Modulação da estrutura do núcleo e seus compartimentos pela ACTH na célula produtora de esteróides.

Delminda Gamelas Neves Lopes de Magalhães

PORTO - 2001

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Artigo 48 º, § 3º

"A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação"
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto,
decreto-Lei n.º 19 337 de 29 de Janeiro de 1931)

Corpo Catedrático da Faculdade de Medicina

Professores Efectivos

Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura
Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira
Doutor Eduardo Jorge da Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Henrique Dias Pinto Barros
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques e Magalhães
Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira
Doutora Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo

Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Víctor Manuel Oliveira Nogueira Faria

Professores Jubilados ou Aposentados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Fernando Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco Sousa Lé
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutor João Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim Oliveira Costa Maia
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto Barros
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Ao Senhor Professor Doutor Manuel Miranda Magalhães

À Senhora Professora Doutora Maria da Conceição Magalhães

Aos meus pais

Ao Alexandre e às nossas filhas Teresa e Leonor

Prefácio

A ideia deste trabalho surgiu aquando do meu ingresso, em 1990, no Instituto de Histologia e Embriologia como Assistente estagiária. Fui integrada num grupo de trabalho orientado pelo Professor Doutor Manuel Magalhães que estudava os processos metabólicos da esteroidogénese na glândula supra-renal do rato, e tornava-se pertinente aprofundar o estudo sobre a intervenção do núcleo celular neste complexo processo, já que a literatura pré-existente, além de escassa, revelava ideias pouco claras e até contraditórias.

Neste trabalho propus-me estudar a modulação exercida pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH) no núcleo da sua célula alvo, a célula esteroidogénica da zona fasciculada do córtex da glândula supra-renal.

Todo o trabalho experimental decorreu no Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Director-Professor Doutor António Coimbra), tendo sido desenvolvido em várias fases. São muitas as pessoas que ao longo do meu trabalho de preparação da Tese me ajudaram e a quem devo o meu agradecimento pois sem elas não teria atingido os meus objectivos.

Em primeiro lugar desejo expressar o meu reconhecimento ao meu orientador de doutoramento Professor Doutor Manuel Magalhães, actual Director do Instituto de Histologia e Embriologia, pela forma cuidada como me orientou e pelo exemplo de bom docente, investigador e director que sempre nos deu.

À Sra. Professora Doutora Maria da Conceição Magalhães gostaria de expressar a minha gratidão pela forma como participou na orientação do

trabalho e na preparação dos artigos científicos, e por todo o apoio que me deu durante a realização da Tese.

Gostaria de manifestar o meu agradecimento ao Professor Doutor Henrique de Almeida e ao Dr. Pedro Vendeira pela boa camaradagem e espírito de entreajuda que sempre mostraram. Ao Professor Doutor António Coimbra, manifesto o meu apreço pelo interesse que lhe mereceu o meu trabalho. A muitas outras pessoas agradeço o apoio que me deram no decorrer do trabalho experimental, tal como aos Drs. Marta Maia, Susana Sousa, Pedro Pinto, Nilza Ribeiro, Ana Isabel Sousa, Sónia Fraga, António Avelino Silva, João Magalhães e aos Professores Doutores Duarte Pignatelli, Armando Almeida, Isaura Tavares, José Castro Lopes, Deolinda Lima e Francisco Cruz.

À Sra. Professora Doutora Maria do Carmo Fonseca do Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, agradeço a disponibilidade com que sempre me ouviu e aconselhou em relação a situações experimentais relativas ao meu trabalho. Agradeço-lhe também os anticorpos anti-coilina e anti-fibrilharina que me permitiram fazer a imunolocalização destas proteínas.

Ao Professor Georg Krohne da Universidade de Wurzburg - Alemanha agradeço os anticorpos anti-lâminas A e C, e anti-lâmina B, que gentilmente me enviou. Ao Professor José Saez da Unidade de Endocrinologia Molecular do Hôpital Debrousse em Lyon - França agradeço a gentileza de me receber num estágio que me foi muito proveitoso em termos de aprendizagem de técnicas. Ao Professor Michael

Iadarola do National Institute of Health em Bathesda - USA agradeço a oferta do anticorpo anti - proteína Fos que usei em "Western blotting".

Aos técnicos e funcionários do Instituto agradeço a boa vontade e a forma como contribuiram para a execução deste trabalho pois sem essa ajuda seria muito difícil realizá-lo! Agradeço às Sra. D. Ana Maria Faustino e Sra. D. Maria Alice Neves Silva o apoio na preparação iconográfica deste trabalho. Às Sra. D. Alice Guimarães, Sra. D. Maria Amélia Ferreira e Sra. D. Elisa Nova a ajuda técnica no laboratório. À Sra. D. Maria de Fátima Cunha, ao Sr. Fernando Rodrigues e ao Sr. Fernando Pinto a ajuda na manipulação e tratamento dos animais. À Sra. D. Maria Teresa Laranjeira um agradecimento especial por todo o apoio que me deu libertando-me dos assuntos burocráticos. A todos os outros funcionários do Instituto dirijo o meu agradecimento.

À Fundação Calouste Gulbenkian, à Reitoria da Universidade do Porto, à Direcção da Faculdade de Medicina, à Reagente 5, e à Baptista Marques agradeço os apoios financeiros que contribuiram para a minha formação através da participação em cursos ou reuniões científicas.

Estou muito grata à minha família e em especial aos meus pais, pelo apoio que me deram, particularmente na fase final do trabalho. Ao meu marido transmito o meu reconhecimento mais especial pelo incentivo e ajuda ao longo do tempo, e, às nossas filhas por transformarem a casa num local divertido, onde se pensa noutras coisas...

Índice

página

Abreviaturas

Introdução **1**

Núcleo celular 3
Matriz nuclear 6
Compartimentos morfológica e funcionalmente distintos associados à matriz nuclear 20
Célula esteroidogénica 42

Objectivos do trabalho **48**

Materiais e métodos **51**

Reagentes 53
Animais 53
Métodos de isolamento de células e organelos 54
Bioquímica 60
Imunocitoquímica 63
Métodos de análise molecular de proteínas 65
Métodos de identificação de ácidos nucleicos 69
Microscopia 71

Resultados **75**

Análise dos resultados relativos aos animais de experiência 77
Isolamento de núcleos e matrizes nucleares 81

Estudos moleculares - Análise de proteínas 88
Imunocitoquímica 93
Hibridização *in situ* 96
Detecção de incorporação da Bromo-uridina 97

Imagens e legendas **99**

Discussão **115**

Estimulação dos animais de experiência com ACTH 118
Aspectos morfológicos das glândulas supra-renais - núcleos e matrizes 120
Estudos bioquímicos 123
Estudo das proteínas características de compartimentos do núcleo 124
Estudo de locais de síntese de RNA 129

Resumo e conclusões **133**

Summary and conclusions **145**

Bibliografia **155**

Abreviaturas

ACTH - hormona adrenocorticotrófica
AMPc - adenosina monofosfatada cíclica
AP-1 - proteina activadora - 1 (*activating protein* - 1)
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
CISP - proteína secretada por indução da corticotrofina
CK 2 - caseína cínase 2
CPSF - factor de especificidade de clivagem e poli-adenilação
CRE - elemento de resposta ao cAMP (*cAMP response element*)
CstF- factor de estimulação da clivagem
CYP - citocromo P- 450
DNA - ácido desoxirribonucleico
DNAr - ácido desoxirribonucleico que contém os genes ribossómicos
DNase I - desoxirribonuclease I
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA - ácido etilenoglicoltetraacético
EAST - limiar sensorial estimulado no adulto (*enhanced adult sensory threshold*)
Gems - *gemini* dos corpos espiralados ou de Cajal
HeLa - linha celular derivada de células de carcinoma uterino de uma paciente de nome Henrietta Lacks
hnRNA - RNA heterogéneo nuclear
HPLC - cromatografia líquida de alta pressão
MAR - região de ligação à matriz nuclear (*matrix associated region*)
MM - massa molecular
MRS - sequência de reconhecimento das MAR/SAR
NDP-55 - proteína do *dot* (ponto) nuclear com 55 kDa
NOR - região do organizador nucleolar
OPT - associação de Oct-1, PTF e transcrição
PCNA - antigénio nuclear de células em proliferação (*proliferating cell nuclear antigen*)
PIKA - associação polimórfica de cariossomas na interfase (*Polymorphic interphase karyosomal association*)
PMA - 13-acetil-12-miristoilforbol

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Poli-A - poli-adenina
PSE - elemento da sequência proximal (*proximal element sequence*)
PTF - factor de transcrição que se liga ao PSE
RNA - ácido ribonucleico
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
RNAr - ácido ribonucleico ribossómico
RNase - ribonuclease
SAR -região de ligação ao nucleosqueleto (*scaffold associated region*)
SDS-PAGE - electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SIP-1 - proteína de interacção com a SMN
SMN - proteína de sobrevivência dos motoneurónios (*survival of motor neurons*)
snRNA - pequenos RNAs nucleares
snRNP - complexos nucleares de pequenos RNAs com proteínas
snurps - pequenos RNAs nucleares ricos em uracilo
StAR - proteína de regulação aguda de esteroidogénese
TBP - proteína de ligação à TATA *box*
TEMED - N,N,N′,N′- tetrametiletilenodiamina
WGA - aglutinina do gérmen de trigo

Introdução

Núcleo celular

Em 1831, o botânico escocês Robert Brown observou pela primeira vez o núcleo celular em células vegetais, mas só no final do século XIX, em 1871, se procedeu ao seu isolamento. Foi Friedrich Miescher, (Miesher, 1871) que a partir de leucócitos presentes em ligaduras de feridas infectadas, isolou os núcleos destas células, fazendo a sua digestão com extractos de estômago de porco, e extracção com éter. A agressividade do método não destruiu os núcleos, que hoje se sabe serem de uma resistência mecânica e osmótica muito elevadas (Blobel e Potter, 1966, Pederson, 1974). No mesmo ano, o trabalho foi reproduzido pelo director do laboratório onde trabalhava F. Miescher (Hoppe-Seyler, 1871), tendo os trabalhos referidos, sido publicados, em simultâneo, na revista de que Hoppe-Seyler era editor - *Hoppe-Seyler's Medizinisch Chemische Untersuchunf* (dados históricos descritos *in* Portugal e Cohen, 1972).

Nos núcleos de células em interfase coradas com corantes básicos observam-se duas regiões distintas – a cromatina (condensada à periferia e em pequenos grânulos no interior) e o nucléolo - separadas pelo espaço intercromatínico corado de uma forma menos intensa. Este apresenta um aspecto transparente pelo que se assemelha a um gel translúcido que se designou inicialmente por nucleoplasma ou cariolinfa.

A observação do núcleo por microscopia electrónica veio apoiar a visão simplista da estrutura nuclear, pois os compartimentos evidentes eram o nucléolo, o nucleoplasma e a cromatina, sendo esta classificada, conforme

o grau de compactação, em eucromatina (descondensada) e heterocromatina (condensada). À periferia do núcleo observam-se as duas membranas do invólucro nuclear e a heterocromatina perinuclear, ocorrendo interrupções que correspondem à localização dos complexos de poro nuclear. No núcleo em interfase encontram-se ainda, pequenos grânulos rodeados por um halo claro - grânulos pericromatínicos, localizados à periferia da heterocromatina. No nucleoplasma observam-se granulações de variável densidade aos electrões constituídas por eucromatina e moléculas nucleares solúveis.

A técnica desenvolvida por Bernhard em 1969 – coloração regressiva por EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), embora mal definida quimicamente, veio demonstrar estruturas de pequenas dimensões que nas preparações de rotina para microscopia electrónica ficam sobrepostas à cromatina. A técnica de coloração regressiva, evidenciando selectivamente ribonucleoproteínas, demonstrou no interior do núcleo em interfase, a presença de uma vasta rede de fibrilas e grânulos que formam compartimentos distintos e que ocupam todo o núcleo, exceptuando-se as regiões de heterocromatina.

Foram as primeiras imagens de microscopia electrónica a sugerir a presença de um esqueleto ribonucleoproteico no núcleo. Sabendo-se que no núcleo ocorrem processos tão complexos como a replicação, a transcrição dos ácidos nucleicos, a organização da cromatina e a sua divisão equitativa, tornou-se cada vez mais verosímil a existência de um nucleosqueleto,

estrutura que, à semelhança do citosqueleto citoplasmático, seria responsável pela organização e manutenção da forma do organelo.

Recentemente, numerosos trabalhos têm procurado elucidar as características moleculares e a regulação de genes específicos; no entanto, nem a forma nem a organização do genoma no núcleo estão completamente esclarecidas (Berezney, 1991).

O estudo da estrutura nuclear e a sua organização topológica tem sido abordado de duas formas distintas mas relacionadas (Clemson e Lawrence, 1996):

a) estudo da compartimentação espacial, pesquisando locais discretos onde ocorre acumulação de macromoléculas ou sequências de ácidos nucleicos.

b) estudo da associação à matriz nuclear dessas macromoléculas ou sequências.

Os resultados obtidos por vários autores sugerem que o núcleo celular se encontra compartimentado, havendo acumulação de moléculas específicas e sendo a matriz nuclear o suporte físico desta compartimentação (Clemson e Lawrence, 1996, Strouboulis e Wolffe, 1996).

Matriz nuclear

Métodos de isolamento da matriz nuclear

Desde 1942 que diversos cientistas (Mayer e Gulick, 1942, Zbarskii e Debov, 1948, Braun e Ernst, 1960, Georgiev e Chentsov, 1962, Zbarsky et al., 1962, Smetana et al., 1963) estudaram as proteínas nucleares; todavia as estruturas proteicas observadas e isoladas não foram consideradas como um esqueleto nuclear (Braun e Ernst, 1960, Zbarsky et al., 1962, Smetana et al., 1963). As primeiras tentativas de isolamento do nucleosqueleto, surgiram na década de 70 (Berezney e Coffey, 1974), tendo sido Berezney e Coffey os pioneiros na realização desta técnica. Isolaram o nucleosqueleto residual dos hepatócitos designando-o por matriz nuclear. Os processos de isolamento da matriz nuclear, que levaram à sua definição como estrutura biológica, consistem em extracções sucessivas de núcleos isolados, com: enzimas (desoxirribonucleases e ribonucleases), detergentes, tampões de alta e baixa força iónica. A matriz nuclear é definida como a estrutura residual do núcleo celular que se obtém após o processo de extracção. A partir de então, diversos investigadores (Berezney et al., 1979, Kaufmann et al.,1981, Peters et al., 1982, Stuurman et al., 1990, Belgrader et al., 1991a, Beven et al., 1991, Eberharter et al.,1993, Khanuja et al., 1993) estudaram as matrizes nucleares de diferentes células - organismos unicelulares, células diferenciadas eucarióticas normais e patológicas - tendo sido efectuado o estudo morfológico e bioquímico dos nucleosqueletos obtidos.

A matriz nuclear mantém a forma e tamanho do núcleo e é constituída por lâmina nuclear fibrosa, com complexos de poro nuclear associados, nucléolo residual e uma rede de filamentos, designados por matriz interna, que se estendem do nucléolo residual à periferia nuclear (Berezney, 1991). Se for utilizada a enzima RNAse a estrutura interna do nucléolo e a rede fibrilogranular desaparecem, ficando somente resíduos do invólucro, o que demonstra a natureza ribonucleoproteica da rede de filamentos da matriz nuclear. De facto, as matrizes nucleares isoladas na presença de RNAse, são compostas em média por 98 % de proteínas, 0.1 %DNA, 1.2 % RNA e 1.1 % lípidos (Berezney e Coffey, 1974, Berezney e Coffey, 1977). A não utilização de RNase permite preservar a matriz interna, originando estruturas com 77.3 % de proteínas, 1.5 % de DNA, 20.5 % de RNA e 0.7 % de lípidos (Berezney et al., 1979).

A existência da matriz nuclear na célula viva foi posta em causa devido às variações morfológicas encontradas em consequência do método de extracção utilizado. De facto, a matriz nuclear mostrava uma rede mais densa de filamentos quando estabilizada com moléculas oxidantes que induzem formação de ligações dissulfureto (Kaufmann et al., 1981, Kaufmann e Shaper, 1991a, Kaufmann et al., 1991b), ou com temperaturas na ordem dos 37ºC (Martelli et al., 1991, Martelli et al., 1994a, Martelli et al., 1994b, Neri et al., 1994). Por estas razões, foi considerada por diversos autores como um artefacto resultante da agressividade do processo de extracção.

Entretanto, outros trabalhos vieram apoiar a existência de um nucleosqueleto. A cromatina, expandida em núcleos permeabilizados com soluções de elevada força iónica revelou a ligação, em ansas, da fibra de cromatina de 10 nm a um esqueleto nuclear (McCready et al., 1979, Cook, 1989). Por outro lado, foram preparadas matrizes nucleares, sem prévia inclusão em resina epoxi (Capco et al., 1982, Fey et al., 1986) o que permitiu obter imagens tri-dimensionais da rede de filamentos intranucleares.

Na década de 80, surgiram trabalhos onde se procedia à extracção de componentes nucleares com vista ao isolamento da matriz nuclear utilizando células inteiras inseridas numa matriz de agarose (Jackson e Cook, 1986, Cook, 1989, Wang e Traub, 1991). As células foram permeabilizadas, e procedeu-se a uma eluição da cromatina e membranas de uma forma mais suave utilizando tampões isotónicos. Este tipo de extracção permitiu ainda, a observação de cortes semi-finos que mostraram uma imagem tridimensional da matriz nuclear, composta por uma densa rede fibrilogranular, em continuidade com o citosqueleto (Cook, 1989). Este método, marcou uma nova fase no estudo do nucleosqueleto, conferindo-lhe uma credibilidade que nunca antes lhe fora atribuída. Com efeito, os métodos de extração *in situ* da matriz nuclear, permitem um rendimento muito maior, reduzem os artefactos e os tempos de extracção, sendo particularmente importantes para o estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico a três dimensões.

Recentemente, o estudo da topologia dos processos metabólicos nucleares tem vindo a adquirir importância crescente. A utilização de anticorpos produzidos por doentes com patologias auto-imunes, permitem caracterizar compartimentos onde se concentram diferentes factores responsáveis por distintos processos nucleares, o que permite concluir que o núcleo celular é um organelo com compartimentação funcional. Alguns daqueles factores e enzimas estão intimamente associados à matriz nuclear.

Estudos recentes (Bisotto et al., 1995, Mortillaro et al., 1996) revelaram uma associação da forma hiperfosforilada da subunidade grande da enzima RNApolimérase II com os locais de concentração dos factores de "splicing" dos RNAm, e verificaram que estas estruturas eram retidas após extracção da matriz nuclear. Previamente, tinha sido demonstrado que a enzima responsável pela transcrição do RNAm pode sofrer alterações transitórias dependentes da sua actividade, e que a forma hiperfosforilada corresponde ao estado funcional mais activo (Dahmus, 1996). As modificações do estado de fosforilação estão descritas para outras proteínas intervenientes no metabolismo dos ácidos nucleicos, sendo responsáveis pela alteração da estrutura e capacidade de estabelecer ligações com outras moléculas proteicas e ácidos nucleicos (Pederson, 1998). Parece provável que o modo de regulação das proteínas nucleares, em que proteínas distintas estão associadas em complexos onde ocorre replicação ou transcrição de DNA, se deve a alterações covalentes (Pederson, 1998) nomeadamente à fosforilação que leva a um aumento das constantes de equilíbrio de ligação entre proteínas e proteínas e ácidos nucleicos. As novas e aumentadas

afinidades entre as moléculas, dependentes das ligações químicas envolvidas, podem transformá-las em estruturas resistentes à extracção com tampões de alta força iónica. Estas interacções justificam o aparecimento da matriz nuclear que se obtém pelo processo de extracção com tampões de alta concentração salina, tendo sido já descritas as interacções físicas entre as maquinarias de transcrição, "splicing" e poli-adenilação (Du e Warren, 1997, McCracken et al., 1997, Yue et al., 1997, Zeng et al., 1997) assim como entre as enzimas de reparação do DNA e da transcrição (Maldonado et al., 1996). De acordo com os trabalhos referidos, as associações moleculares parecem ser resistentes, e até estabilizadas, por elevação da força iónica do meio, resultando na formação de estruturas com 25 a 100 nm de diâmetro.

As fibrilas e grânulos que constituem a matriz nuclear quando observada em microscopia electrónica, são interpretados como associações transitórias entre proteínas e proteínas-ácidos nucleicos que representam actividade metabólica e expressão genética aumentadas (Pederson, 1998). Esta hipótese é compatível com as imagens ultra-estruturais de matrizes nucleares constituídas por grânulos de natureza ribonucleoproteica de diâmetro variável, que representam associações de enzimas e factores de transcrição e processamento de ácidos nucleicos (Fey et al., 1986, Jackson e Cook, 1988, Stuurman et al., 1992, Nickerson et al., 1997).

O facto de a matriz nuclear funcionar como um esqueleto com elevada quantidade de RNA e ribonucleoproteínas, e, por outro lado ser o local onde ocorre grande parte dos processos metabólicos do núcleo, deixa questões por esclarecer desde há 20 anos.

Uma proposta para a estrutura do nucleosqueleto, baseada em trabalhos recentes, é a deste ser constituído, não por filamentos, mas por canais utilizados para o transporte de RNA (Razin e Gromova, 1995, Razin et al., 1995, Lamond e Earnshaw, 1998) a cuja superfície externa se ancoraria o DNA.

Os canais constituintes da matriz nuclear, à volta dos quais se encontrariam dispostos os domínios de DNA cromossómico, estariam em continuidade com os complexos de poro nuclear assegurando assim o transporte de moléculas entre o núcleo e o citoplasma. Os canais formariam uma rede onde circulam precursores de DNA e RNA, enzimas e proteínas reguladoras do citoplasma e no sentido inverso RNAm e subunidades de ribossomas.

Algumas experiências fundamentam esta hipótese, tais como, a demonstração de que os precursores da síntese de DNA são canalizados directamente para os focos de replicação (Panzeter e Ringer, 1993), e a da síntese, amadurecimento e transporte de RNA se encontrarem alinhados em percursos descritos no núcleo (Lawrence et al., 1989, Spector, 1990, Carter et al., 1993, Xing et al., 1993). Spector, em 1990, conseguiu marcar o percurso destes canais até à periferia do núcleo.

Os canais constituintes da matriz nuclear são resistentes à extracção com soluções de elevada concentração salina. Se o transporte de moléculas de RNA e ribonucleoproteínas for bloqueado por qualquer razão, estas moléculas ficam cativas no interior dos canais, originando as imagens da estrutura fibrilogranular da matriz, constituída por RNA, que é isolada por

diferentes métodos. Os canais parecem ter morfologia e tamanho semelhantes, mas têm capacidade de se expandir em todas as direcções dando origem a espaços onde os focos de replicação (Nakayasu e Berezney, 1989, Hozak et al., 1993) e transcrição (Carter et al., 1993, Jackson et al., 1993, Xing et al., 1993) se poderão localizar. Na Drosophila foi encontrada uma proteína EAST (enhanced adult sensory threshold) responsável pela expansão desta região nuclear (Wasser e Chia, 2000).

Este modelo explica como a actividade funcional do núcleo se associa à matriz nuclear (Razin et al., 1995) e como diferentes factores proteicos são directamente transportados dos locais de síntese no citoplasma, para os alvos do DNA cromossomal. Um mecanismo deste género permite explicar que várias estruturas nucleares independentes possam ser estimuladas em simultâneo, pelo facto de estarem ligadas pelo mesmo canal (por exemplo os focos de replicação).

Proteínas constituintes da matriz nuclear

As características e funções da matriz nuclear estão dependentes da sua constituição proteica visto ser formada por elevada percentagem de proteínas, não-histónicas resistentes à extracção com nucleases, detergentes e tampões de alta força iónica (Berezney, 1991). Só com a análise molecular detalhada das proteínas (Kallajoki e Osborn, 1994, Korosec et al., 1997) da matriz nuclear de cada célula se poderá esclarecer a organização estrutural, as propriedades moleculares e as funções associadas ao nucleosqueleto.

A electroforese bi-dimensional das proteínas da matriz nuclear, após marcação com ^{35}S-metionina, revelou que estas são cerca de 200 (Fey e Penman, 1988, Stuurman et al., 1990, Nakayasu e Berezney, 1991, Kallajoki e Osborn, 1994), podendo ser classificadas em dois grupos diferentes:

- proteínas comuns às matrizes nucleares de todas as células, as quais se designam genericamente por matriz mínima (minimal matrix)
- proteínas características das matrizes nucleares de linhas celulares específicas, que podem variar dentro da mesma linha de células, com o estado de diferenciação (Fey e Penman, 1988)

O facto das proteínas da matriz nuclear variarem com a linha celular, reflecte a sua função na activação selectiva dos genes que expressam diferentes funções, pois a matriz nuclear ao fixar-se a diferentes regiões do genoma selecciona a cromatina activa em cada célula (He et al., 1990).

O estudo das proteínas comuns a todas as células revelou que, as presentes em maior quantidade são as lâminas nucleares (Kaufmann, 1989) constituintes da lâmina nuclear fibrosa do invólucro nuclear. As lâminas nucleares têm massas moleculares entre 60 e 80 kDa, dependendo da célula e do grau de fosforilação; são proteínas da família das proteínas dos filamentos intermediários, capazes de formar uma rede tridimensional. As lâminas nucleares A e C, partilham epítopos comuns e existem na matriz nuclear de todas as células, exceptuando células indiferenciadas (Lebel et al., 1987, Stuurman et al., 1990).

Hakes e Berezney, em 1991, realizaram "Southwestern blotting" pesquisando as proteínas capazes de se ligarem ao DNA (DNA binding proteins), encontrando cerca de 12 proteínas com massa molecular superior a 40 kDa e 50 proteínas com massa molecular inferior a este valor. As lâminas A e C, mas não a lâmina B, encontram-se entre as proteínas com capacidade de se ligarem ao DNA.

O estudo electroforético das proteínas da matriz nuclear foi efectuado por vários autores e mostrou que algumas das proteínas matriciais se mantêm associadas à matriz nuclear durante a divisão celular (Peters et al., 1982), revelando assim, a estreita associação da cromatina com a matriz nuclear e o seu arranjo ordenado no núcleo em interfase. Em células HeLa foi possível isolar um esqueleto proteico nos cromossomas, com uma rede fibrilogranular interna semelhante à presente na matriz nuclear (Verheijen et al., 1988), tendo sido detectada por imunocitoquímica a proteína matricial topoisomérase II no interior de cromossomas metafásicos (Earnshaw e Heck, 1985).

Muitas das proteínas detectadas na matriz nuclear são proteínas de acção enzimática, cuja actividade foi pesquisada junto do nucleosqueleto residual. Na tabela seguinte está resumido o conjunto das proteínas encontradas nas matrizes nucleares de diferentes células, e a sua importância nos processos metabólicos do núcleo (Tabela I).

Tabela I

Proteínas associadas à matriz nuclear

Proteína	Capacidade funcional	MM (kDa)/ Pt. isoeléctrico	Célula	Referência
Lâmina nuclear A	Constituem a lâmina nuclear fibrosa	69/6.8-7.2	Hepatócito	Kaufmann 1989
Lâmina nuclear B		67/5.7	Hepatócito	Kaufmann 1989
Lâmina nuclear C		62/6.8-7.2	Hepatócito	Kaufmann 1989
Lâmina nuclear D		70-75/5.7-5.8	Hepatócito	Kaufmann 1989
Lâmina nuclear E		70-75/5.7-5.8	Hepatócito	Kaufmann 1989
DNApolimérase α	Replicação de DNA	*	HeLa	Hozak 1993
DNAprímase	Replicação de DNA	*	Hepatócito	Tubo 1987a
Topoisomérase II	Replicação de DNA	170-180	Hepatócito	Kaufmann1991a
RNApolimérase II	Transcrição de mRNA	*	Células inf. SV-40	Abulafia 1984
Coilina	AmadurecimentoRNA	80	Linfócito	Chali 1983
Fibrilharina	AmadurecimentoRNA	34	Hepat. ,eritoblasto	Ochs 1991
SC-35	AmadurecimentoRNA	35	HeLa	MacMillan 1997
Factores eplicação	Replicação de DNA	+	Hepatócito	Tubo 1987c
Proteína cinase C	Fosforilação	74-77	Hepatócito	Capitani 1987
Prot. cinase CK2	Fosforilação	*	Células tumorais	Tawfic 1997
hnRNP	Estrutura da matriz	33-40/> 7.0	PtK2 , HeLa, etc.	Leser 1984
C23	Matriz nucleolar	110	Novikoff hepatoma	Olson 1986
Mitotina	Proliferação celular	125/6.5	HL-60	Philipova 1991
Matrina - 3	Constituem os filamentos da matriz interna	125/6.0	Insulinoma	Belgrader 1991b
Matrina - 4		105/7.0	Hepatócito	Nakayasu 1991
Matrina D-G		60-75/> 7.0	Hepatócito	Nakayasu 1991
Matrina - 12		42-48/>7.0	Hepatócito	Nakayasu 1991
Matrina - 13		42-48/>7.0	Hepatócito	Nakayasu 1991
Acetiltransférase	Acetilação histonas	*	Eritroblasto	Hendzel 1994
RNAhelicase	Metabolismo RNA	55-80	HeLa	Claude 1991
ARBP	Ligação de DNA	95	Muscular, etc.	von Kries 1991
Prot. de oncogenes	Estrutura nuclear	variável	Células de aves	Eisenman 1985
Poli(ADP)polim.	Liga ADP a proteínas	116	Hepatócito, HTC	Kaufmann1991b

* Detecção de actividade enzimática na matriz nuclear sem determinação da massa molecular.

\+ Detecção de actividade de DNApolimérase, DNAprímase, 3′-5′exonucléase e DNAmetílase em agregados que sedimentam a 8-12 S

Ácidos nucleicos da matriz nuclear

Os ácidos nucleicos que constituem a matriz nuclear variam quantitativamente conforme o método de extracção utilizado. Quando a matriz nuclear é isolada após digestão com RNAse a estrutura interna fica significativamente reduzida assim como a concentração de RNA matricial (1.2 % versus 20.5% de RNA) (Berezney e Coffey, 1974, Berezney e Coffey, 1977, Berezney et al., 1979). Em contrapartida, o DNA associado à matriz permanece sempre em percentagem inferior a 2 % da massa total.

As sequências de DNA associadas à matriz nuclear designam-se por SAR (scaffold associated regions) ou MAR (matrix associated regions), são constituídas por várias centenas de pares de bases (250-3000 pb), predominantemente pares A-T, e situam-se na base das ansas que o DNA forma ao organizar-se no núcleo (Razin et al., 1995). As MARs apresentam sequências repetitivas (Tsongalis et al., 1992) e ligam-se a proteínas específicas da matriz nuclear (von Kries et al., 1991, Tsutsui et al., 1993); as mais periféricas ligam-se às lâminas nucleares (Boulikas, 1986, Ludérus et al., 1992), participando no arranjo tri-dimensional da cromatina fixada ao invólucro nuclear.

As MARs de uma espécie ligam-se a matrizes nucleares isoladas de outras espécies o que revela uma preservação evolutiva destas sequências (Romig et al., 1994). Muitas destas sequências parecem ser origens de replicação, ou estarem muito próximas destas (Dijkwel et al., 1986). Estima-se que 60 % das MARs se co-localizam com sequências de activação da

transcrição ("enhancers" ou promotores conforme a distância ao início da sequência a transcrever) (Brotherton et al., 1991, Avramova e Paneva, 1992, Das et al., 1993, Boulikas, 1995, Zhong et al., 1999) podendo variar com diferentes situações de estimulação e diferenciação (Chou et al., 1991); no entanto, também se encontram MARs no interior de intrões (Romig et al., 1994).

A ligação das ansas de DNA ao núcleo em interfase é resistente a soluções salinas, mas as sequências associadas à matriz nuclear não resistem à extracção com 0.5 M de NaCl (Vassetzky et al., 1989). Algumas dessas sequências são locais alvo para a acção de mutagénios (Xu et al., 1994), e têm uma susceptibilidade acrescida para as exonucleases. O predomínio das bases timina e adenina torna as MARs susceptíveis ao desenrolamento da dupla hélice (Bode et al., 1992), e ao aparecimento de bases não-emparelhadas, características essenciais para que as MARs se liguem à matriz nuclear e estimulem a expressão genética (Kohwi-Shigematsu e Kohwi, 1996).

Há sequências de nucleotídeos comuns entre MARs que permitem fazer a sua identificação (Staden, 1988, Boulikas, 1993, Kramer e Krawetz, 1995, Kramer et al., 1996). Duas das sequências conhecidas comuns a 80 % das MARs designam-se por MRS (MAR/SAR recognition signature) e representam duas regiões degeneradas (AATAAYAA e AWWRTAANNWWGNNNC). As duas sequências criam um local de ligação a proteínas da matriz nuclear (van Drunen et al., 1999).

Para as MARs do cromossoma humano 19 foi feita uma biblioteca, estando estas regiões do genoma bem estudadas, tanto a nível da sequência, como da sua localização no cromossoma, e da homologia entre MARs (Nikolaev et al., 1996).

Na tabela II estão resumidas as funções das sequências de DNA que se ligam à matriz nuclear, mostrando no seu conjunto que a matriz nuclear apresenta funções muito importantes na regulação do metabolismo dos ácidos nucleicos. As MARs parecem constituir um novo elemento de regulação genética em conjunto com as origens da replicação, silenciadores, "enhancers" e promotores (Boulikas, 1995).

Tabela II

Propriedades funcionais das sequências de DNA (MAR) associadas à matriz nuclear

	Referência
Sequência de ligação da ansa de DNA	Gasser 1987
DNA em replicação activa	van der Velden 1987
Sequências de genes activos	Zehnbauer 1986
Origens de replicação	Dijkwel 1986

Durante o isolamento da matriz nuclear com utilização de DNAse I, 30 % do RNA nuclear é solubilizado pelos tampões, ficando 70 % em associação com o nucleosqueleto.

A estrutura fibrilogranular constituinte da matriz nuclear interna é estruturada em fibrilas e grânulos, nomeadamente grânulos intercromatínicos, que são predominantemente de natureza ribonucleoproteica (Thiry, 1993). As moléculas de RNA associadas à matriz nuclear formam complexos com proteínas com importância fundamental na estrutura e função do nucleosqueleto residual (Fey et al., 1986, He et al., 1990).

Foram detectados alguns pequenos RNAs (snRNAs ou snurps) ricos em uracilo em ligação com a matriz nuclear (Reuter et al., 1984, Harris e Smith, 1988) assim como moléculas precursoras dos RNAs funcionais (hnRNA) (Verheijen et al., 1988). A maior parte das moléculas de hnRNA não poli-adeniladas (Harpold et al., 1981) e até poli-adeniladas (Huang et al., 1994) existentes no núcleo em interfase nunca darão origem a RNAm e vão exercer uma função estrutural e organizativa na matriz nuclear (He et al., 1991, Nickerson et al., 1995). Também o nucléolo residual que se observa na matriz nuclear é essencialmente constituído por RNA do tipo ribossómico.

Compartimentos morfológica e funcionalmente distintos associados à matriz nuclear

Lâmina Nuclear fibrosa com complexos de poro nuclear

O invólucro nuclear é constituído por:

- lâmina nuclear fibrosa constituída pelas proteínas lâminas nucleares, da família dos filamentos intermediários

- duas membranas concêntricas, designando-se o espaço entre as duas por cisterna perinuclear

- complexos de poro nuclear

A lâmina nuclear fibrosa existe nas células em interfase, sendo responsável pela manutenção da forma e tamanho do núcleo e é isolada juntamente com a matriz nuclear. É constituída por, pelo menos, cinco proteínas diferentes (Kaufmann, 1989), e é capaz de se formar e desagregar de uma forma dependente da fosforilação e isoprenilação (Moir et al., 1995). As lâminas nucleares são os constituintes principais da lâmina nuclear estando as lâminas A, B e C presentes em maior quantidade. As lâminas A e C, proteínas muito semelhantes estruturalmente, são responsáveis pela estabilização da cromatina periférica no núcleo (Burke e Gerace, 1986) apresentando forte afinidade para oligonucleótideos, especialmente se ricos em guanina, citosina e adenina (Shoeman e Traub, 1990). A lâmina B (isotipos B1, B2, B3) não apresenta grande afinidade para os ácidos nucleicos sendo através dela que a lâmina nuclear fibrosa se

liga às membranas do invólucro nuclear (Burke e Gerace, 1986), constituindo mesmo uma proteína intrínseca da membrana nuclear interna (Lebel e Raymond, 1984).

As lâminas nucleares formam focos nucleoplásmicos que parecem ser locais de distribuição das proteínas para a lâmina nuclear fibrosa (Moir et al., 1995), podendo estes focos variar em composição e distribuição conforme a fase do ciclo celular.

Estudos recentes, sugerem que estas proteínas estão também envolvidas na dinâmica do núcleo eucariota. As lâminas nucleares parecem ter influência na replicação do DNA (DePamphilis, 2000), nomeadamente a lâmina B, já que se co-localiza com o PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Moir et al., 1994), levando a ausência de lâmina B3 à inibição da replicação (Meier et al., 1991). A lâmina B parece surgir como um suporte estrutural para que se forme o foco de replicação (Moir et al., 1995).

As lâminas parecem ter um papel importante (Moir et al., 1995), na restruturação do invólucro nuclear, no final da divisão celular, e na transdução de sinais entre núcleo e citosqueleto, já que os filamentos intermediários parecem influenciar a forma do núcleo, através da lâmina nuclear (Sarria et al., 1994). Aliás, estão descritas as interacções (Georgatos e Blobel, 1987) e mesmo a continuidade física (Fey et al., 1984, Fey et al., 1986, Goldman et al., 1986) entre os filamentos intermediários e a lâmina nuclear.

As duas membranas do invólucro e a lâmina nuclear fibrosa fundem-se pontualmente em estruturas que se designam por complexos de

poro nuclear. Os complexos de poro nuclear são canais de natureza proteica, com cerca de 125 nm de diâmetro externo, evidentes em microscopia electrónica de transmissão e com simetria octogonal. O complexo de poro nuclear apresenta assimetria entre as faces nuclear e citoplasmática, possuindo no interior o canal de transporte do complexo de poro nuclear. Permitem a passagem bidireccional de moléculas, de uma forma passiva para moléculas com diâmetro inferior a 9 nm (Panté e Aebi, 1995), e num processo dependente da temperatura, ATP, saturação de substrato e de sinalização molecular (Nigg et al., 1991, Panté e Aebi, 1995) para moléculas de tamanho superior.

O modelo aceite para a estrutura do complexo de poro nuclear (Hinshaw et al., 1992, Akey e Radermarcher, 1993) consiste numa estrutura básica com simetria octogonal colocada entre dois aneis: nuclear e citoplasmático. O anel citoplasmático é dotado de oito prolongamentos filamentosos, importantes para o reconhecimento das moléculas a transportar para o núcleo, interagindo com filamentos intermediários do citosqueleto (Carmo-Fonseca et al., 1987, Richardson et al., 1988, Gerace, 1992). O anel nuclear apresenta a forma de um cesto. O canal central funcionará como o transportador, abrindo e fechando de acordo com a molécula transportada (Akey, 1990), chegando a apresentar um poro funcional de 26 nm (Dworetzky e Feldherr, 1988). Os complexos de poro nuclear apresentam um papel muito importante na regulação da fisiologia celular, particularmente na regulação da transcrição, já que controlam a

entrada de factores de transcrição chave no núcleo (Steward, 1989, Ghosh e Baltimore, 1990, Nasmyth et al., 1990).

O complexo de poro nuclear é constituído por várias proteínas diferentes, aproximadamente 100 (Reichelt et al., 1990, Bastos et al., 1995) sendo a classe das nucleoporinas (Carmo-Fonseca e Hurt, 1991, Bastos et al., 1995) a mais bem caracterizada. As nucleoporinas dos vertebrados foram estudadas por métodos bioquímicos, imunológicos e genéticos (Bastos et al., 1995) sendo possível classificá-las em dois grupos conforme possuem ou não capacidade de se ligarem à aglutinina do gérmen de trigo (WGA). A utilização de WGA acoplada a ouro coloidal permitiu localizar as nucleoporinas com afinidade para a aglutinina em ambas as faces do complexo de poro nuclear, assim como na estrutura do anel central e filamentos citoplasmáticos (Akey e Goldfarb, 1989, Panté et al., 1994). Algumas destas proteínas do complexo de poro nuclear foram clonadas e as suas funções bem esclarecidas, nomeadamente a p62 (Davis e Blobel, 1986, Snow et al., 1987, Starr et al., 1990, Carmo-Fonseca et al., 1991a) que é essencial ao funcionamento do poro nuclear, a proteína POM121 (Hallberg et al., 1993) responsável pela ligação do complexo de poro nuclear à membrana, a proteína NUP153 (Cordes et al., 1993, Sukegawa e Blobel, 1993, McMorrow et al., 1994, Panté et al. 1994) que se localiza na face nuclear, e a proteína CAN/NUP214 (von Lindern et al., 1992, Kraemer et al., 1994, Panté et al., 1994) que constitui os filamentos citoplasmáticos.

Nos vertebrados estão também estudadas outras nucleoporinas, sem capacidade de interagir com aglutininas, como a proteína gp 210 (Gerace et

al., 1982, Wozniak et al., 1989, Greber et al., 1990, Wozniak e Blobel, 1992) que se liga às membranas do invólucro e as proteínas NUP155 (Radu et al., 1993), Tpr (Byrd et al., 1994) e NUP180 (Wilken et al., 1993) que se localizam na face citoplasmática do complexo de poro nuclear.

Focos de Replicação do DNA - Corpos ovóides

O genoma das células eucariotas replica no núcleo durante a fase S do ciclo celular. O processo de síntese de DNA é iniciado em diversos locais em simultâneo, progredindo a polimerização semi-conservativa nas duas cadeias complementares do DNA. Estudos topológicos, usando precursores da macromolécula, modificados quimicamente de modo a permitir a sua detecção imunocitoquímica, apoiam a hipótese de que os locais onde se inicia a replicação tendem a unir-se, dando origem a focos de replicação onde se concentram as enzimas DNApolimérase α, DNAprímase, DNAlígase I (Cardoso et al., 1997) e factores de replicação como o PCNA (Smith e Berezney, 1983, Tubo e Berezney, 1987c, Berezney, 1991, Hozák et al., 1993). As estruturas morfológicas onde se concentram os factores de replicação, e onde se detecta a incorporação de nucleotídeos precursores de DNA, quando observadas em microscopia electrónica, apresentam uma forma ovalada e uma textura granular, tendo sido designados por corpos ovóides ou fábricas de replicação e são cerca de 150. Os corpos ovóides foram descritos pela primeira vez por Hozák et al. 1993, num trabalho em que utilizaram células HeLa encapsuladas em microesferas de agarose,

permeabilizadas e submetidas à remoção da cromatina e de componentes solúveis do núcleo, tendo verificado que a actividade replicativa se mantinha associada ao nucleosqueleto. A incorporação de uridina trifosfatada marcada com biotina, co-localizou com a DNApolimérase α e com o PCNA. A imunomarcação dos locais de síntese de DNA com partículas de ouro coloidal, indica que o DNA recém-sintetizado sai dos focos de replicação, após o que as moléculas de DNA se deslocariam para outros locais do núcleo. Este facto, apoiado por trabalhos anteriores (Cook, 1991, Cook, 1999, DePamphilis, 2000), fundamenta a hipótese de que a replicação ocorre em associação com enzimas replicativas fixadas a um esqueleto nuclear. A apoiar estes resultados está o facto da enzima responsável pelo início da replicação do DNA - prímase (Tubo e Berezney, 1987a) ter sido detectada em associação com a matriz nuclear, tendo os mesmos autores isolado complexos de replicação (Tubo e Berezney, 1987b) associados à matriz nuclear. Estes complexos apresentam actividade de DNApolimérase α, de DNAprímase, de DNA lígase I, e sedimentam a 100-150 S, o que indicia a organização de várias enzimas em complexos que correspondem a focos de replicação distintos. Separados da matriz nuclear, os complexos desagregam-se formando partículas que sedimentam a 10 S, o que é característico das enzimas constituintes. Estes dados demonstram que as enzimas da replicação de DNA se encontram associadas em complexos e que estes se ligam à matriz nuclear (Tubo e Berezney, 1987b). De facto, estudos de incorporação de trifosfato de uridina em células intactas seguida de extracção da matriz nuclear, e incorporação do nucleotídeo por matrizes

nucleares previamente extraídas (Nakayasu e Berezney, 1989) demonstraram que os complexos de replicação observados em ambas as situações são em número e tamanho equivalentes aos observados na célula intacta.

Estudos mais recentes de "time lapse" (Leonhardt et al., 2000), efectuados em linhas celulares, vieram demonstrar que a distribuição dos locais de replicação durante a fase S é devida à constante organização e desorganização de todos os seus componentes em associação com um esqueleto imobilizador.

A estrutura proteica da matriz nuclear parece ser mais importante para a iniciação da replicação do DNA, do que a própia sequência de nucleotídeos. Trabalhos efectuados com injecção de DNA procariótico em ovos de Xenopus laevis (Forbes et al., 1983, Blow e Laskey, 1986), ou em alternativa, por incubação com extractos de ovo do mesmo animal provaram aquela hipótese. O DNA procariótico rapidamente se organizou em conjunto com estruturas celulares de modo a formar um pseudonúcleo com capacidade de replicar o DNA estranho. A replicação *in vitro* ocorre em focos distintos, com número e distribuição semelhantes aos observados nas células de Xenopus laevis em cultura (Nakamura et al., 1986, Mills et al., 1989).

Focos de Transcrição do DNA

A demonstração de que a replicação de DNA ocorre em associação com um esqueleto nuclear, e de que a molécula de DNA se move sobre as enzimas e factores de replicação imobilizados, sugeriu um modelo equivalente para a transcrição (Cook, 1989, Georgiev et al., 1991, Cook, 1994, Iborra et al., 1996b, Cook, 1999). No núcleo das células eucarióticas existem três tipos de enzimas responsáveis pela transcrição do DNA:

RNApolimérase I - Localiza-se no nucléolo e é responsável pela síntese dos RNAs ribossómicos (exceptuando o fragmento 5 S).

RNApolimérase II - Localiza-se em áreas extranucleolares e transcreve os RNAs mensageiros e os pequenos RNAs (snRNA).

RNApolimérase III- Localiza-se na região extranucleolar e transcreve alguns pequenos RNAs, RNAs de transferência e o RNA ribossómico de 5S.

A hipótese de que a transcrição ocorre com as enzimas imobilizadas encontrou suporte morfológico com a detecção de RNApolimérases I e II e factores de transcrição ligados à matriz nuclear.

Locais de transcrição pela RNApolimerase I - Nucléolo

O nucléolo é o compartimento nuclear mais evidente e exaustivamente estudado morfologica e funcionalmente, sabendo-se que a síntese de RNA ribossómico (RNAr), o seu processamento - clivagem, e organização dos pré-ribossomas ocorre em diversas regiões do nucléolo (Thiry, 1992b). Os nucléolos desaparecem durante a divisão celular reaparecendo no final da telofase. O DNA nucleolar contém os genes que codificam para o RNA ribossómico e quando se reinicia a sua transcrição, num novo ciclo celular, os nucléolos voltam a formar-se em redor destas sequências, que existem nas constrições secundárias de alguns cromossomas (pares 13, 14, 15, 21 e 22 na espécie humana). Por esse motivo, as constrições secundárias que estão associadas a proteínas passíveis de corar especificamente com sais de prata (Hernandez -Verdun et al., 1980) são designadas por organizadores nucleolares (NOR - nucleolous organizer region). O tamanho do nucléolo e dos seus componentes relaciona-se com a taxa de síntese de ribossomas e de proteínas da célula, sendo tanto maior quanto maior é o número de ribossomas em formação. Morfologicamente, o nucléolo apresenta vários componentes:

- Centro fibrilar, que contém cópias de genes que codificam para o RNAr (DNAr) (Thiry, 1992a) e que não estão em transcrição activa. Na espécie humana existem aproximadamente 250 cópias de uma sequência de 44 kb (Scheer e Benavente, 1990), das quais em geral, só algumas estão em transcrição. Estudos por imunocitoquímica permitiram detectar no centro

fibrilar, proteínas de acção enzimática - RNA polimérase I (Scheer e Rose, 1984) e Topoisomérase I (Muller et al., 1985).

- Componente fibrilar denso, rodeia o centro fibrilar e nele ocorre transcrição pela enzima RNApolimérase I, tendo sido detectada por autorradiografia e imunocitoquímica a presença de uridina tritiada e biotinilada, respectivamente, poucos minutos após a incorporação (Hozak, 1995). A hibridização de sequências específicas de RNA com sondas adequadas permitiu localizar moléculas de RNAr na sua forma imatura (Ochs et al., 1985, Puvion-Dutilleul et al., 1991).

- Componente granular do nucléolo, composto por grânulos de 15-20 nm observáveis em microscopia electrónica de transmissão, sendo a marcação autorradiográfica detectada mais tarde que a do componente fibrilar denso e sendo observada hibridização com sondas complementares às moléculas de RNAr maduras de 18 S e 28 S.

À semelhança da matriz nuclear isolada a partir de núcleos intactos, é possível estudar o esqueleto do nucléolo. Por extracção com DNase I, RNase, e tampões de alta e baixa força iónica, vários trabalhos vieram demonstrar a existência de uma matriz nucleolar, formada predominantemente por filamentos proteicos, distintos dos componentes da matriz nuclear resistentes à extracção (Franke et al., 1981), e enriquecida em proteínas nucleolares e snRNA U3 (Shiomi et al., 1986), sugerindo que a matriz nucleolar está envolvida na organização espacial da cromatina e dos produtos de transcrição do nucléolo. Na matriz nucleolar foram detectadas as unidades transcripcionais dos genes ribossómicos (Weipoltshammer et

al., 1996). O estudo morfológico da matriz nucleolar isolada na ausência de RNase, vem apoiar estes dados, visto evidenciar numerosos grânulos, que a hibridização de ácidos nucleicos demonstrou conterem RNAr de 18 e 28 S, associados à estrutura filamentosa proteica (Olson et al., 1986).

A análise molecular das sequências de DNA que se ligam à matriz nucleolar, demonstrou grande analogia com as MARs encontradas na matriz nuclear (Stephanova et al., 1993). As proteínas mais abundantes da matriz nucleolar, estudadas por electroforese apresentam massas moleculares que variam entre 31 e 59 kDa (Olson et al., 1986), detectando-se também a proteína de 110 kDa - C23. Estudos de imunofluorescência permitiram identificar proteínas na matriz nucleolar (Ochs e Smetana, 1991), sendo a mais abundante e conservada a fibrilharina. A fibrilharina é uma proteína de 34 kDa que se localiza no componente fibrilar denso do nucléolo em interfase (Ochs et al., 1985), tendo sido também detectada em corpos pré-nucleolares (Ochs et al., 1985), nucléolos-satélite, corpos espiralados e matrizes nucleolares (Ochs e Smetana, 1991), ou seja, em estruturas de origem nucleolar, podendo a sua detecção ser usada como um marcador (Ochs e Smetana, 1991) das estruturas associadas ou derivadas do nucléolo.

A fibrilharina existe num complexo ribonucleoproteico, que contém U3 snRNA (Lischwe et al., 1985) que actua no amadurecimento das moléculas de RNAr, intervindo na primeira etapa da clivagem da molécula de 45 S, próximo da extremidade 5′ (Kass et al., 1990), sendo o amadurecimento deste RNA inibido em células de levedura, com formas mutadas de fibrilharina (Tollervey et al., 1991). A quantidade de fibrilharina

detectável varia com o estado de diferenciação celular, e com a actividade metabólica do nucléolo, sugerindo todos estes resultados a sua associação à síntese activa de RNAr.

Locais de transcrição pela RNApolimerase II

A enzima RNApolimérase II é responsável pela transcrição de todos os precursores dos RNAmensageiros (RNAm) citoplasmáticos, designando-se o transcripto primário por hnRNA (heterogeneous nuclear RNA). Estas moléculas são sujeitas a: a) ligação à extremidade 5´de um resíduo de 7-metil-guanosina que funciona como um bloqueador (*cap*), b) remoção de intrões, c) clivagem e poli-adenilação na extremidade 3´. Estes mecanismos de transformação são interdependentes e a transcrição pela RNApolimérase II é condição essencial para que ocorram os processos de poli-adenilação e "splicing" nos pré-RNAm (Sisodia et al., 1987). Várias dezenas de enzimas RNApolimérase II em actividade e seus transcriptos, associam-se formando focos de transcrição que apresentam um diâmetro aproximado de 80 nm (Jackson et al., 1993, Wansink et al., 1993, Iborra et. al., 1996a, Fay et al., 1997), e que se localizam na área extranucleolar. Os transcriptos nascentes ligam-se de imediato a proteínas, formando complexos com funções estruturais (Matunis et al., 1993).

A detecção dos locais de actividade da RNApolimérase II pode ser efectuada por pesquisa das cadeias poli-adeniladas, visto serem exclusivas dos transcriptos desta enzima (RNAm e hnRNA) (Carter et al., 1991, Xing e

Lawrence, 1991, Xing et al., 1995), assim como por administração de precursores marcados (Pombo e Cook, 1996) - bromo-uridina ou uridina tritiada, não sendo este último procedimento específico para a RNApolimérase II. Os estudos autorradiográficos revelaram que a marcação mais intensa surge à periferia das regiões de cromatina condensada, em complexos que se organizam em fibrilas e grânulos e que se designam por fibrilas pericromatínicas e grânulos intercromatínicos (*speckles*), respectivamente. Os grânulos intercromatínicos surgem em associações de 30 a 50 grânulos que se encontram interligados pelas fibrilas pericromatínicas (Spector, 1993), não sendo, no entanto, locais de síntese de RNA (Cmarko et al., 1999). A marcação devida aos RNAm recém-formados relaciona-se com a densidade fibrilar, e com a actividade transcricional (Bachellerie et al., 1975, Wansink et al., 1993, Fakan, 1994, van Driel et al., 1995, Wei et al., 1999, Mintz e Spector, 2000) e encontra-se nas fibrilas pericromatínicas e à periferia dos grânulos intercromatínicos (Cmarko et al., 1999).

Há evidência experimental de que os componentes da maquinaria do "splicing", responsáveis pela remoção de intrões, se encontram em associação com os locais de transcrição pela RNApolimérase II nas fibrilas pericromatínicas (Blencowe et al., 1994, Wuarin e Schibler, 1994) e nos grânulos intercromatínicos (Fakan, 1994, Mintz e Spector, 2000). Estudos efectuados por Xing e colaboradores em 1995, fazendo detecção em simultâneo do RNAm e do gene específico, demonstraram que os genes em transcrição pela RNApolimérase II se co-localizam com os grânulos de

RNA recém-sintetizado. A utilização de sondas complementares a sequências de intrões, evidenciou marcação em regiões do RNA próximas do gene que o codifica, sugerindo que o "splicing" ocorre em estreita proximidade com a transcrição dos RNAm. Estes resultados, no seu conjunto, fundamentam o modelo de que a transcrição e o "splicing" do RNAmensageiro ocorrem em associação nas fibrilas pericromatínicas e à periferia dos grânulos intercromatínicos. Estas estruturas evidenciadas nos anos 60 pelo método de Bernhard, mantêm-se associadas à matriz nuclear após extracção (Neves et al., 1993) sendo também, nesta detectada, a presença da enzima RNApolimérase II (Abulafia et al., 1984, Patturajan et al., 1998).

A detecção da bromo-uridina demonstrou marcação, não só na proximidade dos grânulos intercromatínicos, como também noutras regiões do nucleoplasma (Jackson et al., 1993, Lamond e Earnshaw, 1998), verificando-se que alguns desses RNAs correspondem a moléculas poli-adeniladas estáveis que parecem ter funções estruturais no núcleo em interfase (Huang et al., 1994). Estas observações demonstram que a transcrição pela RNApolimérase II não é exclusiva das fibrilas pericromatínicas podendo ocorrer em outros locais do nucleoplasma (Lamond e Earnshaw, 1998), nos focos de transcrição (Jackson et al., 1993, Wansink et al., 1993, Iborra et. al., 1996a, Fay et al., 1997).

Locais de transcrição pela RNApolimerase III

A enzima RNApolimerase III é responsável pela transcrição de pequenas moléculas de RNA, tais como os RNAs de transferência e RNA 5S, sendo inibida por concentrações elevadas de α-amanitina (Chambon, 1974). O facto dos seus transcriptos serem pequenos (menos de 250 nucleótidos) e de serem rapidamente transportados após a sua síntese, tem dificultado o estudo da topologia da transcrição pela RNApolimerase III; no entanto, recentemente foi demonstrado que esta enzima actua em focos específicos (Pombo et al., 1999). Assim, em células HeLa, preparadas de modo a preservar a actividade e ultra-estrutura dos focos de transcrição pela RNApolimerase III foram detectados cerca de 2000 focos com diâmetro aproximado de 40 nm (Pombo et al., 1999).

Domínios OPT (Oct1/PTF/Transcrição)

A transcrição do DNA pelas RNApolimerases está dependente da actuação de moléculas proteicas designadas por factores de transcrição. A detectação de alguns desses factores (TFIIH, Oct1, BRG1, E2F-1) (Grande et al., 1997) foi efectuada e estes foram localizados em focos dispersos no nucleoplasma (van Steensel et al., 1995, Grande et al., 1997); não se verificou co-localização de transcrição activa, com elevada concentração de factores de transcrição, senão no nucléolo. Recentemente, foram descritos domínios nucleares em células HeLa, que se designaram por domínios OPT

(Pombo et al., 1998), que contêm sequências dos cromossomas 6 e 7 em transcrição activa pela RNApolimerase II, nos quais foram detectados factores de transcrição em grande concentração tais como: PTF (PSE-binding transcription factor), Oct1 (que interage com PTF), TBP (TATA binding protein) e Sp1. Verificou-se co-localização frequente destes domínios com os domínios PIKA (Polymorphic interphase karyosomal association). Os domínios OPT parecem funcionar de um modo análogo ao nucléolo, mantendo em proximidade física genes que se encontram em transcrição, e concentrando os factores necessários ao processo (Pombo et al., 1998).

Corpos espiralados (coiled bodies) ou corpos de Cajal

Os corpos espiralados caracterizam-se morfologicamente por serem constituídos por pequenos bastonetes curvos, encontrando-se com frequência na proximidade do nucléolo. As primeiras observações desta estrutura foram feitas por Ramón e Cajal (Cajal, 1903) em células neuronais após impregnação com sais de prata, sendo por isso designados alternativamente por corpos de Cajal (Gall et al., 1999). As imagens estruturais em microscopia electrónica remontam ao ano de 1969 (Monneron e Bernhard, 1969). Recentemente têm sido feitos vários estudos, no sentido de esclarecer a sua função (Spector et al., 1992, Carmo-Fonseca et al., 1993, Lamond e Carmo-Fonseca, 1993, Bohmann et al., 1995, Alliegro e Alliegro, 1998, Malatesta et al., 1999, Gall et al., 1999).

Os corpos espiralados são de natureza ribonucleoproteica e têm origem nucleolar, sendo evidenciáveis após coloração pela prata (Monneron e Bernhard, 1969), contêm a proteína fibrilharina (Raska et al., 1990, Ochs e Smetana, 1991, Neves et al., 1999) e o pequeno RNA U3 (Jimenez-Garcia et al., 1994) característicos do nucléolo.

Também possuem outros pequenos RNAs (Carmo-Fonseca et al., 1992). No entanto, da sua composição está excluído o DNA (Monneron e Bernhard, 1969) e RNA heterogéneo (Carmo-Fonseca et al., 1991b, Raska et al. 1991), assim como o RNAr e o RNAm (Huang et al., 1994, Jimenez-Garcia et al., 1994), o que exclui a sua interferência activa no amadurecimento de RNAs. Contêm uma proteína fosforilada que se considerou exclusiva do corpo espiralado - coilina de 80 kDa (Raska et al., 1991, Carmo-Fonseca et al., 1994, Puvion-Dutilleul et al., 1995), mas que se sabe existir também em regiões associadas aos grânulos intercromatínicos em ligação com a matriz nuclear (Lewis e Tollervey, 2000). A coilina co-localiza-se com a fibrilharina no corpo espiralado, e tem capacidade de se ligar ao RNA. Estas proteínas são detectadas em associação com a matriz nuclear após extracção (Chaly et al., 1983, Penman et al., 1996, Neves et al., 1999).

A função do corpo espiralado ainda não é totalmente conhecida e factos como a variação do seu número ao longo do ciclo celular (Carmo-Fonseca et al., 1993) e em função da actividade da enzima RNApolimérase II (Spector et al., 1992), criam aparente dificuldade em esclarecer a sua função. Quando são utilizadas drogas inibidoras da transcrição verifica-se

uma diminuição das snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) nos corpos espiralados (Carmo-Fonseca et al., 1993), pelo que estes parecem funcionar como locais de reserva da maquinaria de "splicing" de RNA (Brasch e Ochs, 1992, Lamond e Carmo-Fonseca, 1993, Bohmann et al., 1995), estando envolvidos na agregação e desagregação das snRNP quando estas estão dissociadas do mRNA.

Estudos recentes (Alliegro e Alliegro, 1998) demonstram que em células endoteliais, possuidoras de um grande número de corpos espiralados, o seu número e composição varia em função do estado proliferativo do tecido, podendo co-existir corpos espiralados constituídos por diferentes proteínas. Em situações de angiogénese, o número de corpos espiralados está muito aumentado (Alliegro e Alliegro, 1998), o mesmo sucedendo em tecidos como o pâncreas, fígado, tecido adiposo castanho e córtex da supra-renal de animais em estado de hibernação (Malatesta et al., 1999) o que não deixa de surpreender. No entanto, atendendo que após o período da hibernação as células têm que estar preparadas para rapidamente restabelecerem os seus processos metabólicos, estes resultados estão de acordo com a função de reserva de componentes do spliceosoma que o corpo espiralado parece ter.

Em estudos *in vitro* (Wu et al., 1993, Bauer et al., 1994) foi possível observar a formação de estruturas nucleares equivalentes a corpos espiralados em núcleos de espermatozóides a que se retirou a membrana, e que foram colocados no citoplasma do ovócito. Nas células híbridas resultantes, rapidamente se formou o invólucro nuclear e grânulos

intranucleares bastante proeminentes, com composição semelhante à do corpo espiralado estando presentes, além das proteínas coilina e fibrilharina, numerosos pequenos RNAs (entre os quais o U3) que intervêm no processamento de RNAm e no amadurecimento de RNAr. Nos núcleos formados deste modo não foi possível observar síntese de RNAr, estando portanto ausentes os nucléolos. Estes resultados parecem favorecer a hipótese de que os corpos espiralados funcionam como local de acumulação de factores do amadurecimento de RNAs, e na ausência de transcrição, podem aparecer aumentados de tamanho e número.

Na região periférica dos corpos de Cajal, de células em cultura, foi detectada a enzima RNApolimérase II, os factores de transcrição necessários à sua actividade, e regiões do genoma que integram os genes dos pequenos RNAs U1 e U2 (Schul et al., 1998). Estes dados sugerem que o corpo espiralado possa organizar e regular a expressão destes genes, acumulando os seus produtos finais - snRNAs U1 e U2 (Carmo-Fonseca et al., 1991b).

Gems (gemini of coiled bodies)

Os corpos "gem" foram descritos pela primeira vez por Liu e Dreyfuss em 1996, e designados deste modo devido ao facto de se encontrarem associados aos corpos espiralados ou de Cajal. Os corpos "gem" caracterizam-se pela presença da proteína de 32-40 kDa SMN (survival of motor neurons)(Liu e Dreyfuss, 1996), produto do gene que se

encontra mutado em doentes com atrofia muscular espinhal (Lefebvre et al., 1995) e que foi clonado recentemente (La Bella et al., 1998). A proteína SMN associa-se à proteína SIP-1 (SMN-interacting protein -1) formando complexos de 300 kDa que contêm outras moléculas proteicas - Sm que intervêm na formação das snRNP (Liu et al., 1997). A proteína SMN parece ter capacidade de se associar *in vivo* à enzima RNApolimérase II, através da RNAhelícase (Pellizzoni et al., 2001), sem que o significado biológico desta interacção esteja bem esclarecido. Também foi descrita a existência de uma nova proteína nos "gems" - Gemin3, capaz de interagir com a SMN (Charroux et al., 1999).

Trabalhos recentes demonstraram a importância das proteínas SMN e SIP-1 na biogénese e activação das snRNP do spliceossoma (Fisher et al., 1997, Pellizzoni et al., 1998, Charroux et al. 1999), e do papel da SMN como factor de transcrição (Strasswimmer et al., 1999). Em tecidos adultos diferenciados os "gems" co-localizam com os corpos de Cajal (Young et al., 2000), e parecem ter, tal como estes, uma função de reserva de factores proteicos e de snRNP que intervêm no splicing do RNAm. Os "gems" distintos dos corpos de Cajal são particularmente abundantes e evidentes em células em cultura (Carvalho et al., 1999) sugerindo que nestas, está ausente uma proteína de ligação, que existindo em quantidade suficiente nos tecidos (Young et al., 2000) promove a associação destes dois tipos de estruturas nucleares. A fibrilharina poderá ter essa função, já que existe no corpo espiralado, e tem capacidade de se ligar directamente à proteína SMN (Liu e Dreyfuss, 1996). Os corpos de Cajal partilham com os "gems" as proteínas

SMN e SIP1 (Matera e Frey, 1998, Matera, 1999, Sleeman e Lamond, 1999), possuindo também grande concentração de snRNPs, que não existem nos "gems" (Dietz, 1998), parecendo estar ambas as estruturas envolvidas nos processos de biogénese e regeneração das snRNPs (Carvalho et al., 1999).

Corpos de clivagem (cleavage bodies)

Foram descritos outros domínios nucleares que se associam aos corpos de Cajal, em algumas fases do ciclo celular - corpos de clivagem (Schul et al., 1996). Estes domínios, enriquecidos em factores de clivagem da extremidade 3´ dos RNAs, apresentam elevadas concentrações dos factores CstF (cleavage stimulation factor) de 64 kDa e CPSF (cleavage and polyadenilation specificity factor) de 100 kDa. Os corpos de clivagem co-localizam com os corpos de Cajal durante a fase G1 do ciclo celular e após inibição da transcrição (Schul et al., 1999). Todavia, 20% destes domínios nucleares possuem RNA recém-sintetizado e actividade transcriptiva, o que não acontece com o corpo espiralado.

Dots (pontos) nucleares

Os domínios "dot" nucleares foram descritos no início da década de 90 (Ascoli e Maul, 1991) altura em que começou a considerar-se o núcleo

como um organelo compartimentado. Os pontos, detectados por imunocitoquímica surgem associados à matriz nuclear e possuem um antigénio específico NDP-55 (nuclear dot protein) com 55 kDa e ponto isoeléctrico entre 7.4 e 7.7. Os "dots" nucleares apresentam um diâmetro de 0.2 a 0.3 μm e a sua detecção relaciona-se directamente com situações de proliferação celular, desaparecendo durante a mitose.

PIKA (Polymorphic interphase karyosomal association)

Os domínios PIKA (Saunders et al., 1991), foram observados como regiões de densidade aos electrões inferior à do nucleoplasma e em aparente associação com a cromatina, sendo evidentes em microscopia de contraste de fase. A sua estrutura altera-se significativamente durante o ciclo celular e à semelhança do corpo espiralado apresenta localização muito próxima do nucléolo; não apresenta actividade transcricional ou replicativa, pois não possui hnRNA e o DNA é muito escasso. O marcador antigénico específico para o domínio PIKA é uma proteína de 23-25 kDa. Estes domínios podem atingir dimensões máximas de 5 μm, ou seja 5 a 10 vezes superiores às dos corpos de Cajal. Os PIKA diferem dos "dots" nucleares presentes em células em divisão porque a marcação destes últimos não é alterada por digestão com nucleases. Os domínios PIKA poderão não estar em associação directa com a matriz nuclear mas representam um compartimento nuclear distinto.

Célula esteroidogénica

O córtex da glândula supra-renal é constituído por três zonas com células esteroidogénicas, funcional e morfologicamente distintas e dispostas concentricamente: zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticular. No rato, a glândula supra-renal produz predominantemente mineralocorticóides (aldosterona) na zona glomerulosa e glicocorticóides (corticosterona) nas zonas fasciculada e reticular. A hormona esteróide mais abundante no soro do rato é a corticosterona, produzida pela célula da zona fasciculada que é uma célula volumosa, com numerosas vesículas lipídicas no citoplasma e núcleo grande e redondo, tendo sido nestas células que o estudo da matriz nuclear se efectuou.

As hormonas esteróides são derivadas do colesterol e são sintetizadas por acção sequencial de um grupo de enzimas da família do citocromo P-450 (CYP). O processo de esteroidogénese, no córtex da glândula supra-renal, é estimulado, em particular, pela hormona hipofisária ACTH (adrenocorticotropic hormone) sendo esta hormona composta por 39 resíduos de aminoácidos, constituindo os primeiros 24 a fracção activa do péptido. Estudos por hibridização de genes envolvidos na esteroidogénese numa biblioteca de cDNA (DNA complementar) da célula glandular da supra-renal, usando como sondas fragmentos de cDNA, (situações basais e estimuladas com ACTH), revelaram que 40 genes são estimulados pela ACTH e que 2 são reprimidos (Raikhinstein e Hanukoglu, 1994). A

activação transcripcional atinge o máximo nas 6 h iniciais e decai entre as 24 a 36 h.

Alguns dos genes estimulados selectivamente pela hormona adrenocorticotrófica foram já clonados (Citocromos P450 (11 β), pcP450 (11 β)-62 e P450 (11 β, aldo)-46 do rato) em vectores de expressão e a sua actividade estudada (Nonaka e Okamoto, 1991).

O núcleo no processo de estimulação hormonal

A indução da esteroidogénese pela ACTH foi classicamente considerada como um processo dependente da síntese proteica, mas independente da transcrição, ocorrendo após um aumento intracelular de cAMP (cyclic adenosine monophosphate) com estimulação da proteína cínase A. Estudos posteriores revelaram que o processo de estimulação hormonal induzido pela hormona adrenocorticotrófica na esteroidogénese, é regulado através do cAMP por dois mecanismos distintos - agudo e crónico (Waterman, 1994), sendo a ACTH capaz de alterar a expressão genética da célula alvo e de a modular na acção crónica (Kimura e Armelin, 1990).
Os dois mecanismos de acção da ACTH são:

1 - Resposta aguda. A hormona ACTH activa a enzima adenil-ciclase de modo a aumentar os níveis de cAMP (Penhoat et al., 1989, Hanukoglu et al., 1990, Schimmer et al., 1995 a, Schimmer et al., 1995 b). São desencadeados processos que levam à rápida mobilização do colesterol presente nas reservas lipídicas da célula esteroidogénica e ao seu transporte

para a mitocôndria, onde ocorre a transformação de colesterol em pregnenolona. Em 15 minutos verifica-se um aumento dos valores de hormonas esteróides no sangue (Waterman, 1994).

Na sua resposta aguda, a ACTH estimula a proteína StAR (steroidogenic acute regulatory) num processo dependente do cAMP e da proteína cínase C sendo esta enzima fosforilativa regulada pelo sistema cálcio/calmodulina (Nishikawa et al., 1997). A proteina StAR de 30 kDa, cujo gene está bem caracterizado (Ariyoshi et al., 1998), regula o transporte de colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria onde a enzima P450scc actua num passo limitante da esteroidogénese. Culturas primárias de células de supra-renal tratadas com ACTH revelaram produção, num processo dependente de cAMP, de outra proteína de 195 kDa designada por CISP (corticotropin-induced secreted protein) que é uma proteína com estrutura semelhante à das trombospondinas e com capacidade de se ligar ao cálcio (Pellerin et al., 1993).

2 - Resposta crónica. O processo de estimulação crónica pela hormona ACTH induz aumento da transcrição coordenada de genes que codificam para as enzimas da esteroidogénese, verificando-se que a acção pode ser reproduzida pelo cAMP isoladamente o que comprova que, também na estimulação crónica este nucleotídeo funciona como mensageiro secundário. Os genes que codificam para as enzimas da esteroidogénese possuem sequências a montante (sequências de consenso) que os tornam sensíveis à acção do cAMP. As sequências de consenso podem variar nos promotores dos vários genes que codificam para as enzimas da

esteroidogénese (Waterman, 1994), sendo no entanto comum a vários genes a sequência TGACGTCA. A sequência de consenso no promotor é designada por "cAMP-Response Element" (CRE) (Vallejo, 1994) e sabe-se que a expressão genética modulada por hormonas envolve a activação de cínases e consequente fosforilação de factores de transcrição proteicos, que actuam sobre os promotores de genes específicos (Hunter e Karin, 1992).

O estudo da acção da ACTH sobre a transcrição específica do gene CYP11B1 (Mukai et al., 1998), que codifica a enzima 11 β-monoxigenase, demonstrou que a transcrição é dependente do factor proteico AP-1 (activator protein-1). O factor AP-1 é constituído por dímeros (homo ou heterodímeros) de proteínas da família de genes fos e jun, sendo por sua vez a expressão destes genes estimulada pela hormona ACTH (Imai et al., 1990, Kimura e Armelin, 1990, Yang et al., 1990, Ohno et al., 1992, Viard et al., 1992, Morosov et al., 1994, LeHoux e Ducharme, 1995). O factor AP-1 liga-se a regiões específicas de DNA nos genes alvo com sequência muito semelhante ao CRE (Borrelli et al., 1992), sendo a ligação potenciada por outros factores proteicos (Abate et al., 1990). Aliás, a proteína Fos é expressa na supra-renal num ciclo circadiano sobreponível ao da ACTH endógena (Koistinaho et al., 1990), sugerindo que os produtos proteicos dos oncogenes medeiam a regulação fisiológica desta célula endócrina, assim como a resposta mitogénica à ACTH (Lotfi e Armelin, 1998).

O produto proteico do gene c-myc também é expresso por células esteroidogénicas de supra-renal, *in vivo* e em cultura, sendo a síntese modulada pelo tratamento com ACTH (Liu et al., 1996).

O mecanismo de estimulação hormonal pela ACTH pode ser reproduzido pelo ester de forbol PMA (13-acetil-12-miristoilforbol) (Kimura e Armelin, 1990), um estimulante da proteína cínase C que intervém na fase inicial (até às 4 h) da estimulação pela ACTH (Frigeri e Armelin, 1996). Estes resultados indiciam que outras proteínas cínase em associação com a proteína cínase A (Frigeri e Armelin, 1996, Michael et al., 2000) poderão interferir na fosforilação de factores proteicos indispensáveis à actuação sustentada da ACTH, por períodos longos (4 a 24 h) e cronicamente. Alguns dos heterodímeros de ligação à sequência CRE podem interactuar a nível nuclear com o mecanismo da proteína cínase C (Hai e Curran, 1991, Masquilier e Sassoni-Corsi, 1992), sabendo-se que também a caseína cínase II é responsável por reacções de fosforilação que permitem a activação da transcrição (Lee et al., 1990, Gonzalez et al., 1991, Lalli e Sassoni-Corsi, 1994).

A proteína cínase A na ausência de cAMP é um tetrâmero constituído por duas subunidades catalíticas e duas subunidades reguladoras. O cAMP liga-se ao tetrâmero gerando dissociação das subunidades e levando à migração, para o núcleo, das subunidades catalíticas, onde actuam, fosforilando os factores de transcrição (Meinkoth et al., 1990), que activam indirectamente a enzima RNApolimérase II (Vallejo, 1994). A translocação destas subunidades parece ser o passo limitante no processo de estimulação hormonal via cAMP (Hagiwara et al., 1993).

A matriz nuclear da célula do córtex supra-renal

A caseína cínase II (CK2) acumula-se no núcleo da célula do cortéx da supra-renal, em situações de estimulação pela ACTH (Filhol et al., 1991) ou de outros factores (Tawfic e Ahmed, 1994, Tawfic et al., 1996), com aumento de actividade fosforilativa. Por outro lado, esta enzima encontra-se ligada à matriz nuclear (Tawfic et al., 1996, Tawfic et al., 1997) aparentemente através de ligações dissulfureto (Zhang et al., 1998). A CK2 funciona como uma proteína intrínseca da matriz nuclear responsável pela fosforilação de outras proteínas matriciais (Tawfic et al., 1996), tais como, a topoisomérase II, a nucleolina, a B23 e oncoproteínas. A oncoproteína Myc é fosforilada por esta enzima (Luscher et al., 1989) sendo também detectada em associação com a matriz nuclear (Waitz e Loidl, 1991, López-Rodas et al., 1992). Estudos de imunofluorescência revelaram que a proteína Myc se associa a granulações de ribonucleoproteínas, e que está ausente da lâmina nuclear e do nucléolo (Spector et al., 1987).

A proteína cínase C foi detectada também na matriz nuclear no fígado (Capitani et al., 1987), sabendo-se que proteínas nucleares como a lâmina B, a DNA polimérase, a topoisomérase II e a RNA polimérase II funcionam como substratos específicos (Buchner, 1995). Da mesma forma, foi detectada actividade da tirosina cínase na matriz nuclear de células HeLa e de fibroblastos (Radha et al., 1996).

Objectivos do trabalho

O objectivo deste trabalho é esclarecer os mecanismos moduladores dos compartimentos nucleares em associação com a matriz nuclear da célula esteroidogénica, utilizando como modelo a célula da zona fasciculada do córtex da supra-renal sob estimulação hormonal pela ACTH.

A matriz nuclear é a fracção isolada a partir do nucleosqueleto. Existe no núcleo em interfase, e pode sofrer alterações morfológicas no processo de extracção, explicáveis pela sua natureza química. A matriz nuclear organiza a cromatina do núcleo e intervém em todos os processos metabólicos dos ácidos nucleicos. À matriz nuclear associam-se compartimentos distintos: nucléolo, corpo de Cajal, grânulos intercromatínicos, lâmina nuclear e rede fibrilogranular. No processo de estimulação hormonal através da activação de adenil-ciclase, são fosforilados factores de transcrição proteicos, por várias proteínas cínase, algumas delas proteínas intrínsecas da matriz nuclear. Considerando, que o nucleosqueleto pode sofrer alterações durante a estimulação hormonal, fez-se o estudo da matriz nuclear da célula esteroidogénica do córtex da glândula supra-renal, pesquisando compartimentos nucleares associados a esta estrutura. Tentou-se, assim, esclarecer os complexos mecanismos que levam à secreção rápida (estimulação aguda) e à produção sustentada e elevada (estimulação crónica) de hormonas esteróides.

Neste estudo destacamos os seguintes aspectos:

I - Isolamento da matriz nuclear a partir de fracções de núcleos previamente isolados, usando métodos clássicos, descritos por Commerford et al. 1986 e Kaufmann et al. 1981.

II - Isolamento da matriz nuclear *in situ*, em lâminas de vidro. Este modelo permitiu estudar os diferentes compartimentos associados à matriz nuclear com a utilização de anticorpos e sondas específicos.

III- Estimulação dos animais por injecção de hormona adrenocorticotrófica sintética. Utilizaram-se três tipos de estimulação: dois tempos de aguda (2 e 18 h) e crónica (15 dias/ injecção diária). A avaliação da estimulação hormonal foi feita por doseamento da corticosterona por HPLC no soro dos animais.

IV - Identificação de compartimentos nucleares associados à matriz nuclear: lâmina nuclear fibrosa (com anticorpos anti-lâminas A+C e anti-lâmina B), nucléolo e estruturas com origem nucleolar (com utilização de um anticorpo anti-fibrilharina) e corpo espiralado ou de Cajal (utilizando o anti-corpo anti-coilina).

V - Identificação de núcleos em replicação com a utilização do anticorpo anti-PCNA.

VI- Localização das oncoproteínas de ligação ao CRE na matriz nuclear usando anticorpos anti-Fos e anti-Myc.

VII- Identificação de locais de síntese de RNA pela RNApolimérase II usando uma sonda poli-timina complementar às cadeias poli-adeniladas e

localização da síntese activa de RNA por incorporação de bromo-uridina nas matrizes nucleares.

Materiais e métodos

Reagentes

Os reagentes utilizados nas experiências foram, na sua maioria, adquiridos à empresa Sigma Co.. Os produtos usados em cromatografia, foram adquiridos à Merck Farma e Química S.A.. Produtos de outra proveniência estão devidamente assinalados ao longo deste capítulo.

Animais

Nas várias experiências usaram-se ratos macho, estirpe Wistar, com peso compreendido entre 150 e 300 g, adquiridos ao biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência em Oeiras-Portugal. Os ratos foram alimentados *ad libitum* com água e dieta de laboratório, e mantidos no biotério do Instituto de Histologia e Embriologia durante o decorrer das experiências, tendo sido sempre sacrificados por decapitação, entre as 9.00 e as 10.00 h.

Utilizaram-se aproximadamente 500 animais de experiência, distribuídos por 94 grupos de 2-3 ratos (isolamento de matrizes nucleares em lâmina de vidro) e 24 grupos de 10-12 ratos (isolamento de matrizes nucleares pelos métodos de Kaufmann et al. 1981 e Commerford et al. 1986).

Nos estudos de estimulação hormonal pela ACTH usou-se a hormona adrenocorticotrófica sintética de 24 resíduos de aminoácidos (Synacthen depósito, Laboratórios Ciba - Portugal) correspondentes à fracção activa da hormona endógena que possui 39 resíduos de

aminoácidos. O tetracosactido sintético foi adoptado neste trabalho dada a sua facilidade de obtenção e a sua vasta aplicação em trabalhos científicos e com fins terapêuticos.

A ACTH sintética foi sempre administrada por injecção intramuscular:

a) De modo agudo por injecção única de 0.2 mg/Kg e sacrifício às 1, 2, 3, 6, 12, 18 e 24 horas. Selecionaram-se dois tempos representativos da estimulação aguda - 2 h e 18 h.

b) De modo crónico por injecção de 0.2 mg/Kg /dia, entre as 9.00 e as 10.00 h da manhã, durante 15 dias consecutivos, sendo os ratos sacrificados 1 hora após a última injecção.

Métodos de isolamento de células e organelos

Todo o procedimento de isolamento de fracções celulares foi efectuado a 4 °C, excepto quando indicado outro valor.

Método de isolamento de núcleos

Adaptado do método de Blobel e Potter 1966

Após sacrificio dos animais, as glândulas supra-renais foram colhidas para tampão Biochrom (0.137 M cloreto de sódio, 2.68 mM cloreto de potássio, 8.04 mM hidrogenofosfato de sódio, 1.47 mM dihidrogenofosfato de potássio, 0.492 mM cloreto de magnésio hexa-

hidratado, 0.901 mM cloreto de cálcio) e em seguida lavadas com tampão STM/PMSF (50mM Tris-HCl pH 7.4 - 4 °C, 250 mM sacarose, 5 mM sulfato de magnésio, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo). A cápsula das glândulas assim como a medula, foram removidas com ajuda de um bisturi, e o peso de restante tecido foi determinado. As supra-renais foram homogeneizadas em 4 volumes de tampão STM/PMSF num homogeneizador de vidro, que foi movido manualmente 20 vezes. O homogeneizado foi filtrado através de 4 camadas de gaze de algodão, e em seguida centrifugado a 1000 g durante 10 min, numa centrífuga de bancada Heraeus modelo Megafuge 1.0R.

O sedimento foi lavado com o mesmo tampão, e em seguida ressuspenso em 2 ml de tampão STM/PMSF suplementado com 0.1 % de Triton X-100 tendo sido incubado 5 min em gelo. A suspensão foi centrifugada a 1000 g durante 10 min, e o sedimento lavado duas vezes com tampão STM/PMSF. O sedimento de núcleos foi em seguida ressuspenso em 2 ml de tampão DS/PMSF (50 mM Tris-HCl pH 7.4 - 4 °C, 5 mM sulfato de magnésio, 2.1 M sacarose), e centrifugado a 33600 rpm (70000 g) durante 90 min, numa ultracentrífuga Beckman XL-90 com rotor 90Ti. O sedimento obtido foi ressuspenso em 2 ml de STM/PMSF, formando uma suspensão que se aplicou sobre uma base de 1 ml de tampão DS/PMSF com 2.26 M de sacarose. Foi realizada, de seguida, uma ultracentrifugação a 38100 rpm (90000 g) durante 30 min, tendo sido recuperada como sedimento a fracção pura de núcleos.

Método de isolamento de matrizes nucleares da glândula supra-renal

Adaptado de Commerford et al. 1986

Tal como no isolamento de núcleos descrito por Blobel e Potter (1966), as glândulas supra-renais foram removidas, descapsuladas, desmeduladas e lavadas em tampão Biochrom a 4 ºC. O tecido foi pesado e homogeneizado manualmente em 4 volumes de tampão de homogeneização (10 mM Tris-HCl pH 7.4 - 4ºC, 250 mM de sacarose, 2 mM cloreto de magnésio, 1 mM ácido etilenoglicoltetraacético-EGTA, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo) num homogeneizador de vidro. Este foi movido 20 vezes, e o homogeneizado filtrado através de 4 camadas de gaze de algodão. Procedeu-se a uma centrifugação, a 1000 g durante 10 min, numa centrífuga de bancada Heraeus modelo Megafuge 1.0R, tendo sido o sedimento ressuspenso em tampão de homogeneização com 56 % (p/v) de sacarose. A fracção de núcleos obtida em sedimento, após centrifugação a 60000 g durante 90 min, numa ultracentrífuga Beckman TL-100, foi lavada duas vezes com tampão de homogeneização. O sedimento foi ressuspenso em tampão STEM (50mM Tris-HCl pH 7.4 - 4 ºC, 250 mM sacarose, 5 mM cloreto de sódio, 1 mM ácido etilenoglicoltetraacético, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e os núcleos tratados sequencialmente com 0.2mM tetrationato de sódio, 5 mM N-etilmaleimida e 20 µg/ml DNase I (desoxirribonuclease I - Sigma) e incubados a 37 ºC durante 20 min. Em seguida, centrifugou-se a 1000 g, e ressuspendeu-se o sedimento em tampão

LS (10 mM Tris-HCl pH 7.4 - 4ºC, 0.2 mM cloreto de magnésio, 1 mM ácido etilenoglicoltetraacético, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo), mantendo-se a incubação por 10 min. Após nova centrifugação a 1000 g, o sedimento foi ressuspenso em tampão LS com 70 % sacarose p/v, colocando-se esta suspensão na base de um gradiente descontínuo de sacarose (em tampão LS com 2 M NaCl) em concentrações descendentes, 60, 50 e 40 % p/v. Após centrifugação a 1000 g durante 1 h as matrizes nucleares purificadas foram recuperadas na interfase entre as soluções de sacarose de 40 e 50 %, de onde foram aspiradas com uma agulha ligada a uma seringa. Procedeu-se a nova centrifugação e ressuspensão em tampão STEM, conservando-se as fracções das matrizes nucleares a -20 ºC em tampão com 20 % de glicerol.

Método de isolamento de matrizes nucleares da glândula supra-renal

Adaptado de Kaufmann et al. 1981

No método de isolamento de matrizes nucleares adaptado do método descrito por Kaufmann e colaboradores em 1981, os núcleos celulares foram previamente isolados de acordo com o descrito anteriormente (Blobel e Potter, 1966). Os sedimentos de núcleos obtidos por ultracentrifugação foram lavados com tampão STM, e em seguida ressuspensos no mesmo tampão e tratados sequencialmente com 0.2 mM de tetrationato de sódio, 5 mM de N-etilmaleimida e 25 μg/ml de DNase I e

incubados a 37 ºC durante 20 min. A suspensão de núcleos foi centrifugada a 1000 g, e o sedimento ressuspenso em tampão STM com 1 % v/v de Triton X-100 e incubado durante 5 min. Após centrifugação a 1000 g o sedimento foi ressuspenso e incubado em tampão LS durante 15 min. Foi efectuada nova centrifugação, e ressuspensão no mesmo tampão, tendo sido em seguida adicionado tampão HS (10 mM Tris-HCl pH 7.4 - 4ºC, 0.2 mM cloreto de magnésio, 1 mM ácido etilenoglicoltetraacético, 2 M cloreto de sódio, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo) gota a gota, com ligeira agitação, até que a concentração final de cloreto de sódio atingisse 1.6 M, mantendo-se em repouso por mais 15 min. Por fim, foi efectuada uma centrifugação a 6200 g, durante 30 min, tendo-se recolhido as matrizes nucleares no sedimento e ressuspendido em tampão STM com 20 % de glicerol.

Método de isolamento de matrizes nucleares em lâmina de vidro

Adaptado de Lutz et al. 1988

As células do córtex supra-renal do rato foram previamente preparadas em suspensão (Hinson et al. 1991) e a partir delas foram isoladas matrizes nucleares em lâmina de vidro (Lutz et al., 1988). Deste modo, as glândulas supra-renais foram retiradas para tampão Krebs (0.115 M cloreto de sódio, 2.68 mM cloreto de potássio, 1.9 mM cloreto de cálcio, 1.18 mM dihidrogenofosfato de potássio, 1.18 mM sulfato de magnésio com 7 H_2O, 25 mM hidrogenocarbonato de sódio, 0.2 % p/v glicose, 0.2 % p/v albumina

sérica bovina), após sacrifício dos animais. As glândulas foram descapsuladas e desmeduladas com ajuda de um bisturi, e mantidas 1 h a 37 ºC no mesmo tampão suplementado com as enzimas colagénase (2 mg/ml) e DNase I (0.5 mg/ml).

As células glandulares foram em seguida dispersas com ajuda de uma pipeta automática, com a qual se aspirou e expulsou a suspensão 25 vezes, sendo esta filtrada através de uma membrana de nylon com poro de 100 μm. As células foram sedimentadas a 172 g durante 10 min a 4 ºC, ressuspensas em tampão Krebs e centrifugadas de novo. Após ressuspensão no mesmo tampão as células foram centrifugadas a 172 g durante 30 s em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina (em centrífuga Heraeus Megafuge 1.0 R com citoacessórios), e secas ao ar durante 1 h à temperatura ambiente.

As células aderentes às lâminas de vidro, foram incubadas durante 1 min em tampão PBS (0.1M hidrogenofosfato de sódio, 0.1 M di-hidrogenofosfato de potássio e 0.15 M cloreto de sódio), e tratadas durante 3 min com tampão TSKM (25 mM Tris-Cl pH 7.0, 100 mM cloreto de sódio, 50 mM cloreto de potássio, 5 mM cloreto de cálcio, 1 mM cloreto de fenilmetilsulfonilo) suplementado com 0.5 % de detergente Nonidet P-40. Procedeu-se à digestão enzimática do DNA com DNAse I (0.5 mg/ml) em tampão TSKM, durante 15 min a 22 ºC, tendo sido removida a cromatina com 6 passagens de 3 min em tampão Tris-Cl 30 mM pH 7.4 suplementado com 10 mM cloreto de magnésio, 0.4 M sulfato de amónio e 1 mM cloreto de metilfenilsulfonilo. As células foram lavadas com tampão TSKM durante

5 min com três mudanças, e com tampão PBS por 5 min. Em seguida procedeu-se à fixação com 2 % de paraformaldeído em PBS durante 4 min e equilibraram-se as preparações com metanol a -20°C. As lâminas foram desidratadas em metanol a -20°C durante 4 min e em acetona à mesma temperatura durante 2 min (Neves et al., 1999).

Bioquímica

Quantificação de corticosterona no soro por HPLC (cromatografia liquída de alta pressão)

Método adaptado de Haughey e Jusko 1988

Os animais foram sempre sacrificados por decapitação, tendo-se recolhido o sangue do tronco. O soro foi separado por centrifugação a 2500 rpm (1076 g) durante 10 min numa centrífuga de bancada Heraeus modelo Megafuge 1.0R, após 1 hora em repouso.

Por meio de pipeta automática foi medido um volume de 0.4 ml de soro para um tubo de ensaio de 20 ml, ao qual se adicionou dexametasona (concentração final de 2 μg/ml) usada como padrão interno. Após agitação no vórtex, deixou-se equilibrar durante 1 hora.

A extracção líquido-líquido de moléculas esteróides do soro foi efectuada com 8 ml de diclorometano (Merck-reagente para HPLC) por agitação vigorosa no vórtex durante 3 min. A fase aquosa foi removida, e a fase orgânica agitada no vórtex durante 2 min com 1 ml de solução aquosa

de hidróxido de sódio 0.1 M, para remoção de proteínas séricas. A fase aquosa foi de novo rejeitada e as moléculas polares removidas por agitação da fase orgânica com 2 ml de água bidestilada 2 min no vórtex. O diclorometano foi recuperado para um tubo de fundo cónico e evaporado sob uma corrente de azoto. O resíduo seco, foi ressuspenso em fase móvel da cromatografia, podendo ser conservado a -20° C.

A quantificação de corticosterona no soro dos ratos foi efectuada num equipamento de HPLC Waters, munido de uma coluna Nova-Pack C18 de fase reversa e pré-coluna compatível, e de um detector de absorvância a comprimento de onda fixo a 254 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura 2:3 de acetonitrilo (Merck-reagente para HPLC) em água tri-destilada, previamente filtrada e desgaseificada numa bomba de vácuo. As amostras foram ressuspensas em 0.4 ml de fase móvel e filtradas por cartuchos Millex-Millipore, tendo sido injectado um volume de 15 µl e calculada a razão da altura dos picos de corticosterona sobre dexametasona. Essa razão foi em seguida multiplicada por uma constante (calculada pela razão da altura dos picos de dexametasona sobre corticosterona de um padrão com 2 µg de dexametasona e 1 µg de corticosterona por ml). O valor da corticosterona sérica em ng/ml calculou-se multiplicando o valor encontrado anteriormente por 10^3.

Quantificação de DNA

Adaptado de métodos descritos por Burton 1968 e Schuchard et al. 1991

A quantidade de DNA foi determinada nas fracções de núcleos e matrizes nucleares, isoladas pelos métodos adaptados dos descritos por Kaufmann et al. em 1981 e Commerford et al. em 1986. Mediu-se com pipeta automática um volume da amostra bem homogeneizada e ajustou-se com água tridestilada a 0.3 ml. Adicionou-se 30 µl de ácido perclórico 3.3 M, e agitou-se a mistura no vórtex. O DNA foi desnaturado por incubação a 90°C num banho seco durante 1 hora, e arrefecimento em gelo. Procedeu-se a uma centrifugação a 2208 g durante 5 min numa centrífuga Heraeus Biofuge 13. O sobrenadante foi recolhido e o volume de cada amostra ajustado a 0.3 ml com ácido perclórico 0.3 M. Adicionou-se 0.8 ml de solução de difenilamina (1.5 g de difenilamina em 100 ml de ácido acético glacial com 1.5 ml de ácido sulfúrico) previamente suplementada a 0.5 % com acetaldeído a 1.6%. A reacção colorimétrica desenvolveu-se durante a noite à temperatura ambiente, e no dia seguinte a absorvância foi lida num espectrofotómetro Beckman DU 640 a 600 nm. A quantificação de DNA foi efectuada por intrapolação em recta padrão efectuada previamente com DNA de esperma de salmão.

Quantificação de proteínas

Adaptado do método descrito por Lowry et al. 1951

As amostras de núcleos e matrizes nucleares obtidas pelos métodos de Kaufmann et al. 1981 e de Commerford et al. 1986, foram pipetadas em duplicado para tubos de ensaio (10-50 µl), tendo sido o volume completado até 1 ml com água bidestilada. A cada tubo foi adicionado 3 ml de reagente cupro-alcalino (solução de 2 % m/v carbonato de sódio anidro, 0.02 % tartarato duplo de sódio e potássio em 0.1 M de hidróxido de sódio, adicionada a 2 % v/v de solução aquosa 0.5 % de sulfato de cobre acidificada com uma gota de ácido sulfúrico). A solução foi agitada no vórtex e manteve-se 10 min no escuro, à temperatura ambiente. A cada tubo adicionou-se 0.3 ml de reagente de fenol de "Folin-Ciocalteu" (Sigma, Co.) diluído a 50% em água destilada, tendo sido a mistura agitada de imediato no vórtex e mantida durante 30 min no escuro. A absorvância foi medida num espectrofotómetro Beckman DU 640 a 750 nm. A quantificação de proteínas foi efectuada por intrapolação em recta padrão realizada com soluções de albumina sérica bovina em concentrações conhecidas.

Imunocitoquímica

Os métodos de detecção de moléculas por imunocitoquímica foram efectuados em cortes de supra-renal, de 6 µm, e em células de supra-renal previamente dispersas e extraídas para obtenção das matrizes nucleares.

Imunocitoquímica em cortes histológicos de supra-renal de rato

As lâminas com os cortes de tecido foram desparafinadas em xilol durante 15 min, tendo sido tratadas sequencialmente, com soluções aquosas de etanol em concentrações descendentes, e água, durando cada incubação 10 min. As preparações foram, em seguida, incubadas numa solução de peróxido de hidrogénio a 5 % (v/v) em metanol durante 30 min e lavadas em água e tampão TBS (Tris Cl 0.05 M - pH 7.4, 150 mM cloreto de sódio) - duas lavagens de 5 min. Em seguida, o tecido foi submetido a hidrólise com ácido clorídrico 1 M, 20 min a 57°C, o qual foi neutralizado com tetraborato de sódio decahidratado 0.1 M durante 5 min, seguido de três lavagens de 5 min com tampão TBS. O bloqueio dos epítopos antigénicos nos cortes foi efectuado com soro normal de cabra a 10% em TBS durante 10 min, seguindo-se incubação com o anticorpo primário em câmara húmida (diluição indicada na tabela III), durante a noite, a 4°C. Seguiram-se três lavagens de 5 min com tampão TBS e prosseguiu-se o método de imunocitoquímica utilizando um Kit da Dako, que contém anticorpo secundário biotinilado e complexo estreptavidina/peroxídase, cuja revelação foi efectuada com 3,3´-diaminobenzidina e peróxido de hidrogénio. As preparações foram coradas 30 s com hemateína, desidratadas com soluções de etanol em água com concentrações ascendentes, xilol e montadas com resina de nome comercial Entellan.

Imunocitoquímica em matrizes nucleares

As matrizes nucleares em lâmina de vidro previamente fixadas e desidratadas foram incubadas durante 30 min em solução tampão PBS com 0.1 % p/v de glicina, sendo efectuadas seguidamente, três lavagens de 5 min cada com tampão PBS com 0.1% de Tween-20 v/v. O bloqueio dos epítopos de ligação inespecífica foi feito com a solução tampão utilizada anteriormente, suplementada com 2% v/v de gelatina de teleósteo, durante 15 min. A incubação com o anticorpo primário realizou-se durante a noite, a 4°C e em câmara húmida. O excesso de anticorpo primário foi removido por lavagens em tampão TBS seguindo-se o método imunocitoquímico, no qual foi usado o kit da Dako de forma idêntica à realizada para os cortes de parafina.

Métodos de análise molecular de Proteínas

Electroforese de proteínas

Adaptado de Laemmli 1970

As proteínas de núcleos e matrizes nucleares isoladas pelos métodos de Commerford et al. 1986 e Kaufmann et al. 1981 foram analisadas por electroforese unidimensional em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). A técnica foi realizada num equipamento para electroforese com tina vertical, Hoefer modelo SE-600.

O gel de resolução foi preparado a partir de uma mistura com Tris-Cl 0.375 M pH 8.8, 1% p/v de dodecilsulfato de sódio - SDS, 8 ou 10 % p/v de acrilamida e água bidestilada de modo a perfazer o volume de 30 ml. A polimerização foi induzida e catalizada com persulfato de amónio 1 % e N,N,N′,N′- tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0.4 ‰, respectivamente, demorando aproximadamente 1 hora a polimerizar à temperatura ambiente. Sobre o gel de resolução, colocou-se o gel de empacotamento "stacking gel", solução aquosa de Tris-Cl 0.125 M pH 6.8, 1 % p/v de SDS, 4 % p/v de acrilamida, persulfato de amónio 1 % e TEMED 1 ‰, que demora aproximadamente 1 hora a polimerizar à temperatura ambiente. Inseriu-se um pente entre as duas placas de vidro de modo a formar poços no gel superior, onde se aplicam as amostras de proteínas a analisar.

As amostras foram aplicadas nos poços após diluição a 50 % em tampão de amostra (Tris-Cl 0.1 M pH 6.8, 2 % 2-mercaptoetanol, 4 % SDS, 20 % glicerol e 0.2 % azul de bromofenol), aquecimento em água em ebulição durante 90s, e arrefecimento brusco em gelo.

A electroforese de proteínas foi efectuada usando um tampão 25 mM Tris-Cl, 0.1% SDS e 250 mM glicina, e aplicando uma intensidade de corrente constante e igual a 30mA por cada gel de 1.5 mm de espessura. Em simultâneo, separou-se em cada gel uma mistura de proteínas com valores de massa molecular conhecidos. A corrida da electroforese demora aproximadamente 4-5 horas e interrompe-se quando o azul de bromofenol se aproxima do extremidade do gel oposta aos poços. O gel é removido para corar (Coomassie Blue ou sais de prata) ou realizar Western blotting.

"Western blotting"

Adaptado do método descrito por Towbin et al. 1979 segundo a técnica descrita no manual de laboratório de Sambrook et al. 1989.

O método de "Western blotting" consiste na transferência de moléculas proteicas separadas previamente por electroforese para uma membrana de nitrocelulose.

Quando a separação de proteínas por electroforese se aproximou do fim, o gel foi retirado e colocado com todo o cuidado numa tina com tampão de transferência (Tris base 0.58 %, glicina 0.29 %, SDS 0.037 % e metanol 20%). A membrana de nitrocelulose Schleicher & Schuell com poro de 0.45 μm foi previamente cortada de tamanho semelhante ao do gel e equilibrada com água destilada antes de ser submersa no mesmo tampão. Foram cortadas quatro folhas de papel de filtro à medida do gel, e dentro da tina, com tampão de transferência, procedeu-se à montagem da cassete de transferência para evitar retenção de bolhas de ar entre as peças, o que impediria a transferência. Na cassete plástica Hoefer foram colocados os componentes na seguinte ordem; uma esponja, duas folhas de papel de filtro, o gel, a membrana de nitrocelulose, duas folhas de papel de filtro e outra esponja em perfeito alinhamento. A cassete de plástico foi fechada, e colocada na tina de transferência Hoefer TE 42 com a membrana orientada no sentido do ânodo. A corrente aplicada foi de 200 mA durante duas horas.

Após transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução aquosa de Ponceau S (Ponceau 2 %, ácido tricloroacético 30 %,

ácido sulfossalicílico 30 %) durante uns minutos e em seguida lavada com água destilada. A membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (leite em pó magro - Molico, Nestlé 2 %, anti-espuma A 0.01 %, azida de sódio 0.02 % em PBS) durante 30 min, de modo a bloquear os poros do filtro passíveis de ligar anticorpos de um modo inespecífico. A incubação com o anticorpo primário fez-se durante a noite em caixa hermeticamente fechada, sendo o anticorpo diluído em solução de bloqueio (ver tabela III).

No dia seguinte o filtro foi lavado três vezes em PBS, e uma vez em TBS (Tris.Cl 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl), sendo em seguida incubado com o anticorpo secundário marcado com peroxídase, durante 1 h com agitação. O anticorpo secundário foi diluído em TBS com 2 % de leite em pó magro, fazendo-se em seguida a revelação da peroxídase por reacção de peróxido de hidrogénio e 3,3´-diaminobenzidina, na presença de cloreto de cobalto 0.03 %. As bandas resultantes da revelação do blotting foram fotografadas com filme Ilford PANF 50 ASA a preto e branco.

Métodos de identificação de ácidos nucleicos

Hibridização *in situ* em cortes de supra-renal e células intactas dispersas

Adaptado do método descrito por Pringle et al. 1989

A detecção *in situ* das cadeias poli-adeniladas presentes em todos os RNAs mensageiros e seus precursores hnRNAs, ou seja, nos transcriptos mais abundantes da RNApolimerase II, foi feita em cortes de supra-renal e em células dispersas cito-centrifugadas. A sonda utilizada foi um oligonucleótido sintético de poli-timina fornecida pelos laboratórios Novocastra Lda..

Os cortes de supra-renal foram desparafinados em xilol, durante 10 minutos, tratados com soluções de concentração decrescente de etanol em água, e por fim com água (períodos de 3 min). Após a hidratação, os cortes foram digeridos com 20 μg/ml proteinase K durante 30 min a 37 C°. As preparações foram lavados com água (duas vezes 3 min) e desidratadas com etanol a 95% e álcool absoluto, sendo deixadas a secar ao ar. As células intactas citocentrifugadas foram tratadas da mesma forma, excluindo a desparafinação e hidratação iniciais.

Prosseguiu-se com a incubação com a sonda poli-timina conjugada a fluoresceína durante 2h a 37 °C, tendo-se lavado, em seguida, as preparações com tampão TBS com 0.1% de Triton X-100 (3 vezes 3 min). A área dos cortes foi delimitada com uma caneta hidrofóbica Dako e estes

incubados 10 min com solução de bloqueio (20% v/v de soro normal de coelho, 3 % p/v de albumina sérica bovina, 0.1 % v/v de Triton X-100 em TBS). Procedeu-se à incubação com anticorpo anti-fluoresceína, conjugado com fosfátase alcalina, e diluído a 1:200 em TBS com 3 % p/v de albumina sérica bovina e 0.1 % v/v de Triton X-100. Fez-se reagir a enzima fosfátase alcalina com substrato adequado durante a noite, do que resultou um produto de reacção de cor escura. As preparações foram coradas com hemateína de modo a contrastar com a marcação da hibridização *in situ*, e montadas em meio aquoso.

Hibridização *in situ* em matrizes nucleares

A hibridização *in situ* foi efectuada nas matrizes nucleares isoladas em lâmina de vidro, sendo o método equivalente ao utilizado nas células intactas e cortes de tecido. A hibridização com a sonda poli-timina iniciou-se imediatamente após a desidratação das matrizes nucleares com acetona (ver Métodos de isolamento de matrizes nucleares em lâmina de vidro, pág. 58).

Método de incorporação e detecção de bromo-uridina

Aos ratos controlo e estimulados com ACTH foi administrada, por injecção intramuscular, bromo-uridina 25 mg/Kg, 1 hora antes do sacrifício. A detecção foi efectuada por imunocitoquímica, usando um anticorpo anti-bromo-desoxiuridina que faz reacção cruzada.

Microscopia

Preparação de material biológico para microscopia de luz

As glândulas supra-renais foram fixadas em formaldeído tamponado a 10% durante 24 h; em seguida procedeu-se à desidratação com soluções aquosas de etanol a 70, 90 e 99 %, durante, 1 hora com 4 mudanças para cada solução. Foi efectuada uma incubação com benzol durante 30 a 45 min, e procedeu-se à inclusão em parafina.

Fizeram-se cortes de glândula com 6 μm de espessura num micrótomo Leica RM 2145, e montaram-se sobre lâminas revestidas com poli-L-lisina. Após coloração com hemateína ou realização de técnicas de imunocitoquímica ou hibridização *in situ*, as preparações foram observadas e fotografadas num microscópio de campo claro Nikon.

Preparação de material biológico para microscopia electrónica

As fracções de núcleos e matrizes nucleares isoladas pelos métodos anteriormente descritos foram fixadas com glutaraldeído a 2.5 % em tampão cacodilato 0.1 M pH 7.2 com 5 mM de CaCl durante 1 h, sendo mantidas durante a noite no mesmo tampão suplementado com 7 % de sacarose. Procedeu-se a uma post-fixação com tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato durante 1 h, e efectuou-se a desidratação com soluções de concentrações ascendentes de etanol em água e inclusão em Epon. Os cortes de microscopia electrónica foram realizados num ultramicrótomo LKB 2088 Ultrotome V, e contrastados com soluções aquosas de acetato de uranilo 5 min e citrato de chumbo 5 min. A observação foi efectuada num microscópio electrónico Jeol 100 B a 80 kV.

Tabela III

Diluição de anticorpos primários

Anticorpo	Técnica	Diluição
Anti - Lâminas A+C	Imunocitoquímica	1:400
Anti - Lâminas A+C	Western blotting	1:400
Anti - Lâmina B	Imunocitoquímica	1:400
Anti - Fibrilharina	Imunocitoquímica	1:20
Anti - Fibrilharina	Western blotting	1:100
Anti - Coilina	Imunocitoquímica	1:500
Anti - Coilina	Western blotting	1:500
Anti - PCNA	Imunocitoquímica	1:100
Anti - Myc	Imunocitoquímica	1:50
Anti - Bromo-desoxiuridina	Imunocitoquímica	1:100
Anti - Fos	Imunocitoquímica	1:250
Anti - Fos	Western blotting	1:2000

Resultados

Análise dos resultados relativos aos animais de experiência

Estimulação pela ACTH

Os animais utilizados, ratos adultos de 150-300 g, foram estimulados com hormona adrenocorticotrófica de uma forma aguda (injecção única, 2h e 18h) e crónica (injecção diária durante 15 dias consecutivos).

A observação macroscópica das glândulas supra-renais de todos os animais de experiência revelou que as glândulas dos ratos estimulados de forma crónica apresentavam um aumento de tamanho bastante significativo (em média 44 $\pm$ 2 mg/glândula vs. 15 $\pm$ 2 mg/glândula no controlo), e aspecto congestionado, quando comparadas com as dos animais controlo. Os cortes histológicos da glândula controlo, corados com hemateína, mostraram boa preservação e a habitual estrutura da glândula (Orth et al., 1992). As células da zona fasciculada, com núcleos redondos e volumosos, apresentavam nucléolo central e pouca heterocromatina (Fig. 1). O volume das células na estimulação aguda (2 h e 18 h) (Figs. 2 e 3) era semelhante ao dos controlos. Na estimulação crónica (Fig. 4), as células eram volumosas e vacuolizadas.

O peso dos ratos controlo e sujeitos a estimulação crónica foi avaliado tendo-se verificado, após 15 dias do início da experiência, um aumento médio do peso dos ratos controlo (injectados com soro fisiológico)

de 65 ± 11 % do seu peso inicial. O ratos injectados com Synacthen depósito apresentavam um aumento em média de 33 ± 7 % do seu peso inicial.

Doseamento de corticosterona no soro de rato por HPLC

Para avaliar a capacidade de resposta à hormona ACTH fez-se o doseamento da corticosterona plasmática no rato recolhendo o sangue do tronco de animais controlo e estimulados (tabela IV).

Tabela IV

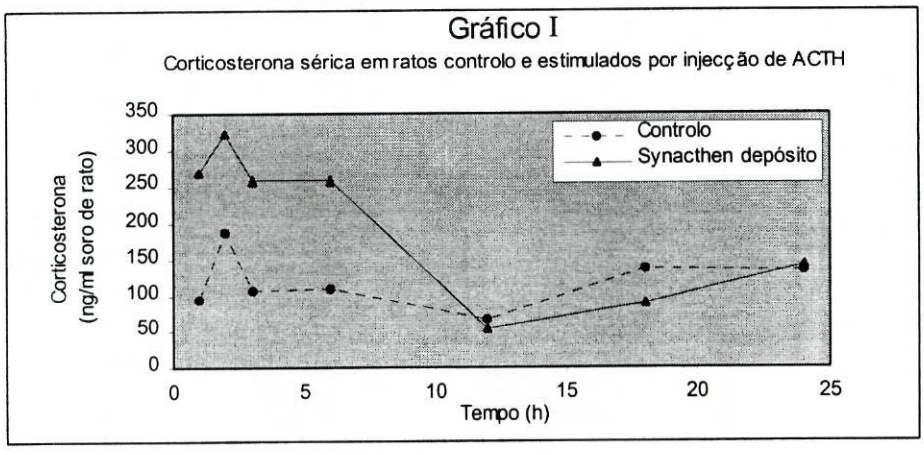
Corticosterona sérica em ratos controlo e estimulados pela ACTH

Tempo / Tipo Estimulação	Corticosterona ng/ml soro de rato Controlo	Synacthén depósito
Controlo	159 ± 21	
1 h	93 ± 18	270 ± 56
2 h	188 ± 19	322 ± 17
3 h	107 ± 48	258 ± 21
6 h	109 ± 58	259 ± 28
12 h	67 ± 21	52 ± 11
18 h	137 ± 18	90 ± 18
24 h	135 ± 49	143 ± 50
15 dias	81 ± 11	498 ± 27

Os valores de corticosterona apresentam desvios-padrão muito elevados devido à influência do stress e a variações inter-individuais.

Os valores da corticosterona sérica dos ratos controlo, nos vários tempos de experiência, apresentam variações que vão desde 188±19 em ratos injectados com soro fisiológico 2 h antes do sacrifício até 67±21 nos ratos injectados com soro fisiológico 12 h antes do sacrifício. A variação inter-individual é elevada em todos os tempos estudados, o que é evidenciado pelos elevados valores dos desvios-padrão.

A análise da variação dos valores de corticosterona ao longo do tempo (gráfico I), nos ratos estimulados pela ACTH, permite concluir que 1 hora após a injecção, os valores de corticosterona sérica sobem para valores significativamente superiores ao controlo (270 vs. 93 ng/ml). A corticosterona mantém valores elevados até às 6 h (259 ng/ml), ocorrendo uma descida entre as 6 e as 12 h (52 ng/ml) para valores inferiores ao controlo, mantendo-se baixa pelo menos até às 18 h. Às 24 h a corticosterona sérica apresenta sinais de recuperação para valores normais.



Na estimulação crónica os valores da corticosterona sérica aumentam para aproximadamente 6 vezes os valores dos ratos controlo (498 vs. 81 ng/ml).

Isolamento de núcleos e matrizes nucleares

Os resultados relativos ao isolamento de organelos pelos métodos clássicos de fraccionamento celular referem-se apenas a experiências dos controlos e das estimulações aguda (18 h) e crónica (15 dias).

Isolamento de núcleos celulares

Os núcleos isolados pelo método descrito por Blobel e Potter, em 1966, apresentaram um bom grau de pureza, tendo sido feita a avaliação da contaminação citoplasmática da actina, por Western blotting. O resultado foi negativo o que mostra elevada pureza da fracção nuclear.

Os núcleos isolados de células controlo, sem qualquer estimulação, foram observados em microscopia electrónica e revelaram um contorno bem definido, com todos os componentes do invólucro visíveis (Fig. 5) - as duas membranas - membrana externa com algumas vesículas de retículo apensas, membrana interna e lâmina nuclear (esta só é visível devido à distensão que os organelos sofrem durante a ultracentrifugação). Observam-se massas de heterocromatina, na proximidade do invólucro e pequenas massas no interior do núcleo. O nucléolo, ou nucléolos (nunca em número superior a 2) ocupam uma posição central e apresentam os seus componentes bem evidentes - os centros fibrilares de moderada densidade aos electrões, rodeados pelo componente fibrilar denso, bastante compacto e

electronodenso e o componente granular. É ainda visível o componente vacuolar no interior do nucléolo.

Observam-se grupos de grânulos intercromatínicos, em geral pouco evidentes em núcleos de células intactas, mas que após a ultracentrifugação se tornam facilmente visíveis (Fig. 5).

Os núcleos de células isoladas dos ratos controlo, injectados com soro fisiológico 18 h (Fig. 6) ou durante 15 dias (Fig. 7) antes do sacrifício não apresentam alterações morfológicas em relação aos controlos.

A estimulação aguda pela ACTH (18 h) provocou um aumento de volume dos nucléolos, tornando-se todos os seus componentes mais evidentes (Fig. 8) e numerosos. Durante a estimulação crónica (15 dias) não ocorre um aumento tão significativo do nucléolo (Fig. 9), tornando-se todavia, evidente uma diminuição da heterocromatina perinuclear.

Isolamento de matrizes nucleares

Método adaptado de Commerford et al., 1986.

As matrizes nucleares isoladas pelo método descrito por Commerford et al. foram sujeitas a tratamento enzimático com DNase I e com tampões de alta e baixa força iónica, não tendo sido, removidos os lípidos do invólucro nuclear, uma vez que não foi utilizado qualquer detergente. Deste modo, as matrizes nucleares isoladas de ratos controlo sem qualquer tratamento, apresentam o contorno bem definido, com os componentes do invólucro intactos (Fig. 10).

São evidentes as membranas nucleares, estando a membrana interna associada à lâmina nuclear fibrosa que se apresenta fina e electronodensa, à periferia do núcleo. Algumas vesículas de retículo endoplasmático associam-se às membranas do invólucro (Fig. 10).

O nucléolo apresenta-se semelhante ao dos núcleos isolados, com os compartimentos evidentes, distinguindo-se bem o componente fibrilar denso, e o componente granular. Observam-se grupos de grânulos intercromatínicos associados entre si por pequenas estruturas fibrilares. Estendendo-se do nucléolo até ao invólucro nuclear existe uma rede fibrilogranular que só se observa após a digestão enzimática da cromatina (Fig. 10).

Isolamento de matrizes nucleares

Método adaptado de Kaufmann et al., 1981.

O método de isolamento de matrizes nucleares descrito por Kaufmann et al. foi inicialmente descrito para as células de fígado. Neste trabalho testámos este método, e obtivemos matrizes nucleares do fígado de rato (Neves et al., 1993) sobreponíveis às obtidas por Kaufmann et al..

As matrizes nucleares das células do córtex da supra-renal do animal intacto obtidas por este método revelam a lâmina nuclear bem preservada em toda a periferia, com alguns resíduos de membranas do invólucro; o nucléolo é pequeno e compacto. Observam-se agrupamentos de

grânulos intercromatínicos e é visível uma rede fibrilogranular que se estende por toda a área do nucleoplasma (Fig. 11).

As matrizes nucleares isoladas a partir de animais injectados com soro fisiológico (às 18 h e 15 dias) apresentam semelhanças morfológicas às do animal intacto (Fig. 12 e 13, respectivamente).

As matrizes nucleares dos animais estimulados pela ACTH por um período de 18 h mostraram matrizes nucleares muito bem preservadas. A lâmina nuclear, na periferia do núcleo apresentava os complexos de poro nuclear bem conservados; os nucléolos estavam aumentados em relação aos controlos, e os seus componentes eram muito evidentes (Figs. 14 e 15). Observavam-se os centros fibrilares, rodeados pelo componente fibrilar denso, composto por finas fibrilas densas, e o componente granular constituído por grânulos associados. As matrizes apresentavam uma rede fibrilogranular que se estendia do nucléolo até à lâmina nuclear fibrosa. Os grânulos intercromatínicos eram numerosos.

As matrizes nucleares dos animais estimulados de forma crónica (15 dias) pela ACTH mostravam uma estrutura semelhante à dos controlo, ainda que o nucléolo e os respectivos componentes fossem mais evidentes. A lâmina nuclear e a rede fibrilogranular distribuiam-se na área correspondente ao nucleoplasma. Também eram evidentes numerosos grânulos intercromatínicos (Fig. 16).

Estudos moleculares - Quantificação de DNA

A quantificação do DNA foi efectuada pelo método descrito por Burton e os resultados estão representados na tabela V, relacionando a quantidade absoluta de DNA presente em núcleos e matrizes nucleares com a massa de tecido de supra-renal. Verifica-se que a dispersão dos resultados tanto entre grupos como dentro de cada grupo é elevada, o que é devido certamente à manipulação das fracções. O rendimento das técnicas de fraccionamento celular é em geral, muito baixo, pois ocorrem perdas nos passos intermédios (lavagens, centrifugações, ressuspensões). As perdas de material repercutem-se na quantidade absoluta de DNA das fracções, e consequentemente na razão quantidade de DNA/massa de tecido. Deste modo, teria sido incorrecto fazer médias dos valores obtidos nas várias experiências, pelo que os valores apresentados são os encontrados em experiências individuais.

A quantidade de DNA por mg de tecido da glândula varia entre 0.20 μg em núcleos estimulados de forma crónica pelo Synacthen depósito e 1.29 μg em núcleos de ratos controlo. Nas outras situações controlo (ratos injectados com soro fisiológico 18 h e 15 dias) a quantidade de DNA foi de 1.18 e 0.57 μg por mg, respectivamente. Nos ratos injectados por 18 h com Synacthen depósito encontrou-se um valor de 0.56 μg por mg de tecido (tabela V).

Nas matrizes nucleares obtidas a partir dos núcleos, quantificou-se o DNA, tendo-se relacionado a massa de tecido de supra-renal e a quantidade

de DNA presente nos núcleos da respectiva fracção (3ª coluna da tabela V). A percentagem de DNA recuperado na matriz nuclear nunca excedeu 15%. A dispersão da quantidade de DNA presente nas matrizes nucleares em relação à massa de tecido de supra-renal também é elevada variando entre 0.030 μg e 0.072 μg respectivamente, após estimulação crónica com ACTH e administração de soro fisiológico. Esta grande variação deve-se a perdas de material durante a preparação das fracções.

Deste modo, só se encontraram significativamente mais baixos os valores de DNA/massa de tecido medidos nas fracções de núcleos e matrizes nucleares estimulados pela ACTH de uma forma crónica (15 dias). As glândulas destes animais apresentavam-se muito aumentadas de volume, como já referimos.

Tabela V

Fracção/ Estimulação	Quantidade de DNA/ massa tecido µg/mg	Quantidade de DNA matriz nuclear/ quantidade de DNA núcleos x 100
Núcleos/Controlo	1.29	—
Núcleos/ 18h Sf	1.18	—
Núcleos/Crónica Sf	0.57	—
Núcleos/18h Sy	0.56	—
Núcleos/Crónica Sy	0.20	—
Matrizes /Controlo	0.066	5%
Matrizes / 18 h Sf	0.071	6%
Matrizes/Crónica Sf	0.072	13%
Matrizes /18 h Sy	0.039	7%
Matrizes/Crónica Sy	0.030	15%

Controlo - Sem qualquer estimulação; 18h Sf - injecção de soro fisiológico com sacrifício às 18 h; Crónica Sf -injecção de soro fisiológico durante 15 dias; 18 h Sy - injecção de Synacthen com sacrifício às 18 h; Crónica Sy - injecção de Synacthen durante 15 dias

Estudos moleculares - Análise de proteínas

Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas nas fracções de núcleos e matrizes usando o método descrito por Lowry et al. em 1951. Os resultados estão indicados na tabela VI. Da mesma forma que na quantificação de DNA, os valores absolutos de proteínas variam, devido à má recuperação do material durante a manipulação e não a perdas moleculares selectivas. Os valores apresentados na tabela VI são os encontrados em experiências individuais.

A quantidade de proteína medida nas fracções nucleares, por mg de tecido, é bastante variável, indo desde 0.60 μg nas fracções isoladas de ratos estimulados de forma crónica pelo Synacten até 4.17 μg nos ratos injectados durante 18 h (tabela VI).

A quantificação de proteínas nas fracções de matrizes nucleares isoladas a partir das fracções de núcleos permitiu avaliar não só a quantidade absoluta de proteínas nas fracções como a percentagem de recuperação de proteínas nucleares na matriz (3ª coluna da tabela VI). Os resultados apresentam uma dispersão grande, desde 0.13 μg nas matrizes nucleares de ratos estimulados de forma crónica com Synacthen depósito, a 1.67 μg nas matrizes nucleares de ratos controlo (tabela VI). Os valores encontrados nas outras fracções são valores intermédios e bastante próximos (0.32-0.34 μg). Percentualmente, a quantidade de proteínas recuperada na matriz nuclear também é bastante variável (8 a 42 %) (tabela VI).

Os valores mais baixos de proteínas presentes tanto nas fracções de núcleos como nas fracções de matrizes nucleares, apesar das variações encontradas, são os relativos às fracções dos animais estimulados cronicamente com Synacthen, resultados que estão de acordo com os obtidos com a quantificação de DNA (tabela V).

Tabela VI

Fracção/ Estimulação	Quantidade de proteína/ massa tecido µg/mg	Quantidade de proteína matriz nuclear/ quantidade de proteína núcleos x 100
Núcleos/Controlo	3.99	—
Núcleos / 18h Sf	3.64	—
Núcleos/Crónica Sf	1.15	—
Núcleos/ 18h Sy	4.17	—
Núcleos/Crónica Sy	0.60	—
Matrizes/Controlo	1.67	42 %
Matrizes/18 h Sf	0.34	9 %
Matrizes/Crónica Sf	0.32	27%
Matrizes/18 h Sy	0.34	8 %
Matrizes/Crónica Sy	0.13	21%

Electroforese de proteínas

A separação de proteínas foi efectuada por electroforese de SDS-poliacrilamida em gel de 8 % de acrilamida. O perfil de péptidos observado nas fracções de núcleos controlo - (Fig. 17 - a e b) revela que os péptidos mais abundantes são os de massas moleculares de 45 e 55 kDa, assim como as histonas, de menor massa molecular. Nas fracções de núcleos isoladas de ratos estimulados pela ACTH durante 15 dias (Fig. 17 - c) o perfil de proteínas é sobreponível às fracções controlo (Fig. 17 - a e b), sendo as proteínas mais abundantes as mesmas referidas para as fracções controlo.

O perfil de péptidos da matriz nuclear, separados por electroforese, revela nas fracções controlo isoladas, quer pelo método de Commerford et al. (Fig. 17 - d), quer pelo método de Kaufmann et al. (Fig. 17 e e f), que as proteínas de 45 e 55 kDa se mantêm visíveis, a par de uma proteína de 126 kDa. As histonas não estão presentes, devido à prévia digestão da cromatina, nas fracções nucleares. Não é possível observar diferenças significativas dos péptidos entre fracções isoladas de animais controlo e de animais estimulados por 15 dias com ACTH (Fig. 17 - f e g).

"Western blotting"

A técnica de "Western blotting" permitiu identificar alguns péptidos presentes nas fracções de núcleos e matrizes nucleares. Na generalidade, as

proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida a 10%, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

Lâminas nucleares A+C

A detecção das lâminas A+C foi efectuada nas fracções de núcleos e de matrizes nucleares de animais controlo (Fig. 18 - a e c) e de animais estimulados 12 h pela ACTH (Fig. 18 - b e d). Foram detectadas duas bandas com massas moleculares de 65 e 80 kDa, que correspondem respectivamente às lâminas C e A.

Fibrilharina

A detecção da proteína fibrilharina foi feita por "Western blotting" apenas nos núcleos e matrizes nucleares dos animais controlo. Em ambas as fracções foi detectada uma banda com 34 kDa que corresponde provavelmente à proteína nucleolar (Fig. 19 - a e b).

Coilina

A proteína coilina foi pesquisada por "Western blotting" após separação das proteínas por electroforese e transferência para membrana de nitrocelulose. Foi detectada uma banda com 80 kDa tanto nas fracções de núcleos controlo como estimulados 18 h pela ACTH (Fig. 20 - a e b); nas

fracções das matrizes nucleares (Fig. 20 - c e d) foi detectada uma banda com 80 kDa sendo a intensidade da banda isolada dos animais controlo (Fig. 20 - c) inferior à dos animais estimulados 24 h pela ACTH (Fig. 20 - d).

Proteína Fos

O produto do gene c-fos, a proteína Fos, assim como péptidos com ela relacionados imunologicamente, foram pesquisados nas proteínas de núcleos e matrizes nucleares separadas por electroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Uma proteína de 55 kDa foi detectada somente nas fracções das matrizes nucleares (Fig. 21 - c e d) sendo a banda mais intensa correspondente a animais estimulados 24 h com ACTH (Fig. 21 - d). As fracções nucleares não apresentam bandas detectáveis (Fig. 21 - a e b) quer nos controlos quer nos animais estimulados 24 h com ACTH.

Isolamento de matrizes nucleares *in situ*

As matrizes nucleares foram isoladas *in situ* a partir de células previamente dissociadas e apresentaram, em qualquer das situações experimentais (controlo, estimulação com ACTH 2 h, 18 h e 15 dias), boa preservação morfológica (Figs. 22 - 25). As matrizes coradas com hemateína apresentavam lâmina nuclear periférica, nucléolo e rede fibrilogranular intacta. Não se observam diferenças morfológicas significativas entre as matrizes nucleares isoladas a partir das células

glandulares de ratos controlo (Fig. 22) e estimulados de forma aguda (2 e 18 h) e de forma crónica (Figs. 23 - 25), respectivamente.

Imunocitoquímica

Lâminas A+C

A pesquisa das lâminas A + C foi efectuada conjuntamente já que estas duas proteínas apresentam estrutura homóloga e partilham epítopos antigénicos. A detecção imunocitoquímica destas proteínas nas matrizes nucleares dos animais controlo, revelou uma banda corada à periferia correspondente à lâmina nuclear fibrosa (Fig. 26). A estimulação hormonal pela ACTH, quer a estimulação aguda (2 e 18 h) (Figs. 27 e 28) quer a crónica (Fig. 29) não alterou a estrutura da lâmina nuclear fibrosa quando comparada com a matriz controlo (Fig. 26).

Lâmina B

A detecção da lâmina B, por imunocitoquímica, nos animais controlo, revelou uma banda corada à periferia das matrizes nucleares, correspondente à lâmina nuclear fibrosa (Fig. 30). A banda respeitante à lâmina B, é menos intensa que a das lâminas A+C correspondendo a um único tipo de proteína. Não há diferenças acentuadas entre as matrizes

nucleares isoladas após estimulação aguda (2 h e 18 h) (Figs. 31 e 32) e crónica (Fig. 33).

Fibrilharina

A proteína nucleolar fibrilharina foi detectada nas matrizes nucleares usando um anticorpo específico que marca não só a fibrilharina nucleolar como a do corpo espiralado ou corpo de Cajal. Nas células de animais controlo observou-se a marcação nítida do nucléolo e de alguns corpos espiralados (Fig. 34).

Após estimulação por 2 h com ACTH a marcação do nucléolo não se modifica (Fig. 35); todavia às 18 h (Fig. 36) o nucléolo e os corpos espiralados apresentam marcação intensa, sendo bem evidentes. Este aspecto corresponderá às imagens obtidas em microscopia electrónica onde se salientavam os componentes do nucléolo neste tempo de estimulação (Figs. 14 e 15). Na estimulação crónica a marcação da fibrilharina é intensa mas os nucléolos não são tão volumosos como às 18 h (Fig. 37).

Coilina

A coilina é uma proteína que se localiza no corpo de Cajal, embora possa ser detectada, numa forma difusa, no nucleoplasma. A detecção imunocitoquímica da coilina em matrizes nucleares de animais controlo mostrou os corpos espiralados associados à matriz (Fig. 38). Em regra,

observam-se 1 a 6 corpos espiralados por núcleo, número que se mantém na estimulação aguda (2 h) pela ACTH (Fig. 39). Às 18 h (Fig. 40) e na estimulação crónica (Fig. 41), verifica-se um aumento do número de corpos espiralados, sendo superior na estimulação crónica (em média, 8 e 10 por núcleo, respectivamente).

Proteína Fos

Pesquisou-se a proteína Fos em cortes histológicos de glândula, e em matrizes nucleares. Nos cortes histológicos dos ratos controlo, a marcação foi nula (Fig. 42); na estimulação aguda (2h) (Fig. 43) a proteína Fos foi evidenciada no núcleo, todavia na estimulação crónica, a marcação era escassa (Fig. 44). Nas matrizes nucleares só foi possível detectar a proteína Fos nos ratos estimulados 2 h pela ACTH, sendo contudo muito ligeira a marcação (Fig. 45). Na estimulação aguda de 18 h (Fig. 46) e na estimulação crónica, a marcação era inexistente.

Proteína Myc

A proteína Myc foi pesquisada por imunocitoquímica, em cortes histológicos e em matrizes nucleares. Nos cortes histológicos, a proteína foi detectada tanto nos animais controlo (Fig. 47) como nos estimulados 2 h, 18 h e 15 dias (Figs. 48 - 50) respectivamente. Nas matrizes, a marcação

manteve-se sempre associada à matriz nuclear após extracção e em todos os tempos estudados (controlo, 2 h, 18 h e 15 dias) (Figs. 51 - 54).

PCNA

A detecção da proteína PCNA foi efectuada quer em cortes histológicos quer em matrizes nucleares. Nos cortes da glândula supra-renal dos animais controlo, alguns núcleos apresentaram boa marcação (Fig. 55), sendo o número de núcleos marcados superior nos ratos estimulados 2 h (Fig. 56), 18 h (Fig. 57) e 15 dias (Fig. 58). Após a estimulação crónica praticamente todos os núcleos apresentaram marcação (Fig. 58).

Nas matrizes nucleares não se obteve marcação, em qualquer dos tempos estudados (controlo e estimulação).

Hibridização *in situ* das cadeias Poli-A

Para a realização desta técnica, usou-se uma sonda complementar - poli-timina que foi aplicada a cortes histológicos e a matrizes nucleares. Como controlo experimental usou-se uma sonda não específica, tendo-se verificado que, tanto nos cortes de tecido como nas matrizes, a marcação foi nula (Figs. 59 e 64).

Nos cortes histológicos dos animais controlo, a hibridização com sonda poli-timina observou-se no núcleo e no citoplasma, traduzida pela presença de granulações escuras correspondentes a RNAm e seus

precursores (Fig. 60). A marcação observada foi muito mais intensa nos cortes de animais sujeitos a estimulação pela ACTH, seja a estimulação aguda (2 h e 18 h) (Figs. 61 e 62) seja crónica (Fig. 63).

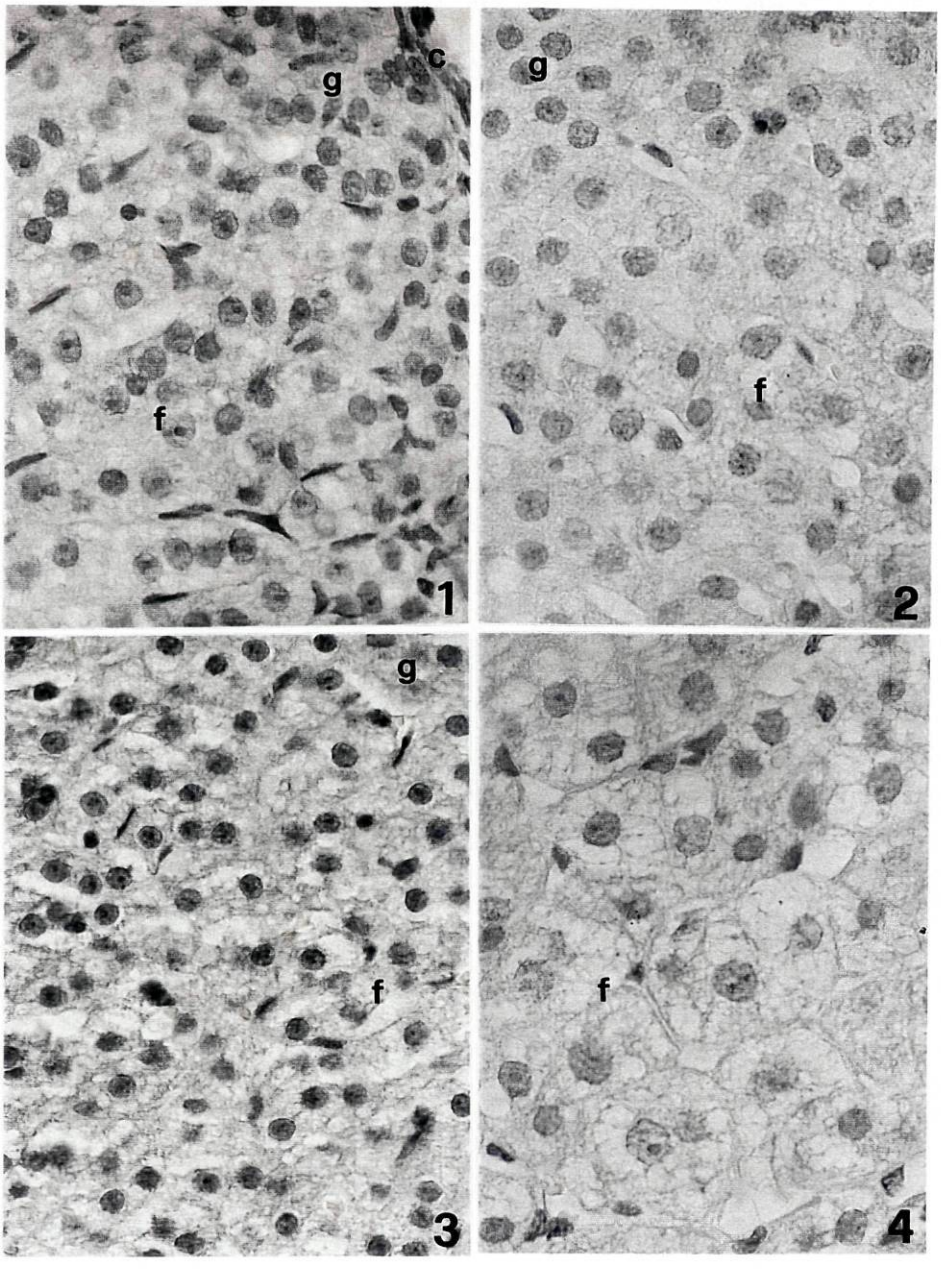
Nas matrizes nucleares observou-se marcação nos controlos a qual se traduzia por granulações escuras semelhantes às referidas anteriormente (Fig. 65) e que eram mais intensas após estimulação pela ACTH (Figs. 66 - 68). A intensidade da marcação é máxima às 2 h de estimulação hormonal, tanto nas células inteiras (Fig. 61) como nas matrizes nucleares (Fig. 66).

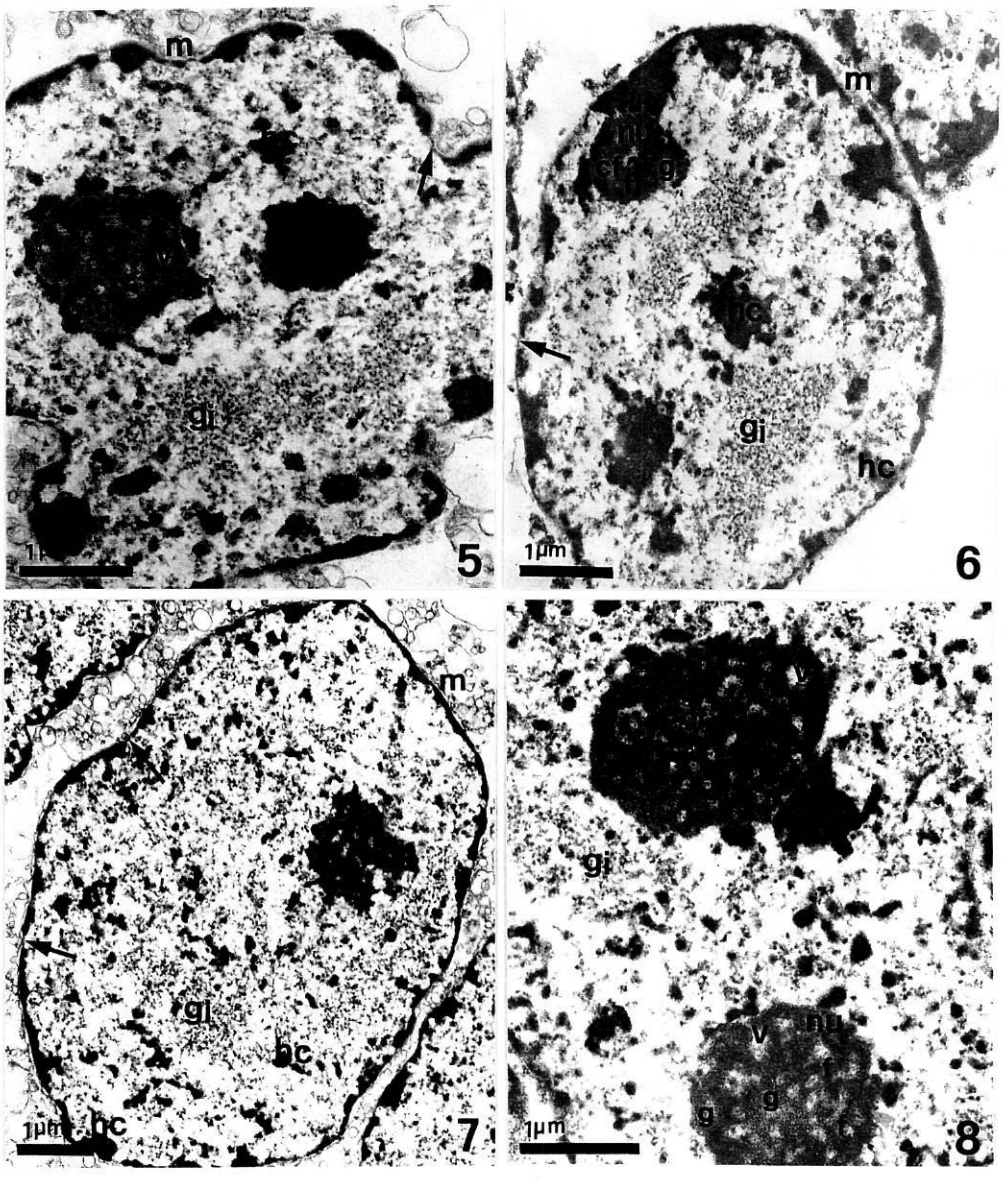
Detecção da incorporação da Bromo-uridina

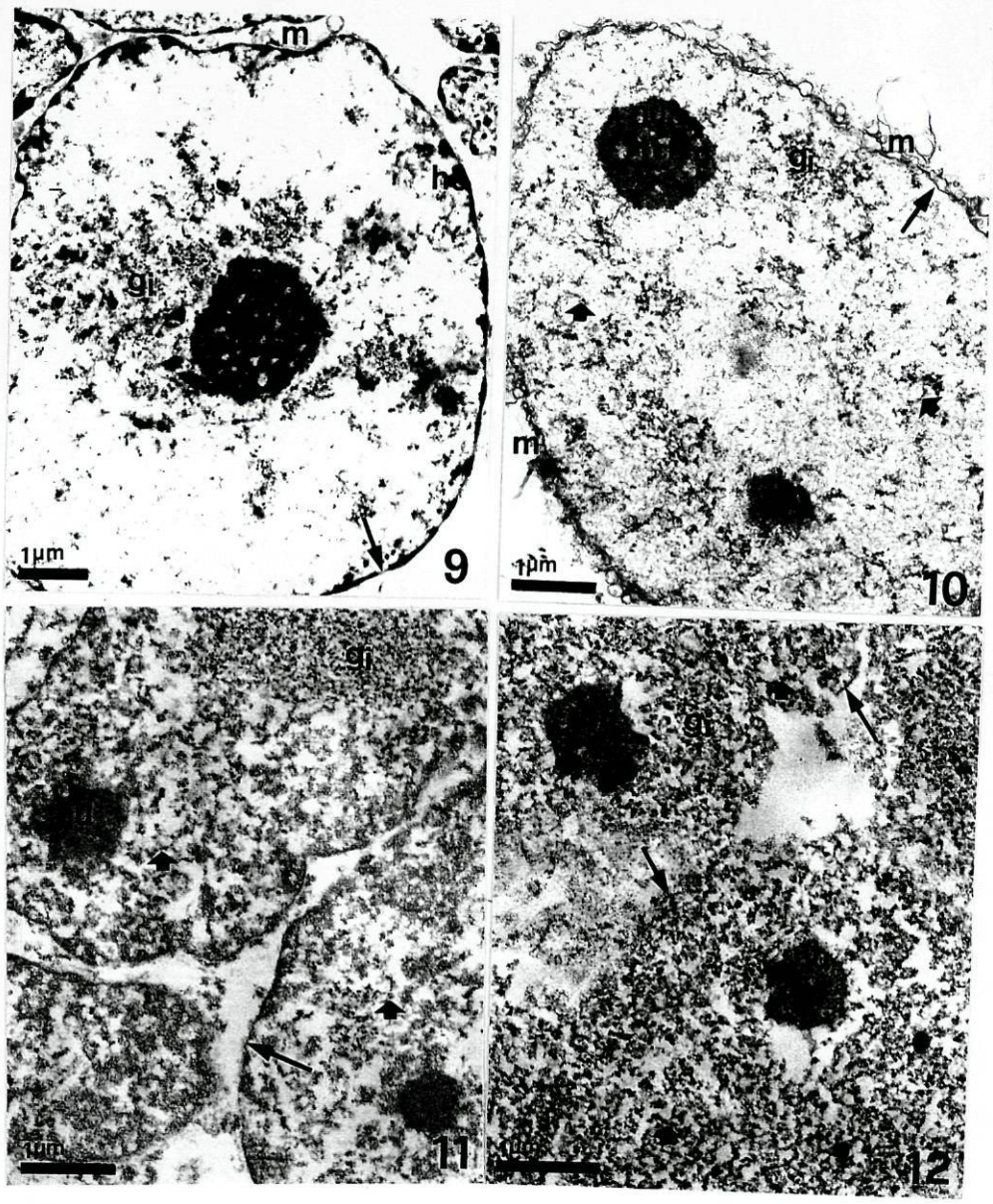
A bromo-uridina administrada foi detectada com anticorpo anti-bromo-desoxiuridina o qual faz reacção cruzada com a bromo-uridina. Nos cortes histológicos dos animais controlo a marcação foi escassa (Fig. 69), enquanto nos animais estimulados (2 h e 18 h) a marcação era evidente (Fig. 70 e 71). Na estimulação crónica os núcleos mostraram uma incorporação acentuada da bromo-uridina, apresentando-se todos marcados (Fig. 72).

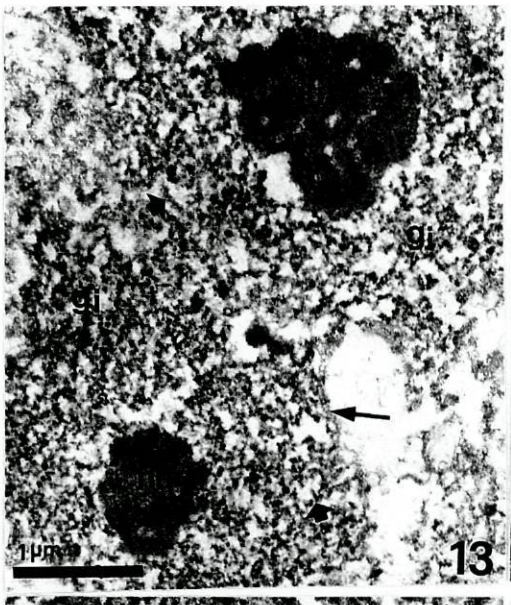
Nas matrizes nucleares dos animais controlo a detecção da bromo-uridina pelo anticorpo foi negativa (Fig. 73). Todavia, nas matrizes nucleares de ratos estimulados pela ACTH (2 h, 18 h e forma crónica) a bromo-uridina incorporada foi sempre detectada em associação com a matriz nuclear (Figs. 74 - 76).

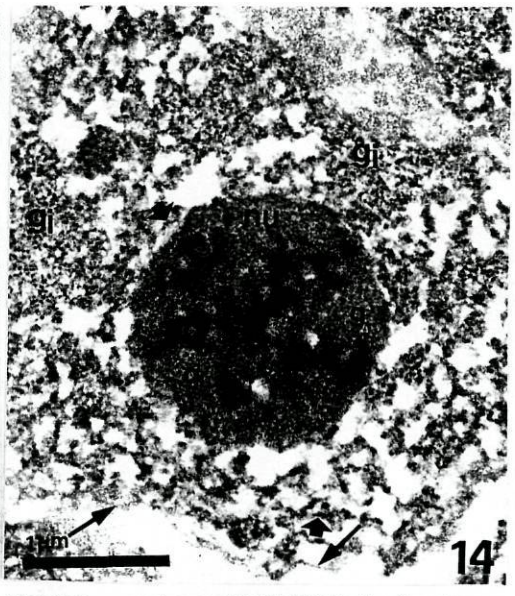
Imagens e legendas

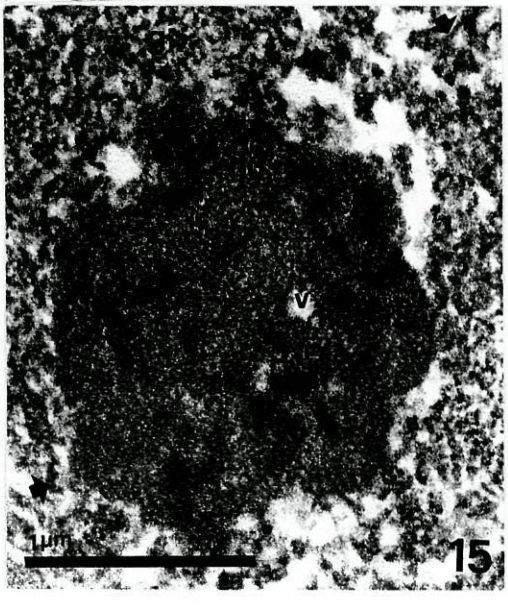

g
c
f
1
g
f
2
g
f
3
f
4

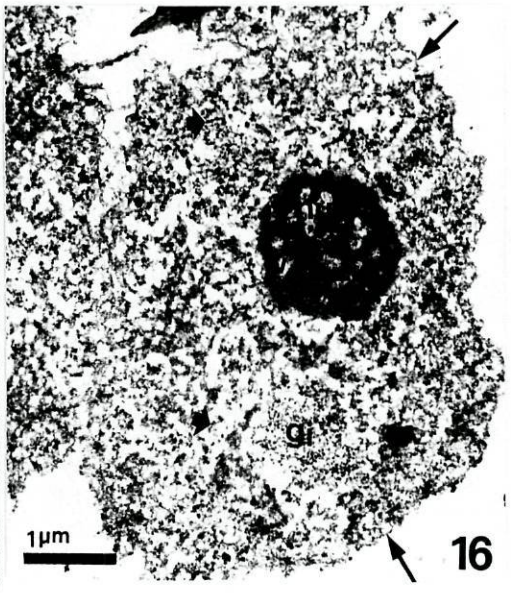

m
gi
1µm
5
m
nu
gi
hc
gi
hc
1µm
6
m
gi
hc
hc
1µm
7
gi
v
nu
g
g
1µm
8

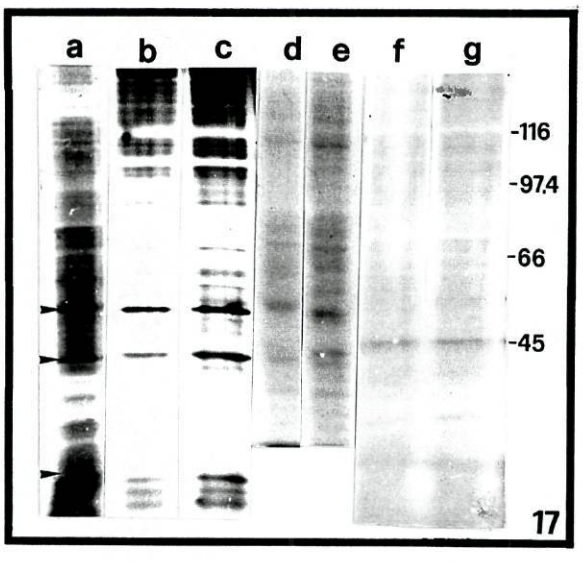

m
gl
1µm
9
gl
m
m
1µm
10
gl
m
11
gl
12

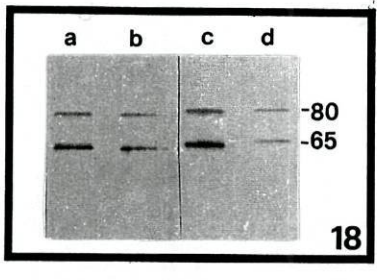

gl
gl
1µm
13


gl
gl
1µm
14

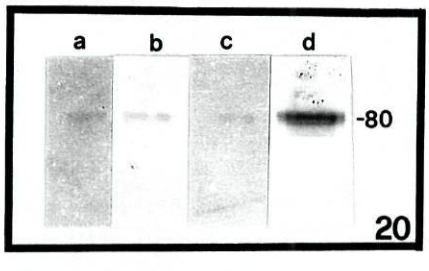

v
1µm
15

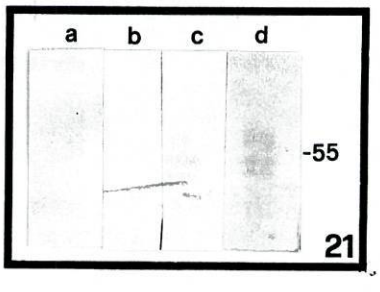

gl
1µm
16

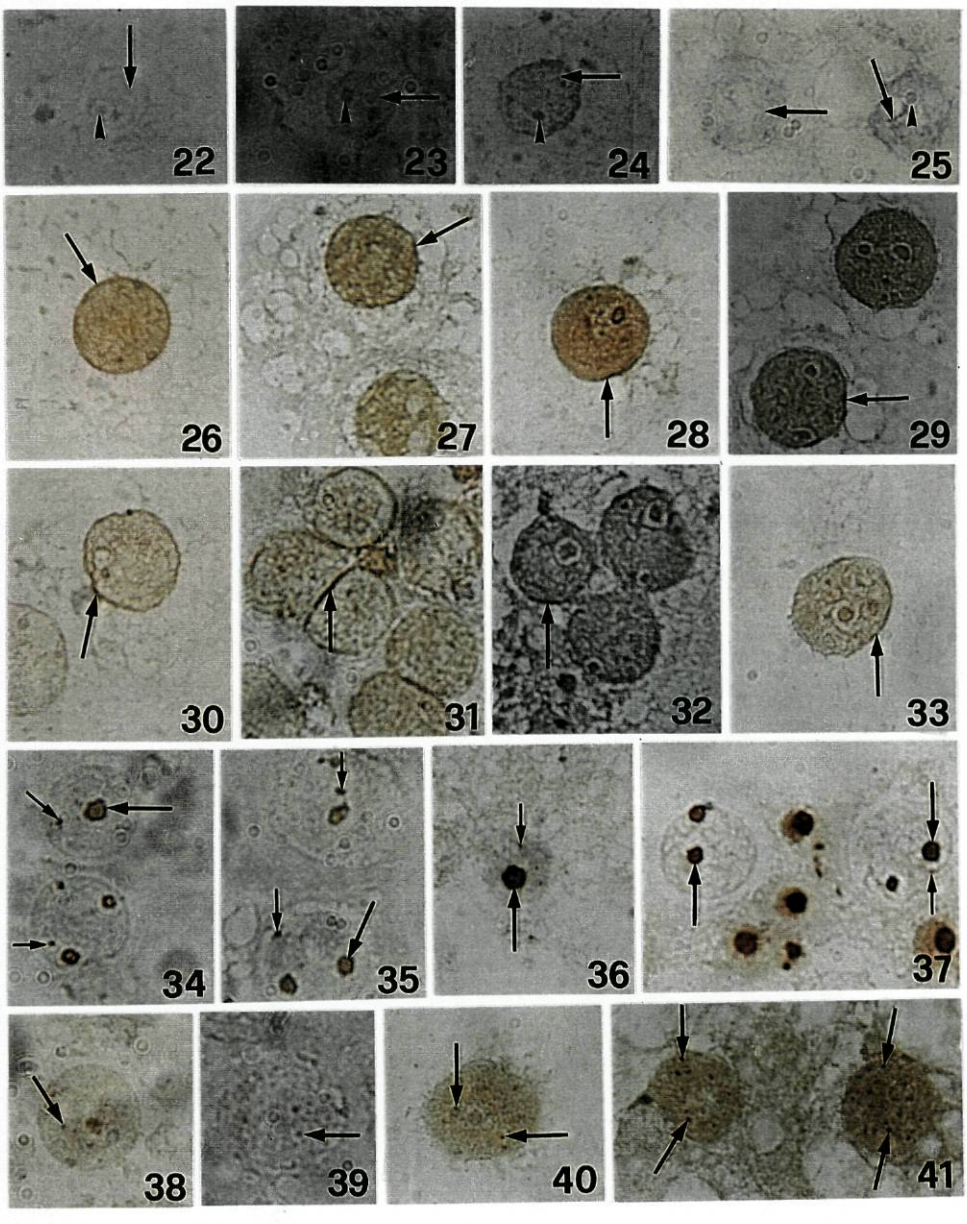

a b c d e f g
-116
-97.4
-66
-45
17

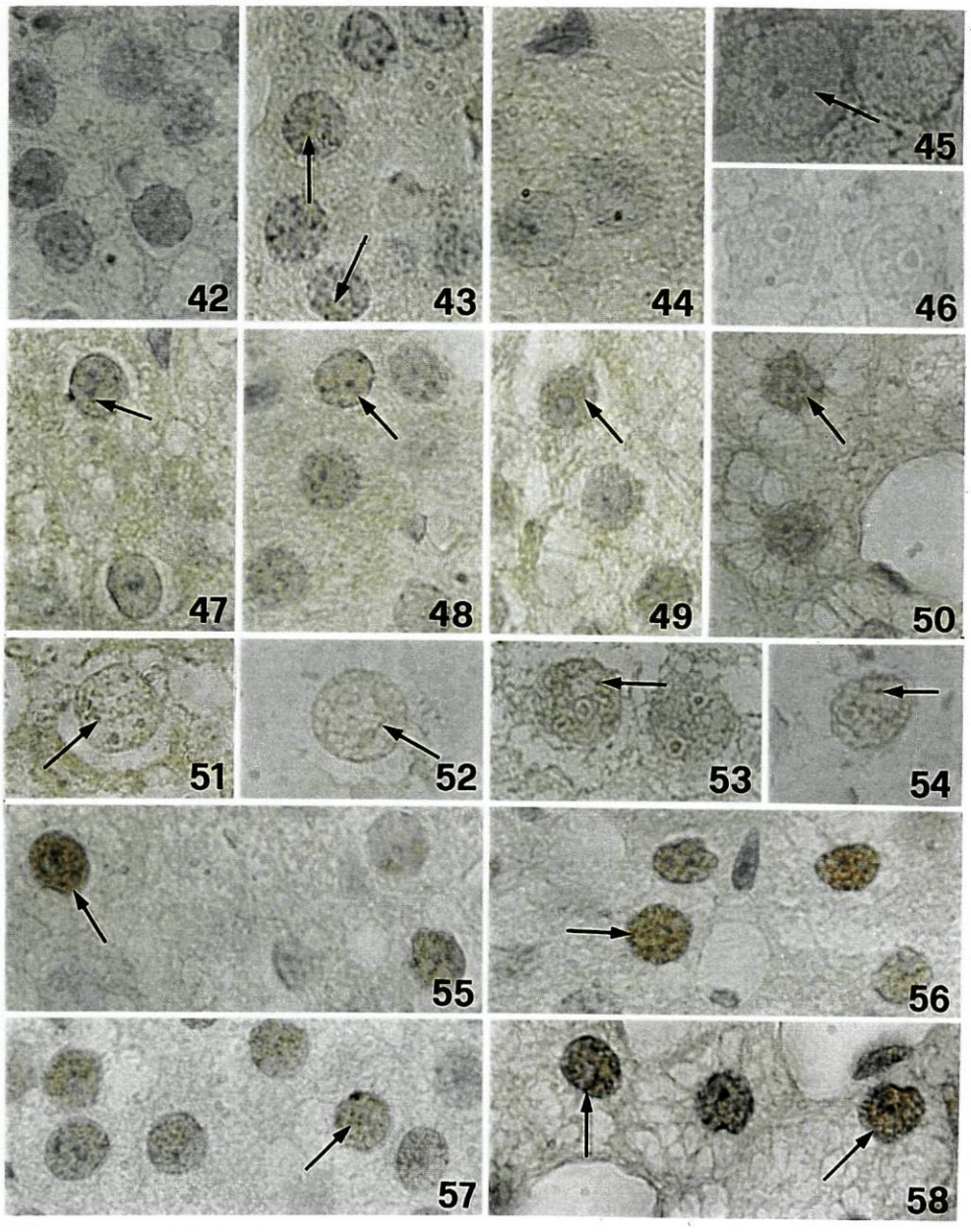

a b c d
-80
-65
18


a b
-34
19


a b c d
-80
20


a b c d
-55
21


22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41


42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

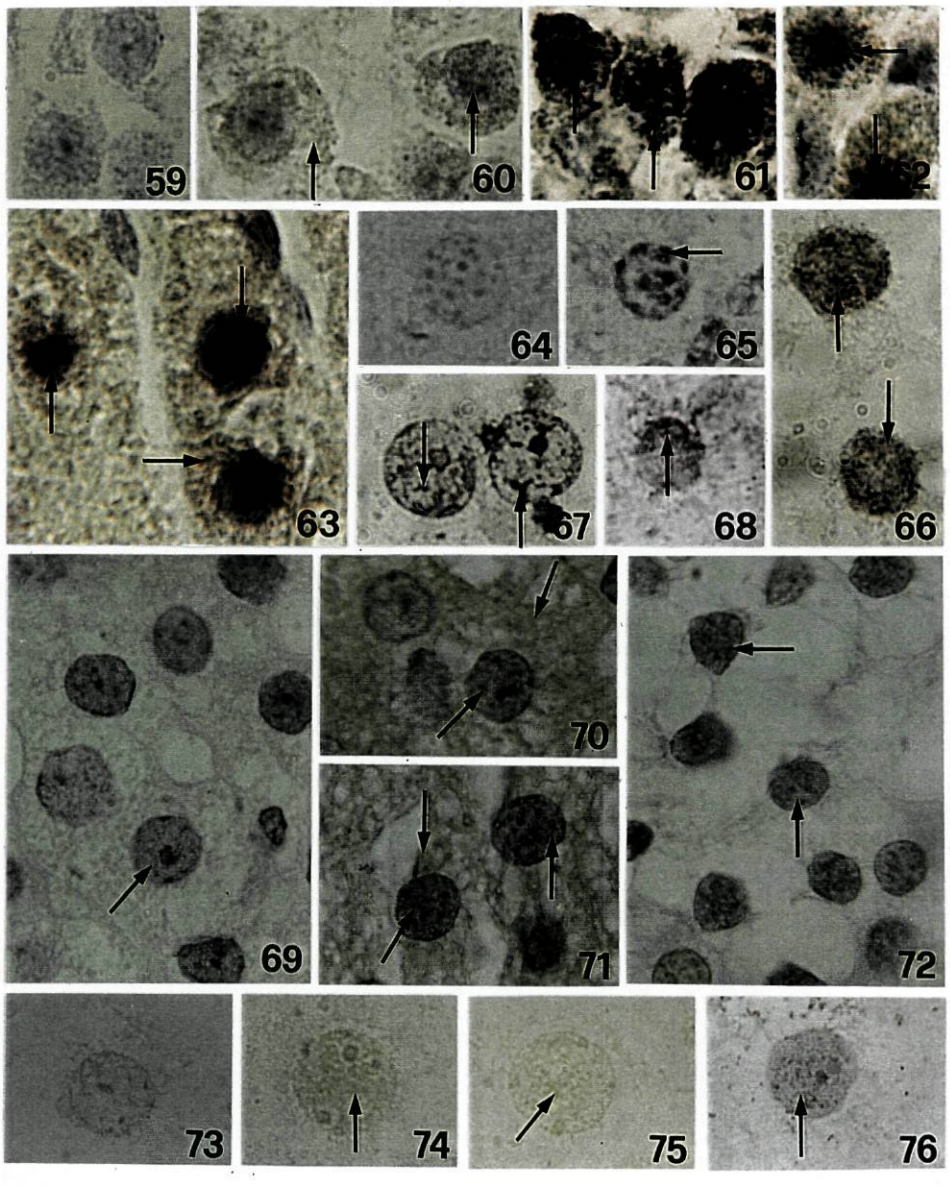

59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76

Fig. 1 a 4 - Cortes histológicos de glândula supra-renal corados com hemateína. As glândulas foram removidas de ratos controlo (Fig.1), injectados com ACTH por 2h (Fig. 2), por 18h (Fig. 3) e por 15 dias (Fig. 4) - observa-se a cápsula (c), a zona glomerulosa (g) e a zona fasciculada (f). Notar o aumento de volume das células que apresentam um aspecto lacunar, assim como do espaço intersticial, na estimulação crónica (Fig. 4). Hemateína. 420 X.

Fig. 5 a 7 - Núcleos de células do córtex da supra-renal isolados pelo método de Blobel e Potter; controlo sem injecção (Fig. 5), injecção de soro fisiológico 18 h (Fig. 6) e durante 15 dias (Fig. 7). De notar boa preservação dos núcleos, onde se vê o invólucro nuclear com as membranas (m) e a lâmina nuclear fibrosa (seta), massas de heterocromatina (hc), o nucléolo (nu) com centro fibrilar (cf), componente fibrilar denso (f), componente granular (g) e componente vacuolar (v), e grânulos intercromatínicos (gi).

Fig. 8 - Núcleo de célula da supra-renal de rato injectado com ACTH 18 h antes do sacrifício. Notar a presença de dois nucléolos (nu) do tipo reticular, que se apresentam bastante aumentados de tamanho com os vários componentes evidentes; centro fibrilar (cf), componente fibrilar denso (f), componente granular (g).

Fig. 9 - Núcleo de célula da supra-renal de rato injectado com ACTH de uma forma crónica. O nucléolo ocupa posição central e não se encontra aumentado de volume.

Fig. 10 - Matriz nuclear isolada de animais controlo pelo método de Commerford et al. 1986. Observa-se o invólucro nuclear com membranas (m) e lâmina nuclear fibrosa (seta), assim como dois nucléolos residuais (nu) com os seus componentes, grânulos intercromatínicos (gi) e a rede fibrilogranular (cabeça de seta).

Fig. 11 a 13 - Matrizes nucleares isoladas pelo método descrito por Kaufmann et al. 1981; em animais controlo sem injecção (Fig. 11), e injectados com soro fisiológico 18 h (Fig. 12) e 15 dias (Fig. 13). Observa-se a lâmina nuclear fibrosa (seta), nucléolo residual (nu), grânulos intercromatínicos (gi) e a rede fibrilogranular (cabeça de seta).

Fig. 14 e 15 - Matrizes nucleares isoladas pelo método descrito por Kaufmann et al. 1981; ratos injectados com ACTH por 18 h. Observa-se aumento do nucléolo residual (nu) com todos os seus componentes evidentes, centro fibrilar (cf), componente fibrilar denso (f) e componente granular (g). Há aumento do número de grânulos intercromatínicos (gi).

Fig. 16 - Matriz nuclear de ratos estimulados de uma forma crónica com ACTH, isolada pelo método de Kaufmann et al. 1981.

Fig. 17 - Electroforese unidimensional de proteínas em gel de 8 % de poliacrilamida. Coluna a) fracção de núcleos de ratos controlo; b) fracção de núcleos de ratos injectados com soro fisiológico durante 15 dias; c) fracção de núcleos isolados de ratos injectados com ACTH durante 15 dias; d) fracção de matriz nuclear de ratos controlo isolada pelo método de Commerford et al. 1986; e),f) e g) fracções de matrizes nucleares isoladas pelo método de Kaufmann et al. respectivamente de ratos controlo, injectados com soro fisiológico durante 15 dias, e com ACTH durante 15 dias. Não se verifica variação significativa entre as fracções isoladas de animais controlo e estimulados, sendo as proteínas mais abundantes as que apresentam massa molecular de 45 e 55 kDa e as histonas (cabeça de seta).

Fig. 18 - "Western blotting" para detecção das Lâminas nucleares A+ C. Colunas a) fracção de núcleos de animais controlo; b) fracção de núcleos de animais injectados por 12 h com ACTH; c) fracção de matrizes nucleares isoladas de ratos controlo; d) fracção de matrizes nucleares isoladas de ratos injectados por 12 h com ACTH. Observam-se duas bandas, com 65 e 80 kDa, em todas as fracções, que correspondem respectivamente às lâminas nucleares C e A.

Fig. 19 - "Western blotting" para detecção da proteína fibrilharina. Colunas a) fracção de núcleos isolada de ratos controlo; b) fracção de matriz nuclear isolada de ratos controlo. Em ambas as fracções observa-se uma banda de 34 kDa que corresponde à fibrilharina.

Fig. 20 - "Western blotting" para detecção da proteína coilina. Colunas a) fracção de núcleos isolados de ratos controlo; b) fracção de núcleos isolados de ratos estimulados por 18 h com ACTH; c) fracção de matriz nuclear de ratos controlo; d) fracção de matriz nuclear isolada de ratos estimulados por 24 h. Observa-se em todas as colunas uma banda com 80 kDa correspondente à proteína coilina, sendo mais acentuada na fracção d).

Fig. 21 - "Western blotting" com detecção da proteína Fos. Colunas a) fracção de núcleos isolados de animais controlo; b) fracção de núcleos isolados de ratos injectados com ACTH por 24 h; c) fracção de matrizes nucleares isoladas de animais controlo; d) fracção de matrizes nucleares isoladas de ratos estimulados com ACTH por 24 h. Nas fracções de matriz nuclear c) e d) observa-se uma banda com 55 kDa que corresponde à proteína Fos ou a um péptido relacionado imunologicamente.

Fig. 22 a 25 - Matrizes nucleares isoladas das células de supra-renal de rato, controlo sem injecção (Fig. 22), e injectados com ACTH por 2 h (Fig. 23), 18 h (Fig. 24) e 15 dias (Fig. 25). A morfologia nas várias situações é semelhante, observando-se o nucléolo (cabeça de seta) e a rede fibriligranular (seta) na área do nucleoplasma. Hemateína. 1050 X.

Fig. 26 a 29 - Imunocitoquímica para detecção das lâminas A+C em matrizes nucleares de células de supra-renal isoladas de ratos controlo (Fig. 26) e injectados com ACTH por 2 h (Fig. 27), 18 h (Fig. 28) e 15 dias (Fig. 29). Em todas as preparações observa-se uma banda castanha à periferia da matriz nuclear (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 30 a 33 - Imunocitoquímica para detecção da lâmina B em matrizes nucleares de células de supra-renal isoladas de ratos controlo (Fig. 30) e injectados com ACTH por 2 h (Fig. 31), 18 h (Fig. 32) e 15 dias (Fig. 33). Nota-se a presença de uma banda castanha à periferia da matriz nuclear (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 34 a 37 - Imunocitoquímica para detecção da fibrilharina em matrizes nucleares de células de supra-renal isoladas de animais controlo (Fig. 34) e injectados com ACTH durante 2 h (Fig. 35), 18 h (Fig. 36) e 15 dias (Fig. 37). Observa-se a marcação nucleolar da fibrilharina (seta grande) que é mais intensa às 18 h de estimulação (Fig. 36) e nos corpos espiralados (seta pequena). Hemateína. 1050 X.

Fig. 38 a 41 - Detecção da coilina, por imunocitoquímica, em matrizes nucleares. As células foram extraídas de ratos controlo (Fig. 38), e estimulados com ACTH por 2 h (Fig. 39), 18 h (Fig. 40) e 15 dias (Fig. 41). Os corpos espiralados (seta) apresentam marcação pelo anticorpo anti-coilina e são mais numerosos após a estimulação crónica (Fig. 41). Hemateína. 1050 X.

Fig. 42 a 44 - Cortes histológicos de glândulas supra-renais de rato em que foi feita a detecção imunocitoquímica da proteína Fos; em ratos controlo sem injecção (Fig. 42), injectados por 2 h (Fig. 43) e por 15 dias (Fig. 44). Não foi evidenciada marcação nos cortes de glândula controlo (Fig. 42), sendo aquela muito escassa após estimulação crónica pela ACTH (Fig. 44). Às 2 h após injecção de ACTH observa-se marcação no núcleo das células (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 45 e 46 - Matrizes nucleares de ratos estimulados, durante 2 h e 18 h com ACTH, em que foi feita a detecção por imunocitoquímica da proteína Fos. A marcação foi escassa (seta) às 2 h (Fig. 45) e nula às 18 h (Fig. 46). Hemateína. 1050 X.

Fig. 47 a 50 - Detecção por imunocitoquímica da proteína Myc em cortes histológicos de supra-renal. Em todas as situações, controlo (Fig. 47), e estimulação com ACTH por 2 h (Fig. 48), 18 h (Fig. 49) e 15 dias (Fig. 50) observou-se marcação nuclear (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 51 a 54 - Matrizes nucleares isoladas de supra-renais de ratos controlo (Fig. 51), e injectados com ACTH por 2 h (Fig. 52), 18 h (Fig. 53) e 15 dias (Fig. 54) sujeitas a detecção da proteína Myc por imunocitoquímica. Observa-se sempre marcação na matriz nuclear (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 55 a 58 - Detecção por imunocitoquímica da proteína PCNA em cortes histológicos de supra-renal de ratos controlo (Fig. 55) e estimulados com ACTH por 2 h (Fig. 56), 18 h (Fig. 57) e 15 dias (Fig. 58). Nos animais controlo alguns núcleos apresentam marcação (Fig. 55) (seta), sendo superior o número de núcleos marcados na estimulação aguda (Figs. 56 e 57) e apresentando-se todos os núcleos marcados na estimulação crónica (Fig. 58). Hemateína. 1050 X.

Fig. 59 - Controlo negativo em corte histológico da técnica de hibridização *in situ* utilizando uma sonda não-específica. A marcação foi nula. Hemateína. 1050 X.

Fig. 60 a 63 - Cortes histológicos de supra-renais de ratos controlo (Fig. 60) e estimulados com ACTH por 2 h (Fig. 61), 18 h (Fig. 62) e 15 dias (Fig. 63) após hibridização *in situ* com sonda poli-timina. Observa-se marcação, na forma de granulações escuras, tanto nos núcleos como no citoplasma (seta). A marcação é mais intensa nos ratos estimulados (Figs. 61 - 63) quando comparadas com o controlo (Fig. 60), atingindo o máximo às 2 h de estimulação com ACTH (Fig. 61). Hemateína. 1050 X.

Fig. 64 - Matrizes nucleares de supra-renal de ratos controlo hibridizadas com sonda não-específica. Não se observa marcação. Hemateína. 1050 X.

Fig. 65 a 68 - Matrizes nucleares de supra-renal após hibridização *in situ* com sonda poli-timina, isoladas de ratos controlo (Fig. 65) e estimuladas com ACTH por 2 h (Fig. 66), 18 h (Fig. 67) e 15 dias (Fig. 68). A marcação mantém-se associada à matriz nuclear (seta), sendo mais intensa após estimulação com ACTH, especialmente 2 h após a injecção. Hemateína. 1050 X.

Fig. 69 a 72 - Cortes histológicos de glândulas supra-renais de ratos previamente injectados com bromo-uridina. A detecção por imunocitoquímica revelou marcação

escassa nas glândulas retiradas de ratos controlo (Fig. 69), sendo mais acentuada após estimulação com ACTH por 2 h (Fig 70), 18 h (Fig. 71) e crónica (Fig. 72) onde se observou marcação no núcleo e citoplasma (seta). Hemateína. 1050 X.

Fig. 73 a 76 - Matrizes nucleares isoladas de glândulas supra-renais de ratos injectados com bromo-uridina. Nas fracções controlo (Fig. 73) não houve marcação significativa. Após estimulação com ACTH por 2 h (Fig. 74), 18 h (Fig. 75) e 15 dias (Fig. 76) a marcação imunocitoquímica verificou-se mais intensa, e em associação com a matriz nuclear (seta). Hemateína. 1050 X.

Discussão

A anatomia da glândula supra-renal foi descrita pela primeira vez no século XVI por Bartholomeo Eustachius, mas a sua importância vital só se conhece a partir de 1856 (Brown-Séquard, 1856). A glândula supra-renal é constituída pelo córtex e pela medula, sendo estes tecidos produtores de hormonas esteróides (córtex), catecolaminas e neuropeptídeos (medula). O córtex da glândula é organizado em camadas de células dispostas de uma forma concêntrica sendo cada população de células responsável pela síntese de hormonas esteróides características: zona glomerulosa - mineralocorticóides, zona fasciculada - glicocorticóides e zona reticular - hormonas sexuais. Há vários factores endógenos a modular a esteroidogénese das células glandulares, sendo o mais importante a hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que estimula especificamente as células das zonas fasciculada e reticular do córtex da supra-renal. Esta hormona é responsável pela manutenção do tamanho da glândula, e quando presente em concentrações supra-fisiológicas induz hipertrofia e hiperplasia do orgão (Nussdorfer, 1986, Andreis et al., 1989, Orth et al., 1992). A adrenocorticotrofina provoca também o desenvolvimento da irrigação da glândula supra-renal (Maier e Staehelin, 1968), e das suas células, à custa do aumento do volume mitocondrial, do retículo endoplasmático liso e da acumulação de gotículas lipídicas (Andreis et al., 1989). O modo de acção da ACTH está bem estudado ao nível de reacções metabólicas extra-nucleares, sabendo-se que actua através da produção de cAMP (Penhoat et al., 1989, Hanukoglu et al., 1990, Schimmer et al., 1995 a, Schimmer et al., 1995 b). Estão descritos dois tipos diferentes de resposta das células da

supra-renal à acção da ACTH (Waterman, 1994): um que provoca uma elevação dos níveis de hormonas esteróides no sangue ao fim de pouco tempo e outro que provoca resposta a longo prazo e que envolve a modulação da expressão genética (Raikhinstein e Hanukoglu, 1994). Nesta modulação ocorre, em regra, um aumento de expressão dos genes que codificam para as enzimas da esteroidogénese, havendo, contudo, genes que são reprimidos por acção directa da ACTH (Raikhinstein e Hanukoglu, 1994). A activação da expressão genética na célula alvo, após administração de ACTH, é máxima pelas 6 h, diminuindo gradualmente entre as 24 e as 36 h.

Apesar destes conhecimentos, o mecanismo da modulação nuclear pela ACTH das células produtores de esteróides ainda não está completamente esclarecido, e por outro lado, o comportamento da matriz nuclear da célula esteroidogénica e dos compartimentos nucleares a ela associados nunca foram estudados. Tomando como base o modelo da compartimentação funcional do núcleo celular, procurou avaliar-se a sua modulação durante a estimulação hormonal com ACTH.

Estimulação dos animais de experiência com ACTH

Dado que a acção da hormona adrenocorticotrófica é variável em função do tipo de estimulação e em função do tempo, usaram-se três formas de estimulação, representativas das várias fases de resposta à acção hormonal.

A estimulação aguda durante 2 h corresponde à fase de esteroidogénese acentuada enquanto a estimulação aguda por 18 h corresponde a deplecção das hormonas esteróides séricas; na estimulação crónica durante 15 dias os valores de esteróides séricos são elevados e sustentados.

A resposta dos animais à estimulação pela ACTH foi avaliada por quantificação da hormona esteróide - corticosterona. Verificou-se que, 1 h após a estimulação, por injecção única de Synacthén depósito, os valores da corticosterona sérica aumentaram para cerca do dobro dos dos controlos, assim se mantendo até às 6 h; 12 h após a injecção de ACTH, os valores de corticosterona sérica são inferiores ao controlo e assim se mantêm até às 24 h. Estes resultados explicam-se pelo facto de a hormona adrenocorticotrófica induzir diminuição do conteúdo de colesterol intracelular (Long, 1945), que leva algumas horas a ser reposto. Só após a reposição do colesterol intracelular ocorre de novo síntese de hormonas esteróides (Péron e Koritz, 1960).

A administração crónica da hormona adrenocorticotrófica, em dose fixa diária, teve efeitos não só a nível do metabolismo da célula alvo, como também em todo o organismo. Os animais, numa fase de crescimento rápido, aumentaram menos que os controlos, observando-se também alterações macroscópicas nas glândulas supra-renais, que se apresentaram aumentadas de volume (cerca de 3 vezes), e muito irrigadas, o que está de acordo com resultados de outros autores (Legros e LeHoux, 1983, Sander et al., 1994, LeHoux et al., 1998). O estudo histológico mostra que as células

esteroidogénicas se encontram aumentadas de volume (Hall, 1985, Simpson e Waterman, 1983, Simpson e Waterman, 1988), e a esteroidogénese muito aumentada (os valores de corticosterona eram cerca de 6 vezes superiores aos dos animais controlo).

Aspectos morfológicos das glândulas supra-renais - núcleos e matrizes

O estudo histológico das glândulas supra-renais após estimulação crónica revelou uma diminuição da densidade de núcleos por volume de tecido, verificando-se aumento do volume celular e do espaço intersticial. O aumento celular deve-se essencialmente à abundância de inclusões lipídicas, facto também observado por outros autores (Andreis et al. 1989). As quantificações de DNA e proteínas revelaram menor quantidade por unidade de peso de tecido de supra-renal o que poderá estar relacionado com o aumento do volume celular à custa das inclusões lipídicas.

A partir de células de supra-renal preparadas em suspensão e centrifugadas em lâmina de vidro foi desenvolvido um método pessoal de extracção da matriz nuclear *in situ* (Neves et al., 1999). Este método apresentou vantagens em relação aos processos tradicionais de isolamento de matriz nuclear (Kaufmann et al., 1981), por duas razões:

a) permitiu identificar a célula a partir da qual se isolou a matriz nuclear, pois não foi feito isolamento prévio de núcleos, b) permitiu obter uma recuperação de material muito superior ao que se obtém por outros métodos.

Em microscopia de luz, as matrizes nucleares isoladas em lâmina de vidro, em qualquer das situações estudadas, apresentaram-se bem preservadas, sendo bem evidentes, o nucléolo, o invólucro residual à periferia do núcleo e a rede fibrilogranular na área do nucleoplasma. Este método permitindo uma boa preservação e reprodutibilidade constituiu um bom modelo para identificação dos compartimentos nucleares por imunocitoquímica (Neves et al., 1999). Não foi, no entanto, possível obter amostras para observação em microscopia electrónica, apesar das nossas tentativas. As matrizes nucleares observadas, não incluídas, eram demasiado frágeis, sendo destruídas facilmente quando bombardeadas com o feixe de electrões.

As imagens de microscopia electrónica de núcleos e matrizes nucleares foram obtidas de material isolado pelos métodos de Blobel e Potter (núcleos) e Commerford et al. e Kaufmann et al. (matrizes nucleares).

As fracções de núcleos isoladas pelo método de Blobel e Potter, apresentaram-se, na generalidade, bastante puras, podendo no entanto ser visíveis algumas vesículas de retículo endoplasmático à periferia do invólucro. Foi feita por "Western blotting" a pesquisa de actina citoplasmática que se revelou negativa o que representa um bom teste a favor da pureza da fracção. A preservação era muito boa, sendo visíveis todos os componentes do núcleo: invólucro, massas de heterocromatina, nucléolo com todos os seus componentes, e grupos de grânulos intercromatínicos. Nestas fracções isoladas de ratos estimulados durante 18 h com ACTH, o nucléolo tornava-se muito saliente com todos os seus

componentes mais evidentes, sugerindo um aumento da transcrição de RNAr. A estimulação crónica provocou a diminuição do tamanho dos nucléolos quando comparados com a situação anterior, o que sugere que a síntese de RNAr tende a estabilizar, não sendo pois tão activa como a que se verifica às 18 h.

O estudo ultra-estrutural das fracções das matrizes nucleares isoladas pelos métodos de Commerford et al. e Kaufmann et al. mostrou boa preservação do material. Todavia, as matrizes nucleares obtidas pelo método de Commerford et al., mantinham as membranas do invólucro nuclear, o que não corresponde ao conceito actual de matriz nuclear (Kaufmann et al., 1981, Berezney, 1991). Por isso, adoptámos na generalidade das experiências, o método descrito por Kaufmann et al. para o isolamento das matrizes nucleares.

Estas apresentaram-se sempre bem preservadas. Após a estimulação pelo Synacthén depósito (18 h) o nucléolo era muito mais evidente, à semelhança do que já era aparente nos núcleos isolados e todos os seus componentes eram facilmente observáveis. Os componentes fibrilar denso e granular encontram-se bastante desenvolvidos, o que é sugestivo de síntese activa de RNAr. Sabendo-se que os componentes da matriz nucleolar contêm as unidades transcripcionais dos genes ribossómicos (Weipoltshammer et al., 1996) estas observações poderão revelar uma actividade acrescida da enzima RNApolimérase I. Também nas matrizes nucleares deste grupo experimental (estimulação por 18 h) observamos um maior número de grânulos intercromatínicos, quando comparados com o

controlo. Este achado sugere que a actividade transcricional da enzima RNApolimérase II possa estar aumentada (Bachellerie et al., 1975, Wansink et al., 1993, Fakan, 1994, van Driel et al., 1995, Wei et al., 1999, Mintz e Spector, 2000).

Nas matrizes nucleares de ratos sujeitos a estimulação crónica observamos um aumento do nucléolo em relação ao controlo, que todavia não era tão proeminente como o observado às 18 h de estimulação.

Estudos bioquímicos

Nas fracções de núcleos e de matrizes nucleares efectuámos o estudo quantitativo de DNA e de proteínas. Em qualquer das situações estudadas, a variação destes parâmetros entre experiências e entre fracções foi elevada, pois houve perdas de material durante o processo de isolamento, particularmente das matrizes nucleares, que se refletiram sobre os valores da recuperação final.

Deste modo, apenas podemos concluir, que a quantidade de DNA e de proteínas por massa de tecido é significativamente inferior nas fracções de núcleos e de matrizes nucleares estimulados de forma crónica com ACTH. Este achado pode ser explicado pelo facto das células estimuladas cronicamente aumentarem muito de volume, sendo esse aumento devido, essencialmente, às inclusões lipídicas.

Estudo de proteínas características de compartimentos do núcleo

O estudo dos compartimentos nucleares da célula do córtex da supra-renal e da forma como estes são modulados pela ACTH, fez-se através do estudo das suas proteínas características. A análise das proteínas presentes nas fracções de núcleos e matrizes nucleares por electroforese unidimensional de poliacrilamida, não revelou diferenças qualitativas ou quantitativas importantes entre as fracções controlo e as estimuladas em qualquer dos tempos estudados. No entanto, deve ter-se em conta que a electroforese unidimensional de proteínas só detecta variações de quantidades de proteínas superiores a 0.1 μg por banda.

A identificação de proteínas específicas de compartimentos nucleares para estudo topológico foi feita pela técnica de "Western blotting" e imunocitoquímica. Fez-se a identificação das lâminas nucleares A+C e B, fibrilharina, coilina, proteína Fos, proteína Myc e PCNA.

As lâminas A e C que constituem juntamente com outras proteínas, a lâmina nuclear fibrosa, foram detectadas por "Western blotting" tanto nos núcleos intactos, como nas matrizes nucleares. Observaram-se duas bandas com massas moleculares de 80 e 65 kDa (Kaufmann, 1989) e intensidade semelhante. A detecção destas proteínas *in situ,* por imunocitoquímica, revelou que nas matrizes nucleares se observa uma faixa de reactividade à periferia do núcleo, correspondente à lâmina nuclear fibrosa. Tanto nas matrizes nucleares dos controlos como nas dos estimulados a intensidade da

marcação é semelhante, o mesmo sucedendo com a imunodetecção da lâmina B. O anticorpo anti-lâmina B não detectou a proteína desnaturada em "Western blotting", permitindo no entanto, a sua detecção por imunocitoquímica. Deste modo, a constituição da lâmina nuclear fibrosa, que desempenha papel fundamental na divisão celular (Moir et al. 1995), assim como na ancoragem e na replicação do DNA (Burke e Gerace, 1986, DePamphilis, 2000), não parece ser influenciada pelo processo de estimulação hormonal.

A proteína nucleolar fibrilharina revelou ser uma proteína da matriz nuclear que resiste à extracção na preparação dos núcleos isolados, sendo detectada por "Western blotting" tanto nas fracções de núcleos como nas matrizes nucleares. A pesquisa da fibrilharina por imunocitoquímica, em matrizes nucleares, demonstrou a sua presença no nucléolo e nos corpos espiralados ou de Cajal. Nas matrizes isoladas de ratos estimulados com ACTH (18 h), os nucléolos apresentaram um aumento de volume e intensa marcação pelo anticorpo anti-fibrilharina. Este aspecto vem apoiar as imagens que vemos em microscopia electrónica. Sabendo-se que a fibrilharina actua num complexo que modifica e amadurece as moléculas de RNAr (Lichwe et al., 1985), estes resultados sugerem que às 18 h, após injecção única de ACTH, ocorre um aumento da síntese e maturação de moléculas de RNAr. Os corpos espiralados, de origem nucleolar (Ochs e Smetana, 1991) também são evidentes. Assim, às 18 h, embora ocorra uma

deplecção das hormonas esteróides séricas, a síntese e o amadurecimento de RNAr são estimulados.

A identificação precisa do corpo de Cajal fez-se com a pesquisa da proteína coilina. Esta proteína de 80 kDa (Chaly et al., 1983) foi detectada por "Western blotting" e por imunocitoquímica nas fracções dos núcleos e nas matrizes nucleares. Verificou-se também uma marcação difusa na área extranucleolar (Lewis e Tollervey, 2000). O número de corpos espiralados aumentou nas matrizes nucleares estimuladas por 18 h, e em especial na estimulação crónica, o que fundamenta os resultados observados no "Western blotting", onde a intensidade da banda se mostrou superior nas fracções estimuladas. Os corpos espiralados funcionam como locais de reserva de componentes da maquinaria de "splicing" (Brasch e Ochs, 1992, Lamond e Carmo-Fonseca, 1993, Bohmann et al., 1995) agregando e libertando os snRNP quando dissociados do RNAm; o seu aumento está relacionado com o aumento de actividade da enzima RNApolimérase II (Spector et al., 1992). No nosso trabalho também estudámos a taxa de actividade desta enzima demonstrada directamente pela presença de RNAs de cadeia poli-adenilada (Neves et al., 2000), tendo verificado que após estimulação pela ACTH, ocorre um aumento da actividade da RNApolimérase II.

A transcrição dos genes que codificam para as enzimas da esteroidogénese é dependente de um factor proteico - AP-1 constituído por

dímeros de proteínas da família de genes fos e jun (Mukai et al., 1998). A presença da proteína Fos foi pesquisada por "Western blotting", tendo sido observada uma banda nas fracções de matriz nuclear, com maior intensidade após estimulação com ACTH por 24 h. A proteína Fos foi detectada, por imunocitoquímica, quer em cortes histológicos quer na matriz nuclear, embora nesta a marcação seja um pouco difusa, não correspondendo por conseguinte a um compartimento delimitado. Nos cortes de tecido e matrizes nucleares dos animais sujeitos a estimulação aguda (2 h) a proteína Fos foi detectada; nas outras situações experimentais a marcação foi muito reduzida.

Estes resultados sugerem que a proteína Fos é expressa na estimulação aguda pela ACTH (LeHoux et al. 1998). Trabalhos anteriores revelaram por imunocitoquímica, a presença da proteína Fos em células de supra-renal e relacionaram a sua expressão com a estimulação pela ACTH (Yang et al., 1990), referindo a retoma dos valores do controlo, 5 h após a administração da hormona. A negatividade observada por imunocitoquímica na fase de estimulação aguda (18 h) e crónica (15 dias) pode não significar ausência da proteína Fos, uma vez que ela foi detectada por "Western blotting". De facto, sabe-se que utilizando períodos de estimulação longos, a proteína Fos forma complexos com outras oncoproteínas (Borrelli et al., 1992) associando-se a sequências de resposta ao cAMP (CRE); deste modo, a proteína Fos poderá ficar irreconhecível pelo anticorpo. Outros autores referem que, o pico de expressão de proteína Fos parece ocorrer 2 h após injecção de ACTH (Yang et al., 1990).

A proteína Myc, outra oncoproteína, foi detectada por imunocitoquímica, tanto nos cortes histológicos da glândula como nas matrizes nucleares preparadas a partir de células isoladas sendo, todavia, sempre difusa a marcação. Não parece haver alteração da proteína associada ao núcleo e matrizes nucleares nos diferentes tempos de estimulação hormonal. De salientar, é o facto da proteína Myc se conservar associada à matriz nuclear após a extracção da matriz (Waitz e Loidl, 1991, López-Rodas et al., 1992), e de não haver marcação nem no nucléolo nem na lâmina nuclear fibrosa.

A proteína PCNA é um factor de replicação (Smith e Berezney, 1983, Berezney, 1991, Hozák et al., 1993), que funciona como marcador de células em proliferação. Nos cortes histológicos de animais controlo algumas células de glândula supra-renal apresentaram marcação, sendo todavia mais numerosas as células marcadas nos cortes de glândulas estimuladas pela ACTH. Nos cortes de animais estimulados durante 15 dias quase todos os núcleos apresentaram marcação pelo anticorpo anti-PCNA o que traduz certamente a hiperplasia induzida pela adrenocorticotrofina (Orth et al., 1992).

Estudo de locais de síntese de RNA

Os locais de síntese de RNA, "transcription domains", parecem associar-se intimamente à matriz nuclear (Carter et al., 1991, Xing and Lawrence, 1991), e podem ser identificados após incorporação de precursores do RNA marcados. Deste modo, podem ser estudadas as moléculas sintetizadas pelas RNApolimérases. A actividade da enzima RNApolimérase II pode ser detectada através dos seus transcriptos, considerando-se que a presença de RNAs poli-adenilados nucleares se relaciona directamente com a actividade desta enzima (Pringle et al., 1989, Talbot et al., 1989, Carter et al., 1991). Estudámos, por isso, a topologia da transcrição pela RNApolimérase II por hibridização *in situ* usando uma sonda poli-timina (Neves et al., 2000). O estudo realizado em cortes histológicos e em matrizes nucleares isoladas em lâmina de vidro, revelou hibridização tanto no núcleo e citoplasma, como nas matrizes nucleares. Nos ratos estimulados em todos os tempos estudados a marcação nuclear foi sempre mais intensa que a dos animais controlo o que poderá traduzir um aumento significativo da síntese de RNAm e seus precursores. Nas matrizes nucleares a detecção de RNAs poli-adenilados mostrou maior intensidade de marcação nos ratos estimulados, particularmente às 2 h, que nos controlos. Deste modo, poder-se-á concluir que a síntese de RNAm e seus precursores é activada pela ACTH e que as moléculas de hnRNA poli-adenilado se formam em estruturas associadas à matriz nuclear (Neves et al., 2000), podendo possuir função estrutural no nucleosqueleto (Huang et al., 1994).

De acordo com estes resultados, já em trabalhos anteriores, Magalhães et al. (Magalhães et al., 1986) haviam demonstrado, *in vivo*, que a estimulação aguda pela ACTH provoca a um aumento de incorporação da uridina tritiada em áreas extra-nucleolares, sugerindo assim, um aumento na expressão dos RNAs poli-adenilados por activação da enzima RNA polimérase II.

O estudo da síntese *de novo* de RNA e da topologia do processo levou-nos a utilizar um precursor da macromolécula marcado, de modo a poder ser detectado por imunocitoquímica. Para o efeito, os animais eram injectados com bromo-uridina 1 hora antes do sacrifício, e a incorporação do nucleotídeo era estudada usando um anticorpo específico. Verificou-se que nas células dos animais estimulados pela ACTH a incorporação de bromo-uridina traduzida pelo aparecimento de granulações nucleares é sempre superior à que ocorre nos controlos. A incorporação era particularmente elevada nos animais estimulados de forma crónica. A bromo-uridina incorporada, detectada em associação com a matriz nuclear, corrobora os trabalhos que evidenciam a associação dos locais de transcrição com a matriz nuclear (Cook, 1989, Georgiev et al., 1991, Cook 1994, Iborra et al., 1996 b).

Os resultados obtidos neste trabalho, permitem-nos concluir que as alterações nucleares das células da zona fasciculada da glândula supra-renal (células alvo da acção da ACTH) são função do tempo e do tipo de estimulação (aguda vs. crónica).

Assim, duas horas após a estimulação hormonal verifica-se aumento, para o dobro, do valor da corticosterona sérica, acompanhado de escassa proliferação celular. Há aumento da expressão da proteína Fos (Yang et al., 1990, LeHoux et al., 1998) concomitantemente com a estimulação da actividade da enzima RNApolimérase II, traduzida pelo aumento de incorporação de bromo-uridina e de hibridização com sonda poli-timina. A proteína Fos parece funcionar como um activador da transcrição da enzima RNApolimérase II na resposta aguda à ACTH.

Dezoito horas após a estimulação verifica-se deplecção dos valores de corticosterona sérica; a nível morfológico, observam-se transformações importantes no núcleo. É evidente um aumento da proliferação celular e da actividade da enzima RNApolimérase II, acompanhados pelo aumento do número de grânulos intercromatínicos e de corpos de Cajal. Verifica-se, por outro lado, um aumento global da incorporação de bromo-uridina. Todavia, a alteração mais importante que se observou, quer nos núcleos, quer nas matrizes nucleares às 18 h de estimulação, foi o aumento notável do volume do nucléolo. Neste, são evidentes todos os seus componentes, indicando uma actividade aumentada quer da transcrição do DNAr quer do processo de amadurecimento do RNAr. A apoiar estes dados, saliente-se ainda, o aumento da proteína nucleolar fibrilharina.

A estimulação crónica provocou alterações macroscópicas nas glândulas supra-renais (tamanho, coloração, consistência). Além do aumento da corticosterona sérica (cerca de seis vezes a dos controlos) verificou-se um aumento da proliferação e do volume de cada célula.

Observou-se um aumento da síntese global de RNA, traduzida pela elevada incorporação de bromo-uridina. Todavia, a enzima RNApolimérase II é preferencialmente estimulada, facto que é apoiado pela expressão elevada de RNA poli-adenilado e pelo aumento de corpos de Cajal. Este resultado é apoiado por trabalhos de outros autores que demonstram haver um aumento coordenado da transcrição de genes pela enzima RNApolimérase II (Raikhinstein e Hanukoglu, 1994) em associação com a matriz nuclear (Cook, 1989, Georgiev et al., 1991, Cook, 1994, Iborra et al., 1996 b).

Resumo e conclusões

A célula da zona fasciculada da supra-renal é a célula-alvo da hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta hormona actua de dois modos distintos:

a) estimulação aguda com síntese de hormonas esteróides séricas ao fim de alguns minutos
b) estimulação crónica que induz aumento da expressão dos genes que codificam as enzimas da esteroidogénese, de uma forma coordenada.

A ACTH estimula a produção de cAMP e a actividade de proteínas cínase, sendo estas responsáveis pela fosforilação de péptidos nucleares capazes de funcionar como moduladores da transcrição. Sabe-se que o núcleo celular é formado por diferentes compartimentos onde se associam moléculas intervenientes nos processos metabólicos nucleares permitindo que estes ocorram de forma organizada. A compartimentação e regulação do núcleo parece ser dependente de um nucleosqueleto que se designa por matriz nuclear.

Neste trabalho isolámos e estudámos a matriz nuclear e os compartimentos nucleares que a ela se associam, usando como modelo células esteroidogénicas de supra-renal em situação basal e após estimulação com hormona adrenocorticotrófica.

Utilizámos 500 ratos Wistar e estimulação pela hormona adrenocorticotrófica sintética (Synacthen depósito - Laboratórios Ciba - Portugal), intra-muscular, na dose de 0.2 mg/Kg, por períodos de 2h, 18h

(estimulação aguda) e de 15 dias, de injecção diária (estimulação crónica), sendo estes tempos representativos da cinética da acção da ACTH.

A quantificação da corticosterona sérica por HPLC, revelou que os valores subiam para o dobro dos valores basais às 2 h após a injecção de Synacthen depósito, diminuindo entre as 6 e 12 h para valores inferiores ao controlo, assim se mantendo até às 24 h. Na estimulação crónica a corticosterona sérica atingiu valores aproximadamente 6 vezes superiores aos dos animais controlo, verificando-se simultaneamente, uma diminuição do crescimento dos animais e hipertrofia e hiperplasia das glândulas supra-renais.

Nestes animais verificámos uma maior proliferação celular evidenciada pela marcação imunocitoquímica do PCNA.

A partir de supra-renais previamente descapsuladas e desmeduladas isolámos os núcleos celulares pelo método descrito por Blobel e Potter 1966. Obtivemos amostras com elevado grau de pureza e morfologia bem preservada. Das fracções de núcleos procedemos ao isolamento das matrizes nucleares utilizando os métodos descritos por Commerford em 1986 e Kaufmann em 1981. O método adoptado para a generalidade das experiências foi o de Kaufmann et al. que consistiu no tratamento dos núcleos com detergente não-iónico, DNase I, e tampões de alta e baixa força iónica. As matrizes nucleares ficaram bem preservadas apresentando lâmina nuclear, nucléolo residual, grânulos intercromatínicos e rede

fibrilogranular em toda a área do nucleoplasma. Nas fracções isoladas (núcleos e matrizes) de ratos injectados com ACTH por 18 h verificou-se um aumento do volume nucleolar, apresentando-se todos os seus componentes bem evidentes.

Os péptidos constituintes das fracções de núcleos e matrizes nucleares foram estudados por electroforese unidimensional, e algumas proteínas (lâminas A+C, lâmina B, fibrilharina, coilina e Fos) por "Western blotting". O estudo por electroforese unidimensional não revelou alterações entre as fracções controlo e estimuladas; o "Western blotting" mostrou que as bandas correspondentes às proteínas fibrilharina, coilina e Fos eram mais intensas nas fracções das matrizes nucleares dos animais estimulados.

Estudámos particularmente matrizes nucleares isoladas *in situ*. Para este efeito, fizemos previamente preparação de células de supra-renal em suspensão, segundo o método descrito por Hinson em 1991. As células dispersas foram centrifugadas sobre uma lâmina de vidro, e extraídas de acordo com a metodologia descrita por Lutz em 1988, para células em cultura, que adaptámos ao nosso modelo. Obtivemos amostras bem preservadas com o invólucro à periferia do núcleo, nucléolo residual, e a rede fibrilogranular em toda a área do nucleoplasma; foi-nos assim possível identificar o tipo de célula a estudar - a célula da zona fasciculada. Nestas matrizes nucleares, isoladas em lâmina, efectuámos por imunocitoquímica a pesquisa de algumas proteínas características de diversos compartimentos

nucleares; as lâminas nucleares (A+C e B) foram localizadas à periferia do núcleo, a fibrilharina no nucléolo e nos corpos espiralados, e a coilina nos corpos espiralados. Também foram detectadas nas matrizes nucleares as oncoproteínas Fos e Myc. Às 18 h de estimulação aguda verificou-se um aumento da marcação com o anticorpo anti-fibrilharina, observando-se ainda, um aumento do número de corpos espiralados em todas as fases de estimulação.

Neste modelo *in situ*, estudámos a localização das cadeias poli-adeniladas dos transcriptos da RNApolimerase II por hibridização *in situ*. Detectámos tanto no núcleo como no citoplasma uma marcação positiva. A reacção estava associada à matriz nuclear, e era mais abundante nas matrizes nucleares isoladas de ratos estimulados pela ACTH. Quando utilizámos um precursor do RNA, a bromo-uridina (25 mg/Kg), verificámos a sua presença ao fim de 1 h, o que poderá traduzir a síntese *de novo* de todos os RNAs. As novas moléculas encontravam-se associadas à matriz nuclear, sendo maior a incorporação nuclear da bromo-uridina nos ratos estimulados com ACTH.

Os nossos estudos levam-nos a concluir que a hormona adrenocorticotrófica estimula especificamente a célula esteroidogénica da zona fasciculada do córtex da supra-renal, local onde ocorrem alterações nos núcleos e seus compartimentos de acordo com o tempo e o tipo de estimulação.

Às 2 h após injecção de ACTH verificámos um aumento do valor de corticosterona sérica acompanhado de proliferação celular, e um aumento da expressão da proteína Fos concomitantemente com a estimulação da actividade da enzima RNApolimérase II. Esta é traduzida pelo aumento de incorporação de bromo-uridina e da hibridização *in situ* com sonda poli-timina. A proteína Fos parece funcionar como um activador da transcrição da enzima RNApolimérase II na resposta aguda à ACTH.

Às 18 horas, após injecção única de ACTH, observámos uma deplecção dos valores de corticosterona sérica, e sobretudo a nível morfológico observámos alterações importantes no núcleo particularmente o aumento do volume do nucléolo onde todos os seus componentes são bem evidentes. Nele assinalamos maior quantidade da proteína nucleolar fibrilharina o que indica uma actividade aumentada da transcrição do DNAr e do processo de amadurecimento do RNAr. Era também evidente neste tempo experimental, o aumento da proliferação celular e da actividade da enzima RNApolimérase II, acompanhadas pelo aumento do número de grânulos intercromatínicos, dos corpos de Cajal e do aumento global da incorporação da bromo-uridina.

A estimulação crónica provocou aumento da massa das glândulas supra-renais, devido não só à congestão vascular, como à proliferação celular e ao aumento do volume celular. Na estimulação crónica ocorre um aumento da síntese global de RNA traduzida pela elevada incorporação de bromo-uridina. Todavia, a enzima RNApolimérase II é preferencialmente estimulada, facto que é apoiado pela expressão elevada de RNA poli-

adenilado e pelo aumento de corpos espiralados. Estes dados sugerem poder haver uma estimulação coordenada da transcrição de genes pela enzima RNApolimérase II em associação com a matriz nuclear.

Conclusões

I - As células da zona fasciculada da glândula supra-renal são células alvo da ACTH; a resposta à estimulação é condicionada pelo tempo e pelo tipo de estimulação (aguda vs. crónica).

II - Os compartimentos do núcleo das células da zona fasciculada da glândula supra-renal são modulados pela acção da ACTH.

III - A estimulação aguda com ACTH (2h) provoca aumento de corticosterona sérica, acompanhado de aumento da expressão da proteína Fos nuclear e da síntese de RNAs poli-adenilados. A estimulação das 18 h provoca deplecção da corticosterona sérica; todavia a síntese e amadurecimento de RNAr encontra-se activada.

IV - A estimulação crónica retarda o crescimento dos ratos, apesar da hipertrofia e hiperplasia glandular verificada.

V - A electroforese unidimensional de proteínas não revelou diferenças quantitativas ou qualitativas entre os perfis de péptidos presentes nas fracções de núcleos e matrizes nucleares (controlos e estimulados).

VI - As lâminas nucleares A+C e B, detectadas por imunocitoquímica revelaram a lâmina nuclear fibrosa localizada à periferia do núcleo, estando

esta estrutura presente em todas as situações de estimulação estudadas. A lâmina nuclear fibrosa não se altera na estimulação pela ACTH.

VII - Na estimulação aguda das 18 h, os nucléolos residuais, associados à matriz nuclear, apresentaram-se muito desenvolvidos com todos os seus componentes evidentes, o que sugere síntese intensa de RNAr. A quantidade de fibrilharina, detectada por imunocitoquímica, também se revelou bastante aumentada em relação aos outros tempos de estimulação.

VIII - A proteína coilina foi detectada nos corpos espiralados ou de Cajal em associação com a matriz nuclear, sendo estes particularmente numerosos após estimulação crónica pela ACTH.

IX - A proteína Fos foi detectada na matriz nuclear das células do córtex supra-renal apenas durante a estimulação aguda das 2h. A proteína Myc, foi detectada na região do nucleoplasma da matriz nuclear sempre presente em quantidade escassa mas constante, e parece não depender da acção da ACTH.

X - A proteína PCNA foi detectada nos núcleos das células da zona fasciculada da glândula supra-renal, sendo marcados em maior número os núcleos dos animais estimulados de forma crónica.

XI - A transcrição pela RNA polimérase II parece ocorrer em associação com a matriz nuclear, uma vez que os seus transcritos poli-adenilados foram detectados na matriz. A actividade desta enzima está aumentada nas células da zona fasciculada da supra-renal particularmente na estimulação aguda (2 h) pela adrenocorticotrofina.

XII - A transcrição global dos RNAs é estimulada pela ACTH e é mais intensa após administração crónica. A hormona adrenocorticotrófica poderá induzir transcrição sequenciada de genes, ao longo do tempo.

Summary and conclusions

Adrenal steroidogenic cell is specifically stimulated by adrenocorticotropin (ACTH). This peptide hormone regulates the target cell steroidogenesis by two temporally distinct processes:

a) an acute response which induces rapid increase of serum steroid hormones

b) a chronic process that regulates the coordinated transcription of the genes that encode enzymes of the steroidogenic pathways.

ACTH activates intracellular cAMP which increases protein kinase activity, these enzymes act on the phosphorylation of nuclear transcription modulator peptides.

Cell nucleus is functionally compartmentalized, being the nuclear metabolic pathways a well organized processes. Nuclear compartmentalization and regulation seems to be organized by a nucleoskeleton defined as nuclear matrix.

In this study the nuclear matrix was isolated and the nuclear compartments identified in adrenal steroidogenic cells in basal condition and after adrenocorticotropic hormone stimulation.

Five hundred male Wistar rats were employed, and the adrenocorticotropin stimulation was performed by intramuscular injection (0.2 mg/Kg) with the synthetic peptide - Synacthen depot (Ciba -Portugal). Rats were sacrificed by decapitation 2h and 18h after injection (acute stimulation) and 15 days of daily injection (chronic stimulation), these times define the kinetics of the ACTH action.

Serum corticosterone was quantified by HPLC; two hours after Synacthen injection serum corticosterone increased to twice the control level, diminishing to values below control between 6 and 12 h. In chronic stimulation serum corticosterone increased 6 fold the control values, rats presented a diminished weight gain as well as hypertrophy and hyperplasia of the adrenal glands. In these animals cellular proliferation was intensified as shown by immunocytochemical detection of PCNA.

Adrenal glands were removed and the capsule and medulla extracted with a bistoury, being the cell nucleus isolated by the method described by Blobel and Potter 1966. The nuclear matrices were isolated from the nuclear fractions employing either the method described by Commerford 1986 or the method of Kaufmann 1981. For the majority of the experiments we used the method described by Kaufmann et al. which consists of extractions with non-ionic detergent, DNase I and high and low ionic strength buffers. Nuclear matrices presented good morphological preservation, with nuclear lamina, residual nucleolus, interchromatinic granules, and a fibrilogranular network extending in all of the nucleoplasmic area. Eighteen hours after ACTH stimulation, the nucleolus (in nucleus and nuclear matrix fractions) presented a higher volume with all the components well evident.

Nucleus and nuclear matrix peptides were analyzed by SDS-PAGE; some proteins (lamins A+C, lamin B, fibrillarin, coilin and Fos) were

identified by "Western blotting". Electrophoretic analysis of the nuclear matrix peptides did not reveal differences between control and stimulated fractions; however, "Western blotting" detection of lamins A and C, fibrillarin, coilin and Fos revealed more intense bands of fibrillarin, coilin and Fos protein after ACTH stimulation.

Nuclear matrices were isolated *in situ*, after previous preparation of adrenal cells in suspension by a method described by Hinson et al. 1991. The dispersed cells were centrifuged on a glass slide and extracted according to a personal modification of the method previously described by Lutz et al. 1988 for cells in culture. Nuclear matrices extracted in glass slide presented a good morphology, and the original cells were easily identified. The nuclear envelope, the residual nucleolus and the fibrilar network were observed. The immunocytochemical detection of proteins specific of several nuclear compartments was performed; lamins (A+C and B) were detected at nuclear periphery, fibrillarin at the nucleolus and coilin and fibrillarin at the coiled bodies. The oncoproteins Fos and Myc were detected on the adrenal nuclear matrices in glass slides. Nuclear matrices isolated from 18h ACTH stimulated rats presented an intensified immunocytochemical reaction of fibrillarin. In all of the ACTH stimulated nuclear matrices an increased number of coiled bodies was observed.

The poly-adenylated chains present in the RNApolimerase II transcripts, were detected by *in situ* hybridization employing a poly-timine

probe. The hybridization revealed a strong association of the reaction with the nuclear matrices after cell extraction, being the reaction intensity higher in the cells isolated from stimulated rats. The transcription topology in the cell nucleus, was studied with the precursor bromo-uridine (25 mg/Kg) injected i.m. in the animals, and detected by immunocytochemistry 1 hour after administration. The *de novo* synthesized molecules were observed in association with the nuclear matrices, with a higher nuclear incorporation of Br-uridine in the ACTH stimulated animals.

This study allowed us to conclude that the adrenocorticotropic hormone stimulates specifically the steroidogenic cell of the adrenal cortex zona fasciculata, and that the nucleus and its compartments suffer modifications related to the time and to the pathway (acute or chronic) of stimulation.

Acute stimulation for 2 h provokes an increase in the value of serum corticosterone as well as an increment of the cell proliferation. We also verified an increased expression of the Fos protein and stimulation of the RNApolimerase II activity which was demonstrated by the enhanced incorporation of Br-uridine and *in situ* hybridization with the poly-timine probe. Fos protein seems to function as an RNApolimerase II transcription modulator in the acute response to ACTH.

Eighteen hours after an unique injection of ACTH, a serum depletion of corticosterone was observed. The nucleus and nuclear matrices isolated from the animals stimulated for 18 h presented a well developed

nucleolus with all the components visible, as well as numerous interchromatinic granules and Cajal bodies. The immunocytochemical detection of fibrillarin revealed a stronger reaction, which meant an intensified transcription of the rDNA and maturation of rRNA. We also observed an enhanced adrenal cell proliferation and an intensified widespread transcription, particularly of the RNApolimerase II, which is in agreement with the higher detection of poly-A RNAs and the higher incorporation of Br-uridine.

Chronic stimulation provokes an increase in the volume of adrenal tissue, due to vascular congestion and to the increased cell volume and proliferation. Increased widespread transcription, demonstrated by the elevated incorporation of the RNA precursor was verified. On the other hand, RNApolimerase II was specifically stimulated by the chronic administration of ACTH, which was demonstrated by the enhanced expression of poly-A RNA and the increased number of coiled bodies. In brief, these results suggest that chronic ACTH stimulation induces a coordinated transcription of genes, by RNApolimerase II, in association with the nuclear matrix.

Conclusions

I - Adrenal fasciculata cell is the target to ACTH; its response is dependent on the time and type (acute vs. chronic) of hormonal stimulation.

II - ACTH modulates the functional compartmentalization of the target cell nucleus.

III - Acute ACTH (2h) stimulation provokes an increase in the value of serum corticosterone, and of nuclear expression of Fos protein. Poly-adenylated RNAs synthesis is also stimulated by ACTH. The stimulation for 18 h induce a serum depletion of corticosterone, however synthesis and processing of RNAr were highly increased.

IV - Chronic ACTH stimulation delays body weight gain of growing rats, however the adrenal glands presented hypertrophy and hyperplasia.

V - Electrophoretic analysis of the peptides revealed neither quantitative nor qualitative differences between the protein profiles of nucleus and nuclear matrices fractions (controls and stimulated animals).

VI - Nuclear lamins A+C and B, were detected, by immunocytochemistry, and were located at nuclear periphery. In all the experiments (control and stimulated) a similar result was observed.

VII - In the acute stimulation for 18 h, the residual nucleoli associated with the nuclear matrix, presented an increased volume with all the components very evident, which suggests an enhanced RNAr synthesis and maturation. Nucleolar immunocytochemical detection of fibrillarin revealed an enhanced reaction, which was more intense than in other experimental times (2 h and 15 days).

VIII - Coilin was detected by immunocytochemistry in Cajal bodies associated with nuclear matrix; coiled bodies were more numerous after chronic stimulation.

IX - Fos protein was only detected in association with the adrenal cell nuclear matrix after acute stimulation for 2 h. Protein Myc was detected in extra-nucleolar area, associated with the nuclear matrix in all the studied stimulation times. Myc expression did not seem to depend on ACTH.

X - PCNA protein was detected in adrenal gland nuclei; the number of PCNA rich nuclei was higher in chronic stimulated animals.

XI - RNA polimerase II transcription was detected by *in situ* hybridization of its transcripts employing a poly-thymine probe. Poly-adenylated transcripts were detected in association with the nuclear matrix; the activity of the RNApolimerase II was enhanced by ACTH stimulation, particularly at 2 h stimulation.

XII - The widespread RNA transcription was stimulated by ACTH as revealed by Br-uridine incorporation; the labeling was higher after chronic administration. Adrenocorticotropin seems to induce the coordinated transcription of steroidogenic enzymes genes.

Bibliografia

Abate C., Luk D., Curran T. (1990) A ubiquitous nuclear protein stimulates the DNA-binding activity of fos and jun indirectly. Cell Growth & Differ. 1, 455-462

Abulafia R., Ben-Ze'ev A., Hay N., Aloni Y. (1984) Control of late simian virus 40 transcription by the attenuation mechanism and transcriptionally active ternary complexes are associated with the nuclear matrix. J. Mol. Biol. 172, 467-487

Akey C.W., Goldfarb D.S. (1989) Protein import through the nuclear pore complex in a multi-step process. J. Cell Biol. 109, 971-982

Akey C.W. (1990) Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. Biophys. J. 58, 341-355

Akey C.W., Radermacher M. (1993) Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. J. Cell Biol. 122, 1-19

Alliegro M.C., Alliegro A.A. (1998) Protein heterogeneity in the coiled body compartment. Exp. Cell. Res. 239, 60-68

Andreis P.G., Rebuffat P., Belloni A.S., Neri G., Cavallini L., Gottardo G., Mazzocchi G., Coi A., MalendowiczL.K., Nussdorfer G.G. (1989) Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells: Zona fasciculata/reticularis cells of chronically ACTH-treated rats. Cell & Tissue Res. 258, 43-51

Ariyoshi N., Kim Y.C., Artemenko I., Bhattacharyya K.K., Jefcoate C.R. (1998) Characterization of the rat *Star* gene that encodes the predominant 3.5-kilobase pair mRNA. J. Biol. Chem. 273, 7610-7619

Ascoli C.A., Maul G.G. (1991) Identification of a novel nuclear domain. J. Cell Biol. 112, 785-795

Avramova Z., Paneva E. (1992) Matrix attachment sites in the murine α-globin gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 78-85

Bachellerie J.P., Puvion E., Zalta J.P. (1975) Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. Eur. J. Biochem. 58, 327-337

Bastos R., Panté N., Burke B. (1995) Nuclear pore complex proteins. Int. Rev. Cytol. 162B, 257-302

Bauer D.W., Murphy C., Wu Z., Wu C. H., Gall J.G. (1994) In vitro assembly of coiled bodies in Xenopus egg extract. Mol. Biol. Cell 5, 633-644

Belgrader P., Siegel A.J., Berezney R. (1991a) A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. J. Cell Sci. 98, 281-291

Belgrader P., Rama D., Berezney R. (1991b) Molecular cloning of matrin 3. J. Biol. Chem. 266, 9893-9899

Bernhard W. (1969) A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27, 250-265

Berezney R., Coffey D.S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1410-1417

Berezney R. Coffey D.S. (1977) Nuclear matrix: Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73, 616-637

Berezney R., Basler J., Hughes B.B., Kaplan S.C. (1979) Isolation and characterization on the nuclear matrix from Zajdela ascites hepatoma cells. Cancer Res. 39, 3031-3039

Berezney R. (1991) The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. J. Cellul. Biochem. 47, 109-123

Beven A., Guan Y., Peart J., Cooper C., Shaw P. (1991) Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament-related components within the nucleus. J. Cell Sci. 98, 293-302

Bisotto S., Lauriault P., Duval M., Vincent M. (1995) Colocalization of a high molecular mass phosphoprotein of the nuclear matrix (p255) with spliceosomes. J. Cell Sci. 108, 1873-1882

Blencowe B.J., Nickerson J.A., Issner R., Penman S., Sharp P.A. (1994) Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. J. Cell Biol. 127, 593-607

Blobel G., Potter V.R. (1966) Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. Science 154, 1662-1665

Blow J.J., Laskey R.A. (1986) Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of Xenopus eggs. Cell 47, 577-587

Bode J., Kohwi Y., Dickinson L., Joh T., Klehr D., Mielke C., Kohwi-Shigematsu T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. Science 255, 195-197

Bohmann K., Ferreira J., Santama N., Weis K., Lamond A.I. (1995) Molecular analysis of the coiled body. J. Cell Sci. 19, 107-113

Borrelli E., Monmayeur J.P., Foulkes N.S., Sassoni-Corsi P. (1992) Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. Crit. Rev. Oncog. 3, 321-338

Boulikas T. (1986) Protein-protein and protein-DNA interactions in calf thymus nuclear matrix using cross-linking by ultraviolet irradiation. Biochem. Cell. Biol. 64, 474-484

Boulikas T. (1993) Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. J. Cell. Biochem. 52, 13-22

Boulikas T. (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences. Int. Review Cytol. 162A, 279-388

Brasch K. e Ochs R.L. (1992) Nuclear bodies (NBs): A newly "rediscovered" organelle. Exp. Cell Res. 202, 211-223

Braun H. e Ernst H. (1960) Electronoptic studies on the isolation of nuclear fractions. Z. Naturforsch. 15B, 592-596

Brotherton T., Zenk D., Kahanic S., Reneker J. (1991) Avian nuclear matrix proteins bind very tightly to cellular DNA of the β-globin gene ehnancer in a tissue-specific fashion. Biochemistry 30, 5845-5850

Brown-Séquard C.E. (1856) Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales. Arch Gen. Med. , Ser 5 (8) 385-401

Buchner K. (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. Eur. J. Biochem. 228, 211-221

Burke B., Gerace L. (1986) A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. Cell 44, 639-652

Burton K. (1968) Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzymol. 12B, 163-168

Byrd D., Sweet D.J., Panté N., Konstantinov K.N., Guan T., Saphire A.C.S., Mitchell P.J., Cooper C.S., Aebi U., Gerace L. (1994) Tpr, a large coiled-coil protein whose amino-terminus is involved in activation of oncogenic kinases, is localized to the cytoplasmic surface of the nuclear pore complex. J. Cell Biol. 127, 1515-1526

Cajal S.R. (1903) Un sencillo método de coloración del reticulo protoplasmico e sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados é invertebrados. Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid) 2, 129-221

Capco D.G., Wan K.M., Penman S. (1982) The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. Cell 29, 847-858

Capitani S., Girard P.R., Mazzei G.J., Kuo J.F., Berezney R., Manzoli F.A. (1987) Immunochemical characterization of protein kinase C in rat liver nuclei and subnuclear fractions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 367-375

Cardoso M.C., Joseph C., Rahn H.P., Reusch R., Nadal-Ginard B., Leonhardt H. (1997) Mapping and use of a sequence that targets DNAligase I to sites of DNA replication in vivo. J. Cell Biol. 579 - 587

Carmo-Fonseca M., Cidadão A.J., David-Ferreira J.S. (1987) Filaments cross-bridges link intermediate filaments to the nuclear pore complexes. Eur. J. Cell Biol. 45, 282-290

Carmo-Fonseca M., Hurt E.C. (1991) Across the nuclear pores with the help of nucleoporins. Chromosoma 101, 199-205

Carmo-Fonseca M., Kern H., Hurt E.C. (1991a) Human nucleoporin p62 and the essential yeast nuclear pore protein NSP1 show sequence homology and a similar domain organization. Eur. J. Cell Biol. 55, 17-30

Carmo-Fonseca M., Tollervey D., Pepperkok R., Barabino S.M.L., Merdes A., Brunner C., Zamore P.D., Green M.R., Hurt E., Lamond A.I. (1991 b) Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. EMBO J. 10, 195-206

Carmo-Fonseca M., Pepperkok R., Carvalho M.T., Lamond A.I. (1992)Transcription-dependent colocalization of the U1,U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. J. Cell Biol. 117, 1-14

Carmo-Fonseca M., Ferreira J., Lamond A.I. (1993) Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure .J. Cell Biol. 120, 841-852

Carmo-Fonseca M., Bohmann K., Carvalho M. T., Lamond A.I. (1994) In *Manual of Biological Markers of Disease*. (ed. W. Van Venrooij e R.N. Maini) secção B8.2 Pág. 1-11

Carter K.C., Taneja K.L. and Lawrence J.B. (1991) Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationships to the functional organization of the nucleus. J. Cell Biol. 115: 1191-1202

Carter C.C., Bowman D., Carrington W., Fogarty K., McNeil J.A., Fay F.S., Lawrence J.B. (1993) A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within mammalian nucleus. Science 259, 1330-1335

Carvalho T., Almeida F., Calapez A., Lafarga M., Berciano M.T., Carmo-Fonseca M. (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. J. Cell Biol. 147, 715-727

Chaly N., Setterfield G., Kaplan J.G., Brown D.L. (1983) Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes: II- Cytochemistry and autoradiography during stimulation by concanavalin A. Biol. Cell 49, 35-43

Chambon P. (1974) RNApolymerases. *In* Boyer, P.D., The Enzymes. Academic Press, New York, Vol.10, 261-331

Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A., Shevchenko A., Mann M., Dreyfuss G. (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. J. Cell Biol. 147, 1181-1194

Chou R.H., Churchill J.R., Mapstone D.E., Flubacher M.M. (1991) Sequence-specific binding of a c-myc nuclear-matrix-associated region shows increased nuclear matrix retention after leukemic cell (HL-60) differentiation. Amer. J. Anat. 191, 312-320

Claude A., Arenas J., Hurwitz J. (1991) The isolation and characterization of an RNA Helicase from nuclear extracts of HeLa cells. J. Biol. Chem. 266, 10358-10367

Clemson C. M., Lawrence J. B. (1996) Multifunctional compartments in the nucleus: insights from DNA and RNA localization. J. Cellular Biochem. 62, 181-190

Cmarko D., Verschure P.J., Martin T.E., Dahmus M.E., Krause S., Fu X.D., van Driel R., Fakan S. (1999) Ultrastructure analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. Mol. Biol. Cell 10, 211-223

Commerford S. A., Agutter P. S., McLennan A. G. (1986) Nuclear Structures: isolation and characterization (Birnie G.D., MacGillivray A.J. eds) Butterworth, London, 1

Cook P.R. (1989) The nucleoskeleton and the topology of transcription. Eur. J. Biochem.185, 487-501

Cook P.R. (1991) The nucleoskeleton and the topology of replication. Cell 66, 627-636

Cook P.R (1994) RNApolymerase: structural determinants of the chromatin loop and the chromosome. BioEssays 16, 425-430

Cook P. R. (1999) The organization of replication and transcription. Science 284, 1790-1795

Cordes V., Reidenbach S., Kohler A., Stuurman N., van Driel R., Franke W.W. (1993) Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. J. Cell Biol. 123, 1333-1344

Dahmus M.E. (1996) Reversible phosphorylation in the C-terminal domain of RNApolymerase II. J. Biol. Chem.271, 19009-19012

Das A.T., Ludérus M.E.E., Lamers W.H. (1993) Identification and analysis of a matrix-attachment region 5'of the rat glutamate-dehydrogenase-encoding gene. Eur. J. Biochem. 215, 777-785

Davis L.I., Blobel G. (1986) Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. Cell 45, 699-709

DePamphilis M.L. (2000) Review: Nuclear structure and DNA replication. J. Struct. Biol. 129, 186-197

Dietz H. (1998) Polishing the cutting edge of gems. Nat. Genet. 20, 321-322

Dijkwel P.A., Wenink P.W., Poddighe J. (1986) Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. Nucleic Acids Res. 14, 3241-3249

Du L. e Warren S.L. (1997) A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. J.Cell Biol.136, 5-18

Dworetzky S.I., Feldherr C.M. (1988) Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. J. Cell Biol. 106, 575-584

Earnshaw W.C., Heck M.S. (1985) Localization of Topoisomerase II in mitotic chromosomes. J. Cell Biol. 100, 1716-1725

Eberharter A., Grabher A., Gstraunthaler G., Loidl P. (1993) Nuclear matrix of the lower eukaryote *Physarum polycephalum* and the mammalian epithelial LLC-PK1 cell line. Eur. J. Biochem. 212, 573-580

Eisenman R.N., Tachibana C.Y., Abrams H.D., Hann S.R. (1985) V-myc- .and c-myc- encoded proteins are associated with the nuclear matrix. Mol. Cell Biol. 5, 114-126

Fakan S. (1994) Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. Trends. Cell Biol. 4, 86-90

Fay F.S., Taneja K.L., Shenoy S., Lifshitz L., Singer R.H. (1997) Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). Exp. Cell Res. 231, 27-37

Fey E.G., Wan K.M., Penman S. (1984) Epithelial cytoskeleton framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. J. Cell Biol. 98, 1973-1984

Fey E. G., Krochmalnic G., Penman S. (1986) The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analysed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. J. Cell Biol. 102, 1654-1665

Fey E. G., Penman S. (1988) Nuclear matrix reflect cell type of origin in cultured human cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 121-125

Filhol O., LoueMackenbach P., Cochet C., Chambaz E.M. (1991) Casein kinase II and polyamines may interact in the response of adrenocortical cells to their trophic hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 623-630

Fischer U., Liu Q., Dreyfuss G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. Cell 90, 1023-1029

Forbes D.J., Kirschner M.W., Newport J.H. (1983) Spontaneous formation of nucleus-like structures around bacteriophage DNA microinjected into Xenopus eggs. Cell 34, 13-23

Franke W.W., Kleinschmidt J.A., Spring H., Krohne G., Grund C., Trendelenburg M.F., Stoehr M., Scheer U. (1981) A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of Xenopus laevis. J. Cell Biol. 90, 289-299

Frigeri C.K., Armelin H. A. (1996) Patterns of long-term steroidogenesis stimulation by ACTH and phorbol ester. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 343-345

Gall J.G., Bellini M.,Wu Z., Murphy C. (1999) Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. Mol. Biol. Cell 10, 4385-4402

Gasser S.M., Laemmli U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. Trends Genet. 3, 16-22

Georgatos S.D., Blobel G. (1987) Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. J. Cell Biol.105, 117-125

Georgiev G.P. e Chentsov J.S. (1962) On the structural organization of nucleolo-chromosomal ribonucleoproteins. Exp. Cell Res. 27, 570-572

Georgiev G.P., Vassetzky Y.S., Luchnik A.N., Chernokhvostov V.V., Razin S.V. (1991) Nuclear skeleton, DNA domains and control of replication and transcription. Eur. J. Biochem. 200, 613-624

Gerace L., Ottaviano Y., Kondor-Koch C. (1982) Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. J. Cell Biol. 95, 826-837

Gerace L. (1992) Molecular trafficking across the nuclear pore complex. Curr. Opin. Cell Biol. 4, 637-645

Ghosh S., Baltimore D. (1990) Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor IkB. Nature 344, 678-682

Goldman A.E., Maul G., Steinert P.M., Yang H.-Y., Goldman R.D. (1986) Keratin-like proteins that co-isolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 3839-3943

Gonzalez G.A., Menzel P., Leonard J., Fischer W.H., Montminy M.R. (1991) Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. Mol. Cell. Biol. 11, 1306-1312

Grande M.A., van der Kraan I., de Jong L., van Driel R. (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNApolimerase II. J. Cell Sci. 110, 1781-1791

Greber U.F., Senior A., Gerace L. (1990) A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large lumenal domain and a small cytoplasmic tail. EMBO J. 9, 1495-1502

Hagiwara M., Brindle P., Harootunian A., Armstrong R., Rivier J., Vale W., Tsien R., Montminy M. (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. Mol. Cell. Biol. 13, 4852-4859

Hai T.-Y., Curran T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3720-3724

Hall P.F. (1985) Trophic stimulation of steroidogenesis: in search of the elusive trigger. Recent Prog. Horm. Res. 41, 1-31

Hallberg E., Wozniak R.W., Blobel G. (1993) An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region. J. Cell Biol. 122, 513-522

Hakes D.J., Berezney R. (1991) DNA-binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. J. Biol. Chem. 266, 11131-11140

Hanukoglu I., Feuchtwanger R., Hanukoglu A. (1990) Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells. J. Cell Biol. 265, 20602-20608

Harpold M.M., Wilson M.C., Darnell J.E.Jr. (1981) Chinese hamster polyadenylated messenger ribonucleic acid: Relationship to non-polyadenylated sequences and relative conservation during messenger ribonucleic acid processing, Mol. Cell Biol. 1, 188-198

Harris S.G., Smith H.C. (1988) SnRNP core protein enrichment in the nuclear matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 1383-1387

Haughey D., Jusko W. (1988) Analysis of methylprednisolone, methylprednisone and corticosterone for assessment of methylprednisolone disposition in the rat. J. Chromatogr. 430, 241-248

He D., Nickerson J.A., Penman S. (1990) The core filaments of the nuclear matrix. J. Cell Biol. 110, 569-580

He D.C., Martin T., Penman S. (1991) Localization of heterogenous nuclear ribonucleoprotein in the interphase nuclear matrix core filaments and on perichromosomal filaments at mitosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88, 7469-7473

Hendzel M.J., Sun J.-M., Chen H. Y., Rattner J.B., Davie J.R. (1994) Histone Acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. J. Biol. Chem. 269, 22894-22901

Hernandez -Verdun D., Hubert J., Bourgeois C.A., Bouteille M. (1980) Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolous during the cell cycle and in other nucleolar structures. Chromosoma (Berlin) 79, 349-362

Hinshaw J.E., Carragher B.O., Milligan R.A. (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex. Cell 69, 1133-1141

Hinson J.P., Vinson G. P., Kapas S., Teja R. (1991) The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 40: 381-389

Hoppe-Seyler F. (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung des Eiters. Hoppe-Seyler´s Med. Chem. Unters. 4, 486-501

Hozák P., Hassan A.B., Jackson D.A., Cook P.R (1993) Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. Cell 73, 361-373.

Hozák P. (1995) Catching RNA polymerase I in flagranti: ribosomal genes are transcribed in the dense fibrillar component of the nucleolous. Exp. Cell Res. 216, 285-289

Huang S., Deerinck T. J., Ellisman M.H., Spector D. L. (1994) In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)+RNA. J. Cell Biol.126, 877-899

Hunter T., Karin M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. Cell 70, 375-387

Iborra F.J., Pombo A., Jackson D.A., Cook P.R. (1996a) Active RNApolimerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei. J. Cell Sci. 109, 1427-1436

Iborra F.J., Pombo A., McManus J., Jackson D.A., Cook P.R. (1996b) The topology of transcription by immobilized polymerases. Exp. Cell Res. 229, 167-173

Imai T., Seo H., Murata Y., Ohno M., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matsui N. (1990) ACTH increases expression of c-fos and β- actin genes in the rat adrenals. Endocrinology 127, 1742-1747

Jackson D.A., Cook P.R. (1986) Replication occurs at a nucleoskeleton. EMBO J. 5, 1403-1410

Jackson D.A., Cook P.R. (1988) Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. EMBO J. 7, 3667-3677

Jackson D. A., Hassan A. B., Errington R.J., Cook P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. EMBO J.12, 1059-1065

Jimenez-Garcia L.F., Segura-Valdez M.L., Ochs R.L., Rothblum L.I., Hannan R., Spector D.L. (1994) Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. Mol. Biol. Cell 5, 955-966

Kallajoki M., Osborn M. (1994) Gel electrophoretic analysis of nuclear matrix fractions isolated from different human cell lines. Electrophoresis 15, 520-528

Kass S., Tyc K., Steitz J.A., Sollner-Webb B. (1990) The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. Cell 60, 897-908

Kaufmann S.H., Coffey D.S., Shaper J.H. (1981) Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. Exp. Cell Res. 132, 105-123

Kaufmann S.H. (1989) Additional members of the rat liver lamin polypeptide family. J. Biol. Chem. 264, 13946-13955

Kaufmann S.H., Shaper J.H. (1991a) Association of Topoisomerase II the hepatoma cell nuclear matrix: the role of intermolecular disulfide bond formation. Exp. Cell Res. 192, 511-523

Kaufmann S.H., Brunet G., Talbot B., Lamarr D., Dumas C., Shaper J.H., Poirier G. (1991b) Association of poly(ADP-ribose)polymerase with the nuclear matrix: the role intermolecular disulfide bond formation, RNA retention, and cell type. Exp. Cell Res. 192, 524-535

Khanuja P. S., Lehr J. E., Soule H.D., Gehani S.K., Noto A.C., Choudhury S., Chen R., Pienta K. P. (1993) Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. Cancer Res. 53, 3394-3398

Kimura E., Armelin H.A. (1990) Phorbol ester mimics ACTH action in corticoadrenal cells stimulating steroidogenesis, blocking cell cycle, changing cell shape, and inducing c-fos proto-oncogene expression. J. Biol. Chem. 265, 3518-3521

Kohwi-Shigematsu T., Kohwi Y. (1996) High unwinding capability of matrix attachment regions and ATC-sequence context-specific MAR-binding proteins. *In* Nuclear structure and gene expression. Cap. I - 4, 111-144 Edited by Bird R.C., Stein G.S..Lian J.B., Stein J.L.Academic Press

Koistinaho J., Roivainen R., Yang G. (1990) Circadian rhythm in c-fos protein expression in the rat adrenal cortex. Mol. Cell. Endocrinol. 71, R1-R6

Korosec T., Gerner C., Sauermann G. (1997) Common nuclear matrix proteins in rat tissues. Electrophoresis 18, 2109-2115

Kraemer D., Wozniak R.W., Blobel G., Radu A. (1994) The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 1519-1523

Kramer J.A., Krawetz S.A. (1995) Matrix-associated regions in haploid expressed domains. Mammalian Genome 6, 677-679

Kramer J.A., Singh G.B., Krawetz S.A. (1996) Computer-assisted search for sites of nuclear matrix attachement. Genomics 33, 305-308

La Bella V., Cisterni C., Salaun D., Pettmann B. (1998) Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. Eur. J. Neurosci. 10, 2913-2923

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Lalli E., Sassoni-Corsi P. (1994) Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP.J. Biol. Chem. 269, 17359-17362

Lamond A.I. e Carmo-Fonseca M. (1993) The coiled body. Trends Cell Biol. 3, 198-204

Lamond A.I., Earnshaw W.C. (1998) Structure and function in the nucleus. Science 280, 547-553

Lawrence J.B., Singer R.H., Marcelle L.M., (1989) Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. Cell 57, 493-502

Lebel S., Raymond Y. (1984) Lamin B from rat liver nuclei exists both as a lamina protein and as an intrinsic membrane protein. J. Biol. Chem. 259, 2693-2696

Lebel S. Lampron C., Royal A., Raymond Y. (1987) Lamins A and C appear during retinoic acid-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma cells. J. Cell Biol. 105, 1099-1104

Lee C.Q., Yun Y.D., Hoeffler J.P., Habener J.F. (1990) Cyclic-AMP-responsive transcriptional activation of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains. EMBO J. 9, 4455-4465

Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zevianni M., Le Paslier D., Frezal J., Cohen D., Weissenbach J., Munnich A., Melki J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell 80, 155-165

Legros F., LeHoux J.G. (1983) Changes in characteristics of rat adrenal glomerulosa cells under acute and chronic treatment with ACTH. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61: 538-546

LeHoux J.G., Ducharme L. (1995) *In vivo* effects of adrenocorticotropin on c-jun, jun-B, c-fos and fos -B in rat adrenal. Endocrine Res. 21, 267-274

LeHoux J.G., Fleury A., Ducharme L. (1998) The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal *in vivo*. Endocrinology 139, 3913-3922

Leonhardt H., Rahn H.P., Weinzierl P., Sporbert A., Cremer T., Zink D., Cardoso M.C. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. J. Cell Biol. 149, 271-280

Leser G.P., Escara-Wilke J., Martin T.E. (1984) Monoclonal antibodies to heterogenous nuclear RNA-protein complexes. The core proteins comprise a conserved group of related polypeptides. J. Biol. Chem. 259, 1827-1833

Lewis J. D., Tollervey D. (2000) Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. Science 288, 1385-1389

Lischwe M.A., Ochs R.L., Reddy R., Cook R.G., Yeoman L.C., Tan E.M., Reichlin M., Busch H. (1985) Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) rich in NG, NG- dimethylarginine. J. Biol. Chem. 260, 14304-14310

Liu Q., Dreyfuss G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neuron proteins. EMBO J. 15, 3555-3565

Liu J., Youtilainen R., Kahri A.I., Heikkila P. (1996) Expression of the c-myc gene in human adrenals: regulation by adrenocorticotropin in primary cultures. J. Endocrinol. 148, 523-529

Liu Q., Fischer U., Wang F., Dreyfuss G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. Cell 90, 1013-1021

Long C.N.H. (1945) Relation of cholesterol and ascorbic acid to secretion of adrenal cortex. Recent Prog. Horm. Res. 1, 99-122

López-Rodas G., Lang S., Loidl A., Fasching B., Greil R., Loidl P. (1992) Nuclear proto-oncogene homologous proteins during the cell cycle of Physarum polycephalum. Cell Biol. Int. Rep.16, 1185-1192

Lotfi C.F., Armelin H.A. (1998) c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH. Endocr. Res. 24, 421-424

Lowry O.H., Rosenbrough N. J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Ludérus M.E.E., de Graaf A., Mattia E., den Blaauwen J.L., Grande M.A., de Jong L., van Driel R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. Cell, 70, 949-959

Luscher B., Kuenzel E.A., Krebs E.G., Eisenman R.N. (1989) Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. EMBO J. 8, 1111-1119

Lutz Y., Jacob M., Fuchs J. (1988) The distribution of two hnRNP-associated proteins defined by a monoclonal antibody is altered in heat-shocked HeLa cells. Exp. Cell Res. 175, 109-124

MacMillan A.M., McCaw P.S., Crispino J.D., Sharp P.A. (1997) SC35-mediated reconstitution of splicing in U2AF-depleted nuclear extract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 133-136

Magalhães MC, Bonito-Vitor A and Magalhães MM (1986) Effects of ACTH on RNA synthesis and migration in the adrenal cortex cells of the young rat, as shown by radioautography. Acta Endocrinol 112: 114-121

Maier R., Staehelin M. (1968) Adrenal responses to corticotrophin in the presence of an inhibitor of protein synthesis. Acta Endocrinol. 58, 619-629

Malatesta M., Cardinalli A., Battistelli S., Zancanaro C., Martin T.E., Fakan S., Gazzanelli G. (1999) Nuclear bodies are usual constituents in tissues of hibernating dormice. Anat. Rec.254, 389-395

Maldonado E., Sheikhattar R., Sheldon M., Cho H., Drapkin R., Rickert P., Lees E., Anderson C.W., Linn S., Reinberg D. (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. Nature 381, 86-89

Martelli A.M., Falcieri E., Gobbi P., Manzoli L., Gilmour R.S., Cocco L. (1991) Heat-induced stabilization of the nuclear matrix: a morphological and biochemical analysis in murine erythroleukemia cells. Exp. Cell Res. 196, 216-225

Martelli A.M., Bareggi R., Riederer B.M., Marugg R.A., Narducci P. (1994a) The effect of in vitro heating on the distribution of nuclear matrix polypeptides in HeLa cells. Cell Biol. Int. 18, 151-158

Martelli A.M., Bareggi R., Narducci P. (1994b) Catalytic properties of DNA polymerase α activity associated with the heat-stabilized nuclear matrix prepared from HeLa S3 cells. Cell Biochem. Funct.12, 129-135

Masquilier D., Sassoni-Corsi P. (1992) Transcription cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. J. Cell Biol.267, 22460-22466

Matera A.G., Frey M.R. (1998) Coiled bodies and gems: Janus or Gemini? Am. J. Hum. Genet. 63, 317-321

Matera A.G. (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. Trends Cell Biol. 9, 302-309

Matunis E.L., Matunis M.J., Dreyfuss G. (1993) Association of individual hnRNP proteins and snRNPs with nascent transcripts. J. Cell Biol. 121, 219-228

Mayer D.T. e Gulick A. (1942) The nature of the proteins of cellular nuclei. J. Biol. Chem. 146, 433-440

McCracken S., Fong N., Yankulo K., Ballentyne S., Pan G., Greenblatt J., Patterson S.D., Wickens M., Bentley D.L. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. Nature 385, 357-361

McCready S.J., Akrigg A., Cook P.R. (1979) Electron-mycroscopy of intact nuclear DNA from human cells. J. Cell Sci. 39, 53-62

McMorrow I.M., Bastos R., Horton H., Burke B. (1994) Sequence analysis of a cDNA encoding a human nuclear pore complex protein, hnup153. Biochim. Biophys. Acta 1217, 219-223

Meier J., Campbell K.H., Ford C.C., Stick R., Hutchison C.J. (1991) The role of lamina L III in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of Xenopus eggs. J. Cell Sci. 98, 271-279

Meinkoth J.L., Ji Y., Taylor S.S., Feramisco J.R. (1990) Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 9595-9599

Michael l.F., Asahara H., Shulman A.I., Kraus W.,L. Montminy M. (2000) The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. Mol. Cellul. Biol. 20, 1596-1603

Miescher F. (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Hoppe-Seyler´s Med. Chem. Unters. 4, 441-460

Mills A.D., Blow J.J., White J.H., Amos W.B., Wilcock D., Laskey R. A. (1989) replication occurs at discrete foci spaced throughout nuclei replicating in vitro. J. Cell Sci. 94, 471-477

Mintz P.J., Spector D. L. (2000) Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. J. Struct. Biol. 129, 241-251

Moir R.D., Montag-Lowy M., Goldman R.D. (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: Lamin B is associated with sites of DNA replication. J. Cell Biol. 125, 1201-1212

Moir R.D., Spann T.P., Goldman R.D. (1995) The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. Int. Rev. Cytol. 162 B, 141-182

Monneron A. e Bernhard W. (1969) Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res. 27, 266-288

Morosov A., Phelps W.C., Raychaudhuri P. (1994) Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoproteins depends upon the cAMP-response element at -60. J. Biol. Chem. 269, 18434-18440

Mortillaro M.J., Blencowe B.J., Wei X., Nakayasu H., Du H., Warren S.L., Sharp P.A., Berezney R. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNApolymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 8253-8257

Mukai K., Mitani F., Agake R., Ishimura Y. (1998) Adrenocorticotropic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors. Eur. J. Biochem. 256, 190-200

Muller M.T., Pfund W.P., Mehta V.B., Trask D.K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. EMBO J. 4, 1237-1243

Nakamura H., Morita T., Sato C. (1986) Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. Exp. Cell Res. 165, 291-

Nakayasu H., Berezney R. (1989) Mapping replicational sites in the eukaryotic cell nucleus. J. Cell Biol. 108, 1-11

Nakayasu H., Berezney R. (1991) Nuclear matrins: identification of the major nuclear matrix proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88, 10312-10316

Nasmyth K., Adolf G., Lydall D., Sheddon A. (1990) The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: Cell cycle regulation of SWI5 nuclear entry. Cell 62, 631-647

Neri L.M., Santi S., Marugg R.A., Riederer B.M., Capitani S., Cataldi A., Martelli A.M. (1994) In vitro heat exposure induces a redistribution of nuclear matrix proteins in human K562 erythroleukemia cells. Exp. Cell Res. 213, 275-285

Neves D., Magalhães M.M., Magalhães M. C. (1993) Adrenal nuclear matrix isolation. A morphologic and biochemical study. Biol. Cell. 79, 139-145

Neves D., Magalhães M.M., Magalhães M.C. (1999) Immunocytochemical detection of structural and regulatory proteins in rat adrenal nuclear matrix. Biotechnic & Histochemistry 74, 85-91

Neves D., Magalhães M.M., Magalhães M.C. (2000) Poly-A Rich Domains in Adrenal Cell Nuclear Matrix After ACTH Acute and Chronic Stimulation. An *in situ* hybridization study. Cell & Tissue Res. 302, 81-84

Nickerson J.A., Blencowe B.J., Penman S. (1995) The architectural organization of nuclear metabolism. Int. Rev. Cyt. 162A, 67-123

Nickerson J.A., Krockmalnic G., Wan K.M., Penman S. (1997) The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94, 4446-4450

Nigg E.A., Baeuerle P.A., Luhrmann R. (1991) Nuclear Import-export: in search of signals and mechanisms. Cell 66, 15-22

Nikolaev L.G., Tsevegiyn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. (1996) Construction of a chromosome specific library of human MARs and mapping of matrix attachment regions of human chromosome 19. Nucleic Acids Res. 24, 1330-1336

Nishikawa T., Omura M., Suematsu S. (1997) Possible involvement of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Cinase in ACTH-induced expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in bovine adrenal fasciculata cells. Endoc. J.44, 895-898

Nonaka Y., Okamoto M. (1991) Functional expression of the cDNAs encoding rat 11 β-hydroxylase [cytochrome P450 (11 β)] and aldosterone synthase [cytochrome P450 (11 β,aldo)]. Eur. J. Biochem. 202, 897-902

Nussdorfer G.G. (1986) Cytophysiology of the adrenal cortex. Int. Rev. Cytol. 98, 1-405

Ochs R.L., Lischwe M.A., Spohn W.H., Busch H. (1985) Fibrillarin: a new protein of the nucleolous identified by autoimmune sera. Biol. Cell 54, 123-133

Ochs R.L., Smetana K. (1991) Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix. Exp. Cell Res. 197, 183-190

Ohno M., Seo H., Imai T., Murata Y., Miyamoto N., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matsui N. (1992) ACTH increases expression of c-fos, c-jun and β-actin genes in the dexamethasone-treated rat adrenals. Endocrinol Japon 39, 377-383

Olson M.O., Wallace M.O., Herrera A.H., Marshall-Carlson L., Hunt R.C. (1986) Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. Biochemistry 25, 484-491

Orth D.N., Kovacs W.J., Debold C.R. (1992) The adrenal cortex. *In* Williams text book of Endocrinology. 8ª edição. Capítulo 9 Wilson & Foster, W.B. Saunders Company USA

Panté N., Bastos R., McMorrow I., Burke B., Aebi U. (1994) Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins. J. Cell Biol. 126, 603-617

Panté N., Aebi U. (1995) Toward a molecular understanding of the structure and function of the nuclear pore complex. Int. Rev. Cytol. 162B, 225-255

Panzeter P.L., Ringer D.P. (1993) DNA precursors are channeled to nuclear matrix DNA replication sites. Biochem. J. 293, 775-779

Patturajan M., Wei X., Berezney R., Corden J.L. (1998) A nuclear matrix protein interacts with the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. Mol. Cellul. Biol. 18, 2406-2415

Pederson T. (1974) Proteins associated with heterogeneous nuclear RNA in eukaryotic cells. J. Mol. Biol. 83, 163-184

Pederson T. (1998) Thinking about a nuclear matrix. J. Mol. Biol. 277, 147-159

Pellerin S., Lafeuillade B., Scherrer N., Gagnon J., Shi D.L., Chambaz E.M., Feige J.J. (1993) Corticotropin-induced secreted protein, an ACTH-induced protein secreted by adrenocortical cells, is structurally related to trombospondins. J. Biol. Chem. 268, 4304-4310

Pellizzoni L., Kataoka N., Charroux B., Dreyfuss G. (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. Cell 95, 615-624

Pellizzoni L., Charroux B., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G. (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNApolimerase II. J. Cell Biol. 152, 75-86

Penhoat A., Jaillard C., Saez J.M. (1989) Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4978-4981

Penman S., Blencowe B.J., Nickerson J.A. (1996) The nuclear matrix: Past and present. *In* Nuclear Structure and Gene Expression. 3- 31 R. Curtis Bird, Gary S. Stein, Jane B. Lian, Janet L. Stein Academic Press, London

Péron F.G., Koritz S.B. (1960) On the location of the stimulation in vitro by Ca^{2+} and freezing of corticoid production by rat adrenal homogenates. J. Biol. Chem. 235, 1625-1628

Peters K.E., Okada T.A., Comings D.E. (1982) Chinese hamster nuclear proteins. Eur. J. Biochem. 129, 221-232

Philipova R.N., Vassilev A.P., Kaneva R.P., Andreeva P., Todorov I.T., Hadjiolov A.A. (1991) Expression of the nuclear protein mitotin in differentiating in vitro HL60 cells. Biol. Cell 72, 47-50

Pombo A., Cook P.R. (1996) The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. Exp. Cell Res. 229, 201-203

Pombo A., Cuello P., Schul W., Yoon J-B, Roeder R.G., Cook P.R., Murphy S. (1998) Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle. EMBO J. 17, 1768-1778

Pombo A., Jackson D.A., Hollinshead M., Wang Z., Roeder R.G., Cook P.R. (1999) Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. EMBO J. 18, 2241-2253

Portugal F.H., Cohen J.S. (1972) *In* A century of DNA, pp-16-18, MIT Press, Cambridge, MA

Pringle J.H., Primrose L., Kind C.N., Talbot I.C., Lauder I. (1989) In situ hybridization demonstration of Poly-adenylated RNA sequences in formalin-fixed paraffin sections using a biotinylated oligonucleotide polyd(T) probe. J. Pathol. 158, 279-286

Puvion-Dutilleul F., Bachellerie J.P., Puvion E. (1991) Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. Chromosoma 100, 395-409

Puvion-Dutilleul F., Besse S., Chan E.K.L., Tan E.M., Puvion E. (1995) p80-Coilin: a component of coiled bodies and interchromatin granule-associated zones. J. Cell Sci.108, 1143-1153

Radha V., Nambirajan S., Swarup G. (1996) Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity. Eur. J. Biochem. 236, 352-359

Radu A., Blobel G., Wozniak R. W. (1993) Nup155 is a novel nuclear pore complex protein that contains neither repetitive sequence motifs nor reacts with WGA. J. Cell Biol.121, 1-9

Raikhinstein M., Hanukoglu I. (1994) Cloning of ACTH-regulated genes in the adrenal cortex. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 49, 257-260

Raska, I., Ochs R.L., Salamin-Michel L. (1990) Immunocytochemistry of the cell nucleus. Electron Microsc. Rev. 3: 301-353

Raska I, Andrade L.E.C., Ochs R.L., Chan E.K.L., Chang C.M., Roos G., Tan E.M. (1991) Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. Exp. Cell Res. 125, 27-37

Razin S.V., Gromova I.I. (1995) The channels model of nuclear matrix structure. Bioessay 17, 443-450

Razin S.V., Gromova I.I., Iarovaia O.V. (1995) Specifity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. Int. Review Cytol. 162 B, 405-448

Reichelt R., Holzenburg A., Buhle E.L., Jarnik M. Engel A., Aebi U. (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore components. J. Cell Biol. 110, 883-894

Reuter R., Appel B., Bringmann P., Rinke J., Luhrmann R. (1984) 5′-Terminal caps of snRNP are reactive with antibodies specific for 2,2,7- trimethylguanosine in whole cells and nuclear matrices. Exp. Cell Res. 154, 548-560

Richardson W.D., Mills A.D., Dilworth S.M., Laskey R.A., Dingwall C. (1988) Nuclear protein migration involves two steps: Rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through the nuclear pores. Cell 52, 655-664

Romig H., Ruff J., Fackelmayer F.O., Patil M.S., Richter A. (1994) Characterisation of two intronic nuclear-matrix-attachment regions in the human DNA topoisomerase I gene. Eur. J. Biochem. 221, 411-419

Sambrook J., Fritsch., Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. (segunda edição) Cold Spring Harbor Laboratory Press - New York

Sander M., Ganten D., Mellon S.H. (1994) Role of adrenal renin in the regulation of adrenal steroidogenesis by corticotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 148-152

Sarria A.J., Lieber J.H., Nordeen S.K., Evans R.M. (1994) The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. J. Cell Sci.107, 1593-1607

Saunders W.S., Cooke C.A., Earnshaw W.C. (1991) Compartmentalization within the nucleus: discovery of a novel subnuclear region. J. Cell Biol. 115, 919-931

Scheer U. Rose K.M. (1984) Localization of RNApolymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1431-1435

Scheer U., Benavente R. (1990) Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolous. BioEssays 12, 14-21

Schimmer B.P., Kwan W.K., Tsao J., Qiu R. (1995 a) ACTH - receptor deficient mutants of the Y1 mouse adrenocortical tumor cell line. Endocrin. Res. 21, 139-156

Schimmer B.P., Kwan W.K., Tsao J., Qiu R. (1995 b) Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor. J. Cell Physiol. 163, 164-171

Schuchard M., Subramaniam M., Ruesink T., Spelsberg T.C. (1991) Nuclear matrix localization and specific matrix DNA binding by receptor binding factor 1 of the avian oviduct progesterone receptor. Biochemistry 30, 9516-9522

Schul W., Groenhout B., Koberna K., Takagaki Y., Jenny A., Manders E.M.M., Raska I., van Driel R., de Jong L. (1996) The RNA 3´cleavage factors CstF 64kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. EMBO J. 15, 2883-2892

Schul W., van Driel R., de Jong L. (1998) Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required to snRNA transcription. Mol. Biol. Cell 9, 1025-1036

Schul W., van der Kraan I., Matera A.G., van Driel R., de Jong L. (1999) Nuclear domains enriched in RNA 3′- processing factors associated with coiled bodies and histone genes in a cell cycle-dependent manner. Mol. Biol. Cell 11, 3815-3824

Shiomi Y., Powers J., Bolla R.I., Van Nguyen T., Schlessinger D. (1986) Proteins and RNA in mouse L cell core nucleoli and nucleolar matrix. Biochemistry 25, 5745-5751

Shoeman R.L., Traub P. (1990) The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamins proteins and vimentin. J. Biol. Chem. 265, 9055-9061

Simpson E.R., Waterman M. R. (1983) Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61, 692-703

Simpson E.R., Waterman M. R. (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. Annu. Rev. Physiol 50, 427-440

Sisodia S.S., Sollner-Webb B., Cleveland D.W. (1987) Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. Mol. Cell Biol. 7, 3602-3612

Sleeman J.E., Lamond A.I. (1999) Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 372-377

Smetana K., Steele W.J., Busch H. (1963) A nuclear ribonucleoprotein network. Exp. Cell Res.31, 198-201

Smith H.C., Berezney R. (1983) Dynamic domains of DNA polymerase alpha in regenerating rat liver. Biochemistry 22, 3042-3046

Snow C.M., Senior A., Gerace L. (1987) Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex gycoproteins. J. Cell Biol. 104, 1143-1156

Spector D.L., Watt R.A., Sullivan N.F. (1987) The v- and c-myc oncogene proteins colocalize in situ with small nuclear ribonucleoprotein particles. Oncogene 1, 5-12

Spector D.L. (1990) Higher order nuclear organization: Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoproteins particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 147-151

Spector D.L., Lark G., Huang S. (1992) Differences between snRNP localization between transformed and non transformed cells. Mol. Biol. Cell 3, 555-569

Spector D.L. (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. Annu. Rev. Cell Biol.9, 265-315

Staden R. (1988) Methods to define and locate patterns of motifs in sequences. Comput. Appl. Biosci. 4, 53-60

Starr C.M., D'Onofrio M., Park M.K., Hanover J.A. (1990) Primary sequence and heterologous expression of nuclear pore glycoprotein p62. J. Cell Biol. 110, 1861-1871

Stephanova E., Stansheva R., Avramova Z. (1993) Binding of sequences from the 5'-and 3'-nontranscribed spacers of the rat rDNA locus to the nucleolar matrix. Chromosoma 102, 287-295

Steward R. (1989) Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. Cell 59, 1179-1188

Strasswimmer J., Lorson C.L., Breiding D.E., Chen J.J., Le T., Burghes A.H., Androphy E.J. (1999) Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. Hum. Mol. Genet. 8, 1219-1226

Strouboulis J., Wolffe A.P. (1996) Functional compartmentalization of the nucleus. J. Cell Sci. 109, 1991-2000

Stuurman N., Meijne A.M.L., van der Pol A.J., de Jong L., van Driel R., van Renswoud J. (1990) The nuclear matrix from cells of different origins. J. Biol. Chem.265, 5460-5465

Stuurman N., DeGraf A., Floore A., Josso A., Humbel B., de Jong L., van Driel R. (1992) A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. J. Cell Sci.101, 773-784

Sukewaga J., Blobel G. (1993) A nuclear pore complex protein that contains zinc fingers and faces the nucleoplasm. Cell 72, 29-38

Talbot I.C., Primrose L., Pringle J.H. (1989) Functional activity of intestinal ephitelium demonstrated by mRNA in situ hybridization. J. Pathol. 158, 287-291

Tawfic S., Ahmed K. (1994) Growth stimulus-mediated differential translocation of casein kinase 2 to the nuclear matrix. J. Cell Chem. 269, 24615-24620

Tawfic S., Faust R.A., Gapany M., Ahmed K. (1996) Nuclear matrix as an anchor for protein kinase CK2 nuclear signalling. J. Cell. Biochem. 62, 165-171

Tawfic S., Davis A.T., Faust R.A., Gapany M., Ahmed K. (1997) Association of protein kinase CK2 with nuclear matrix: influence of method of preparation of nuclear matrix. J. Cell Biochem. 64, 499-504

Thiry M. (1992a) Ultrastructural detection of DNA within the nucleolous by sensitive molecular immunocytochemistry. Exp. Cell Res. 200, 135-144

Thiry M. (1992b) New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolous: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. Nucl. Acids Res. 20, 6195-6200

Thiry M. (1993) Differential location of nucleic acids within interchromatin granule clusters. Eur. J. Cell Biol. 62, 259-269

Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Hurt E.C. (1991) The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. EMBO J. 10, 573-583

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

Tsongalis G.J., Coleman W.B., Smith G.J., Kaufmann D.G. (1992) Partial characterization of nuclear matrix attachment regions from human fibroblast DNA using Alu-polymerase chain reaction. Cancer Res.52, 3807-3810

Tsutsui K., Tsutsui K., Okada S., Watarai S., Seki S., Yasuda T., Shohmori T. (1993) Identification and characterization of a nuclear scaffold protein that binds the matrix attachment region DNA. J. Biol. Chem. 268, 12886-12894

Tubo R.A., Berezney R. (1987a) Nuclear matrix-bound DNA primase. Elucidation of an RNA priming system in nuclear matrix isolated from regenerating rat liver. J. Biol. Chem.262, 6637-6642

Tubo R.A., Berezney R. (1987b) Identification of 100 and 150 S DNApolymerase alpha-primase megacomplexes solubilized from the nuclear matrix of regenerating rat liver.J.Biol. Chem. 262, 5857-5865

Tubo R.A., Berezney R.(1987c) Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 262, 1148-1154

Vallejo M. (1994) Transcription control of gene expression by cAMP-response element binding proteins. J. Neuroendocr. 6, 587-596

van der Velden H.M.W., Wanka F. (1987) The nuclear matrix - its role in the spatial organization and replication of eukaryotic DNA. Molec. Biol. Reports 12, 69-77

van Driel R., Wansink D. G., van Steensel B., Grande M.A., Schul W., de Jong L (1995) Nuclear domains and the nuclear matrix. Int. Rev. Cytol. 162A, 151-189

van Drunen C.M., Sewalt R.G., Oosterling R.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C., van Driel R. (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. Nucleic Acids Res. 15, 2924-2930

van Steensel B., Brink M., van der Meulen K., van Binnendijk E.P., Wansink D.P., de Jong L., van Driel R. (1995) Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus. J. Cell Sci. 108, 3003-3011

Vassetzky Y.S., Razin S.V., Georgiev G.P. (1989) DNA fragments which specifically bind to isolated nuclear matrix in vitro interact with matrix-associated DNA topoisomerase II. Biochem. Biophys. Res. Commun.159, 1263-1268

Verheijen R., Venrooij W.V., Ramaekers F. (1988) The nuclear matrix. Structure and composition. J. Cell Sci. 90, 11-36

Viard I., Hall S.H., Jaillard C., Berthelon M.C., Saez J.M. (1992) Regulation of c-Fos and c-Jun messenger ribonucleic acids by Angiotensin-II and Corticotropin in ovine and bovine adrenocortical cells. Endocrinology 130, 1193-1200

von Kries J.P., Buhrmester H., Stratling W.H. (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. Cell 64, 123-135

von Lindern M., van Baal S., Wiegant J., Raap A., Hagemijer A., Grosveld G. (1992) *can*, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3′ half to different genes: Characterization of the *set* gene. Mol. Cell. Biol. 12, 3346-3355

Waitz W., Loidl P. (1991) Cell cycle dependent association of c-myc protein with the nuclear matrix. Oncogene 6, 29-35

Wang X., Traub P. (1991) Resinless section immunogold electron microscopy of kario-cytoskeletal frameworks of eukaryotic cells cultured *in vitro*. J. Cell Sci. 98, 107-122

Wansink D.G., Schul W., Vanderkraan I., Vasteensel B., Vandriel R., Dejong L. (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polimerase II in domains scattered throughout the nucleus. J. Cell Biol.122, 283-294

Wasser M.,Chia W. (2000) The EAST protein of Drosophila controls an expandable nuclear endoskeleton. Nature Cell Biol. 2, 268-275

Waterman M R (1994) Biochemical diversity of cAMP-dependent transcription of steroid hydroxylase genes in the adrenal cortex. J. Biol. Chem. 269, 27783-27786

Wei X., Somanathan S., Samarabandu J., Berezney R. (1999) Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. J. Cell Biol. 146, 543-558

Weipoltshammer K., Schoffer C., Wachtler F., Hozak P. (1996) The transcription unit of ribosomal genes is attached to the nuclear skeleton. Exp. Cell Res. 227, 374-379

Wilken N., Kossner U., Senécal J.-L., Scheer U., Dabauvalle M.-C. (1993) Nup180, a novel nuclear pore complex protein localizing to the cytoplasmic ring and associated fibrils. J. Cell Biol. 123, 1345-1354

Wozniak R.W., Bartnik E., Blobel G. (1989) Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. J. Cell Biol. 108, 2083-2092

Wozniak R.W., Blobel G. (1992) The single transmembrane segment of gp210 is sufficient for sorting to the pore membrane domain of the nuclear envelope. J. Cell Biol.119, 1441-1449

Wu Z., Murphy C., Wu C.-H. H., Tsvetkov A., Gall J. G. (1993) Snurposomes and coiled bodies. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. LVIII, 747-753

Wuarin J., Schibler U. (1994) Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNApolymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. Mol. Cell Biol.14, 7219-7225

Xing Y and Lawrence JB (1991) Preservation of specific RNA distribution within the chromatin-depleted nuclear substructure demonstrated by in situ hybridization coupled with biochemical fractionation. J. Cell Biol. 112: 1055-1063

Xing Y., Johnson C.V., Dobner P.R., Lawrence J.B. (1993) Higher level organization of individual gene transcription and RNA splicing. Science 259, 1326-1330

Xing Y., Johnson C.V., Moen P.T. Jr, McNeil J.A., Lawrence J.B. (1995) Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains. J. Cell Biol. 131, 1635-1647

Xu J., Manning F.C.R., Patierno S.R. (1994) Preferential formation and repair of chromium-induced DNA adducts and DNA-protein crosslinks in nuclear matrix DNA. Carcinogenesis 15, 1443-1450

Yang G., Koistinaho J., Iadarola M., Shenhua-Zhu, Hervonen A. (1990) Administration of adrenocorticotropic hormone (ACTH) enhances Fos expression in the rat adrenal cortex. Regulat. Peptides 30, 21-31

Young P.J., Le T.T., Man N., Burghes A.H.M., Morris G.E. (2000) The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. Exp. Cell Res. 256, 365-374

Yue Z., Maldonado E., Pillutta R., Cho H., Reinberg D., Shatkin A.J. (1997) Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cervisiae* lacking

mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94, 12898-12903

Zbarskii I.B. e Debov S.S. (1948) On proteins of the cell nucleus. Doklady Akad. Nauk. SSSR 63, 795-798

Zbarsky I.B., Dmitrieva N.P., Yermolayeva L.P. (1962) On the structure of tumor cell nuclei. Exp. Cell Res. 27, 573-576

Zehnebauer B., Vogelstein B. (1986) Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukariotes. BioEssays 2, 52-54

Zeng C., Kim E., Warren S.L., Berget S.M., (1997) Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. EMBO J. 16, 1401-1412

Zhang P., Davis A.T., Ahmed K. (1998) Mechanism of protein kinase CK2 association with nuclear matrix: role of disulfide bond formation. J. Cell. Biochem. 69, 211-220

Zhong X.P., Carabana J., Krangel M.S (1999) Flanking nuclear matrix attachment regions synergize with the T cell receptor delta enhancer to promote V(D)J recombination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 12, 11970-11975