritos na literatura. Submetemos a cromatina das células de Sertoli a ação da DNase tipo I 20 U/mg de DNA por 30 minutos, e verificamos que a cromatina das células tratadas com retinol era sempre mais sensível à ação desta enzima que a de células não tratadas. Estes resultados indicavam que a cromatina das células tratadas estava mais relaxada ou que havia danos na estrutura do DNA; decidimos averiguar estas duas possibilidades. A sensibilidade da cromatina das células de Sertoli, tratadas e controle, à ação da DNase tipo I, foi testada na presença de 1,10 fenantrolina, um quelante de Fe (II), pois desta maneira impediríamos o acontecimento da reação de Fenton nestas células, uma das reações responsáveis pelo surgimento de radicais $\cdot\text{OH}$ nas células. Com este tratamento, a sensibilidade aumentada da cromatina das células tratadas desapareceu, indicando a presença de danos na estrutura do DNA pelo tratamento com retinol. Para averiguarmos se havia simultaneamente também a síntese específica de

algum gene ativado pelo *stress* oxidativo da célula, decidimos determinar os efeitos do tratamento com retinol sobre a incorporação de [³H] timidina pela cromatina, na presença ou ausência de um inibidor de síntese de DNA, a hidroxí-uréia 3 mM, por 2 horas. Estes experimentos sugerem que existe simultaneamente ao reparo, a indução e a amplificação de alguns genes. Por fim como uma maneira de testarmos nossas hipóteses, decidimos verificar a atividade da enzima *Ornitina descarboxilase* nas células tratadas. Estes experimentos indicaram que o tratamento com retinol afeta a atividade desta enzima que se torna mais ativa que a das células controle depois de 24 horas de tratamento, fenômeno este que parece estar associado com a inibição de processos celulares que levem à proliferação antes que o material genético da célula esteja completamente reparado.

TRABALHOS RELACIONADOS COM O CONTEÚDO DESTA TESE

1) Resumos publicados em congressos

a. Internacionais

Moreira, J.C.F.; da Rocha, A.B. and Bernard, E.A.B.

The effect of retinol in the phosphorylation of histones from sertoli cells - VII^a PAABs

Congress - Ixtapa , México - 1992.

b. Nacionais

Moreira, J.C.F., da Rocha, A.B. and Bernard, eE.A.

The effect of retinol in the phosphorylation of histones. - XXIa. Reunião anual da

SBBq - Caxambu, MG - 1992.

Moreira, J.F.C.; Von Endt, D.; Junqueira, L.A.V. and Bernard, E.A..

Alterations in phosphorylation of histones and HMGs from Sertoli cells cultures,
induced by retinol pre-treatment. XXIIIa. Reunião anual da SBBq - Caxambu,

MG - 1994.

Moreira, J.C.F.; Von Endt, D.; Dal Pizzol, F.. and Bernard

The effect of retinol on chromatin structure : Iron chelators inhibit the increased

DNase I sensitivity induced by retinol. - XIV^a reunião anual da SBBq -

Caxambu, MG - 1995.

c. Locais

da Rocha, A.B.; Moreira, J.C.F. e Bernard, E.A.

Efeito do retinol sobre a fosforilação de histonas em células de Sertoli. IIIº SIC
PROPESP/UFRGS, Porto Alegre, RS - 1991.

Junqueira, L.A.V.; Moreira, J.C.F. e Bernard, E.A.

Efeito do retinol sobre a fosforilação do “pool” de nucleotídeos de células de Sertoli
cultivadas. IVº SIC PROPESP/UFRGS, Porto Alegre, RS - 1992.

Von Endt, D.; Moreira, J.C.F. e Bernard, E.A.

Efeito do retinol sobre a fosforilação de HMGs em células de Sertoli cultivadas. Vº
SIC PROPESP/UFRGS, Porto Alegre, RS - 1993.

Dal Pizzol, F.; Moreira, J.C.F. e Bernard, E. A.

Sensibilidade da cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol à ação de DNase tipo
I. VIº SIC PROPESP/UFRGS, Porto Alegre, RS - 1994.

2) Publicados em revistas Internacionais

Moreira, J.C.F.; Von Endt, D.; Junqueira, L.A.V and Bernard, E. A.

The effect of retinol pre-incubation on the phosphorylation of histones and HMGs
from cultured Sertoli cells of rats. Med. Sci Res 22:783-784, 1994.

3) Enviados para publicação

Moreira, J.C.F.; dal Pizzol, F. and Bernard, E. A.

Effect of retinol on chromatin structure: Iron chelators inhibit the increased DNase I
sensitivity induced by retinol. submetido à Biochem. and Mol. Biology

Moreira J.C.F., Dal Pizzol, F; Guma, F.C.R. and Bernard, E.A.

Effect of hydroxi-urea on increased incorporation [³H] timidine in chromatin from

Sertoli cells induced by retinol. submetido à Med Sci. Res.

I.INTRODUÇÃO

I.1.Célula de Sertoli

Em 1865 Enrico Sertoli descreveu pela primeira vez algumas células presentes no testículo humano, que pela forma, estrutura e participação na organização testicular, estariam ou deveriam estar associadas com o suporte e a nutrição das células germinativas durante o desenvolvimento e a maturação das mesmas (Sertoli, 1865). As células descritas como células de Sertoli são colunares e se estendem desde a lâmina basal até o lúmen tubular, possuem a aparência de uma árvore muito ramificada ao mesmo tempo que seu núcleo é grande, irregular e está situado na região basal, contendo um nucléolo proeminente. O citoplasma destas células contém várias organelas, o que caracteriza a grande diversidade de processos celulares realizados pelas mesmas (Fawcett, 1975).

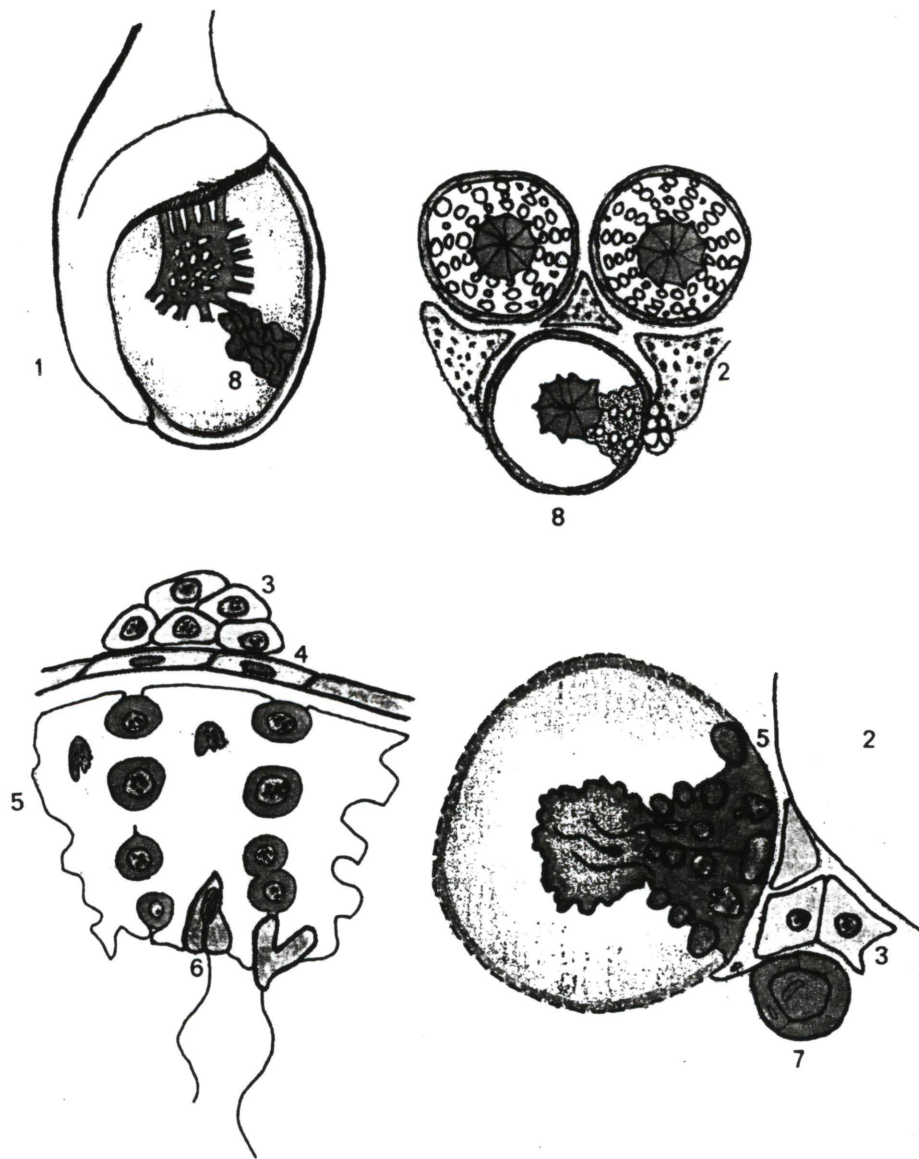
Estas células proliferam durante a vida fetal e o período pré-puberal, que vai até os 16 dias de vida no rato (Steinberger et al., 1971; Orth, 1982). Não foi evidenciada atividade mitótica após o período pré-puberal e mesmo a indução hormonal não foi capaz de reverter este quadro. No entanto, do início da espermatogênese até aproximadamente os 60 dias de vida do rato, as células de Sertoli aumentam de tamanho durante a sua maturação (Orth, 1982; Nagy, 1972).

A região basal do citoplasma das células de Sertoli e as espermatogônias do tipo A estão em contato direto com a membrana do túbulo, enquanto que as células germinativas mais maduras estão circundadas pelo citoplasma das células de Sertoli. O contato íntimo entre as células germinativas e as células de Sertoli sugere que estas células são importantes para a espermatogênese.

Perto da região basal de células de Sertoli adjacentes se formam complexos juncionais os quais recebem o nome de *tight-junctions* e participam da manutenção da barreira hemato-

testicular (Russel et al, 1985). Nos ratos esta barreira se estabelece entre o 16^o. e o 18^o. dia de vida e esta apresenta uma estreita correlação temporal com o aparecimento dos complexos juncionais, o início da secreção de fluido pelo epitélio seminífero, estratificação do epitélio germinal e desenvolvimento do lumen nos túbulos seminíferos (Vitale et alli, 1973). A barreira divide os túbulos em um compartimento basal, contendo as espermatogônias e os espermatócitos primários e uma compartimento adluminal, que contém os espermatócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento e as espermátides (Russel, 1977a). Existe uma diferença significativa entre a composição dos fluidos intersticiais ,pois a barreira não permite a passagem para o compartimento adluminal de uma série de substâncias que estão normalmente presentes na circulação geral e linfática. A passagem seletiva de compostos através desta barreira combinada com a secreção de compostos pela célula de Sertoli, criam um ambiente adequado para o desenvolvimento e maturação das células germinativas. Devido à presença da barreira e de suas características seletivas, a célula de Sertoli assume um papel de reguladora e modificadora das substâncias que chegam até às células germinativas. Não podemos esquecer que em função da própria organização testicular são as próprias células de Sertoli que mantêm a estrutura da barreira hemato-testicular e suportam as células germinativas (Fawcet, 1975).

Muitas outras funções são comumente atribuídas às células de Sertoli: fagocitar corpos residuais das espermátides e células germinativas danificadas e participar da secreção do fluido do túbulo seminífero, no qual os espermatozóides são transportados do testículo para o epidídimo. As células de Sertoli apresentam uma intensa atividade de síntese e secreção de substâncias, como: esteróides, proteínas (TABELA I.1.), fatores não identificados que atuam sobre as células de Leydig e substâncias energéticas como lactato e piruvato. Estes produtos parecem ser importantes para a espermatogênese, seja servindo como proteínas transportadoras ou mesmo de fonte energética e substratos para o metabolismo das células germinativas (Fawcet, 1975; Means et alli., 1976).



- 1-testículo
- 2-tecido intersticial
- 3-células de Leydig
- 4-células peritubulares
- 5-células de Sertoli
- 6-células germinativas
- 7-vaso sanguíneo
- 8-túbulo seminífero

FIGURA I.1. Representação esquemática da estrutura dos testículos em mamíferos (baseada em Skinner et al., 1991 e Lincoln et al., 1979).

TABELA I.1. Principais proteínas secretadas pelas células de Sertoli

1) Hormônios ou fatores de crescimento

precursor TGF- β
hormônio anti-Mulleriano (MIS)
inibina
TGF- α
fator de crescimento semelhante à EGF
Fator de crescimento do túbulo seminífero
TGF-I
fator de crescimento semelhante à interleuquina
fator estimulador de célula de Leydig

2) Componentes da membrana basal

colágeno tipo IV
laminina

3) Enzimas

procathepsina L
ativador de plasminogênio

4) Proteínas de transporte

proteína ligadora de andrógeno
transferrina
ceruloplasmina

5) Outras

glicoproteína sulfatada 1 (prosaposina)
glicoproteína sulfatada 2 (clusterina)
testibumina
testinas

Tabela modificada de Griswold et alli., 1989.

Devido à presença da barreira hemato-testicular as células germinativas meióticas têm acesso limitado às substâncias presentes na circulação sendo dependentes do meio circundante que é controlado pelas células de Sertoli; isto fornece considerável evidência para a proposição de que as células de Sertoli sejam as responsáveis pela nutrição das células germinativas, além de permitir também explicar o mecanismo pelo qual os hormônios que atuam diretamente sobre as células de Sertoli como : hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona, regulam a espermatogênese (Fritz, 1978). Muitos autores tentam provar a existencia de sítios aceptores/receptores de andrógenos em espermátides e espermátócitos. No entanto, não só pelos resultados discrepantes mas também pela falta de evidências conclusivas da ação direta de hormônios sobre estas células, parece que a célula de Sertoli seja realmente a responsável por intermediar estas respostas à ação hormonal (Steinberger et alli., 1989).

A síntese e secreção de produtos da célula de Sertoli apresentam uma complexa regulação, que vai desde a participação de hormônios à interação entre os diversos tipos celulares presentes no testículo. O hormônio luteinizante (LH), secretado pela hipófise, estimula as células de Leydig a produzir andrógenos, que são importantes para a função da células de Sertoli e a espermatogênese. O FSH exerce uma série de efeitos sobre as células de Sertoli, dando origem a uma série de respostas morfológicas e bioquímicas em testículos de animais imaturos (Steinberger et alli., 1989). Muitos dos processos celulares que ocorrem durante o desenvolvimento e a diferenciação são regulados por estes hormônios: o fluxo iônico (cálcio e potássio, por exemplo), atividade enzimática, síntese de RNAs, síntese e secreção de esteróides e de glicoproteínas, transporte de amino-ácidos, divisão e motilidade celular além de comunicação célula-célula são exemplos destes processos (Means et alli., 1976; Bernard et al., 1982). A estimulação da síntese de proteínas como ABP (proteína ligadora de andrógeno) e inibina por sua vez está relacionada com muitos outros processos: a glicoproteína inibina pode inibir a liberação de FSH pela hipófise, formando um sistema de *feed-back* entre os testículos e a hipófise. Os andrógenos

produzidos pelas células de Leydig por ação estimulatória do LH, difundem da área intersticial para o túbulo seminífero onde se ligam à ABP, criando possivelmente uma alta concentração de andrógenos na vizinhança de certas células germinativas meióticas. A rápida dissociação dos andrógenos do complexo ABP-andrógeno pode facilitar a transferência do hormônio para o receptor citoplasmático nas células alvo. O complexo receptor/andrógeno é transportado para o núcleo onde se liga a um sítio aceptor na cromatina. Os passos subsequentes são ainda desconhecidos (Steinberger et alli., 1989). Após transferir o andrógeno para a célula alvo, a molécula de ABP pode se ligar novamente a andrógenos e o processo se repete; o complexo ABP-andrógeno também pode deixar o túbulo seminífero transportando andrógenos que são levados para o epidídimo onde são encontrados receptores para este hormônio (Steinberg et alli., 1989).

As células de Sertoli também apresentam receptores para outros hormônios e vários fatores de crescimento; já foram identificados nestas células receptores para insulina e fator de crescimento semelhante à insulina: IGF-I (Borland et alli., 1984; Oonk et al., 1987; 1988). Além dos efeitos de hormônios e fatores de crescimento sobre as células de Sertoli, elas também sofrem a ação indireta destas substância por suas interrelações com os demais tipos celulares (Morera et alli., 1990).

As células mióides peritubulares são células de origem mesenquimal que fornecem suporte estrutural para o túbulo seminífero e ajudam a manter a citoarquitetura do epitélio seminífero. Estas células estão em contato direto com a superfície basal das células de Sertoli, podendo interagir com as mesmas através da secreção de substâncias como as proteínas induzidas por testosterona (P mod) que afetam a função das células de Sertoli (Hardley et alli., 1985; Skinner et al., 1985).

Os túbulos seminíferos estão rodeados por uma membrana basal localizada entre as células de Sertoli e as células mióides peritubulares (Tung et al., 1980). A membrana basal é composta por fibras de colágeno embebidas em uma matriz de polissacarídeos e a composição desta matriz influencia sobremaneira a função das células de Sertoli.

I.1.1. Retinol, seus efeitos sobre espermatogênese e as células de Sertoli

Entre os vários processos celulares dependentes de vitamina A encontra-se a espermatogênese, que na ausência desta vitamina simplesmente não ocorre (Thompson et alli., 1964; Mitramond et alli., 1979). A administração de ácido retinóico a animais deficientes em vitamina A restabelece as funções basais das células, mas somente o retinol e seus ésteres podem restabelecer a função testicular e a visão (Thompson et alli., 1964; Lotan, 1980).

As mudanças citológicas que ocorrem nos testículos de ratos como consequência de deficiência em vitamina A foram descritas por Mitramond et alli. (1979). Os autores submeteram animais de 30 dias de idade à dieta deficiente em vitamina A até a interrupção do crescimento, a qual sinaliza o estabelecimento da deficiência após a mobilização total dos estoques hepáticos. O acompanhamento das mudanças citológicas no testículo foi feito do 10^o. ao 20^o. dia após os animais terem parado de crescer. No 20^o. dia, o número de espermatogônias nos túbulos era cerca de 1/4 do detectado no início do experimento. O número de espermatídes era praticamente zero no 10^o. dia e o de espermatócitos decrescia rapidamente entre o 5^o. e o 12^o. dia, sendo que no 20^o. dia poucos espermatócitos foram encontrados.

Sobhon et alli. (1979) analisando a ultra-estrutura de túbulos seminíferos de ratos deficientes em vitamina A, demonstraram que partes do citoplasma das células de Sertoli são liberadas junto com as células germinativas imaturas, causando uma diminuição do tamanho das células de Sertoli e uma perda de espessura do epitélio seminífero. Em adição, aumentam as inclusões elétron-densas no citoplasma destas células, que parecem ser lisossomas em vários estágios de atividade. Os autores propõem que estes lisossomas estariam envolvidos na absorção de células germinativas mortas e na degradação de partes do citoplasma das próprias células de Sertoli

I.2. Cromatina

Os cromossomos eucarióticos na metáfase são geralmente referidos como cromossomos, mas durante a interfase o termo cromatina é mais adequado para descrever as fibras de nucleoproteínas no núcleo das células. A cromatina foi originalmente descrita e subdividida em duas classes principais, eucromatina e heterocromatina. A heterocromatina compreende as áreas densas e fortemente coradas do núcleo que se pensava ser a cromatina inativa não-transcritiva enquanto que a eucromatina fosse a cromatina empacotada de uma maneira menos densa e portanto mais ativa e associada à atividade transcricional. Esses conceitos têm sido amplamente revistos por pesquisas recentes mas são vez por outra ainda utilizados (Watson et ali, 1987) (FIGURA.I.2).

A cromatina se constitui de DNA, RNA e proteínas. A proporção existente entre estes três componentes varia de acordo com o tecido ou mesmo a célula de origem do material em estudo, podendo também variar em função do ciclo celular. Em geral a quantidade de proteínas é igual ou um pouco maior que a de DNA enquanto que a quantidade de RNA é muito pequena. As proteínas componentes da cromatina podem ser subdivididas em duas grandes classes; as histonas e as não-histonas. O primeiro grupo consiste de uns poucos tipos de molécula, presentes em grande quantidade, enquanto o segundo grupo é composto por uma grande diversidade de proteínas onde a maioria está presente em quantidades muito pequenas. Historicamente o conjunto das proteínas não-histonas era referido como as proteínas ácidas do núcleo, mas esta classificação ha muito tempo não é mais considerada apropriada. (Adams et ali, 1986 e Watson et ali, 1987)

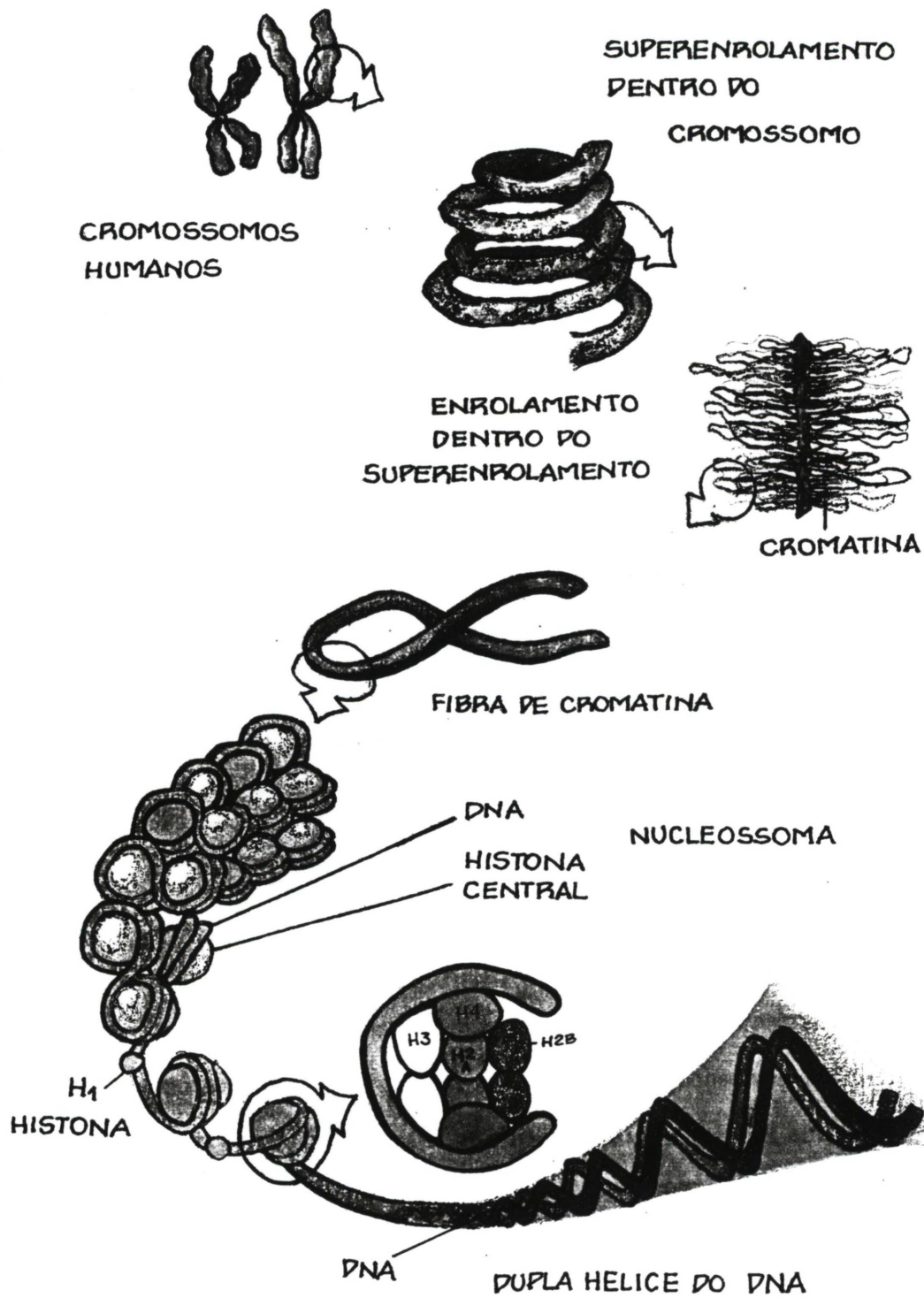


FIGURA I.2. Representação esquemática da cromatina (baseada em Lewin, 1994)

I.2.1. Proteínas nucleares

I.2.1.1. Histonas

Existem 5 tipos principais de histonas no núcleo eucariótico. Estas sub-famílias são classificadas de histonas H1, H2a, H2b, H3 e H4 desde o *CIBA Foundation Symposium* de 1975. Anteriormente, uma enorme variedade de nomenclaturas era adotada por diferentes laboratórios (Grunstein, 1992).

As histonas são proteínas básicas de baixo peso molecular que podem ser isoladas da cromatina por extração salina ou ácida e que podem ser separadas e purificadas com base na carga e peso molecular (Panyin et al., 1965 e Itzhaki et al., 1979). Em soluções salinas de NaCl 2M todas as histonas são dissociadas do DNA. Entretanto em soluções de NaCl 0,5 M apenas H1 é dissociada e assim ficou definido que a demais histonas fariam parte de um núcleo ou cerne (core) enquanto que a histona H1 seria externa a esse arranjo. Cada uma das histonas consiste de uma região central hidrofóbica com um ou dois braços básicos. A histona H1 é muito rica em resíduos de lisina e é composta por 216 aminoácidos que mostram um alto grau de conservação entre os eucariontes principalmente com relação à região central apolar. As histonas H2a e H2b são ainda mais conservadas e comumente conhecidas como histonas ricas em lisina, embora as mais conservadas evolutivamente das histonas são a H3 e a H4. Apenas 3 aminoácidos da H4 variam em todas as amostras estudadas até hoje (Bonner et al., 1973 e Shibata et al., 1993).

Apesar da conservação da sequência de aminoácidos existem múltiplos genes para cada histona em todos os eucariontes. Este fato assume proporções extremas no Ouriço do mar e em *Drosófilas* que contêm múltiplos arranjos de regiões repetidas do DNA onde estão presentes um gene para cada histona separados entre si apenas por regiões espaçadoras ricas em As e Ts. Nem todos estes genes produzem histonas idênticas: os genes para histonas presentes em grande abundância parecem estar ativos em períodos iniciais do

desenvolvimento quando existe uma grande demanda para novas histonas, enquanto as histonas menos variantes são transcritas em estágios posteriores e representam a maioria das histonas presentes nas células somáticas dos indivíduos adultos. (Adam et al., 1986; Roth et al., 1992). Um tipo especial de histonas a H5, é geralmente encontrada em eritrócitos nucleados de peixes, aves e anfíbios. Esta variante apresenta muitas similaridades com H1 e acredita-se que seja responsável pelo alto estado de repressão gênica da cromatina destas células. Similarmente, em células não-proliferativas de mamíferos encontramos grandes quantidades de H1⁰ e H1e, e em células muito proliferativas, os sub-tipos H1a e H1b são os mais encontrados. Não é claro até o momento que efeito as variações de sub-tipos de histonas tem sobre a estrutura da cromatina, nem os efeitos reais das alterações pós-traducionais que estas proteínas sofrem sobre a modulação do estado conformacional da cromatina (Moreira et al., 1994). Entretanto, as histonas podem ser metiladas, fosforiladas, acetiladas ou ADP-ribosiladas e muitas destas modificações têm por finalidade alterar a carga das moléculas e em consequência afetar as interações entre as histonas e o DNA ou mesmo entre as histonas e as demais proteínas e fatores nucleares (Weisbrod et al., 1979; Jackson et al., 1975; Karn et al., 1974; Gurley et al., 1975; Grimmes et al., 1975; Hendzel et al., 1992; Clayton et al., 1993 e Lopez-Rodas et al., 1993). A título de exemplo, existem 6 sub-tipos de H1 (H1a-e e H1⁰) que dão origem a 14 diferentes formas fosforiladas, e estas formas se alternam sequencialmente durante o ciclo celular (Trostle-Weige et al., 1982; Baubichon-Cortay et al., 1992; Levy et al., 1977; Grimes et al., 1975 e Louie et al., 1972). A acetilação e desacetilação das histonas H3 e H4 ocorrem rapidamente na fase G2 do ciclo celular dos fungos do gênero *Physarum*, mas a importância deste fenômeno para a conformação da cromatina ainda é desconhecida. Pelo menos 20% das histonas H2a existentes nos núcleos de eucariontes estão associadas covalentemente a resíduos de ubiquitina e estes níveis se alteram drasticamente durante a mitose e parecem estar associados também à transcrição de algumas famílias de genes (Norton et al., 1990; Marvin et al., 1990 e Lee et al., 1993). As possíveis implicações das modificações de

histonas sobre a regulação de atividades de genes serão discutidas mais adiante em um item apropriado.

Na ausência de DNA, as histonas se associam umas às outras formando arranjos compactos, predominantemente tetrâmeros homotípicos no caso de H3 e H4 e dímeros nos casos de H2a e H2b. Em soluções de grande força iônica todas as quatro sub-famílias de histonas formaram complexos descritos como tetrâmeros heterotípicos com uma histona de cada sub-família ou octâmeros heterotípicos com duas histonas de cada sub-família. Estes octâmeros fazem parte de um arranjo entre DNA e histonas chamado **nucleossomo** encontrados em todos os eucariontes (Watson et alli., 1987 e Brooks et al., 1994).

I.2.1.1.1. Nucleossomos

O DNA das células humanas é da ordem de 1 m de comprimento e deve ser condensado dentro do núcleo da célula cujo diâmetro é da ordem de 10 μm . O empacotamento deve, entretanto, manter o DNA acessível para a maquinária celular e evitar possíveis rompimentos da fita durante os processos de replicação e transcrição. As células eucariontes realizam o empacotamento através de uma série de mecanismos que envolvem a presença de histonas e outras proteínas nucleares. O primeiro nível de compactação, onde o DNA se enrola com as histonas formando os nucleossomos e polinucleossomos, foi alvo de extensas pesquisas durante a década de 1970 e é atualmente razoavelmente compreendido (Weintraub et alli., 1975 e Watson et alli., 1987).

A elucidação da estrutura do nucleossomo é um exemplo de como neste campo é necessário um grande número de abordagens diferentes para resolver uma mesma questão, dado o intrincado sistema em estudo. Ao mesmo tempo em que os estudos sobre as histonas tomavam seu caminho particular, muitos grupos estudavam o núcleo usando microscopia eletrônica, difração de raios-X e difração de neutrons; muito importantes também foram os grupos que se dedicaram aos experimentos de "crosslinking" e de

nucleases onde os subprodutos do DNA eram analisados por eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida.

Os estudos iniciais sobre a estrutura da cromatina utilizando-se difração de raios-X indicaram a presença de uma estrutura repetitiva com um intervalo de 10nm com difícil interpretação para a época. Mais tarde a microscopia eletrônica de núcleos rompidos de células mostraram a presença de uma série de partículas esféricas associadas a um filamento fino - que são as figuras mais comuns encontradas nos livros para descrever o arranjo da cromatina em nucleossomos (FIG.I.2). As partículas esféricas têm um diâmetro de 7-10 nm mas o comprimento dos filamentos é variável. Complementarmente à microscopia eletrônica do minicromossoma SV40, presente nas células infectadas por vírus, indicava a presença de 21 arranjos (nucleossomos) em cada molécula de DNA viral. O comprimento total do SV40 sem os corpos esféricos é de 1590 nm e o comprimento do minicromossomo SV40 associado aos corpúsculos esféricos é de 250 nm, portanto seis vezes mais compactado, indicando uma provável função para este arranjo (Adams et alli., 1986).

O DNA compactado na cromatina através deste arranjo se torna mais resistente à ação de nucleases. Usando-se a nuclease microcócica, que quebra a fita dupla de DNA, rapidamente podemos observar que esta nuclease corta a fita sempre nos espaços entre nucleossomos e só quando a ação é muito prolongada as fitas envolvidas no arranjo nucleossomal são afetadas. Uma análise do tamanho do DNA mostra que o espaçamento entre os nucleossomos é de aproximadamente 200 pb. Em fitas de DNA este espaçamento pode ser de 166 pb e em fitas muito compactadas 146 pb.

Estudos de crosslinking usando Dimetil suberimidato demonstraram que estão presentes na cromatina um octâmero de histonas que compõe o núcleo ou core do nucleossomo (H2a, H2b, H3, H4)₂. A análise estequiométrica do DNA sugere que existe um octâmero por 200 pb, isto é, um nucleossomo (Watson et alli., 1987) (FIGURA I.2).

A DNase tipo I, uma outra nuclease, é capaz de produzir falhas ao longo de toda a cromatina, a intervalos de 10 pb que parece ser a média de intervalo de DNA livre entre

cada histona componente do nucleossomo e que está acessível à ação da nuclease na face externa do nucleossomo, o que foi confirmado em estudos de difração de neutrons (Adams et alli., 1986). Estudos posteriores por cristalografia de raios-X tem mostrado que o nucleossomo é uma estrutura em forma de um V pouco profundo em torno da qual se associam 146 pb de DNA na forma de um giro completo e um terço de giro , para uma perfeita associação entre a dupla fita e as histonas a rígida molécula de DNA executa dobramentos em ângulos agudos permitindo a execução de giros ao redor do cerne de histonas que compõe o nucleossomo. Esta é provavelmente a explicação para a pouca sensibilidade de algumas regiões da cromatina à ação da DNase tipo I (Levy et alli., 1977 e Meisterich et alli., 1978).

Através dos estudos de *crosslinking* envolvendo DNA/proteínas e da cristalografia por raios-X do nucleossomo tem se tornado claro que um tetrâmero (H3-H4)₂ é a estrutura de sustentação do nucleossomo e que a esta estrutura estão associados de cada lado dímeros (H2a-H2b) e que fechando este arranjo encontramos um pedaço de fita de DNA com 146 pb de comprimento (Brooks et alli., 1994) (FIGURA.I.2).

A histona H1 segura as duas extremidades de DNA nucleossomal juntas formando uma estrutura chamada cromatossoma, de 166 pb. O restante do DNA presente forma as estruturas de ligação entre os nucleossomas que juntos são chamados oligonucleossomos. O comprimento das regiões de ligação e a frequência do DNA nucleossomal varia de espécie para espécie e nos diversos tecidos de uma mesma espécie. A frequência de repetição dos nucleossomos pode variar de 212 pb em eritrócitos de galinhas (tecido inativo) a 165 pb em leveduras (muito ativo) e embora fosse lógico antecipar que quanto mais compactado menos ativa fosse a cromatina, isso nem sempre é verdadeiro, mesmo porque devemos observar estas variações sempre com relação a um mesmo tecido em seus vários momentos de atividade durante seu característico ciclo celular (Garcia-Ramirez et alli., 1992; Rasmussen et al., 1993; Zlatanova et al., 1994 e Tarkka et alli., 1994).

Nucleossomos podem ser reconstituídos *in vitro* a partir de DNA e histonas. A reconstituição só é possível em soluções salinas de baixa concentração o que geralmente implica em diálise visto que os métodos de isolamento de histonas utilizam soluções salinas concentradas. Nos núcleos existem proteínas que se acredita terem um papel importante na organização e orientação do DNA recém sintetizado em cromatina (Weintraub et alli., 1975).

I.2.2. Proteínas não-histonas

Estas proteínas estão presentes na cromatina em uma quantidade aproximadamente igual a das histonas. Em géis de poliacrilamida/uréia/SDS podem ser isoladas e identificadas perto de 200 diferentes proteínas dos mais diversos pesos moleculares. Muitas destas proteínas são enzimas envolvidas na replicação e na transcrição ou então formam a matriz nuclear.

Um grupo em especial nos chama mais atenção pois se assemelham bastante às histonas por terem um baixo peso molecular (e uma alta mobilidade eletroforética em géis) e devido a esta propriedade são conhecidas como proteínas HMG (high mobility group). Estas proteínas apresentam como característica marcante a presença de muitos resíduos de aminoácidos básicos (principalmente lisina e arginina) que conferem a estas proteínas uma forte basicidade. Como outra importante característica é interessante ressaltar que se apresentam em múltiplas cópias na cromatina, onde se acredita que tenham um papel estrutural/organizacional da mesma.

Este grupo de proteínas difere das histonas por não estar tão intimamente associado à cromatina e podem ser extraídas com soluções NaCl 0,35 M. Outra importante diferença entre as histonas e as HMGs é que estas últimas não apresentam um centro apolar como as histonas, pois as HMGs apresentam uma região N terminal básica e uma região C terminal ácida separadas por uma pequena região rica em resíduos de serina, glicina e prolina.

As HMGs mais características estão subdivididas em 4 sub-grupos denominados: HMG1, HMG2, HMG14 e HMG17. Existem outras sub-famílias associadas a tecidos especiais ou mesmo a momentos diversos do ciclo celular mas que parecem ser na maioria das vezes modificações dos quatro tipos básicos mais frequentes, podemos citar as HMG Y em leveduras, as HMG E em eritrócitos de aves e até mesmo as HMG T presentes em alguns espermatozoides(Lehming et alli., 1994 e Varga-Weisz et alli., 1994).

Existem muitos trabalhos que associam estas proteínas a funções específicas nucleares: as HMG1 e 2 estariam associadas à replicação e à diferenciação celular (Alexandrova et alli., 1984; Angelova et al., 1993 e Aizawa et alli., 1994) enquanto que as HMG 14 e 17 seriam encontradas com maior frequência associadas a regiões transcricionalmente ativas da cromatina (Tremethick et alli., 1993 e Tremethick, 1994)

Muitos autores têm associado as HMG1 a fatores de transcrição para genes da classe II ou mesmo associada à presença destes fatores em cromatina transcricionalmente ativa (Pil et alli., 1993). Ge e Roeder (1994) acreditam que não só HMG1 estimule a transcrição de genes como sua ação seja potencializada pela presença de HMG2.

I.2.3. A cromatina ativa

I.2.3. A natureza da cromatina ativa

Os genes eucarióticos ativos tendem a compartilhar uma série de características que parecem estar associadas com a transcrição, mesmo que isoladamente sejam insuficientes para serem tidos como únicos responsáveis por este processo. Estas características incluem uma maior sensibilidade à ação da DNase tipo I (Ferrari et al., 1985 e Adams et alli., 1986), uma tendência a uma relativa hipometilação e um outro grande número de características que indicam que o DNA ou a cromatina estão diferentemente arranjados do que quando

comparados com a cromatina inativa (Adams et alli., 1986). Dentre as várias características discutidas em vários artigos, duas delas nos são particularmente importantes e por essa razão vamos apresentá-las um pouco mais detalhadamente: a sensibilidade aumentada à ação da DNase tipo I e o arranjo e interação das proteínas da cromatina ativa (Weisbrod et al., 1979 e Weisbrod et alli., 1980).

I.2.3.1. A sensibilidade da cromatina a ação da DNase tipo I

Weintraub e Groundine em 1976 descreveram pela primeira vez um aumento na sensibilidade da cromatina ativa à ação da DNase tipo I. Eles demonstraram que genes para globina, de cromatina originária de eritrócitos, eram mais sensíveis à digestão por DNase tipo I do que os mesmos genes de cromatinas de outros tecidos. Similarmente, os genes para ovoalbumina oriundos de ovidutos de galinha eram muito mais sensíveis à ação de DNase do que os mesmos genes oriundos de outras cromatinas de diversos tecidos onde estes genes não eram expressos.

A sensibilidade à ação da DNase tipo I foi desde então tida como um fenômeno comum, típico de regiões ativas da cromatina, e que não envolve apenas a região alvo da transcrição, mas também uma região vizinha ao gene contendo algumas kilobases. Essas regiões sensíveis podem muitas vezes envolver *clusters* de genes, como por exemplo, no caso do gene para o domínio β da globina que inclui todo o cluster dos genes *β -like* e mais pelo menos 8 kpb na extremidade 3' e 6 kpb na extremidade 5'.

Alta sensibilidade à ação da DNase tipo I geralmente, mas nem sempre, está correlacionada com uma relativa hipometilação dos genes. No entanto, apesar de ser a hipometilação um pré-requisito para a transcrição ela não é suficiente para assegurar esse fenômeno (Adams et alli., 1986)

A ativação de regiões promotoras moduladas por hormônios é um dos fatores que também parece facilitar a ação da DNase tipo I sobre os genes ou gene precedido pela

referida região, . Neste nível colocamos várias das regiões *enhancers* conhecidas, regiões promotoras e sem dúvida muitos sítios de ligação de hormônios na cromatina, como por exemplo, os genes para vitelogenina em *Xenopus levi* (Adam et ali., 1986 e Roth et al., 1992).

I.2.3.2. Proteínas da cromatina durante a ativação gênica

Entre os vários fatores citados nos itens anteriores nós podemos considerar as proteínas nucleossomais como um dos mais intimamente associados à diferenciação entre a cromatina ativa e inativa e, sem sombra de dúvida, um dos pontos mais discutidos hoje em dia é o seu provável envolvimento no controle da transcrição.

Muitos estudos têm demonstrado que a distribuição da histona H1 não é randômica e que a sua depleção está relacionada com atividade transcricional. Weintraub e colaboradores (1984) apresentaram evidências que demonstravam uma grande afinidade da histona H1 com nucleossomos de regiões inativas da cromatina e uma pequena ou mesmo quase inexistente afinidade das referidas histonas com nucleossomos em regiões de cromatina ativa. O afastamento da H1 permitiria um maior relaxamento da estrutura da cromatina que daria origem a uma conformação que permitiria uma aproximação das enzimas e dos outros fatores envolvidos com a transcrição (Wolffe, 1994; Kohlstaedt et al., 1994).

O desenvolvimento de embriões de ouriços-do-mar é acompanhado pela sucessiva incorporação à cromatina de uma sequência de histonas variantes, as histonas esperma-específicas. Estas histonas são substituídas a cada passo do desenvolvimento por uma sequência de proteínas novas que vão a cada estágio variando, e com isso variam a distância dos nucleossomos e o arranjo da cromatina, e isso parece estar associado à regulação sequencial da expressão e repressão dos vários genes necessários aos vários períodos do desenvolvimento do indivíduo. Em outras espécies também são encontrados exemplos de

alterações nas histonas ao longo do desenvolvimento ou mesmo diferenciação de algum tipo celular como é, por exemplo, a substituição das histonas por protaminas em espermatozoides de salmonídeos e de alguns mamíferos, o que parece estar associado com uma maior compactação do material genético. Podemos também colocar nesta categoria de eventos a substituição das histonas encontradas nos micronúcleos inativos de *Tetrahymena sp* pelas histonas presentes nos macronúcleos ativos desta mesma espécie (Roth et al., 1994).

Existem evidências consideráveis de que a acetilação de histonas também seja um fator associado à atividade transcricional da cromatina, principalmente porque muitas vezes a presença de histonas acetiladas foi associada a aumentos consideráveis na síntese de RNA (Adams et al., 1986). No entanto, a função exata da hiperacetilação de histonas durante a transcrição não foi ainda determinada, e a melhor correlação descrita se restringe a uma hiperacetilação da histona H4 e de um rápido *turnover* de grupos acetil em cromatina ativa (Turner, 1991). Chalkley e colaboradores (1985) propuseram que a acetilação/desacetilação de histonas geram uma alteração sequencial do nível de compactação da cromatina permitindo que a região associada a histonas acetiladas se torne mais ativa.

A ubiquitina é uma proteína altamente conservada de 76 aminoácidos, necessária para degradação intracelular de proteínas, não-lisossomal dependente de ATP, também tendo sido encontrada associada com histonas H2a e H2b. As histonas ubiquitinadas, principalmente H2b, estão presentes em altas concentrações em regiões de cromatina transcionalmente ativas e portanto estão entre os fatores provavelmente associados à regulação da atividade gênica. Importante ressaltar que as drogas que inibem a transcrição também inibem a adição de ubiquitina às histonas, mas não impedem a ação de isopeptidases que reduzem drasticamente, nestes casos, a presença de histonas ubiquitinadas (Davie et al., 1994).

As histonas também podem ser fosforiladas, metiladas, ADP-ribosiladas e até mesmo farnesiladas e em função de todas estas associações covalentes alterarem a carga das histonas e portanto sua associação com a cromatina. Muitas tentativas têm sido feitas para

estabelecer uma correlação entre estas modificações, a atividade da cromatina e a regulação gênica.(Adams et alli., 1986; Turner, 1991; Takada et alli., 1994). Poli ADP-ribosilação de histonas parece estar associada à inibição da síntese de RNA e da fosforilação de histonas. Alguns dos mais importantes trabalhos na área da modulação da transcrição e replicação têm demonstrado que a atividade das enzimas envolvidas com este processo são moduladas pelo nível de fosforilação da histona H1 como é o caso da DNA primase. Experimentos têm demonstrado um aumento na atividade da quinase da histona H1 pouco antes do início da síntese de DNA, durante o ciclo celular (Takada et alli., 1994).

As proteínas não histonas HMG 14 e 17 parecem estar fortemente associadas com cromatina ativa (Tremethick et al, 1993). Elas são responsáveis pelo menos em parte, pela maior sensibilidade à DNase tipo I em cromatina ativa (Stein et alli., 1974; James et al., 1977; Weinsbrod et al., 1979 e Kuhel, 1979). Muitos estudos de determinação de regiões ativas da cromatina têm sido feitos pela identificação dessas regiões pela afinidade de interação entre as HMGs 14 e 17 isoladas e purificadas por colunas de afinidade e a cromatina transcricionalmente ativa (Watson et alli., 1987; Sheflin et alli., 1993). Um fato que tem chamado a atenção dos pesquisadores é a fosforilação diferencial das HMGs conforme os estágios do ciclo celular dos diversos tipos celulares (Bhorjee, 1981 e Wisnieswski et alli., 1994).

1.2.4. Interações entre histonas e HMGs

Muitos dos processos observados no núcleo das células parecem estar associados com alterações na conformação da cromatina e estas alterações parecem estar sendo moduladas por alterações nas interações entre as proteínas cromossômicas e o DNA. Entre as muitas proteínas existentes na cromatina, duas classes estão mais intimamente associadas à conformação e ao empacotamento da cromatina e são as histonas e HMGs. Portanto,

acredito ser importante abordarmos o que existe descrito na literatura sobre as interações dessas duas grandes classes de proteínas com o DNA e de como a interação entre elas podem estar modulando os processos nucleares. Não devemos esquecer que estas proteínas interagem com o DNA através de um jogo de cargas e que muitas das alterações covalentes que elas sofrem têm como objetivo exatamente modular estas interações e, portanto, alterar a conformação da cromatina, provavelmente levando a mesma de um estado ativo a um inativo ou vice-versa (Ding et alli., 1994; Kohlstaed, 1994b e Tremethick, 1994).

I.2.4.1 Histona H1

Roth e Allis (1992) observaram que em muitas situações corriqueiras na natureza a fosforilação de H1 está correlacionada com a descondensação da cromatina e a forma desfosforilada de H1 com a formação ou estabilização de estruturas altamente condensadas. Além do mais, a natureza dinâmica da fosforilação/desfosforilação da cromatina provavelmente influencia a aproximação de outros fatores envolvidos nos processos de estabilização dos vários níveis de conformação da mesma. A fosforilação facilita a saída de H1 da cromatina e estas alterações no "steady-state" de fosforilação de H1 podem resultar em mudanças nos níveis de associação de outras proteínas com o DNA. Portanto, H1 pode ser hábil em regular indiretamente a topologia dos domínios cromossômicos modulando a disponibilidade das enzimas necessárias às suas correspondentes sequências *consensus*. Muitas outras proteínas não-histonas podem modular a fosforilação de H1, como por exemplo HMG1 e de uma maneira menos específica HMG2.

Algumas alterações pós-transcricionais, tais como acetilação das histonas do *core* do nucleossomos, são sabidamente moduladoras da estabilidade da interação H1/DNA e portanto, da estrutura da cromatina. Está suficientemente documentado na literatura que quando o *core* dos nucleossomos está acetilado e H1 está fosforilada de maneira acentuada,

os pontos de contato entre DNA/Histonas estão enfraquecidos, levando a uma descondensação da cromatina. Gradações entre estes dois processos podem ser observadas e estão associadas a diversos fenômenos biológicos que envolvem desde a maturação de células germinativas até o próprio desenvolvimento de embriões.

Roth, entre vários autores, propõe um modelo mostrando como as alterações na carga das histonas H1 via modificação covalente (fosforilação) pode alterar o estado de condensação da cromatina, como podemos ver na FIGURA 3.

Existem outras alterações no micro-ambiente nuclear influenciadas pela fosforilação de H1 como, por exemplo, a atividade da enzima DNA primase. Segundo Takada et al. (1994) tal enzima tem sua atividade aumentada na presença de H1 fosforilada e isto foi observado na fase que precede imediatamente a fase S do ciclo celular. Encontra-se descrito na literatura que um aumento na atividade da enzima H1 quinase acontece um pouco antes da fase que caracteriza a síntese de DNA (Takada et al., 1994).

À parte de seu papel influenciando a replicação, parece também que muitas vezes a fosforilação da H1 ou mesmo a sua interação com outras proteínas nucleares é capaz de influenciar a transcrição. Alguns autores como Kohlstaedt et al. (1994a) insistem em que a capacidade de H1 em condensar dinucleossomos quando não fosforilada é um forte indicativo para o papel de reguladora da expressão gênica. Fato muito importante também observado no trabalho deste autor é a forte interação específica entre H1 e HMG1 que chegam a formar heterodímeros estáveis e com baixa afinidade pelo DNA. A HMG2 não é capaz de se associar a H1, apesar de sua semelhança estrutural com a HMG1.

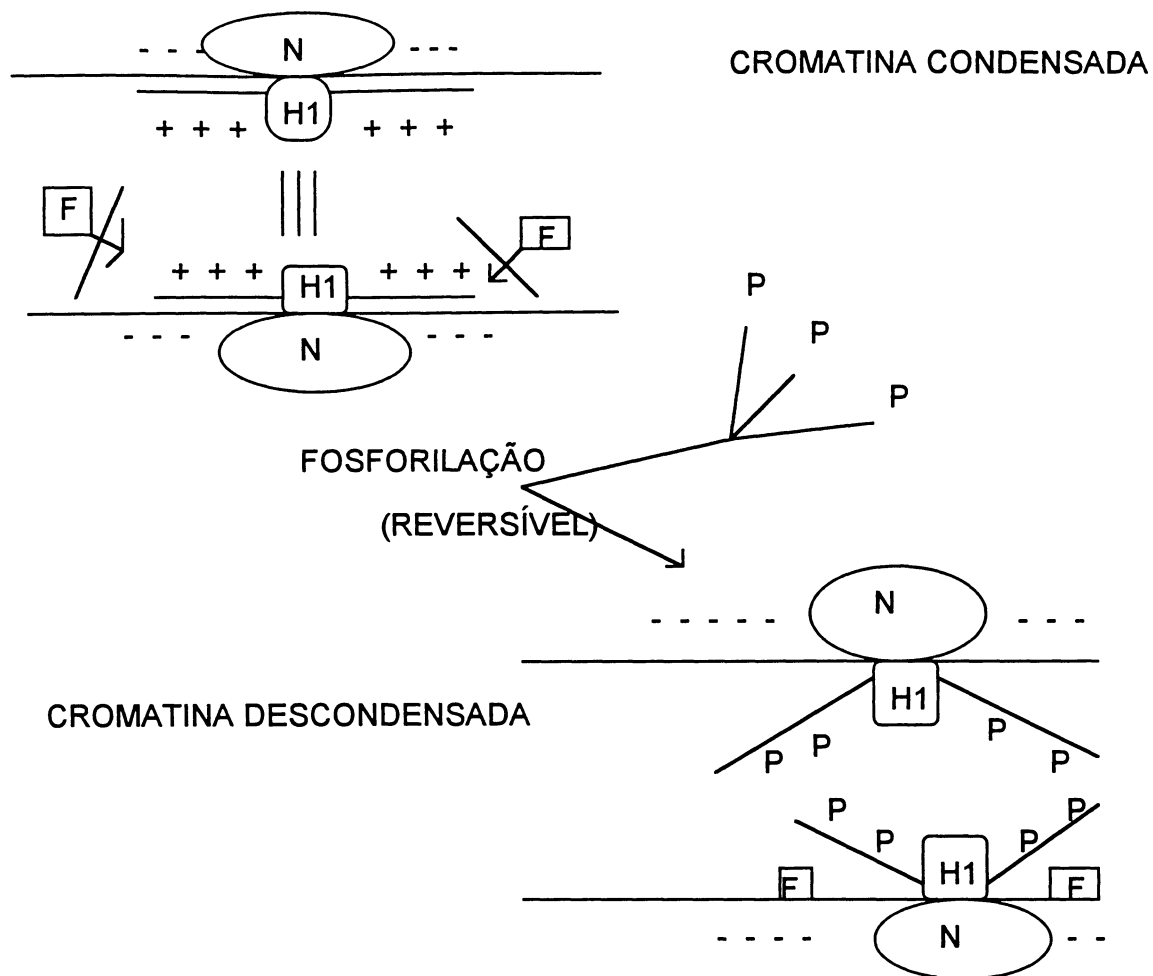


FIGURA.I.3. Modelo para o envolvimento da fosforilação/desfosforilação da H1 na condensação da cromatina (Roth et al., 1992).

Neste esquema as cargas das caudas ricas em lisina da H1 neutralizam as cargas positivas do esqueleto rico em cargas negativas do DNA, permitindo a condensação. As seqüências alvo para fatores *trans-acting* (F) podem desta maneira estar inacessíveis. Após a fosforilação há um aumento de cargas negativas na cauda da H1 que geram a repulsão das caudas pelo DNA, deixando as regiões do DNA descobertas e mais acessíveis. As seqüências alvo para os fatores *trans-acting* podem ficar mais disponíveis neste estado e, após a ligação com os respectivos fatores, pode ser promovida tanto a condensação da cromatina durante a mitose como a descondensação da cromatina durante a transcrição. Na figura o N representa um único nucleossomo associado a uma molécula de H1 e o P sítios de fosforilação.

I.2.4.2. Histonas H2a e H2b

As histonas H2a e H2b são as histonas onde a ubiquitinação parece ter um papel modulador da atividade da cromatina. Mais especificamente a ubiquitinação da histona H2b está associada à transcrição, pois durante a ativação transcricional da cromatina a H2b encontra-se até mais de 40% ubiquitinada do que em regiões de cromatina inativa. Também foi observado por Davie et al. (1994) que inibidores de transcrição são capazes de diminuir os níveis de H2b ubiquitinadas. Outros pesquisadores como Davies et al. (1994), contrariamente, citam que embora a ubiquitinação da H2a seja menos claramente associada com a transcrição existem muitos experimentos que demonstram a presença de H2a ubiquitinadas em frações transcionalmente ativas da cromatina. Estes dados encontram subsídio em resultados de pesquisadores que mostram que nucleossomos com H2a ubiquitinada são mais sensíveis à ação digestiva da DNase tipo I.

Hansen e Wolfe (1994) descrevem em seu trabalho que várias alterações podem ser encontradas quando comparamos o *core* de nucleossomos de cromatina ativa com inativa, e uma das alterações mais marcantes é que na cromatina ativa o *core* dos nucleossomos é pobre em dímeros de H2a/H2b e isto parece estar associado a uma "facilitação" para a passagem da RNA polimerase por este sítio específico da cromatina ativado para transcrição. Os mesmos autores citam que já foi determinado que a remoção destes dímeros facilita a associação do DNA nucleossomal com outras proteínas não histonas que provavelmente facilitem a transcrição. Ao que parece, hoje em dia é aceito que a retirada destes dímeros do nucleossomo facilita a descompactação do mesmo (Tremethick et al, 1993).

Os mesmos autores supra citados (Hansen et al., 1994) demonstraram que a carga das histonas H2a e H2b parecem ser de importância crucial para o nucleossomo, pois íons divalentes como, por exemplo, cálcio e magnésio são capazes de estabilizar nucleossomos na ausência de dímeros H2a/H2b. Provavelmente, a descompactação que ocorre com a perda

de dímeros H2a/H2b seja devida a repulsão das cargas do esqueleto externo do DNA não neutralizadas pelo *core* de histonas. Ao que parece, o afastamento dos dímeros de H2a/H2b do nucleossomo permite a associação do tetrâmero (H3/H4)₂ com outros fatores que facilitem a transcrição.

I.2.4.3. Histonas H3 e H4

As histonas H3 e H4 parecem ser as responsáveis pela manutenção da estrutura básica dos nucleossomos e sua interação com o DNA nucleossomal parece ser pouco alterada durante a ativação e inativação da cromatina. É como se fosse através de associações com este esqueleto interno do core que as outras histonas, ou mesmo proteínas não histonas, pudessem modular a atividade da cromatina. O que podemos compreender dos trabalhos de 1993 e 1994 publicados por Tremethick e colaboradores é que as outras proteínas do nucleossomo ao sofrerem modificações covalentes, modificam sua afinidade pelas histonas H3 e H4 e assim são substituídas por outras proteínas não-histonas, talvez HMGs, e, pelo que podemos observar na literatura, esta troca se dá nos momentos de ativação da cromatina quando os dímeros de H2a/H2b são substituídos por outras proteínas.

I.2.4.4. Proteína 14-3-3

Chen e Wagner (1994) demonstraram em seu trabalho que a ligação das histonas com uma proteína conhecida como 14-3-3 pode ter um papel importante na modulação da atividade gênica. A proteína 14-3-3 é uma proteína ácida dimérica que é muito abundante em cérebro mas que também existe em outros tecidos. Esta proteína é capaz de ativar inúmeras enzimas além dos mecanismos de secreção dependentes de cálcio. Existem inúmeros relatos que indicam esta proteína como ativadora de PKC.

Como esta proteína é um conhecido ativador de transcrição em organismos não-mamíferos, seu papel como ligante de histonas foi averiguado e ficou determinado que esta proteína era capaz de ativar em muito a fosforilação de histonas. Se existe algum significado fisiológico para isto ainda não se sabe, mas em muitos organismos esta proteína é considerada uma ativadora de transcrição.

1.2.4.5. HMG1 e HMG2

As HMG1 e HMG2 são muitas vezes descritas conjuntamente nos artigos devido as suas similaridades estruturais. No entanto, ao observarmos mais detalhadamente essas duas proteínas encontramos que apresentam características funcionais bem distintas.

A HMG1 é uma proteína não específica de ligação com o DNA que parece estimular a transcrição de genes da classe II e que pode ter sua ação potencializada pela presença de HMG2 (Ge et al., 1994).

Segundo Lehming et alli. (1994) existem muitas similaridades entre a estrutura da HMG 1 e uma família de proteínas ativadoras de transcrição em *Drosóphila sp.* Este autor demonstrou em seu trabalho que em embriões desta espécie a HMG1 pode atuar como indutor da transcrição gênica.

Aizawa e colaboradores (1994) demonstraram em seus experimentos que HMG1 está fortemente associada à transcrição, pois ao injetar anti-HMG1 em núcleos ativos, a transcrição foi inibida. Os referidos autores mostraram que as proteínas HMG1 e 2 estão associadas não só à transcrição mas também à replicação e diferenciação celular.

Pil et alli., 1993 em seu trabalho apresentam dados que sugerem que as HMG1 e 2 estão muito associadas à formação do complexo de iniciação na transcrição, agindo não só como fatores de transcrição, mas também gerando sitios de ligação para outros fatores e deslocando as histonas H2a e H2b dos nucleossomos .

Um outro grupo de autores, entre os quais está Vargas-Weisz (1995), acreditam que as HMG1 substituam as H1 em regiões de cromatina ativa e que seu principal papel seja deslocar esta histona por ativar enzimas que alterem sua carga via reações covalentes como fosforilação ou mesmo acetilação. Estes autores acreditam que as alterações de carga são as responsáveis pelas modificações de interações entre proteínas nucleares e DNA, e conseguiram demonstrar esse ponto através de medidas de afinidade de proteínas pelo DNA em vários pHs e forças iônicas, fatores que influenciaram fortemente a interação.

Angelova et al. (1993) demonstram em seu trabalho o envolvimento de HMG2 com a diferenciação do tecido, onde pode ser visto que quanto mais proliferativo e indiferenciado for o tecido, maior será a quantidade de HMG2 presente. Além do quê, o uso de anti-HMG2 bloqueou a síntese de DNA e a diferenciação do tecido (Stros et alli., 1994).

Alexandrova e colaboradores em seu trabalho de 1984 sugerem com seus resultados o envolvimento de HMG1 com a replicação, apenas não sabemos até hoje exatamente em que etapas deste processo ocorre a ação da HMG1.

I.2.4.6. HMG14 e HMG17

Weisbrod e colaboradores em seu artigo de 1980 demonstraram que a sensibilidade da cromatina à DNase tipo I é dependente da presença de HMG14 e 17, pois quando estas proteínas são eluídas da cromatina, a sensibilidade à DNase tipo I desaparece. Neste artigo também ficou demonstrado que a maioria dos genes transcricionalmente reguláveis tem sua sensibilidade à DNase tipo I aumentada pela presença de HMG14 e 17 e é muito interessante notar que estas proteínas ligam-se preferencialmente a nucleossomos depletados de histonas H2a e H2b.

Durante a discussão dos resultados do artigo fica bem claro que os autores acreditam que HMG14 e 17 ocupam os mesmos sítios que H2a e H2b no nucleossomo ativo e que portanto devem competir em afinidade pela H3 e H4 presentes nos nucleossomos.

HMG14 e 17 são responsáveis apenas em parte pela maior sensibilidade dos genes à DNase tipo I. Observações feitas na literatura indicam que modificações covalentes nas histonas podem e devem também estar associadas à maior atividade dos nucleossomos. O porquê da maior sensibilidade à DNase tipo I na presença de HMG14 e 17 não fica bem claro ainda, mas acredita-se que os nucleossomos mistos seriam mais abertos que os compostos apenas por histonas. Esta deve ser a mesma razão pela qual nucleossomos mistos, histonas/HMGs, facilitam a transcrição.

Vários outros dados na literatura corroboram com o que está descrito no artigo de Weinsbrod et al 1980, como por exemplo, o fato de HMG17 induzir a síntese de RNA polimerase III em sistemas livres de célula e ainda pelo fato de HMG14 e 17 induzirem a transcrição, não por ativação da atividade enzimática, mas por alteração na conformação dos nucleossomos, como demonstrado por Ding et alli. 1994. Dados experimentais associam HMG17 com a iniciação da transcrição enquanto que a HMG14 parece estar associada com o alongamento mas o ponto exato de ação destas duas proteínas ainda não está bem esclarecido.

A capacidade das HMGs 14 e 17 de espaçar nucleossomos esta bem demonstrada nos trabalhos de Tremethick et al 1993 e 1994 onde, além deste papel, fica também provada a substituição de H2a e H2b nos nucleossomos ativos por dímeros de HMG14 e 17. Os referidos autores demonstram que ao depletar os nucleossomos de HMG14 e 17 eles se tornam transcricionalmente inativos. Um fato que deve ficar bem claro é que a simples retirada de dímeros de H2a/H2b dos nucleossomos não os torna mais ativos transcricionalmente falando, mas a adição de HMG14 e 17 ao sistema induz a transcrição.

I.2.5. Receptores de retinol

Através de uma série de estudos experimentais nas últimas duas décadas, as proteínas receptoras de retinol têm sido bioquimicamente identificadas e purificadas, e seu

sequenciamento determinado por clonagem. Análises estruturais comparativas revelaram uma superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes que incluem receptores para hormônios esteróides, tireóidanos, vitaminas A e D e hormônios de muda de invertebrados (Evans, 1988; Green et al., 1988 e O'Malley, 1990). Enquanto a maioria dos membros da família dos receptores são nucleares na presença ou ausência dos seus respectivos ligantes, alguns também são encontrados no citoplasma em complexos com proteínas *heat-shock*. A ligação com os respectivos ligantes inicia uma alteração conformacional dos receptores que os leva à dissociação das proteínas *heat-shock*, dimerização, translocação para o interior do núcleo e associação com sítios de ligação no DNA. A sequência de DNA alvo ou elemento responsivo a hormônio (HREs) funciona como um ativador transcricional, e pode ser encontrado em localizações variáveis tanto abaixo como acima na fita de DNA em relação ao sítio de iniciação transcricional do gene a ser ativado. Permanece ainda a questão se os receptores não-ligados a seus ligantes estariam associados aos sítios específicos do DNA ou livres no nucleoplasma. No caso dos receptores de hormônio tireoidianos, os receptores livres podem ter uma ação efetora negativa, podendo estar, mesmo quando livres, associados a regiões receptoras da cromatina (Damm et alli., 1989).

Baseados nestes conhecimentos podemos supor que os passos para a ação do retinol nas células sejam provavelmente a sua entrada no citoplasma, facilitada por um receptor ou transportador, a sua translocação ou de seus metabólitos para o núcleo por uma proteína celular transportadora. E, finalmente, a regulação da transcrição de genes responsivos a retinol pela mediação de regiões ou sítios receptores para retinol na cromatina.

1.2.5.1. Proteínas ligadoras de retinol

As proteínas ligadoras de retinol (RBP) são as primeiras proteínas envolvidas com os processos mediados por ação do retinol na célula. Esta proteína é uma cadeia polipeptídica

com peso molecular de 21 kDa, contendo um único sítio para all-trans-retinol (Kanai et alli., 1968 e Newcomer et alli., 1974). A vitamina A presente no plasma é encontrada principalmente na forma de retinol e associada a esta proteína. Em adição a este complexo (RBP-retinol) muitas vezes encontramos uma outra proteína chamada transtirretina (TTR) (Kanda et alli., 1974). Nos testículos, a RBP foi encontrada no espaço intersticial mas não nos túbulos seminíferos (Kato et alli., 1985). O complexo RBP-retinol/TTR é capaz de doar retinol tanto para a célula de Sertoli como para as células germinativas no lado basal das *tight-junctions*.

I.2.5.2. Proteínas celulares ligadoras de retinol

No interior da maioria das células alvo de retinol existem proteínas ligadoras de retinol (CRBP) e de ácido retinóico (CRABP), que se ligam a estes compostos com alta afinidade e especificidade. Estas proteínas foram isoladas e ficou caracterizado que possuem um peso molecular de 15 kDa (Bashor et alli., 1973). CRBP(I) e CRABP (I) são as formas predominantes destas proteínas na maioria dos tecidos. No entanto, também são encontradas em quantidades menores outras isoformas destas mesmas proteínas CRBP(II), CRBP (III) e dois tipos de CRABP (II) que estão restritas a alguns tecidos e a períodos do desenvolvimento embrionário. Estas proteínas tem como função transportar o retinol ou ácido retinóico dentro da célula (Porter et alli., 1983 e Kitamoto et alli., 1989).

A despeito dos esforços feitos até hoje, a natureza da função de ambas as proteínas CRBP e CRABP é discutida e cheia de dúvidas. Geralmente, o nível de CRBP ou CRABP no tecido é proporcional à resposta deste tecido à vitamina A. Em concordância com esta proposição está o fato de que células mutantes, onde a CRABP não é expressa, não se diferenciam mesmo quando expostas a altas concentrações de ácido retinóico, isto apesar da captação do referido ácido ser normal pela célula (Schindler et alli., 1981 e Scherman et alli., 1981). Em contraste, também já foram encontrados mutantes onde, apesar de estarem

presentes no citoplasma CRABPs funcionais, a célula não respondia à ação da vitamina A (McCue et ali., 1983).

Muitos papéis fisiológicos foram propostos tanto para CRBP como para CRABP. Um dos mais propostos pela literatura é o de serem estas proteínas uma maneira da célula estocar retinol e ácido retinóico no citoplasma (Chytil et ali., 1988). No entanto, o provável papel destas proteínas, seria o de transportadoras de retinol e/ou ácido retinóico do citoplasma para receptores nucleares específicos que em última análise resultaria em modulação da atividade transcricional de genes específicos sensíveis à vitamina A (Sporn et ali., 1994).

I.2.5.3. Receptores nucleares de retinol

A resposta celular à vitamina A parece ser mediada por duas famílias de receptores nucleares recentemente identificadas, que incluem a família de receptores para ácido retinóico (RARs) e a família de receptores para retinóides não específicos (RXRs) (Leid et ali., 1992). De maneira análoga aos receptores de hormônios esteróides e tiroideanos, estas duas famílias de receptores descritas, quando ativadas por seus respectivos ligantes, funcionam como fatores de transcrição modulando a expressão de genes responsivos à vitamina A (O'Malley, 1990).

Ambas as famílias de receptores apresentam três formas variantes: a forma α , a forma β e a forma γ . Em nenhuma das duas famílias foi encontrado um receptor que se ligasse tanto com ácido retinóico como com retinol (Benbrook et ali., 1988 e Mangeldorf et ali., 1990).

As duas famílias de receptores apresentam uma similaridade estrutural e organizacional, mas diferem em sequências específicas, particularmente nos domínios de ligação com seus ligantes (Yu et al, 1991). Os receptores que compõem a superfamília dos receptores hormonais nucleares são compostos de 6 domínios, chamados de A, B, C, D, E e F, respectivamente da região N terminal para a C terminal (Evans, 1988). O maior grau de similaridade (50 a 60%) entre os RARs, RXRs e os receptores para hormônios esteróides e

tireoideanos é encontrada no domínio C que consiste de uma sequência de 68 aminoácidos rica em resíduos de cisteína que formam dois *zinc-fingers*, conferindo a cada receptor a habilidade de se ligar a sequências específicas do DNA. A região E próxima a extremidade C terminal e que é composta de 220 aminoácidos, responsável pela ligação com o ligante, tem menos similaridade em seus aminoácidos e os encontrados nas regiões de ligação com o ligante em receptores para hormônios esteróides. Em contraste com o observado, entre as famílias de RARs e RXRs, os domínios responsáveis pela ligação com o ligante são altamente conservados (76% de identidade de sequência), sugerindo que ambas as famílias apresentam um receptor ancestral comum para retinóide (Mangelsdorf et alli., 1990). Mas, sem dúvida nenhuma, hoje em dia estas regiões apresentam diferenças substanciais em sua estrutura primária que nos fazem identificá-las como duas famílias de receptores .

A comparação entre as sequências de aminoácidos dos RARs e RXRs de seres humanos e de ratos revelou que existe uma maior conservação de uma das subfamílias interespécies do que a conservação das outras três subfamílias intraespécie. O alto grau de conservação das subfamílias nos leva a acreditar que estas subfamílias tenham funções específicas correlacionadas com seu papel fisiológico (Brand et alli., 1988 e Tora et alli., 1989).

I.2.5.4.Mecanismo de ação da vitamina A mediado por receptores nucleares de retinol

Tanto RAR como RXR ligam-se a pequenas sequências do DNA (*enhancer* ou *silencer*) próximas a genes responsivos à vitamina A chamadas de elemento responsivo a ácido retinóico (RARE) ou elemento responsivo a retinóide X (RXRE) que modulam a expressão do gene. Muitos genes responsivos à vitamina A têm sido descritos em uma variedade de tipos celulares responsivos à vitamina A, e, na maioria das vezes, a região RARE esta situada na extremidade 5' a 1 kb de distância do ponto de início da transcrição dos genes responsivos à vitamina A (Smith et alli., 1991).

Estudos de *footprinting* de DNA revelaram que RAR não se liga ao RARE sozinho, mas sim que forma heterodímeros com RXR que é um dos co-reguladores dos RAR e que assim o heterodímero formado apresenta uma alta afinidade pela região RARE (Zahng et alli., 1992). A interface de dimerização dos receptores RAR e RXR que formam geralmente um *zipper* de leucina é o domínio F, e este domínio fica geralmente encoberto pelo domínio E de ligação com o ligante (Foreman et alli., 1989). A formação de heterodímeros em receptores parece ser um mecanismo geral pelo qual hormônios interagem com elementos responsivos da cromatina. O único problema em entender este mecanismo é que ligações específicas de dímeros de RAR e RXR com a região RARE parece ser independente da presença do ligante, mas o significado fisiológico destes achados ainda precisa de muitas elucidações experimentais.

A presença de sequências RARE ou RXRE em genes indutíveis não é suficiente para a modulação transcricional, mas outros componentes do complexo transcricional, o tipo de ligante e o tipo de receptor devem ser corretos para mediar a ativação específica da transcrição gênica. Em células de Sertoli, por exemplo, o gene para RAR- β contendo uma sequência RARE é expresso, mas o nível de RNA mensageiro para RAR- β não é aumentado pela presença de retinol (Kim et al., 1990). Este resultado em Célula de Sertoli demonstra bem a teoria de que o retinol, não sendo o ligante apropriado, não foi capaz de ativar o gene, pois apesar do retinol poder ser metabolizado a ácido retinóico, isto não aconteceu em velocidade suficiente no referido experimento.

Os mecanismos de ação do retinol mediados por receptores nucleares em testículos são ainda muito desconhecidos. Até agora, apenas os genes para RAR- β e CRBP foram descritos como possuidores de uma região RARE. Entretanto, como ambos os receptores RAR e RXR foram encontrados em células de Sertoli, acreditamos que tanto os dímeros ativos RAR/RXR como os RXR sozinhos tenham um papel funcional nestas células (Griswold et alli., 1993).

I.2.5.5 Metabolismo da vitamina A em células de Sertoli

O principal alvo do retinol no testículo é a célula de Sertoli. Esta célula, após metabolizar o retinol, o envia para as células germinativas na face adluminal da barreira hemato-testicular, na forma correta e necessária para estas células. Adicionalmente, a célula de Sertoli, pode exercer controle sobre as concentrações de alguns dos derivados da vitamina A disponíveis para as células germinativas na face adluminal da barreira, através da captação, em particular, de apenas alguns destes derivados presentes no interstício.

Em células de Sertoli, o éster de retinol pode funcionar como um reservatório de onde os derivados ativos do retinol podem ser produzidos. Isto pode explicar porque o ácido retinóico da dieta não é eficiente em restabelecer a espermatogênese em ratos deficientes em vitamina A, uma vez que o ácido retinóico é incapaz de gerar éster de retinol (Bishop et al., 1987). Já foi plenamente demonstrado que o retinol em célula de Sertoli pode ser metabolizado a éster de retinol dentro de 24 a 32 horas por uma enzima, a lecitina:retinol aciltransferase (LRAT). A esterificação do retinol parece estar funcionalmente associada com a captação de retinol (Bishop et al., 1987). O complexo retinol-CRBP é usado como substrato para esterificar pela LRAT (Shingleton et al., 1989). A capacidade de sintetizar éster de retinol não está limitada à célula de Sertoli, mas também está presente em todos os estágios de espermatócitos e espermátides redondas.

A função exata do éster de retinol nas células de Sertoli não é clara, talvez o éster de retinol seja uma reserva primária para retinol ou mesmo um intermediário que seja facilmente transportado para células germinativas. De uma certa maneira, já é fato bem conhecido que a captação das quilomicras remanescentes, que são lipoproteínas ricas em colesterol, é facilitada nas células do fígado por um receptor de LDL a proteína LRP, proteína receptora de LDL. A LRP serve como uma proteína receptora e mediadora de endocitose, em um mecanismo similar ao que ocorre com as quilomicras remanescentes no

figado. As lipoproteínas contendo éster de retinol são liberadas pelas células de Sertoli e captadas pelas células germinativas (Kowal et ali., 1989).

Muitos trabalhos ainda serão necessários para estabelecermos os passos exatos do metabolismo e da ação dos esteres de retinol nos testículos. A FIGURA I.4 mostra o provável envolvimento do éster de retinol, lipoproteínas e LRPs na transferência dos retinóides das células de Sertoli para as células germinativas no compartimento adluminal do testículo (Goodmann et ali., 1965).

As quantidades de retinol livre presentes em células germinativas e células de Sertoli são pequenas ou mesmo insignificantes, muitas linhas de evidência indicando que qualquer retinol presente na célula será espontaneamente oxidado a ácido retinóico (Emerick et ali., 1967), sugerindo que pequenas quantidades de ácido retinóico encontradas nas células de Sertoli e células germinativas sejam produto desta oxidação. Em adição, o ácido retinóico celular é rapidamente metabolizado a um grande número de derivados, significando que se o ácido retinóico é requerido para a ativação transcricional, deve ser gerado imediatamente antes da ação e próximo do sítio onde a ação deve ocorrer, provavelmente dentro da célula alvo (Napolí et al., 1981).

A elucidação da sequência de enzimas envolvidas na conversão do retinol a ácido retinóico é atualmente um assunto de inúmeras pesquisas. Estudos preliminares indicam que a oxidação de ambos retinol e etanol são catalisados pela mesma enzima, álcool desidrogenase (Pares et al., 1990). Esta função da álcool desidrogenase parece consistente com o fato de que o gene da álcool desidrogenase (ADH-3) é responsivo ao ácido retinóico. Entretanto, existem dados que mostram que o ácido retinóico é produzido a partir do retinol em linhagens mutantes de ratos onde não existe o gene para álcool desidrogenase (Posch et ali., 1989; Duester et ali., 1991). Estes resultados indicam que deve haver mais de uma enzima desidrogenase que use NAD^+ para converter especificamente retinol em ácido retinóico nas células de Sertoli (Siegenthaler et ali., 1990).

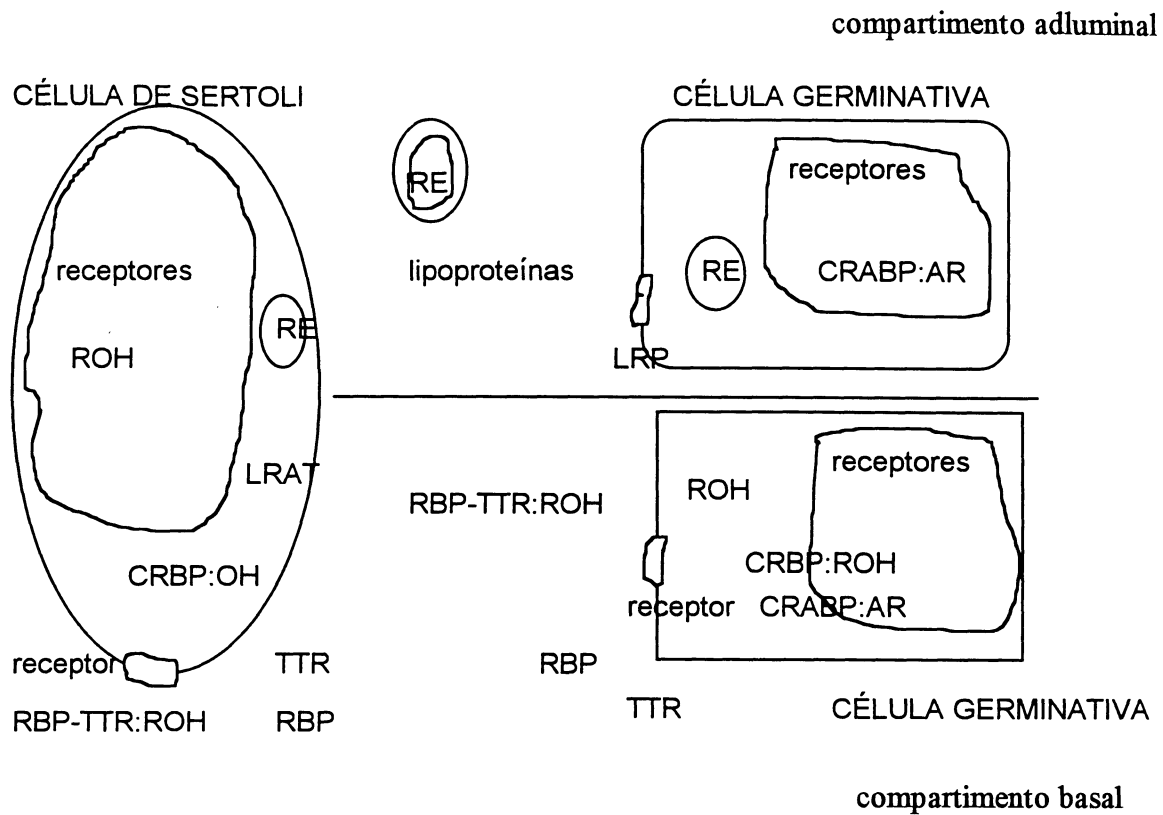


FIGURA. I.4. Modelo para as rotas de ação do retinol nos testículos (modificado de Griswold et al., 1989).

ROH- retinol

RE- éster de retinol

AR- ácido retinóico

RBP- proteína de ligação com retinol

TTR- transterrina

CRBP- proteína celular ligadora de retinol

CRABP- proteína celular ligadora de ácido retinóico

LRP- proteína receptora de LDL

LRAT- lecitina:retinol acil transferase

I.3. Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermidina e espermina são compostos associados com a proliferação e diferenciação celulares. As enzimas envolvidas com a biosíntese destes compostos são reguladas por vários agentes que afetam o crescimento celular e sua diferenciação, resultando em mudanças nas concentrações celulares das poliaminas. As atividades destas enzimas e a concentração das poliaminas são elevadas em tecidos de rápida proliferação e aumentam de maneira substancial quando crescimento ou diferenciação são induzidos. Em sistemas livres, as poliaminas formam complexos firmes, não-covalentes, com muitas biomoléculas, especialmente ácidos nucléicos, desta maneira influenciando a síntese, *turnover* e modificações pós-sintéticas do DNA, RNA e proteínas (Shubhaba et alli., 1989). Uma estimulação da síntese de poliaminas geralmente precede a síntese de DNA, RNA e proteínas, indicando um possível envolvimento das poliaminas na regulação destes eventos (Scalabrino et al., 1991). Alterações drásticas nas concentrações de poliaminas e na atividade das enzimas envolvidas com sua síntese foram efeitos demonstrados como associados ao crescimento e diferenciação induzidos por gonadotrofina em ovários e testículos, por estrogênio em útero e por hormônios androgênicos em glândulas genitais masculinas (Smith et alli., 1987 e Shubhaba et alli., 1989).

A formação de espermatozóides é um complexo, contínuo e dinâmico processo, que envolve divisão e diferenciação celulares. Esta série de eventos é regulada por hormônios e outros fatores não hormonais através de vários mecanismos biológicos não muito bem esclarecidos. A concentração testicular de espermidina parece estar associada com a maturação e com a diferenciação das células germinativas. Nos testículos de animais jovens, os níveis de espermidina e espermina são baixos no inverno, aumentam na primavera e atingem um pico no verão durante a espermatogênese. Durante a espermatogênese em roedores, as razões entre espermina/DNA e espermidina/DNA são relativamente constantes, embora a razão putrescina/DNA aumente nas espermátides

alongadas. O conteúdo celular de putrescina, espermidina e espermina decresce significativamente em espermatozoides maduros. Estes dados sugerem a importância das poliaminas em testículos durante a maturação e espermatogênese (Shubhada et alli., 1989; Kaipia et alli., 1990).

I.3.1. L-Ornitina descarboxilase (EC 4.1.1.17)

Em tecidos de mamíferos quatro enzimas são as principais responsáveis pela síntese de poliaminas. A l-ornitina descarboxilase (ODC) faz a conversão de ornitina em putrescina; a S-adenosil-l-metionina descarboxilase (AdoMetDC) que catalisa a descarboxilação da S-adenosil-metionina, necessária como doador de grupo aminopropil para a síntese de espermidina a partir da putrescina, através da espermidina sintetase e da síntese de espermina a partir da espermidina pela espermina sintetase. Um aumento na síntese de poliaminas está geralmente associado com uma ativação da biossíntese dessas enzimas e parece responder a estímulos que induzem a proliferação e diferenciação celulares. Tanto a espermidina como a espermina podem ser convertidas novamente a putrescina pela espermidina/espermina-N^o-acetiltransferase (SAT) e pela poliamina oxidase (Scalabrino et alli., 1991).

A SAT, a ODC e a AdoMetDC podem ser induzidas por uma variedade de hormônios, estímulos tóxicos, e inclusive a regeneração, possuindo uma rápida taxa de *turnover*. O significado fisiológico do catabolismo das poliaminas não é bem compreendido, embora esta rota possa prover uma via de salvação pela qual a porção putrescina das moléculas de poliaminas possa ser reutilizada quando necessário (Shubhada et alli., 1991).

A espermatogênese é um processo que envolve tanto a diferenciação como a proliferação das células germinativas. Durante este processo são encontradas grandes alterações nos conteúdos celulares de poliaminas e também podem ser associadas alterações nas atividades

das enzimas ODC e AdoMetDC que acompanham o crescimento e diferenciação funcional dos testículos (Shubhada et alli., 1991).

A atividade específica da enzima ODC em células de Sertoli é muito maior do que a observada no testículo inteiro e o padrão de dependência de idade é idêntico ao observado no testículo inteiro. Este dado sugere que a célula de Sertoli é o tipo celular que apresenta a maior atividade de ODC no testículo. A maior atividade enzimática da ODC em ratos é observada aos 12 dias de idade e a menor atividade enzimática é observada aos 45 dias de idade, que corresponde à maturação destas células. No trabalho de Shubhada encontramos a proposta de que como a célula de Sertoli é a maior responsável pela atividade da ODC no testículo, as células germinativas dependem da provisão de putrescina para a sua própria síntese de espermidina e espermina. Embora as células germinativas tenham ODC ativa, como esta atividade é tão baixa, é muito provável como proposto também por outros autores que exista esta dependência das células germinativas por uma quantidade adicional de putrescina vinda da célula de Sertoli. A putrescina e seus derivados, espermidina e espermina, quando em concentrações elevadas podem inibir a síntese de ODC (Shubhada et alli., 1991).

I.3.2. Atividade da ODC e retinol

Os retinóides exercem um profundo efeito no desenvolvimento de mamíferos e no crescimento celular e, dependendo do tecido, podem ser tanto estímulos proliferativos como anti-proliferativos. A ação dos retinóides é predominantemente mediada por vários receptores para ácido retinóico (RAR) e receptores para retinol X (RXR). A expressão destes receptores é tecido-específica e às vezes célula específicos, e ambos os receptores na forma de heterodímeros ou homodímeros podem modular atividade transcricional dos genes.

Em células epiteliais, o retinol é um composto anti-proliferativo e decresce a atividade da ODC, parecendo que a atividade desta enzima está intimamente associada ao estado proliferativo das células (Mao et alli., 1993). Os trabalhos em sua maioria não apresentam nenhuma correlação muito clara entre os efeitos dos retinóides sobre o crescimento e a atividade da ODC, embora estudos avançados utilizando a clonagem do gene da ODC indicaram alguns efeitos dos retinóides sobre o RNA mensageiro do gene da ODC. É possível que moléculas como os retinóides e a própria putrescina apresentem alguns efeitos significantes sobre as alterações pós-transcricionais destes RNAs mensageiros. A maioria dos estudos sobre o efeito dos retinóides sobre a ODC utilizou queratócitos como célula de estudo, e estes trabalhos demonstraram uma supressão da síntese de RNA mensageiro quando da presença de ácido retinóico, embora este efeito era dependente da síntese protéica, indicando que provavelmente não fosse um efeito direto do ácido retinóico sobre a transcrição.

Em concordância com os experimentos apresentados acima e com os primeiros experimentos correlacionando retinóides e atividade de ODC, o ácido retinóico aplicado topicamente nas costas de ratos antagonizou a indução do RNA mensageiro da ODC por TPA. Em outros estudos de desenho experimental similar, ácido retinóico e uma série de derivados dos ácidos benzóicos retinoidais inibiram a síntese de RNA mensageiro para ODC ocorrida em consequência da estimulação por dois promotores tumorais, telocidina e antralina. Uma exceção a estes efeitos é o observado em linfócitos de cobaia onde os retinóides estimulam a síntese de RNA mensageiro para ODC na presença de TPA e fito-hemaglutinina. Estes dados nos permitem concluir que não temos até agora de maneira clara nenhuma ligação entre o efeito dos retinóides e o crescimento, transformação e proliferação celulares se analisarmos estes efeitos frente à atividade ou mesmo à síntese da ODC (Sporn et alli., 1994).

1.3.3. Regulação da ODC

A ODC é uma das enzimas com *turnover* mais rápido que se conhece, com uma meia-vida de 10 minutos no testículo. É induzida por muitos estímulos de crescimento (por exemplo, hormônais e fatores de crescimento) e sua inibição por inibidores específicos ou agentes mutagênicos inibe o crescimento celular e a transformação. Estudos recentes mostraram que a super-expressão da ODC pode ser causada por transformação celular, indicando que a ODC pode ser tida como produto de um proto-oncogene (Hayashi et al., 1995). A ODC pode ser estimulada por vários tipos de estímulo, tais como tratamento hipotônico ou indução de diferenciação e inibida pelas próprias poliaminas (espermina e espermidina), como um mecanismo de defesa que evitaria um excesso de síntese destes compostos.

O único regulador alostérico conhecido da ODC é o GTP, que ativa a enzima de *Escherichia coli*, de alguns tumores e de cérebro de rato. Mudanças na atividade da ODC estão geralmente associadas com mudanças nas quantidades presentes da enzima; exceto quando as quantidades da enzima forem pequenas, pois a mesma pode estar presente na forma de um complexo inativo com a antienzima. A ODC é especificamente inibida por uma antienzima, uma proteína reguladora de 26,5 kDa. Quando sua síntese é induzida pela presença de poliaminas a antienzima liga-se reversivelmente, mas com grande afinidade, à ODC. Recentemente ficou demonstrado que a antienzima não só inibe a atividade da ODC como também deixa a enzima susceptível à proteólise, sendo este sistema dependente de ATP e diferente do sistema mais usual de indução de proteólise lisossomal por ligação de proteínas alvo com ubiquitina. A rápida regulação da ODC é o resultado de seu rápido *turnover*. A degradação da ODC é regulada, sendo acelerada por aumentos nos níveis celulares de poliaminas. A nível molecular, a ODC é regulada em quatro diferentes momentos da expressão gênica: transcrição do gene, degradação do mRNA, tradução do mRNA e degradação da enzima (Hayashi et al., 1995).

I.4. Objetivos

Em função do exposto nesta introdução, especialmente no que se refere à presença de receptores para retinol e ácido retinóico no núcleo das células de Sertoli e dos efeitos que o tratamento com retinol possa ter sobre a conformação da cromatina, o presente trabalho pretende:

- 1) Determinar o padrão de fosforilação das histonas e HMGs de células de Sertoli.
- 2) Analisar as possíveis alterações dos padrões de fosforilação de histonas e HMGs em células de Sertoli tratadas com retinol.
- 3) Determinar a sensibilidade da cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol à ação de DNase tipo I.
- 4) Correlacionar a presença de Fe(II) com a sensibilidade da cromatina de células de Sertoli cultivadas à ação da DNase tipo I, inferindo possíveis efeitos da presença aumentada de Fe(II) na célula induzindo danos no DNA, via reação de Fenton, como consequência do tratamento com retinol.
- 5) Avaliar os efeitos do tratamento com retinol sobre a incorporação de [³H] timidina à cromatina de células de Sertoli na presença de hidroxí-uréia, um inibidor de síntese de DNA.
- 6) Determinar o efeito do tratamento com retinol sobre a atividade da *Ornitina Descarboxilase* em células de Sertoli.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Materiais

1) [metil-³H] timidina, atividade específica 2,0 Ci/mmol

L-[1- ¹⁴C] ornitina, atividade específica 50,0 mCi/mmol

[6-³H] timidina, atividade específica 23,0 Ci/mmol

(Amersham Internacional, UK)

Na₂H³²PO₄ , atividade específica 20 mCi/ml (livre de carreador)

(IPEN - CNEN - SP - Brasil)

2) colagenase Tipo I, inibidor de tripsina (soja), all-trans-retinol, DNase Tipo I, acrilamida, gamicina, bis-acrilamida, uréia, hidróxi-uréia, meio 199, pirronina Y (Sigma Co.)

3) Tripsina 1/250 (Difco)

4) Soro fetal bovino testado para micoplasma (Cultilab)

5) Ultima Gold - líquido para cintilação (Packard Co.)

6) Filme X-OMAT, XAR-2 (Kodak)

Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza "pró-análise" (PA).

Todo material (vidraria, pipetas, filtros, etc) utilizados nas culturas de células foi lavado com Extran alcalino (Merck), enxaguado exaustivamente com água da torneira e por imersão em água destilada (5vezes em água destilada comum e 2 vezes em água destilada em destilador de vidro).

A vidraria (copos, tubos de ensaio, pipetas Pasteur, etc) e o material cirúrgico foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C, 1 atm por 40 minutos, posteriormente mantidos em estufa seca a 120 °C até o momento de uso. Os filtros com membranas de 0,2 µm foram autoclavados por 15 minutos nas mesmas condições.

Todas as soluções foram preparadas com água retirada do miliQ na hora da feitura das mesmas. O pH foi acertado com NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N, também preparados com água do miliQ. As soluções foram esterilizadas por filtração (membrana de 0,2 µm), e a esterilidade das mesmas foi testada por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana pelo menos 24 horas antes do uso.

II.1.1. Soluções salinas e meio de cultura utilizados

II.1.1.1. solução salina fosfato tamponada (PBS-1)

Utilizada no preparo da colagenase, do inibidor de tripsina e para as lavagens das células durante a cultura.

CaCl ₂	1,29 mM	
KCl	5,36 mM	
KH ₂ PO ₄	1,10 mM	pH 7,4
MgSO ₄	0,65 mM	
NaCl	136,9 mM	
Na ₂ HPO ₄	0,27 mM	
glicose	6,10 mM	

II.1.1.2. Solução salina tamponada (PBS-2)

Utilizada na lavagem de células após as incubações e nas homogeneizações

NaCl	136,9 mM	
Na H ₂ PO ₄	0,27 mM	pH 7,4
KH ₂ PO ₄	1,10 mM	

II.1.1.3. Solução salina tamponada sem Cálcio e sem Magnésio (CMF-PBS)

Utilizada para o preparo da solução de tripsina.

NaCl	136,9 mM	
KCl	5,36 mM	
Na ₂ HPO ₄	0,27 mM	pH 7,8
KH ₂ PO ₄	1,10 mM	
glicose	6,10 mM	

II.1.2. Soluções utilizadas nas extrações e isolamentos protéicos, bem como nos ensaios enzimáticos

II.1.2.1. Tampão A com triton - utilizado na extração de histonas

Sacarose	0,2 M	
Tris.HCl	0,05 M	
Acetato de magnésio	0,005 M	pH 7,6
KCl	0,025 M	
Triton X-100	0,01 %	
Bissulfito de sódio	0,005 M	

II.1.2.2. Tampão A - utilizado na extração de histonas

Sacarose	0,2 M	
Tris.HCl	0,05 M	
Acetato de magnésio	0,005 M	pH 7,6
KCl	0,025 M	
Bissulfito de sódio	0,005 M	

II.1.2.3. Tampão B - utilizado na extração de histonas

NaCl	0,14 M	
Acetato de magnésio	0,0024 M	pH 7,2
Tris.HCl	0,005 M	
Bissulfito de sódio	0,005 M	

II.1.2.4. Tampão de amostra I - utilizado no isolamento de histonas.

Fosfato de sódio	0,005 M	
β-Mercaptoetanol	0,1 M	pH 8,0
Bissulfito de sódio	0,005 M	

II.1.2.5. Tampão de amostra II - utilizado no isolamento de histonas.

Ácido acético	1,8 M	
Uréia	10,0 M	pH 6,6
Bissulfito de sódio	0,005 M	

II.1.2.6. Tampão de amostra para gel de SDS/Uréia - utilizado no isolamento de HMGs.

Tris.HCl	0,0625 M	
SDS	2 %	
b-Mercaptoetanol	5 %	pH 6,8
Glicerol	10 %	
Uréia	0,5 M	

II.1.2.7. Tampão 1 - utilizado no isolamento dos núcleos.

NaCl	5,0 mM	
MgCl ₂	1,5 mM	
CaCl ₂	0,5 mM	pH 7,0
Tris.HCl	5,0 mM	
PMSF	0,1 mM	

II.1.2.8. Tampão 2 - utilizado na incubação dos núcleos com DNase tipo I.

NaCl	10,0 mM	
MgCl ₂	3,0 mM	
CaCl ₂	1,0 mM	pH 7,0
Tris.HCl	10,0 mM	
PMSF	0,1 mM	

II.1.2.9. Tampão de incubação para determinar a atividade da Ornitina Decarboxilase (ODC).

Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	100,0 mM	
EDTA	0,2 mM	pH 7,2
PMSF	5,0 mM	
Pirodoxal fosfato	30,0 mM	

II.1.3. Composição dos géis utilizados para separar histonas e HMGs extraídas.

II.1.3.1. Gel utilizado para separar histonas.

II.1.3.1.1. Gel de entrada.

Acrilamida	8,0 %	
Bis-acrilamida	0,3 %	
Acetato de potássio	0,375 M	pH 4,0
Uréia	2,5 M	
Persulfato de amônio	0,25 M	
TEMED	0,08 %	

II.1.3.1.2. Gel de corrida.

Acrilamida	15 %	
Bis-acrilamida	0,1 %	
Persulfato de amônio	0,25 M	pH 2,7
Ácido acético	5,4 M	
Uréia	2,5 M	
TEMED	0,08 %	

II.1.3.1.3. Tampão de corrida.

Ácido acético	0,9 N
---------------	-------

II.1.3.2. Gel utilizado para separar HMGs.

II.1.3.2.1. Gel de entrada.

Acrilamida	3,0 %	
Bis-acrilamida	0,08 %	
Tris.HCl	0,125 M	pH 6,8
SDS	0,1 %	
Uréia	0,5 M	
EDTA	0,005 M	

Persulfato de amônio 0,25 M
TEMED 0,08 %

II.1.3.2.2. Gel de corrida

Acrilamida	15 %	
Bis-acrilamida	0,213 %	
Tris.HCl	0,375 M	pH 8,8
SDS	0,1 %	
Uréia	0,5 M	
EDTA	0,005	
Persulfato de amônio	0,25 M	
TEMED	0,08 %	

II.1.3.2.3. Tampão de corrida

Tris.HCl	0,025 M	
SDS	0,1 %	pH 8,3
Glicina	0,192 M	

II.2.MÉTODOS

II.2.1. Obtenção de Células de Sertoli

As células de Sertoli foram obtidas de ratos Wistar machos de 15 dias de vida (cepa do IB-UFRGS), de acordo com Dorrington et al. (1975). Os animais foram mortos por asfixia com eter, lavados com sabão germicida e banhados em álcool iodado. Os testículos foram retirados em condições estéreis (capela de fluxo laminar), dissecados da túnica albugínea e fragmentados com bisturi.

Os tratamentos enzimáticos com tripsina e colagenase (Fig. II.1) foram acompanhados de agitação, e as trocas de soluções entre os procedimentos, de sucessivas aspirações com pipeta Pasteur para ajudar a liberação das células.

Ao término deste processo, as células eram suspensas em volume conhecido de meio de cultura (4,0 ml). Uma alíquota era retirada para contagem em hemocítmetro com azul de tripan, e com este procedimento não só determinávamos o número de células obtidas na preparação como também a sua viabilidade pelo método de exclusão com tripan blue (Dorrington et al., 1975)

Sendo as culturas de células de Sertoli primárias, os experimentos foram realizados com culturas de células obtidas de uma ou mais ninhadas de ratos Wistar, sempre com a idade de 15 dias de vida. Esta característica pode explicar a variabilidade encontrada nos resultados obtidos nos controles.

II.2.2. Cultura primária de Células de Sertoli

As células foram sempre semeadas em substrato plástico, cultivadas por 24 horas em meio 199 com 1% de soro fetal bovino (SFB) na densidade aproximada de $3,2 \times 10^4$ células por cm^2 . Após este período, as culturas eram lavadas com PBS-1 e cultivadas por mais 24 horas

em meio 199 sem SFB. As culturas eram mantidas a 34°C em atmosfera normal (5 % CO₂, 95 % de ar).

Os tratamentos com retinol eram iniciados somente após essas primeiras 48 horas de cultura.

II.2.3 Determinação da pureza das culturas de Células de Sertoli.

Em culturas enriquecidas de células de Sertoli, os possíveis tipos celulares contaminantes são as células germinativas e as peritubulares. O isolamento das células por tratamento com tripsina e colagenase produz agregados celulares que contêm aproximadamente 70 % de células de Sertoli (Tung et. alli., 1984). Após o cultivo sobre substrato plástico por 2 ou mais dias esta percentagem aumenta para mais de 90 %, visto que a maioria das células germinativas contaminantes são retiradas pelas lavagens e trocas de meio das culturas, conforme testado anteriormente em nosso grupo por Guma et al, 1994. Além deste fato, a presença de 1% de SFB durante as primeiras 24 horas de cultura reduz a possibilidade de proliferação das células peritubulares contaminantes (Tung et alli., 1984).

II.2.4. Tratamento das culturas de Células de Sertoli com retinol.

O tratamento das culturas com retinol era iniciado sempre após 48h de cultura, como foi indicado anteriormente. O retinol era adicionado ao meio de cultura dissolvido em etanol absoluto, estando as doses e os tempos de tratamento descritos em cada experimento. A concentração final do solvente no meio de cultura era sempre menor que 0,1 %. As culturas controle recebiam a mesma quantidade do solvente.

Todo o manuseio feito com o retinol, desde a pesagem, o preparo das soluções e sua adição aos meios de cultura era feito sem incidência de luz direta.

II.2.5. Incubação com precursores radioativos.

II.2.5.1. Incubação com $[^{32}\text{P}]$

As células pré-incubadas ou não com retinol eram incubadas durante as últimas 6 horas de experimento com 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^{32}\text{P}]$ na forma de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$. Para determinar a incorporação fosforo em histonas e HMGs, as células eram lavadas por 3 vezes com PBS-2, centrifugadas, suspensas em 2,0 ml de Tampão A com Triton X-100 e então homogeneizadas em homegeneizador de Potter. As histonas e HMGs eram extraídas (FIGURAS II.2 e II.3), separadas em gel de poliacrilamida e coradas com Comassie Blue.

II.2.5.2. Incubação com [metil- ^3H] timidina ou $[^3\text{H}]$ timidina.

As células de Sertoli pré-incubadas ou não com retinol (tempos e doses descritos em cada experimento) eram incubadas após as primeiras 24 horas em meio 199 com SFB, com meio 199 suplementado com 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de [metil- ^3H] timidina ou $[^3\text{H}]$ timidina. A incubação com [metil- ^3H] timidina ou $[^3\text{H}]$ timidina continuava durante todo o período do experimento. Após o período de tratamento com retinol, as células eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas, coletadas e centrifugadas. O sedimento era então suspenso em Tampão 1 e homogeneizado, centrifugado a 3000 rpm a 4^o C e então suspenso em tampão 2 próprio para determinar a sensibilidade da cromatina à ação da DNase Tipo I. Alíquotas da suspensão eram retiradas para determinar a quantidade de DNA presente na amostra (II.2.7).

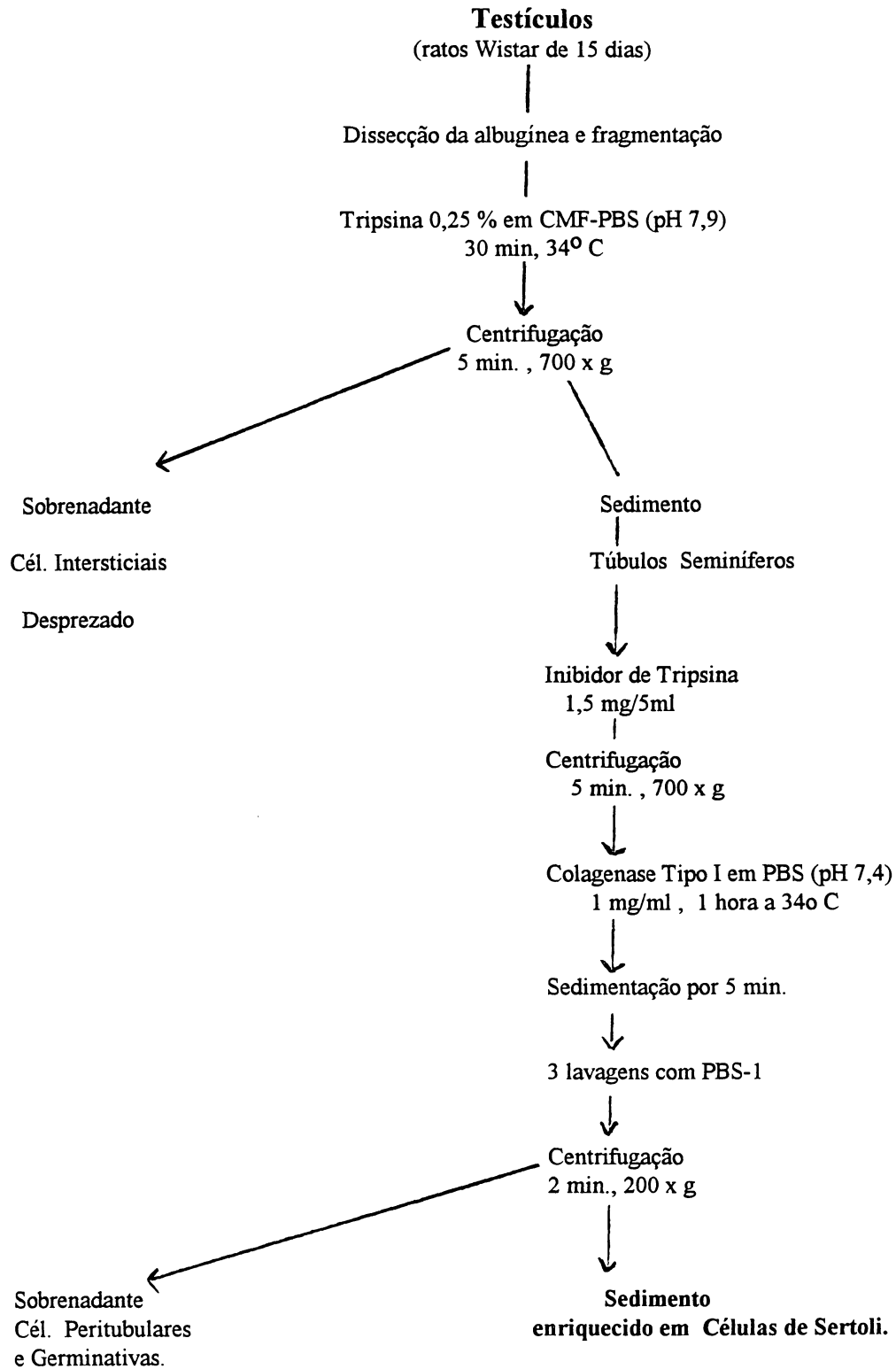


FIGURA II.1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE SERTOLI.

II.2.6. Coleta e rompimento das células.

As células eram coletadas das garrafas de cultura por raspagem com um bastão com ponta de borracha (rubber policeman). Neste procedimento, as culturas eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas, coletadas e centrifugadas. O sedimento era então homogeneizado em homogeneizador de Potter ou sonicado (2 x 10 seg, 25 % de potência em um Sonicator Ultrasonic processor XL, Hert Systems) em tampões apropriados para que fosse dado seguimento a cada experimento determinado.

II.2.7. Determinação de DNA.

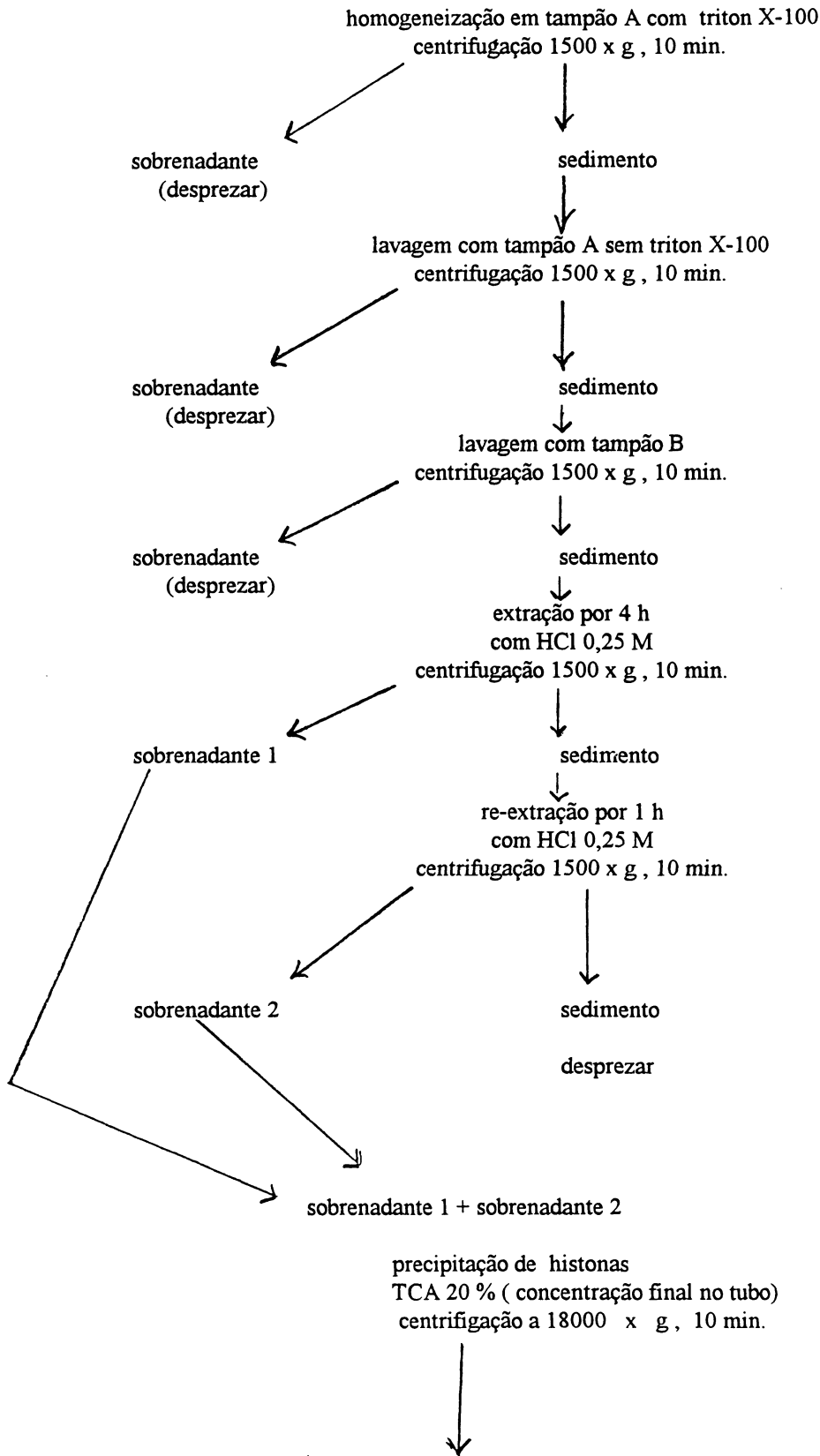
O DNA era precipitado dos homogeneizados celulares por adição de PCA (concentração final 0,2 M), hidrolisado em PCA 0,5 M e dosado pelo método de Burton et. al. (1956), método que apresentava sensibilidade suficiente para determinar as quantidades de DNA de cada uma das amostras, usando DNA tipo I como padrão.

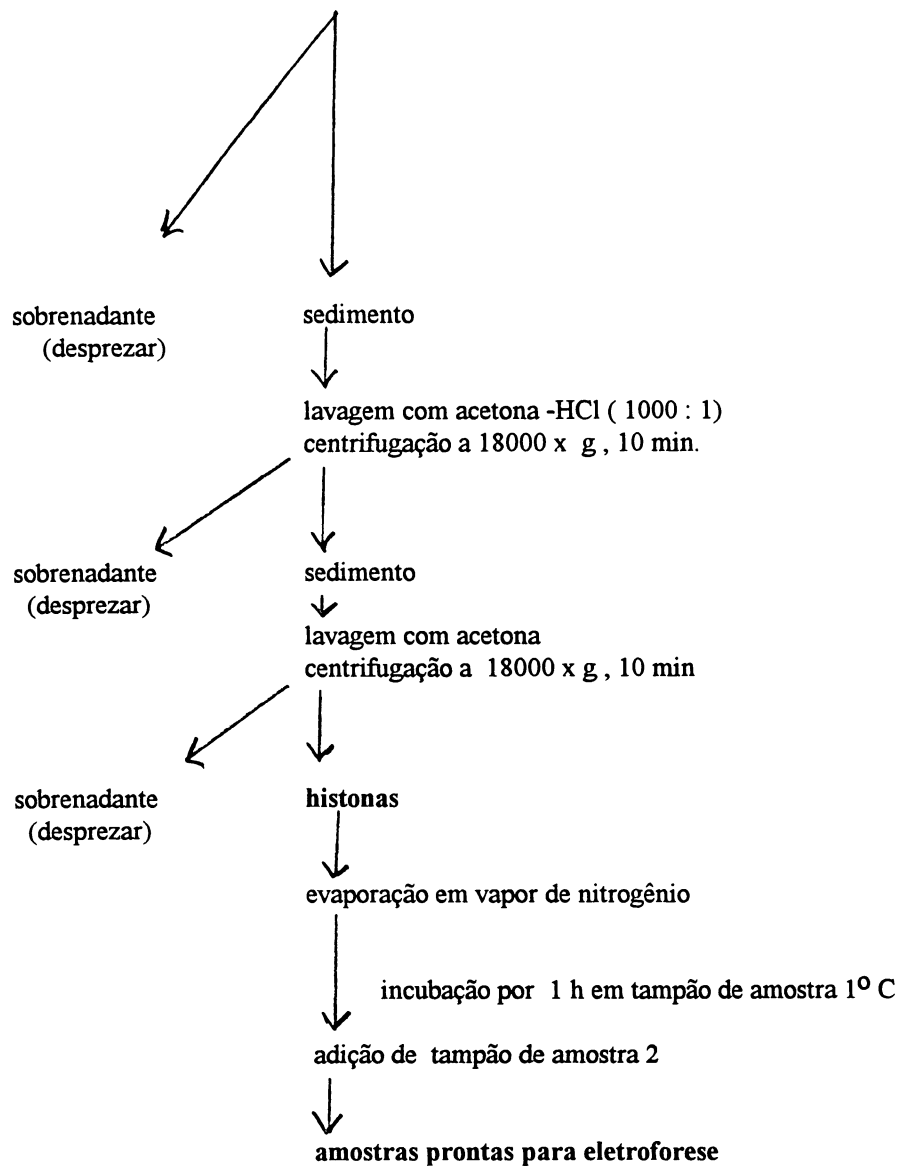
II.2.8. Extração de proteínas nucleares.

II.2.8.1. Extração de histonas.

Após o período de tratamento com retinol as histonas das células de Sertoli, tratadas ou não, eram extraídas por uma modificação no método descrito por Panyin et al., 1965; descrita por Marvin et alli. 1990 (FIGURA II.2).

Células de Sertoli





obs: todos os procedimentos de centrifugação foram realizados entre 0º C e 4º C.

FIGURA II.2. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HISTONAS.

II .2.8.2. Extração de HMGs.

As HMGs de células de Sertoli tratadas ou não com retinol foram extraídas segundo o método de Seyedin et al., 1981.(FIGURA II.3).

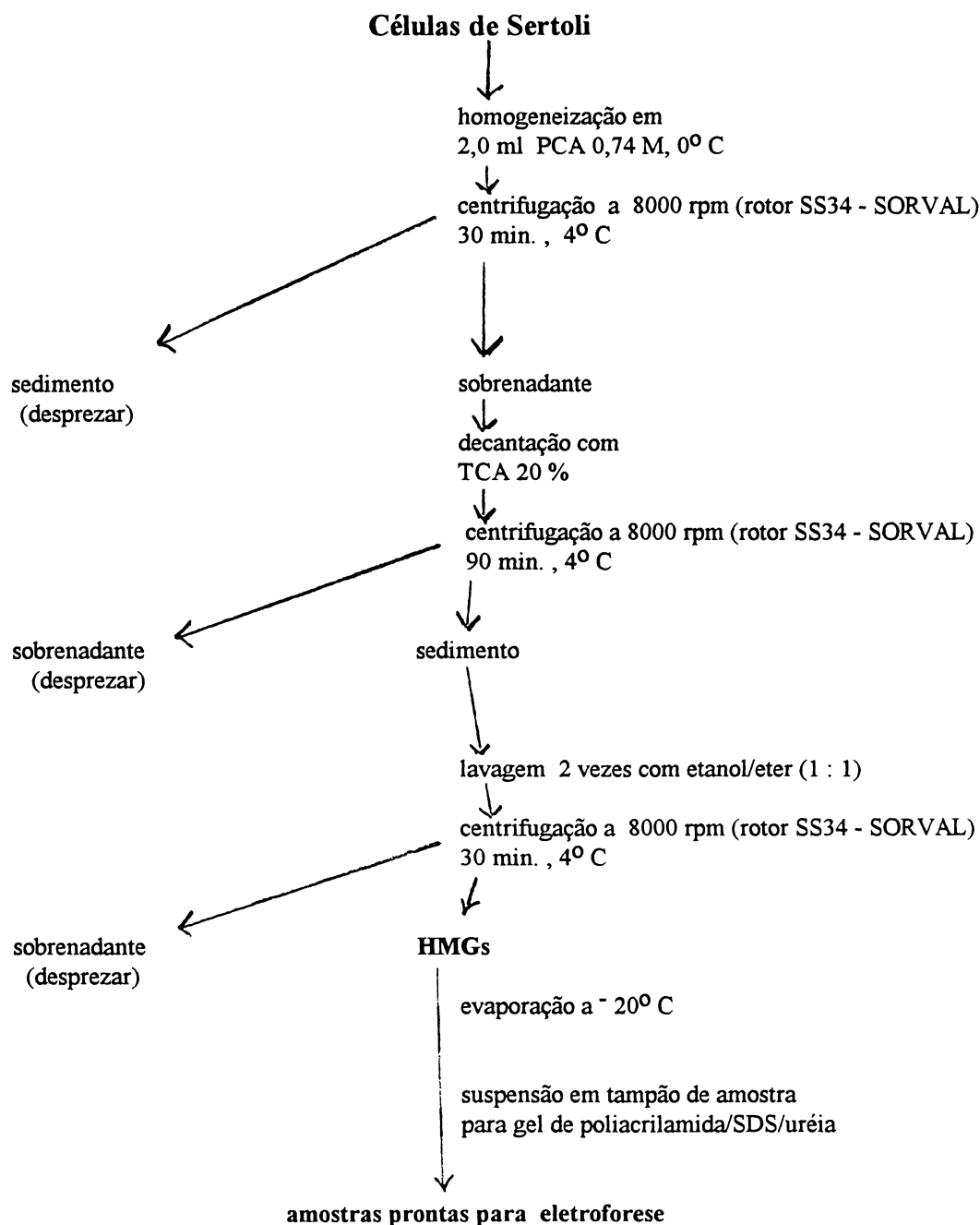


FIGURA II.3 . MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HMGs (Seyedin et al. , 1981)

II.2.9. Eletroforeses.

Foram utilizados dois procedimentos para separar eletroforeticamente as proteínas nucleares extraídas, histonas ou HMGs. Cada um dos métodos se adaptou melhor para um dos tipos de proteínas devido às suas características físico-químicas diferenciadas.

II.2.9.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida/uréia para separar as sub-famílias de histonas.

O método utilizado para separar eletroforeticamente as sub-famílias de histonas foi o descrito por Spiker , 1980. A corrida durava por volta de 7 horas a 10 mA, sendo que sempre era realizada uma pré-corrida de 2 h a 10 mA para retirar do sistema possíveis sais interferentes como descrito no artigo supra-citado.

II.2.9.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS/uréia para separar as sub-famílias de HMGs

O método utilizado para separar eletroforeticamente as sub-famílias de HMGs foi o método descrito por Bhorjee , 1981. A corrida tinha uma duração total de 8 horas a 10 mA, sendo que em todos os experimentos era realizada previamente uma pré-corrida por 2 h a 10 mA, para que fossem retirados do sistema possíveis sais interferentes.

II.2.10. Determinação da sensibilidade da cromatina das células de Sertoli tratadas com retinol à ação da DNase Tipo I.

Os núcleos eram obtidos pelo rompimento das células em tampão 1 (hipotônico) utilizando-se um homogeneizador de vidro. Logo em seguida, o homogeneizado era centrifugado a 1000 . g por 10 minutos a 4°C, na presença de 0,1 mM de PMSF, precipitando os núcleos. O precipitado era então suspenso em tampão 2 (de incubação) e o DNA da amostra quantificado.

As amostras eram então incubadas por 5 minutos a 30°C e ao final deste período era adicionada ao sistema DNase tipo I na proporção de 20 U/mg de DNA. A reação era interrompida após 30 minutos pela adição de EDTA na concentração final de 10 mM com pH 7,0.

O sistema de incubação era então rapidamente resfriado em banho de gelo e centrifugado a 3000 g por 10 minutos para que a cromatina resistente (precipitado) à ação da DNase tipo I fosse separada da sensível (sobrenadante); Ferrari et al., 1985.

II.2.10.1. Efeito da 1,10 fenantrolina sobre a ação da DNase Tipo I em cromatina de Células de Sertoli.

Com objetivo de determinarmos uma possível relação entre a presença de íons de ferro, a formação de radicais livres e os efeitos do retinol sobre a conformação da cromatina de células de Sertoli, 100µM de 1,10 fenantrolina foram adicionados ao meio de cultura após as primeiras 24 h de cultura em meio 199 e SFB,. A cromatina destas células foi extraída e submetida ao procedimento descrito no item II.2.10 para determinar a sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I. Tanto as células controle como tratadas com retinol

receberam o tratamento com 1,10 fenantrolina. A utilização do quelante para ferro II com este objetivo foi descrita previamente por Martins et al. , 1994.

II.2.10.2. Inibição da síntese de DNA por hidróxi-uréia

Com o objetivo de determinarmos se o aumento na incorporação de timidina tritiada na cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol era devido à síntese de DNA ou ao reparo consequente do tratamento destas células em cultura com retinol (Guma et alli., 1993), nós tratamos as células de Sertoli com retinol 10 μ M por 24 horas. Duas horas antes de terminar este período, trocamos o meio de cultura de células tratadas, com retinol e controle, por um meio correspondente suplementado com 3 mM de hidróxi-uréia. Esperamos 30 minutos e adicionávamos ao meio [3 H] timidina 5 μ Ci/ml. Após 90 minutos lavamos as células 3 vezes com PBS gelado, isolávamos o DNA e quantificávamos pelo método de Burton et al. 1956. Uma alíquota correspondente era contada e o número de CPMs/ μ g de DNA determinado (Adams et alli., 1986)..

II.2.11. Determinação da atividade da Ornitina Descarboxilase em células de Sertoli tratadas com retinol.

A determinação do efeito do tratamento com retinol sobre a atividade da Ornitina descarboxilase (ODC) de células de Sertoli cultivadas foi realizada pelo método descrito por Swift et al. 1988.

As culturas de células tratadas com retinol e controle eram raspadas das placas e lavadas com PBS, procedimento que era realizado a 4 $^{\circ}$ C. Após a lavagem, as células eram suspensas em tampão de incubação para ODC na proporção de 0,5 ml de tampão de incubação para cada 2 garrafas de 16×10^6 células. As células eram então rompidas por

sonicador equipado com uma microponteira. Este procedimento sempre era realizado com as células em banho de gelo e consistia de dois pulsos de 10 segundos de 20 MHz. As células rompidas eram então centrifugadas por 15 minutos a 2000 g a 4°C. Finda esta centrifugação eram retiradas alíquotas de 200 µl do sobrenadante (citosol) que eram incubadas por 60 minutos a 34 °C na presença de 0,5 µCi L [1-¹⁴C] ornitina em pequenos tubos acondicionados dentro de vial de cintilação bem vedados. O ¹⁴CO₂ liberado pela reação catalisada pela ODC era capturado em um papel Whatman embebido com 50 µl de NaOH 2,0 N. A reação era interrompida pela adição de 1ml de ácido cítrico 1,0 N após 60 minutos e mantida por mais 30 minutos em banho com agitação para que todo CO₂ fosse capturado. O papel de filtro era retirado e colocado em um outro vial contendo 3,0 ml de líquido de cintilação, e então a radioatividade presente no papel era determinada.

II.2.12. Determinação da radioatividade.

II.2.12.1. Radioatividade contida nas bandas dos géis.

As bandas obtidas nos géis após a corrida e a coloração com Comassie Blue (Bohrjee et al 1985) eram cortadas do gel com bisturi e colocadas em vials contendo 0,3 ml de peróxido de hidrogênio a 30% e mantidas a 60°C por 12 horas. Durante este período o gel era dissolvido, as amostras eram então resfriadas até a temperatura ambiente e recebiam 3,0 ml de líquido de cintilação, sendo as contas então determinadas.

II.2.12.1. Cintilação líquida.

As determinações quantitativas da radioatividade nas amostras eram medidas em um espectrômetro de cintilação líquida Wallac, modelo 1409.

Nas amostras a radioatividade era contada em um líquido de cintilação próprio para amostras aquosas, Ultima Gold - Packard Co.

II.2.12. Análise Estatística.

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Newman-Keuls. Quando apropriado foi realizado o teste t de Student, Snedecor e Cochran, 1978.

III. RESULTADOS

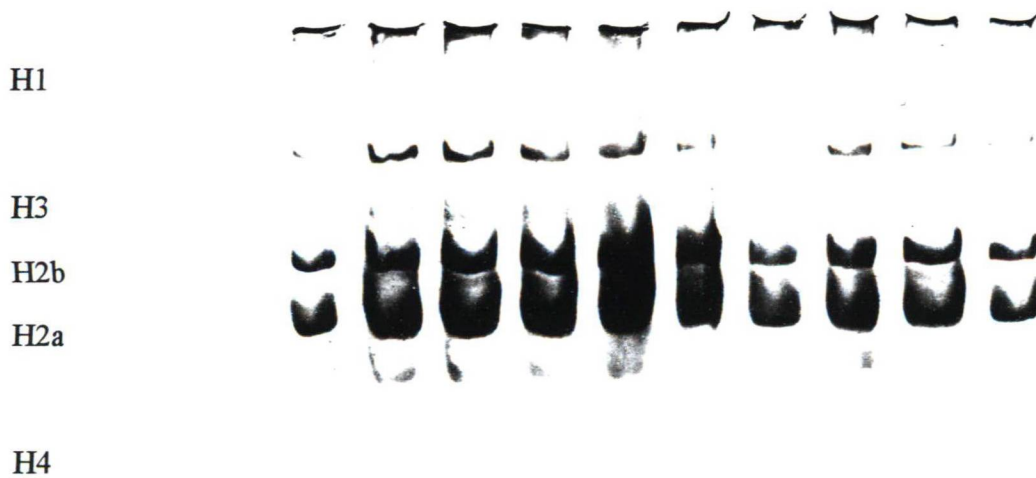
Nesta tese os resultados podem ser divididos em três grandes partes: a primeira contendo os resultados que mostram os efeitos do retinol sobre a fosforilação de proteínas nucleares; a segunda os que mostram os efeitos das alterações no padrão de fosforilação de proteínas nucleares induzidos pelo retinol sobre a conformação da cromatina e, por último, dados que nos permitiram concluir alguns dos prováveis efeitos do tratamento com retinol na conformação da cromatina e suas possíveis consequências no desenvolvimento das células de Sertoli.

III.1. Efeito do retinol sobre a fosforilação das proteínas nucleares

As células de Sertoli foram isoladas e cultivadas conforme descrito e então tratadas com retinol (10 μ M) por períodos de tempo crescentes (6, 12, 24 e 48 horas). Depois destes períodos de tratamento, as proteínas nucleares eram isoladas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis eram então cortados em tiras de 0,3 cm, e estes pedaços dissolvidos em peróxido de hidrogênio 30 % a 60 °C por 12 horas e a radioatividade das amostras era quantificada em cintilador β .

Na FIGURA III.1 podemos observar as subfamílias de histonas, isoladas e coradas em um gel de poliacrilamida/uréia. Neste gel, as diferentes histonas foram separadas de H1 a H4. A figura mostra a separação das histonas de células controle em concentrações crescentes de proteínas de a até e, e concentrações decrescentes de histonas de células tratadas com retinol por 24 horas de f até j. As proteínas foram coradas com comassie blue conforme descrito por Panyim et al., 1969. Nesta figura podemos ver que o padrão apresentado pelas proteínas era semelhante ao descrito para histonas na literaturas (Panyim et al., 1969)

Pólo positivo



Pólo negativo

FIGURA.III.1. GEL DE POLIACRILAMIDA/URÉIA MOSTRANDO A SEPARAÇÃO DAS SUB-FAMÍLIAS DE HISTONAS.

As histonas foram isoladas de células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade, isoladas e cultivadas conforme descrito em material e métodos e tratadas com retinol (10 μ M) por 24 horas. As linhas de a até e mostram histonas isoladas de células controle em quantidades crescentes enquanto que as linhas de f a j mostram histonas isoladas de células tratadas com retinol (10 μ M) por 24 h em quantidades decrescentes de proteína

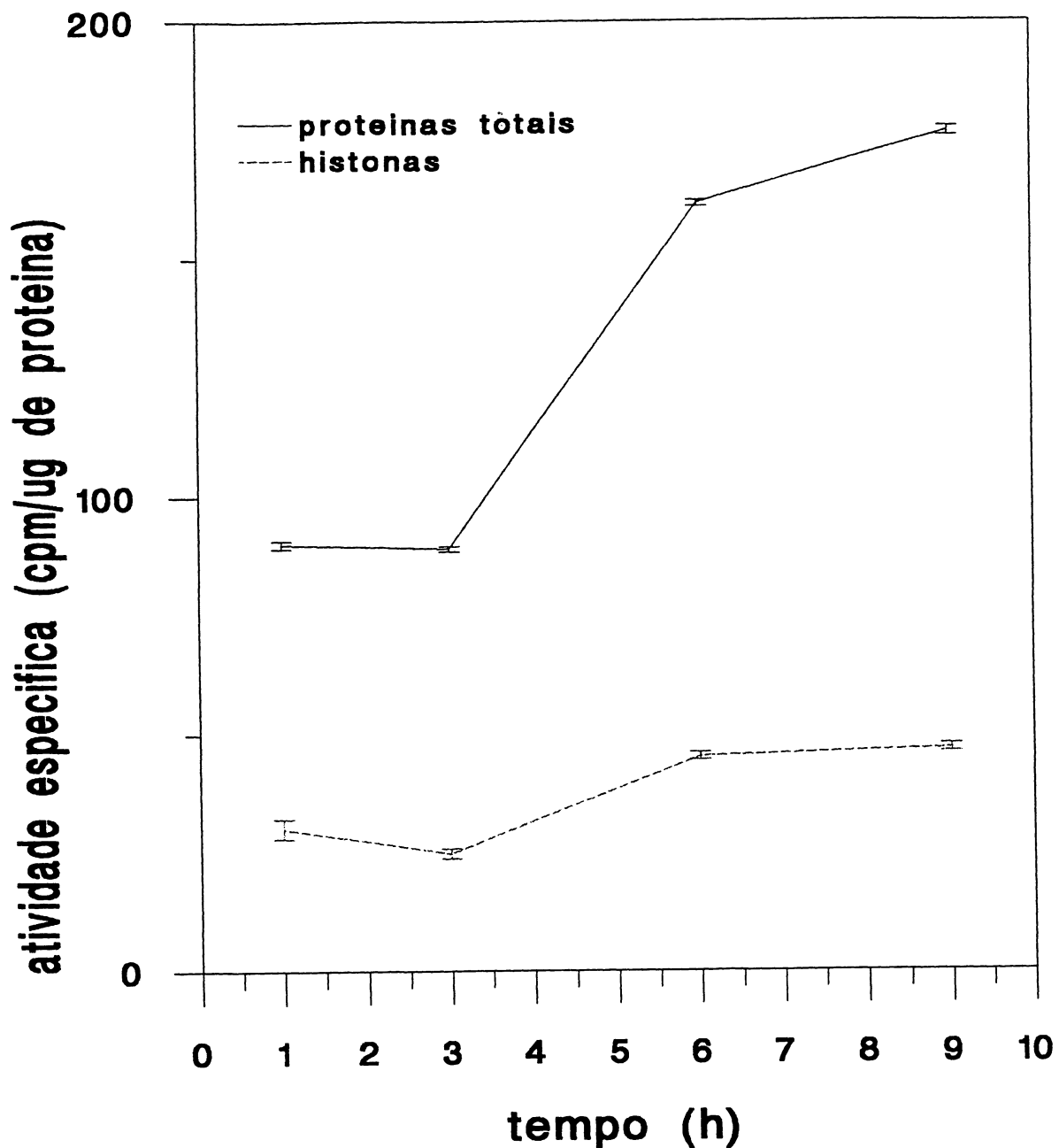


FIGURA.III.2 DETERMINAÇÃO DA INCORPORAÇÃO $[^{32}\text{P}]$ EM HISTONAS E PROTEÍNAS TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO.

a) os valores foram expressos em média \pm EPM, para um $n = 8$.

As células de Sertoli foram incubadas com $[^{32}\text{P}]$ pelos tempos descritos e as proteínas totais e as histonas de células de Sertoli foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada conforme descrito em material e métodos.

III.1.1. Histonas

As histonas foram o primeiro foco de abordagem desta tese e a metodologia empregada para o isolamento e purificação destas proteínas nucleares pode ser encontrado no capítulo de Material e Métodos.

III.1.1.1. Determinação do período de incubação com [³²P]

Para que pudéssemos trabalhar com as histonas fosforiladas foi importante determinar o tempo necessário de incubação com [³²P] para que estas proteínas fossem marcadas. Na FIGURA III.2 encontramos os resultados que nos levaram a escolher o tempo de 6 horas como o período necessário para a marcação das histonas durante nossos experimentos. Nesta figura podemos observar que após as 6h de marcação com o rádioisótopo se atinge um platô..

III.1.1.2. Fosforilação das histonas.

III.1.1.2.1. Efeito do tempo de cultura sobre a fosforilação das histonas.

A influência do tempo de cultura sobre a fosforilação das histonas fica evidente se observarmos o que se passa com as células controle onde a única variável é o tempo de cultura. Na FIGURA III.3, se pode observar que após 24 horas a fosforilação de histonas aumenta (este efeito também foi observado nas proteínas totais) e em presença de retinol, este efeito é maior. Isto nos leva a acreditar que esta variação seja referente ao próprio ciclo celular. Tomando isto em conta e que os experimentos foram realizados com diferentes populações celulares, decidimos trabalhar sempre em porcentagens relativas ao total de contas obtidas para cada amostra controle e para cada experimento.

III.1.1.2.2. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação das histonas.

Na FIGURA III.3 podemos observar que o tempo de cultura é um fator que altera o nível de fosforilação das histonas, só que este não é o único fator capaz de alterar a fosforilação das histonas, quando tratamos nossas culturas com retinol (FIGURA III.4). Os resultados desta etapa do trabalho foram coerentes com os obtidos na primeira etapa da tese e nos ajudaram a confirmar a nossa suposição de que o tratamento com retinol agia sobre a fosforilação das proteínas componentes dos nucleossomos e assim alterava o estado de relaxamento da cromatina. Estes resultados também nos ajudaram a propor a hipótese de uma função antagônica das histonas e das HMGs com relação ao estado de relaxamento da cromatina. Acreditamos que quanto mais fosforiladas as histonas maior o relaxamento da cromatina. Estas mudanças provavelmente induzam alterações nos níveis de associação entre as histonas e o DNA visto que esta associação é devida em grande parte a forças eletrostáticas. A consequência destas alterações será, a nosso ver, uma alteração na conformação da cromatina induzida por retinol e atingida pela alteração do *steady-state* dos níveis de fosforilação das histonas.

III.1.1.3. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da histona H1

Depois de termos observado que o retinol era capaz de alterar os níveis de fosforilação das histonas como um todo, decidimos averiguar como as diversas sub-famílias de histonas reagiam ao tratamento com retinol. Na FIGURA III.5, podemos observar o efeito do tratamento com retinol nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas sobre a fosforilação da histona H1 das células tratadas, em relação histona H1 das células controle. Nesta figura fica

evidente que o tratamento com retinol estimula a fosforilação das H1 em relação ao controle e que este fenômeno apresenta um paralelismo entre fosforilação das histonas de células controle e tratadas, atingindo um máximo após 24 h de tratamento com retinol sendo que após 48 h de tratamento os níveis voltam praticamente aos mesmos valores observados após 6 h de tratamento. Em todos os tempos observados, o nível de fosforilação das histonas H1 é sempre maior nas células tratadas do que nas controle.

III.1.1.4. Efeito do tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da Histona H3

Podemos observar na FIGURA III.6 que a histona H3 apresenta uma grande alteração no seu padrão de fosforilação quando comparamos os níveis de fosforilação destas histonas de células tratadas com as mesmas histonas das células controle. É possível vermos que o retinol altera de maneira considerável este padrão onde as histonas H3 de células tratadas por mais de seis horas com retinol praticamente invertem o seu padrão normal de fosforilação com relação ao controle e passam a ter um padrão semelhante a partir de 24 horas de tratamento, mas com uma taxa maior de grupamentos fosfato por histona, em relação s outras histonas, o que a deixa com uma maior carga negativa e provavelmente uma associação eletrostática diferente tanto com o DNA como com as outras histonas componentes do nucleossomo, levando a um provável afrouxamento do arranjo do nucleossomo.

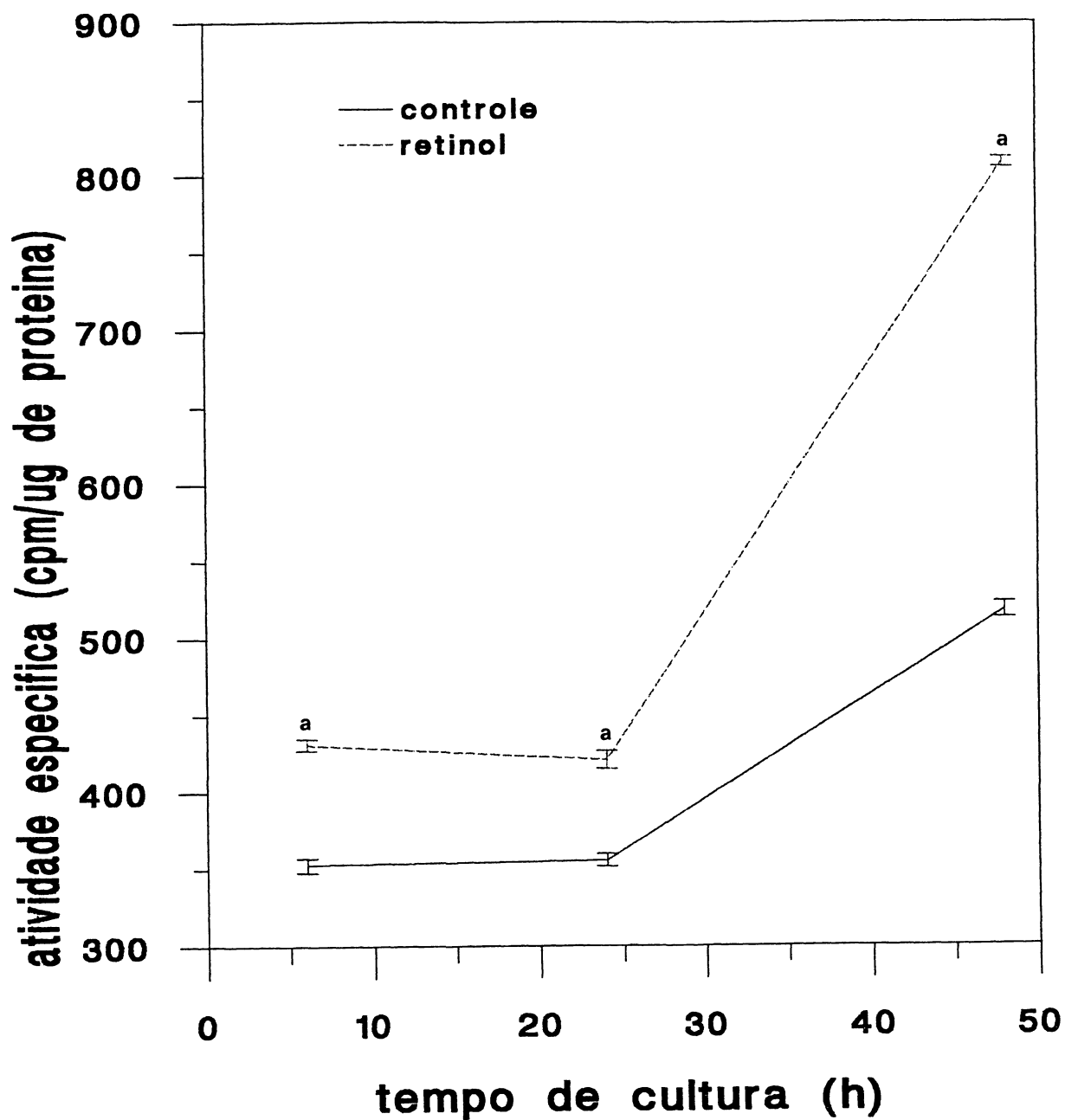


FIGURA.III.3. EFEITO DO TEMPO DE CULTURA SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para um n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras independentes).

As células de Sertoli foram cultivadas por diferentes tempos, com ou sem retinol, e incubadas por 6h com $[^{32}\text{P}]$; as histonas foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada.

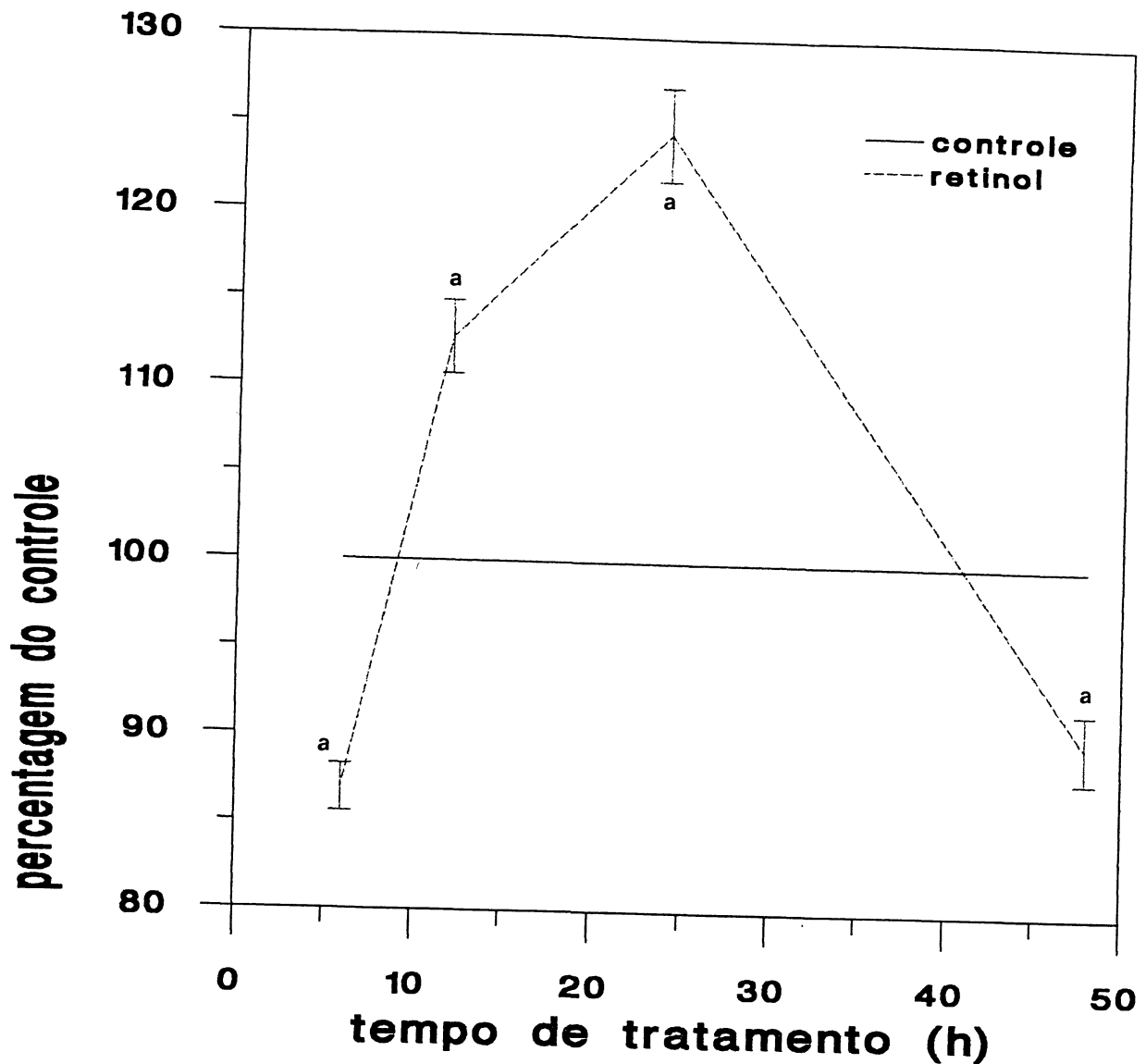


FIGURA.III.4 .EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student, para amostras pareadas).

As histonas de células de Sertoli cultivadas, controle ou tratadas com retinol por tempos definidos, foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada, conforme descrito em material e métodos. Os controles foram considerados 100 % , para cada tempo, e os dados das células tratadas expressos em relação ao controle correspondente.

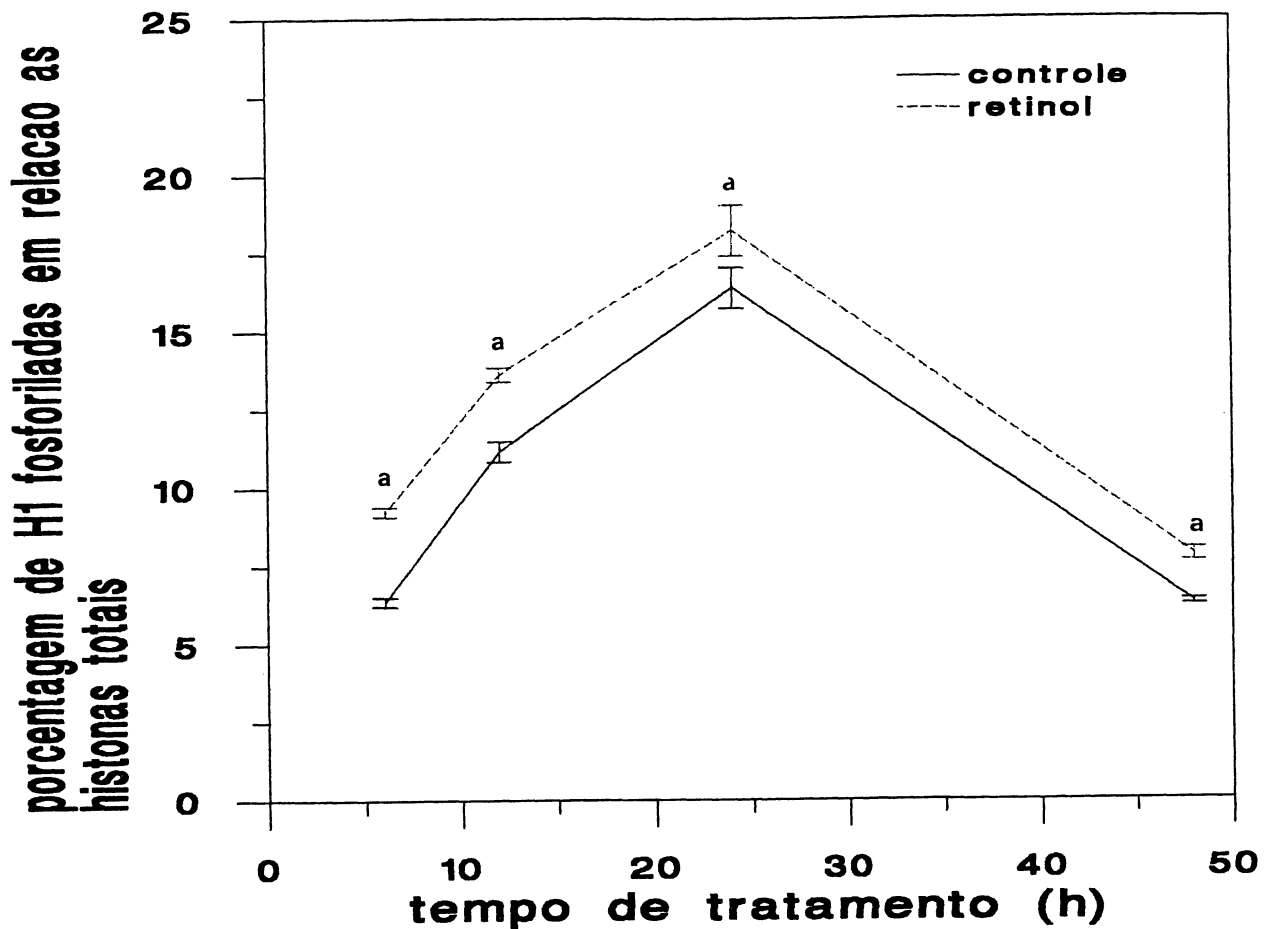


FIGURA.III.5. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS H1 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para um n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student, para amostras pareadas).

As células de Sertoli foram cultivadas conforme descrito em III.4. As histonas foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada, conforme descrito em material e métodos. As contas de cada banda foram expressas em porcentagens do total de contas obtidas em todas as bandas de cada amostra.

III.1.1.5. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação de histonas H2a.

As histonas H2a também são afetadas em seu padrão de fosforilação pelo tratamento com retinol. Na FIGURA III.7 fica claro que o tratamento com retinol afeta significativamente a fosforilação destas histonas e que os padrões das células controle e tratadas tornam-se antagônicos tendo como provável ponto de inversão o ponto que corresponde a aproximadamente 30 horas de tratamento. Esta histona tal qual a histona H3 faz parte do cerne do nucleossomo e portanto acreditamos que esta alteração no padrão de fosforilação também deve levar a uma alteração na conformação da mesma, a ser determinada em experimentos posteriores. Talvez a diferença na fosforilação desta histona com relação ao que poderia se esperar para uma maior coerência com o observado na histona H3, isto é uma maior fosforilação após 24 horas de tratamento com retinol, não seja observada por ser esta histona também um grande alvo para a ubiquitinação quando os nucleossomos estão abertos, o que deixa esta histona pouco disponível para as quinases específicas (vide introdução I.2.4.2).

III. 1.1.6. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação de histonas H2b.

Com relação a histona H2b podemos observar que esta apresenta praticamente uma resposta "tardia" a ação do retinol, pois ao contrário das outras histonas onde com seis horas de tratamento já evidenciávamos uma alteração nos padrões de fosforilação das células tratadas em relação ao controle, nestas histonas este efeito só se evidencia depois das 12 horas de tratamento, conforme podemos observar na FIGURA III.8. Depois das 12 horas de tratamento podemos então perceber que, ao contrário do que havia ocorrido até

este período, começa a existir um aumento na fosforilação atingindo um máximo após 24 horas de tratamento com uma pequena diminuição após 48 horas, em contraste com o observado nas histonas de células controle onde com 48 h de tratamento ocorre um aumento na fosforilação.

III.1.1.7. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da histona H4.

Na FIGURA III.9 pode ser observado o efeito do tratamento com retinol sobre a fosforilação da histona H4. Nesta figura percebe-se que o tratamento com retinol em seus vários tempos também afetou de maneira significativa e diferentemente das outras histonas a fosforilação da histonas H4. Nesta sub-família podemos observar que o tratamento induziu um aumento no nível de fosforilação que já era evidente com 6 horas de tratamento e superior ao nível de fosforilação observado nas histonas H4 de células controle. Este desenho se inverte por volta das 30 horas de tratamento, ponto a partir do qual as histonas H4 de células tratadas passam a ter um nível de fosforilação, mais baixo do que o das células controle, não tanto por um declínio na sua taxa de fosforilação mas por um acentuado aumento na fosforilação das mesmas histonas nas células controle.

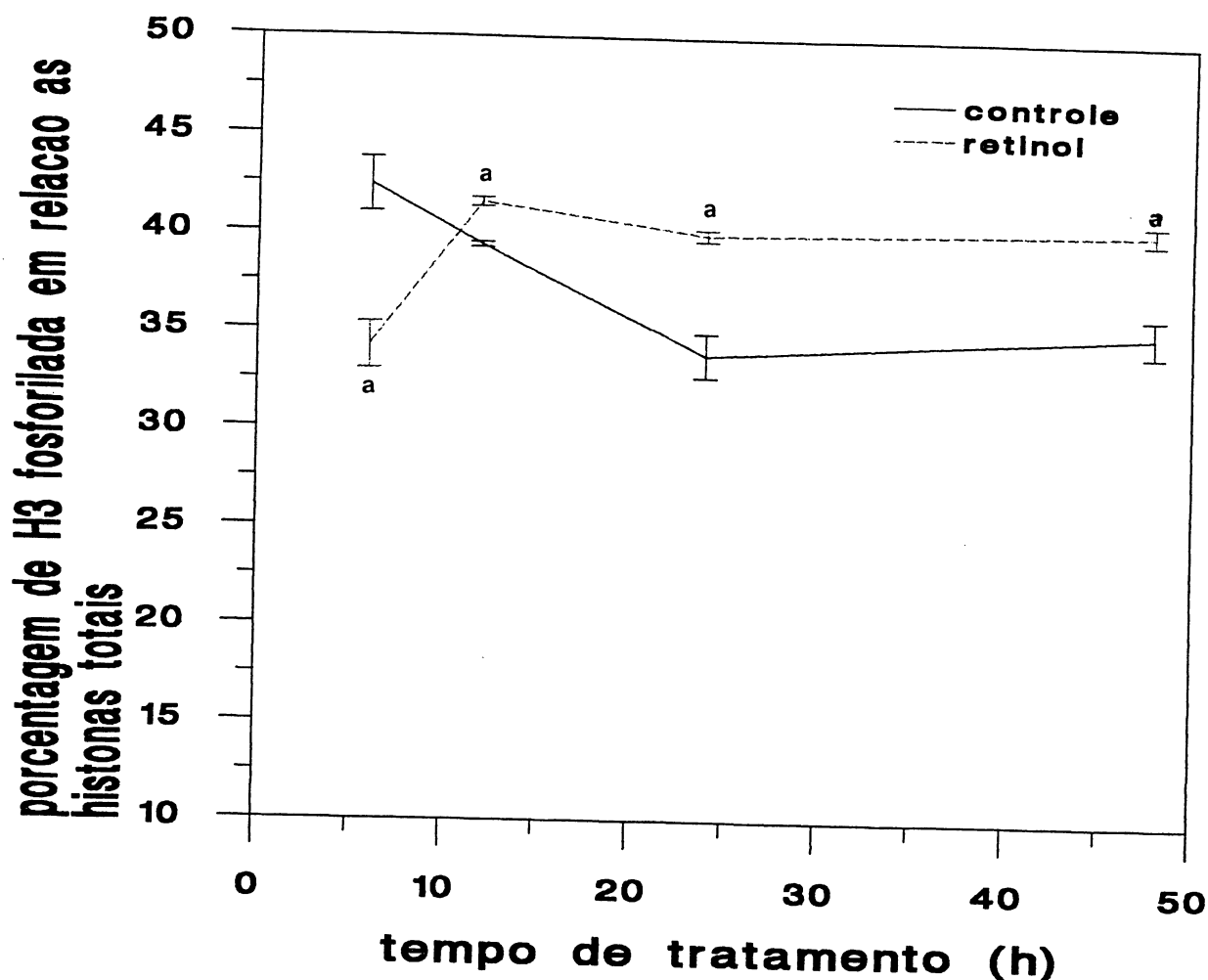


FIGURA.III.6. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS H3 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para um n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As células de Sertoli foram cultivadas conforme descrito em III.4. As histonas foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada, conforme descrito em material e métodos. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas obtidas em todas as bandas de cada amostra.

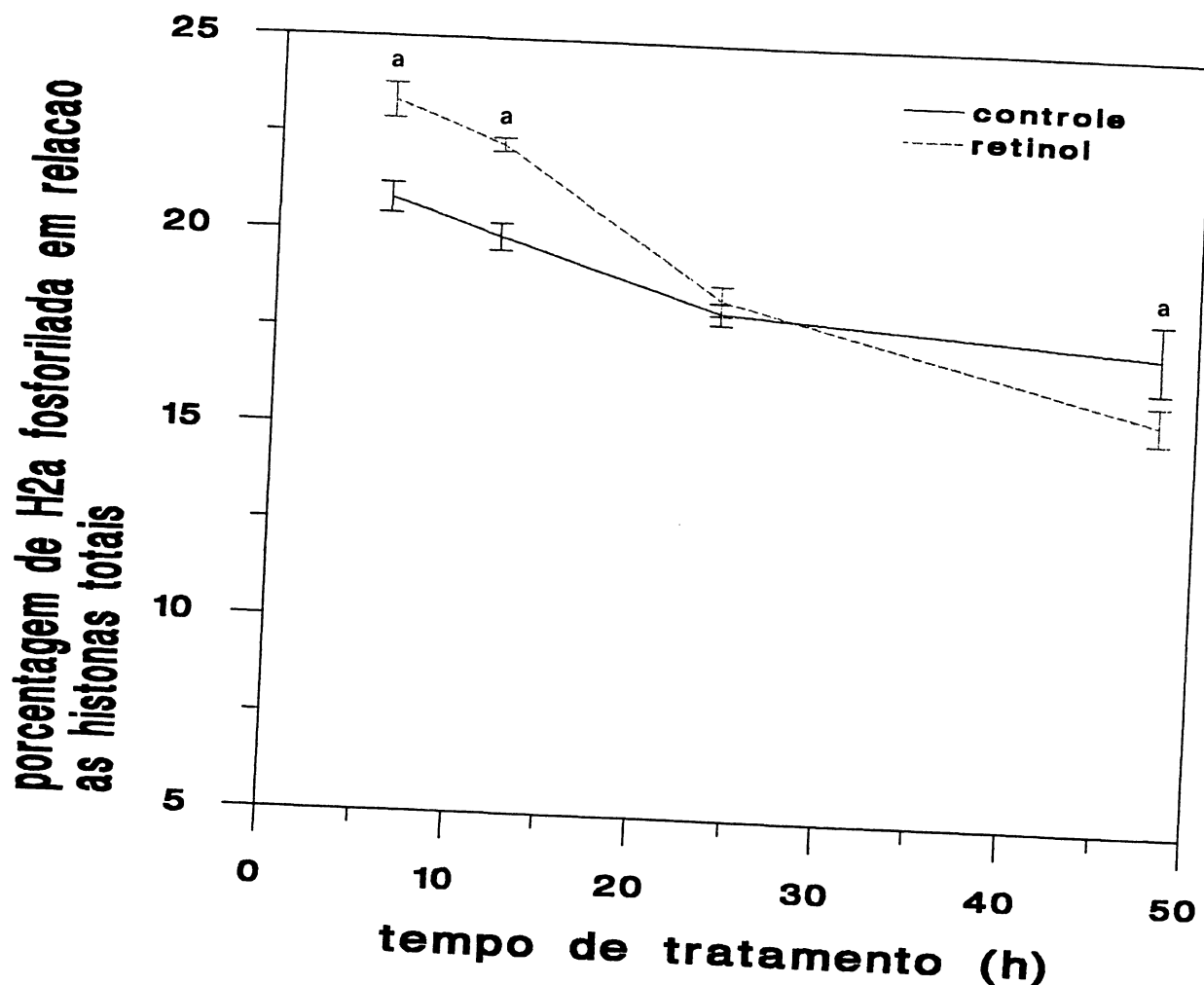


FIGURA.III.7. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10µM) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS H2a ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As células de Sertoli foram cultivadas conforme descrito em III.4, as histonas foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada, conforme descrito em material e métodos. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas de todas as bandas de cada amostra.

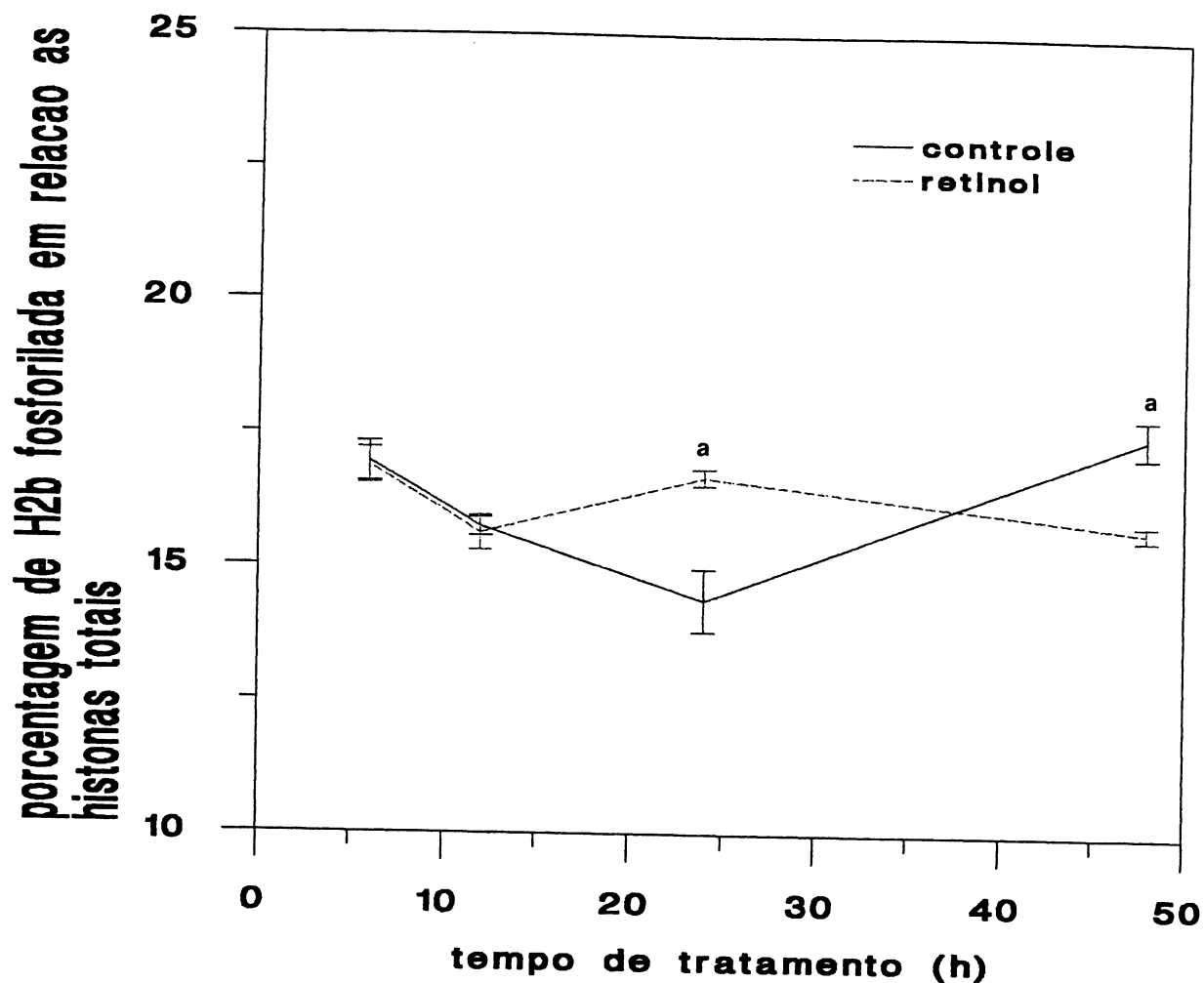


FIGURA.III.8. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL ($10\mu\text{M}$) SOBRE O FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS H2b ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para um $n=8$

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As células de Sertoli foram cultivadas conforme descrito em III.4. As histonas foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas corada foram cortadas, quantificadas e a radioatividade contada conforme descrito em material e métodos. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas de cada amostra.

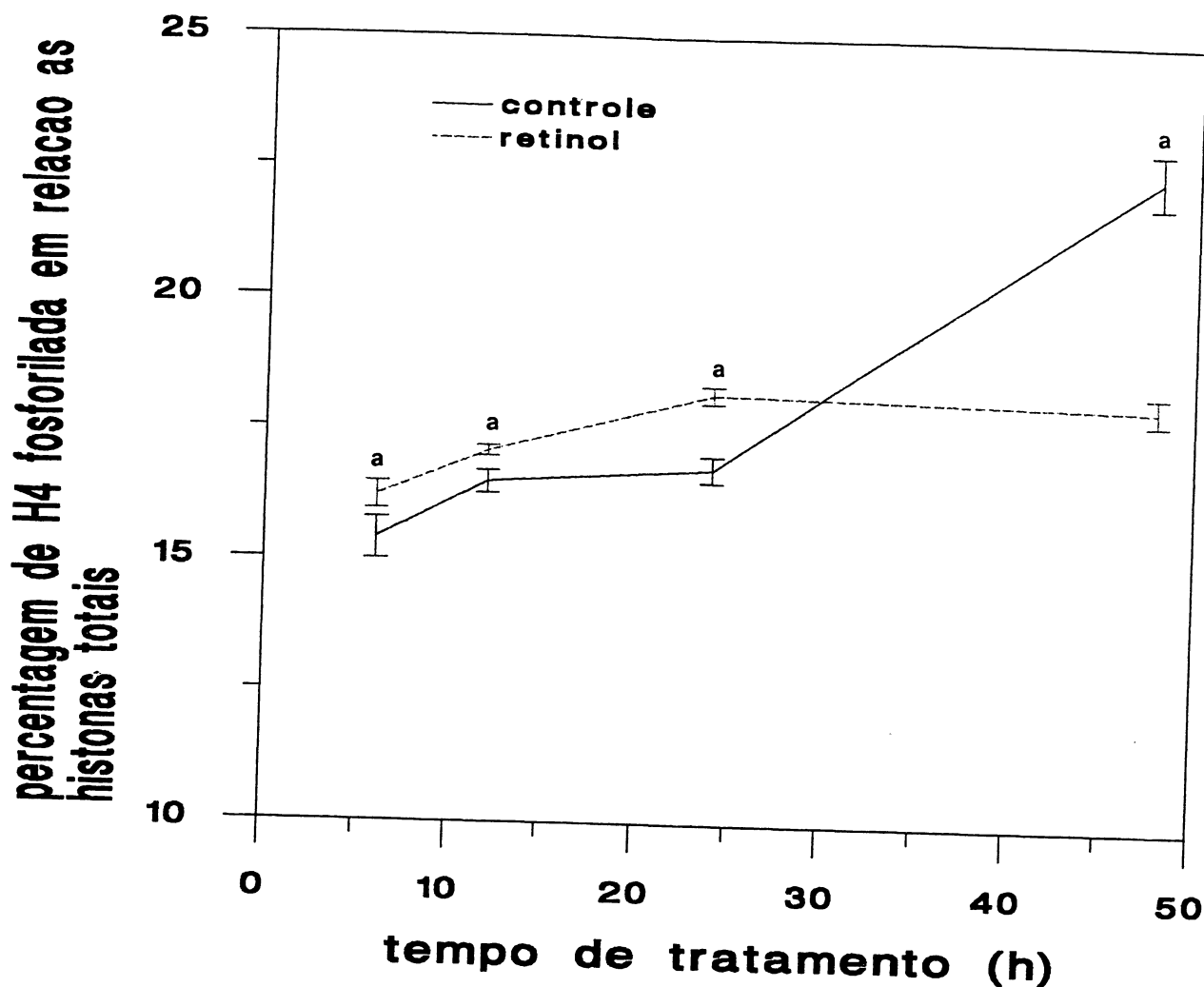


FIGURA.III.9. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE HISTONAS H4 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em média \pm EPM, para n=8

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas) .

As células de Sertoli foram cultivadas conforme descrito em III.4. As histonas foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada, conforme descrito em material e métodos. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas de cada amostra.

III.1.2. HMGs

As HMGs foram as outras proteínas nucleares escolhidas como material de estudo nesta tese. Os métodos de isolamento e purificação destas proteínas podem ser encontrados no capítulo Material e Métodos.

Na FIGURA III.10 podemos observar as 4 sub-famílias de HMGs isoladas e coradas em um gel de poliacrilamida/SDS/uréia. Neste gel, as HMGs estão colocadas do topo para base de HMG1 a HMG 17, onde o polo negativo corresponde ao topo da figura. Nesta figura as linhas a e b correspondem a HMGs de células controle e as linhas c e d a HMGs de células tratadas por 24 h com retinol (10 μ M). As proteínas foram coradas com comassie blue e apresentaram um padrão semelhante ao descrito na literatura para as proteínas HMGs (Bhorjee, 1981).

III.1.2.1. Efeito do tempo de cultura sobre a fosforilação de HMGs.

De maneira semelhante ao observado em relação s histonas, o tempo de cultura também influencia o estado de fosforilação das HMGs que apresentam, conforme pode ser observado na FIGURA III.11, um aumento no nível geral de fosforilação com a continuidade da cultura, fenômeno que pode estar associado a um aumento na fosforilação de proteínas totais (vide III.1.1.3.1) manutenção das células em cultura e, talvez, a uma possível desdiferenciação destas células que quando tratadas apresentam uma maior sobrevivência em cultura..

III.1.2.3. Efeito do tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação das HMGs.

De maneira semelhante ao que fizemos antes com as histonas decidimos, antes de trabalharmos com as sub-famílias, determinar se havia alguma alteração no padrão de

fosforilação das HMGs com um todo em células tratadas com retinol pelos mesmos períodos de cultura que os testados para as histonas, considerando sempre o valor dos respectivo controle como 100 %. Na FIGURA III.12 podemos observar que as HMGs isoladas de células tratadas com retinol nos vários períodos apresentam um comportamento significativamente diferente das HMGs isoladas de células controle. Nas células tratadas com retinol observamos um pico de fosforilação com 48 horas de tratamento enquanto que após 24 horas temos o menor nível de fosforilação, este comportamento é exatamente o oposto do observado nas histonas o que muito nos chamou a atenção e nos sugeriu na época uma função antagônica das duas famílias de proteínas nucleares. Na FIGURA III 13 onde estão colocadas as curvas de fosforilação dos dois grupos de proteína versos os tempos de tratamento em porcentagem de cada controle (100 %), o que foi colocado anteriormente fica claramente exemplificado. Acreditando que as histonas tenham a função de compactar o nucleossomo e por consequência a cromatina, e que as HMGs tenham como função preparar a cromatina para a atividade gênica, podemos inferir que ao ficarem mais fosforiladas, as histonas se afastam permitindo que as HMGs menos fosforiladas se aproximem da cromatina nos momentos de relaxamento. Nos momentos de compactação, o oposto deve ser observado (Moreira et al, 1994).

Pólo negativo

HMG 1

HMG 2

HMG 14

HMG 17



Pólo positivo

FIGURA.III.10. GEL DE POLIACRILAMIDA/SDS MOSTRANDO A SEPARAÇÃO DAS SUB-FAMÍLIAS DE HMGs.

As HMGs foram obtidas de células de Sertoli de ratos de 15 dias, isoladas e cultivadas conforme descrito em material e métodos e tratadas por 24 horas com retinol (10 μ M). As filas a e b mostram as HMGs isoladas de células controle enquanto que as filas c e d mostram as HMGs isoladas de células tratadas com retinol.

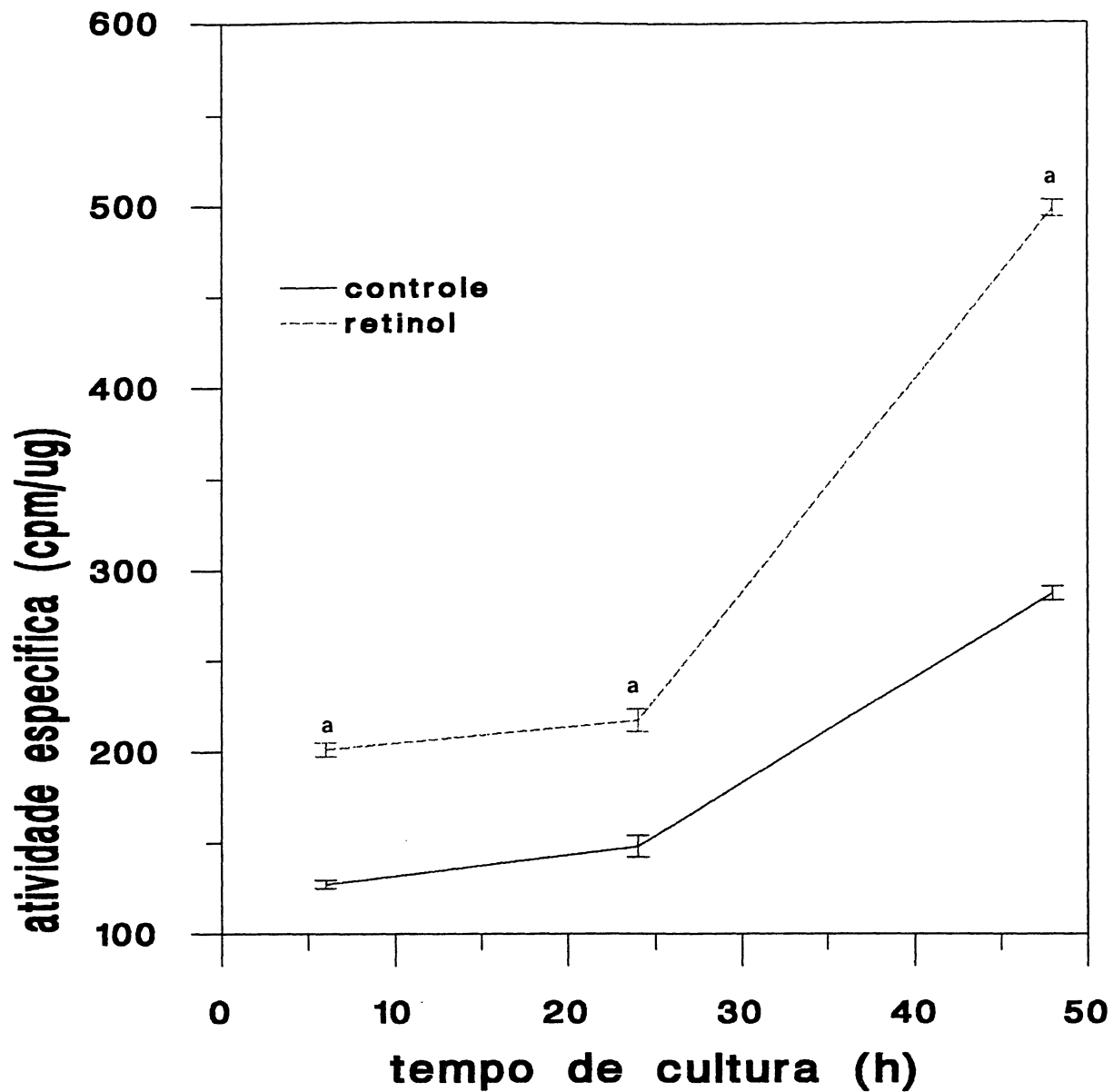


FIGURA.III.11 EFEITO DO TEMPO DE CULTURA SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMGs ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos em médias \pm EPM, para um n=6

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas) .

As células de Sertoli foram cultivadas por diferentes tempos com ou sem retinol e incubadas por 6 h com $[^{32}\text{P}]$; as HMGs foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada.

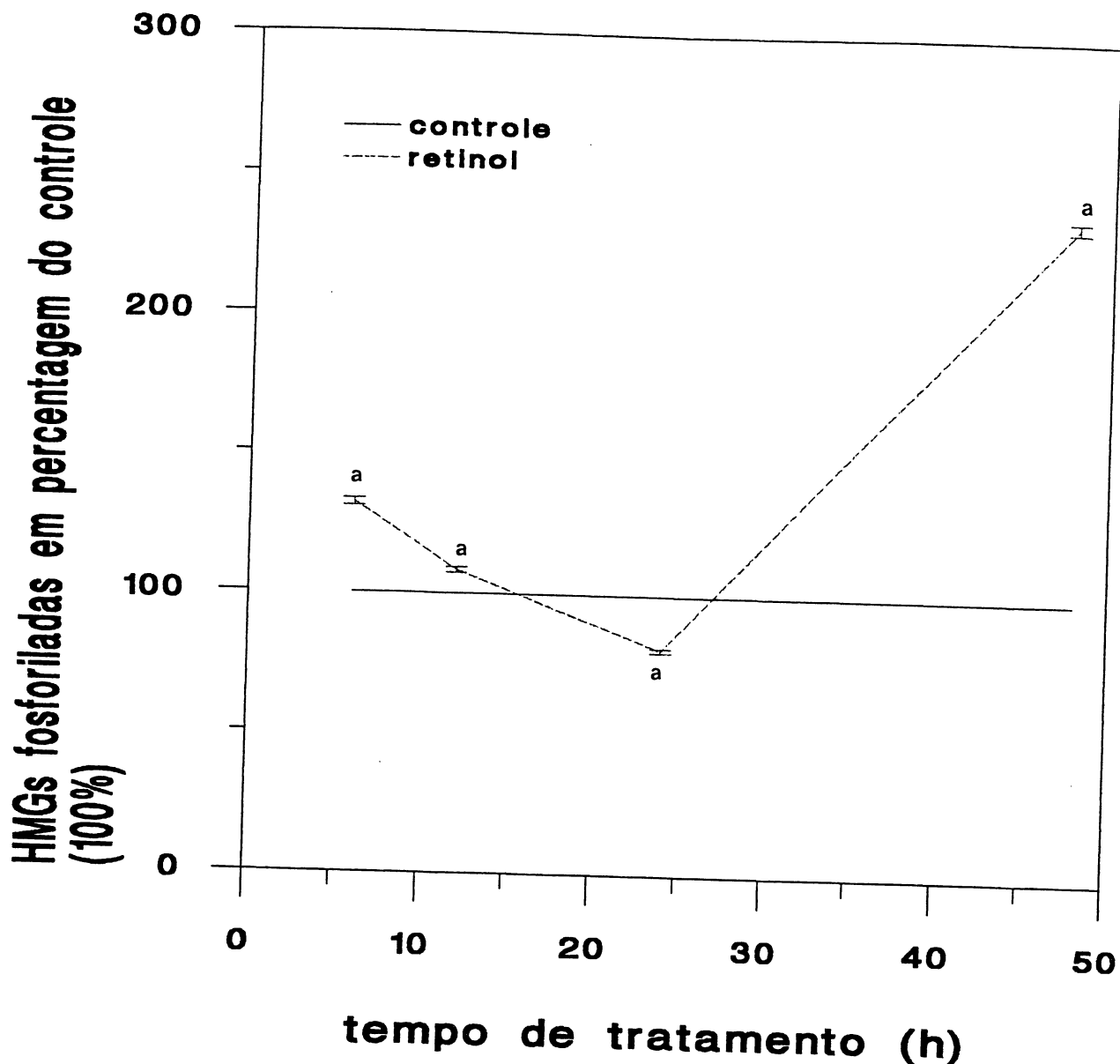


FIGURA.III.12. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMGs ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um n=6

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As células de Sertoli foram tratadas conforme descrito em III.4. As HMGs foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada. Os valores para cada ponto foram expressos em percentagem, em relação ao controle correspondente, considerado sempre 100%.

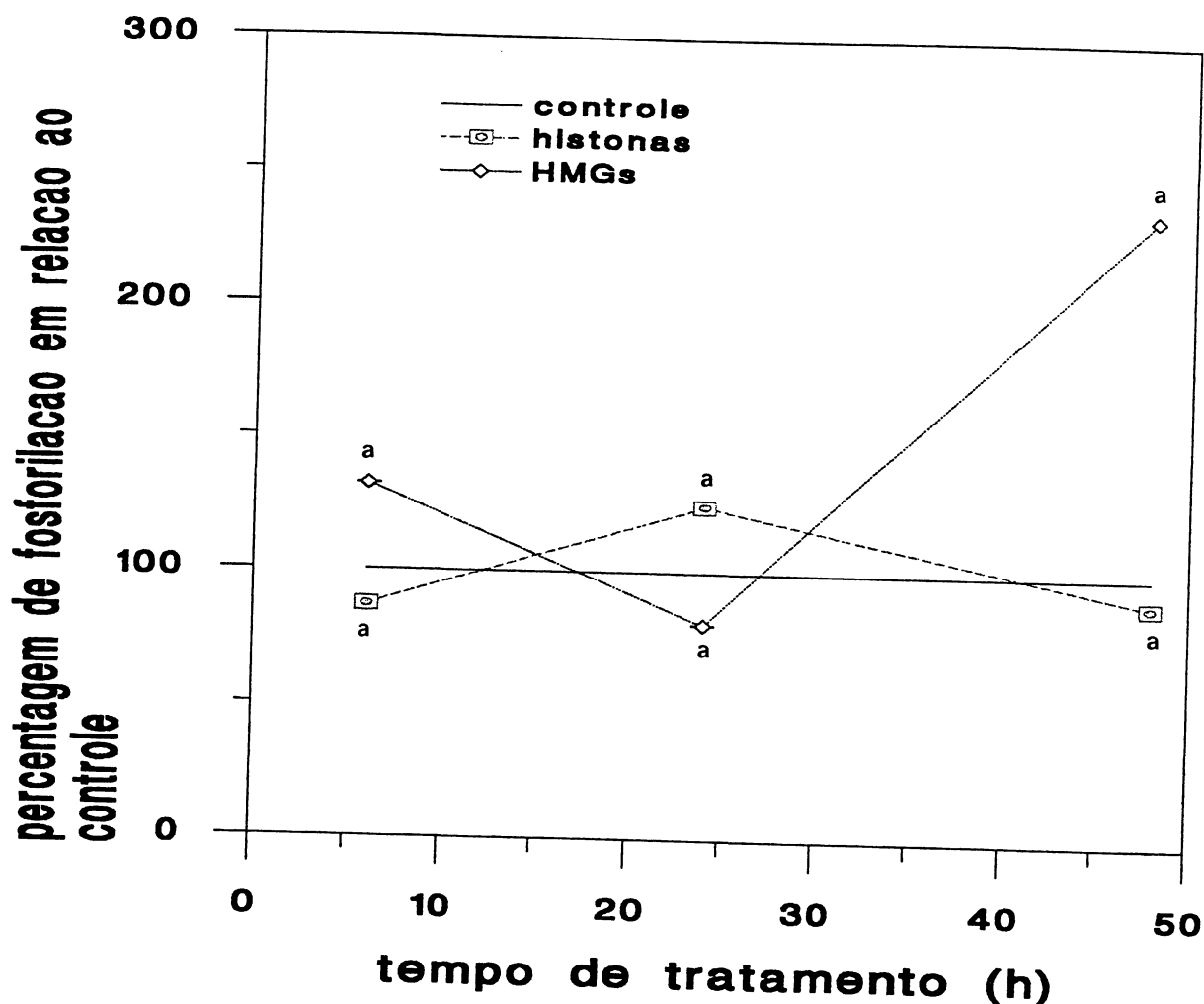


FIGURA.III.13. PERFIL DE FOSFORILAÇÃO DE HISTONAS E HMGs ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS TRATADAS COM RETINOL (10 μ M) POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para n=6

a) p < 0,01 em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As histonas e as HMGs de células de Sertoli, tratadas com retinol e controle, foram isoladas, quantificadas e a radioatividade contada. Os valores de cada ponto estão expressos em percentagens do controle correspondente para cada tempo de tratamento, que foi sempre considerado como 100%.

III.1.2.4. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da HMG 1.

Na FIGURA III.14 pode ser visto que a HMG 1 apresenta uma significativa alteração do nível de fosforilação quando comparamos o perfil de fosforilação das HMG 1 de células tratadas com o perfil da HMG 1 de células controle. Nas células tratadas por 6 horas já encontramos um considerável aumento no nível de fosforilação que decai para o menor nível de fosforilação quando atingimos 24 horas de tratamento e finalmente, com 48 horas de tratamento encontramos um aumento de mais de 10 vezes no nível de fosforilação destas HMGs que parecem estar associadas com a replicação celular. Este aumento indica que neste momento estas HMGs não estariam associadas de maneira íntima com a cromatina. Em contraste, o nível de fosforilação da HMG 1 das células controle não varia com o tempo de cultura.

III.1.2.5. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da HMG 2.

A FIGURA III.15 representa o perfil de fosforilação da HMG 2 de células tratadas com retinol pelos vários períodos experimentais em comparação com o perfil de fosforilação das HMG2 de células controle. Nesta figura podemos observar que o perfil das HMG 2 dos dois grupos celulares é mais próximo um do outro, sendo que também observamos um decréscimo nos níveis de fosforilação com 24 horas de tratamento como nas outras sub-famílias de HMGs quando comparamos os grupos tratados e seus respectivos controles. No entanto, o decréscimo não é tão acentuado. Pode-se observar também um aumento de quase 80 % na fosforilação das HMG 2 após 48 horas de tratamento com retinol, sempre em relação ao respectivo controle. Esta HMG está descrita na literatura como associada não só diferenciação celular como também replicação, em conjunto com a HMG 1, mas em

menores proporções. A quantidade de HMG1 é menor que a das outras HMGs visto que está associada com a imaturidade de tecidos e a não diferenciação. Em células de Sertoli na idade (15 dias) em que trabalhamos, tanto a diferenciação, como a divisão são fenômenos já terminados e quase inexistentes.

III.1.2.6. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação da HMG 14.

A HMG 14 é uma das HMGs que parece estar associada com o afrouxamento do nucleossomo durante a atividade de transcrição gênica e muitos autores sugerem que esta HMG 14 substitua ou mesmo exerça uma certa competição com o dímero H2a-H2b no nucleossomo, não sendo de estranhar que seu perfil de fosforilação seja antagônico ao das histonas H2a e H2b. Na FIGURA III.16 podemos observar este perfil de fosforilação quando comparamos as HMG 14 isoladas de células tratadas com retinol e de células controle. O perfil mostra que com 6 horas de tratamento as HMG14 de células tratadas estão mais fosforiladas que as das células controle, com 24 horas de tratamento temos o menor nível de fosforilação e com 48 horas, de maneira semelhante ao observado nas HMGs já descritas, temos o maior nível de fosforilação destas HMGs em relação ao controle.

III.1.2.7. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a fosforilação de HMG 17.

A FIGURA III.17 mostra o perfil de fosforilação das HMGs 17 de células tratadas com retinol comparado com o perfil das HMGs 17 isoladas de células controle. Nesta figura observamos que com 6 horas de tratamento não existe diferenças entre as HMGs 17 dos dois grupos experimentais. De maneira semelhante a outras três sub-famílias de HMGs, com 24 horas temos o menor nível de fosforilação e, provavelmente, a maior associação

entre estas HMGs e os nucleossomos, e com 48 horas de tratamento temos o maior nível de fosforilação das HMGs 17 e também, provavelmente, o seu menor nível de associação com os nucleossomos. Esta sub-família de HMGs em associação com as HMGs 14 são descritas na literatura com competidoras dos dímeros H2a-H2b nos nucleossomos durante os momentos de relaxamento da cromatina na ativação transcricional dos genes (vide Introdução I.2.4.6).

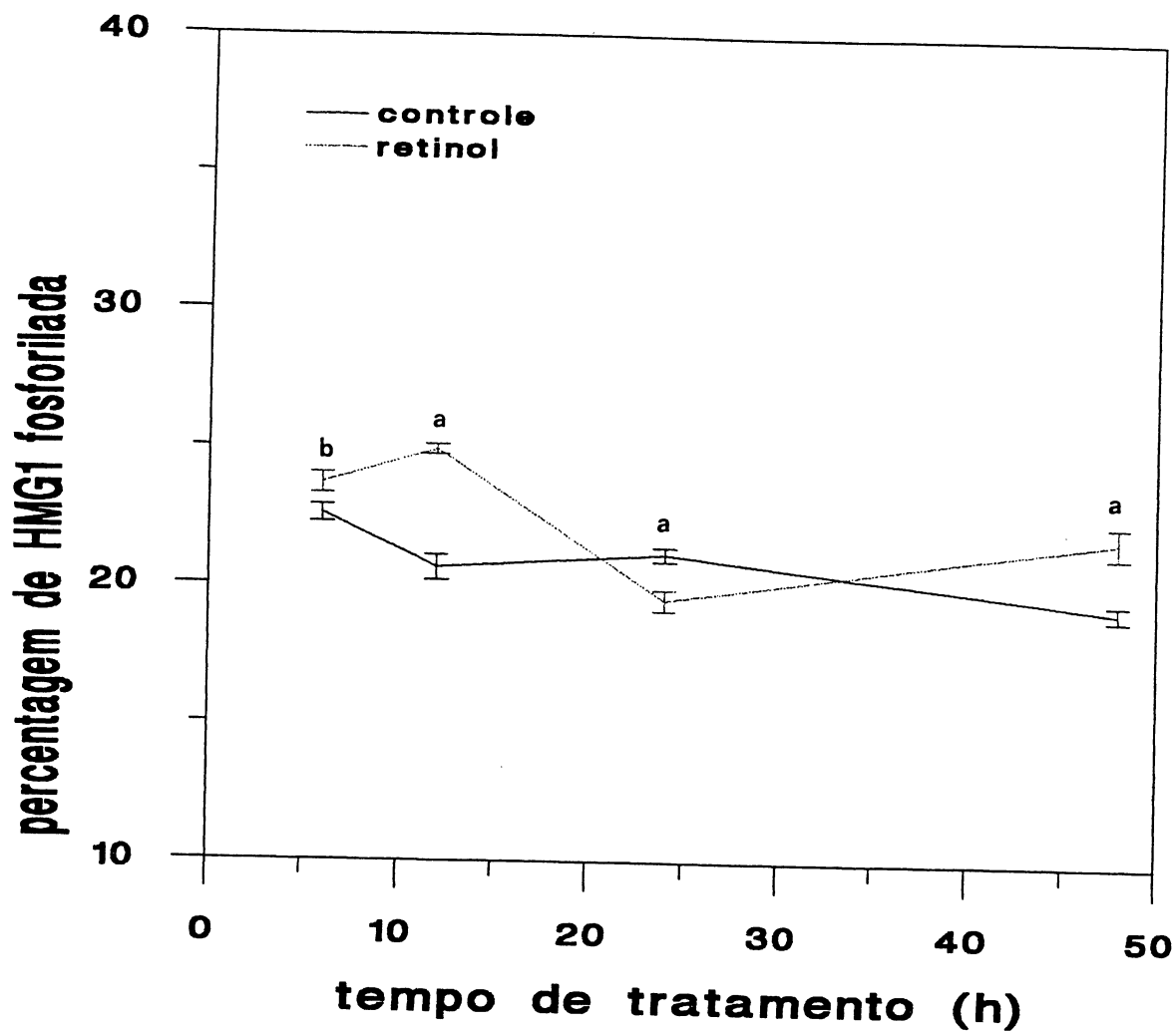


FIGURA.III14. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMG1 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para n=6

a) $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas) .

b) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas) .

As HMGs de células de Sertoli tratadas com retinol e controle, foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas obtido em cada amostra.

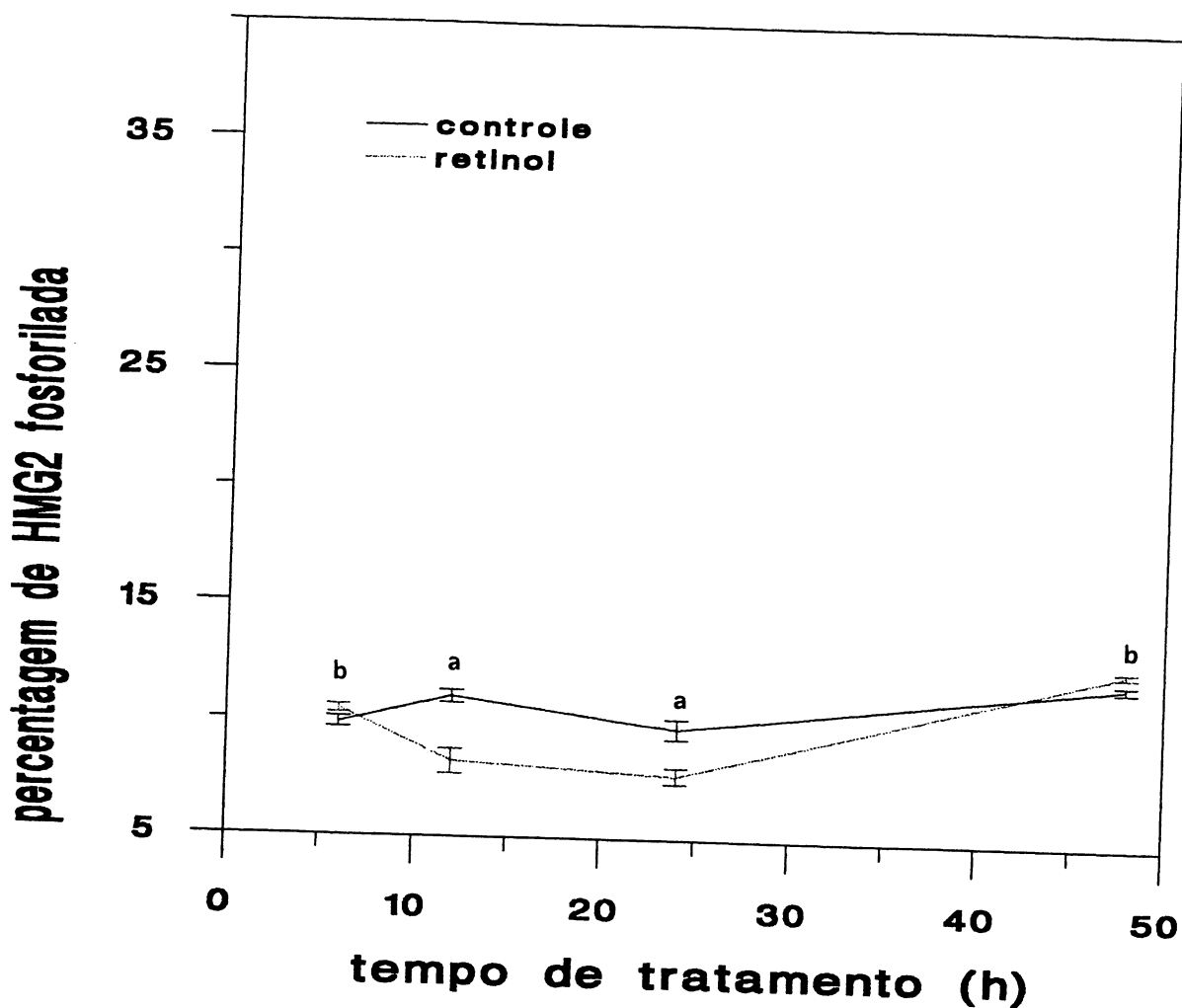


FIGURA.III15. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMG2 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um n=6

a) $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

b) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As HMGs das células de Sertoli tratadas com retinol e controle, foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada. As contas obtidas em cada banda foram expressas em porcentagens do total de contas de cada amostra.

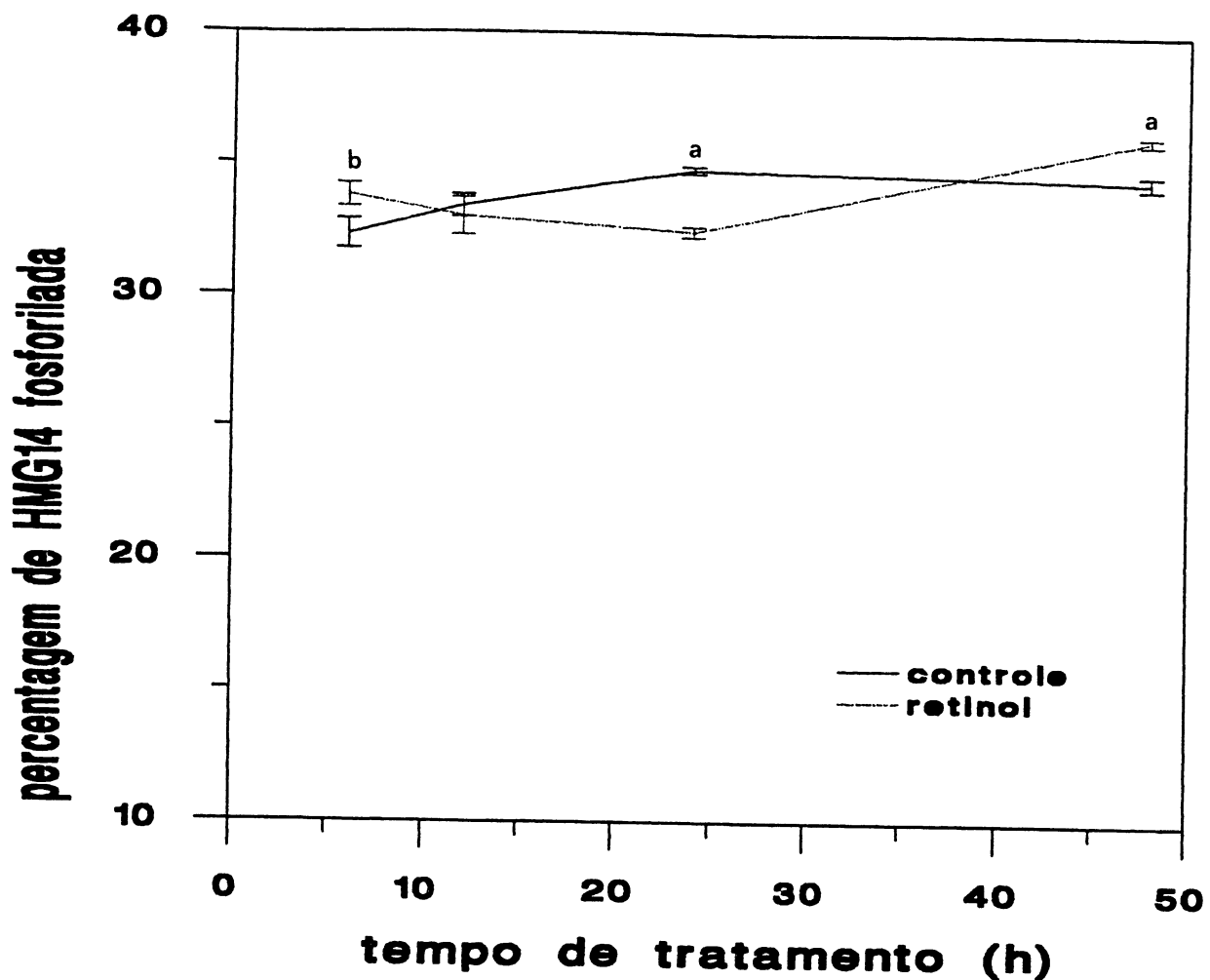


FIGURA.III.16. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMG14 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um n=6

a) $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

b) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As HMGs de células de Sertoli, tratadas com retinol e controle, foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas de cada amostra.

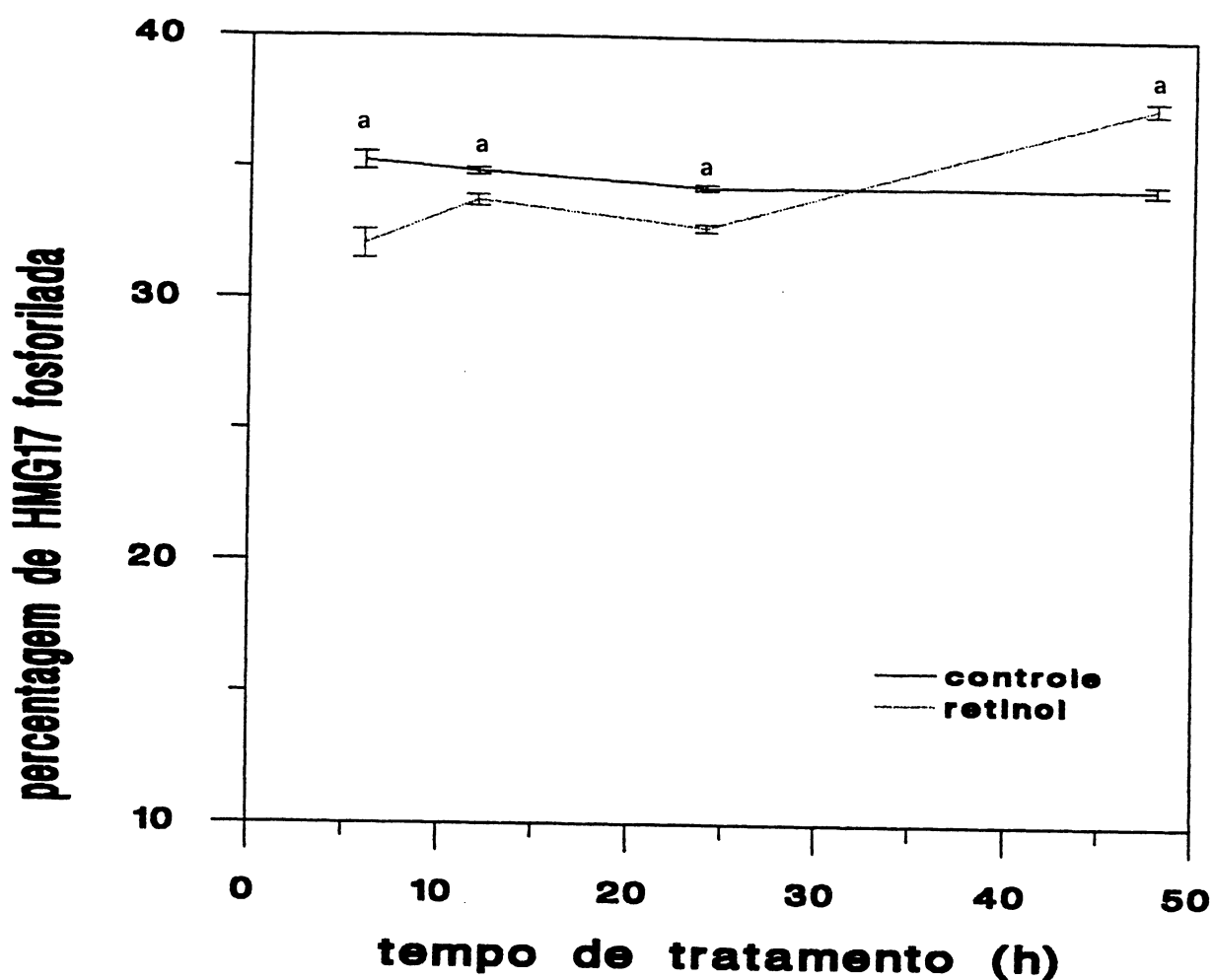


FIGURA.III.17. EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS HMG17 ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um n=6

a) $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

b) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

As HMGs de células de Sertoli tratadas com retinol e controle, foram isoladas, quantificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. Após a corrida de separação as bandas coradas foram cortadas, dissolvidas e a radioatividade contada. As contas de cada banda foram expressas em percentagens do total de contas de cada amostra.

III.2. Efeito do retinol sobre a estrutura da cromatina

Durante a fase anterior da tese onde determinamos os efeitos do retinol sobre a fosforilação de histonas e HMGs surgiu a hipótese de que o retinol poderia estar alterando a conformação da cromatina ao alterar o perfil de fosforilação das histonas e HMGs nas células tratadas. Entre os testes mais utilizados para determinar o relaxamento da cromatina está a sensibilidade da cromatina a ação da DNase tipo I.

III.2.1. Efeito do tempo de tratamento com retinol (10 μ M) sobre a sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I.

Na FIGURA III.18 encontramos os dados referentes à sensibilidade da cromatina das células de Sertoli tratadas com retinol (10 μ M) pelos vários períodos testados na etapa anterior da tese. Nesta figura podemos observar que em qualquer dos períodos estudados, a cromatina das células tratadas com retinol é mais sensível que a das células do grupo controle, sendo que após 24 horas de tratamento com retinol encontramos a maior sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I (20U.I./mg de DNA). Após 48 horas de tratamento com retinol podemos observar a menor sensibilidade da cromatina à ação da DNase tipo I e isto pode nos dar a informação de que esta cromatina esteja tão compactada que a DNase age bem menos sobre ela. Os resultados desta etapa do trabalho foram coerentes com os obtidos na primeira etapa da tese e nos ajudaram a confirmar a nossa suposição de que o tratamento com retinol agia sobre a fosforilação das proteínas componentes dos nucleossomos e assim alterava o estado de relaxamento da cromatina. Estes resultados também nos sugeriram uma função antagônica das histonas e das HMGs com relação ao estado de relaxamento da cromatina. Acreditamos que quanto mais fosforiladas as histonas mais sensível seja a cromatina à ação da DNase tipo I e que o nível

de fosforilação das HMGs esteja ligado atividade gênica desta cromatina. A TABELA III.1 mostra que a incorporação de [metil ³H] timidina obtida em nossos experimentos é semelhante a descrita no trabalho de Guma e colaboradores(1993) e que serviu de idéia inicial para este experimento, nosso modelo portanto repetia o observado anteriormente.

TABELA.III.1. Incorporação de [metil-³H] timidina na cromatina de células de Sertoli cultivadas.

células	CPM x 10 ³		
	6 horas*	24 horas*	48 horas*
controle	86,67 + 0,94 ^a	105,80 + 0,27 ^b	106,95 + 0,41 ^b
retinol	116,80 + 0,59 ^a	154,76 + 0,34 ^b	152,11 + 0,94 ^b

resultados expressos em média + erro padrão

a) diferentes do controle pelo teste t de Student para amostras pareadas com p < 0,01

b) diferentes dos valores correspondentes (controle ou retinol) em 6 horas pelo teste t de Student para amostras pareadas com p < 0,01

* tempo de tratamento com retinol (10 µM)

III.2.2.Efeito da 1,10 fenantrolina (100 µM) sobre a sensibilidade da cromatina a ação da DNase tipo I induzida por retinol.

As teorias mais moderna sobre estrutura de cromatina propõe (Martins et al,1994) que existam íons de ferro fazendo parte do arranjo entre DNA e proteínas nucleares. Como as

células de Sertoli apresentam um intenso transporte de Fe em seu interior e que a presença de Fe⁺² livre nas células tem sido descrita como capaz de gerar danos no DNA via ação de radicais livres, nós decidimos averiguar se o tratamento com 1,10 fenantrolina, um quelante de Fe⁺², seria capaz de reduzir a sensibilidade da cromatina de células tratadas com retinol a ação da DNase tipo I. Na FIGURA III.19 podemos observar que a 1,10 fenantrolina não só foi capaz de diminuir a sensibilidade da cromatina a ação da DNase tipo I como também não apresentou nenhum efeito significativo como droga, neste parâmetro. A escolha do período de 24 horas para o teste se deu em razão de ser o tempo de maior sensibilidade DNase tipo I detectado no item anterior (III.2.1). A TABELA III.2 mostra que a dose utilizada de 1,10 fenantrolina não apresentou efeito tóxico para as células de Sertoli, pois não encontramos diferenças significativas nas incorporações de [metil³H] timidina com ou sem o uso da droga, na dose e no tempo testados.

TABELA.III.2. Incorporação de [metil-³H] timidina na cromatina de células de Sertoli cultivadas.

tratamento	CPM . 10 ³
controle	100,06 ± 0,53 ^b
retinol	142,65 ± 0,46 ^a
1,10 fenantrolina	99,86 ± 0,96 ^b
retinol/1,10 fenantrolina	97,54 ± 0,76 ^b

resultados expressos em médias ± erro padrão

a) significativamente diferente dos outros valores pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,01

III.2.3. Efeito da 1,10 fenantrolina (100 μ M) sobre a ação de endonucleases.

Como no item anterior (III.2.2) havíamos detectado uma diminuição da sensibilidade da cromatina DNase tipo I exógena, decidimos averiguar se a cromatina também estaria mais resistente à ação de suas próprias endonucleases e na FIGURA III.20 observamos que o tratamento com retinol deixava a cromatina mais sensível à ação das próprias endonucleases e que o tratamento com 1,10 fenantrolina deixava esta cromatina mais resistente à ação da DNase tipo I, no nosso modelo experimental. Um fato interessante observado é que o tratamento com retinol mais 1,10 fenantrolina causava uma redução na sensibilidade da cromatina à ação das endonucleases não observado quando apenas a 1,10 fenantrolina era utilizada, sugerindo uma provável proteção da célula à ação deste tipo de enzimas.

III.3. Efeito da hidróxi-uréia sobre a incorporação de timidina na cromatina de células de Sertoli cultivadas, previamente tratadas com retinol (10 μ M)

Com o objetivo de determinarmos se a incorporação aumentada de timidina, observada em células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol era devida à síntese de DNA ou ao reparo de DNA, decidimos tratar as células com hidróxi-uréia (3 mM) que é um inibidor de síntese de DNA. Cultivamos as células conforme descrito em material e métodos e escolhemos o tempo de 24 horas de tratamento por sabermos ser este o ponto de máxima incorporação de timidina na cromatina de células tratadas com retinol (GUMA et al, 1994). Duas horas antes do final do período de incubação com retinol adicionamos a grupos experimentais 3 mM de hidróxi-uréia e 90 minutos antes do final do período de incubação total foram adicionados ao meio de incubação 5 μ Ci/ml de [3 H] timidina. Sendo o período total de incubação com retinol de 24 h, as células foram raspadas, lavadas com PBS gelado e o DNA isolado, quantificado e contado conforme descrito em material e métodos. Os resultados deste experimento podem ser vistos na FIGURA III.21 onde fica evidente o efeito da hidróxi-uréia

como um inibidor de síntese de DNA, visto que inibe em quase 90% a incorporação observada tanto nas células controle como nas tratadas com retinol. Podemos ainda observar que em presença de hidróxi-uréia o tratamento com retinol mantém um pequeno aumento de incorporação com respeito a hidroxí-uréia. Estes dados nos sugerem que o retinol, nestas condições, não só aumentou a síntese de DNA como também teve um pequeno efeito indutor sobre os mecanismos de reparo do DNA. Este experimento junto com os experimentos em que foi utilizada a 1,10 fenantrolina nos levam a pensar nesta possibilidade.

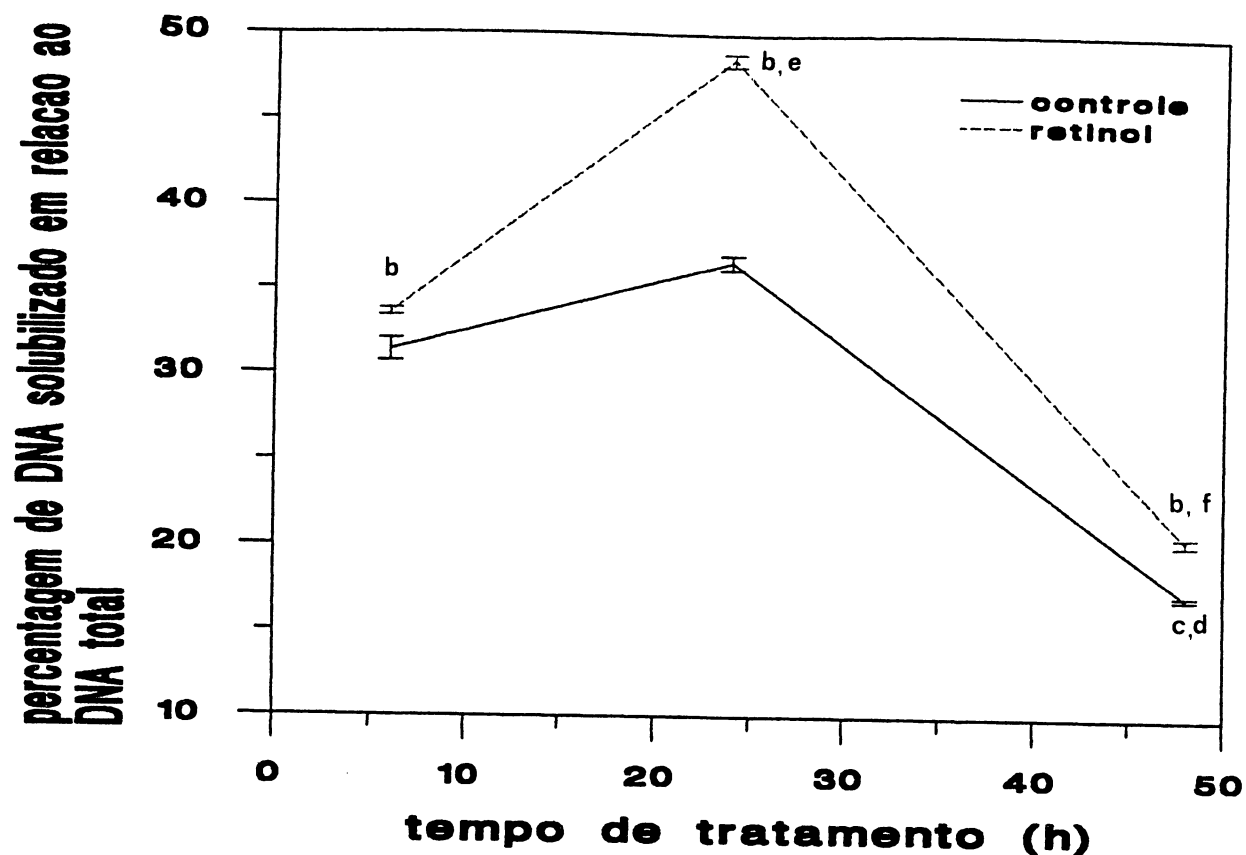


FIGURA.III.18. AUMENTO DA SENSIBILIDADE DA CROMATINA A AÇÃO DE DNase TIPO I EM CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS TRATADAS COM RETINOL ($10\mu\text{M}$).

- a) os valores estão expressos como média \pm EPM, para um $n=6$
 b) $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).
 c) $p < 0,01$ em relação ao controle 6 h (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).
 d) $p < 0,01$ em relação ao controle 24 h (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).
 e) $p < 0,01$ em relação ao retinol 6 h (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).
 f) $p < 0,01$ em relação ao retinol 24 h (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).
 O DNA das células de Sertoli, tratadas com retinol por diferentes tempos, foi isolado e quantificado; conforme descrito em material e métodos. A incubação com DNase tipo I foi feita por 30 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, na concentração de 20 U.I de DNase/mg de DNA. Após a interrupção da reação, o sistema de incubação foi centrifugado e tanto o sedimento como o sobrenadante contados. Os dados foram expressos como uma relação entre o número de contas do sobrenadante e o total de contas do sistema (sedimento + sobrenadante).

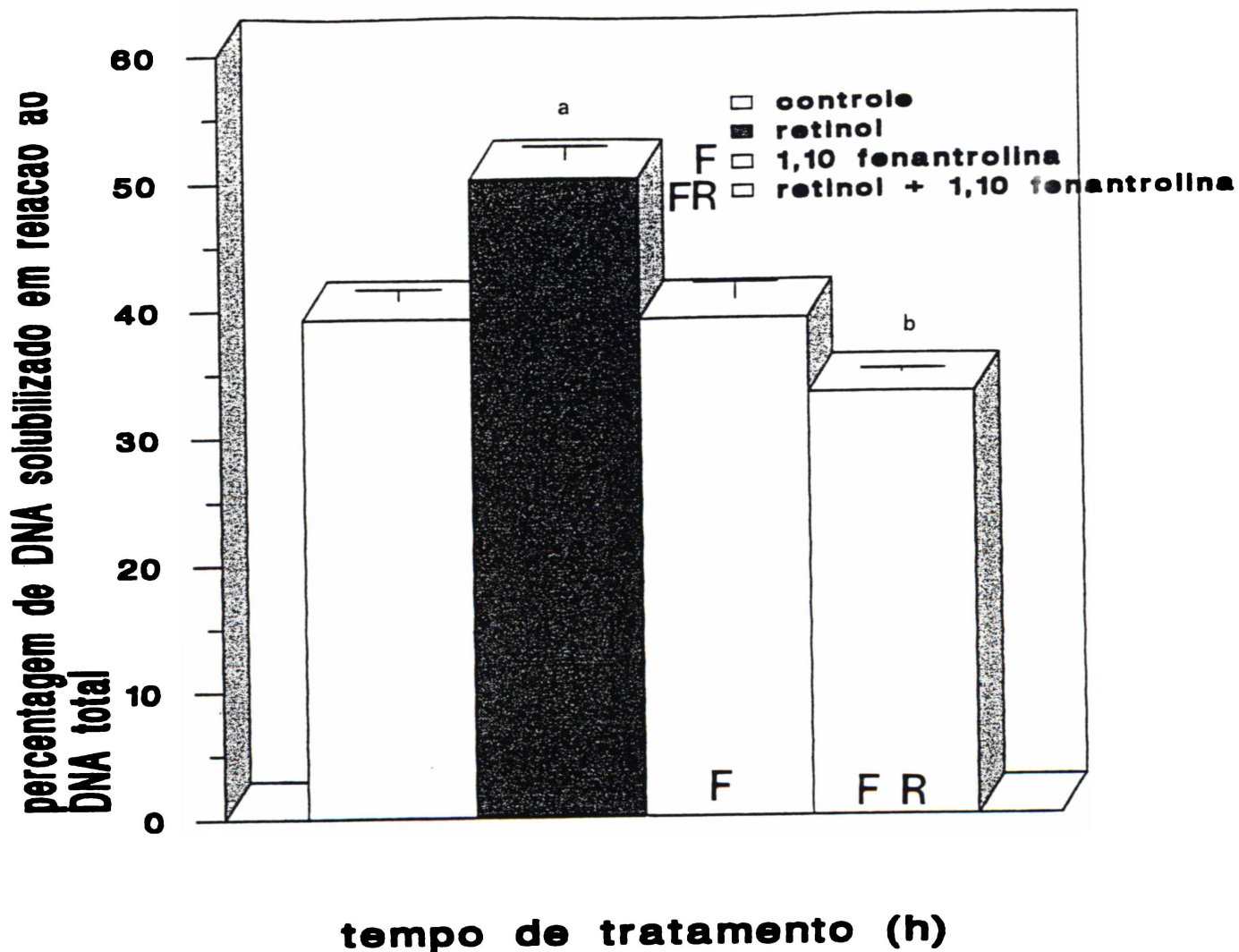


FIGURA.III.19. EFEITO DA 1,10 FENANTROLINA SOBRE A SENSIBILIDADE DA CROMATINA DE ISOLADA DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS, À AÇÃO DA DNase TIPO I.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um $n=6$

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).

b) $p < 0,01$ em relação a 1,10 fenantrolina (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).

As células de Sertoli foram incubadas em ausência ou presença de 1,10 fenantrolina ($100\mu\text{M}$). Após 24 h a metade das culturas de cada grupo recebeu retinol por 24 h ($10\mu\text{M}$). O DNA das células foi isolado e tratado como descrito em III.19.

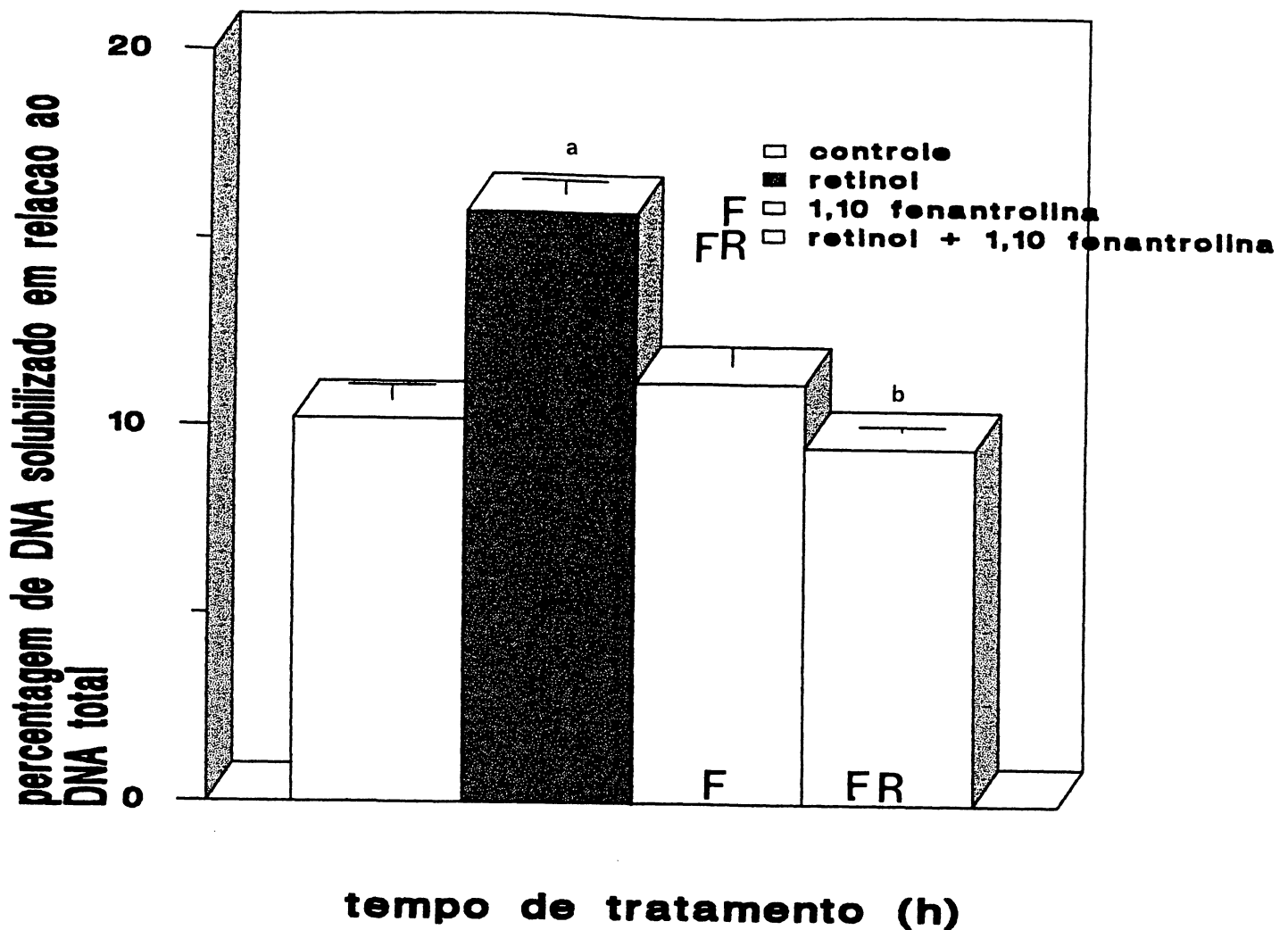


FIGURA.III.20. EFEITO DO TRATAMENTO COM 1,10 FENANTROLINA SOBRE A SENSIBILIDADE DA CROMATINA DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS, TRATADAS COM RETINOL ($10\mu\text{M}$), À AÇÃO DE ENDONUCLEASES.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para um $n=6$

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).

b) $p < 0,01$ em relação a 1,10 fenantrolina (ANOVA e posterior teste de Newman-Keuls).

O presente experimento é semelhante ao anterior, tendo como diferença apenas o fato de que o DNA isolado das células de Sertoli tratadas (de maneira igual descrita em III.20), foi incubado a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem a adição de DNase tipo I exógena. O tratamento dos dados e a forma final de expressão dos resultados é a mesma.

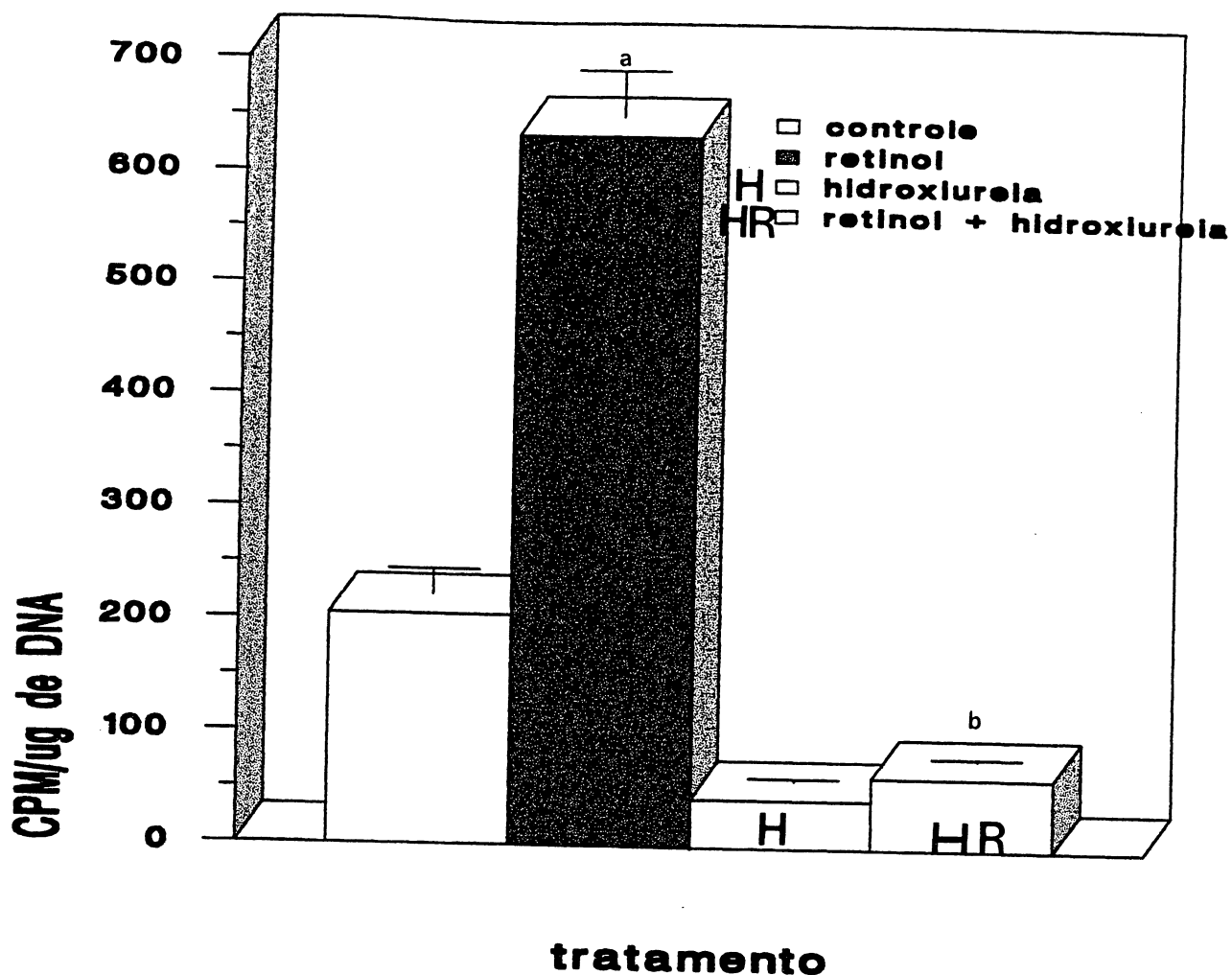


FIGURA.III.21. EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDRÓXI-URÉIA (3mM) SOBRE A INCORPORAÇÃO DE $[^3\text{H}]$ TIMIDINA AO DNA DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS TRATADAS COM RETINOL (10 μM).

Resultados expressos em médias \pm EPM, n=6, diferenças determinadas pelo teste de Newman-Keuls (ANOVA)

a) diferente do controle, $p < 0,01$

b) diferente de hidróxi-uréia, $p < 0,05$

O DNA de células de Sertoli cultivadas, tratadas (24 h) ou não com retinol, e que foram tratadas por 2 h com hidróxi-uréia e incubadas com $[^3\text{H}]$ timidina por 90 minutos, foi isolado, quantificado e contado conforme descrito em material e métodos. Os resultados expressos em cpm/ μg de DNA.

III.4. Efeito do retinol (10 μ M) sobre a atividade da Ornitina Descarboxilase (ODC).

A ODC é uma enzima de grande importância para o desenvolvimento celular e hoje em dia é um dos modelos de regulação mais estudados em função da sua complexidade e de todo o envolvimento das poliaminas com o desenvolvimento celular. No capítulo Introdução da tese estão descritas as alterações que a atividade desta enzima sofre com a maturação da célula de Sertoli. Por esta razão escolhemos esta enzima como um marcador de diferenciação desta células. Na FIGURA III.22 podemos observar que o tratamento com retinol induz a uma redução inicial, apesar de não significativa, da atividade da enzima, como se a célula estivesse em um outro processo e que terminado este processo, após 24 horas de tratamento, fosse havendo um estímulo gradual da atividade desta enzima para que em 48 horas estivesse cerca de 50 % acima da atividade observada nas células controle. Se levarmos em conta o papel das poliaminas como moléculas acessórias da compactação da cromatina, estes dados são perfeitamente coerentes com os observados em relação sensibilidade aumentada da cromatina de células tratadas com retinol ação da DNase tipo I e que o aumento da atividade da ODC a partir de 24 horas corresponde também a um aumento da resistência da cromatina DNase tipo I. Se formos analisar os resultados pensando em diferenciação celular podemos dizer que esta mudança da atividade da enzima indica um retorno aos níveis de atividade mais semelhantes aos de células imaturas ou não diferenciadas.

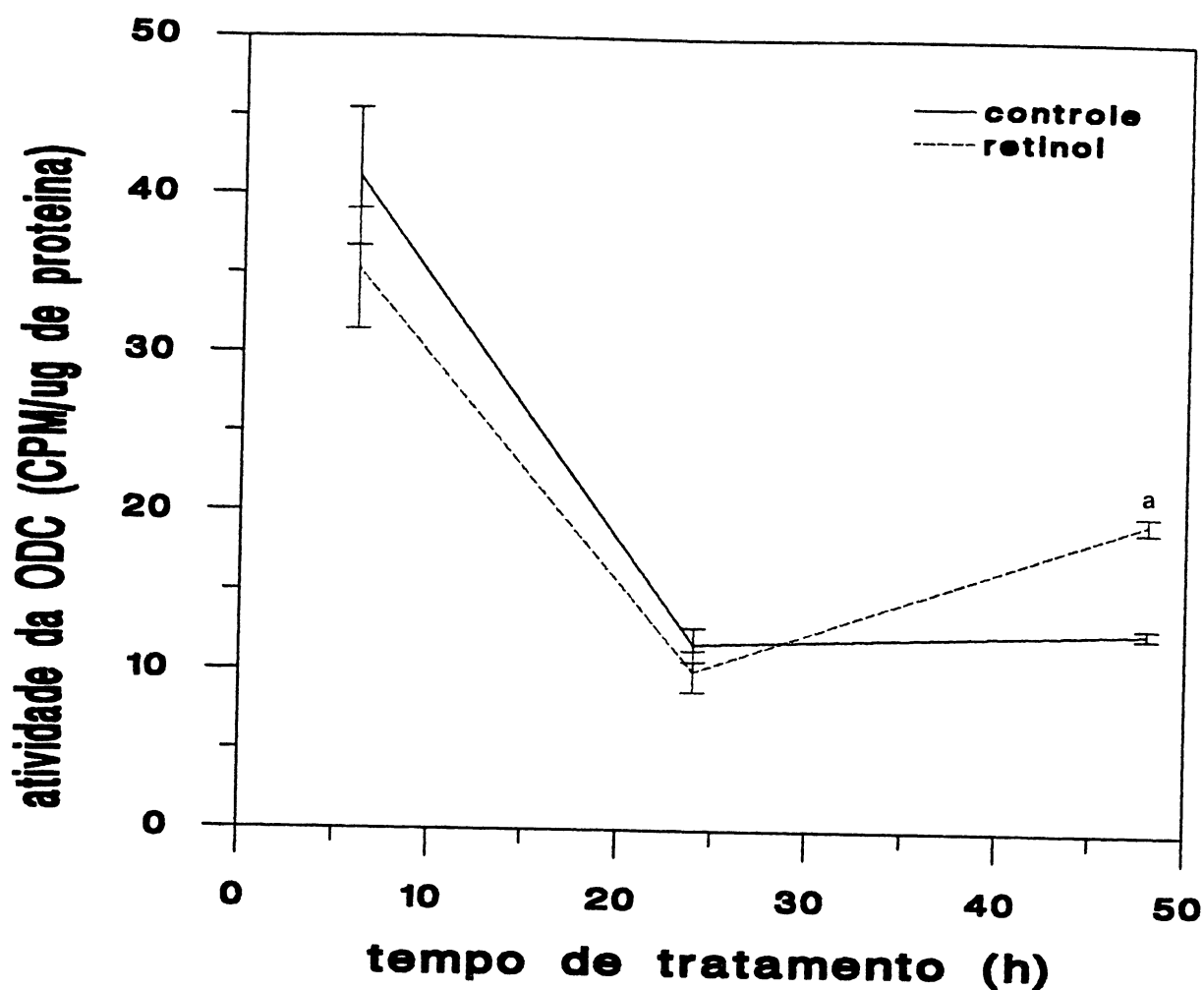


FIGURA.III.22. EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL (10 μ M) SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA ORNITINA DESCARBOXILASE, ISOLADAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CULTIVADAS.

Os valores estão expressos como média \pm EPM, para n=6

a) $p < 0,01$ em relação ao controle (teste t de Student para amostras pareadas).

A enzima ODC isolada de células de Sertoli, tratadas com retinol e controle, foi quantificada e teve a sua atividade determinada para cada período de tratamento das células com retinol, conforme descrito em material e métodos. Os resultados foram expressos em CPM/ μ g de proteínas tanto para as células controle como para as células tratadas com retinol.

IV. DISCUSSÃO

Durante a década de 1970 muita da metodologia existente foi usada na elucidação da estrutura da interação DNA-proteína e estes esforços acabaram se tornando os primeiros a elucidar a organização geral deste complexo arranjo que compõe a cromatina. Estes estudos forneceram uma visão estática, necessária a princípio, de como as histonas e outras proteínas cromossomais progressivamente compactam DNA no cromossomo. O nucleossomo veio a ser visto como o bloco construtor universal e invariável, e seu papel parecia ficar limitado a impedir qualquer processo nuclear onde o DNA fosse necessário como um molde. Esta visão estática da cromatina perdurou por mais de uma década. Felizmente, ela foi recentemente revisada para incorporar os novos papéis multifuncionais das histonas e demais proteínas cromossomais nos eventos regulatórios nucleares (Pruss et alli., 1995 e Lewin, 1994a,b,c).

Na última década (1990), trabalhos experimentais sobre a disponibilidade dos genes à maquinária transcricional têm claramente confirmado que a conformação da estrutura da cromatina tem um papel importante na repressão ou indução da expressão dos genes. Entretanto, esta repressão se mostrou altamente seletiva, dependente da formação de nucleossomos específicos que contenham elementos regulatórios chaves e, além disso, estrutura de cromatina de alta ordem. Mais importante ainda do que isto, é o fato de que a análise genética e a reconstituição bioquímica sugerem que a estrutura da cromatina seja essencial na ativação da transcrição, e que em certos momentos pode na realidade facilitar os processos de iniciação. Mutações ou deficiências em histonas específicas ou em seus domínios estruturais acabam por levar a alterações bem específicas na transcrição de genes individuais. O envolvimento das nucleoproteínas no arranjo do nucleossomo tem sido estudado em detalhe, sendo suficientemente compreendido hoje, podendo-se atribuir alterações funcionais no núcleo às mudanças nas interações entre os domínios específicos

das histonas e outras proteínas nucleares (HMG's) e o DNA (Pruss et alli., 1995; Lee et alli., 1993).

Os estudos sobre a função dos nucleossomos têm sido responsáveis por um renascimento do interesse científico mundial pela estrutura e organização do nucleossomo e da cromatina em geral. Moudrianakis e colaboradores solucionaram em 1991 a estrutura do octâmero de histonas em torno do qual o DNA está organizado formando os nucleossomos. Outros autores têm determinado a porção do nucleossomo envolvida com a histona ligadora (por exemplo H1 ou H5) e até mesmo como esta histona se associa ao DNA inter-nucleossomal. De uma maneira geral, os estudos até aqui têm levado a uma apreciação da anatomia do nucleossomo, o que nos leva a novas questões não mais apenas com relação à estrutura, mas também sobre a natureza e o significado das interações proteína nuclear/DNA (Pruss et alli., 1995; Kochbin et alli., 1994).

Os resultados obtidos durante a execução deste trabalho vêm ao encontro desta nova visão não apenas estrutural organizacional dos nucleossomos, mas reforçam a idéia de que este arranjo seja dinâmico e que variações nas cargas das histonas via reações covalentes sejam capazes de alterar as interações destas proteínas com o DNA e desta maneira agir permitindo ou impedindo a expressão de genes ou até mesmo de famílias de genes após um determinado estímulo. No nosso caso em especial o retinol se mostrou um agente capaz de induzir a fosforilação de histonas em níveis maiores do que os que normalmente ocorrem durante as variações do ciclo das células de Sertoli (figuras III.3 e III.4). O efeito importante do retinol sobre a fosforilação das histonas de células de Sertoli nos chamou muito a atenção e se tornou a pergunta condutora da tese. Além de aumentar os níveis de fosforilação das histonas de células tratadas em relação ao controle, o tratamento com retinol gerava um pico de fosforilação após 24 h de tratamento e este pico correspondia ao que havia sido anteriormente descrito em trabalhos realizados em nosso grupo onde por volta de 24 horas de tratamento com retinol havia um aumento na incorporação de [³H] timidina sem que

houvesse um aumento significativo de massa de DNA ou mesmo uma significativa indução de divisão celular (Guma et alli., 1993; Moreira et alli., 1994).

Para que as células estavam incorporando mais timidina ? qual o significado fisiológico/molecular deste aumento na incorporação? Muitas perguntas poderiam ser geradas com estes dados, e para respondê-las deveríamos ter uma idéia ao menos aproximada de como estava a estrutura da cromatina, se mais relaxada ou mais condensada, em função da ação do retinol. Uma dúvida que foi de imediato sanada pela literatura referia-se à ação do retinol, se ela ocorreria diretamente sobre o DNA ou através de intermediários. Apesar de muitas referências não descartarem a possibilidade de intermediários, hoje já se sabe que existem receptores nucleares tanto para retinol como para ácido retinóico (produzido a partir de retinol no citoplasma) e que estes agem nuclearmente durante vários momentos da diferenciação e divisão celulares. Sendo assim, não seria errado supor uma ação do retinol sobre a estrutura da cromatina (Griswold et alli., 1993). Com esta finalidade nós também estudamos os efeitos do retinol sobre a fosforilação das HMGs, uma outra superfamília de proteínas nucleares, que depois de descoberta no final dos anos 60 também ficou meio de lado na sua importância frente aos processos nucleares em franca elucidação e que de maneira semelhante às histonas tem retornado à linha de frente nas pesquisas e se encontram hoje como foco de várias linhas de pesquisa que associam suas interações com o DNA, sugerindo envolvimento destas proteínas com a diferenciação, transcrição, replicação e divisão celular. Nossos experimentos demonstraram que o tratamento com retinol também altera os padrões de fosforilação das HMGs (Figura III.14) e, talvez o mais importante, que estes padrões são inversos dos observados nas histonas, sugerindo uma função antagônica para estas duas superfamílias de proteínas nucleares (Moreira et alli., 1994). Não é novidade na literatura o fato das HMGs estarem associadas a processos de facilitação e relaxamento na estrutura da cromatina e que as histonas parecem estar associadas ao empacotamento. A novidade consiste em tratarmos destes dois lados da questão simultaneamente. Nos interessava também observar os comportamento individuais das sub-famílias de histonas e

HMGs e determinarmos como este padrão geral se refletia nos seus respectivos sub-grupos (Figura III.1 e Figura III.10).

Nas histonas encontramos um efeito muito interessante que talvez explicasse muitas das nossas observações seguintes sobre a sensibilidade à ação da DNase tipo I. Encontramos que as histonas componentes do nucleossoma apresentavam um padrão de fosforilação diferente da histona de ligação - H1. No padrão de fosforilação da H1 (Figura III.5) vemos que os níveis de fosforilação desta histona em células tratadas é sempre mais elevado do que em células controle, o que provavelmente já deixaria esta cromatina mais relaxada e mais sensível a ação de DNase tipo I (fato observado na Figura III.18). Nas demais histonas que compõem o nucleossomo (H2a, H2b, H3 e H4) observamos um padrão semelhante, o que indicaria uma provável ação combinada com respostas sequenciais (Figuras III.6, III.7, III.8 e III.9) e um fato a chamar a atenção é a pequena diferença no padrão de fosforilação da H2a (Figura III.7) que pode ser associado, de alguma maneira, segundo a literatura, a uma outra alteração covalente desta proteína, a ubiquitinação. Sendo assim, não seria necessária uma grande diferença nos níveis de fosforilação para uma alteração de carga nestas histonas, pois sua carga já seria alterada por esta interação especial. Não acredito que apenas a fosforilação esteja ocorrendo, ou mesmo, que apenas a fosforilação seja suficiente para alterar tão significativamente as interações das proteínas nucleares com a cromatina, mas acredito que esta alteração associada à acetilação, por exemplo, e a outros processos de alteração de carga que possam estar envolvidos com a regulação da expressão de genes devam estar associados para que o efeito global de relaxamento da estrutura em locais específicos e com funções bem determinadas ocorram no momento necessário (Treischmann et ali., 1995).

Nas HMGs temos também uma diferença entre os 4 sub-tipos e seus padrões de fosforilação, as HMGs 1, 14 e 17 apresentam um padrão semelhante e as HMGs 2 diferem dos demais sub-grupos (Figuras III.14, III.15, III.16 e III.17). Acredito que isto se deva ao fato da HMG 2 apresentar poucos sítios de fosforilação e de sua ação estar mais associada

à sua presença ou ausência, uma vez que esta HMG está quase sempre associada à diferenciação celular, praticamente desaparecendo em tecidos maduros. Parece que em tecidos jovens está sempre associada a uma função antagônica com relação a histona H1, sendo sempre responsável pela indução de atividade gênica (Lewin, 1994c). Mesmo com estas pequenas diferenças entre os comportamentos de fosforilação das HMGs ainda podemos observar nas sub-famílias um desenho que repete o observado nas HMGs como um todo o de que existe uma redução de fosforilação com 24 horas de tratamento com retinol, exatamente o oposto do que ocorre com as histonas sob as mesmas condições de tratamento (Figura III.13).

Nós decidimos então averiguar como estava o nível de relaxamento da conformação desta cromatina durante o tratamento com retinol e se esta conformação correspondia às nossas suposições. Decidimos então testar a sensibilidade da cromatina das células de Sertoli tratadas com retinol à ação de DNase tipo I (Figura III.18). Nossos resultados demonstraram que a cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol era sempre mais sensível à ação da DNase tipo I do que a de células não tratadas, em qualquer dos tempos experimentais de tratamento, e que havia um pico de sensibilidade após 24 horas de tratamento (também presente no controle) e que este era amplificado pelo tratamento com retinol. O que poderia significar este fato? Acredito que este dado mostre que as células tratadas com retinol estariam envolvidas com um processo a mais do que as células controle, que apesar do aumento de sensibilidade causado pelo tratamento com retinol, não foi capaz de modificar drasticamente o comportamento molecular das células em cultura. Este pico com 24 horas de tratamento deve ser algum ponto do relógio biológico destas células onde seria necessário um maior relaxamento da estrutura da cromatina. Estariam preparando uma divisão, estariam reparando genes ou até mesmo aumentando a síntese de alguns genes específicos necessários para responder a alterações no ambiente? Todas as situações são plausíveis e deveríamos optar por uma delas para seguirmos investigando. Claro que não deveríamos descartar a possibilidade de que mais situações estivessem

ocorrendo e que o que estávamos observando poderia ser o somatório de todas elas. Um fato que gostaria de lembrar é que neste momento trabalhávamos com duas hipóteses principais, a primeira de que o tratamento com retinol estaria induzindo a amplificação de genes específicos (Sylvester, 1993) e a segunda de que estaria havendo reparos na cromatina, qualquer uma das duas seria suficiente para justificar os dados até então colhidos: um maior nível de fosforilação nas histonas e HMGs, com um pico de fosforilação nas histonas em 24 horas de tratamento com retinol, induzindo um simultâneo ponto de menor fosforilação das HMGs, tudo isto somado a um pico de aumento da sensibilidade à ação da DNase tipo I também neste mesmo ponto. Possuíamos também o resultado que indicava ser neste ponto que havia uma maior incorporação de timidina ao DNA (Figura III.21). Neste momento decidimos verificar o possível envolvimento de danos no DNA em função do tratamento com retinol e correlacioná-los, se possível, com nossos resultados. Para isso foi necessário que buscássemos na literatura subsídios que justificassem o porquê de nossa idéia do envolvimento da geração dos radicais livres de oxigênio com nossos resultados. Acreditávamos que uma das possíveis razões para os resultados obtidos seria um aumento de danos no DNA provocados pelo tratamento com doses elevadas de retinol e que o relaxamento observado na cromatina seria consequência de ação dos mecanismos de reparo e também da amplificação de genes envolvidos com estes processos.

As espécies nativas de oxigênio, incluindo : superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (O_2^1), radical hidroxila ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio e orgânicos (H_2O_2 , $ROOH$); são intensamente produzidos por células expostas à radiação ou drogas redox, gerando intermediários citotóxicos. O radical hidroxila entre estas espécies é a mais poderosa, podendo atacar todos os tipos de moléculas biológicas incluindo lipídios, DNA e proteínas.

As células são normalmente protegidas contra danos oxidativos por múltiplos mecanismos enzimáticos e por moléculas antioxidantes. As primeiras enzimas envolvidas são a citosólica Cu/Zn e a mitocondrial Mn *superóxido dismutase* (SOD), que diminui o nível de O_2^- transformando-o em H_2O_2 , prevenindo a célula de danos mediados por este

radical de oxigênio , em várias circunstâncias. O peróxido de hidrogênio é posteriormente metabolizado por uma *catalase peroxissomal* ou, em maior quantidade, por uma enzima citosólica e mitocondrial a *seleno glutatião peroxidase* (Se-GPx). Os peróxidos orgânicos também são reduzidos pela mesma enzima e além disso, por outras enzimas específicas *glutatião-S-transferases* (GST). Portanto, têm sido sugerido que a Se-GPx e GST tem importante papel na defesa da célula contra danos oxidativos (Bauché et al., 1994) .

Quando peróxidos são atacados pelas diferentes glutatião peroxidases (GPx), o glutatião reduzido (GSH) é convertido a glutatião oxidado (GSSG) e este dissulfeto é subsequentemente reduzido por enzimas NADPH dependentes, as *glutatião redutases* (GH), mantendo o equilíbrio GSH/GSSG. Muitos estudos têm demonstrado a importância destas enzimas na resistência das células às espécies reativas de oxigênio . Estas enzimas trabalhando em conjunto evitam a formação do radical hidroxila que é altamente citotóxico.

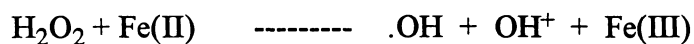
Os sistemas antioxidantes das células de Sertoli são caracterizados por níveis relativamente altos nas atividades de SOD, SE-GPx, GPX, GST, GSH e de GH intracelular. As células de Sertoli devem, portanto, ser capazes de converter O_2^- a H_2O_2 e depois metabolizar este peróxido ou outros peróxidos orgânicos em outras moléculas não-reativas, mantendo assim os níveis de GSH/GSSG. Estas células somáticas possuem um complexo sistema de defesa antioxidativo que pode provavelmente protegê-la eficientemente contra um *stress* oxidativo. A fagocitose é um processo sempre associado com queima respiratória onde altos níveis de O_2^- são produzidos. Isto é particularmente importante nas células de Sertoli devido ao fato delas fagocitarem os restos de espermátides mortas e consideráveis quantidades de citoplasma residual de espermátides em amadurecimento durante a espermatogênese normal, sem nos esquecermos de um grande número de células germinativas degeneradas. A proteção contra espécies reativas de oxigênio, é, portanto , essencial para as células de Sertoli , tanto em condições normais como patológicas (Bauché et alli., 1994).

Qualquer desequilíbrio neste sistema enzimático pode levar à formação de peróxido de hidrogênio em excesso, deixando-o disponível para ser convertido em radical hidroxila livre via reação de Fenton, podendo induzir danos nos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas celulares. Isto pode originar consequências dramáticas nos testículos. Um outro dado que não pode ser deixado de lado é que os altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados nos testículos sugerem que as membranas plasmáticas das células testiculares podem ser muito susceptíveis aos ataques de radicais livres.

Lucesoli e seus colegas (1995) demonstraram que um aumento de Fe na alimentação de ratos adultos causa um acúmulo de Fe nos testículos destes animais, e que isto está associado com um aumento de danos oxidativos em lipídios e DNA, além de uma depleção nos antioxidantes disponíveis. Os mesmos autores concluem que uma elevada produção de espécies ativas de oxigênio nos testículos pode levar a alterações na fisiologia do tecido e/ou afetar as células espermáticas, retardando a maturação ou mesmo gerando espermatozoides alterados. Recentemente foi estabelecida uma relação inversa entre proteção antioxidante e dano oxidativo no DNA (Martins et al., 1994).

A relação entre Fe, o maior catalisador de reações produtoras de espécies ativas de oxigênio, e as funções testiculares, tem sido estudadas em pacientes com hemocromatose hereditária. Em modelos animais, a relação entre danos oxidativos e defesa antioxidante tem sido limitada à descrição das espécies celulares presentes em testículos de ratos (Bauché et al., 1994).

Martins e colaboradores (1994) demonstram que .OH pode gerar danos no DNA e que este espécie ativa pode ser gerada pela reação de Fenton:



O ferro é captado pela célula e permanece ligado à ferritina, menos de 2 % ficando livre e é este ferro livre que pode causar danos às macromoléculas celulares via reação de Fenton. Existe na célula uma infinidade de substâncias capazes de quelar ferro (citrato, ATP e ADP

entre outras), o que faz supor que bem pouco ferro estaria disponível para a reação de Fenton.

As células são ricas em oxidantes que impedem o Fe de ficar no estado (II) oxidando-o a Fe (III) antes dele participar de uma reação de Fenton. O problema da célula com o Fe (II) vem do fato de que para entrar na célula ele precisa estar nesta forma, Fe(II), sendo substrato para a reação de Fenton e gerando .OH. Os muitos redutores citoplasmáticos muitas vezes agem transformando o Fe(III) livre inócuo a Fe(II) perigoso.

Não se sabe a quantidade exata de Fe existente no núcleo das células, mas esta mesmo que pequena, parece estar associada ao DNA onde, devido às suas propriedades, leva à formação de .OH e a danos na estrutura do DNA. Ao que se sabe o núcleo possui sistemas capazes de transformar Fe(III) em Fe(II). Outros trabalhos também citados por Martins (1994) afirmam que diferenças nas composições de íons causam alterações na estrutura da cromatina.

Com base nestes conhecimentos decidimos averiguar se o tratamento prévio das células com 1,10 fenantrolina, um quelante de Fe (II), seria capaz de alterar a sensibilidade da cromatina das células de Sertoli tratadas com retinol à ação da DNase tipo I. Podemos verificar em nossos resultados (Figuras III.19 e III.20) que as células de Sertoli quando tratadas só com o quelante de Fe(II) apresentavam uma resposta semelhante à do controle e que o tratamento com retinol na presença do quelante, praticamente não alterava esta sensibilidade, o que nos indicava que a retirada do Fe (II) do sistema por quelação com a 1,10 fenantrolina, um elemento crucial para o acontecimento da reação de Fenton, de alguma maneira reduzia a sensibilidade aumentada da cromatina de células de Sertoli aos níveis normais observados nas células de Sertoli cultivadas e não tratadas com retinol. Como não havia nenhuma diferença significativa entre as células controle e as que haviam recebido apenas 1,10 fenantrolina, acreditamos que este efeito estaria relacionado com a quelação do Fe(II) pela droga. Este dado nos leva a pensar que de alguma maneira o retinol aumentou a concentração de Fe (II) dentro da célula de Sertoli e isto pode ter acontecido por um

aumento na síntese de proteínas transportadoras de Fe, pois está descrito na literatura que o tratamento simultâneo com FSH, testosterona, insulina e retinol é capaz de induzir a síntese de mRNA para proteínas transportadoras de íons em células de Sertoli (Sylvester et al., 1993) ou que de alguma maneira o tratamento com retinol causou um desequilíbrio nas espécies moleculares que seriam capazes de transformar Fe (II) em Fe (III) destas células. Existe também uma terceira hipótese que seria a que o tratamento com retinol geraria uma tal quantidade de peróxidos orgânicos que mesmo uma pequena quantidade de Fe (II) presente nestas células seria capaz de via reação de Fenton gerar radicais livres tipo .OH que gerariam danos no DNA. Embora sejam importantes os mecanismos pelos quais este processo de geração de danos esteja acontecendo, para nós, no momento, o mais importante é que havíamos estabelecido uma correlação, com suficiente embasamento na literatura, e tendo em mente o papel fisiológico da célula de Sertoli de transportadora de substâncias (entre elas íons) e de sua intensa fagocitação de restos celulares, entre a geração de radicais livres e a presença de danos na cromatina que justificava os nossos dados anteriores sobre a conformação mais relaxada da cromatina que com o tratamento com retinol, sofria danos e dava início a processos de reparo. No entanto, estes dados não nos faziam descartar a ideia de uma síntese específica de genes que deveriam ser amplificados, tanto pela indução com retinol, como também por estarem envolvidos com reparo (Li et al., 1995). Com vista a solucionar a questão resolvemos testar como se daria a incorporação de [³H] timidina tendo sido as células de Sertoli previamente tratadas com hidróxi-uréia 3 mM, um potente inibidor da síntese de DNA, mas que não impede o reparo (Lewin, 1994b). Nossos resultados (Figura III.21) mostraram que a maior incorporação de timidina ao DNA após o tratamento com retinol se deve parcialmente à síntese de DNA, aumento na incorporação de [metil ³H] timidina que desaparece com a adição de hidróxi-uréia ao meio de cultura, mas que também havia um aumento residual de incorporação de [metil ³H] timidina que deveria ser correspondente ao reparo. Com isto estávamos então com uma solução dupla para a nossa questão inicial e de uma maneira muito interessante

isto nos levava ao encontro dos resultados de Li e colaboradores (1995) que propõe em seu trabalho a existência de genes que são ativados por danos no DNA (genes provavelmente associados ao *stress* e envolvidos com os mecanismos de reparo) e também a existência de outras famílias de genes que respondem negativamente a danos no DNA, sendo o gene da *ornitina descarboxilase* um destes. Estes genes, inibidos por danos no DNA, provavelmente têm um papel importante na divisão celular, na multiplicação do DNA e no crescimento celular e portanto ficam bloqueados até que a célula esteja preparada (e também reparada) para uma nova divisão segura, que irá gerar descendência viável.

Esta referência foi importante pois, se o que nós propúnhamos como modelo para as nossas células tratadas com retinol fosse verdade deveria estar havendo uma inibição da síntese de ornitina descarboxilase durante o período de ação do retinol e o reparo da célula e este efeito deveria apresentar um retorno às atividades normais assim que a célula estivesse recuperada. Poderia até mesmo ocorrer uma indução, uma vez que pela literatura atual a atividade aumentada da ODC é um dos pré-requisitos para a divisão celular, uma vez que a presença de poliaminas é indispensável à manutenção da estrutura do DNA durante os processos de replicação e transcrição (Ruiz-Herrera et alli., 1995). Nossos resultados mostraram (Figura III.22) que a ornitina decarboxilase isolada das células tratada apresenta uma atividade menor que a isolada de células controle até o período de 24 h. A partir deste ponto a ODC das células tratadas passam a ter cada vez mais atividade chegando a ter quase o dobro desta atividade com 48 h de tratamento com retinol. Este fato confirma em grande parte nossa hipótese uma vez que este ponto corresponde também a maior sensibilidade da cromatina de células tratadas à ação da DNase tipo I. Apartir deste período de tratamento acontece como se a célula já estivesse reparada e estivesse se preparando para uma divisão, onde sua cromatina esta mais condensada, fato que também fica claro quando notamos a sensibilidade à DNase tipo I que também fica reduzida a níveis bem próximos aos das células controle. Poderíamos questionar o porquê de os níveis de atividade da ODC não serem mais baixos nos pontos onde acreditamos estar acontecendo os danos e o reparo das

células. Acredito que estes níveis não são mais baixos porque mesmo uma atividade reduzida desta enzima é necessária para a produção de poliaminas para outras funções celulares e mesmo porque a ação de enzimas tanto de reparo como de síntese de DNA, como transcrição de RNA, dependem da presença de poliaminas para estabilizar a estrutura do DNA enquanto agem. Outra questão é sobre o significado da diferença de atividade da ODC em 6 h e 24 h de tratamento. Acredito que os erros sejam grandes nestes momentos devido às condições experimentais onde as células ainda estão se adaptando às condições de cultura. Muitos outros autores apresentam dados que corroboram com nossa hipótese sobre a atividade da ODC e os danos na estrutura do DNA e um dos exemplos mais significativos é o trabalho de Gottlieb e colaboradores (1994), onde fica claro que existe uma cascata de sinais que envolve proteínas quinases (proteína quinase C) que sinaliza a presença de danos no DNA que aparentemente ativa a maquinaria de reparo do DNA, induz a tradução de genes envolvidos com reparo ou simplesmente induzidos por danos (que muitas vezes são amplificados) e reprime outros processos relacionados com replicação, como por exemplo genes necessários para a estabilidade do DNA durante a replicação e a transcrição. O gene para ODC deve ser um destes genes. Ruiz-Herrera e colaboradores (1995) propõem e demonstram que a falta de espermidina bloqueia a metilação do DNA um processo de grande importância na atividade transcricional da célula. Existe ainda o trabalho de Kusano e colaboradores com fibroblastos humanos (1994), onde fica evidente a importância das poliaminas para a restauração da síntese de DNA após danos causados por U.V.. Neste artigo, os autores demonstram que a atividade da ODC cai significativamente nas células após a exposição de U.V e que esta atividade volta ao normal após 20 horas, sendo que nas 12 horas subsequentes encontramos uma ativação desta enzima como a que vemos no nosso modelo experimental. A síntese de DNA, mas não o reparo, também fica inibida e volta ao normal depois do restabelecimento da atividade da ODC (Kusano et alli., 1994).

Em face do que foi apresentado até aqui podemos então propor uma hipótese para explicar de uma maneira correlata os resultados encontrados durante a realização de nossos

trabalho. Acreditamos que ao tratarmos as células de Sertoli com retinol, de alguma maneira aumentamos as quantidades presentes dos reagentes intracelulares capazes de realizar a reação de Fenton e isto pode ter acontecido ou por um aumento no transporte intracelular de Fe (II) causado pela indução de proteínas carreadoras de íons pelo retinol ou mesmo por uma diminuição dos compostos celulares capazes de transformar Fe (II) em Fe (III). Também é possível que o retinol cause um aumento nas quantidades de peróxidos, tanto peróxido de hidrogênio como alguns peróxidos orgânicos de origem lipídica, presentes na célula. Nossos resultados nos sugerem, portanto, que o tratamento com doses elevadas de retinol nas condições experimentais testadas causa danos na estrutura do DNA que fica mais sensível à ação de DNase tipo I, e que estes danos são dependentes, pelo menos parcialmente, da presença de Fe (II) pois este efeito desaparece quando utilizamos um quelante de Fe (II). Como consequência destes danos o DNA deve ser reparado e para que isto ocorra é necessário um maior relaxamento na estrutura do DNA, o que pode ser evidenciado por alterações nos padrões de fosforilação das histonas e HMGs, o que leva a uma alteração nas interações destas proteínas com o DNA permitindo mudanças no estado conformacional da cromatina. Este relaxamento também fica evidente pela sensibilidade da cromatina de células tratadas à ação da DNase tipo I. Durante os momentos de *stress* molecular, como o dano na estrutura do DNA, alguns genes são amplificados devido à necessidade das proteínas por eles codificadas. Acreditamos que seja por isso que evidenciamos uma maior incorporação de [³H] timidina ao DNA das células tratadas com retinol e esta incorporação era maior após 24 h de tratamento (Guma et al., 1993); esta incorporação era em grande parte inibida pela adição de hidróxi-uréia, inibidor da ribonucleotídeo redutase, por duas horas nas culturas tratadas, o que indicava ser realmente a maior parte da incorporação devida a mecanismos de síntese específica de alguns genes necessários nos momentos de reparo. O restante da incorporação, por volta de 10 %, seria então correspondente aos mecanismos de reparo do DNA danificado e este processo não é inibido pela presença de hidróxi-uréia. Em contra partida existem genes que nos momentos

de reparo devem ser inibidos, pois estão associados à estabilidade do DNA para a transcrição e a replicação e isto asseguraria que a célula não entraria em divisão enquanto não estivesse com seu material genético reparado. O gene da ODC é um destes genes e nossos resultados mostram uma inibição da sua atividade entre 6 e 24 h de tratamento e uma recuperação de atividade após as 24 h de tratamento, o que coincide com a diminuição da sensibilidade da cromatina das células tratadas, à ação da DNase tipo I.

O modelo de ação do retinol apresentado nesta discussão nos deixa com muitas dúvidas e com muitos pontos em aberto onde devemos continuar a investigar. Talvez este seja o mais interessante neste trabalho, pois quanto mais seus resultados foram convergindo em uma dada direção permitindo uma explicação, diferentes abordagens foram se abrindo, pois apesar de podermos juntá-los desta maneira, bastaria que apenas algum dos experimentos tivesse tido uma resposta ligeiramente diferente e estaríamos propondo uma explicação tão plausível quanto esta, mas quem sabe em outro sentido.

V.CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos durante a execução desta tese, do conteúdo exposto na introdução e das proposições apresentadas durante a discussão podemos concluir que:

- 1) As histonas das células de Sertoli cultivadas apresentam um padrão de fosforilação que varia com o tempo de cultura.

- 2) O tratamento com retinol 10 μM altera o padrão de fosforilação das histonas de células de Sertoli cultivadas, aumentando o nível de fosforilação das histonas. Este aumento é diferenciado para cada uma das subfamílias das histonas componentes do nucleossomo e também para a histona de ligação. O efeito observado varia com o tempo de tratamento tendo um pico com 24 horas de tratamento com retinol.

- 3) As HMGs de células de Sertoli cultivadas apresentam um padrão de fosforilação que varia com o tempo de cultura.

- 4) O tratamento com retinol 10 μM também altera o padrão de fosforilação das HMGs de células de Sertoli cultivadas, aumentando o nível de fosforilação das HMGs como um todo. Diferentemente das histonas, as HMG's apresentam uma redução do nível de fosforilação em relação ao controle com 24 horas de tratamento. Este efeito também foi dependente do tempo.

- 5) A cromatina de células de Sertoli tratadas com retinol 10 μM é mais sensível à ação da DNase tipo I e a endonucleases do que a cromatina de células de Sertoli controle cultivadas pelo mesmo tempo. As variações encontradas nas células controle se deviam provavelmente ao fato da conformação da cromatina variar com o tempo de cultura obedecendo a um relógio celular.

6) A sensibilidade aumentada da cromatina das células de Sertoli tratadas com retinol 10 μM DNase tipo I é dependente da presença de Fe (II), uma vez que o uso de um quelante para esta forma de Fe, a 1,10-fenantrolina 100 μM por 24 h, anula este aumento de sensibilidade observado anteriormente com o tratamento com retinol. Acreditamos que este resultado nos leve a associar este aumento de sensibilidade a danos causados a estrutura do DNA pela geração de radicais hidroxila via reação de Fenton no núcleo. Podemos dessa maneira associar de algum modo o tratamento com retinol a um aumento na quantidade de Fe(II) no interior da célula, quer seja por um aumento no transporte de Fe dentro da célula, ou mesmo por um aumento nos processos celulares capazes de transformar Fe(III) em Fe(II) induzido por retinol.

7) O tratamento com retinol 10 μM por 24 horas aumenta a incorporação de [metil ^3H] timidina ao DNA de células de Sertoli cultivadas. Este aumento é reduzido pelo tratamento por 2 horas com hidróxi-uréia 3 mM, um inibidor da síntese de DNA mas que não afeta o reparo.

8) Embora nossos dados não tenham mostrado significância na inibição observada na atividade da ODC nas primeiras 24 horas de tratamento com retinol, em todos os tempos testados a atividade da ODC de células tratadas sempre foi inferior da ODC das células controle. Ao contrário, a partir de 24 horas de tratamento com retinol ocorre um aumento na atividade da ODC. Acreditamos que esta possível inibição acontece devido aos danos causados pelo tratamento com retinol. Sendo assim, a inibição da ODC serve como um impedimento temporário para que a célula não se divida até que esteja reparada e em condições para produzir uma descendência saudável e viável.

9) O tratamento com retinol causa danos ao DNA das células de Sertoli, que estes danos envolvem a formação de radicais livres e que o Fe está envolvido neste processo. Durante o tempo que a célula precisa para se recuperar os genes necessários recuperação são amplificados e os genes cujos produtos são necessários para a divisão celular ou mesmo para a duplicação do DNA estão inibidos até o final dos processos de reparação.

VI. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. L. P.; KNOWLER, J. T. e LEADER, D. P. **The biochemistry of the nucleic acids**. Chapman and Hall, London, 10th edition, 1986.
- AIZAWA, S. ; NISHINO, H. ; SAITO, K. ; KIMURA, K. ; SHIRAKAWA, H. e YOSHIDA, M. Stimulation of Transcription in Culture Cells by High Mobility Group Protein 1: Essential Role of the Acidic Carboxyl-Terminal Region. **Biochemistry**, v. 33, p. 14690-14695, 1994.
- ALEXANDROVA, E. A. ; MAREKOV, L. N. e BELTCHEV, B. G. Involvement of protein HMG1 in DNA replication. **FEBS LETTERS**, v. 178, p. 153 - 156, 1984.
- ANGELOVA, A. e STAMBOLOVA, M. HMG-2 protein in rat brain cells. **Journal Biochemistry**, v. 25, p. 37-41, 1993.
- BASHOR, M. M.; TOFT, D. O. e CHYTIL, F. *In vitro* binding of retinol to rat-tissue components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 70, p. 3483-3487, 1973.
- BAUBICHON-CORTAY, H.; MALLET, L.; DENOROY, L. e ROUX, B. Histone H1a subtype present structural differences compared to other histone H1 subtypes. Evidence for a specific motif in the C-terminal domain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1122, p. 167-177, 1992.

BAUCHÉ, F.; FOUCHARD, M. e JÉGOU, B. Antioxidant system in rat testicular cells. **FEBS LETTERS**, v. 349, p. 392-396, 1994.

BENBROOK, D.; LERNHARDT, E. e PFAHL, M. A new retinoic acid receptor identified from hepatocellular carcinoma. **Nature**, v. 333, p. 699 - 672, 1988.

BERNARD, E. A. e WASSERMANN, G. F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by "in vivo" administration of follicle stimulating hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v. 44, p. 45 - 47, 1982.

BHORJEE, J. S. Differential phosphorylation of nuclear nonhistone high mobility group proteins HMG 14 and HMG 17 during the cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, p. 6944-6948, 1981.

BISHOP, P. D. e GRISWOLD, M. D. Uptake and metabolism of retinol in cultured Sertoli cells: evidence for a kinetic model. **Biochemistry**, v. 26, p. 7511-7518, 1987.

BLANER, W. S. e OLSON, J. A. Retinol and retinoic acid metabolism. In: **The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine**. Sporn, M. B. ; Roberts, A. B.; Goodman, D. S. 2nd Edition, Raven Press, New York, p. 329-356, 1994.

BONNER, J. e GARRARD, W. T. Biology of the histones. **Life Sciences**, v. 14, p. 209-221, 1974.

- BORLAND, K.; MITA, M.; OPPENHEIMER, C. L.; BLINDERMAN, L. A.; MASSAGUÉ, J. ; HALL P. F. e CHECH, M. P. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, Baltimore, MD, USA, v. 114, p. 240-246, 1984.
- BRAND, N. ; PETKOVICH, M.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; de THÉ, H.; MACHIO, A.; TIOLLAIS, P. e DEJEAN, A. Identification of a second human retinoic acid receptor. **Nature**, v. 332, p. 850 - 853, 1988.
- BROCK, W. A.; TROSTLE, P.K. e MEISTRICH, M.L. Meiotic synthesis of testis in the rat. **Proceedings of National Academy Science of the USA**, v. 77(1), p. 371-375, 1980.
- BROOKS, W. e JACKSON, V. The rapid transfer and selective association of histones H2a and H2b onto negatively coiled DNA at physiological ionic strength. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 18155-18166, 1994.
- BURTON, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of desoxiribonucleic acid. **Biochemical Journal**, v.62, p.315-323,1965.
- CHALKLEY, R. e SHIRES, A. The isolation of HTC variant cells which can replicate in butyrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, no. 12, p. 7698-7704, 1985.
- CHEN, F. e WAGNER, P. D. 14-3-3 proteins bind to histone and affect both histone phosphorylation and dephosphorylation. **FEBS LETTERS**, v. 347, p. 128-132, 1994.

- CHYTIL, F. e ONG, D. E. Cellular retinol-and retinoic acid-binding proteins. In: Draper HH, (ed.), **Advances in Nutritional Research**. N.Y., Plenum Publishing Co; p. 13-29,1988.
- CLAYTON, A. L. ; HEBBES, T. R. ; THORNE, A. W. e CRANE-ROBINSON, C. Histone acetylation and gene induction in human cells. **FEBS LETTERS**, v. 336, p. 23-26, 1993.
- DAMM, K. ; THOMPSON, C.C. e EVANS, R. M. Protein encoded by *v-erbA* functions as a thyroid-hormone-receptor antagonist. **Nature**, v. 339, p. 593-597, 1989.
- DAVIE, J. R. e MURPHY, L. C. Inhibition of transcription selectively reduces the level of ubiquitinated histone H2b in chromatin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, p. 344-350, 1994.
- DAVIES, N. e LINDSEY, G. G. Histone H2B (and H2A) ubiquitination allows normal histone octamer and core particle reconstitution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1218, p. 187-193, 1994.
- DING, H-F.; RIMSKY, S.; BASTON, S. C.; BUSTIN, M. e HANSEN, U. Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-14. **Science**, v. 265, p. 796-799, 1994.
- DORRINGTON, J. H. e FRITZ, M. R. Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -hydroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testes. **Endocrinology**,v. 46, p. 879-889, 1975.

DUESTER, G.; SHEAN, M. L.; McBRIDE, M. S. e STEWART, M. J. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implication for regulation of retinoic acid synthesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 163-164, 1991.

EMERICK, R. J.; ZILE, M. e DELUCA, H. F. Formation of retinoic acid from retinol in the rat. **Biochemistry Journal**, v. 102, p. 606-611, 1967.

EVANS, R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p. 889-895, 1988.

FAWCETT, D. W. Ultrastructure and function of Sertoli cell. **Handbook of Physiology**, Baltimore, MD, USA, v. 5 (Endocrinology), p. 21-55, 1975.

FERRARI, N. e VIDALI, G. Effects of retinol on chromatin structure. **FEBS LETTERS**, v. 151, p. 305-310, 1985.

FOREMAN, B. M.; YANG, C.; AU, M.; CASANOVA, J.; GHYSDAEL, J. e SAMUELS, H. H. A domain containing leucine-zipper-like motifs mediates novel *in vivo* interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 3, p. 1610-1626, 1989.

FRITZ, I. B. Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In: Litwack G. (ed.). **Biochemical actions of hormones**, Academic Press, New York, v. 5, p. 249- , 1978.

GARCIA-RAMIREZ, M. ; DONG, F. e AUSIO, J. Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 19587-18595, 1992.

GE, H. e ROEDER, R. G. The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 17136-17140, 1994.

GOODMAN, D. S. ; HUANG, H. S. e SHIRATORI, T. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. **Journal of Lipid Research**, v. 6, p. 390-396, 1965.

GOTTLIEB, M. T. e JACKSON, S. P. Protein kinases and DNA damage. **TIBS**, v. 19, p. 500-503, 1994.

GREEN, S. ; CHAMBON, P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. **Trends in Genetics**, v. 74, p. 309-314, 1988.

GRIMES, S. R. ; Jr.; PLATZ, R. D.; MEISTRICH, M. L e HNILICA, L. S. Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 182-189, 1975.

GRISWOLD, M. D.; BISHOP, P. D.; KIM, K.; PING, R.; SIITERI, J. E. e MORALES, C. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 564, p. 154-170, 1989.

GRUNSTEIN, M. Histones as regulators of genes. **Scientific American**, p. 40-47, outubro, 1992.

GUMA, F. C. R.; MARTINI, L. H. e BERNARD, E. A. Retinol effects in Sertoli cells: [methyl-³H]thymidine incorporation into DNA. **Medical Science Research**, v. 21, p. 9-10, 1993.

GURLEY, L. R.; WALTERS, R. A. e TOBEY, R. A. Sequential phosphorylation of histone subfractions in the chinese hamster cell cycle. **The Journal Biological Chemistry**, v. 250, p. 3936-3944, 1975.

HADLEY, M. A.; BYERS, S. W. ; SUAREZ-QUIAN, C. A. ; KLEINMAN, H. K. e DYM, M. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro*. **Journal of Cell Biology**, v. 101, p. 1511-1515, 1985.

HANSEN, J. C. e WOLFFE, A. P. A role for histones H2A / H2B in chromatin folding and transcriptional repression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 2339-2343, 1994.

HAYASHI, S-I. e MURAKAMI, Y. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. **Biochemistry Journal**, v. 306, p. 1-10, 1995.

HENDZEL, M. J. e DAVIE, J. R. Acetylation and methylation of histones H3 and H4 in chicken immature erythrocytes are not directly coupled. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 185, no. 1, p. 414-419, 1992.

ITZHAKI, R. F. e COOPER, H. K. Similarity of chromatin from different tissues. **Journal of Molecular Biology**, v. 75, p. 119-128, 1973.

JACKSON, V. ; SHIRES, A.; CHALKLEY, R. e GRANNER, D. K. Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4856-4863, 1975.

JAMES, G. T. ; YEOMAN, L. C.; MATSUI, S.; GOLDBERG, A. H. e BUSH, H. Isolation and characterization of nonhistone chromosomal protein C-14 which stimulates RNA synthesis. **Biochemistry**, v. 16, p. 2384-2389, 1977.

KAIPIA, A.; TOPPARI, J.; MALI, P.; KANGASNIEMI, M.; ALCIVAR, A. A.; HECHT, N. B. e PARVINEN, M. Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 73, p. 45-52, 1990.

KANAI, M. ; RAZ, A. e GOODMAN, D. S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 2025-2044, 1968.

KANDA, Y. ; GOODMAN, D. S.; CANFIELD, R. E. e MORGAN, F. J. **Biological Chemistry**, v. 249, p. 6796-6805, 1974.

KARN, J. ; JOHNSON, E. M. ; VIDALI, G. e ALLFRY, V. G. Differential phosphorylation and turnover of nuclear acidic proteins during the cell cycle of synchronized HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 667-677, 1974.

KATO, M.; SUNG, W. K.; KATO, K. e GOODMAN, D. S. Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinol-binding protein in rats testis and epididymis. **Biological Reproduction**, v. 32, p. 173-189, 1985.

KIM, K. H. e GRISWOLD, M. D. The regulation of retinoic acid receptor mRNA levels during spermatogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 4, p. 1679-1688, 1990.

KIM, K. H. e WAUNG, Z. Action of vit A on the testis: Roli of The Sertoli cell. In: **The Sertoli cell**. Russel, L.D.; Giowold, M.. Cache river Press, St Louis, M.O., p.317-335, 1993.

KITAMOTO, T.; MOMOI, M. e MOMOI, T. Expression of cellular retinoic acid binding protein II (chick-CRABP II) in the chick embryo. **Biochemical and Biphysical Research Communications**, v.164, p. 531-536, 1989.

KOHLSTAEDT, L. A. e COLE, R. D. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. **Biochemistry**, v. 33, p. 570-575, 1994.

KOHLSTAEDT, L. A. e COLE, R. D. Effect of pH on interactions between DNA and high-mobility group protein. **Biochemistry**, v. 33, p. 12702-12707, 1994.

KOWAL, R. C. ; HERZ, J. ; GOLDSTEIN, J. L.; ESSER, V. e BROWN, M. S. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 5810-5814, 1989.

KUEHL, L. Synthesis of high mobility group proteins in regenerating rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 7276-7281, 1979.

KUSANO, I.; HIBA SAMI, H.; KAWAI, K.; ESAKI, K. e SHIRAISHI, T. Essential role of polyamines in restoration of DNA synthesis after UV radiation and expression of UV resistance in cockayne syndrome cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 205, no. 2, p. 1018-1024, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LEE, D. Y.; HAVEYS, J. J.; PRUSS, D. e WOLFFE, A. P. A positive role for histone acetylation in transcriptions factor acess to nucleosomal DNA. **Cell**, v. 72, p. 73-84, 1993.

LEHMING, N.; THANOS, D.; BRICKMAN, J. M.; MA, J.; MANIATS, T. e PTASHNE, M. An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. **Nature**, v. 371, p. 175-179, 1994.

LEID, M. ; KASTNER, P. ; e CHAMBON, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. **TIBS**, v. 17, p. 427-433, 1992.

LEVY W, B.; WONG, N. C. W. e DIXON, G. H. Selective association of the trout-specific H6 protein with chromatin regions susceptible to DNase I and DNase II: possible location of HMG-T in the space region between core nucleosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, no. 7, p. 2810-2814, 1977.

LEWIN, B. Cell cycle and growth regulation. In **Genes V**, Lewin, B. ed. Oxford University press, Oxford, p. 349-369, 1994a.

LEWIN, B. Chromosomes consist of nucleosomes. In **Genes V**, Lewin, B. ed. Oxford University press, Oxford, p. 797-839, 1994b.

LEWIN, B. Chromatin and gene expression: constant questions, but changing answers. **Cell**, v. 79, p. 397-406, 1994c.

LI, L.; YOO, H.; BECKER, F.F.; ALI-OSMAN, F. e CHAN, J. Y. H. Identification of a brain-and reproductive-organs-specific gene responsive DNA damage and retinoic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206 (2), p. 764-774, 1995.

LINCOLN, G. A. Pituitary control of the testis. **British Medical Bulletin**, v. 35, p. 167-172, 1979

LÓPEZ-RODAS, G.; BROSCHE, G.; GEORGIEVA, E. I.; SENDRA, R.; FRANCO, L. e LOIDL, P. Histone deacetylase - A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. **FEBS LETTERS**, v. 317, no. 3, p. 175-180, 1993.

LOTAN, R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 605, p. 33-91, 1980.

LOUIE, A. J. e DIXON, G. H. Trout testis cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, no. 17, p. 5498-5505, 1972.

- LUCESOLI e FRAGA, C. G. Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, no. 1, p. 567-571, 1995.
- MANGELSDORF, D. J. ; ONG, E. S.; DYCH, J. A. e EVANS, R. M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. **Nature**, v. 345, p. 224-229, 1990.
- MANGELSDORF, D. J.; UMESOMO, K. e EVANS, R.M. The retinol receptors. In: **The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine**. Sporn, M. B. ; Roberts, A. B.; Goodman, D. S. 2nd Edition, Raven Press, New York, p. 319-350, 1994.
- MAO, Y.; GURR, J. A. e HICKOK, N. J. Retinoic acid regulates ornithine decarboxylase gene expression at the transcriptional level. **Biochemistry Journal**, v. 295, p. 641-644, 1993.
- MARTINS, E. A. L. e MINEGHINI, R. Cellular DNA damage by hydrogen peroxide is attenuated by hypotonicity. **Biochemistry Journal**, v. 299, p. 137-140, 1994.
- MARVIN, K. W.; YAU, P. e BRADBURY, E. M. Isolation and characterization of acetylated histones H3 and H4 and their assembly into nucleosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, no. 32, p. 19839-19847, 1990.
- McCUE, P. A.; MATTHAEI, K.I.; TAKEDO, M. e SHERMAN, M. I. Differentiation-detective mutants of mouse embryonal carcinoma cells response to hexamethylenebisacetamide and retinoic acid. **Developmental Biology**, v. 96, p. 416-426, 1983.

- MEANS, A. R. ; FAKUNDING, J. L.; HUCKINS, C.; TINDALL, D.L. e VITALE, R.
FSH, The Sertoli cell, and Spermatogenesis em **Recent Progress in Hormone Research**, Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA, v. 32, p. 477-527, 1976.
- MEISTRICH, M. L.; BROCK, W. A.; GRIMES, S. R.; PLATZ, R. D. e HNILICA, L. S.
Nuclear protein transitions during spermatogenesis. **Federation Proceedings**, v. 37, p. 2522-2525, 1978.
- MITRAMOND, V.; SOBHON, P.; TOSUKHOWONG, P. E CHINDADUANGRAT, W.
Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. **Acta Anatomica**, v. 103, p. 159-168, 1979.
- MOREIRA, J. C. F.; JUNQUEIRA, L. A. V.; von EDNT, D. e BERNARD, E. A. The effect of retinol pre-incubation on the phosphorylation of histones and HMGs from cultured Sertoli cells of rats. **Medical Science Research**, v. 22, p. 783-784, 1994.
- MORERA, A. M.; CHAUVIN, M. A.; FEIGE, J. J.; GUILLAUMOT, P.; KERAMIDAS, M. ; MAUDUIT, C. : SORDOILLET, C e BENAHMED, M. Interactions between systemic hormones and local growth factors in the control of the testis function: the example of gonadotropins and transforming growth factor β . In **Hormon Communicating Events in the Testis**. Isidori, A.; Fabri, A. e Dufau, M. L. (Eds.). Serono Symposia Publications from Raven Press, v. 70, p. 191-201, 1990.
- NAGY, F. Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridg, United Kingdom, v. 28, p. 389-395, 1972.

- NAPOLI, J. e McCORMICK, A. M. Tissue dependence of retinoic acid metabolism *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 666, p. 165-175, 1981.
- NEWCOMER, M.E.; JONES, T.A.; AQIST, I; SUNDELIN, J.; ERICKSSON, U.;RASK, L.; PETERSON, P.A. The three-dimensional structure of retinol-Binding protein **European Molecular Biology Oorganization Journal**, v. 3, p. 1451-1454, 1984.
- NORTON, V. G.; MARVIN, K. W.; YAU, P. e BRADBURY, E. M. Nucleosome linking Number change controlled by acetylation of histones H3 and H4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 19848-19852, 1990.
- O'MALLEY, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. **Molecular Endocrinology**, v. 4, p. 363-369, 1990.
- OONK, R. B. e GROOTEGOED, J. A. Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v. 49, p. 51-62, 1987.
- OONK, R. B. e GROOTEGOED, J. A. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v. 55, p. 33-43, 1988.
- ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiografic study. **Anatomical Records**, New York, NY, USA, v. 203, p. 485-492, 1982.

- PANYIM, S. e CHALKLEY, R. High resolution acrilamide gel electrophoresis of histones. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 130, p. 337-346, 1969.
- PARES, X. e JULIA, P. Isoenzymes of alcohol dehydrogenase in retinoid metabolism. In: Packer L, (ed.), **Methods in Enzymology**, San Diego: Academic Press, p. 436-441, 1990.
- PIL, P. M.; CHOW, C. S. e LIPPARD, S. J. High-mobility-group 1 protein mediates DNA bending as determined by ring closures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 9465-9469, 1993.
- PORTER, S. B. ; FRAKER, L. D. ; CHYTIL, F. e ONG, D. E. Localization of cellular retinol-binding protein in several rat tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 80, p. 6586-6590, 1983.
- POSCH, K. C. ; ENRIGHT, W. J. e L., N.J. Retinoid acid synthesis by cytosol from the alcohol dehydrogenase negative deer mouse. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 274, p. 171-178, 1989.
- PRUSS, D. ; HAYES, J. J. e WOLFFE, A. P. Nucleosomal anatomy - Where are the histones. **BioEssays**, v. 17, no. 2, p. 161-171, 1995.
- RASMUSSEN, C. e GAREN, C. Activation of calmodulin-dependent enzymes can be selectively inhibited by histone H1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 23788-23791, 1993.

ROTH, S.Y. e ALLIS, C. D. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? **TIBS**, v. 17, p. 93-98, 1992.

RUIZ-HERRERA, J. ; RUIZ-MEDRANO, R. e DOMÍNGUEZ, A. Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines. **FEBS LETTERS**, v. 357, p. 192-196, 1995.

RUSSEL, L. D. Observations on rat Sertoli ectoplasmic ("junctional") specializations in their association with germ cells of rat testis. **Tissue & Cell**, v. 9, p. 475- , 1977a.

RUSSEL, L. D. e PETERSON, R. N. Sertoli cells junctions: morphological and functional correlates. **International Review of Cytology**, San Diego, CA, USA, v. 94, p. 177-211, 1985.

SCALABRINO, G. ; LORENZINI, E. C. e FERIOLI, M. E. Polyamines and mammalian hormones. Part I: Biosynthesis, interconversion and hormone effects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 77, p. 1-35, 1991.

SCALABRINO, G. ; LORENZINI, E. C. Polyamines and mammalian hormones. Part II: Paracrine signals and intracellular regulators. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 77, p. 37-56, 1991.

SCHINDLER, J. ; MATTHAEI, K. I. e SHERMAN, M. I. Isolation and characterization of mouse mutant embryonal carcinoma cells which fail to differentiate in response to retinoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, p. 1077-1080, 1981.

SERTOLI, E. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. **Il Morgagni**, Roma, Italy, v. 7, p. 31-39, 1865.

SEYEDIN, S. M.; PEHRSON, J. R. e COLE, R. D. Loss of chromosomal high mobility group proteins HMG1 and HMG2 when mouse neuroblastoma and friend erythroleukemia cells become committed to differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, p. 5988-5992, 1981.

SHEFLIN, L. G. ; FUCILE, N. W. e SPAULDING, S. W. The specific interactions of HMG1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic c-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG1 / 2 boxes. **Biochemistry**, v. 32, p. 3228-3248, 1993.

SHERMAN, M. I.; MATTHAEI, K. I. e SCHINDLER, J. Studies on the mechanism of induction of embryonal carcinoma cell differentiation by retinoic acid. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 359, p. 192-199, 1981.

SHIBATA, K. e AJIRO, K. Cell cycle-dependent suppressive effect of histone H1 on mitosis-specific H3 phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 18431-18434, 1993.

SHINGLETON, J. L. ; SKINNER, M. K. e ONG, D. E. Retinol esterification in Sertoli cells by lecithin-retinol acyltransferase. **Biochemistry**, v. 28, p. 9647-9653, 1989.

SHUBHADA, S.; LIN, S-N.; QIAN, Z-Y.; STEINBERGER, A. e TSAI, Y-H. Polyamine profiles in rat testis, Germ cells and Sertoli cells during testicular maturation. **Journal of Andrology**, v. 10, no. 2, p. 145-151, 1989.

SHUBHADA, S. e TSAI, Y-H. Differential effects of FSH on the activities of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and ornithine decarboxylase in rat Sertoli cells. **Journal of Andrology**, v. 11, no. 5, p. 414-421, 1990.

SIEGENTHALER, G. ; SAURAT, J-H. e PONEC, M. Retinol and retinal metabolism. **Biochemistry**, v. 268, p. 371-378, 1990.

SKINNER, M. K. e FRITZ, I. B. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 82, p. 114-118, 1985.

SKINNER, M. K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 45-77, 1991.

SMITH, F. F.; TRES, L. L. e KIERSZENBAUM, A. L. Ornithine decarboxylase activity during rat spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: selective effect of hormones and growth factors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 133, p. 305-312, 1987.

SMITH, W. C. ; NAKSAHTRI, H. ; LEROY, P.; REES, J. e CHAMBON, P. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 10, p. 2223-2230, 1991.

SNEDECOR, G. W. e COCHRAN, W. G. **Statistical methods**, 6th. ed., The Iowa State University Press, Iowa, USA, 1978.

SOBHON, P.; MITRAMOND, V.; TOSUKHOWONG, P. e CHINDADAUNGRAT, W.
Cytological changes in testis of vitamin A deficient rats. **Acta Anatomica**, v.103, p.
169-183, 1979.

SPIKER, S. A Modification of the acetic acid-urea system for use in microslab
polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 108, p. 263-265,
1980.

STEIN, G. S. ; SPELSBERG, T. C. e KLEINSMITH, L. J. Nonhistone chromosomal
protein and gene regulation. **Science**, v. 183, p. 817-824, 1974.

STEINBERGER, A. e STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in
maturing rat testis *in vivo* and in organ culture. **Biology of Reproduction**,
v. 4, p. 84-87, 1971.

STEINBERGER, A. ; DIGHE, R. R. e DIAZ, J. Testicular peptides and their endocrine
and paracrine functions. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**,
Santiago, Chile. v. 17, p. 267-271, 1984.

STROS, M.; NISHIKAWA, S e DIXON, G. H cDNA sequence and structure of a gene
encoding trout testis high-mobility-group-1 protein. **FEBS LETTERS**, v. 225, p.
581-591, 1994.

SWIFT, T. A. e DIAS, J. A. Testosterone suppression of ornithine decarboxylase activity
in rat Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 123, no. 2, p. 687-693, 1988.

SYLVESTER, R. S. Secretions of transport and Binding Proteins. in **The Sertoli Cell**. Russel, L. e Guswold, M. ed. Cache River Press, St Louis, M. O., p. 201- 216, 1993.

TAKADA, S.; NAKAGAWA, A.; YAMADA, K.; ENDO, I. e YAMAMURA, M. Role of nuclear histone-H1 kinase in regeneration of rat liver. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 34, p. 935-941, 1994.

TARKKA, T. ; YLI-MÄYRY, N. MANNERMAA, R-M. ; MAJAMAA, K. e OIKARINEN, J. Nucleotide recognition by histone H1 involves specific protein structures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 310, no. 2, p. 291-299, 1994.

THOMPSON, J. N.; HOWELL, J. McC. e PITT, G. A. Vitamin A and reproduction in rats. **Proceeding of the Royal Society of London series B-Biological Science**, v. 159, p. 510-535, 1964.

TORA, L. ; WHITE, J. ; BROU, C. ; TASSET, D. ; WEBSTER, N.; SCHEER, E. e CHAMBON, P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. **Cell**, v. 59, p. 477-487, 1989.

TUNG, P. S. e FRITZ, I. B. Interactions of Sertoli cells with myoid cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 207-217, 1980.

TREISCHMANN, L. ; ALFONSO, P. J.; CRIPPA, M. P.; WOLFFE, A. P. e BURSTIN, M. Incorporation of chromosomal proteins HMG 14 / 17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active

- transcription complexes. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 14, no. 17, p. 1478-1485, 1995.
- TREMETHICK, D. J. e DREW, H. R. High mobility group proteins 14 and 17 can space nucleosomes *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 11389-11393, 1993.
- TREMETHICK, D. J. High mobility group proteins 14 and 17 can space nucleosomal particles deficient in Histones H2A and H2B creating a template that is transcriptionally active. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 28436-28442, 1994.
- TROSTLE-WEIGE, P. K. ; MEISTRICH, M. L.; BROCK, W. A.; NISHIOKA, K. e BREMER, J. W. Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 5560-5567, 1982.
- TUNG, P. S. ; SKINNER, M. K. e FRITZ, I. B. Fibronectin synthesis is a marker of peritubular cell contaminants in Sertoli cell-enriched cultures. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 199-211, 1984.
- TURNER, B. M. Histone acetylation and control of gene expression. **Journal of Cell Science**, v. 99, p. 13-20, 1991.
- VARGA-WEISZ, P.; van HOLDE, K. e ZLATANOVA, J. Competition between linker histones and HMG1 for binding to four-way junction DNA: implication for transcription. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, p. 1904-1911, 1994.

- VITALE, R. ; FAWCETT, D. W. e DYM, M. The normal development of the blood-testis barrier and the effects off clomiphene and estrogen treatment. **The Anatomical Record**, v. 176, p. 33-344, 1973.
- WATSON, J. D.; HOPKINS, N. H.; ROBERTS, J. W.; STEITZ, J. A. e WEINER, A. M. **Molecular Biology of the Gene**, 4th ed., The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 1987.
- WEINTRAUB, H. ; PALTER, K. e VAN LENTE, F. Histones H2a, H2b, H3, and H4 form a tetrameric complex in solutions of high salt. **Cell**, v. 6, p. 85-110, 1975.
- WEINTRAUB, H. e GROUDINE, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. **Science**, v. 193, p. 848-858, 1976.
- WEISBROD, S. e WEINTRAUB, H. Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 630-634, 1979.
- WEISBROD, S.; GROUDINE, M. e WEINTRAUB, H. Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. **Cell**, v. 19, p.289-301, 1980.
- WISNIEWSKI, J. R. ; SCHULZE, E. e SAPETTO, B. DNA binding and nuclear translocation of insect high-mobility-group protein-1 (HMG1) proteins are inhibited by phosphorylation. **FEBS LETTERS**, v. 225, p. 687-693, 1994.

WOLFFE, A. P. Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. **TIBS**, v. 19, p. 240-244, 1994.

YU, V. C. ; DELSERT, C. ; ANDERSEN, B. ; HOLLOWAY, J. M. DEVARY, OV. ; NÄÄR, A. M. ; KIM, S. Y. ; BOUTIN, J-M. ; GLASS, C. K. e ROSENFELD, M. G. RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptor to their cognate response elements. **Cell**, v. 67, p. 1251-1266, 1991.

ZHANG, X. ; HOFFMANN, B. ; TRAN, P. B-V. ; GRAUPER, G. e PFAHL, M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. **Nature**, v. 355, p. 441-446, 1992.

ZLATANOVA, J. e DOENECKE, D. Histone H1⁰: a major player in cell differentiation? **The FASEB Journal**, v. 8, p. 1260-1268, 1994.