

SIMONE RIBEIRO BITTENCOURT NEVES

**Distribuição da proteína IMPACT
em Encéfalos de Camundongos, Ratos e Saguís**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**São Paulo
2009**

SIMONE RIBEIRO BITTENCOURT NEVES

**Distribuição da proteína IMPACT
em Encéfalos de Camundongos, Ratos e Sagüis**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eugênio de Araújo Moraes Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Amaral de Castilho

**São Paulo
2009**

Bittencourt, Simone

Distribuição da proteína IMPACT em encéfalos de camundongos, ratos e sagüis. /Simone Ribeiro Bittencourt Neves. --São Paulo, 2009.

xviii, 169f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Neurologia/ Neurociências.

Título em Inglês: Distribution of the protein IMPACT in the mouse, rat, and marmoset brain.

1. IMPACT. 2. GCN2. 3. GCN1. 4. eIF2. 5. Encéfalo. 6. Hipocampo. 7. Hipotálamo. 8. Interneurônios. 9. Embrião

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Sérgio Luiz Domingues Cravo

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Maria da Graça Naffah Mazzacoratti

SIMONE RIBEIRO BITTENCOURT NEVES

**Distribuição da proteína IMPACT
em Encéfalos de Camundongos, Ratos e sSagüis**

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a)..... Chao Yun Irene Yan

Prof(a). Dr(a)..... Marimélia Porcionatto

Prof(a). Dr(a)..... Telma Tiemi Schwindt

Prof(a). Dr(a)..... Newton Sabino Canteras

Prof(a). Dr(a)..... Luiz Eugenio Araújo de Moraes Mello

SUPLENTES

Prof(a). Dr(a)..... Maria Elisa Calcagnotto

Prof(a). Dr(a)..... Claudio Marcos Teixeira de Queiroz

Banca aprovada em : 26 / 11 / 2008

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurofisiologia e Fisiologia do Exercício do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/ EPM, durante o curso de pós-graduação em Neurologia/Neurociências, com apoio financeiro da FAPESP (05/55236-2)



A minha família adorável

Pai (Aloísio), Mãe (Anatólia) e Irmão (Fábio)

*Meus exemplos de alegria, sabedoria,
cumplicidade, dedicação, coragem, força,
honestidade e espiritualidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Eugênio Mello por mostrar o quanto a ciência é encantadora e por ter me guiado, sempre direcionando e expandindo o raciocínio científico. Tenho grande carinho, admiração e enorme orgulho em tê-lo como orientador, não apenas por sua benevolência mas também por seu trabalho sério e seu fascinante dinamismo intelectual.

À Profa. Beatriz Castilho por co-orientar e direcionar o raciocínio científico.

A TODOS meus AMIGOS do Laboratório de Neurofisiologia. Vocês, sem dúvida, tornaram a minha permanência aqui cada vez mais desejável. Também aos amigos que me mostram o mundo fora de um laboratório. Principalmente àqueles que passaram por minha vida e fizeram a diferença.

À querida Roseli (querida chatinha... rsrs), que além de quebrar galhos com assuntos de secretaria, ouve, aconselha e puxa as orelhas.

Aos funcionários que contribuíram com um caloroso bom dia a cada manhã.

Aos examinadores e suplentes por terem aceitado julgar este trabalho. Cada um em sua competência tornará a minha tarefa mais difícil, mas engrandecerá a continuidade desse estudo.

Agradeço a toda minha família maravilhosa que mesmo estando longe compartilham todos momentos. Agradeço principalmente a minha querida tia Gel, por seus conselhos sábios e surpreendentes.

Agradeço a Deus, pelo equilíbrio e direcionamento da minha vida

Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim...e que valeu a pena.

Mário Quintana

SUMÁRIO

Dedicatória.....	<i>vi</i>
Agradecimentos.....	<i>vii</i>
Epígrafe.....	<i>viii</i>
Listas de Figuras.....	<i>xvi</i>
Lista de Tabelas e Gráfico.....	<i>xvii</i>
Listas de Abreviaturas.....	<i>xviii</i>
Resumo.....	<i>xxi</i>
Abstract.....	<i>xxii</i>

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Introdução geral.....	<i>02</i>
1.2 Regulação da síntese protéica.....	<i>04</i>
1.3 Relevância Fisiológica de GCN2.....	<i>07</i>
1.3.1 Comportamento alimentar.....	<i>07</i>
1.3.2 Memória e aprendizado.....	<i>08</i>
1.4 Relevância Fisiológica de ATF4.....	<i>09</i>
1.5 GCN2 e a Proteína IMPACT.....	<i>11</i>

Parte 1

2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais.....	19
3.2 Especificidade dos Anticorpos Produzidos.....	19
3.2.1 Preparação dos anticorpos e testes de especificidade.....	19
3.2.2 <i>Immunoblot</i>	22
3.3 Imuno-marcação em Tecido.....	24
3.3.1 Processamento do tecido adulto para imuno-histoquímica e análise.....	24
3.3.2 Processamento do tecido adulto para imunofluorescência e análise.....	26
3.3.3 Processamento do tecido embrionário para imuno-histoquímica, imunofluorescência e análise.....	26
4 RESULTADOS	29
4.1 Especificidade do Anticorpo Anti-IMPACT.....	30
4.2 Distribuição e Expressão Geral da Proteína IMPACT no Encéfalo.....	30

4.3 Distribuição da Proteína IMPACT por Regiões do Encéfalo.....	36
PROSENCÉFALO.....	37
Bulbo Olfatório.....	37
Córtex.....	39
Corpo Estriado.....	48
Região Septal.....	48
Amígdala.....	50
Região Septohipocampal.....	50
Formação Hipocampal.....	51
Tálamo.....	52
Hipotálamo.....	52
METENCÉFALO	
Cerebelo.....	55
Ponte.....	60
MIELENCÉFALO	
Bulbo.....	60
MEDULA ESPINAL	
Medula Espinal.....	60
4.4 Análise da Neuroquímica das Células IMPACT-positivas.....	61
4.5 Expressão de IMPACT no Desenvolvimento Embrionário.....	67

5 DISCUSSÃO	70
5.1 Distribuição da Proteína IMPACT.....	70
5.2 Sensibilidade Nutricional (hipotálamo ventro medial e córtex piriforme anterior).....	71

5.3	Aprendizado e Memória (hipocampo, amígdala e cerebelo).....	73
5.4	Ritmo Circadiano e Ritmo Teta.....	76
5.5	Roedores <i>versus</i> primata.....	79
5.6	Características Neuroquímicas dos Interneurônios IMPACT-positivos.	80
5.7	IMPACT na via GABAérgica durante o Desenvolvimento Embrionário..	84

Parte 2

6 OBJETIVOS 88

7 MATERIAIS E MÉTODOS 91

7.1	Animais.....	92
7.2	Indução de Estresse.....	92
7.2.1	Indução de estresse por baixa temperatura (estresse agudo).....	92
7.2.2	Indução de <i>status epilepticus</i> (estresse agudo).....	93
7.2.3	Indução de epilepsia do lobo temporal (estresse crônico).....	94
7.3	Administração de L-leucinol no encéfalo.....	95
7.4	Pinealectomia.....	96
7.5	Neuroesferas.....	97

7.5.1	Obtenção e cultivo de células progenitoras neurais de roedor.....	97
7.5.2	Obtenção e cultivo de células progenitoras neurais de humanos..	99
7.5.3	Carenciamento das neuroesferas.....	99
7.6	Cultura de Neurônios do Hipotálamo.....	100

8 RESULTADOS **102**

8.1	Células que contém IMPACT são mais resistentes a estresses induzidos.....	103
8.2	IMPACT inibe ativação de GCN2 <i>in vivo</i> ?.....	104
8.3	Queda nos níveis de glicose no VMH é capaz de ativar GCN2 ?.....	106
8.4	Expressão de IMPACT em neuroesferas de roedor e humano.....	107
8.5	Expressão de IMPACT em Células de Hipotálamo Adulto em Cultura.....	109

9 DISCUSSÃO **110**

9.1	Neurônios IMPACT-positivos são Resistentes a Administração de Pilocarpina.....	111
9.2	Cultura Celular (Neuroesfera x Células de Hipocampo Adulto).....	111

10 CONCLUSÃO GERAL **113**

ANEXO**115**

Bittencourt S, Pereira CM, Avedissian M, Delamano A, Mello LE, Castilho BA (2008) Distribution of the protein IMPACT, an inhibitor of GCN2, in the mouse, rat, and marmoset brain. *J Comp Neurol* 507:1811-1830.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**136**

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Representação simplista da via ativada por GCN2 e da atuação de IMPACT nessa via.....	05
Fig. 2. Expressão diferencial do mRNA de IMPACT em vários tecidos de camundongo adulto.....	12
Fig. 3. Teste de especificidade do anticorpo anti-IMPACT.....	31
Fig. 4. Montagem de fotomicrografias de fatias sagitais do encéfalo de camundongo processado para imuno-histoquímica usando anticorpo anti-IMPACT.....	33
Fig. 5. Representação da intensidade da imuno-marcação de neurônios IMPACT-positivos.....	34
Fig. 6. Representação, em Atlas, da distribuição de neurônios que expressam IMPACT de forma moderada ou intensa no encéfalo de camundongo.....	35
Fig. 7. Imuno-histoquímica mostrando o perfil de neurônios IMPACT-positivos em diversas regiões.....	36
Fig.8. Secções no nível do bulbo olfatório.....	38
Fig.9. Immunoreatividade para IMPACT no neocórtex de camundongo, rato e sagüi.....	40
Fig.10. Secções no nível do cortex piriforme.....	41
Fig. 11. Secções no nível do caudado putamen e órgão subfornical.....	49
Fig. 12. Imuno-histoquímica para IMPACT no nível da amígdala.....	50
Fig. 13. Secção no nível da formação hipocampal.....	53

Fig. 14. Secção no nível do tálamo de encéfalo de rato e sagüi.....	54
Fig. 15. Secções no nível do hipotálamo.....	55
Fig. 16. Secções no nível do cerebelo.....	57
Fig. 17. Imunofluorescência do giro denteado hipocampal utilizando anticorpos anti-IMPACT e anti-GFAP.....	62
Fig. 18. Expressão de GCN2, GCN1 e Impact no encéfalo de camundongo.	62
Fig. 19. Imunofluorescência no giro denteado hipocampal utilizando anticorpos anti-IMPACT com anti-GAD65/67, anti-GABA, anti-PV, anti-CCK, anti-CR, anti-Calb, anti-SST ou anti-NPY.....	64
Fig. 20. Imunofluorescência do giro denteado hipocampal utilizando anticorpos anti-IMPACT e anti-CB1.....	66
Fig. 21. Imunofluorescência em fatias de hipocampo de camundogno utilizando anticorpos anti-IMPACT e anti-nNOS.....	66
Fig. 22. Expressão diferencial do mRNA de IMPACT em tecido de embrião de camundongo.....	67
Fig. 23. <i>Immunoblot</i> de neuroesfesras carenciadas e não-carenciadas usando anticorpo purificado anti-IMPACT. Córtex: extrato de córtex de camundongo.....	108
Fig. 24. Imunofluorescência em células de hipotálamo em cultura.....	109

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Informações sobre os anticorpos utilizados.....	28
Tabela 2. Distribuição de neurônios IMPACT-positivos em áreas selecionadas de encéfalo de camundongo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	= graus celsius
µg	= micrograma (s)
µm	= micrometro (s)
A	= unidade de absorbância
ATF4	= fator de ativação transcricional 4
Atf4	= gene do fator de ativação transcricional 4
Atf4^{-/-}	= ausência do gene de do fator de ativação transcricional 4
AUG	= adenina, uracila e guanina
BSA	= albumina bovina sérica
cAMP	= AMP cíclico
Calb	= calbindina
CB1	= receptor canabinóide
CCK	= colecistocinina
CPN	= células progenitoras neurais
EDTA	= ácido etilenodiaminotetracético
eIF	= fator de iniciação em eucariotos
eIF2a	= fator de iniciação em eucariotos 2a
eIF2a-P	= fator de iniciação em eucariotos 2a fosforilado
E-LTP	= fase inicial do potencial de longa duração
GABA	= ácido gama-aminobutírico
GAD65/67	= glutamato descarboxilase
GCN1	= controle geral não-desreprimível 1
GCN2	= controle geral não-desreprimível 2
Gcn2	= gene de controle geral não-desreprimível 2
Gcn2^{-/-}	= ausência do gene de controle geral não-desreprimível 2
GCN4	= controle geral não-desreprimível 4
GFAP	= glial fibrillary acidic protein (proteína glial fibrilar ácida)
GDP	= difosfato de guanosina
GTP	= trifosfato de guanosina
HEPES	= ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-2-etanosulfônico
Hz	= hertz (unidade para frequência)
IRES	= sítio interno de entrada do ribossoma
IRS	= resposta integrada de estresse
kb	= kilobase (s)

Kg	= kilograma (s)
LTM	= memória de longa duração
LTP	= potencial de longa duração
L-LTP	= fase tardia do potencial de longa duração
mg	= miligrama (s)
mL	= mililitro (s)
mRNA	= RNA mensageiro
mTor	= alvo da rapamicina em mamíferos
NADPH-d	= fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenine diaforase
nNOS	= óxido nítrico sintetase neuronal
PBS	= tampão salina fosfato
PFA	= paraformaldeído
pH	= potencial de hidrogênio
PV	= parvalbumina
RNA	= ácido ribonucléico
rRNA	= RNA ribossômico
S	= unidade Svedberg, medida da taxa de sedimentação de um componente em uma centrífuga, relacionando peso molecular e a forma 3-D do componente
SDS	= dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	= eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SE	= <i>status epilepticus</i>
SST	= somatostatina
Tris	= tris-hidroximetil amino metano
tRNA	= RNA transportador
uORF	= fase aberta de leitura
U	= unidade de enzima
UPR	= resposta a proteína mal enovelada