ALEXANDRA BELÉN SAONA MARÍN

**Capacidade proliferativa *in vitro* de precursores neuro-gliais,
telencefálicos e expressão dos genes *1 e 2 do Complexo da
Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2)***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
como requisito parcial para a obtenção de
Título de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética

São Paulo

2012

ALEXANDRA BELÉN SAONA MARÍN

**Capacidade proliferativa *in vitro* de precursores neuro-gliais,
telencefálicos e expressão dos genes *1 e 2 do Complexo da
Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2)***

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**SÃO PAULO
2012**

MARÍN, ALEXANDRA BELÉN SAONA

Capacidade proliferativa *in vitro* de precursores neuro-gliais, telencefálicos e expressão dos genes *1 e 2 do Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2)*

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Complexo da esclerose tuberosa 2. Proliferação celulares 3. Precursor neuro-glial 4. Córtex cerebral 5. TSC1 6. TSC2 7. Hamartina 8. Tuberina

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética de Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo à orientadora (FAPESP Proc. 2008/53857-8) e do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à aluna.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Alexis e Candelaria
e à minha avozinha Eliana,
que de longe me deram força, ânimo e motivação
para investir nesta importante etapa da minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Profa. Luciana pela confiança que você me deu e senti neste tempo todo, sempre tendo um tempinho para falar comigo não somente sobre o trabalho acadêmico, mas também as coisas mais profundas para me aconselhar. Assim eu consegui sentir muito mais que uma relação orientadora e aluna.

Quero agradecer aos meus grandes irmãos brasileiros que fiz aqui, Débora Furloni e Jonas Luchessi, não vou esquecer nunca de vocês, que foram mesmo minha linda e grande família nesse tempo, estiveram nos tempos bons e sobretudo nos tempos ruins, sempre compartilhando uma amizade de verdade. Levo belas lembranças no meu coração.

Muito obrigada a vocês, que foram parte fundamental desta grande conquista!

Meus especiais agradecimentos às pessoas que diretamente auxiliaram ao trabalho, com destaque aos nossos colaboradores Profs Dr Henning Ulrich (IQ-USP) e Dra Telma T Schwindt (IQ-USP) pelo ensino na padronização de experimentos do cultivo de neuroesferas.

Agradeço aos veterinários e funcionários dos biotérios do ICB-USP e do Centro de Bioterismo (FM-USP), especial e diretamente à Thaís Marques (ICB) e Dras. Milena e Maria Luisa Guzzo (CB-FMUSP).

Sou muito grata ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro (IB-USP) pela concessão dos serviços do seu técnico Waldir Caldeira ao uso do criostato e microscópio confocal.

Agradeço o apoio recebido pela técnica de microscopia confocal Dra Ana Lúcia Garippo (Instituto do Coração, USP) que capturou todas as imagens apresentadas neste trabalho, serei sempre grata.

Agradeço à Profa Dra. Regina Mingoni Netto, chefe da pós-graduação, à Deisy, secretária do programa de pós-graduação em Biologia/Genética, e ao Helder, funcionário da seção de pós-graduação do IB-USP pela prontidão nas informações e apoio logístico a esta aluna estrangeira.

Aos meus companheiros, colegas do Laboratorio de Genômica Funcional (LGF) do Instituto de Biociências da USP, Fernando, Juliana, Laís, Marcelo, Daniel, Deborah e Crysthiane.

Muito obrigada aos colegas da pós-graduação Natássia e Bruno e à técnica Larissa Bomilcar pelo apoio nos experimentos de citometria de fluxo.

INDICE

	Página
Resumo	x
Abstract	xii
Lista de Acrônimos	xiv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xvii
I. Introdução	1
1. Diagnóstico clínico de TSC	1
Principais manifestações no sistema nervoso central	3
2. Patogênese de SEN e SEGA	7
3. Os genes <i>TSC1</i> e <i>TSC2</i> e as proteínas por eles codificadas	9
4. Hamartina, tuberina e o ciclo celular	14
5. Neurogênese cortical, piramidal no mamífero e regulação do ciclo celular	17
II. Objetivos	21
6. Objetivo geral	21
7. Objetivos específicos	21
III. Material e Métodos	22
8. Animais	22
9. Anticorpos	22
10. Cultivo primário de neuroesferas a partir da vesícula telencefálica de rato	23
11. Passagens e congelamento de neuroesferas	24
12. Sincronização de células de neuroesferas na transição G1/S do ciclo celular por carenciamento	25
13. Sincronização de células de neuroesferas na fase S do ciclo celular com hidroxureia	25
14. Ensaio de viabilidade e proliferação celular baseado na incorporação de CFSE	25
15. Ensaio de proliferação celular baseado na incorporação de BrdU	26
16. Análise das fases do ciclo celular baseada no conteúdo do DNA	26
17. Preparo de neuroesferas em suspensão para imunofluorescência	26
18. Diferenciação neuro-glial de neuroesferas	27
19. Imunofluorescência indireta	27

20. Análises estatísticas.....	28
IV. Resultados.....	29
21. Hamartina e tuberina são expressas em células de neuroesferas e em neurônios diferenciados a partir destas	29
22. Tuberina desloca-se ao núcleo de células de neuroesferas na fase G1/S do ciclo celular	34
23. Tuberina e hamartina em células proliferativas.....	41
V. Discussão.....	50
VI. Referências Bibliográficas.....	57
VII. Anexos.....	66
24. Aprovação pelo Comitê de Ética de Uso de Animais Vertebrados em Experimentação	66
25. Imagens de neuroesferas cujas áreas foram definidas.....	67
26. Tabelas.....	68

RESUMO

O complexo da esclerose tuberosa (TSC) é um transtorno clínico, com expressividade variável, caracterizado por hamartomas que podem ocorrer em diferentes órgãos. Tem herança autossômica dominante e é devido a mutações em um de dois genes supressores de tumor, *TSC1* ou *TSC2*. Estes codificam para as proteínas hamartina e tuberina, respectivamente, que se associam formando um complexo macromolecular que regula funções como proliferação, diferenciação, crescimento e migração celular. As lesões cerebrais podem ser muito graves em pacientes com TSC e caracterizam-se por nódulos subependimários (SEN), astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGA), tuberosidades corticais e heterotopias neuronais, podendo relacionar-se clinicamente à epilepsia refratária à terapia medicamentosa, deficiência intelectual, desordens do comportamento e hidrocefalia.

O potencial de crescimento de SEGA até os 21 anos de idade dos pacientes exige acompanhamento periódico por exame de imagem e condutas clínicas ou cirúrgicas, conforme indicação médica. As lesões subependimárias têm sido explicadas por déficits de controle da proliferação, crescimento e diferenciação de precursores neuro-gliais na zona subventricular telencefálica. Embora a capacidade da tuberina em inibir a proliferação celular pela repressão do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) esteja bem documentada, outros aspectos celulares do desenvolvimento de SEGA ainda não foram examinados. Assim, é importante estabelecer um sistema *in vitro* para o estudo de células da zona subventricular e testá-lo na análise das proteínas hamartina e tuberina. Neste sentido, o cultivo de neuroesferas em suspensão é muito apropriado.

Neste estudo, buscamos relacionar a expressão e distribuição subcelular da hamartina e tuberina à capacidade proliferativa e de diferenciação das células de neuroesferas cultivadas *in vitro* a partir da dissociação da vesícula telencefálica de embriões de ratos normais.

Analizamos a expressão e distribuição subcelular da hamartina e tuberina por imunofluorescência indireta em células entre a primeira e a quarta passagens das neuroesferas, sincronizadas nas fases G1 ou S do ciclo celular e após a reentrada no ciclo celular, através da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) e imunofluorescência com anticorpo anti-BrdU.

Em geral, células de neuroesferas apresentaram baixa colocalização entre hamartina e tuberina *in vitro*. A expressão da tuberina foi elevada em basicamente todas as células das esferas e fases do ciclo celular; ao contrário, a hamartina apresentou-se principalmente nas células da periferia das esferas. A colocalização entre hamartina e tuberina foi observada em células mais periféricas das esferas, sobretudo no citoplasma e, em G1, no núcleo celular. A proteína rheb, que conhecidamente interage diretamente com a tuberina, apresentou distribuição subcelular muito semelhante à desta. Ao carenciamento das células visando à parada do ciclo celular na transição G1/S, tuberina distribuiu-se ao núcleo celular em quase todas as células avaliadas e, de forma menos frequente, a hamartina também. À reentrada no ciclo celular pelo reacrécimo dos fatores de crescimento, avaliaram-se células com incorporação de BrdU ao seu núcleo celular, após 72 e 96 horas. Nestas, tuberina mostrou-se novamente no citoplasma de forma preponderante e hamartina manteve-se citoplasmática, em geral subjacente à membrana plasmática, em níveis mais baixos. Os grupos cujas células reciclaram por 72 ou 96 horas diferiram quanto ao aumento significativo da expressão da hamartina em células proliferativas no último. À diferenciação neuronal, aumentaram-se os níveis de expressão de hamartina observáveis à imunofluorescência indireta, tornando-se equivalentes àqueles da tuberina.

Concluimos que as células de neuroesferas cultivadas em suspensão apresentam-se como um sistema apropriado ao estudo da distribuição das proteínas hamartina e tuberina e sua relação com o ciclo celular.

ABSTRACT

The tuberous sclerosis complex (TSC) is a clinical disorder with variable expressivity, characterized by hamartomas that can occur in different organs. It has autosomal dominant inheritance and is due to mutations in one of two tumor suppressor genes, *TSC1* or *TSC2*. These encode for the proteins hamartin and tuberin, respectively, which are associated in a macromolecular complex which functions as a regulator of cell proliferation, differentiation, growth and migration. TSC brain lesions may be severe and are characterized by subependymal nodules (SEN), subependymal giant cell astrocytomas (SEGA), neuronal heterotopias and cortical tubers, and may be clinically related to refractory epilepsy, intellectual disability, behavioral disorders and hydrocephaly.

The growth potential of SEGA up to 21 years of age in TSC patients requires regular monitoring by imaging. Clinical and surgical interventions may be medically indicated. Subependymal lesions have been explained by deficient control of proliferation, growth and differentiation of neuro-glial progenitors from the telencephalic subventricular zone. While tuberin ability to inhibit cell proliferation by repressing the mammalian target of rapamycin (mTOR) has been well documented, other cell aspects of SEGA development have not been thoroughly examined. Therefore, it is important to establish conditions for an *in vitro* system to study the cells from the subventricular zone and to test its suitability for the study of the TSC proteins. In this regard, the neurosphere suspension culture is very appropriate.

We evaluated the expression and subcellular distribution of hamartin and tuberin in relation to the proliferation and differentiation capability of neurosphere cells derived *in vitro* from the dissociation of the telencephalic vesicle of normal E14 rat embryos. These analyses were performed by indirect immunofluorescence in cells from first through fourth passages of neurospheres, synchronized in G1 or S phases of the cell cycle, and after reentry into the cell

cycle by the addition of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and immunolabeling with anti-BrdU antibody.

In general, neurosphere cells presented low colocalization between hamartin and tuberin *in vitro*. Tuberin expression was relatively high in basically all neurosphere cells and cell cycle phases, whereas hamartin distributed mainly to cells from the periphery of the spheres. In these cells, hamartin and tuberin colocalization was evident mostly in the cytoplasm and, in G1, also in the cell nucleus. Rheb, which is known to interact directly with tuberin, had subcellular distribution very similar to tuberin. Cell starvation indicating cell cycle arrest at G1/S redistributed tuberin to the cell nucleus in virtually all cells examined, what was accompanied by nuclear location of hamartin in a small subset of cells. When cells were allowed to reenter cell cycle by adding growth factors, we evaluated BrdU-labeled nuclei 72 and 96 hours later. In the two groups, tuberin was shown to move back to the cytoplasm as well as hamartin, which apparently maintained its lower expression levels distribution underneath the plasma membrane. Group of cells that recycled for 96 hours had significantly more expression of hamartin than those cells that cycled for only 72 hours. After neuronal differentiation, hamartin expression levels observed by immunofluorescence were similar to those of tuberin.

We conclude that neurosphere cells cultured in suspension showed to be an appropriate cell system to study hamartin and tuberin distribution in respect to the cell cycle.

LISTA DE ACRÔNIMOS

Acrônimo	Definição
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
4EBP	proteína ligante do fator 4E iniciador da tradução
72h	Grupo de células tratadas com BrdU por 72 horas
96h	Grupo de células tratadas com BrdU por 96 horas
AKT	Cinase cujo nome provém da linhagem de timoma derivada de vírus Ak
AML	angiomiolipoma
AMP	monofosfato de 5'-adenosina
AMPK	cinase ativada por AMP
ATP	trifosfato de adenosina
bFGF	fator básico de crescimento de fibroblasto
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albumina sérica bovina
CDK	cinases dependentes de ciclinas
CDK1	cinase dependente de ciclina 1
CFSE	éster de succimidil-diacetato de carboxifluoresceína
CKI	proteínas inibidoras de CDK
CP	placa cortical
DAPI	4',6-diamidina-2-fenil indol
DIV	Dia <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
E	Dia do desenvolvimento embrionário de rato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK2	cinase regulada por sinal extracelular 2
ERM	ezrina, radixina, and moesina
f.d.	Fato de diluição
FBS	Soro fetal bovino
G1	Fase <i>gap</i> 1 do ciclo celular

G2	Fase <i>gap</i> 2 do ciclo celular
GAP	Domínio com atividade ativadora de GTPase
GFAP	Proteína acídica filamentar da glia
GSK3b	cinase da sintase de glicogênio 3 β
HMMP	hiperplasia multifocal micronodular de pneumócitos
LAM	linfangioleiomiomatose
M	Fase de mitose do ciclo celular
MAPK	cinase ativada por mitógeno
mg	miligrama
MK2	cinase 2 ativada por MAPK
mL	mililitro
mTOR	Alvo em mamífero da rapamicina
mTORC1	complexo 1 do mTOR, em associação com a proteína raptor
NFL	Cadeia leve do neurofilamento
nM	nanomolar
PKD1	isoforma 1 da cinase da desidrogenase de piruvato
PI3K	cinase 3 de fosfoinositol
PKB	cinase proteica B (=AKT)
PKD1	Gene 1 da doença renal policística
Poli-HEME	poli-2-hidroxietil-metacrilato
PTEN	fosfatase homóloga à tensina e fosfatase
Q	Fração de células que deixam o ciclo celular
rheb	Proteína com homologia a ras enriquecida em cérebro
RMS	fluxo migratório rostral
RNM	Ressonância nuclear magnética
RSK1	cinase 1 da proteína ribossomal S6
S	Fase de síntese de DNA do ciclo celular
S6K	cinase da proteína S6 da menor subunidade ribossomal
SEGA	Astrocitoma subependimário de células gigantes
SEN	Nódulos subependimários
SVZ	zona subventricular
TC	Tomografia computadorizada
TSC	Complexo da esclerose tuberosa

TSC1	Gene 1 do complexo da esclerose tuberosa
TSC2	Gene 2 do complexo da esclerose tuberosa
VZ	zona ventricular

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Critérios principais e secundários para o diagnóstico definitivo, provável ou possível do TSC	6
2	Área estimada de cada neuroesfera analisada dos grupos 72h e 96h	69
3	Dados numéricos das análises de células proliferativas do grupo 72h	70
4	Dados numéricos das análises de células proliferativas do grupo 96h	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Localização de nódulos subependimários (SEN) e astrocitomas subependimários de células gigantes, tuberosidades corticais e heterotopias neuronais em relação aos ventrículos cerebrais.	7
2	Diagramas mostrando a estrutura de domínios e localização de motivos de fosforilação das proteínas hamartina e tuberina.	11
3	Sinalização do complexo hamartina-tuberina a mTOR.	13
4	Relação entre o inibidor de p27 (p27 ^{KIP1}) e a proteína tuberina na regulação da transição G1/S no ciclo celular.	16
5	Dois nichos neurogênicos – o córtex embrionário e o ventrículo lateral do adulto.	18
6	Neuroesferas em suspensão, cultivadas a partir da dissociação de vesícula telencefálica de rato em E14.5.	29
7	Dissociação e passagem de neuroesferas após sete DIV.	31
8	Ensaio de viabilidade de neuroesferas após a marcação com CFSE.	32
9	Imunofluorescência indireta de neuroesferas cultivadas em suspensão, fixadas e seccionadas ao criostato.	33
10	Imunofluorescência indireta de células de neuroesferas que foram submetidas ao tratamento para diferenciação neuronal e glial por sete DIV ou 14 DIV.	35

11	Perfis de fluorescência do iodeto de propídeo obtidos ao citômetro pela análise de células de neuroesferas cultivadas por sete dias <i>in vitro</i> ou que foram submetidas ao carenciamento por sete DIV ou ao tratamento com hidroxureia.	37
12	Perfis de fluorescência do iodeto de propídeo obtidos ao citômetro (Guava) pela análise de células de neuroesferas cultivadas por sete dias <i>in vitro</i> ou que foram submetidas ao tratamento com hidroxureia.	38
13	Imunofluorescência indireta de células de neuroesferas cultivadas por sete dias <i>in vitro</i> ou que posteriormente foram submetidas ao carenciamento por sete DIV ou ao tratamento com hidroxureia.	39
14	O deslocamento da tuberina ao núcleo celular na transição G1/S não impede sua colocalização com hamartina no citoplasma.	40
15	Ensaio proliferativo de neuroesferas baseado na marcação com CFSE.	42
16	Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU.	44
17	Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU.	45
18	Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU.	49
19	Áreas definidas para neuroesferas de nove imagens do grupo 72h	67
20	Áreas definidas para neuroesferas de nove imagens do grupo 96h	68

I. INTRODUÇÃO

O complexo da esclerose tuberosa (TSC) é um transtorno do desenvolvimento, com herança autossômica dominante e prevalência estimada entre 1:27.000 e 1:10.000 (Hunt e Lindebaum, 1984; Sampson *et al.*, 1989; Osborne *et al.*, 1991). Tem expressividade variável e penetrância de pelo menos 90% (Hunt e Lindebaum, 1984; Gómez, 1988; Northrup *et al.*, 1993). É caracterizado, sob o ponto de vista patológico, por lesões (i) circunscritas; (ii) displásicas (tipo celular característico do órgão de origem, mas com desalinhamento em relação às demais células); (iii) podendo apresentar taxa de proliferação celular ligeiramente aumentada, caracterizando tumores benignos de crescimento lento (hamartomas). As lesões do TSC podem acometer múltiplos órgãos, embora ocorram principalmente no cérebro, retina, coração, rins, pele e pulmões (Gómez *et al.*, 1999). Duas características adicionais são comumente observadas nessas lesões: (iv) o aumento do tamanho das células, as quais são muitas vezes descritas como 'células gigantes', possivelmente em decorrência de uma desregulação do crescimento celular; e (v) a inconsistência à caracterização do tipo celular para cada lesão, sugerindo falha na diferenciação celular. Desta forma, observam-se deficiências da proliferação, crescimento e diferenciação celular, em vários tipos de lesões no TSC (Huttenlocher e Wollmann, 1991).

1. Diagnóstico Clínico de TSC

Um breve relato sobre as lesões e diagnóstico clínico de TSC será apresentado a seguir. As lesões de pele incluem as máculas hipomelanóticas, com uma prevalência de 90% dos casos de TSC; os angiomiobromas faciais, com distribuição principalmente malar, em 75% dos pacientes; espessamento da pele na região facial frontal (placas fibróticas) ou região lombar (placas em couro, do inglês, *shagreen patch*, ou 'casca de laranja'), em cerca de 20% a 55% dos casos; os fibromas subungueais em 20% dos pacientes; a poliose (descoloração) do cabelo e cílios e as lesões em *confetti*, hiperocrômicas em pequeno percentual dos casos.

Embora a maioria das lesões de pele constitua, sobretudo, um problema estético, elas são muito úteis ao diagnóstico clínico do TSC e algumas delas, como os angiomiofibromas e fibromas, podem causar dor (Roach e Sparagana, 2004).

O rabdomioma cardíaco, presente em cerca de 50% dos pacientes com TSC, é um tumor do músculo cardíaco, que ocorre com maior frequência entre o terceiro trimestre pré-natal e o primeiro ano de vida, podendo haver um aumento de frequência na puberdade. É normalmente assintomático, tendendo a regredir e desaparecer, embora possa causar arritmias cardíacas (Smythe JF *et al.*, 1990; Roach e Sparagana, 2004).

Cerca de 70% dos adultos com TSC terão angiomiolipomas com localização, notavelmente, renal. É a lesão renal mais comumente associada ao TSC, é composta por células de origem mesodérmica, compreendendo adipócitos, músculo liso e endotélio, em composição variável. Angiomiolipomas renais são em geral múltiplos e bilaterais, podem sofrer complicações vasculares como fenômenos trombóticos e sangramento, causando dor. Quando no parênquima renal, eles podem complicar com insuficiência renal crônica (Steiner *et al.*, 1993; Kennelly *et al.*, 1994; van Baal *et al.*, 1994). Cistos renais simples, em geral múltiplos, sem caracterizar rins policísticos ocorrem em até 15% dos casos de TSC. Por outro lado, a doença policística renal, associada ao TSC, acomete aproximadamente 5% dos pacientes. O carcinoma de célula renal e oncocitomas renais podem afetar 1% dos pacientes TSC (Jozwiak S, *et al.* 2000; Cook JA, *et al.* 1996; O'Callaghan FJ, *et al.* 2004; Henske EP *et al.*, 2005).

As lesões pulmonares não são comuns e compreendem a hiperplasia multifocal micronodular de pneumócitos (HMMP) e a linfangioleiomiomatose (LAM). A HMMP consiste na proliferação epitelial de pneumócitos do tipo II (hamartoma) formando pequenos nódulos (1 a 10 milímetros), com margens claras, na parede do alvéolo, em ambos os pulmões, podendo acometer pacientes dos sexos feminino ou masculino, em uma frequência entre 2 e 3% no TSC. HMMP pode ocorrer de forma independente da LAM pulmonar (Muir *et al.*, 1998;

Maruyama *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2010). A LAM pulmonar afeta, basicamente, pacientes do sexo feminino e consiste de proliferação anormal de células semelhantes ao músculo liso e destruição cística do parênquima pulmonar (Ryu JH, *et al.* 2006).

Os hamartomas astrocíticos na retina estão presentes em até cerca de 50% dos casos de TSC e podem se apresentar, à oftalmoscopia, desde lesões planas, semi-transparentes àquelas nodulares, frequentemente multinodulares, de aparência sólida (Nyboer *et al.*, 1976; Zimmer-Galler e Robertson, 1995; Mennel S *et al.*, 2007). Embora essas lesões tendem a se manter estáveis, podem evoluir a calcificação, além do raro surgimento de novos hamartomas retinianos.

Principais manifestações no sistema nervoso central

Embora o TSC possa comprometer basicamente qualquer órgão, manifesta-se mais comumente como um transtorno do desenvolvimento neurológico, com epilepsia, deficiência intelectual, autismo, outras desordens do comportamento e hidrocefalia (Smalley *et al.*, 1998; Curatolo *et al.*, 2003; Prather *et al.*, 2004; Thiele *et al.*, 2004). Além dos hamartomas astrocíticos de retina, quatro tipos de lesões são identificados aos exames de imagem ou *postmortem* do sistema nervoso central dos pacientes com TSC. A primeira dessas lesões deu o nome à doença; são as tuberosidades corticais, também denominadas túberes corticais. Consistem de alargamentos dos giros da superfície cerebral ou lesões circunscritas no parênquima cerebral, cortical ou subcortical, sendo mais firmes do que o parênquima adjacente e, por isso, tendo o termo esclerose denominado a doença. São caracterizadas como displasias, apresentando neurônios piramidais desorganizados, astrócitos displásicos, pontos de gliose e desmielinização. Uma vez que se acredita que as tuberosidades corticais sejam compostas por células não proliferativas, essas são caracterizadas como hamártias e não como hamartomas. Por outro lado, é possível se observar gliose reativa nas lesões (Huttenlocher e Wollmann, 1991; Scheithauer e Reagan, 1999).

As tuberosidades corticais estão associadas a todas as alterações neurológicas, exceto à hidrocefalia. Parte dos pacientes abaixo de dois anos de idade apresentam as crises convulsivas sob a forma de espasmos infantis que, apesar de terem uma resposta parcial à terapia medicamentosa, não apresentam resultados plenamente satisfatórios (Chiron *et al.*, 1997; Hancock e Osborne, 1998; Curatolo *et al.*, 2001; Thiele 2004). A maior parte dos pacientes com espasmos infantis evoluirá com crises convulsivas de outros tipos - tônico-clônica, complexa parcial, ausência (Chu-Shore, 2010). Muitos desses pacientes são submetidos à ressecção cirúrgica dos hamartomas em foco com atividade eletroencefalográfica, com algum sucesso (Parain *et al.*, 2001; Weiner *et al.*, 2004). Há uma relação direta entre a falta de controle terapêutico da epilepsia e a gravidade da deficiência intelectual. Embora não se tenha estabelecido de maneira convincente uma correspondência entre o número e localização de tuberosidades corticais e a gravidade clínica, aquelas com distribuição temporal parecem associar-se mais frequentemente aos quadros graves de epilepsia e autismo (Goodman *et al.*, 1997; Holmes *et al.*, 2007). As tuberosidades corticais são lesões do desenvolvimento encefálico, com aparecimento na primeira infância, estando a ausência de manifestações clínicas nos primeiros cinco anos de vida relacionada à melhor função cognitiva e social nesta e nas fases sucessivas do desenvolvimento (Joinson *et al.*, 2003; Humphrey *et al.*, 2004).

Associados às tuberosidades corticais ou isoladamente, podem-se observar três tipos de lesões: (i) nódulos subependimários (SENs); (ii) astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGAs); e (iii) linhas de migração neuronal na substância branca subcortical que sugerem heterotopias neuronais (Gómez *et al.*, 1999; DiMario *et al.*, 2004). Enquanto tuberosidades corticais e heterotopias neuronais são consideradas hamártias, lesões sem crescimento, SENs e SEGAs são hamartomas formados por astrócitos displásicos e células neuronais (Gómez *et al.*, 2009). A localização de SENs e SEGAs está restrita, como o nome

indica, à região subjacente ao epêndima, epitélio que reveste os ventrículos cerebrais, estando comumente próximo ao forame de Monro. Embora classificados como astrocitomas (Lopes *et al.*, 2007), a composição neuro-glial dos SEGAs poderia classificá-los como tumores de origem mista (Buccoliero *et al.*, 2009).

Poucos casos de SEGA foram descritos no período neonatal (Boesel *et al.*, 1979). Há um relato de caso de SEGA pré-natal em feto feminino, sem história familiar de esclerose tuberosa (Raju, 2007). Acredita-se que os SEGAs sejam tumores relacionados aos SENs, embora maiores e muitas vezes altamente vascularizados. SENs e SEGAs acontecem em 10 a 15% dos pacientes com TSC e podem causar obstrução do fluxo do líquido cérebro-espinhal, ocasionando hidrocefalia, cujo quadro de hipertensão intracraniana, que pode estar associado, é caracterizado por cefaléia, vômito, paledema e distúrbios visuais. SEGA pode também agravar a epilepsia (Torres *et al.*, 1998; Goh *et al.*, 2004; Ribaupierre *et al.*, 2007) e os déficits cognitivos e comportamentais (Sharma *et al.*, 2004; Franz *et al.*, 2009; revisto por Berhouma *et al.*, 2010).

SEGAs e SENs podem ser diagnosticados por meio de exames de imagem (ressonância nuclear magnética, RNM ou tomografia computadorizada, TC) nos pacientes. O seu seguimento periódico (a cada um a dois anos) por exames de imagens é indicado até os 21 anos de idade (Nabbout *et al.*, 1999; Roach *et al.*, 1999 Conference) devido à tendência de aumento de tamanho de SEN nesse período, passando a ser caracterizado como SEGA se acima de um centímetro de diâmetro à RNM (Inoue *et al.*, 1998; Baron *et al.*, 1999; Hasoya *et al.*, 1999).

Embora a apresentação clínica do TSC possa ser muito variável (Hunt e Lindebaum, 1984; Gómez, 1988; Northrup *et al.*, 1993), a tríade proposta por Vogt (1908) que recebeu seu nome, consistindo em adenoma sebáceo, deficiência intelectual e epilepsia, foi utilizada inicialmente como critério para seu diagnóstico. O diagnóstico do TSC mantém-se

essencialmente clínico, sendo, nas últimas quatro décadas, auxiliado por exames de imagem, notavelmente a TC cerebral, torácica e abdominal, a RNM do cérebro e a ultrassonografia abdominal. O diagnóstico definitivo, provável ou possível do TSC baseia-se na classificação dos diversos sinais e sintomas como critérios principais ou secundários, de acordo com a frequência de sua observação entre pacientes com TSC ou de forma isolada, na população geral (Tabela 1).

TABELA 1: Critérios principais e secundários para o diagnóstico definitivo*, provável ou possível*** do TSC**

Critérios principais:
<ul style="list-style-type: none">• Angiofibromas faciais ou espessamento da pele na região frontal• Fibromas ungueais ou periungueais não traumáticos• Máculas hipomelanóticas (três ou mais)• Espessamento da pele na região lombar• Hamartomas nodulares múltiplos na retina• <u>Tuberosidades corticais</u>• <u>Nódulos subependimários</u>• <u>Astrocitoma subependimário de células gigantes</u>• Rabdomioma cardíaco, isolado ou múltiplos• Linfangioleiomiomatose (LAM) pulmonar §• Angiolipoma renal §
Critérios secundários:
<ul style="list-style-type: none">• Microcrateras escuras aleatoriamente distribuídas no esmalte dentário• Pólipos retais hamartomatosos• Cistos ósseos• <u>Linhas de migração radial na substância branca cerebral</u>• Fibromas gengivais• Hamartoma não renal• Acromia retiniana• Lesões em confete hiper cromáticas na pele• Cistos renais múltiplos

As lesões cerebrais encontram-se sublinhadas.

*Diagnóstico definitivo de TSC: dois sinais principais ou um principal e dois secundários;

**Diagnóstico provável de TSC: um sinal principal e um secundário;

***Diagnóstico possível de TSC: um sinal principal ou dois sinais secundários.

§LAM pulmonar e AML renal no mesmo paciente constituem, juntos, um único sinal principal (Orlova e Crino, 2010).

2. Patogênese de SEN e SEGA

No encéfalo, os quatro tipos de lesões observadas no TSC (Fig 1, Tabela 1, sublinhadas) comumente apresentam deficiências nos três processos celulares mencionados, a proliferação, a diferenciação e o crescimento celular. Além disso, duas lesões, as tuberosidades corticais e a heterotopias neuronais, parecem ser decorrentes de déficits da migração e adesão celular (Huttenlocher e Wollmann, 1991; Scheithauer e Reagan, 1999). Neste trabalho, atenção será dada às lesões subependimárias, cujas alterações na proliferação, diferenciação e crescimento celulares foram bem documentadas.

Figura 1: Localização de nódulos subependimários (SEN) e astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGA, verde), tuberosidades corticais (vermelho) e heterotopias neuronais (amarelo) em relação aos ventrículos cerebrais (brancos). Desenho de corte coronal do encéfalo, mostrando os ventrículos laterais e as regiões corticais (cinza escuro) e subcorticais (cinza claro, interno). Os ventrículos são revestidos por epitélio simples (epêndima) em continuidade com a região subcortical denominada região subventricular.

À inspeção, SENs se apresentam como uma lesão arredondada ou ovoide, projetando-se à cavidade ventricular, com superfície lisa, firme e, devido à frequente calcificação, endurecida. Variáveis em tamanho, SENs podem se mostrar alinhados na parede do ventrículo, com aparência de “gotas de cera de vela”. Embora possam ocorrer nos terceiro e quarto ventrículos e também no aqueduto cerebral, a grande maioria dos SENs tem localização no

sulco tálamo-estriado dos ventrículos laterais. Quando maiores, sua porção mais profunda pode estar nos núcleos talâmico e caudado (Scheithauer e Reagan, 1999).

SENs são revestidos pelo epitélio do epêndima, de forma relativamente intacta, apresentam-se não-infiltrativos e com arquitetura sólida, que pode requerer sua descalcificação para ser seccionado para análise anatomo-patológica. Células gigantes, com vários núcleos, convolutos e grandes tendem a ser observadas no interior do nódulo. Seu corpo celular é, em geral, envolto por processos fibrilares, em rede frouxa ou densa. São lesões muito vascularizadas, cujos vasos têm tendência à hialinização. Formações concêntricas de cálcio acumulam-se inicialmente ao redor dos vasos, agregando-se posteriormente no estroma tumoral. Hemorragia e necrose, assintomáticas, internas ao SEN são eventos raros e próprios dos nódulos grandes (Scheithauer e Reagan, 1999).

SENs podem potencialmente evoluir a SEGAs, uma hipótese sustentada pelo seguimento com exames de imagem, semelhanças histológicas entre esses hamartomas e sua localização encefálica. A maioria dos SEGAs é uma massa solitária, discreta, maior que 1 cm de diâmetro e localização próxima ao forame de Monro. Embora alguns sejam internos ao parênquima cerebral, a invasão difusa do mesmo não é uma característica do SEGA. Seu estroma vascular é proeminente, lembrando formações angiomas. A calcificação e hialinização vasculares contribuem à ocorrência rara de hemorragia intramural, espontânea. A calcificação do estroma é mais comum em SEN do que em SEGA (Shepherd *et al.*, 1991; Stefansson *et al.*, 1991; Huttenlocher e Wollmann, 1999; Scheithauer e Reagan, 1999).

SEGAs podem exibir uma variedade de arranjos celulares, que inclui células fusiformes, alinhadas em grupos perivasculares, agregados de células epitelioides ou em forma de gânglios, e células gigantes com nucléolo proeminente. Uma apresentação rara e semelhante a ependimomas é a formação de células em pseudo-rosetas. As células, embora geralmente multinucleadas, apresentam seus núcleos arredondados ou fusiformes, vesiculares a

hipercromáticos, com nucléolo proeminente, sem formações convolutas ou bizarras. Proliferação endotelial e áreas de necrose são raras e, mais raras são as figuras mitóticas (Shepherd *et al.*, 1991).

Ambos, SENs e SEGAs, contêm astrócitos grandes, multinucleados, com citoplasma eosinófilo e aparência poligonal, em fuso ou epitelióide que, em sua maioria, lembra astrócito. Embora pouco frequente, a aparência das células pode ser neuronal. À imunohistoquímica, no entanto, a composição mista, neuronal e glial, é observada pela imunorreatividade para as proteínas acídica fibrilar glial (GFAP), ligante de cálcio (S-100, própria da linhagem glial), enolase neuronal, neurofilamentos, sinaptofisina, tubulina beta-III (Altermatt *et al.*, 1992; Inoue *et al.*, 1998; Baron *et al.*, 1999; Mizuguchi *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004). SEN e SEGA expressam a proteína 4 mediadora da resposta da colapsina (CRMP4) e doublecortina, marcadores da zona subventricular (Seung-Ki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004; Ess *et al.*, 2004; Buccoliero *et al.*, 2009). Em conjunto, esses dados sugerem que SEN e SEGA sejam decorrentes de defeitos de diferenciação celular (positividade para marcadores neurais e gliais) e derivados de precursores neurogliais, subventriculares (Crino *et al.*, 1996). O mais alto número celular observado em nódulos subependimários e SEGAS deve-se provavelmente a maiores índices proliferativos de precursores neuro-gliais. Finalmente, as células aumentadas de tamanho de SENs e SEGAs sugerem alterações no controle do crescimento celular (Huttenlocher e Wollmann, 1999; Stefansson *et al.*, 1991).

3. Os genes *TSC1* e *TSC2* e as proteínas por eles codificadas

O TSC pode ser causado por mutações em um de dois genes supressores de tumor, os genes 1 e 2 do complexo da esclerose tuberosa (do inglês, *Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2*, *TSC1* e *TSC2*). *TSC1* mapeia-se em 9q34.1, tem 23 éxons e expressa um transcrito de 8.6 kb, que codifica para uma proteína hidrofílica de 140 kDa, hamartina (van Slegtenhorst *et al.*, 1997). *TSC2* mapeia-se em 16p13.3, expressa um transcrito de 5.5 kb, contendo 41 éxons e

codifica para uma proteína de 200 kDa, tuberina (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993).

As mutações em *TSC2* são cinco vezes mais comuns do que em *TSC1* e podem estar associadas a fenótipos mais graves (Jones *et al.*, 1997; Dabora 2001). As deleções em *TSC2* que comprometem o domínio GAP (do inglês, *GTPase activating protein*) da tuberina, composto por 300 aminoácidos, podem também associar-se aos déficits neurológicos mais graves de TSC (Maheshwar *et al.*, 1997; Dabora *et al.*, 2001). Há um percentual pequeno de casos (3-5%) em que deleções em *TSC2* compreendem o gene vizinho, *PKD1* (do inglês, *Polycystic Kidney Disease 1*), causando um quadro de rins policísticos (Sampson *et al.*, 1997).

Os produtos de *TSC1* e *TSC2*, hamartina e tuberina, respectivamente, interagem formando um complexo funcional heterodimérico (Planck *et al.*, 1998; Nellist *et al.*, 1999). A região de hamartina que pode interagir com a tuberina compreende do resíduo 302 ao 430. Os primeiros 418 aminoácidos da tuberina contêm o sitio de interação para hamartina (Fig. 2, Plank *et al.*, 1998). A interação hamartina/tuberina é regulada pela fosforilação da tuberina em resíduos de serina e treonina, e pela sua ubiquitinação pela ubiquitina ligase E3 (HERC1), que pode reconhecer seus 608 aminoácidos iniciais (Chong-Kopera *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2004). Esses e vários outros resíduos de serina e treonina de hamartina e tuberina já foram documentados como alvo de diferentes cinases regulando a atividade e distribuição subcelular dessas proteínas (Fig. 2). Essa regulação será discutida a posteriori.

No sistema nervoso central, tuberina e hamartina co-localizam-se, sendo detectadas no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tronco cerebral, epitélio do plexo coróide, substância de Nissl de neurônios motores da medula espinhal e astrócitos (Gutmann *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Murthy *et al.*, 2001). Tuberina no cerebelo adulto é expressa na região perinuclear das células de Purkinje e hamartina pode ser observada em astrócitos e processos neuronais. Por outro lado, nos neurônios do córtex cerebral, ambas as proteínas são expressas no corpo

celular e no processo neuronal onde tuberina tem uma distribuição perinuclear e hamartina é mais homoganeamente distribuída no corpo celular e nos processos. Em astrócitos, hamartina em comparação a tuberina é mais altamente expressa, sugerindo que esta poderia ser importante no controle do crescimento em astrócitos (Gutmann *et al.*, 2000).

Figura 2: Diagramas mostrando a estrutura de domínios e localização de motivos de fosforilação das proteínas hamartina (A) e tuberina (B), que possuem em sua forma completa, respectivamente, 1164 e 1807 aminoácidos, como indicado. Estão indicados os terminais amino (N) e carboxílico (C), os domínios de interação entre as duas proteínas (vermelho) e os domínios *coiled-coil* e ativador de GTPase (GAP), em amarelo, respectivamente, de hamartina e tuberina. Os sítios de fosforilação em serinas (S) e treoninas (T) e a numeração desses aminoácidos estão indicados em cada diagrama. Entre parênteses, o acrônimo da cinase demonstrada experimentalmente para fosforilação do respectivo resíduo, como se segue: GSK3b (cinase da sintase de glicogênio 3 β), CDK1 (cinase dependente de ciclina 1), ERK2 (cinase regulada por sinal extracelular 2), AKT (cujo nome provém da linhagem de timoma derivada de vírus Ak, também conhecida como cinase proteica B, PKB), MK2 (cinase 2 ativada por MAPK, cinase ativada por mitógeno), AMPK (cinase ativada por AMP) e RSK1 (cinase 1 da proteína ribossomal S6). Estão representados apenas alguns resíduos alvos de fosforilação.

No sistema nervoso central, a hamartina no complexo heterodimérico pode interagir com NF-L e actina através da sua interação direta com proteínas ERM (ezrina, radixina, and moesina) na região proximal a central dos cones de crescimento de neurônios, sugerindo a sua importância na regulação do citoesqueleto neuronal (Lamb *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2002).

Além do sistema nervoso central, hamartina e tuberina colocalizam-se em outros órgãos como rins, pulmões, pâncreas, fígado, intestino delgado, intestino grosso, testículos, sobretudo no período embrionário (Johnson *et al.*, 2001, Murthy *et al.*, 2002).

O domínio GAP da tuberina fica em sua região C-terminal e tem envolvimento na inativação de rheb (do inglês, *ras-homology enriched in brain*), pequena GTPase da superfamília Ras, e consequente supressão do crescimento celular por inibição de mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*; Garami *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). A falta de inibição de mTOR, por exemplo em células com mutações que inativam o complexo hamartina/tuberina, causa aumento da fosforilação da cinase S6K e de seu substrato S6 (proteína 6 da menor unidade - S, do inglês, *small* - do ribossomo), com consequente elevação dos níveis gerais de síntese protéica e crescimento celular (Gao *et al.*, 2002). Desta forma, a GTPase rheb é um ativador de mTOR e é inibido pela tuberina que a mantém ligada a GDP, inativando-a (Fig. 3).

A fosforilação de tuberina pela cinase AKT nos sítios S939, S981 e T1462 causa a inibição de sua atividade GAP para rheb, mantendo altos os níveis de rheb ligado a GTP. Por esta via, AKT pode estimular mTOR pela inibição de tuberina ao dissociar o complexo hamartina/tuberina e provocar crescimento celular. Um dos estímulos à cinase AKT é o hormônio insulina relacionado ao crescimento celular (Fig. 3, Saucedo *et al.*, 2003).

A mutação somática condizente com o segundo evento mutacional, pela teoria de Knudson sobre genes supressores de tumor (Knudson, 1971), tem sido demonstrada experimentalmente em grande parte dos hamartomas no TSC, mas não amplamente em lesões do sistema nervoso central de pacientes TSC (Sepp *et al.*, 1996; Henske *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 1999; Niida *et al.*, 2001). Isso pode se dever ao fato de, apesar de clonais, as hamártias e hamartomas do TSC serem compostos por um baixo percentual de célula duplamente mutadas, mas também por células reativas (Li *et al.*, 2008; Crino *et al.*, 2010). No sistema

nervoso, há considerável gliose tanto em SEN e SEGA quanto em tuberosidades corticais (Crino *et al.*, 2010). Henske *et al.* (1997) descreveram perda de heterozigose em 16p13.3 nas células fusiformes e epitelioides de SEGA, mas não em células gigantes deste. Outros estudos com microdissecção adequada demonstraram o evento mutacional somático em SEGA e tuberosidades corticais (Chan *et al.*, 2004; Crino *et al.*, 2010).

Figura 3: Sinalização do complexo hamartina-tuberina a mTOR. Hormônios, como a insulina, e fatores de crescimento ativam a cascata de sinalização pela ativação de receptores com atividade cinásica para serina/treonina e consequente ativação das cinases 3 de fosoinositol (PI3K) e AKT. AKT pode também ser ativada pela isoforma 1 da cinase da desidrogenase de piruvato (PDK1). A atividade de AKT inibe diretamente o complexo hamartina e tuberina, pela fosforilação desta, mantendo Rheb ligado ao GTP, cuja ação ativadora de mTOR, em seu complexo 1 em associação com a proteína raptor (mTORC1), induz a síntese protéica pela fosforilação de proteínas-chave nesta via, a cinase da proteína S6 da menor subunidade ribossomal (S6K) e a proteína ligante do fator 4E iniciador da tradução (4EBP), ambas importantes reguladoras da iniciação traducional. A razão entre monofosfato de 5'-adenosina (AMP) e trifosfato de adenosina (ATP) – razão AMP/ATP - reflete o estado nutricional da célula e modula a atividade da cinase ativada por AMP (AMPK). Esta via ativa o complexo hamartina-tuberina inibindo mTOR via rheb e, consequentemente, a síntese protéica. A fosfatase homóloga à tensina e fosfatase (PTEN) inibe mTOR, de modo semelhante ao complexo hamartina-tuberina. (Laplante *et al.*, 2009; Jaworski *et al.*, 2006; Tee *et al.*, 2003).

Em outros casos, a patogênese do SEGAs vem sendo sugerida pela haplo-insuficiência de *TSC1* ou *TSC2* ou pela heterozigose composta em algum loco ainda não identificado, mas não entre *TSC1* e *TSC2*. Em tuberosidades corticais, hamartina e tuberina podem apresentar-se subexpressas ou apresentar uma distribuição alterada, nos tipos celulares específicos criando um modelo alternativo para a patogênese (Jansen *et al.* 2004). Hamartina tem uma distribuição principalmente citoplasmática em neurônios normais, mas em tuberosidades corticais e células displásicas pode-se encontrar uma distribuição nuclear e citoplasmática. Tuberina nas células displásicas tem uma distribuição citoplasmática e granular e em células gigantes os níveis desta proteína são mais baixos (Boer *et al.*, 2008). A redução considerável dos níveis dessas proteínas é consistente com o modelo de Knudson (1971). Em um estudo com SEGAs, obtidos de ressecções cirúrgicas de sete pacientes TSC, a inativação bialélica foi demonstrada em seis deles. Em todos os tumores, havia aumento das formas fosforiladas de proteínas alvos da ação de mTOR (Chan *et al.*, 2004).

Na hipótese de haplo-insuficiência, o surgimento de SEGAs poderia estar relacionado também à hiperativação de mTOR pela fosforilação de proteínas como S6K, S6 e ERK. Isso se relacionaria à hipótese do heterozigoto composto por mutações em genes codificadores para proteínas que atuam na mesma via, mas em níveis anteriores ao complexo heterodimérico de hamartina-tuberina. Por outro lado, a superprodução de proteínas envolvidas no ciclo celular como os protooncogenes, c-Myc ou n-Myc, poderiam ser fatores que potencialmente levariam ao desenvolvimento de SEN a SEGAs (Chan *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2006, Jozwiak *et al.*, 2004; Jozwiak *et al.*, 2007; Jozwiak *et al.*, 2008).

4. Hamartina e tuberina no ciclo celular

O ciclo celular em eucariotos é um processo de eventos coordenados e altamente conservados que dão lugar ao crescimento, diferenciação e divisão celular. Este processo é controlado por três transições reguladas (*checkpoints*), que ocorrem (i) entre a fase *gap 1* (G1)

e a fase de síntese de DNA (S) – transição G1/S; (ii) na própria fase S; e (iii) na transição entre a fase *gap 2* (G2) e a mitose (fase M) – transição G2/M (Murray e Hunt, 1993). Estas transições permitem ou inibem a progressão do ciclo celular mediante cinases dependentes de ciclinas (CDKs), as ciclinas especificamente associadas e as proteínas inibidoras de CDK (CKI), como p27, p53 e a proteína do retinoblastoma (Hardwiger *et al.*, 1989; Hunt, 1989; Gali-Muhtasib e Bakkar, 2002).

O complexo hamartina/tuberina pode antagonizar a rede de sinalização de mTOR/p70SK6, que repercute na regulação do crescimento e da progressão do ciclo celular. Neste último caso, a transição desde um estado quiescente G0/G1 a um estado proliferativo S está regulado pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs), Cdk2 ou Cdk4 (Soucek *et al.*, 1997). Quando as células encontram-se na fase G0/G1 do ciclo celular, as CDKs estão negativamente reguladas por pequenas moléculas inibidoras, entre elas se encontra p27, uma proteína com a capacidade de ligar-se a Cdk2 no núcleo (Soucek *et al.*, 1998). Por outro lado, quando as células entram em fase proliferativa S do ciclo celular, as quantidades protéicas de p27 no núcleo são mais baixas (Polyak *et al.*, 1994a, 1994b; Toyoshima e Hunter, 1994), provavelmente pelos seguintes fatos: (i) p27 é fosforilada pela AKT, redistribuindo-se do núcleo ao citoplasma ao formar o complexo p27/14-3-3 (Rosner *et al.*, 2007); e (ii) p27 na fase S sofre proteólise mediada por Skp2, uma proteína da classe F-box que, em conjunto a outras proteínas, forma um tipo de complexo ubiquitina ligase tipo E3, SCF (Rosner *et al.*, 2004).

Com o aumento dos níveis nucleares e estabilidade de p27, o complexo tuberina/hamartina mantém as células em estado quiescente. Isso pode se dar por ser o complexo hamartina-tuberina regulado pela inibição de sua retenção citoplasmática mediada pela proteína 14-3-3 (Rosner *et al.*, 2007) e, no segundo caso, em consequência de a tuberina poder sequestrar p27, unindo-se ao complexo Skp2/p27, regulando negativamente a Cdk2 ao formar o complexo Cdk2/p27 (Rosner *et al.*, 2004, 2009).

Figura 4: Relação entre o inibidor de CDK, p27 ($p27^{KIP1}$), e a proteína tuberina na regulação da transição G1/S no ciclo celular. Em G1, $p27^{KIP1}$ está associado à tuberina e é translocado ao núcleo celular. A associação com tuberina impede a interação de $p27^{KIP1}$ com a proteína 14-3-3. A fosforilação de $p27^{KIP1}$ por Akt no núcleo celular aumenta a afinidade desse por 14-3-3 que libera tuberina e retorna ao citoplasma. Em células francamente proliferativas (painel inferior, bloco da esquerda), $p27^{KIP1}$ é ubiquitinado e degradado. Sua associação com tuberina (bloco da direita) mantém esse complexo no núcleo celular e para o ciclo celular. Fonte: Rosner *et al.*, 2007.

Hamartina pode ser fosforilada pelo complexo Cdk1/ciclina B regulando a função do complexo tuberina/hamartina durante a fase G2/M do ciclo celular, deixando de inibir mTOR/S6K, permitindo o aumento da síntese protéica e crescimento celular (Astrinidis *et al.*, 2003).

Finalmente, pode-se corroborar que o complexo hamartina-tuberina no ciclo celular tem efeito na manutenção das células em estado quiescente através do aumento dos níveis de p27 no núcleo e de sua meia-vida. No primeiro caso, é regulado pela inibição da interação com a proteína 14-3-3 (Rosner *et al.*, 2006) e, no segundo caso, pelo sequestro de p27 pela tuberina ao invés de Skp2 regulando negativamente Cdk2 ao formar o complexo Cdk2/p27 (Rosner *et al.*, 2004).

5. Neurogênese cortical piramidal no mamífero e regulação do ciclo celular

Durante a corticogênese cerebral no camundongo, entre os 11^º e 19^º dias embrionários, respectivamente E11 e E19, duas camadas da zona germinal, a zona ventricular e a zona subventricular, geram os neurônios piramidais. Antes do início da neurogênese, antes de E11, um grupo de células neuroepiteliais, proliferativas sofre várias divisões simétricas formando um epitélio pseudo-estratificado na zona ventricular. Por volta do décimo dia embrionário no camundongo (E10), essas células sofrem alguma diferenciação com perda de certas características epiteliais gerando três tipos principais de precursores neurono-gliais que passam a sofrer divisões assimétricas. Estas divisões assimétricas gerarão uma célula-filha, progenitora que não sai do ciclo celular, e a outra célula, pós-mitótica, gerará um neurônio ou célula da glia. As células pós-mitóticas migrarão tangencialmente formando as seis camadas corticias, conhecidas como neocortex (revisto por Bystron *et al.*, 2008). As projeções neuronais mais novas são distribuídas nas camadas mais profundas do neocortex (camada V-VI), enquanto as projeções mais antigas migram às camadas mais superficiais (camadas II-IV), ultrapassando as primeiras (Caviness *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1999).

Neste período da embriogênese, os SEN poderiam se originar como pequenos aglomerados de células que manterão, mais tarde, um índice proliferativo ligeiramente acima do esperado. Sabendo que esses progenitores retêm, mesmo no adulto, a capacidade de

diferenciação e migração tangencial, pode-se especular que alguns sinais mitógenos ou mutações somáticas no desenvolvimento pós-natal estimulariam o crescimento desses nódulos por mecanismos ainda desconhecidos, originando SEGAs.

Figura 5: Dois nichos neurogênicos – o córtex embrionário (esquerda) e o ventrículo lateral do adulto (direita). Progenitores apicais sofrem migração nuclear intercinética. VZ: zona ventricular; SVZ: zona subventricular; CP: placa cortical; RMS: fluxo migratório rostral. Fonte: Salomoni e Calegari (2010)

Acredita-se haver uma ligação entre a fase G1 do ciclo celular e o modo de divisão de precursores corticais. Um ciclo celular curto, determinado por uma breve duração da fase G1 gera mais progenitores. Quando há uma fase G1 mais longa, pode existir divisão assimétrica, gerando por sua vez células neuronais e mais células progenitoras. E, por último, quando existe uma fase muito longa de G1, há uma divisão simétrica e as células precursoras corticais geram somente neurônios (Calegari *et al.*, 2003).

O processo de neurogênese e também da histogênese do neocórtex é regulado principalmente pelo ponto de restrição G1 da fase do ciclo celular por ser capaz de controlar se os progenitores neuro-gliais continuarão se dividindo, constituindo a reserva de células que proliferarão ou se elas vão escapar do ciclo celular e entrar no estado Q (Sherr *et al.*, 1999).

Depois de sucessivas divisões dos progenitores neuro-gliais, irá se acrescentando a fração de células pós-mitóticas que deixam o ciclo (fração Q, neurônios) havendo um

incremento da duração da fase G1 do ciclo dos progenitores restantes (Caviness *et al.*, 1999). Assim, o número total de células produzidas pelos progenitores depende de dois parâmetros críticos: (i) a probabilidade de células saírem do ciclo celular (fração Q) a cada ciclo; e (ii) o número de ciclos celulares que constituem o período de produção, onde geralmente são 11 nos camundongos (Mitsuhashi e Takahashi *et al.*, 2009, Takahashi *et al.*, 1995). O término da neurogênese para a corticogênese embrionária é definido, então, como o ponto onde o último grupo de progenitores deixa o ciclo celular. Este período tem um tempo determinado de seis dias, começando a acontecer a partir do dia embrionário E11 até por volta do dia E17 (Takahashi *et al.*, 1996).

A expressão de genes envolvidos na progressão da fase G1 a S (ex. ciclina E) é mais alta nas primeiras etapas da neurogênese (Q baixo) e no decorrer da neurogênese a atividade de p27 vai aumentando, tendo sua máxima expressão em E14 e inibindo a progressão da fase G1 nos progenitores, aumentando a fração de células no estado quiescente ou Q. Desta forma, p27 é uma proteína crítica no processo de proliferação e diferenciação característico dos progenitores neuro-gliais nessa região (Delalle *et al.*, 1999). Tarui (2005) observou que a superexpressão de p27 incrementa a fração de células Q, aumentando o número de células que migram até as camadas supragranulares do córtex, esclarecendo que os mecanismos regulatórios de Q são importantes para o plano geral de desenvolvimento.

As células progenitoras que se dividem para gerar neurônios são caracterizadas por ter um ciclo celular mais longo que as células progenitoras que se manterão na zona proliferativa. Aquelas com uma fase G2 mais longa são encontradas na base da zona ventricular e subventricular em relação às células que estão se dividindo na superfície ventricular. Desta forma, a duração do ciclo celular regula o estado proliferativo diferentemente do neurogênico (Calegari e Hunter 2003; Calegari *et al.*, 2005).

No modelo patogênico de SEGA, suas células são provenientes de progenitores neuro-gliais da zona subventricular, onde residem. Desta forma, os progenitores neuro-gliais são células importantes à patogênese do TSC. No início da década de 1990, definiram-se condições para o cultivo, em suspensão, de células progenitoras obtidas de tecido encefálico dissociado. Essas apresentavam franca proliferação *in vitro*, formando agregados celulares que foram denominados neuroesferas, mantidos em presença de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator-2 de crescimento de fibroblastos (FGF-2 ou bFGF) (Reynolds *et al.*, 1992; Vescovi *et al.*, 1993). Esse sistema de cultivo mostra-se muito apropriado ao estudo das proteínas hamartina e tuberina e suas relações.

II. OBJETIVOS

O cultivo de neuroesferas constitui um modelo *in vitro* que pode ser informativo ao estudo dos papéis da hamartina e tuberina na proliferação de precursores neuro-gliais, sua diferenciação celular e também no papel dessas proteínas na migração celular. O estudo da expressão e distribuição da hamartina e tuberina em células de neuroesferas derivadas de ratos pode servir como base para futuros projetos com células humanas derivadas de pacientes ou de modelos animais geneticamente modificados.

6. Objetivo geral

- Relacionar os níveis de expressão endógena das proteínas hamartina e tuberina do complexo da esclerose tuberosa e a taxa de proliferação de células da vesícula telencefálica de rato no 14º dia embrionário, cultivadas *in vitro* em suspensão.

7. Objetivos específicos

- Produzir culturas primárias em suspensão de neuroesferas a partir da região rostral do encéfalo de rato no 14º dia embrionário (E14);
- Caracterizar por imunofluorescência indireta o fenótipo de células das neuroesferas de acordo com a expressão de marcadores proteicos;
- Avaliar a proliferação celular de neuroesferas em cultura pela incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina e relacionar à expressão da hamartina e tuberina;
- Diferenciar *in vitro* as neuroesferas em neurônios e examinar a expressão das proteínas hamartina e tuberina por imunofluorescência indireta.

III. MATERIAL E MÉTODOS

8. Animais

Foram utilizados ratos Wistar no décimo quarto dia embrionário (E14). As fêmeas, prenhas foram utilizadas para fornecimento de embriões e mantidas no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, em gaiolas adequadas, sala climatizada, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimento. Um protocolo para trabalho experimental em animais neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de pesquisa em animais do Instituto de Biociências, USP (No. 091/2009, Anexo). Os experimentos seguiram as normas para cuidados e experimentação animal.

Todos os embriões de cada cria, ambos os sexos, foram utilizados em cada experimento. As fêmeas prenhas foram sacrificadas por inalação de CO₂, um procedimento muito rápido que não envolve dor ou sofrimento ao animal. Crânio e meninges foram dissecados do encéfalo e sua região rostral isolada.

9. Anticorpos

Os seguintes anticorpos foram utilizados em experimentos de imunofluorescência indireta e seu fator de diluição (f.d.), espécie animal em que foi gerada e laboratório fornecedor estão respectivamente indicados entre parênteses: anticorpo monoclonal anti-hamartina 1B2 (f.d. 10 a 25, camundongo, gentilmente cedido por Vijaya Ramesh, Harvard Medical School); anticorpo monoclonal anti-tuberina IA22 (f.d. 50 a 100, coelho, Sigma, St Louis MO); anticorpo policlonal anti-rheb (f.d. 50, coelho, Abcam, Cambridge MA); anticorpo policlonal anti-BrdU (f.d. 100, carneiro, Abcam, Cambridge MA); anticorpo policlonal anti-p27^{kip1} (f.d. 50, coelho, Abcam, Cambridge MA); anticorpo monoclonal anti-nestina (clone rat-401, f.d. 200, Chemicon, Temecula CA); anticorpo policlonal anti-Oct-6 (f.d. 100, coelho, Abcam, Cambridge MA); anticorpo anti-NFL (cadeia leve do neurofilamento, f.d. 50, coelho, Chemicon, Temecula CA),

anticorpo monoclonal anti-GFAP (proteína acídica filamentar de glia, clone GA5, f.d. 200, camundongo, Chemicon, Temecula CA). Os anticorpos secundários conjugados a fluorocromo para imunofluorescência indireta eram compostos pelas quatro cadeias completas de imunoglobulinas (duas leves e duas pesadas). Estes foram anti-coelho conjugado a Alexa 488 (f.d. 400, cabra, Molecular Probes), anti-camundongo conjugado a Alexa Fluor 568 (f.d. 400, cabra, Molecular Probes), anti-coelho conjugado a Alexa Fluor 568 (f.d. 400, jumento, Molecular Probes), anti-camundongo conjugado a Alexa Fluor 647 (f.d. 400, cabra, altamente adsorvido, Molecular Probes), anti-carneiro conjugado a Alexa Fluor 488 (f.d. 400, jumento, altamente adsorvido, Jackson Immuneresearch, West Grove PA).

10. Cultivo primário de neuroesferas a partir da vesícula telencefálica de rato

Para cultura primária de precursores neuro-gliais derivados da vesícula telencefálica de ratos em E14, a região rostral do encéfalo foi isolada com pinça do restante do encéfalo e coletada em meio completo (DMEM:F12 (7:3) acrescido de piruvato de sódio 1X, B-27 a 2%, fator de crescimento epidérmico (EGF) a 20 ng/mL, fator básico de crescimento de fibroblasto (β FGF) a 20 ng/mL, heparina a 5 μ g/mL, L-glutamina a 2 mM e antibióticos penicilina e estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad CA). Após o isolamento do tecido de todos os animais, os fragmentos se depositaram no fundo do tubo por gravidade e o meio foi removido por pipetagem. O tecido foi digerido em 3 mL de solução de tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad CA) por 10 min., a 37C. A reação foi parada pela adição de 3 mL de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen, Carlsbad CA). Após a sedimentação do tecido no fundo do tubo, a solução foi removida e acrescentou-se 1 mL de meio completo. O tecido foi dissociado mecanicamente com pipetas com calibres decrescentes (5 mL, 2 mL, micropipetas com capacidade para 1000 μ L e 200 μ L) até a obtenção de uma solução homogênea e filtrado para remover debris celulares (filtro de 100 μ m, BD Biosciences, Billerica MA). Foram utilizados 20 μ L do

sobrenadante para observar, ao microscópio, a morfologia das células e contá-las em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em garrafas de cultura de capacidade de 75 mL (T-75 tratada para adesão celular (TTP, Melbourn UK) ou garrafa não tratada para adesão celular (Corning, Corning NY), previamente revestidas com poly-2-hidroxietil-metacrilato (poli-HEMA, Sigma, St Louis MO) para evitar adesão celular (Savary *et al.*, 2007). Em cada garrafa foram semeadas 10^6 células em 10 mL de meio completo. As garrafas foram mantidas a 37°C e CO₂ a 5% e não houve troca de meio por sete dias.

11. Passagens e congelamento de neuroesferas

Para repiques, neuroesferas e meio de cultura foram transferidos para um tubo e centrifugados a 212 X *g*, por 5 min., a 4°C. O sobrenadante foi removido e 1mL de *Tryple Express* (Invitrogen) foi adicionado para dissociação das neuroesferas. Esta suspensão foi incubada por 20 min., a 37°C, seguida de centrifugação a 500 X *g*, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 µL de meio de cultura completo e dissociadas com pipeta *Pasteur*, repetidas vezes. O número de células viáveis foi determinado em câmara de *Newbauer*. As células dissociadas (3×10^4) foram plaqueadas nas mesmas condições anteriores e mantidas a 37°C, CO₂ a 5%. Foram também utilizados tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad CA) ou accutase (BD Bioscience, Billerica MA), ao invés de tryple (Invitrogen) para a dissociação enzimática, no mesmo volume.

Para congelamento se utilizaram as neuroesferas do sétimo dia *in vitro* onde a maioria delas não excedem os 100µm de diâmetro. As neuroesferas foram centrifugadas a 200 x *g* por 5 minutos e resuspensas em meio de manutenção DMEM:F12 (1:1) ou DMEM:F12 (7:3) sem os fatores de crescimento, com soro fetal bovino a 20% e DMSO 15% ou a 10% e transferidas a criotubos, mantidos a -80°C.

Para o ensaio de auto-renovação, neuroesferas isoladas do sétimo DIV foram transferidas a uma placa de 96 pocos individualmente com ajuda de lupa estereoscópica. Cada

dia foi obtida uma foto ao microscópio e as dimensões e diâmetro de cada poço contendo só uma neuroesfera foram medidas.

12. Sincronização de células de neuroesferas na fase G1 do ciclo celular por carenciamento

Para a sincronização das células de neuroesferas na fase G1 do ciclo celular, após uma semana *in vitro* (7 DIV) de cultivo primário, primeira ou segunda passagem, as esferas foram lavadas como descrito e passadas, sem dissociação, a nova garrafa T75, revestida com poli-HEME (Sigma), contendo meio mínimo (DMEM:F12 (7:3) acrescido de piruvato de sódio 1X, B-27 a 2%, heparina a 5 µg/mL, L-glutamina a 2 mM e antibióticos), onde foram mantidas por sete dias.

13. Sincronização de células de neuroesferas na fase S do ciclo celular com hidroxiureia

Para sincronização de células na fase S do ciclo celular, as células foram carenciadas como acima, embora por apenas 72 horas, e seguiu-se o tratamento com hidroxiureia para 1 mM em meio completo, mantido por 16 horas.

14. Ensaio de viabilidade celular e proliferação celular baseado na incorporação de CFSE

As neuroesferas foram sincronizadas no sexto DIV por sete dias pela privação dos fatores de crescimento EGF e bFGF. Após uma semana, o meio foi trocado por meio completo de manutenção por duas horas para posteriormente se dissociar as esferas com accutase (BD Bioscience). As células foram contadas e o volume ajustado com PBS para 25×10^6 células por mL, centrifugado a $300 \times g$ por 5 minutos e as células ressuspensas em 1ml de PBS e BSA a 0,1% mantendo a concentração anterior. As células foram coradas com éster de succimidil-diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) a 2,5 µM e incubadas por 15 minutos a 37°C. Dez mL de meio completo foram adicionados e as células levemente agitadas. Após 10 minutos de

incubação, a temperatura ambiente, as células foram lavadas com meio completo, repetidas vezes e sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL. As condições para sua manutenção a 37°C em incubadora de CO₂ (5%) foram mantidas.

15. Ensaio de proliferação celular baseado na incorporação de BrdU

Células sincronizadas na fase G1 foram lavadas três vezes em PBS (centrifugações a 220 X g, 2 min.), dissociadas em accutase como descrito acima, ressuspensas, ao abrigo da luz, em meio completo, contendo 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, Sigma, St Louis MO) para 50 nM e uridina para 100 ng/mL (podendo ser usada a 1 µg/mL), mantidas assim por 24 hs. As células foram coletadas após 72 hs ou 96 hs. Duas garrafas contendo células carenciadas foram retiradas antes de se iniciar o tratamento com BrdU. Para coletar células que foram expostas ao BrdU, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo ácido ascórbico para 67 nM.

16. Análise das fases do ciclo celular baseada no conteúdo do DNA

Para análise do conteúdo de DNA baseada na fluorescência pelo iodeto de propídeo, as neuroesferas foram dissociadas com accutase como descrito e então mecanicamente e contadas em câmara de Neubauer. Foram utilizadas 10^6 células por análise. As células foram fixadas em metanol em MES, por 60 min a 4°C, lavadas em PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS contendo iodeto de propídeo a 10 mg/mL. As células foram analisadas ao citômetro de fluxo Guava (Millipore), cujos parâmetros recomendados devem ser o programa *express plus* e a centralização do primeiro pico em 1024 antes de salvar os dados. Para análise dos dados, utilizou-se o programa *cell cycle* do software Guavasoft (versão 2.1).

17. Preparo de neuroesferas em suspensão para imunofluorescência

Para preparar neuroesferas para corte ao criostato, elas foram cuidadosamente coletadas, lavadas em PBS (centrifugação a 220 X g, 3 min.) e fixadas em solução em

microtubo, em paraformaldeído a 4%, por 30 min, temperatura ambiente. Após lavadas três vezes em PBS, as neuroesferas foram ressuspensas em sacarose a 10% e mantidas por uma hora a 4C. Outras três lavagens em PBS se seguiram e as esferas ressuspensas em sacarose a 20% em PBS, incubadas a 4C, por 1 hora. As esferas lavadas três vezes em PBS foram suspensas em sacarose a 30% e mantidas por pelo menos 16 horas a 4C. As esferas foram montadas em meio Tissue-tek® O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance CA) em forma, congeladas a -80C e cortes de 10 a 12 µm realizados ao criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha) e capturados em lâminas tratadas com poli-L-lisina. Os cortes em lâminas foram tratados em acetona gelada (-20C) por dez min. e estocados a -80C.

18. Diferenciação neuro-glial de neuroesferas

Neuroesferas foram plaqueadas sob condições de aderência em placas revestidas com poli-D-lisina (50 µg/mL em PBS, por 16 horas) e cultivadas em DMEM:F12 (7:3), suplementado B27 1X, glutamina a 2 mM e antibióticos, por sete ou 14 DIV. Como alternativa, o meio de cultivo foi composto por Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad CA), B27 1X, heparina 2,5µg/mL, N-acetil-cisteína a 400 mM, insulina-transferrina-selênio 1X, glicose a 0,2%, glutamina 2 mM e antibióticos. Nestas condições, para cultivos acima de 10 DIV, a partir de 4 DIV, a cada dois dias, metade do meio foi trocada substituindo por meio completo. Após fixação em paraformaldeído a 4%, por 20 min, a temperatura ambiente, as células foram submetidas à imunofluorescência indireta.

19. Imunofluorescência indireta

Para imunofluorescência indireta, células fixadas foram permeabilizadas em triton-X-100 a 0,3% ou Igepal a 0,1% por 20 minutos, a temperatura ambiente, tratadas em glicina a 0,1M em PBS, por 20 min, bloqueadas em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (livre de imunoglobulinas, Jackson Immuneresearch, West Grove PA) por 60 min a temperatura ambiente. Para marcação com anti-BrdU, imediatamente após a permeabilização, houve uma

etapa de desnaturação do DNA em HCl a 1,5 M por 60 min. a temperatura ambiente, em placa de Petri de vidro, na capela, seguida de três lavagens em tampão borato, 5 mn. cada. Os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído em PBS e BSA a 0,5%, lavadas em PBS, e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo. Após a última lavagem, as lamínulas foram montadas em lâmina contendo Vectashiled (Vector Laboratories, Burlingame CA) com o corante de ácido nucléico 4',6-diamidina-2-fenyl indol (DAPI, Sigma) a 1 µg/mL e seladas com esmalte. As imagens de imunofluorescência serão capturadas ao microscópio confocal LSM410 ou LSM510 (Zeiss, Germany).

20. Análises estatísticas

As médias obtidas para o número de células marcadas pelo anticorpo anti-BrdU ou expressão de tuberina ou hamartina em células positivas para BrdU de cada grupo (72h ou 96h) foram analisadas usando o teste t de Student para avaliar semelhança entre os grupos. O nível de significância foi considerado 5% ($p < 0.05$).

IV. RESULTADOS

21. Hamartina e tuberina são expressas em células de neuroesferas e neurônios diferenciados a partir dessas

O cultivo de neuroesferas a partir da vesícula telencefálica de rato em E14 mostrou-se reprodutível desde os primeiros ensaios. Observamos a formação dos agregados celulares em suspensão antes de 24 horas de plaqueamento das células dissociadas obtidas do animal (Fig. 6). Embora, mesmo com o revestimento da garrafa de cultivo para evitar a aderência celular, houve células aderidas, mas que não prejudicaram a proliferação celular em neuroesferas. As medidas do diâmetro das esferas em cultura, ao microscópio Axiovert 40C (Zeiss), mostraram esferas com 20 a 40 μm , seis horas após iniciado o cultivo, que passaram a ter 40 a 70 μm de diâmetro após outras 12 horas ($t = 18$ horas), 50 a 100 μm 24 horas após o plaqueamento e até 150 μm ao concluir 48 horas *in vitro*.

Figura 6: Neuroesferas em suspensão, cultivadas a partir da dissociação de vesícula telencefálica de rato em E14.5. Fotografias foram obtidas com câmera AxioCam MRC5 acoplada ao microscópio Axiovert 40C (Zeiss) ao plaquear as células dissociadas (A, $t=0$); seis horas após plaqueamento (B); 18hs (C); 24 horas (D) e 48 horas após o plaqueamento (E). Setas indicam neuroesferas. Barra de escala: 50 μm .

Verificamos nas células das esferas algumas características de células indiferenciadas derivadas dessa região encefálica. Essas compreenderam (i) a auto-renovação; (ii) a proliferação celular; (iii) a expressão de marcadores de células progenitoras; e (iv) a diferenciação neuronal e glial. As propriedades (i), (iii) e (iv) serão apresentadas a seguir. A proliferação celular, por ser objetivo deste estudo, será apresentada em seção posterior.

Trypsina e duas composições enzimáticas, *Trypsin-like enzyme* (TrypLE, Invitrogen, Carlsbad CA) e accutase (Thermo, Louisville CO), foram usadas para dissociação celular de neuroesferas que haviam sido cultivadas por sete dias *in vitro* (DIV). Após a dissociação enzimática e mecânica, as células foram contadas e recultivadas, estabelecendo-se a primeira passagem. Uma alíquota dessas células também foi testada para o congelamento. Após cinco DIV, em primeira passagem, foi possível observar a formação de novas neuroesferas, a maioria com até 50µm de diâmetro após tratamento com accutase (Fig. 7, G-I). Esses dados confirmam a propriedade de auto-renovação dessas células, que formaram esferas a partir de células isoladas. Embora novas esferas tenham-se formado após tratamento com trypLE (Fig. 7, A-C) ou tripsina (Fig. 7, D-F), a proliferação celular foi aparentemente mais rápida após accutase (Fig. 7, G-I). Para o congelamento das células dissociadas, testado por quatro dias a -80C, o meio composto por DMEM/F12 (1:1); soro fetal bovino a 20% e DMSO a 15% manteve a viabilidade celular e permitiu, após o descongelamento e recultivo, a formação de esferas de até 300 µm em 15 DIV (dados não mostrados). Um segundo meio de congelamento (DMEM/F12 (7:3); soro fetal bovino a 20% e DMSO a 10%), nas demais condições acima, manteve a viabilidade celular por até oito DIV (dados não mostrados). Esses resultados confirmaram a viabilidade da criopreservação deste tipo celular obtido de cultivo primário, favorecendo o meio de congelamento DMEM/F12 (1:1); soro fetal bovino a 20% e DMSO a 15%.

O ensaio de viabilidade celular pela incorporação de éster de succimidil-diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) foi testado com dois objetivos. Inicialmente, verificamos a viabilidade celular e, posteriormente, o avaliamos como teste de proliferação celular. O CFSE se difunde passivamente na célula. A clivagem do seu grupo acetato por esterases da célula viva fornece um produto fluorescente, com espectros de excitação e emissão, respectivamente em 492 nm e 517 nm, que indicam a viabilidade celular. Como esse produto é retido na célula,

ele é distribuído às células-filhas, permanecendo detectável. Nossos dados para a viabilidade celular indicaram que grande parte das células estava viável após dissociação (Fig. 8).

Figura 7: Dissociação e passagem de neuroesferas após sete DIV. Células inteiramente dissociadas usando Tryple (A), tripsina (D) ou accutase (G) e após 48 horas ou 72 horas de recultivo para o grupo de tryple (respectivamente B e C), tripsina (respectivamente E e F) ou accutase (respectivamente H e I). Fotografias foram obtidas com câmera AxioCam MRC5 acoplada ao microscópio Axiovert 40C (Zeiss). Barra de escala: 50 μ m.

As células de neuroesferas em suspensão foram submetidas à imunofluorescência indireta para verificar a expressão do filamento intermediário, nestina, próprio de progenitores neuro-gliais. Sua expressão foi confirmada e, nas mesmas células, houve detecção da tuberina (Fig. 9). Ao contrário da intensa expressão da tuberina, que se mostrou citoplasmática, a

proteína hamartina apresentou níveis de expressão baixos. Estava restrita basicamente às células da periferia das esferas, de forma subjacente à membrana plasmática, onde alguma colocalização com a tuberina foi observada (Fig. 9). Examinamos também a expressão da proteína rheb, com a qual tuberina sabidamente interage. Não foi possível realizar marcação dupla para tuberina e rheb porque tínhamos ambos os anticorpos gerados na mesma espécie. No entanto, analisando, lado a lado, o padrão de expressão de tuberina e rheb de experimentos independentes, verificamos semelhanças na distribuição da duas proteínas em células de neuroesferas: expressão abundante e citoplasmática, não polarizada (Fig. 9).

Figura 8: Ensaio de viabilidade de neuroesferas após a marcação com CFSE. Vinte e quatro horas (A) ou 48 horas (B) após marcação com CFSE, a análise ao citômetro Guava indicou 68,30% e 70,70% de células viáveis. Note que neste ensaio, o aparelho definiu viabilidade celular a partir de limites diferentes (linhas verticais, vermelhas) em cada condição. Uma linha tracejada em cor roxa foi desenhada manualmente por nós para indicar 10e1, em ambos os gráficos, valor a partir do qual, em geral, se considera a viabilidade celular.

Figura 9: Imunofluorescência indireta de neuroesferas cultivadas em suspensão, fixadas e seccionadas ao criostato. Painel horizontal superior: tuberina e nestina, como indicado, detectadas, respectivamente por Alexa 488 e Alexa 568. Segundo painel horizontal: tuberina e hamartina, como indicado, detectadas, respectivamente por Alexa 488 e Alexa 568. Terceiro painel horizontal: rheb e hamartina, como indicado, detectadas, respectivamente por Alexa 488 e Alexa 568. A terceira coluna para esses três painéis horizontais representa a sobreposição das duas imagens anteriores. A seta indica possível colocação entre hamartina e tuberina em células periféricas. Os dois painéis inferiores foram tratados independentemente para tuberina ou rheb. As imagens foram obtidas ao microscópio LSM510 (Zeiss) sem obtenção de seções z. Barras de escala: 50 μ m.

A capacidade de células de neuroesferas se diferenciarem *in vitro* em células com fenótipo neuronal ou glial foi analisada pela expressão e distribuição subcelular da cadeia leve do neurofilamento ou da proteína GFAP, respectivamente. Ambos expressaram-se bem, como observado na Figura 10. Como já relatado (Haddad *et al.*, 2002), hamartina teve níveis altos de expressão e colocalizou-se com NFL, indicando o fenótipo neuronal. A expressão da hamartina foi elevada nessas células. Hamartina teve ampla colocalização com tuberina, em sete e 14 DIV (Fig. 10). A expressão de tuberina foi analisada em células com expressão de GFAP, mas se mostrou negativa, inferindo que nessas condições, hamartina e tuberina são expressas e colocalizam-se em células com fenótipo neuronal, mas não em células com expressão de marcador glial.

22. Tuberina desloca-se ao núcleo de células de neuroesferas na fase G1/S do ciclo celular

A padronização de protocolos para a sincronização de células na transição G1/S do ciclo celular é uma etapa importante, anterior aos ensaios de proliferação celular, definindo um ponto no ciclo celular em que a maior parte das células em cultura se encontrará. Há possibilidade de sincronizar as células em outro ponto de transição como, por exemplo, na transição G2/M ou na fase M. Para o estudo das proteínas hamartina e tuberina, cujas distribuições subcelulares são alteradas na transição G1/S, escolhemos a sincronização das células nas fases G1 ou S como ponto de partida dos nossos estudos. Dois protocolos foram padronizados para as células de neuroesferas. O primeiro baseia-se no carenciamento das células pela remoção dos fatores de crescimento do meio de cultivo, por uma semana, e será referido aqui simplesmente como carenciamento. A falta de mitógenos causa uma parada no ciclo celular não permitindo a entrada na fase de replicação do DNA. O segundo protocolo é o tratamento das células com hidroxiaurea, a qual reduz o *pool* celular de desorribonucleotídeos na célula resultando em forquilhas de replicação do DNA paralisadas (Bianchi *et al.*, 1986).

Figura 10: Imunofluorescência indireta de células de neuroesferas que foram submetidas ao tratamento para diferenciação neuronal e glial por sete DIV ou 14 DIV, como indicado. A terceira coluna de imagens representa a sobreposição das duas imagens anteriores. As cores verde e vermelha representam a fluorescência obtida através de Alexa 488 e Alexa 568, respectivamente. Os anticorpos primários utilizados (anti-tuberina, hamartina, NF-L (cadeia leve do neurofilamento) ou GFAP (proteína ácida filamentar da glia)) estão indicados. Barras de escala: 25, 20, 50 e 20 μm, respectivamnete da primeira à ultima linhas de imagens.

Como o método de referência para a análise do ciclo celular é a citometria de fluxo, decidimos utilizar o citômetro de fluxo de análise (Guava EasyCyte™, Millipore, Billerica MA), disponível no Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-USP). Células sincronizadas na fase G1 ou S do ciclo celular foram submetidas à análise ao citômetro Guava, utilizando-se iodeto de propídeo, um agente intercalante do DNA, inespecífico, sem preferência por sequência de bases.

Na análise com marcador de DNA, o conteúdo deste pode ser distribuído de acordo com a intensidade de fluorescência, definindo dois picos principais, um para o DNA diploide ($2n$) e outro para o conteúdo tetraploide ($4n$), que representa o DNA replicado em células que ainda não sofreram divisão mitótica. Picos intermediários definem a fase de replicação do DNA (fase S). Embora a interpretação seja lógica com este tipo de análise, permitindo inferir a fase do ciclo celular em que se encontram distribuídas as células, tivemos dificuldades com a interpretação dos nossos resultados. Ao término da análise de fluorescência, os dados devem ser salvos pelo operador, alinhando-se o primeiro pico em 1024, referência para o conteúdo $2n$. No entanto, isso não foi realizado para nenhuma de nossas análises. Diante disso, tentamos interpretar os dados de duas formas diferentes.

Na primeira tentativa, definimos ao *software* analisar a posição relativa do maior pico em relação ao pico do grupo controle (não carenciado e não tratado). Essa análise relativa permitiu-nos observar que os picos do conteúdo de DNA dos grupos carenciado ou hidroxureia estavam deslocados para a direita em relação ao controle, sugerindo ter iniciado a replicação do DNA e parado (Fig. 11). A segunda abordagem para a análise, em novo experimento, foi definirmos manualmente para o grupo controle, no software, que o primeiro pico que surgisse inteiro teria sua porção mediana definida como valor $2n$ e que o mesmo seria feito com o segundo pico da análise do controle para definir o valor $4n$. Uma amostra do mesmo experimento, mas com células tratadas com hidroxureia, foi analisada e teve seu maior pico de

conteúdo de DNA localizado entre os picos $2n$ e $4n$, sugerindo se tratar de replicação de DNA iniciada mas interrompida (Fig. 12).

Figura 11: Perfis de fluorescência do iodeto de propídeo obtidos ao citômetro Guava (Millipore) pela análise de células de neuroesferas cultivadas por sete dias *in vitro* (controles) ou que foram submetidas ao carenciamento por sete DIV (carenciamento) ou ao tratamento com hidroxureia (hidroxureia).

Figura 12: Perfis de fluorescência do iodeto de propídeo obtidos ao citômetro Guava (Millipore) pela análise de células de neuroesferas cultivadas por sete dias *in vitro* (controle) ou que foram submetidas ao tratamento com hidroxureia (hidroxureia). Os conteúdos 2n e 4n de DNA foram definidos manualmente com explicado no texto. As cores (rosa, verde vivo e lilás) foram usadas no gráfico como legenda da tabela à direita, respectivamente para as fases G1, S e G2. O percentual de células em relação ao total, bem como o número absoluto, está indicado.

As células dos grupos sincronizados por carenciamento ou tratamento com hidroxureia foram analisadas por imunofluorescência indireta para verificação da distribuição das proteínas hamartina e tuberina e de marcadores que, na transição G1/S, são translocados ao núcleo celular, como p27^{kip1} e o fator transcricional Oct-6. Oct-6 não se mostrou um bom marcador da transição G1/S, uma vez que nos três grupos (controle, carenciado e tratado com hidroxureia) distribuiu-se ao núcleo celular (Fig. 13). Outras imagens para o grupo hidroxureia não foram satisfatórias e, com isso, prosseguimos com os experimentos somente pela sincronização na fase G1 pelo carenciamento do meio de cultivo.

Figura 13: Imunofluorescência indireta de células de neuroesferas cultivadas por sete dias *in vitro* (painel vertical do controle) ou que posteriormente foram submetidas ao carenciamento por sete DIV (painel vertical do carenciamento) ou ao tratamento com hidroxiureia (painel único, hidroxiureia). A marcação foi realizada com anticorpos para tubeirina, hamartina, p27^{KIP1}, Oct-6 ou nestina, como indicado. A detecção foi com Alexa488 ou Alexa 568. Para a detecção com Alexa568, utilizamos na montagem das figuras a pseudocor verde, visando a uma melhor comparação. No painel para a tuberina (controle), um quadrado delimita a área em que houve magnificação de 5 vezes (painel à direita no mesmo eixo horizontal). Barras de escala: 50 μ m.

Figura 14: O deslocamento da tuberina ao núcleo celular na transição G1/S não impede sua colocalização com hamartina no citoplasma; alguma colocalização no núcleo é possível. Neuroesferas carenciadas por sete DIV foram seccionadas e submetidas à imunofluorescência indireta com anticorpo anti-hamartina e anti-tuberina (painel horizontal superior) ou anti-p27^{kip1} (painel horizontal inferior), como indicado. Hamartina foi detectada com Alexa 488 e tuberina ou p27^{kip1} com Alexa 568. A terceira coluna define a sobreposição das duas imagens horizontais, anteriores. As setas indicam regiões onde é possível observar coloração mais amarelada, citoplasmática, sugerindo colocalização entre hamartina e tuberina. O empalidecimento do núcleo celular na imagem superior, direita sugere alguma colocalização nuclear entre hamartina e tuberina. Barras de escala: 50 μ m.

No grupo controle, a proteína p27^{KIP1} apresentou uma marcação de baixa intensidade, citoplasmática; enquanto, em células carenciadas, teve elevada expressão com distribuição nuclear. Da mesma forma, tuberina localizou-se no núcleo celular em células carenciadas e no citoplasma em células do grupo controle. Por outro lado, de forma diferente de p27^{KIP1}, os níveis de intensidade de marcação com o anticorpo anti-tuberina não pareceram variar muito entre os grupos controle e carenciado (Fig. 13 e 14).

A distribuição nuclear de tuberina e p27^{KIP1} na transição G1/S é evidente na Figura 15 que apresenta magnificação. No painel superior da Figura 14, observa-se que, mesmo em células carenciadas, onde a distribuição nuclear da tuberina é clara, alguma co-marcação citoplasmática existe para os anticorpos anti-tuberina e anti-hamartina. Embora a distribuição de hamartina ao núcleo celular não seja perceptível no respectivo painel, em verde, observa-se um empaldecimento da imagem da tuberina quando esta é sobreposta à da hamartina, sugerindo alguma colocalização das proteínas da escerose tuberosa nessa organela. O mesmo é perceptível para a sobreposição das imagens de hamartina e p27^{KIP1} (Fig. 14). Como controle negativo, a distribuição da proteína nestina não se alterou entre os grupos controle e carenciado. Os dados obtidos nesta etapa mostraram que as condições do carenciamento foram satisfatórias, baseando-nos no deslocamento nuclear das proteínas tuberina e p27^{KIP1}.

23. Tuberina e hamartina em células proliferativas

Para os experimentos de análise da proliferação celular, a sincronização das células em cultura foi realizada em G1 pelo carenciamento do meio de cultura. Para a análise da proliferação propriamente dita, utilizamos inicialmente o método baseado na incorporação citoplasmática do CFSE. A análise com CFSE foi realizada 24, 48, 72 e 96 horas após a marcação das células em cultura com esse reagente. A cada 24 horas, observamos uma diminuição da fluorescência sem considerável diminuição na contagem celular (Fig. 15). Para o mesmo número de células, a diminuição da fluorescência a cada 24 horas pode indicar a distribuição da fluorescência entre as células filhas, isto é, proliferação celular; mostrando que o intervalo de 24 horas de observação deve ser apropriado para experimentos futuros com esse tipo celular e as condições de cultivo.

Testamos outra alternativa para avaliar a capacidade proliferativa das células de neuroesferas em suspensão, através da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) no DNA. Para isso, permitiu-se a reentrada das células no ciclo celular pelo reacrécimo dos

fatores de crescimento EGF e bFGF, juntamente com BrdU e uracila para diminuir a chance de incorporação do desoxirribonucleotídeo modificado no RNA.

Figura 15: Ensaio proliferativo de neuroesferas baseado na marcação com CFSE. Neuroesferas sincronizadas na fase G1 pelo careciamento do meio de cultura, foram dissociadas e coradas com CFSE a $2,5\mu\text{M}$. O controle negativo, sem CFSE, está indicado em (A). O controle positivo, constituído por neuroesferas não submetidas ao careciamento, mas marcadas com CFSE, é apresentado em (B). Neuroesferas dissociadas coradas com CFSE e observadas 24 horas (C), 48 horas (E), 72 horas (F) ou 96 horas (F) mais tarde. Os dados foram obtidos através do Citometro de fluxo Guava e avaliados pelo programa Guavsoft 2.1.

Os experimentos foram feitos sucessivamente em concentrações decrescentes de BrdU porque observamos perda de viabilidade celular em 10 μ M, 5 μ M e 1 μ M (dados não mostrados). Os resultados apresentados foram obtidos com BrdU a 50 nM. A disponibilidade de anticorpos comerciais que detectam BrdU facilita a observação *in situ* dos núcleos das células que o incorporaram. Uma vez que as células estavam paradas em G1, sua reentrada no ciclo celular em presença de BrdU permite identificar, em experimentos de imunofluorescência indireta, aquelas que proliferaram *in vitro*.

Células carenciadas consistiram o grupo controle e testamos células que ciclaram por 72 (72h) ou 96 (96h) horas. Todas as análises foram realizadas em esferas que foram seccionadas ao criostato e submetidas à imunofluorescência tripla com anti-BrdU detectado por Alexa fluor 488, anti-tuberina detectado por Alexa fluor 568 e anti-hamartina detectado por Alexa fluor 647. Após a marcação, as células foram montadas em Vectashield contendo DAPI, embora este não tenha sido observado por falha técnica no LASER apropriado do microscópio LSM510 (Zeiss). A falta de exposição do grupo carenciado ao nucleotídeo BrdU permitiu discriminar entre núcleos corados dos grupos 72h e 96h e coloração de fundo do grupo controle para o anticorpo anti-BrdU (Figs. 16 e 17). Para todas as imagens dessa análise foi realizada subtração do sinal obtido pela omissão do anticorpo primário (controle negativo) ao microscópio confocal LSM510, seguido por obtenção de seções z e formação de imagem única. Dois fluorocromos foram selecionados para cada imagem, permitindo pseudocores, sendo sempre BrdU (verde) e hamartina (vermelho) e, posteriormente, BrdU (verde) e tuberina (vermelho), como os exemplos das Figuras 16 e 17, respectivamente. Desta forma, obtivemos dois tipos de sobreposições de imagens para cada esfera analisada.

Foram coletadas seis imagens do grupo carenciado e nove imagens de cada grupo 72h ou 96h. De acordo como número de neuroesferas no grupo de imagens, foi possível analisar 14 neuroesferas do grupo carenciado e 11 e 10 esferas respectivamente dos grupos 72h e 96h.

Figura 16: Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU. Células de neuroesferas de segunda passagem foram cultivadas por sete dias *in vitro* após passagem, carenciadas por mais sete dias e permitidas re-entrar no ciclo celular pela reposição dos fatores de crescimento com a acrescimo de BrdU. As células foram fixadas e submetidas à imunofluorescência indireta em diferentes tempos: logo que concluído o carenciamento e imediatamente antes do acrescimo dos fatores de crescimento (painéis horizontais superiores), 72 horas e 96 horas mais tarde, com indicado. Marcação dupla para hamartina (Alexa 647, vermelho) e BrdU (Alexa 488, verde). A terceira coluna indica a sobreposição das duas imagens horizontais, anteriores. Barras de escala: 50 μm .

Foi estimada a área de cada esfera por ferramenta do programa do microscópio Zeiss. A área média das esferas de cada grupo foi de 20.068 μm^2 (variando de 4.512 a 55.810 μm^2) para o grupo carenciado, 36.671 μm^2 (variando de 873 a 134.339 μm^2) para o grupo 72h e 45.682 μm^2 (variando de 3.176 a 93.228 μm^2).

Figura 17: Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU. Células de neuroesferas de segunda passagem foram cultivadas por sete dias *in vitro* após passagem, carenciadas por mais sete dias e permitidas re-entrar no ciclo celular pela reposição dos fatores de crescimento com a adição de BrdU. As células foram fixadas e submetidas à imunofluorescência indireta em diferentes tempos: logo que concluído o carenciamento e imediatamente antes do acréscimo dos fatores de crescimento (painéis horizontais superiores), 72 horas e 96 horas mais tarde, como indicado. Marcação dupla para tuberina (Alexa 568, vermelho) e BrdU (Alexa 488, verde). A terceira coluna indica a sobreposição das duas imagens horizontais, anteriores. Barras de escala: 50 μm.

Ao programa *powerpoint*, sem auxílio automático, todas as imagens sugestivas de marcação nuclear com anticorpo anti-BrdU foram identificadas para os grupos 72h e 96h, por um segundo examinador sem conhecimento da identidade de cada grupo. Cada célula positiva para BrdU teve a expressão e distribuição de tuberina ou hamartina registrada.

O objetivo nesta análise foi verificar se a expressão das proteínas tuberina ou hamartina se relaciona à atividade proliferativa de células de neuroesferas. Uma vez que se perdeu a informação dada pelo DAPI, o examinador considerou somente imagens muito sugestivas de estrutura nuclear, baseando-se também na marcação negativa pelo anticorpo anti-tuberina que, nessas condições, detecta, sobretudo, citoplasma. À contagem das células, no grupo 72h, houve uma média de 23 marcações de BrdU por esfera (variando de zero a 71) e, no grupo 96h observou-se uma média de 59,4 marcações (variando de 21 a 136). Embora esses dados sugiram um maior número de células marcadas após 96 horas, a comparação desses valores não alcançou significância significativa (teste *t* de Student, $p = 0,082$).

Diante da observação de que algumas esferas não devem ter sido bem dissociadas antes do tratamento com BrdU, mantendo-se grandes, como mostrado pela variação de tamanho citada anteriormente, estimamos a razão entre o número de células marcadas e a área da esfera fornecida pelo mesmo programa de análise de imagens do microscópio LSM510. Todas as imagens estão apresentadas nas Figuras 19 e 20, disponíveis no Anexo. As áreas estimadas encontram-se na Tabela 2 (Anexo). Novas comparações foram realizadas e não se observou uma diferença entre as razões de células marcadas (0,001026 vs. 0,0015962, teste *t* de Student, $p = 0,31$), indicando que no tempo 96h já deva haver uma redução da incorporação de BrdU ou da intensidade da marcação com o anticorpo.

Nessa análise de área, estimamos a área de uma célula na esfera, a partir da observação de uma pequena esfera cujas células conseguimos contar. Assim, estabelecendo a área celular em $87,3\mu\text{m}^2$ (Tabela 2), estimamos o número de células por esfera, em seção de $12\mu\text{m}$, através da razão entre a área da esfera (μm^2) e a área da célula (μm^2). Estimamos, posteriormente, o percentual de células positivas para BrdU em cada imagem de cada grupo (Tabela 3, Anexo). No grupo 72h, o percentual variou de 0 a 33,8%, com a média de 10,32% de células positivas para BrdU. O grupo 96h apresentou em média 15,6% de células positivas para

BrdU, com variação de 8,9% a 33% de células marcadas. Curiosamente, as esferas com mais alto índice de marcação eram as menores de cada grupo. As duas esferas em que não obtivemos marcação no grupo 72h eram as maiores esferas, com áreas de $1538 \mu\text{m}^2$ e $904 \mu\text{m}^2$. Por outro lado, três esferas do grupo 96h, com áreas de $1002 \mu\text{m}^2$, $1011 \mu\text{m}^2$ e $1067 \mu\text{m}^2$, apresentaram, respectivamente, 9,2%, 8,9% e 12,7% de células marcadas (Tabela 3, Anexo).

Em relação à detecção de tuberina em células marcadas pelo anticorpo anti-BrdU, observamos uma média de 8,73 células (variando entre 0 e 21) para o grupo 72h e 21,1 (variando entre 8 e 73) para o grupo 96h. A comparação estatística entre os dados não revelou diferença de expressão entre os grupos para a expressão de tuberina em células proliferativas (teste *t* de Student, $p = 0,16$). Estimando o percentual de células positivas para BrdU que expressaram tuberina, obtivemos 37,9% para o grupo 72h e 35,5% para o grupo 96h.

Para a hamartina, observamos sua expressão em uma média de 1,6 células marcadas por anti-BrdU (variação de 0 a 9) no grupo 72h e 27 células do grupo 96h em média (variando de 0 a 88). A comparação dos dados pelo teste *t* de Student revelou um aumento na detecção de hamartina no grupo 96h em relação ao grupo 72h, em células que apresentaram incorporação de BrdU ($p = 0,027$). Esses dados mostraram um aumento significativo da expressão de hamartina de 6,9% das células do grupo 72h para 45,5% das células do grupo 96h. Essas análises não permitiram verificar se eram as mesmas células que expressavam hamartina e tuberina.

Imagens dos três grupos (carenciado, 72h e 96h) foram também analisadas para a marcação dupla para tuberina e hamartina, como mostrado na Figura 18. É interessante evidenciar que o grupo carenciado apresentou marcação dupla para essas proteínas, inclusive em estrutura sugestiva de núcleo celular. Neste experimento, hamartina foi detectada por novo anticorpo secundário, conjugado a Alexa fluor 647 ao contrário dos experimentos anteriores em

que se usou Alexa 488. Colocalização entre tuberina e hamartina foi também identificada nos grupos 72h e 96h, em células positivas para BrdU, indicando células proliferativas. Na Figura 18, é mostrada uma grande esfera do grupo 72h, em que a marcação para hamartina se localiza nas células da periferia da esfera. O tamanho da esfera (área estimada em 134.339 μm^2) sugere que ela não tenha sofrido ação enzimática para sua dissociação antes da reentrada no ciclo celular. Isso pode significar que mesmo mantida intacta, as células de sua periferia reciclaram, como se vê por um halo de células marcadas por anti-BrdU, na periferia da esfera do grupo 72h, na Figura 16.

Figura 18: Imunofluorescência indireta de neuroesferas em ensaios de proliferação e marcação com BrdU. Células de neuroesferas de segunda passagem foram cultivadas por sete dias *in vitro* após passagem, carenciadas por mais sete dias e permitidas re-entrar no ciclo celular pela reposição dos fatores de crescimento com a adição de BrdU. As células foram fixadas e submetidas à imunofluorescência indireta em diferentes tempos: logo que concluído o carenciamento e imediatamente antes do acréscimo dos fatores de crescimento (painéis horizontais superiores), 72 horas e 96 horas mais tarde, como indicado. Marcação dupla para tuberina (Alexa 568, pseudocor verde) e hamartina (Alexa 647, vermelho). A terceira coluna indica a sobreposição das duas imagens horizontais, anteriores. Barras de escala: 50 µm.

V. **DISCUSSÃO**

O neocórtex é a estrutura predominante da substância cinzenta do telencéfalo de mamíferos, dividida em seis camadas, compostas por neurônios de projeção, excitatórios, neurônios inibitórios e glia. Os neurônios excitatórios (65 a 80% dos neurônios neocorticais) desenvolvem-se por uma sequência de processos coordenados, que se inicia a partir da neurogênese em um epitélio pseudoestratificado, nas margens do sistema ventricular, nas porções mais profundas da parede cerebral do embrião. Os mecanismos que controlam a proliferação celular nessa região são os mesmos que regularão o número de neurônios destinados a cada camada neocortical. Os progenitores neuronais do epitélio pseudoestratificado subventricular ciclam de forma contínua e não sincronizada pelas fases do ciclo celular até a sua saída deste, como neurônios pós-mitóticos, migratórios. Assim, a cada um dos sucessivos onze ciclos celulares dos progenitores neuronais, na fase neurogênica, há um incremento na duração de G1, embora de nenhuma outra fase do ciclo celular, e também um aumento na fração de células que deixa G1 (fração Q, revisto por Caviness-Jr *et al.*, 2009; Mitsuhashi e Takahashi, 2009).

Demonstrou-se que o neocórtex humano, adulto contém uma quantidade considerável de células tronco neurais (Sanai *et al.*, 2004). A produção de neurônios e astrócitos *in vitro*, a partir de células isoladas do sistema nervoso de animal adulto, havia sido demonstrada, após cultivo em suspensão de neuroesferas clonais (Reynolds e Weiss, 1992). Glioblastomas e astrocitomas anaplásticos são tumores malignos do adulto, de localização cerebral, cuja origem se associa a células semelhantes às células tronco neurais. Amostras de tais tipos tumorais, obtidas de ressecção cirúrgica, podem ser cultivadas *in vitro* como neuroesferas, permitindo ensaio de drogas que interfiram em sua proliferação e crescimento (Galli *et al.*, 2004). Este sistema pode ser promissor ao estudo de SEGA e seus mecanismos patogénéticos, uma vez que a natureza pouco diferenciada de suas células foi demonstrada (Huttenlocher e Wollmann,

1991; Scheithauer e Reagan, 1999) e um pequeno percentual de pacientes com TSC precisam ter esse tumor removido cirurgicamente (Nabbout *et al.*, 1999). O rato Eker, com mutação natural em *Tsc2* e os camundongos nocautes, heterozigotos (*Tsc1*^{+/-} ou *Tsc2*^{+/-}) desenvolvem SEGAs, de forma muito semelhante a humanos (Uhlmann *et al.* 2002; Ess *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2004). Assim, SEGAs desenvolvidos por esses modelos animais são também apropriados ao ensaio de neuroesfera, podendo trazer informações sobre a patogênese e evolução de SEN e SEGA.

Neste trabalho, caracterizamos a distribuição de hamartina e tuberina em células de neuroesferas obtidas da dissociação da vesícula telencefálica de rato em E14. Apesar da disponibilidade comercial de alguns anticorpos dirigidos às proteínas hamartina e tuberina, há geral dificuldade à obtenção de resultados, de forma reprodutível, em experimentos de imunocoloração para essas proteínas. Acredita-se que o complexo hamartina-tuberina seja solúvel e distribui-se ao citosol (Plank *et al.*, 1998; Nellist *et al.*, 1999). Os anticorpos testados neste estudo incluíram os anticorpos anti-hamartina HF6 e 1B2 (Murthy *et al.*, 2000) e EP318Y (Abcam) e os anticorpos anti-tuberina IA22 (Sigma), C20 (Santa Cruz), D93F12 (Cell Signaling) e EB4 (Abcam, dados não mostrados). Dados anteriores do grupo afirmaram a melhor qualidade da imunomarcagem neuronal com o anticorpo anti-hamartina 1B2 em experimentos com fluorescência (Haddad *et al.*, 2002). O anticorpo policlonal, gerado em coelho, HF6, produzido pelo mesmo grupo e para o mesmo antígeno (aminoácidos 480 a 666 da hamartina), apresenta-se bom em imunohistoquímica mas não tão satisfatório com fluorescência. HF6 é um bom anticorpo para blots, enquanto 1B2 é muito adequado à imunoprecipitação (Murthy *et al.*, 2000, 2001). Todas essas variações limitam a análise e a confirmação da especificidade dos dados. Não foi possível, por exemplo, utilizar dois anticorpos, gerados em espécies diferentes, mas dirigidos à mesma proteína, para verificar-se semelhanças e diferenças entre as marcações. Utilizando o anticorpo IA22, dirigido à porção N-terminal da tuberina e o anticorpo

anti-hamartina 1B2, observamos a distribuição dessas proteínas em células de neuroesferas e a comparamos com dados obtidos em outras preparações da mesma espécie, rato, mas em tipos celulares diferentes (Murthy *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2002).

Com o anticorpo anti-tuberina IA22, a imunomarcação nuclear foi claramente observada em células sincronizadas na fase G1, como já relatado para tipos celulares como HeLa e HEK-293 (Rosner *et al.*, 2004). Sua distribuição citoplasmática, difusa, observada em células proliferativas e não sincronizadas, é semelhante à detectada em células renais e neurônios corticais de rato, em cultura (Murthy *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2002). Hamartina tem sido relatada por sua expressão em níveis mais baixos do que a tuberina e distribuição subcelular mais restrita e polarizada (Murthy *et al.*, 2000, Haddad *et al.*, 2002). Da mesma forma, observamos hamartina concentrada na borda livre de células da periferia das esferas, em fases proliferativas ou aleatórias (não sincronizadas). Essa distribuição é semelhante à das proteínas ERM (ezrina, radixin e moesina), que interagem com hamartina e se associam fortemente com microfilamentos de actina (Lamb *et al.*, 2000). Embora não examinada, a marcação dupla para hamartina e as ERM deverá ser informativa. A localização de hamartina no núcleo celular, em células sincronizadas em G1, foi detectada, embora de maneira muito menos exuberante do que para a tuberina. Esta larga abrangência de distribuição citoplasmática da tuberina em relação à hamartina infere que, embora a interação entre as duas proteínas seja necessária para atuação de cada uma, elas devam ter funções independentes. No entanto, aquelas funções em que elas participam como heterodímeros devem ser essenciais para sua atuação supressora de tumor. O efeito GAP de tuberina sobre rheb é a atividade mais reconhecida para esse complexo molecular no citoplasma (Garami *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003) em que hamarina pode agir como chaperona de tuberina (Nellist *et al.*, 1999, 2001).

Por outro lado, à diferenciação neuronal, hamartina e tuberina mantiveram aparentemente níveis de expressão e padrão de distribuição muito semelhantes. Uma possibilidade alternativa seria que, em precursores neurogliais, tuberina exerceria uma função mais relevante ao controle do ciclo celular, cuja deficiência ocasionaria índices proliferativos mais altos, descontrole do crescimento celular, e surgimento de SENs e SEGAs. Na população de pacientes TSC com mutações germinativas identificadas, observou-se que pacientes com mutações em *TSC2* têm pelo menos um SEN com frequência significativamente mais alta do que aqueles com mutações em *TSC1*. Quando presente o SEN, pacientes com mutações em *TSC2* têm maior número desses nódulos do que aqueles com mutações em *TSC1*. Nenhuma diferença significativa foi observada para a ocorrência de SEGAs em pacientes com mutações em um ou outro gene (Dabora *et al.*, 2001; Au *et al.*, 2007).

Em nossos ensaios de sincronização do ciclo celular, achamos que seria fundamental usar um corante de DNA para a identificação nuclear. Diante da disponibilidade de um LASER que identifique o DAPI (LSM510, Instituto do Coração, USP), ele foi escolhido para nossas análises ao invés de outros corantes, como o iodeto de propídeo, também por permitir a marcação dupla ou tripla das células, empregando LASER para excitação de fluoróforos como os utilizados, Alexa Flúor 488, Alexa Flúor 568 e Alexa Flúor 647. No entanto, a falha técnica do LASER não permitiu tal análise, limitando-nos inicialmente a identificar o núcleo celular em imagens negativas deste. Outro obstáculo no trabalho foi análise ao citômetro GUAVA (Millipore), cujo processamento não foi adequadamente conduzido, inviabilizando a distribuição correta dos picos de fluorescência. Por outro lado, a análise do marcador p27/p27^{KIP1} de fase G1 (marcação nuclear) permitiu-nos afirmar a sincronização em G1 adequada pelo carenciamento das células, bem como definir a marcação nuclear para comparações com a tuberina.

O principal fato que determina se os precursores neurogliais continuam se proliferando ou se diferenciam em neurônios é o tempo de progressão do ciclo celular, determinado principalmente pelo período G1 (Caviness-Jr *et al.*, 2009; Mitsuhashi e Takahashi, 2009). Uma das proteínas que pode regular negativamente o ciclo celular é p27/p27^{KIP1}. Na neurogênese, essa proteína encontra-se em baixas concentrações nas primeiras etapas embrionárias, porque neste período as células têm, em geral, uma fase G1 curta e, portanto, um ciclo celular rápido, com maior produção de novos precursores neurogliais de divisões simétricas (Delalle *et al.*, 1999; Tarui 2005). Quando existe uma desregulação na progressão do ciclo celular, encontram-se problemas na correta formação do neocortex (Bystron *et al.*, 2008). Segundo Soucek *et al.* (1997), o complexo hamartina-tuberina pode regular negativamente a progressão do ciclo celular deixando-as em um estado quiescente G0/G1 ao antagonizar mTOR ou por ter a capacidade de interagir diretamente no núcleo com p27/p27^{KIP1} impedindo a degradação ou ubiquitinação desta última.

Tuberina é capaz de transitar entre o citoplasma celular (onde interage com a hamartina) e o núcleo celular quando há fosforilação de sua porção carboxi-terminal (resíduos 1351 e 1807, Lou *et al.*, 2006; York *et al.*, 2009). Essa redistribuição na fase tardia de G1 do ciclo celular, demonstrada em nossos dados, já foi evidenciada em linhagem celular de músculo liso de traqueia (Clements *et al.*, 2007) e outras (Rosner *et al.*, 2004). A atividade e função da tuberina, regulada pela sua localização subcelular, sugere que, durante proliferação dos precursores neurogliais, ela controle positivamente a função de p27/p27^{KIP1} no núcleo celular, permitindo que essa CKI iniba a formação de ciclina E-CDK2, não progredindo à fase S. Em células quiescentes ou pós-mitóticas, sua distribuição citoplasmática, com possível ação inibidora de mTOR, deve controlar a síntese proteica e o crescimento celular. Nossos resultados corroboram os dados do trânsito celular de tuberina, regulado em relação ao ciclo celular, confirmando que o sistema de cultivo de células de vesícula telencefálica é apropriado

à análise das proteínas hamartina e tuberina. Buscando validar mais extensivamente este sistema *in vitro*, é desejável que seja feita uma análise de marcadores da via de mTOR, como os alvos de sua fosforilação, as proteínas S6K e 4EBP, em suas formas fosforiladas ou não.

Nos ensaios de proliferação celular, foram padronizadas condições para a marcação com CFSE, com definição de um intervalo de tempo para análises posteriores do ciclo das células de neuroesferas; e para identificação de células proliferativas pelo ensaio de incorporação de BrdU no DNA em neuroesferas. Neste, não observamos um aumento significativo de proliferação celular ou marcação com anticorpo anti-BrdU, no intervalo de 72 a 96 horas, sugerindo que as janelas de observação temporal de 24 a 48 horas e 48 horas a 72 horas sejam possivelmente mais adequadas, quando se busca por uma fase de aumento numérico significativo de células proliferativas. Outro fator relacionado pode ser a concentração de BrdU em cultura e a frequência de sua administração ao meio. Dada a toxicidade desse nucleotídeo modificado, os resultados apresentados só foram possíveis após uma redução de 10 μ M a 50 nM de BrdU. É possível que, nessas baixas concentrações, a administração deva ser repetida a cada 24 horas, embora a administração única tenha sido satisfatória para detecção do nucleotídeo por imunofluorescência.

Na análise de marcação por BrdU, levando-se em consideração a área e a aproximação do número de células por esfera, os percentuais de células marcadas por esfera, apesar se não terem sofrido um tratamento estatístico, foram aparentemente semelhantes (10,32% e 15,6%, respectivamente). Por outro lado, poderíamos supor certo aumento percentual na marcação por BrdU significaria um incremento no índice proliferativo, indicando que as células, nas condições testadas, continuam incorporando BrdU do meio. Por outro lado, nossas estimativas não levaram em conta que, no interior de esferas grandes, as células estejam mais restritas e, com isso, ocupem uma área menor. As células deverão ser reanalisadas após a correção do erro do

LASER (LSM510), tendo-se o número de células marcadas por DAPI como o denominador para o cálculo do índice proliferativo.

O aumento significativo na marcação de hamartina, entre os grupos 72h e 96h, poderia refletir o tamanho mais homogêneo das esferas do grupo 96h. No entanto, observamos que, nas esferas grandes do grupo 96h, havia marcação para hamartina (Tabela 4).

Nossos dados mostram que as células cultivadas como neuroesferas em suspensão, a partir da dissociação da vesícula telencefálica de rato em E14, apresentam características de expressão e distribuição subcelular de hamartina e tuberina muito semelhantes a outros sistemas avaliados. Em particular, esse sistema deve ser mais profundamente analisado para favorecer análises de células com a mesma origem que essas, mas com modificações genéticas para *Tsc1* ou *Tsc2*, favorecendo o melhor entendimento da patologia de SENS e SEGAs.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altermatt HJ, Scheithauer BW (1992) Cytomorphology of subependymal giant cell astrocytoma. *Acta Cytol* 36: 171-5
- Arai Y, Ackerley CA, Becker LE. (1999) Loss of the TSC2 product tuberlin in subependymal giant-cell tumors. *Acta Neuropathologica* 98: 233-9.
- Astrinidis A, Senapedis W, Coleman TR, Henske EP (2003) Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem* 278: 51372-9
- Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, Wheless JW, Baumgartner JE, Roa BB, Wilson CM, Smith-Knuppel TK, Cheung MYC, Whittemore VH, King TM, Northrup H. (2007) Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genet Med* 9: 88–100
- Baron Y, Barkovich AJ (1999) MR imaging of tuberous sclerosis in neonates and young infants. *AJNR Am J Neuroradiol* 20: 907-16
- Berhouma M. (2010) Management of subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex: the neurosurgeon's perspective. *World J Pediatr* 6: 103-10
- Boer K, Jansen F, Nellist M, Redeker S, van den Ouweland AM, Spliet WG, van Nieuwenhuizen O, Troost D, Crino PB, Aronica E. (2008) Inflammatory processes in cortical tubers and subependymal giant cell tumors of tuberous sclerosis complex. *Epilepsy Res* 78: 7-21.
- Buccoliero AM, Franchi A, Castiglione F, Gheri CF, Mussa F, Giordano F, Genitori L, Taddei GL (2009) Subependymal giant cell astrocytoma (SEGA): Is it an astrocytoma? Morphological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Neuropathology* 29: 25-30
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9: 110-22
- Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB (2005) Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25: 6533-8
- Calegari F, Huttner WB (2003) An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116: 4947-55
- Caviness VS, Jr. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 256: 293-302
- Caviness VS, Jr., Takahashi T, Nowakowski RS (1999) The G1 restriction point as critical regulator of neocortical neuronogenesis. *Neurochem Res* 24: 497-506
- Caviness–Jr VS, Nowakowski RS, Bhide PG. (2009) Neocortical neurogenesis: morphogenetic gradients and beyond. *Trends Neurosci* 32: 443-50.
- Chan JA, Zhang H, Roberts PS, Jozwiak S, Wieslawa G, Lewin-Kowalik J, Kotulska K, Kwiatkowski DJ (2004) Pathogenesis of tuberous sclerosis subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 1236-42

- Chiron C, Dumas C, Jambaqué I, Mumford J, Dulac O. (1997) Randomized trial comparing vigabatrin and hydrocortisone in infantile spasms due to tuberoussclerosis. *Epilepsy Res* 26: 389-95.
- Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL (2006) TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 281: 8313-6
- Chu-Shore CJ, Thiele E. (2010) The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Epilepsia* 51: 1236-41.
- Clements D, Mayer RJ, Johnson SR. (2007) Subcellular distribution of TSC2 gene product tuberlin in human airway smooth muscle cells is driven by multiple localization signals and is cell-cycle dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L258-66.
- Cook JA, Oliver K, Mueller RF, Sampson J (1996) A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 33: 480-4
- Crino PB, Aronica E, Baltuch G, Nathanson KL. (2010) Biallelic TSC gene inactivation in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 74: 1716-1723.
- Crino PB, Nathanson KL, Henske EP (2006) The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* 355: 1345-56
- Crino PB, Trojanowski JQ, Dichter MA, Eberwine J (1996) Embryonic neuronal markers in tuberous sclerosis: single-cell molecular pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14152-7
- Curatolo P (2003) The International Child Neurology Association: personal view. *J Child Neurol* 18: 786-94
- Curatolo P, Seri S, Verdecchia M, Bombardieri R. (2001) Infantile spasms in tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 23: 502-7.
- Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, Choy YS, Reeve MP, Thiele E, Egelhoff JC, Kasprzyk-Obara J, Domanska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ. (2001) Mutational Analysis in a Cohort of 224 Tuberous Sclerosis Patients Indicates Increased Severity of *TSC2*, Compared with *TSC1*, Disease in Multiple Organs. *Am J Hum Genet* 68: 64-80.
- Delalle I, Takahashi T, Nowakowski RS, Tsai LH, Caviness VS, Jr. (1999) Cyclin E-p27 opposition and regulation of the G1 phase of the cell cycle in the murine neocortical PVE: a quantitative analysis of mRNA in situ hybridization. *Cereb Cortex* 9: 824-32
- DiMario FJ Jr. (2004) Brain abnormalities in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 19: 650-7.
- Ess KC, Kamp CA, Tu BP, Gutmann DH. (2005) Developmental origin of subependymal giant cell astrocytoma in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 64: 1446-9.
- Ess KC, Uhlmann EJ, Li W, Li H, Declue JE, Crino PB, Gutmann DH (2004) Expression profiling in tuberous sclerosis complex (TSC) knockout mouse astrocytes to characterize human TSC brain pathology. *Glia* 46: 28-40
- Franz DN, de Vries PJ, Crino PB (2009) Giant cell astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Arch Dis Child* 94: 75-6
- Gali-Muhtasib H, Bakkar N (2002) Modulating cell cycle: current applications and prospects for future drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 2: 309-36

- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. **(2004)**. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011–21.
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D **(2002)** Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 699-704
- Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, et al. **(2003)** Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP1 signaling is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 11:1457-66.
- Goh S, Butler W, Thiele EA **(2004)** Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 63: 1457-61
- Gomez M, Sampson J, Holtes-Whittemore V. **(1999)** Tuberous Sclerosis Complex. 3rd ed: Oxford University Press.
- Gomez MR. **(1988)** Varieties of expression of tuberous sclerosis. *Neurofibromatosis* 1: 330-338.
- Goodman M, Lamm SH, Engel A, Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. **(1997)** Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 12: 85-90.
- Gutmann DH, Zhang Y, Hasbani MJ, Goldberg MP, Plank TL, Petri Henske E **(2000)** Expression of the tuberous sclerosis complex gene products, hamartin and tuberin, in central nervous system tissues. *Acta Neuropathol* 99: 223-30
- Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V **(2002)** The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem* 277: 44180-6
- Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, de Barros Lopes M, Reed SI **(1989)** A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6255-9
- Han S, Santos TM, Puga A, Roy J, Thiele EA, McCollin M, Stemmer-Rachamimov A, Ramesh V. **(2004)** Phosphorylation of tuberin as a novel mechanism for somatic inactivation of the tuberous sclerosis complex proteins in brain lesions. *Cancer Res* 64: 812-6.
- Hancock E, Osborne J. **(1998)** Treatment of infantile spasms with high-dose oral prednisolone. *Dev Med Child Neurol* 40: 500.
- Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Yao T, Suda K, Seyama K. **(2010)** Loss of heterozygosity on tuberous sclerosis complex genes in multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia. *Mod Pathol* 23: 1251-60.
- Henske EP **(2005)** Tuberous sclerosis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond. *Pediatr Nephrol* 20: 854-7
- Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Welsh CT, Kwiatkowski DJ **(1996)** Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet* 59: 400-6
- Holmes GL, Stafstrom CE; Tuberous Sclerosis Study Group. **(2007)** Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges. *Epilepsia* 48: 617-30.
- Humphrey A, Williams J, Pinto E, Bolton PF. **(2004)** A prospective longitudinal study of early cognitive development in tuberous sclerosis - a clinic based study. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13: 159-65.
- Hunt A e Lindebaum RH **(1984)** Tuberous sclerosis: a new estimation of prevalence within the Oxford region. *J Med Genet* 27:2-7.

- Hunt T (1989) Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* 1: 268-74
- Huttenlocher PR, Wollmann RL (1991) Cellular neuropathology of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 615: 140-8
- Inoue Y, Nemoto Y, Murata R, Tashiro T, Shakudo M, Kohno K, Matsuoka O, Mochizuki K (1998) CT and MR imaging of cerebral tuberous sclerosis. *Brain Dev* 20: 209-21
- Jaworski J e Sheng M. (2006) The growing roles of mTOR in synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 34: 205-10
- Johnson MW, Kerfoot C, Bushnell T, Li M, Vinters HV (2001) Hamartin and tuberin expression in human tissues. *Mod Pathol* 14: 202-10
- Joinson C, O'Callaghan FJ, Osborne JP, Martyn C, Harris T, Bolton PF. (2003) Learning disability and epilepsy in an epidemiological sample of individuals with tuberoussclerosis complex. *Psychol Med* 33: 335-44.
- Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszczyk SA, Krawczak M, Sampson JR, Cheadle JP (1997) Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6: 2155-61
- Jozwiak J, Kotulska K, Grajkowska W, Jozwiak S, Zalewski W, Oldak M, Lojek M, Rainko K, Maksym R, Lazarczyk M, Skopinski P, Wlodarski P (2007) Upregulation of the WNT pathway in tuberous sclerosis-associated subependymal giant cell astrocytomas. *Brain Dev* 29: 273-80
- Jozwiak S, Kwiatkowski D, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Lewin-Kowalik J, Grajkowska W, Roszkowski M (2004) Tuberlin and hamartin expression is reduced in the majority of subependymal giant cell astrocytomas in tuberous sclerosis complex consistent with a two-hit model of pathogenesis. *J Child Neurol* 19: 102-6
- Jozwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Bielicka-Cymerman J (2000) Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients. *J Child Neurol* 15: 652-9
- Kaper F, Dornhoefer N, Giaccia AJ (2006) Mutations in the PI3K/PTEN/TSC2 pathway contribute to mammalian target of rapamycin activity and increased translation under hypoxic conditions. *Cancer Res* 66: 1561-9
- Kennelly MJ, Grossman HB, Cho KJ. (1994) Outcome analysis of 42 cases of renal angiomyolipoma. *The J Urol* 152: 1988-91.
- Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-3
- Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, Hall A (2000) The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol* 2: 281-7
- Laplane M e Sabatini D. (2009) mTOR signaling at a glance. *Cell* 122: 3589-94
- Lee A, Maldonado M, Baybis M, Walsh CA, Scheithauer B, Yeung R, Parent J, Weiner HL, Crino PB (2003) Markers of cellular proliferation are expressed in cortical tubers. *Ann Neurol* 53: 668-73

- Li S, Takeuchi F, Wang J-A, Fan Q, Komurasaki T, Billings EM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Darling TN. **(2008)** Mesenchymal-epithelial interactions involving epiregulin in tuberous sclerosis complex hamartomas. *Proc Natl Acad Sci* 105: 3539-3544.
- Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, Ning T, Basang Z, Zhang C, Ke Y **(2004)** Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *J Biol Chem* 279: 35664-70
- Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR **(1997)** The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6: 1991-6
- Manning BD, Cantley LC. **(2003)** Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 28: 573-6.
- Maruyama H, Seyama K, Sobajima J, Kitamura K, Sobajima T, Fukuda T, Hamada K, Tsutsumi M, Hino O, Konishi Y. **(2001)** Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia and lymphangiioleiomyomatosis in tuberous sclerosis with a TSC2 gene. *Mod Pathol* 14: 609-14.
- Mennel S, Meyer CH, Peter S, Schmidt JC, Kroll P **(2007)** Current treatment modalities for exudative retinal hamartomas secondary to tuberous sclerosis: review of the literature. *Acta Ophthalmol Scand* 85: 127-32
- Miloloza A, Rosner M, Nellist M, Halley D, Bernaschek G, Hengstschlager M **(2000)** The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. *Hum Mol Genet* 9: 1721-7
- Mitshuhashi T e Takahashi T. **(2009)** Genetic regulation of proliferation/differentiation characteristics of neural progenitor cells in developing neocortex. *Brain & Develop* 31: 553-7.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M **(2004)** Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131: 3133-45.
- Mizuguchi M, Takashima S **(2001)** Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev* 23: 508-15
- Muir TE, Leslie KO, Popper H, Kitaichi M, Gagné E, Emelin JK, Vinters HV, Colby TV. **(1998)** Micronodular pneumocyte hyperplasia. *Am J Surg Pathol* 22: 465-72.
- Murray A, Hunt T. **(1993)** The cell cycle: An Introduction. OXFORD UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, NY.
- Murthy V, Atemmer-Rachamimov AO, Haddad LA, Roy J, Cutone A, Beauchamp RL, Smith N, Louis D, Ramesh V **(2001)** Developmental expression of the tuberous sclerosis proteins tuberin and hamartin. *Acta Neuropathol (Berlin)* 101: 202-10.
- Murthy V, Haddad LA, Smith N, Pinney D, Tyszkowski R, Brown D, Ramesh V **(2000)** Similarities and differences in the subcellular localization of hamartin and tuberin in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F737-46
- Nabbout R, Santos M, Rolland Y, Delalande O, Dulac O, Chiron C **(1999)** Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in children with tuberous sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 370-5
- Nellist M, Van Slegtenhorst MJ, Goedbloed MA, van den Ouwenland AMW, Halley DJJ, van der Sluijs P. **(1999)** Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex. Tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. *The J Biol Chem* 274: 35647-52.

- Nellist M, Verhaaf B, Goedbloed MA, Reuser AJJ, van den Ouwenland AMW, Halley DJJ (2001) TSC2 missense mutations inhibit tuberlin phosphorylation and prevent formation of hamartin-tuberlin complex. *Hum Mol Genet* 10: 2889-98.
- Niida Y, Stemmer-Rachamimov AO, Logrip M, Tapon D, Perez R, Kwiatkowski DJ, Sims K, MacCollin M, Louis DN, Ramesh V (2001) Survey of somatic mutations in tuberous sclerosis complex (TSC) hamartomas suggests different genetic mechanisms for pathogenesis of TSC lesions. *Am J Hum Genet* 69: 493-503
- Northrup H, Wheless JW, Bertin TK, Lewis RA. (1993) Variability of expression in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 30: 41-3.
- Nyboer JH, Robertson DM, Gomez MR. (1976) Retinal lesions in tuberous sclerosis. *Arch Ophthalmol* 94: 1277-80.
- O'Callaghan FJ, Noakes MJ, Martyn CN, Osborne JP (2004) An epidemiological study of renal pathology in tuberous sclerosis complex. *Br J Urol Int* 94: 853-7
- Orlova KA, Crino PB. (2010) The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci* 1184: 87-105
- Osborne JP, Fryer A, Webb D. (1991) Epidemiology of Tuberous Sclerosis. *Annals N Y Acad Sci* 615: 125-7.
- Parain D, Penniello MJ, Berquen P, Delangre T, Billard C, Murphy JV. (2001) Vagal nerve stimulation in tuberous sclerosis complex patients. *Pediatr Neurol* 25: 213-6.
- Plank TL, Yeung RS, Henske EP (1998) Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberlin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 58: 4766-70
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8: 9-22
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66
- Prather P, de Vries PJ (2004) Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 19: 666-74
- Raju GP, Urion DK, Sahin M (2007) Neonatal subependymal giant cell astrocytoma: new case and review of literature. *Pediatr Neurol* 36: 128-31
- Reynolds BA e Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells from the adult mammalian central nervous system. *Science* 1707-10.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The J Neurosci* 12: 4565-4574.
- Ribaupierre S, Dorfmueller G, Bulteau C, Fohlen M, Pinard JM, Chiron C, Delalande O (2007) Subependymal giant-cell astrocytomas in pediatric tuberous sclerosis disease: when should we operate? *Neurosurgery* 60: 83-89; discussion 89-90
- Roach ES e Sparagana SP (2004) Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 19: 643-9.
- Roach ES, DiMario FJ, Kandt RS, Northrup H (1999) Tuberous Sclerosis Consensus Conference: recommendations for diagnostic evaluation. National Tuberous Sclerosis Association. *J Child Neurol* 14: 401-7

- Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschlager M **(2009)** Skp2 inversely correlates with p27 and tuberlin in transformed cells. *Amino Acids* 37: 257-62
- Rosner M, Hengstschlager M **(2004)** Tuberlin binds p27 and negatively regulates its interaction with the SCF component Skp2. *J Biol Chem* 279: 48707-15
- Rosner M, Hengstschlager M **(2006)** 14-3-3 proteins are involved in the regulation of mammalian cell proliferation. *Amino Acids* 30: 105-9
- Ryu JH, Moss J, Beck GJ, Lee JC, Brown KK, Chapman JT, Finlay GA, Olson EJ, Ruoss SJ, Maurer JR, Raffin TA, Peavy HH, McCarthy K, Taveira-Dasilva A, McCormack FX, Avila NA, Decastro RM, Jacobs SS, Stylianou M, Fanburg BL **(2006)** The NHLBI lymphangioleiomyomatosis registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 105-11
- Salomoni P e Calegari F. **(2010)** Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol* 20: 223-33.
- Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC **(1997)** Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 61: 843-51
- Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JBP, Mann L, Connor JM. **(1989)** Genetic aspects of tuberous sclerosis in the west of Scotland. *J Med Genet* 26: 28-81.
- Sanai N, Tramontin, AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott M.W., Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J. **(2004)**. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427: 740–4.
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA **(2003)** Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 5: 566-71
- Savary E, Sabourin JC, Santo J, Hugnot JP, Chabbert C, Van De Water T, et al. **(2008)** Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential. *Mech Dev.* 125(8):674-86.
- Scheithauer BW e Reagan TJ. **(1999)** Neuropathology. In: Gómez MR e Whitemore VH. 3a Ed. Tuberous Sclerosis Complex. New York: Oxford University Press, 1999, pp101-44.
- Sepp T, Yates JR, Green AJ **(1996)** Loss of heterozygosity in tuberous sclerosis hamartomas. *J Med Genet* 33: 962-4
- Sharma MC, Ralte AM, Gaekwad S, Santosh V, Shankar SK, Sarkar C **(2004)** Subependymal giant cell astrocytoma--a clinicopathological study of 23 cases with special emphasis on histogenesis. *Pathol Oncol Res* 10: 219-24
- Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR **(1995)** MR findings in tuberous sclerosis complex and correlation with seizure development and mental impairment. *AJNR Am J Neuroradiol* 16: 149-55
- Shepherd CW, Scheithauer BW, Gomez MR, Altermatt HJ, Katzmann JA **(1991)** Subependymal giant cell astrocytoma: a clinical, pathological, and flow cytometric study. *Neurosurgery* 28: 864-8
- Short JD, Houston KD, Dere R. **(2007)** AMP-activated protein kinase signaling results in cytoplasmic sequestration of p27. *Cancer Res* 68: 6496-06.
- Smalley SL **(1998)** Autism and tuberous sclerosis. *J Autism Dev Disord* 28: 407-14

- Smythe JF, Dyck JD, Smallhorn JF, Freedom RM (1990) Natural history of cardiac rhabdomyoma in infancy and childhood. *Am J Cardiol* 66: 1247-9
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 5: 438-45
- Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, Hengstschlager M (1997) Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. Loss of the tuberous sclerosis gene-2 induces quiescent cells to enter S phase. *J Biol Chem* 272: 29301-8
- Soucek T, Yeung RS, Hengstschlager M (1998) Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15653-8
- Stefansson K (1991) Tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc* 66: 868-72
- Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, Marshall FF. (1993) The natural history of renal angiomyolipoma. *The J Urol* 150: 1782-6.
- Takahashi DK, Dinday MT, Barbaro NM, Baraban SC. (2004) Abnormal cortical cells and astrocytomas in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia* 45: 1525-30.
- Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1999) Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 19: 10357-71
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1995) Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15: 6058-68
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1996) The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis. *J Neurosci* 16: 6183-96
- Tarui T, Takahashi T, Nowakowski RS, Hayes NL, Bhide PG, Caviness VS (2005) Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons. *Cereb Cortex* 15: 1343-55
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. (2003) Tuberous sclerosis gene products, hamartin and tuberlin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating complex toward rheb. *Curr Biol*. 13:1259-68
- The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. (1993) Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75: 1305-15
- Thiele EA (2004) Managing epilepsy in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 19: 680-6
- Torres OA, Roach ES, Delgado MR, Sparagana SP, Sheffield E, Swift D, Bruce D (1998) Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis. *J Child Neurol* 13: 173-7
- Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67-74
- Uhlmann EJ, Apicelli AJ, Baldwin RL, Burke SP, Bajenaru ML, Onda H, Kwiatkowski D, Gutmann DH. (2002) Heterozygosity for the tuberous sclerosis complex (TSC) gene products results in increased astrocyte numbers and decreased p27-Kip1 expression in TSC2+/- cells. *Oncogene* 21: 4050-9.
- van Baal JG, Smits NJ, Keeman JN, Linghout D, Verhoef S. (1994) The evolution of renal angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis. *The J Urol* 152: 35-8.

- van Slegtenhorst M, deHoogst R, Hermans C, et al. (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277: 805-8.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S. (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-66.
- Vogt H: (1908) Zur Diagnostik der tuberösen sclerose. *Z Erforsch Benhandl Jugendl Schwachsinn* 2: 1-16.
- Weiner HL, Ferraris N, LaJoie J, Miles D, Devinsky O. (2004) Epilepsy surgery for children with tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 19: 687-9.
- York B, Lou D, Noonan DJ (2006) Tuberin nuclear localization can be regulated by phosphorylation of its carboxyl terminus. *Mol Cancer Res* 4: 885-97.
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. (2003) Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology* 5: 578-81.
- Zhong W (2008) Timing cell-fate determination during asymmetric cell divisions. *Curr Opin Neurobiol* 18: 472-8
- Zhou J, Shrikhande G, Xu J, McKay RM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF. (2011) Tsc1 mutant neural stem/progenitor cells exhibit migration deficits and give rise to subependymal lesions in the lateral ventricle. *Genes Dev.* 25: 1595-600.
- Zimmer-Galler IE, Robertson DM. (1995) Long-term observation of retinal lesions in tuberous sclerosis. *Am J Ophthalmol* 119: 318-24.

VII. ANEXOS

24. Aprovação pelo Comitê de Ética de Uso de Animais Vertebrados em Experimentação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/014/2009
Ref. 2009.1.615.41.2

São Paulo, 03 de junho de 2009.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 02/06/2009, **APROVOU** o Projeto “Capacidade proliferativa e expressão dos genes do Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC) em precursores neuro-gliais” – **Protocolo 091/2009**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Alexandra Belén Saona Marin).

Atenciosamente.

Profª. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Profª. Dra. LUCIANA AMARAL HADDAD

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>

25. Imagens de neuroesferas cujas áreas foram definidas

Figura 19: Áreas definidas para neuroesferas de nove imagens do grupo 72h. Estas nove imagens (B1-B9) representam onze neuroesferas que foram circeladas manualmente com ferramenta do programa LSM510 (Zeiss) tendo a área sido definida consequentemente pelo programa. A menor esfera encontrada (em B8) tinha dez células, definindo a área celular em $87 \mu\text{m}^2$. As áreas encontram-se na tabela 2 (Anexo). As imagens são de marcação dupla para anti-BrdU (verde) e anti-tubulina (vermelho) e sobreposição de seções z obtidas ao microscópio confocal LSM510 e agrupadas.

Figura 20: Áreas definidas para neuroesferas de nove imagens do grupo 96h. Estas nove imagens (C1-B9) representam dez neuroesferas que foram circuladas manualmente com ferramenta do programa LSM510 (Zeiss) tendo a área sido definida consequentemente pelo programa. As áreas encontram-se na tabela 2 (Anexo). As imagens são de marcação dupla para anti-BrdU (verde) e anti-tuberina (vermelho) e sobreposição de seções z obtidas ao microscópio confocal LSM510 e agrupadas.

26. Tabela de áreas estimadas de cada neuroesfera analisada dos grupos 72h e 96h

Tabela 2: Áreas estimadas de cada neuroesfera analisada dos grupos 72h e 96h

Grupo/imagem*	Área (μm^2)**
B1	31856
B2	35904
B3	78991
B4	23820
B5	35680
B6	134339
B7	18410
B8a	18563
B8b	873 (***)
B9a	5069
B9b	19878
C1	27338
C2	50253
C3	93228
C4	88289
C5	28462
C6	87501
C7	64600
C8a	3176
C8b	8295
C9	5674

*Grupo B (72 horas) e Grupo C(96 horas). Imagens 1 a 9 correspondem às Figuras 19 e 20. (a) e (b) discriminam entre neuroesferas da mesma imagem.

**De acordo com programa Zeiss LSM510.

***Neuroesfera contendo dez células e definindo aproximadamente a área da célula em $87,3 \mu\text{m}^2$.

Tabela 3: Dados numéricos das análises de células proliferativas do grupo 72h

Número de células positivas para BdrU	Número estimado de células para cada esfera	Percentual de células marcadas por esfera	Número de células marcadas para tuberina no grupo de células positivas para BrdU	Número de células marcadas para hamartina no grupo de células positivas para BrdU
30	364	8,20%	9	0
29	411	7%	20	0
0	904	0	0	0
19	272	7%	6	3
19	408	4,70%	10	0
0	1538	0	0	0
71	210	33,80%	21	9
23	222	10,40%	11	6
62	285	21,80%	19	0

Tabela 4: Dados numéricos das análises de células proliferativas do grupo 96h

Número de células positivas para BdrU	Número de células estimado para cada esfera	Percentual de células marcadas por esfera	Número de células marcadas para tuberina no grupo de células positivas para BrdU	Número de células marcadas para hamartina no grupo de células positivas para BrdU
54	313	17,30%	23	18
81	575	14,10%	32	24
136	1067	12,70%	73	74
90	1011	8,9%	14	88
55	326	16,90%	16	32
92	1002	9,20%	22	0
44	739	5,60%	11	11
21	131	16%	12	14
21	64	33%	8	9