Universidade de São Paulo

Deborah Azzi-Nogueira

Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em processos neurodegenerativos

São Paulo

2016

Deborah Azzi-Nogueira

Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em processos neurodegenerativos

Tese em versão simplificada apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências na área de Biologia/Genética.

Orientação

Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

São Paulo

2016

AZZI-NOGUEIRA, DEBORAH

Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em processos neurodegenerativos

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

(1) TSC1, (2) TSC2, (3) Complexo da esclerose tuberosa, (4) Doença de Parkinson, (5)
Dieta hiperlipídica, (6) Neurodegeneração, (7) Expressão gênica

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

2016

Comissão Julgadora

Profa. Dra.

Prof. Dr.

Profa. Dra.

Prof. Dr.

Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

*Para a mamãezinha e
para a margarida.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, por acreditar em mim, me apoiar e me mostrar caminhos. À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad, pela perseverança e orientação.

A CAPES e FAPESP, pelas bolsas durante o período. Aos Instituto de Biociências e Instituto de Ciências Biomédicas e suas equipes, por oferecer a infraestrutura utilizada durante o trabalho. Ao CNPq, CAPES, FAPESP e USP, pelo apoio financeiro e institucional aos laboratórios onde esse trabalho foi realizado. À organização *March of Dimes*, por possibilitar a minha ida ao curso do Jackson Laboratory, em Bar Harbor (EUA).

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Genômica Funcional do IB-USP, especialmente Juliana C. Corrêa, Fernando J. Velloso e Marcelo Valpeteris, pela amizade e ajuda nos experimentos e nos momentos de desespero. Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Neurobiologia do ICB-USP, especialmente Priscila C. Garcia, Cecília Café, Carolina Parga, Marina Sorrentino, Anri Yamaguchi, Kallene Vidal, Katherine Ravelli, Danilo Santos, Lívia Dati, Jáfia Lacerda, Graziella Dago e Ana Ferreira, pela amizade, risadas, comilanças e ajuda no trabalho e na vida. Agradeço também aos estagiários que passaram um tempo comigo, Elton Banks, Adriana Martinez e Malika Malik. Um agradecimento especial à querida Barbarella (Barbara dos Anjos), que me ajudou tanto nos experimentos finais, e ao Adilson da Silva Alves, pelo imenso apoio técnico e infinitas risadas.

Às queridas vizinhas do Laboratório de Comunicação Neuronal e amigas Fernanda Crunfli, Talita Vrechi e Andressa Costa. Um agradecimento especial à

Profa. Dra. Andrea Torrão, por sempre disponibilizar seu laboratório para os experimentos de qPCR e tudo mais que precisei, além de conversas técnicas, científicas e de vida.

À Profa. Dra. Alice Rodrigues e sua aluna Flávia Toledo, pela colaboração com as dietas dos animais, por toda a ajuda com o qPCR e pelas risadas. Ao Prof. Dr. William Festuccia e seus alunos e alunas, pela doação dos animais floxeados e pela ajuda no desenho experimental com os nocautes. Ao Prof. Dr. José Donato e seus alunos e alunas, pela doação dos animais *Cre*, pela ajuda com o sistema *Cre-lox* e pelo apoio técnico para genotipagem. Ao Prof. Dr. Rui Curi, por disponibilizar seu laboratório para experimentos com as dietas e revelações de *Western blotting*. Ao técnico Bob, por todo o apoio no manejo dos animais. Às Profas. Dras. Silvana Chiavegatto e Eliane Hiromi Akamine, por disponibilizarem o equipamento de dosagem de ácidos nucleicos. À Profa. Dra. Angela Morgante e sua equipe técnica (Fátima, Maraísa, Mara, Paulo) pelo apoio desde o início das minhas pipetagens. Ao Prof. Dr. Roberto de Pasquale, pelas conversas com café e conversas com cerveja.

À equipe da Abramundo Educação e Ciências, pela flexibilização para que eu pudesse trabalhar e terminar a tese.

A outros amigos e amigas dessa vida de laboratório: Rafaella Nascimento, Larissa Fontes, Jacaré (Leonardo Cappelli), Lilian Kimura, Ana Carla Batissoco, Pangaré (Rafael Salgueiro), Guga (Luis Gustavo Sousa), Cleyton Sobrinho, Daniel Blanc, Erika Reime, Gabriela Chaves, Rafaella Batalhote, entre outros, pelo apoio e amizade.

Às minhas amadas samambaias, Tróia (Helena Pinto), Vacamila (Camila Jericó Daminello) e Mimimi (Flávia Sant'Anna), e ao meu eu lírico, Pedaco, por

manterem minha louca sanidade em dia. Aos queridos Kiwi (Gustavo Herdeiro), Thais Ogeda, Fofinho (Henrique Prasse) e Sorriso (Murilo Reginato), pela amizade e risadas. À minha mais de centena de amigos mais próximos que a Biologia e o Interbio me deram, por me mostrarem que o mundo é mais, especialmente Robertinha (Roberta Figueiredo), Fefê (Fernando Nodari), Flatú (Flávio Grassi), Marcia Hoshina, Barbara Paes, Gabriela Sobral, Picles (Paula Corsini), Raíssa Rosa, Pico (Marília Gaiarsa), Daniel Caratti, Juliano Sheldon, André Vesper e (Rena) Renata Orofino, entre tantos outros. Um agradecimento especial às amadas amigas do Café com Angústia, Fer (Fernanda Oliveira), Xirra (Carolina Laurini), Fu (Vanessa Pose) e Jaxpion (Renata Novaes), por transformar o peso e o sofrimento da pós em alegria, e me fazer continuar andando.

À minha terapeuta Mariângela Oliveira e ao meu psiquiatra Gabriel Magalhães, por me ajudarem a enfrentar as montanhas dos últimos anos.

Ao meu pai, Francisco, por me ensinar o valor do trabalho e do estudo e ao meu irmão, Daniel, pelas risadas e desenhos. À minha cunhada, Clau Fragelli, pelas conversas, doces e filmes. Ao Roberto, meu cachorro maravilhoso, por tudo que eu nem sei escrever. Aos outros bichos da família: Rafael, Jay, Maria Antonieta, Amora, Isadora, Fubá, Alice, Joana, Laura, Leia e Luke Skywalker, Mauça e Beethoven (*in memorian*). À minha avó, Maria Lúcia (*in memorian*), por me ensinar a amar os livros e a dar risada. À minha irmã, Marina Azzi-Nogueira e minha mãe, Carla Barbosa de Oliveira Azzi, por absolutamente tudo que eu sou; esse trabalho é de vocês.

“Don’t let the dragon drag on.”

Jake, A. T.

AUXÍLIO FINANCEIRO

Para o desenvolvimento deste trabalho a aluna recebeu bolsa de Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e bolsa de Doutorado Direto da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2010/50039-2). O projeto foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPESP e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e no Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP.

RESUMO

AZZI-NOGUEIRA, D. **Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em processos neurogenerativos**. 2016. 125 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2015.

O complexo da esclerose tuberosa (TSC) é uma doença genética que pode afetar órgãos específicos de qualquer sistema do organismo humano. Em geral, as lesões surgem pela inativação bialélica de um dos genes supressores tumorais *Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1)* ou *2 (TSC2)*. Por outro lado, nas regiões corticais e subcorticais do cérebro, as lesões decorrentes de falhas de migração neuronal e sua arborização podem ser explicadas pela haploinsuficiência de *TSC1* ou *TSC2*. As lesões do córtex cerebral apresentam-se comumente com epilepsia refratária, a qual, por sua vez, pode se associar a deficiência intelectual e transtornos do comportamento. Estes quadros clínicos podem estar presentes em pacientes com TSC sem lesão anatômica detectável à ressonância nuclear magnética do crânio.

As proteínas hamartina ou tuberina, conhecidas também como TSC1 e TSC2, são codificadas respectivamente pelos genes *TSC1* e *TSC2*. Elas agem juntas em um complexo molecular citosólico que inativa a pequena GTPase Rheb, a qual tem ação ativadora da cinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), regulando diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, crescimento, migração e metabolismo. Com a hipótese de que a quantidade de TSC1 ou TSC2 no neurônio pode alterar suas funções de forma dependente do estado metabólico, tivemos, neste trabalho, o objetivo geral de caracterizar os padrões de expressão e atividade de TSC1 e TSC2 em dois modelos de neurodegeneração induzida no camundongo

adulto e verificar se a redução de quantidade de TSC1 tem efeito sobre a extensão da lesão de neurônios dopaminérgicos em modelo de hemiparkinsonismo.

No primeiro modelo empregado, cinco estruturas encefálicas de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica mostraram alteração da quantidade de RNAm de *Tsc1* e/ou *Tsc2* ou sinais de estresse oxidativo. A redução de transcritos de *Tsc1* e *Tsc2* no córtex cerebral foi dependente de jejum realizado imediatamente antes da eutanásia. No córtex cingulado, houve evidência de estresse oxidativo. O aumento específico de RNAm foi observado no hipocampo (*Tsc1* e *Tsc2*) e no estriado e hipotálamo (*Tsc1*), embora de forma independente do jejum, sugerindo se tratar de alterações relacionadas à dieta hiperlipídica.

No modelo de hemiparkinsonismo, camundongos adultos submetidos a injeção intracerebral de 6-hidroxidopamina apresentaram redução da quantidade total de proteína S6 no lado encefálico tratado quando comparado ao segmento contralateral ($p = 0,004$, $r = 0,8795$; teste de Pearson, IC: 95%), sem alteração de TSC1 ou TSC2. Em análises de imunoperoxidase do encéfalo, descrevemos, de forma independente da lesão, a expressão de TSC1 no estriado, núcleos entopeduncular e arqueado e de TSC2 no tálamo e hipotálamo.

Com o objetivo de obter um modelo de camundongo sem expressão pós-natal de *Tsc1* em várias regiões encefálicas, de forma independente do tipo celular, realizamos cruzamentos entre uma linhagem de camundongo transgênico em que o gene *Tsc1* contém sequências *lox* nos íntrons 16 e 18 e outra linhagem com *Tsc1* tipo-selvagem (WT) em homozigose e o transgene para expressão da recombinase Cre em fusão ao domínio de ligação ao ligante do receptor de estrógeno humano (ESR1) sob o controle de expressão do promotor de ubiquitina C (*UBC*). Em F1, obtivemos camundongos portadores do transgene *UBC-CreESR1* e heterozigotos

para *Tsc1* (*Tsc1*^{WT/Flox}). Em F2, entre os animais homozigotos *Tsc1*^{Flox/Flox} (N = 153) gerados por retrocruzamento, nenhum era portador do transgene (N_{esperado} = 85; N_{observado} = 0; $X^2 = 348,185$; $p < 0,0001$) É possível que o segmento genômico em que houve inserção do vetor lentiviral que carrega o transgene *UBC-CreESR1* esteja ligado ao loco de *Tsc1* no cromossomo 2 do camundongo, segregando juntos. O tratamento com 4-hidroxitamoxifeno de animais heterozigotos e portadores do transgene aumentou a quantidade de TSC1 no estriado ($p < 0,05$) e o cerebelo não apresentou alteração. É possível que mecanismos transcricionais ou traducionais, funcionais no estriado, tenham favorecido o aumento de TSC1 de forma dependente de 4-hidroxitamoxifeno.

ABSTRACT

AZZI-NOGUEIRA, D. *Tsc1* and *Tsc2* gene products in neurodegenerative processes. 2016. 125 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2015.

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a genetic disorder that can affect any specific organs. In general, lesions are caused by biallelic inactivation of the tumor suppressor genes Tuberous Sclerosis Complex 1 (*TSC1*) or 2 (*TSC2*). On the other hand, in cortical and subcortical brain regions, lesions associated with neuronal migration and arborization failures can be explained by *TSC1* or *TSC2* haploinsufficiency. Brain cortical lesions commonly cause refractory epilepsy, which, in turn, may be associated with intellectual disabilities and behavioral disorders. These medical conditions may be present in TSC patients without detectable anatomic lesion on magnetic resonance images.

TSC1 and *TSC2* genes encode hamartin and tuberin, also known as TSC1 and TSC2, respectively. They act together in a cytosolic molecular complex that inactivates small GTPase Rheb, which is a mammalian target of rapamycin (mTOR) activator, regulating diverse cellular processes such as proliferation, differentiation, growth, migration and metabolism. With the hypothesis that the amount of TSC1 or TSC2 in the neuron can change its function depending on the metabolic state, the overall objective of this study was to characterize TSC1 and TSC2 expression patterns and activity in two mice models of induced neurodegeneration; and check whether TSC1 reduction changes dopaminergic neurons damage extent in a hemiparkinsonins model.

For the first model, five brain structures from mice fed with high fat diet showed alterations in *Tsc1* and/or *Tsc2* mRNA, or oxidative stress signals. Reduction of *Tsc1* and *Tsc2* transcripts in the cerebral cortex was dependent on fasting performed immediately prior to euthanasia. There was evidence of oxidative stress in the cingulate cortex. Increase in mRNA was observed in the hippocampus (*Tsc1* and *Tsc2*) and striatum and hypothalamus (*Tsc1*), although independent of the fasting, suggesting that this effect is related to the high fat diet.

In hemiparkinsonism model, adult mice subjected to intracerebral injection of 6-hydroxydopamine had decreased levels of S6 in the brain treated side compared to the contralateral segment ($p = 0.004$, $r = 0.8795$; Pearson test, CI: 95 %), without alterations in TSC1 nor TSC2. Using immunoperoxidase analysis, we described TSC1 expression in the striatum, entopeduncular and arcuate nuclei, and TSC2 in the thalamus and hypothalamus, independently from the 6-OHDA lesion.

To obtain a mouse model without TSC1 postnatal expression in different brain regions, independently of the cell type, we performed crosses between transgenic mouse strain in which the *Tsc1* gene contains *lox* sequences in introns 16 and 18 and strain with *Tsc1* wild-type (WT) and the transgene for expression of Cre recombinase fused to the binding domain of the human estrogen receptor (ESR1) ligand, controlled by ubiquitin C (*UBC*) promoter expression. In F1, we obtained mice carrying the transgene *UBC-CreESR1* and heterozygous for *Tsc1* (*Tsc1*^{WT/flox}). In F2, among animals homozygous *Tsc1*^{Flox/Flox} (N=153) generated by backcrossing, none was carrying the transgene ($N_{\text{Expected}} = 85$; $N_{\text{observed}} = 0$; $X^2 = 348.185$, $p < 0.0001$) It is possible that the genomic segment containing the lentiviral vector insertion bearing *UBC-CreESR1* transgene is linked to the TSC1 region on mouse chromosome 2, and they segregate together.

Treatment with 4-hydroxytamoxifen in animals heterozygous and positive for the transgene showed increased TSC1 in the striatum ($p < 0.05$), while there was no change in the cerebellum. It is possible that transcriptional or translational functional striatum mechanisms favored TSC1 increasing, in a 4-hydroxytamoxifen-dependent manner.

SUMÁRIO

Auxílio Financeiro.....	IX
Resumo	X
Abstract	XIII
Prefácio.....	XVIII
CAPÍTULO 1. TSC1 e TSC2 – expressão, funções e envolvimento em patologias.....	1
1.1. As proteínas TSC1 e TSC2	2
1.2. Envolvimento de TSC1 e TSC2 em vias celulares.....	3
1.3. Expressão Encefálica de TSC1 e TSC2.....	9
1.4. Dosagem das proteínas TSC1 e TSC2 e aspectos neurológicos.....	15
1.5. Objetivo Geral.....	17
CAPÍTULO 2. Os produtos dos genes <i>Tsc1</i> e <i>Tsc2</i> em encéfalos de animais submetidos a dieta hiperlipídica	18
2.1. Introdução	19
2.2. Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 3. Os produtos dos genes <i>Tsc1</i> e <i>Tsc2</i> em modelo de doença de Parkinson.....	21
3.1. Introdução	22
3.2. Objetivos específicos.....	27
Conclusões	28
Referências.....	29

PREFÁCIO

O complexo da esclerose tuberosa (TSC, *Tuberous Sclerosis Complex*) é uma doença genética de herança autossômica dominante, caracterizada por lesões que afetam comumente o cérebro, os rins, o coração, a retina, a pele e os pulmões (CRINO et al., 2006; HYMAN; WHITTEMORE, 2000). Afeta um a cada 6.000 indivíduos (OSBORNE et al., 1991). As lesões corticais e subcorticais do cérebro apresentadas pelos pacientes com TSC – denominadas tuberosidades corticais e heterotopias neuronais – originam-se no desenvolvimento embrionário e não apresentam crescimento pós-natal, sendo consideradas hamártias. As demais lesões do cérebro e outros órgãos são hamartomas e apresentam características celulares em comum, como a perda do controle sobre o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular.

O TSC ocorre devido a mutações em um de dois genes supressores de tumor, *TSC1* [*Tuberous Sclerosis Complex 1*, cromossomo 9q34.1 humano, (SLEGTENHORST, VAN et al., 1997)] ou *TSC2* [*Tuberous Sclerosis Complex 2*, cromossomo 16p13.3 humano, (EUROPEAN CHROMOSOME 16 TUBEROUS SCLEROSIS CONSORTIUM, 1993)], que codificam, respectivamente, para as proteínas hamartina e tuberina, também conhecidas como TSC1 e TSC2. Estas proteínas interagem entre si, formando um heterodímero (NELLIST et al., 1999; PLANK et al., 1998). Os hamartomas observados em pacientes com TSC apresentam perda funcional de TSC1 ou TSC2, pela inativação bialélica de *TSC1* ou *TSC2*, respectivamente (CRINO et al., 2006).

Estudos em *Drosophila melanogaster* e camundongos recapitularam o descontrole do crescimento, proliferação e diferenciação celular por perda de função

dos genes ortólogos de *TSC1* ou *TSC2* e revelaram que o complexo proteico TSC1-TSC2 inibe mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), um regulador central da síntese proteica (GAO et al., 2002; INOKI et al., 2002; RADIMERSKI et al., 2002) ao reprimir a pequena GTPase Rheb [*Ras-homolog enriched in brain*, (INOKI; LI; et al., 2003; SAUCEDO et al., 2003; TEE et al., 2005; ZHANG et al., 2003)]. A partir desses relatos, o heterodímero TSC1-TSC2 passou a ser mais amplamente pesquisado em áreas como Oncologia (BARNES et al., 2010; BHATIA et al., 2009; HABIB, SAMY L. et al., 2008; HENSKE, 2003; HUANG et al., 2009; JOZWIAK, 2006; KOBAYASHI et al., 1999; LEVINE; PUZIO-KUTER, 2010; MIEULET; LAMB, 2010; POTTER et al., 2003; PRESNEAU et al., 2009; ROSNER et al., 2006; TOKER, 2008; VEELLEN, VAN et al., 2011; WOUTERS; KORITZINSKY, 2008; ZACHAREK et al., 2005; ZONCU et al., 2011), Metabolismo (GAO et al., 2002; HAISSAGUERRE et al., 2014; INOKI et al., 2006; INOKI; ZHU; et al., 2003; JEWELL et al., 2013; LEE, C. et al., 2007; MIEULET; LAMB, 2010; SLEGTENHORST, VAN et al., 2004; TOMASONI; MONDINO, 2011; WU; ZHOU, 2007) e Imunologia (BYLES et al., 2013; O'BRIEN et al., 2011; PRABOWO et al., 2013).

No presente trabalho, avaliamos os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em dois modelos animais relacionados à neurodegeneração. A tese está apresentada em três capítulos. O primeiro introduz as proteínas TSC1 e TSC2 e suas funções celulares. O segundo capítulo versa sobre a expressão dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em animais submetidos a dieta hiperlipídica, e o terceiro trata da expressão das proteínas de interesse em modelo animal de hemiparkinsonismo.

CAPÍTULO 1. TSC1 E TSC2 – EXPRESSÃO, FUNÇÕES E
ENVOLVIMENTO EM PATOLOGIAS

CAPÍTULO 1. TSC1 e TSC2 – Expressão, funções e envolvimento em patologias

1.1. AS PROTEÍNAS TSC1 E TSC2

Hamartina (TSC1) e tuberina (TSC2) são proteínas citosólicas codificadas pelos genes *TSC1* (cromossomo 9q34 humano; gene ortólogo *Tsc1* no cromossomo 2 de camundongo) e *TSC2* (cromossomo 16p13.3 humano; gene ortólogo *Tsc2* no cromossomo 16 de camundongo), respectivamente (EUROPEAN CHROMOSOME 16 TUBEROUS SCLEROSIS CONSORTIUM, 1993; SLEGTENHORST, VAN et al., 1997).

TSC1 e TSC2 formam um complexo heterodimérico citosólico, o qual controla diversas funções celulares (PLANK et al., 1998). Essas proteínas não são parálogas e apresentam pouca similaridade com outras proteínas. TSC1 possui um domínio de ligação a TSC2 e um domínio *coiled-coil*. TSC2 possui um domínio de ligação a TSC1 e um domínio GAP [*GTPase Activating Protein*, **Figura 1**; (HUANG; MANNING, 2008)]. TSC1 estabiliza TSC2, impedindo a sua degradação por poliubiquitinação (BENVENUTO et al., 2000; CHONG-KOPERA et al., 2006; HODGES et al., 2001; NELLIST et al., 2001).

Figura 1. Domínios funcionais de TSC1 e TSC2, com números representando resíduos de aminoácidos na proteína ortóloga humana. Abreviaturas: **T2BD**: domínio de ligação a TSC2; **T1BD**: domínio de ligação a TSC1; **Coil**: domínio coiled-coil; **GAP**: domínio GAP. Retirado de (HUANG; MANNING, 2008).

Em 2007, Nakashima e colaboradores observaram que a proteína TBC1D7 (*Tre2-Bub2-Cdc16 1 Domain family, member 7*) coimunoprecipita com o complexo TSC, através de uma interação molecular com TSC1 (NAKASHIMA et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que essa proteína, de fato, é um componente estável e ubíquo do complexo TSC, agora denominado complexo TSC-TBC1D7 (DIBBLE et al., 2012; GAI et al., 2016; QIN et al., 2016; SANTIAGO LIMA et al., 2014). Sua ligação ao complexo é independente do estado nutricional da célula, indicando que ela é componente estável do complexo e não apenas um modulador transitório (DIBBLE et al., 2012). Análises recentes indicaram que os aminoácidos 936 a 977 de TSC1 são necessários e suficientes para sua ligação a TBC1D7 em resíduos codificados pelos éxons 4 e 5 do gene que a expressa (SANTIAGO LIMA et al., 2014). Análises de cristalografia indicam que TSC1 forma homodímeros através de ligações entre esses aminoácidos, que fazem parte do domínio *coiled coil*, e é nessa região que ocorre também a ligação com TBC1D7. Essa estrutura molecular, então, contribuiria para a estabilização do complexo TSC como um todo (GAI et al., 2016; QIN et al., 2016). Embora investigado, não se encontraram mutações no gene *TBC1D7* causadoras de TSC (DIBBLE et al., 2012). Sabe-se, no entanto, que mutações neste gene estão associadas com déficits intelectuais e comportamentais e macrocefalia (ALFAIZ et al., 2014; CAPO-CHICHI et al., 2013).

1.2. ENVOLVIMENTO DE TSC1 E TSC2 EM VIAS CELULARES

Hoje, são conhecidas diversas vias de sinalização das quais o complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 participa, convergindo a um ponto central de regulação da síntese proteica na célula (DIBBLE et al., 2012; HUANG; MANNING, 2008). Aqui, serão resumidas as vias que são reguladas por TSC1-TSC2 (*downstream*) e, depois, as vias que são reguladoras desse complexo (*upstream*).

A proteína mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) é uma cinase que participa de dois complexos, 1 e 2, que são funcionalmente distintos, denominados respectivamente mTORC1 e mTORC2 (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Hoje, a função mais bem esclarecida do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 é o controle indireto sobre mTORC1 (*mTOR Complex 1*), o qual é extensivamente reconhecido por seu papel fundamental em processos relacionados à proliferação celular através da progressão do ciclo celular e em processos anabólicos que levam ao crescimento celular, como a biossíntese de macromoléculas e a inibição da autofagia, importantes em condições fisiológicas e em doenças diversas, como obesidade, câncer, diabetes e neurodegeneração [revisto por (LAPLANTE; SABATINI, 2012)].

Entre vários, os componentes mais bem estabelecidos de mTORC1 são as proteínas mTOR, raptor, pras40, deptor, mLST8, tti1/tel2 (LAPLANTE; SABATINI, 2012). A falta de inibição de mTORC1 causa a fosforilação das proteínas-alvo S6K1 e S6K2 (cinases da proteína ribossomal S6; denominadas em conjunto como S6Ks) e 4E-BP1 e 4E-BP2 [ligantes do fator 4E iniciador da tradução em eucariotos, eiF4E; (HAY; SONENBERG, 2004)]. A fosforilação de S6Ks ativa estas cinases, o que leva ao aumento da biogênese de RNAm e à iniciação e elongação traducional. A fosforilação de 4E-BPs configura o fator eiF4E a uma forma pró-traducional. Essas constituem juntas importante mecanismo para ativação global da síntese proteica em eucariotos, mediada por mTORC1 (MA; BLENIS, 2009).

mTORC1 é diretamente ativado pela pequena GTPase Rheb (*Ras-homolog enriched in brain*). TSC2, com sua atividade GAP, promove a hidrólise de GTP a GDP associado a Rheb, inativando-a e, desta forma, inibindo mTORC1 (INOKI; LI; et al., 2003). Isso significa que a atividade do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 mantém a célula em condições quiescentes e de pouco crescimento. Assim como TSC1 (BENVENUTO et al., 2000; CHONG-KOPERA et al., 2006; HODGES et al., 2001; NELLIST et al., 2001),

TBC1D7 é necessário para a regulação de mTORC1 por TSC2 através de Rheb (DIBBLE et al., 2012; GAI et al., 2016; QIN et al., 2016). Por causa da necessidade de Rheb para regulação de mTORC1 por TSC2, o complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 é também denominado Rhebulator. A co-localização de mTOR, Rheb e do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 com marcadores lisossomais indica que a inibição de mTORC1 pelo complexo ocorre no lisossomo e que a fosforilação de TSC2 mediada por AKT causa sua dissociação desta organela. [Figura 2, (DIBBLE et al., 2012; MENON et al., 2014; ZHENG et al., 2014)].

Figura 2. Modelo Rheb-Rhebulator da ativação de mTORC1 por fatores de crescimento. mTOR, Rheb e o complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 estão co-localizados na superfície lisossomal. Estímulos de fatores de crescimento induzem a fosforilação do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7, causando sua dissociação do lisossomo. Essa dissociação impede então a interação entre TSC2 e Rheb, inibindo assim a regulação negativa do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 sobre mTORC1. Retirado de (ZHENG et al., 2014).

O segundo complexo de mTOR, mTORC2 (*mTOR Complex 2*), tem suas funções menos esclarecidas. É composto, entre outras proteínas, por mTOR, rictor, mSin1, protor 1/2, deptor, mLST8 e tti1/tel2 (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Regula o citoesqueleto, o metabolismo e a sobrevivência celulares e responde a sinais de fatores de

crescimento (COTA, 2014; DADA et al., 2008; DAVID, 2011; GONCHAROVA et al., 2011; SACI et al., 2011). Esse complexo controla cinases, como a família AKT de cinases de serina e treonina (AKT), SGK-1 (*Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase 1*) e PKC α (*Protein Kinase C- α*) (GARCÍA-MARTÍNEZ; ALESSI, 2008; OH; JACINTO, 2011; YAN et al., 2008). O complexo TSC1-TSC2 ativa e se associa fisicamente com mTORC2 (HUANG et al., 2008). Sendo um regulador de mTORC1 e mTORC2, TSC1-TSC2 tem grande potencial como fator participante dos processos regulados por ambos os complexos, fisiológicos e patológicos.

TSC1-TSC2-TBC1D7 intersecta vias diversas, integrando diferentes sinais, culminando na regulação da atividade de outras proteínas de acordo com o contexto metabólico da célula, como em alguns exemplos apresentados a seguir e ilustrados na Figura 3 (LIPTON; SAHIN, 2014). A ativação de algumas vias metabólicas, como as de AMPK (cinase proteica ativada por monofosfato de adenosina, AMP), cinase de fosfatidilinositol (PI3K) e AKT, reflete o estado nutricional da célula através da disponibilidade de hormônios e fatores de crescimento como insulina, aminoácidos como leucina e da razão entre as concentrações molares de AMP/ATP (ATP, trifosfato de adenosina). AKT, um dos principais reguladores de TSC2, fosforila-a em dois sítios (Ser939 e Thr1462) e inibe sua ação (INOKI et al., 2002; MANNING et al., 2002). É interessante que a ativação de AKT por mTORC2 não é necessária para a regulação de mTORC1 exercida por TSC2 (GUERTIN et al., 2006). Em condições de privação energética, o aumento dos níveis de AMP em relação aos de ATP ativam AMPK, a qual fosforila TSC2 nos sítios Thr1271 e Ser1387, ativando-a e, desta forma, reprime mTORC1, inibindo o anabolismo celular (INOKI; ZHU; et al., 2003). A fosforilação de TSC2 por AMPK favorece a atividade cinásica de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) também sobre TSC2, de forma regulada por Wnt [*Wingless-Type*, (INOKI et al., 2006)]. De maneira indireta através de AMPK, TSC2 é ativado por ATM (*Ataxia-Telangiectasia*

Mutated) em resposta ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Em decorrência, há aumento de autofagia pela inibição de mTORC1 (ALEXANDER et al., 2010). Por outro lado, de forma independente de AMPK, sob condições de hipóxia, a ação inibitória de TSC2 sobre mTORC1 é dependente de REDD1 (*Regulated in the Development and DNA damage response 1*), a qual recruta proteínas reguladoras 14-3-3, liberando TSC2 para exercer sua atividade repressora sobre Rheb (BRUGAROLAS et al., 2004; DEYOUNG et al., 2008).

Figura 3. Vias que interceptam os complexos TSC1-TSC2-TBC1D7, mTORC1 e mTORC2, integrando sinais nutricionais, de fatores de crescimento, de citocinas e outros para agir sobre diversas respostas celulares cruciais, como autofagia e síntese proteica. Abreviações: **RTKs:** *receptor tyrosine kinases*; **TrkB:** *tyrosine receptor kinase B*; **mGluRs:** *metabotropic glutamate receptors*; **NMDA-R:** *N-methyl-D-aspartate receptor*; **PGC-1α:** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*. Em verde, proteínas codificadas por genes ligados a doenças humanas. Retirado de (LIPTON; SAHIN, 2014).

Assim como TSC2, TSC1 é regulada por diferentes vias (Figura 3). A citocina TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*), por exemplo, inibe TSC1 por sua fosforilação por IKK β (cinase β do inibidor de NF κ B) em Ser487 e Ser511. A via de NF κ B está envolvida em processos inflamatórios incluindo angiogênese (LEE et al., 2008; LEE, D.-F. et al., 2007). Anteriormente, o aumento da expressão de alguns fatores da resposta inflamatória havia sido demonstrado em lesões cerebrais (tuberosidades corticais) de pacientes com TSC (BOER et al., 2010), embora esses componentes e a morte celular nessas lesões estejam diretamente relacionados à epilepsia dos pacientes (IYER et al., 2014). Por outro lado, camundongos com nocaute condicional de *Tsc1* em células que expressam GFAP não apresentam crises convulsivas mas têm, na quarta semana pós-natal, um aumento da expressão de fatores envolvidos em processo inflamatório no cérebro (ZHANG et al., 2015). TSC1 e TSC2 são necessárias para uma resposta completa contra o estresse do retículo endoplasmático, o que sugere papel dessas proteínas na resposta a proteínas mal dobradas e sobrevivência celular (KANG et al., 2011).

A grande maioria dos sinais conhecidos que converge para TSC1-TSC2 resultam na regulação de mTORC1. De forma geral, em situações propícias ao crescimento celular e maior consumo energético, o complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 é inibido. Quando há estresse oxidativo ou carência nutricional, este complexo é ativado e inibe mTORC1, com consequente inibição da síntese proteica global e aumento da autofagia. Dessa forma, níveis de aminoácidos são mantidos para a síntese regulada de proteínas-chave para a sobrevivência da célula, até haver mudança do ambiente e recuperação das condições nutricionais (HUANG; MANNING, 2008, 2009; LAPLANTE; SABATINI, 2012; LIPTON; SAHIN, 2014).

É possível que outros efetores diferentes de mTORC1 sejam controlados por TSC1-TSC2-TBC1D7. Estudos mostraram que complexos CDK-ciclinas fosforilam TSC1 e TSC2. Sabe-se que TSC1-TSC2 mantém células em estado quiescente através da

distribuição de p27 ao núcleo celular em associação física com TSC2 (ROSNER et al., 2004, 2007). Além disso, TSC1 e TSC2 interagem direta e indiretamente com elementos do citoesqueleto (GONCHAROVA et al., 2004; HADDAD et al., 2002; LAMB et al., 2000; LARSON et al., 2010).

1.3. EXPRESSÃO ENCEFÁLICA DE TSC1 E TSC2

Desde a sua identificação e caracterização, a expressão dos genes humanos *TSC1* e *TSC2* e de seus ortólogos *Tsc1* e *Tsc2* em ratos e camundongos foi estudada no sistema nervoso central (SNC) por grupos de pesquisa diversos. Esses estudos variaram quanto ao seu objeto de análise: proteína (hamartina ou tuberina) ou transcritos/RNAm (*TSC1* ou *TSC2* para humanos e *Tsc1* ou *Tsc2* para roedores); e nas técnicas utilizadas: imunocitoquímica e *Western blot* (proteína), hibridização *in situ* e Northern blot (transcritos). A seguir, são apresentados dados para os três organismos e regiões do sistema nervoso, oriundos desses trabalhos e do banco de dados de expressão gênica para camundongo, GXD (“Gene Expression Database (GXD)”, [S.d.]; SMITH et al., 2014). São citados resultados obtidos tanto sobre proteínas como RNAm.

ENCÉFALO TOTAL

Na ocasião da identificação e caracterização dos genes *TSC1* e *TSC2*, transcritos de ambos os genes foram observados em lisados de encéfalo humano adulto (EUROPEAN CHROMOSOME 16 TUBEROUS SCLEROSIS CONSORTIUM, 1993; SLEGTENHORST, VAN et al., 1997). A região analisada, no entanto, não foi especificada. Em 2001, Murthy e colaboradores mostraram a expressão de TSC1 e TSC2 em diversos tecidos derivados de autópsias humanas e de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento (MURTHY et al., 2001). O sistema nervoso central, ao contrário de outras regiões, não apresentou expressão mais baixa de TSC1 e TSC2 em adultos quando

comparados a embriões ou recém-nascidos. Em lisados cerebrais de ratos no décimo nono dia embrionário (E19), primeiro dia pós-natal (P1), P6, P10, P15 e P30 e no adulto, altos níveis de TSC2 foram observados, assim como para TSC1 em E19, P1, P6 e no adulto. Empregando-se outros anticorpos, elevada expressão de TSC2 foi observada em encéfalo humano e de ratos (FUKUDA et al., 1999). Alta expressão foi também observada em lisados do embrião inteiro, em E13, e da cabeça e torso em E16 (MURTHY et al., 2001). Nestes casos, porém, deve-se considerar o resultado como expressão global dessas áreas, não sendo possível distinguir a expressão cerebral. Em ratos, além dos níveis de expressão de TSC1 e TSC2 por *Western blot*, foi também analisada a distribuição celular dessas proteínas por imunistoquímica. O neuroepitélio de embriões em E13 e E16 foi fracamente marcado pelos anticorpos anti-TSC1 e anti-TSC2. Em E19, a expressão foi consideravelmente aumentada com padrões de expressão similares para as duas proteínas. Neste estágio, TSC1 e TSC2 foram encontradas no sistema nervoso periférico e central, estando presente também nos gânglios de nervos cranianos (MURTHY et al., 2001).

TELENCÉFALO

Em 1995 e 1996, Geist e colaboradores observaram, durante o desenvolvimento de ratos, transcritos de *Tsc2* ou a proteína TSC2 no telencéfalo de animais em E11 (RNAm), E13 (RNAm e proteína), E15 (RNAm) e E17 [proteína; (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996)].

Em camundongos adultos, foi demonstrada a expressão de TSC1 e TSC2 em lisados de telencéfalo total (GUTMANN et al., 2000). Menchine e colaboradores observaram, em 1996, transcritos de *TSC2* em neurônios piramidais, células endoteliais e plexo coroide oriundos de tecidos de autópsias humanas em idades diversas

(MENCHINE et al., 1996). Plank e colaboradores observaram TSC1 e TSC2 em neurônios corticais humanos, mas não em astrócitos (PLANK et al., 1999).

Transcritos do gene *Tsc2* são expressos em células mitrais do núcleo olfatório anterior de ratos (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996). Nesta mesma estrutura, foi observada TSC2 com padrão de marcação neuronal (GEIST et al., 1996). Transcritos de *Tsc2* também são expressos em animais adultos, no córtex piriforme, um dos componentes do córtex olfatório primário (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996).

Em humanos, foi observada alta expressão de transcritos e proteína de TSC2 no córtex cerebral adulto (GEIST; GUTMANN, 1995; MIZUGUCHI et al., 1996). Kerfoot e colaboradores (1996) relataram expressão de TSC2 e do transcrito em células piramidais corticais, especialmente naquelas localizadas nas camadas intermediárias da estrutura. Quando substâncias branca e cinzenta corticais foram comparadas, a segunda apresentou níveis significativamente mais elevados de TSC2 (FUKUDA et al., 1999; MIZUGUCHI et al., 1996). A expressão cortical de TSC2 aumentou com a idade dos indivíduos (fetos na décima-terceira e vigésima-segunda semanas gestacionais, no neonato e no adulto de 18 anos) e foi maior do que no cerebelo e medula espinal (MIZUGUCHI et al., 1996). Há relatos de baixa expressão de TSC1 e TSC2 no córtex embrionário humano até o fim da gestação, período no qual seus níveis aumentam (JOHNSON et al., 1999). Em 1997, dois grupos observaram alta expressão de TSC2 em pericários e processos neuronais do córtex cerebral humano e menor expressão em astrócitos do mesmo tecido (MIZUGUCHI et al., 1997; WIENECKE et al., 1997). Células gliais positivas para TSC2 foram também encontradas na substância branca (MIZUGUCHI et al., 1997). TSC1 foi identificado em lisados de lobo frontal humano (JOHNSON et al., 1999). Johnson e colaboradores (1999) observaram também TSC1 e TSC2 em neurônios corticais e células Cajal-Retzius, produtoras de reelina e importantes reguladoras do desenvolvimento

cortical. Foram analisados tecidos humanos desde a vigésima semana gestacional até o oitavo ano pós-natal, mas os autores não especificaram a idade em que ocorreu esse achado.

Já no córtex cerebral de ratos e camundongos, transcritos de *Tsc2* e a proteína TSC2 foram encontrados, porém em menor proporção do que em outras áreas, como o cerebelo (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996). Por imunoistoquímica, foi observado um padrão de marcação neuronal para TSC2, algumas vezes em neurônios piramidais (FUKUDA et al., 1999; GEIST et al., 1996). TSC1 e TSC2 foram também localizadas por imunoistoquímica em córtex cerebral de ratos adultos (MURTHY et al., 2001).

FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

Foi mostrado que, em ratos adultos, as camadas hipocâmpais do corno de Ammon (CA), CA1, CA2, CA3, além do giro denteado, expressam transcritos de *Tsc2* e a proteína TSC2 (KERFOOT et al., 1996). Células granulares da formação hipocâmpal são positivas tanto para TSC1 quanto para TSC2 (MURTHY et al., 2001). No giro cingulado observou-se o transcrito de *Tsc2* (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996). Em humanos, neurônios piramidais e células granulares da formação hipocâmpal são também positivos para TSC1 e TSC2 (JOHNSON et al., 1999).

EMINÊNCIA GANGLIONAR, AMÍDALA E NÚCLEOS BASAIS

Transcritos de *TSC1* e *TSC2* foram observados na eminência ganglionar, amígdala e núcleos basais (“Gene Expression Database (GXD)”, [S.d.]; SMITH et al., 2014).

TSC1 e TSC2 foram detectadas em neurônios da zona de diferenciação dos núcleos basais, em ratos em E19 (MURTHY et al., 2001). Em humanos, foram observadas em áreas profundas dessa estrutura (JOHNSON et al., 1999).

DIENCÉFALO E MESENCÉFALO

Transcritos de TSC1 e TSC2 foram observados no tálamo e no hipotálamo (“Gene Expression Database (GXD)”, [S.d.]; SMITH et al., 2014). TSC1 e TSC2 foram observadas em neurônios talâmicos, por imunistoquímica (JOHNSON et al., 1999).

ROBOENCÉFALO / TRONCO ENCEFÁLICO

Durante o desenvolvimento de ratos, especificamente em E15, transcritos de *Tsc2* são expressos no roboencéfalo, e esta expressão aumenta gradativamente com a formação do cerebelo (GEIST; GUTMANN, 1995). Em cerebelos de fetos humanos, foram encontrados altos níveis de TSC1 e TSC2 (MURTHY et al., 2001).

Em 1996, Mizuguchi e colaboradores mencionaram que os níveis de expressão de TSC2 no cerebelo humano eram baixos, como citado anteriormente (MIZUGUCHI et al., 1996). Em trabalho apresentado no ano seguinte, mostraram imagens com marcação evidente para TSC2 em células de Purkinje (MIZUGUCHI et al., 1997). Outros trabalhos com humanos mostram a expressão cerebelar de TSC2, especificamente na camada molecular, onde se encontram processos neuronais (marcação difusa); em células da camada granular (marcação perinuclear), células em cesta e em células de Purkinje (JOHNSON et al., 1999; KERFOOT et al., 1996; MIZUGUCHI et al., 1997; WIENECKE et al., 1997). Células de Purkinje humanas expressam também TSC1. Neurônios denteados do cerebelo são citados ainda como positivos para TSC1 e TSC2 (JOHNSON et al., 1999).

Por *Western blotting* foi observada, em cerebelo humano adulto, alta expressão tanto de TSC1 quanto de TSC2 (MURTHY et al., 2001).

Em ratos e camundongos, o cerebelo foi a área que apresentou mais alta expressão de transcritos de *Tsc2* e TSC2, especialmente em células de Purkinje (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996). Em células granulares cerebelares foi

identificado somente o transcrito. Núcleos cerebelares foram positivos para TSC1 e TSC2, em ratos no período pós-natal e adultos (MURTHY et al., 2001).

Células de Purkinje de roedores expressam também TSC1 (GEIST; GUTMANN, 1995). No entanto, foram encontradas diferenças na distribuição subcelular de TSC1 e TSC2 no cerebelo adulto. Enquanto TSC2 localizou-se principalmente na área perinuclear de células de Purkinje, TSC1 foi observada também em fibras do estrato molecular, cujas células projetam para as células de Purkinje (AFIFI; BERGMAN, 2008; GEIST; GUTMANN, 1995). TSC1 apresentou co-localização com os marcadores de astrócito GFAP e de neurônio MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*), sugerindo sua expressão em ambos os tipos celulares (GUTMANN et al., 2000).

Durante o desenvolvimento de ratos, há expressão de TSC1 e TSC2 no final da embriogênese (E19) e na primeira semana pós-natal, com acentuada redução após essa fase (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996; MURTHY et al., 2001). No entanto, outros detalhes de estágios de desenvolvimento não são disponíveis. Transcritos de *Tsc2*, TSC1 e TSC2 foram identificados em núcleos do tronco encefálico incluindo, para proteínas, núcleos de nervos craniais como o vestibular e facial (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996; JOHNSON et al., 1999; MURTHY et al., 2001). Em humanos, foram observados neurônios positivos para transcritos e proteínas codificados por *TSC2* (KERFOOT et al., 1996; MENCHINE et al., 1996; MIZUGUCHI et al., 1997).

PLEXO COROIDE, MENINGES E EPÊNDIMA

Foi encontrada expressão de TSC1 e TSC2 no plexo coroide em formação, em ratos em E19 e em animais no período pós-natal e adulto (JOHNSON et al., 1999; MURTHY et al., 2001). Menchine e colaboradores encontraram transcritos de *TSC2* em plexo coroide oriundo de autópsias humanas (MENCHINE et al., 1996).

Foi encontrada expressão de TSC1 e TSC2 na membrana aracnoide, em ratos em E19, no período pós-natal e no adulto (MURTHY et al., 2001). Além disso, expressão de transcritos de *Tsc2*, hamartina e tuberina já foram observados em células endoteliais (GEIST; GUTMANN, 1995; GEIST et al., 1996; JOHNSON et al., 1999; KERFOOT et al., 1996; MENCHINE et al., 1996; MURTHY et al., 2001).

1.4. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS TSC1 E TSC2 E ASPECTOS NEUROLÓGICOS

As lesões do TSC surgem, em geral, pela inativação bialélica de *TSC1* ou *TSC2*. Entretanto, nas regiões corticais e subcorticais do cérebro, as lesões decorrentes de falhas de migração neuronal e sua arborização podem ser explicadas pela haploinsuficiência de *TSC1* ou *TSC2* (GOORDEN et al., 2007; WALTEREIT et al., 2011). Estas apresentam-se comumente com epilepsia refratária (aproximadamente 60% dos casos), a qual, por sua vez, pode se associar a deficiência intelectual (50% do total de casos) e transtornos do espectro autista (40 a 50%) ou de hiperatividade e déficit de atenção (30 a 50%) (CURATOLO et al., 2015).

Crianças, adolescentes e adultos com TSC podem apresentar uma série variável de desafios em múltiplas dimensões neuropsiquiátricas, como visto acima para as escalas do comportamento e intelecto. Distúrbios do humor, ansiedade e depressão são observados em cerca de 30 a 60% dos pacientes com TSC (VRIES, DE et al., 2015). Estas e outras queixas comuns aos pacientes com TSC, em conjunto, foram denominadas como transtornos neuropsiquiátricos associados ao TSC [TAND (VRIES, DE et al., 2015)]. Embora cerca de 90% dos pacientes com TSC tenham queixas neuropsiquiátricas em alguma fase da vida, somente cerca de 20% deles recebem avaliação e tratamento em países desenvolvidos (LECLEZIO; VRIES, DE, 2015). Como, muitas vezes, TAND não são explicados inteiramente pelos achados anatomo-patológicos do encéfalo (KOTHARE et al., 2014), supõe-se aqui que a haploinsuficiência de *TSC1* possa alterar

outras funções neuronais em segmentos do sistema nervoso ainda não estudados e sem lesão macroscópica detectável.

Nesta linha de raciocínio, estudos recentes com camundongos geneticamente modificados têm examinado os efeitos da deleção condicional de *Tsc1* ou *Tsc2* em áreas ou células específicos do sistema nervoso, a maioria com enfoque em precursores neurogliais que formarão o córtex cerebral (CARSON et al., 2011, 2015; CROWELL et al., 2015; ERBAYAT-ALTAY et al., 2007; ESS et al., 2004; FU et al., 2012; JONES et al., 2015; MCMAHON et al., 2012; NIE et al., 2015; UHLMANN et al., 2002; WANG et al., 2007; YUAN et al., 2012; ZENG et al., 2011). A deleção de *Tsc1* no décimo terceiro dia embrionário, especificamente em células do tálamo, afeta o circuito talamocortical (NORMAND et al., 2013), indicando que outras estruturas cerebrais podem ser vulneráveis à redução de dose de TSC1 ou TSC2.

A relação funcional entre mTORC1 e neurodegeneração já foi relatada (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Na etiopatogênese de processos neurodegenerativos, disfunções neuronais, e não somente degeneração neuronal, parecem ser importantes (PALOP et al., 2006). Um componente comum a diferentes patologias que têm a neurodegeneração como cenário principal é o estresse oxidativo na célula, repercutindo com deficiências no dobramento e degradação de proteínas e na função mitocondrial (KANDEL et al., 2013). O envolvimento do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 com estresse celular e processos relacionados apoiam a hipótese de uma relação das proteínas TSC1 e TSC2 e neurodegeneração.

Os níveis de TSC2 estão diminuídos em amostras de córtex cerebral frontal de pacientes com Doença de Alzheimer (FERRANDO-MIGUEL et al., 2005). A hiperfosforilação de TSC2 em Thr1462, consistente com inibição da atividade da proteína sobre Rheb (INOKI; LI; et al., 2003; MANNING et al., 2002), foi observada

em córtex cerebral frontal de pacientes com doença de Alzheimer ou de Parkinson e em modelo murino para doença de Parkinson, embora os níveis totais de TSC2 não diferiram dos controles (HABIB et al., 2008). Esses resultados sugerem que processos metabólicos da neurodegeneração tem um efeito sobre a expressão de TSC2. A observação de neurodegeneração retiniana associada a alterações pós-traducionais em AKT, o principal regulador de TSC2, traz mais uma evidência de que a expressão do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 possa ser desregulada em processos neurodegenerativos (MARÇAL et al., 2013).

1.5. OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, tivemos o objetivo geral de caracterizar o padrão de expressão e atividade das proteínas TSC1 e TSC2 na via do mTORC1 em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica ou ao modelo de neurodegeneração induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Neste, foi também nosso objetivo verificar a extensão da lesão sobre neurônios dopaminérgicos de camundongos transgênicos quando há redução da expressão de TSC1.

CAPÍTULO 2. OS PRODUTOS DOS GENES *Tsc1* E *Tsc2* EM
ENCÉFALOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPÍDICA

CAPÍTULO 2. Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em encéfalos de animais submetidos a dieta hiperlipídica

2.1. INTRODUÇÃO

O estudo de dietas hiperlipídicas tem hoje grande importância devido às mudanças no padrão de dieta ocorridas no século passado, levando ao aumento progressivo do aporte calórico em populações humanas, sobretudo em função de lipídios. Em decorrência, aumentou-se a prevalência de transtornos sistêmicos como obesidade, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, aterosclerose e a combinação destas na síndrome metabólica (SMITH; SMITH, 2016).

São várias as evidências que mostram o efeito de dietas hiperlipídicas no sistema nervoso central (FLEUR, LA; SERLIE, 2014; LEE; MATTSON, 2014). Sabe-se que dietas hiperlipídicas causam resistência cerebral a insulina, alterações sinaptodendríticas no hipocampo e córtex e efeitos deletérios na memória de trabalho (ARNOLD et al., 2014; BOITARD et al., 2014; DINGESS et al., 2016; KIM; FELDMAN, 2015; OH et al., 2013; SPIELMAN et al., 2014), além de gliose e angiogênese hipotalâmica (BERKSETH et al., 2014; JASTROCH et al., 2014; TANG et al., 2015). Em humanos, obesidade foi associada com inflamação hipotalâmica crônica e perda de integridade de áreas envolvidas em comportamentos de recompensa e alimentação, como córtex orbitolateral e amígdala (CAZETTES et al., 2011).

Evidências recentes indicam o envolvimento de dieta hiperlipídica em processos neurodegenerativos, especificamente em neurônios hipotalâmicos e na retina (MARÇAL et al., 2013; MORAES et al., 2009). No trabalho de Marçal e cols. (2013), conduzido em nosso laboratório, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram degeneração retiniana mais extensa, que foi associada a níveis mais baixos de AKT total e fosforilado em Ser473 (MARÇAL et al., 2013), um sítio regulado por mTORC2

(LAPLANTE; SABATINI, 2012). É importante lembrar que a cinase AKT é a principal reguladora de TSC2. A neurodegeneração é possivelmente causada pela inflamação e é independente da quantidade de calorias ingeridas (MARÇAL et al., 2013; MORAES et al., 2009).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo específico desta etapa do projeto foi avaliar, em animais alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica, os níveis de (i) proteína e transcritos dos genes *Tsc1* e *Tsc2*, respectivamente por *Western blotting* e RT-PCR quantitativa (qPCR); (ii) fosforilação em TSC2 em sítio de regulação; e (iii) proteínas alvos de mTOR e sua atividade, em particular, as proteínas S6 e 4E-BP1.

CAPÍTULO 3. OS PRODUTOS DOS GENES *TSC1* E *TSC2* EM
MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON

CAPÍTULO 3. Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em modelo de doença de Parkinson

3.1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson

Historicamente, descrições do que poderia ser a doença de Parkinson são encontradas em registros tradicionais indianos e chineses (1000 a.C.) e em registros médicos a partir do século XVII. No entanto, a doença só foi descrita como uma síndrome neurológica em 1817, por James Parkinson (GOETZ, 2011).

A doença de Parkinson é a doença motora neurodegenerativa mais comum associada ao envelhecimento humano. Afeta aproximadamente 1 a 2% da população com mais de 65 anos e 4 a 5% da população com mais de 85 anos, atingindo cerca de seis milhões de pessoas no mundo. A idade média de aparecimento dos sintomas é 70 anos; porém, 4% dos pacientes a desenvolvem antes dos 50 (doença de Parkinson precoce) (TRINH; FARRER, 2013). De acordo com os últimos avanços no entendimento da doença de Parkinson, hoje ela é classificada em diversos subtipos de acordo com a idade de manifestação, apresentação clínica e taxa de progressão. As formas de manifestação precoce são raras (1% do total) e cerca de 50% delas correspondem a formas familiares com herança autossômica recessiva (OBESO et al., 2010). Assim, de forma geral, a doença de Parkinson pode ser considerada como um transtorno do envelhecimento que se manifesta em virtude de uma sobrecarga sobre o metabolismo de neurônios dopaminérgicos (OBESO et al., 2010).

Clinicamente, a doença de Parkinson é caracterizada pela tríade de tremor de repouso, bradicinesia (movimentos lentos) e rigidez postural, sobretudo posterior. Como consequência, são frequentes a instabilidade postural, dificuldade na iniciação e

sustentação de movimentos e no equilíbrio, marcha embaralhada, diminuição de movimentos faciais espontâneos, como frequência de piscar os olhos, e alterações motoras finas, como escrita. Os sinais motores, em conjunto, são conhecidos como parkinsonismo. Sinais não-motores como disautonomia (disfunção do sistema autônomo), depressão, perda sensorial, transtornos do sono, déficit cognitivo moderado e demência são comuns (KANDEL et al., 2013; TRINH; FARRER, 2013). Evidências indicam que alguns desses sintomas não-motores podem estar presentes numa fase pré-clínica da doença (OBESO et al., 2010).

Achados anatômicos e histológicos

Os núcleos da base são compostos pelo estriado, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico. A atuação desses núcleos se dá principalmente em comportamentos motores, mas também em aspectos não motores como comportamentos complexos e neuropsiquiátricos.

Diversas estruturas dos núcleos da base participam do chamado circuito motor. Esse circuito é formado por projeções sequenciais do córtex cerebral sensorimotor ao estriado, deste ao globo pálido e à substância negra *pars reticulata* (SNr), destes aos núcleos talâmicos, os quais, finalmente, projetam suas fibras aos córtices motor e pré-motor e área motora suplementar. O circuito motor é responsável por diversos aspectos do comportamento motor do animal.

Entre as estruturas que compõem os núcleos da base, o estriado e a da substância negra *pars compacta* (SNc) são os de maior relevância ao estudo da doença de Parkinson. O estriado é a principal estrutura aferente dos núcleos da base. Seu principal tipo celular, neurônios espinhosos gabaérgicos, recebem projeções externas oriundas do tálamo, do córtex cerebral, do tronco encefálico e da SNc, além de projeções locais de interneurônios colinérgicos e gabaérgicos. Suas projeções, por sua vez, dão-se à porção

interna do globo pálido (GPI) e à SNr. A eferência estriatal ao GPI e à SNr se dá por duas vias, uma direta e monossináptica e uma indireta e polissináptica, que passa pela porção externa do globo pálido (GPE). A via direta é permissiva ao movimento, enquanto a via indireta é inibitória. A ação estriatal tem como principal moduladora a atividade da SNc, que a essa estrutura se projeta. Terminais oriundos da SNc modulam neurônios espinhosos gabaérgicos estriatais através da liberação de dopamina. Essa sinalização tem efeitos opostos nas vias direta e indireta. Enquanto na via direta a liberação de dopamina e sua captação por receptores dopaminérgicos tipo D1 têm efeito facilitador da atividade neuronal, a sua liberação na via indireta e captação por receptores dopaminérgicos tipo D2 têm efeito inibitório. Juntos, esses efeitos se somam no sentido de facilitação do movimento (KANDEL et al., 2013).

Os sinais motores da doença de Parkinson são causados pelo decréscimo desses estímulos dopaminérgicos no estriado, como resultado da neurodegeneração da SNc em uma taxa de cerca de 5% ao ano (TORRÃO et al., 2012). Sinais não-motores podem ser causados por alterações patológicas em áreas encefálicas diversas, como tronco encefálico, *locus* cerúleo, amígdala, tálamo, hipotálamo e córtex cerebral, ou ainda pela atuação dos núcleos da base em aspectos neurológicos não motores (KANDEL et al., 2013).

Estudos em animais e em cérebros humanos derivados de autópsia indicam que os sinais motores surgem quando pelo menos 70% da dopamina estriatal é perdida, o que indica uma alta capacidade de compensação do circuito que envolve os núcleos basais. Esta compensação pode ocorrer através da atividade aumentada de neurônios dopaminérgicos, arborização das fibras dopaminérgicas remanescentes e mudanças na síntese, liberação, metabolismo ou sensibilidade de receptores nas células pós-sinápticas, além de mecanismos independentes da dopamina (KANDEL et al., 2013).

Nos neurônios presentes no cérebro de pacientes com doença de Parkinson são encontrados os corpos ou neuritos de Lewy, formados por agregados proteicos, principalmente de α -sinucleína (JAGUST, 2013; KANDEL et al., 2013; SCHOBER, 2004). As inclusões são denominadas corpos de Lewy se ocorrem no corpo celular neuronal ou neuritos de Lewy, se ocorrem nos processos neuronais (TORRÃO et al., 2012). Os corpos e neuritos de Lewy são formados por deficiências no sistema de degradação proteica da célula e são compostos por agregados de proteínas normais, proteínas truncadas ou proteínas com outras alterações conformacionais, além de ubiquitina. A família das sinucleínas é amplamente expressa no cérebro e é o principal componente dos corpos e neuritos de Lewy. Acredita-se que, sob condições fisiológicas, essas proteínas ajam na neurotransmissão, regulando o tamanho de vesículas sinápticas e de processos de reciclagem de proteínas e plasticidade. Não se sabe o papel exato dessas inclusões na patologia da doença de Parkinson (OBESO et al., 2010; TORRÃO et al., 2012).

Patogênese molecular

O conhecimento sobre as causas da doença de Parkinson é limitado. Além disso, como patologia de origem multifatorial, fatores predisponentes podem diferir entre pacientes que apresentam subtipos clínicos diferentes. A homeostase do circuito motor é vulnerável à expressão de variantes genéticas, de fatores celulares e ambientais que contribuem para a morte celular. A morte celular pode se dar por disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, degradação anormal de proteínas e outras disfunções celulares (OBESO et al., 2010).

O metabolismo de dopamina parece ser importante na patogênese da doença, já que produz espécies altamente reativas que oxidam componentes diversos, aumentam o estresse oxidativo e prejudicam o funcionamento mitocondrial. No citosol, a dopamina

livre se auto-oxida, de forma que a diminuição de seu sequestro em vesículas sinápticas pode desequilibrar a homeostase da célula. Estudos sugerem interação entre a concentração celular de α -sinucleína e dopamina e a regulação dopaminérgica da autofagia em neurônios da SNc. Existe também a hipótese de que agregados de α -sinucleína se propagariam como príons, e que, quando em ambiente extracelular, essa proteína seria endocitada e transmitida entre neurônios. Foi mostrado que a secreção de α -sinucleína é aumentada em situações de disfunção mitocondrial e do proteassomo, como acontece na doença de Parkinson (OBESO et al., 2010; TRINH; FARRER, 2013). Mais estudos são necessários para que se compreenda a complexa patogênese molecular da doença de Parkinson.

Genética

A doença de Parkinson tem origem multifatorial, causada por fatores ambientais e gênicos em interação. Um em cada sete pacientes com doença de Parkinson tem um parente de primeiro grau com a doença. O estudo dessas famílias é essencial à descoberta de genes associados à doença de Parkinson. No entanto, famílias com padrão de herança mendeliano claro são muito raras. Menos de 10% dos casos familiares de manifestação tardia são associados a um gene específico (TRINH; FARRER, 2013). Mutações já identificadas causam 2 a 3% dos casos tardios e até 50% dos casos precoces, familiares ou esporádicos (OBESO et al., 2010). Casos de Parkinson tardio com causas genéticas conhecidas são associados a mutações nos genes *LRRK2* [codificador para *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*, (ZIMPRICH et al., 2004)], *VPS35* [codificador para *Vacuolar Protein Sorting 35*, (VILARIÑO-GÜELL et al., 2011)] e *EIF4G1* [codificador para *Elongation Initiation Factor 4G1*, (CHARTIER-HARLIN et al., 2011)]. Casos de doença de Parkinson precoce com herança autossômica dominante foram associados a mutações no gene *SNCA* [codificador para α -sinucleína, (NUYTEMANS et al., 2010)], e com herança

autossômica recessiva a mutações nos genes *PARK2* [codificador para parkina (LÜCKING et al., 2000)], *PINK1* [codificador para *Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-INDuced putative Kinase 1*, (HEALY et al., 2004; ROGAEVA et al., 2004; VALENTE et al., 2004)], *PARK7* [codificador para DJ1, (PANKRATZ et al., 2006)] e *ATP13A2* [codificador para *ATPase 13A2*, (RAMIREZ et al., 2006)], cujas mutações causam uma forma juvenil da doença. A penetrância dessas mutações varia bastante de acordo com a idade do paciente (OBESO et al., 2010; TRINH; FARRER, 2013). Estudos diversos tem sido conduzidos na tentativa de se entender o papel dos produtos desses genes na patogênese da doença de Parkinson.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo específico desta etapa do projeto foi avaliar os (i) níveis de expressão proteica de TSC1 e TSC2 por *Western blotting*, e (ii) níveis da forma fosforilada de TSC2 em sítio de regulação bem como de dois alvos de regulação por mTOR, as proteínas S6 e 4E-BP1 em modelo murino de neurodegeneração induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA); além de (iii) desenvolvimento de uma linhagem de camundongo nocaute condicional para o gene *Tsc1* e, nesta, avaliar a susceptibilidade à indução de neurodegeneração por 6-OHDA.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pudemos observar que camundongos submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram:

- evidências de estresse oxidativo no córtex cingulado;
- redução da quantidade de transcritos de *Tsc1* e *Tsc2* no córtex cerebral de forma dependente de jejum realizado imediatamente antes da eutanásia;
- aumento específico de RNAm no hipocampo (*Tsc1* e *Tsc2*) e no estriado e hipotálamo (*Tsc1*), de forma independente do jejum, sugerindo se tratar de alterações relacionadas à dieta hiperlipídica.

Camundongos adultos submetidos a injeção intracerebral de 6-hidroxidopamina apresentaram redução da quantidade total de proteína S6 no lado encefálico tratado quando comparado ao segmento contralateral (controle), sem alteração de TSC1 ou TSC2.

Em análises de imunoperoxidase do encéfalo de camundongo, descrevemos pela primeira vez e de forma independente da lesão por 6-OHDA, a expressão de TSC1 no estriado, núcleos entopeduncular e arqueado e de TSC2 no tálamo e hipotálamo.

O fármaco 4-hidroxitamoxifeno parece regular a expressão de TSC1 no estriado de camundongos adultos.

REFERÊNCIAS

- ABS, E.; GOORDEN, S. M. I.; SCHREIBER, J.; *et al.* TORC1-dependent epilepsy caused by acute biallelic Tsc1 deletion in adult mice. **Annals of Neurology**, v. 74, n. 4, p. 569–579, 2013.
- AFIFI, A. K.; BERGMAN, R. A. **Neuroanatomia funcional: texto e atlas**. Tradução Paulo Laino Cândido; Jackson Cioni Bittencourt. 2a. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.
- ALEXANDER, A.; CAI, S.; KIM, J.; *et al.* ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. **PNAS**, v. 107, n. 9, p. 4153–4158, 2010.
- ALFAIZ, A. A.; MICALÉ, L.; MANDRIANI, B.; *et al.* TBC1D7 Mutations are Associated with Intellectual Disability, Macrocrania, Patellar Dislocation, and Celiac Disease. **Human Mutation**, v. 35, n. 4, p. 447–451, 2014.
- ARNOLD, S. E.; LUCKI, I.; BROOKSHIRE, B. R.; *et al.* High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. **Neurobiology of disease**, v. 67C, p. 79–87, 29 mar 2014.
- BARNES, E. A.; KENERSON, H. L.; MAK, B. C.; YEUNG, R. S. The loss of tuberin promotes cell invasion through the β -catenin pathway. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 43, n. 5, p. 617–27, nov 2010.
- BARNES, P. J. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 3, p. 790–806, 2015.
- BATEUP, H. S.; TAKASAKI, K. T.; SAULNIER, J. L.; DENEFRIO, C. L.; SABATINI, B. L. Loss of Tsc1 In Vivo Impairs Hippocampal mGluR-LTD and Increases Excitatory Synaptic Function. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 24, p. 8862–8869, 15 jun 2011.
- BATISTA, A. F. R.; HENGST, U. Intra-axonal protein synthesis in development and beyond. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2016.
- BENVENUTO, G.; LI, S.; BROWN, S. J.; *et al.* The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. **Oncogene**, v. 19, p. 6306–6316, 2000.
- BERKSETH, K. E.; GUYENET, S. J.; MELHORN, S. J.; *et al.* Hypothalamic gliosis associated with high-fat diet feeding is reversible in mice: A combined immunohistochemical and magnetic resonance imaging study. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2858–2867, 2014.
- BHATIA, B.; NORTHCOTT, P. A.; HAMBARDZUMYAN, D.; *et al.* Tuberous Sclerosis Complex Suppression in Cerebellar Development and Medulloblastoma: Separate Regulation of Mammalian Target of Rapamycin Activity and p27Kip1 Localization. **Cancer Research**, v. 69, n. 18, p. 7224–7234, 15 set 2009.

- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism & related disorders**, v. 14 Suppl 2, p. S124–9, jan 2008.
- BLUM, D.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135–172, 2001.
- BOER, K.; CRINO, P. B.; GORTER, J. A.; *et al.* Gene expression analysis of tuberous sclerosis complex cortical tubers reveals increased expression of adhesion and inflammatory factors. **Brain Pathology**, v. 20, n. 4, p. 704–19, jul 2010.
- BOITARD, C.; CAVAROC, A.; SAUVANT, J.; *et al.* Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 40, p. 9–17, 2014.
- BRAY, G. A.; PAERATAKUL, S.; POPKIN, B. M. Dietary fat and obesity: A review of animal, clinical and epidemiological studies. **Physiology and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 549–555, 2004.
- BRUGAROLAS, J.; LEI, K.; HURLEY, R. L.; *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex. **Genes & Development**, p. 1–12, 2004.
- BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.
- BYLES, V.; COVARRUBIAS, A. J.; BEN-SAHRA, I.; *et al.* The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. **Nature communications**, v. 4, p. 2834, 2013.
- CAPO-CHICHI, J.-M.; TCHERKEZIAN, J.; HAMDAN, F. F.; *et al.* Disruption of TBC1D7, a subunit of the TSC1-TSC2 protein complex, in intellectual disability and megalencephaly. **Journal of medical genetics**, v. 50, n. 11, p. 740–4, nov 2013.
- CARSON, R. P.; KELM, N. D.; WEST, K. L.; *et al.* Hypomyelination following deletion of Tsc2 in oligodendrocyte precursors. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 12, p. n/a–n/a, 2015.
- CARSON, R. P.; NIELEN, D. L. VAN; WINZENBURGER, P. A.; ESS, K. C. Neuronal and glia abnormalities in Tsc1-deficient forebrain and partial rescue by rapamycin. **Neurobiology of disease**, v. 1, p. 1–12, 26 ago 2011.
- CAZETTES, F.; COHEN, J. I.; YAU, P. L.; TALBOT, H.; CONVIT, A. Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. **Brain Research**, v. 1373, p. 101–109, 2011.
- CHARTIER-HARLIN, M. C.; DACHSEL, J. C.; VILARI??O-G??ELL, C.; *et al.* Translation initiator EIF4G1 mutations in familial parkinson disease. **American Journal of Human**

Genetics, v. 89, n. 3, p. 398–406, 2011.

CHONG-KOPERA, H.; INOKI, K.; LI, Y.; *et al.* TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8313–8316, 2006.

COTA, D. MTORC2, the “other” mTOR, is a new player in energy balance regulation. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 349–350, 2014.

COTA, D.; PROULX, K.; SMITH, K. A. B.; *et al.* Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 927–930, 12 maio 2006.

CRINO, P. B.; NATHANSON, K. L.; HENSKE, E. P. The tuberous sclerosis complex. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 13, p. 1345–1356, set 2006.

CROWELL, B.; HWA LEE, G.; NIKOLAEVA, I.; DAL POZZO, V.; D’ARCANGELO, G. Complex neurological phenotype in mutant mice lacking Tsc2 in excitatory neurons of the developing forebrain. **eNeuro**, v. 2, n. October, p. 1–15, 2015.

CURATOLO, P.; MOAVERO, R.; VRIES, P. J. DE. Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 7, p. 733–745, 2015.

DADA, S.; DEMARTINES, N.; DORMOND, O. mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 4, p. 875–879, 8 ago 2008.

DAS, B.; TSUCHIDA, R.; MALKIN, D.; *et al.* Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 7, p. 1818–30, 2008.

DAVID, R. Cell migration: MTORC2 brings up the rear. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 74, fev 2011.

DEYOUNG, M. P.; HORAK, P.; SOFER, A.; SGROI, D.; ELLISEN, L. W. Hypoxia regulates TSC1 / 2 – mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14 – 3 – 3 shuttling. **Genes**, p. 239–251, 2008.

DIANO, S. Role of reactive oxygen species in hypothalamic regulation of energy metabolism. **Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)**, v. 28, n. 1, p. 3–5, 2013.

DIBBLE, C. C.; ELIS, W.; MENON, S.; *et al.* TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. **Molecular cell**, v. 47, n. 4, p. 535–46, 24 ago 2012.

DIETRICH, M. O.; HORVATH, T. L. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 2, p. 65–73, fev 2013.

DINGESS, P. M.; DARLING, R. A.; KURT DOLENCE, E.; CULVER, B. W.; BROWN, T. E. Exposure to a diet high in fat attenuates dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. **Brain Structure and Function**, 2016.

ERBAYAT-ALTAY, E.; ZENG, L.-H.; XU, L.; GUTMANN, D. H.; WONG, M. The natural history and treatment of epilepsy in a murine model of tuberous sclerosis. **Epilepsia**, v. 48, n. 8, p. 1470–1476, ago 2007.

ESS, K. C.; UHLMANN, E. J.; LI, W.; *et al.* Expression profiling in tuberous sclerosis complex (TSC) knockout mouse astrocytes to characterize human TSC brain pathology. **Glia**, v. 46, n. 1, p. 28–40, 1 abr 2004.

EUROPEAN CHROMOSOME 16 TUBEROUS SCLEROSIS CONSORTIUM. Identification and Characterization of the Tuberous Sclerosis Gene on Chromosome 16. **Cell**, v. 75, p. 1305–1315, 1993.

FELICIANO, D. M.; QUON, J. L.; SU, T.; TAYLOR, M. M.; BORDEY, A. Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell TSC1 deletion. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 4, p. 799–810, 2012.

FERRANDO-MIGUEL, R.; ROSNER, M.; FREILINGER, A.; LUBEC, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Tuberin – A New Molecular Target in Alzheimer's Disease? **Neurochemical Research**, v. 30, n. 11, p. 1413–1419, 2005.

FINLAY, G. A.; THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L.; KWIATKOWSKI, D. J. Platelet-derived growth factor-induced p42/44 mitogen-activated protein kinase activation and cellular growth is mediated by reactive oxygen species in the absence of TSC2/tuberin. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 10881–10890, 2005.

FLEUR, S. E. LA; SERLIE, M. J. The interaction between nutrition and the brain and its consequences for body weight gain and metabolism; studies in rodents and men. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 649–659, 2014.

FU, C.; CAWTHON, B.; CLINKSCALES, W.; *et al.* GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 9, p. 2111–2119, 2012.

FUKUDA, T.; KOBAYASHI, T.; YASUI, H.; *et al.* Distribution of Tsc2 protein in various normal rat tissues and renal tumours of Tsc2 mutant (Eker) rat detected by immunohistochemistry. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 434, n. 4, p. 341–50, abr 1999.

GAI, Z.; CHU, W.; DENG, W.; *et al.* Structure of the TBC1D7-TSC1 complex reveals that TBC1D7 stabilizes dimerization of the TSC1 C-terminal coiled coil region. **Journal of molecular cell biology**, v. 0, p. 1–15, 2016.

GALLAGHER, S. R. **Digital Image Processing and Analysis with ImageJ**. [S.l.]: Wiley Interscience, 2010.

GAO, X.; ZHANG, Y.; ARRAZOLA, P.; *et al.* Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 699–704, set 2002.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M.; ALESSI, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). **The Biochemical journal**, v. 416, n. 3, p. 375–85, 15 dez 2008.

GEIST, R. T.; GUTMANN, D. H. The Tuberous Sclerosis 2 Gene is Expressed at High Levels in the Cerebellum and Developing Spinal Cord. **Cell Growth & Differentiation**, v. 6, p. 1477–1483, 1995.

GEIST, R. T.; REDDY, A. J.; ZHANG, J.; GUTMANN, D. H. Expression of the Tuberous Sclerosis 2 Gene Product, Tuberin , in Adult and Developing Nervous System Tissues. **Neurobiology of Disease**, v. 3, p. 111–120, 1996.

Gene Expression Database (GXD). Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

GIERUT, J. J.; JACKS, T. E.; HAIGIS, K. M. Strategies to achieve conditional gene mutation in mice. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 4, p. 339–349, 2014.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, p. a008862, 2011.

GONCHAROVA, E. A; GONCHAROV, D. A; LI, H.; *et al.* mTORC2 is Required for Proliferation and Survival of TSC2-Null Cells. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 12, p. 2484–98, 11 abr 2011.

GONCHAROVA, E.; GONCHAROV, D.; NOONAN, D.; KRYMSKAYA, V. P. TSC2 modulates actin cytoskeleton and focal adhesion through TSC1-binding domain and the Rac1 GTPase. **The Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 6, p. 1171–1182, 20 dez 2004.

GOORDEN, S. M. I.; WOERDEN, G. M. VAN; WEERD, L. VAN DER; CHEADLE, J. P.; ELGERSMA, Y. Cognitive deficits in Tsc1+/- mice in the absence of cerebral lesions and seizures. **Annals of Neurology**, v. 62, n. 6, p. 648–655, dez 2007.

GUERTIN, D. A.; STEVENS, D. M.; THOREEN, C. C.; *et al.* Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or LST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. **Developmental Cell**, v. 11, n. 6, p. 859–871, dez 2006.

GUTMANN, D. H.; ZHANG, Y.; HASBANI, M. J.; *et al.* Expression of the tuberous sclerosis complex gene products, hamartin and tuberin, in central nervous system tissues. **Acta Neuropathologica**, v. 99, n. 3, p. 223–230, mar 2000.

HABIB, S. L.; MICHEL, D.; MASLIAH, E.; *et al.* Role of tuberin in neuronal degeneration. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 6, p. 1113–6, jun 2008.

HABIB, S. L.; SIMONE, S.; BARNES, J. J.; ABBOUD, H. E. Tuberin haploinsufficiency is associated with the loss of OGG1 in rat kidney tumors. **Molecular Cancer**, 2008.

HADDAD, L. A.; SMITH, N.; BOWSER, M.; *et al.* The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 520–534, 15 nov 2002.

HAISSAGUERRE, M.; SAUCISSE, N.; COTA, D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 1–11, 2014.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Development**, v. 18, n. 16, p. 1926–1945, 15 ago 2004.

HEALY, D. G.; GIBSON, J. M.; ROSS, O. A.; JAIN, S.; LYNCH, T. PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. **Neurology**, v. 63, p. 1486–1488, 2004.

HELDRING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; *et al.* Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiology Review**, v. 87, p. 905–931, 2007.

HENSKE, E. P. Metastasis of benign tumor cells in tuberous sclerosis complex. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 38, n. 4, p. 376–381, dez 2003.

HODGES, A. K.; LI, S.; MAYNARD, J.; *et al.* Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberin. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 25, p. 2899–2905, 2001.

HUANG, J.; DIBBLE, C. C.; MATSUZAKI, M.; MANNING, B. D. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 12, p. 4104–4115, jun 2008.

HUANG, J.; MANNING, B. D. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. **The Biochemical Journal**, v. 412, n. 2, p. 179–90, 1 jun 2008.

HUANG, J.; MANNING, B. D. A complex interplay between Akt , TSC2 and the two mTOR complexes. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 217–222, 2009.

HUANG, J.; WU, S.; WU, C.-L.; MANNING, B. D. Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. **Cancer research**, v. 69, n. 15, p. 6107–6114, ago 2009.

HYMAN, M. H.; WHITTEMORE, V. H. National Institutes of Health consensus conference: tuberous sclerosis complex. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 5, p. 662–665, maio 2000.

INOKI, K.; LI, Y.; XU, T.; GUAN, K.-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes & Development**, v. 17, n. 15, p. 1829–1834, 1 ago 2003.

INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 648–657, set 2002.

INOKI, K.; OUYANG, H.; ZHU, T.; *et al.* TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. **Cell**, v. 126, n. 5, p.

955–68, 8 set 2006.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, n. 5, p. 577–90, 26 nov 2003.

IYER, A.; PRABOWO, A.; ANINK, J.; *et al.* Cell injury and premature neurodegeneration in focal malformations of cortical development. **Brain Pathology**, v. 24, n. 1, p. 1–17, 2014.

JAGUST, W. Vulnerable neural systems and the borderland of brain aging and neurodegeneration. **Neuron**, v. 77, n. 2, p. 219–34, 23 jan 2013.

JASTROCH, M.; MORIN, S.; TSCHÖP, M. H.; YI, C. X. The hypothalamic neural-glial network and the metabolic syndrome. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 661–671, 2014.

JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K.-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 3, p. 133–9, mar 2013.

JIANG, L.; XU, L.; MAO, J.; *et al.* Rheb/mTORC1 Signaling Promotes Kidney Fibroblast Activation and Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 7, p. 1114–1126, 2013.

JOHNSON, M. W.; EMELIN, J. K.; PARK, S. H.; VINTERS, H. V. Co-localization of TSC1 and TSC2 gene products in tubers of patients with tuberous sclerosis. **Brain Pathology**, v. 9, n. 1, p. 45–54, jan 1999.

JOHNSON, T. E. 25years after age-1: Genes, interventions and the revolution in aging research. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 7, p. 640–643, 2013.

JONES, I.; HAGGLUND, A.-C.; TORNQVIST, G.; *et al.* A novel mouse model of Tuberous Sclerosis Complex (TSC): eye-specific Tsc1-ablation disrupts visual pathway development. **Disease Models & Mechanisms**, n. October, p. 1517–1529, 2015.

JOZWIAK, J. Hamartin and tuberlin: working together for tumour suppression. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 1, p. 1–5, jan 2006.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Principles of Neural Science**. 5th. ed. New York: McGraw-Hill, 2013.

KANG, Y. J.; LU, M.-K.; GUAN, K.-L. The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 1, p. 133–44, jan 2011.

KAYYALI, U. S.; LARSEN, C. G.; BASHIRUDDIN, S.; *et al.* Targeted deletion of Tsc1 causes fatal cardiomyocyte hyperplasia independently of afterload. **Cardiovascular Pathology**, v. 24, n. 2, p. 80–93, 2015.

KERFOOT, C.; WIENECKE, R.; MENCHINE, M.; *et al.* Localization of tuberous sclerosis 2 mRNA and its protein product tuberlin in normal human brain and in cerebral lesions of patients

with tuberous sclerosis. **Brain Pathology**, v. 6, p. 367–377, 1996.

KIM, B.; FELDMAN, E. L. Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 3, p. e149, 2015.

KOBAYASHI, T.; MINOWA, O.; KUNO, J.; *et al.* Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomatosis, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. **Cancer research**, v. 59, n. 6, p. 1206–11, mar 1999.

KOBAYASHI, T.; MINOWA, O.; SUGITANI, Y.; *et al.* A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8762–7, jul 2001.

KOTHARE, S. V.; SINGH, K.; HOCHMAN, T.; *et al.* Genotype/phenotype in tuberous sclerosis complex: Associations with clinical and radiologic manifestations. **Epilepsia**, v. 55, n. 7, p. 1020–1024, 2014.

KWIATKOWSKI, D. J.; ZHANG, H.; BANDURA, J. L.; *et al.* A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 5, p. 525–34, mar 2002.

LAMB, R. F.; ROY, C.; DIEFENBACH, T. J.; *et al.* The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 5, p. 281–287, maio 2000.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–93, 13 abr 2012.

LARSON, Y.; LIU, J.; STEVENS, P. D.; *et al.* Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) regulates cell migration and polarity through activation of CDC42 and RAC1. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24987–98, 6 ago 2010.

LECLEZIO, L.; VRIES, P. J. DE. Advances in the treatment of tuberous sclerosis complex. **Current opinion in psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 113–20, 2015.

LEE, C.; INOKI, K.; KARBOWNICZEK, M.; *et al.* Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. **EMBO Journal**, v. 26, p. 4812–4823, 2007.

LEE, D.-F.; KUO, H.-P.; CHEN, C.-T.; *et al.* IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 440–55, 10 ago 2007.

LEE, D.-F.; KUO, H.-P.; CHEN, C.-T.; *et al.* IKK β suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 633–638, 2008.

LEE, E. B.; MATTSO, M. P. The neuropathology of obesity: Insights from human disease. **Acta Neuropathologica**, v. 127, n. 1, p. 3–28, 2014.

LEVINE, A. J.; PUZIO-KUTER, A. M. The control of metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science**, v. 330, p. 1340–1344, 2010.

LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The Neurology of mTOR. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 275–291, 2014.

LÜCKING, C. B.; DÜRR, A.; BONIFATI, V.; *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 1560–1567, 2000.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 5, p. 307–18, maio 2009.

MALAGELADA, C.; RYU, E. J.; BISWAS, S. C.; JACKSON-LEWIS, V.; GREENE, L. A. RTP801 Is Elevated in Parkinson Brain Substantia Nigral Neurons and Mediates Death in Cellular Models of Parkinson's Disease by a Mechanism Involving Mammalian Target of Rapamycin Inactivation. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 39, p. 9996–10005, 2006.

MALHOWSKI, A. J.; HIRA, H.; BASHIRUDDIN, S.; *et al.* Smooth muscle protein-22-mediated deletion of Tsc1 results in cardiac hypertrophy that is mTORC1-mediated and reversed by rapamycin. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 7, p. 1290–1305, 2011.

MANNING, B. D.; TEE, A. R.; LOGSDON, M. N.; BLENIS, J.; CANTLEY, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Molecular cell**, v. 10, n. 1, p. 151–62, jul 2002.

MARÇAL, A. C.; LEONELLI, M.; FIAMONCINI, J.; *et al.* Diet-induced obesity impairs AKT signalling in the retina and causes retinal degeneration. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 1, p. 65–74, jan 2013.

MCMAHON, J.; HUANG, X.; YANG, J.; *et al.* Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 45, p. 15704–14, 2012.

MEHTA, M. S.; VAZQUEZ, A.; KULKARNI, D. A.; *et al.* Polymorphic variants in TSC1 and TSC2 and their association with breast cancer phenotypes. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 861–868, 2011.

MEIKLE, L.; TALOS, D. M.; ONDA, H.; *et al.* A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 21, p. 5546–58, maio 2007.

- MENCHINE, M.; EMELIN, J. K.; MISCHÉL, P. S.; *et al.* Tissue and Cell-Type Specific Expression of the Tuberous Sclerosis Gene, TSC2, in Human Tissues. **Modern Pathology**, v. 9, n. 11, p. 1071–1080, 1996.
- MENON, S.; DIBBLE, C. C.; TALBOTT, G.; *et al.* Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 771–785, 2014.
- MIEULET, V.; LAMB, R. F. Tuberous sclerosis complex: linking cancer to metabolism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 7, p. 329–335, 2010.
- MIZUGUCHI, M.; KATO, M.; YAMANOUCHI, H.; IKEDA, K.; TAKASHIMA, S. Loss of tuberin from cerebral tissues with tuberous sclerosis and astrocytoma. **Annals of Neurology**, v. 40, p. 941–944, 1996.
- MIZUGUCHI, M.; KATO, M.; YAMANOUCHI, H.; IKEDA, K.; TAKASHIMA, S. Tuberin immunohistochemistry in brain, kidneys and heart with or without tuberous sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 94, n. 6, p. 525–31, dez 1997.
- MIZUGUCHI, M.; TAKASHIMA, S.; YAMANOUCHI, H.; *et al.* Novel cerebral lesions in the Eker rat model of tuberous sclerosis: cortical tuber and anaplastic ganglioglioma. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 59, n. 3, p. 188–96, mar 2000.
- MORAES, J. C.; COOPE, A.; MORARI, J.; *et al.* High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5045, jan 2009.
- MÜNZBERG, H.; QUALLS-CREEKMORE, E.; YU, S.; MORRISON, C. D.; BERTHOUD, H.-R. Hedonics act in unison with the homeostatic system to unconsciously control body height. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, n. February, p. 6, 2016.
- MURTHY, V.; STEMMER-RACHAMIMOV, A. O.; HADDAD, L. A.; *et al.* Developmental expression of the tuberous sclerosis proteins tuberin and hamartin. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 202–210, 2001.
- NAKASHIMA, A.; YOSHINO, K.; MIYAMOTO, T.; *et al.* Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 361, n. 1, p. 218–23, 14 set 2007.
- NELLIST, M.; SLEGTENHORST, M. A. VAN; GOEDBLOED, M.; *et al.* Characterization of the Cytosolic Tuberin-Hamartin Complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 50, p. 35647–35652, 1999.
- NELLIST, M.; VERHAAF, B.; GOEDBLOED, M. A.; *et al.* TSC2 missense mutations inhibit tuberin phosphorylation and prevent formation of the tuberin-hamartin complex. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 25, p. 2889–2898, 2001.
- NIE, D.; CHEN, Z.; EBRAHIMI-FAKHARI, D.; *et al.* The Stress-Induced Atf3-Gelsolin

Cascade Underlies Dendritic Spine Deficits in Neuronal Models of Tuberous Sclerosis Complex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 30, p. 10762–72, 2015.

NORMAND, E. A.; CRANDALL, S. R.; THORN, C. A.; *et al.* Temporal and mosaic Tsc1 Deletion in the developing thalamus disrupts thalamocortical circuitry, neural function, and behavior. **Neuron**, v. 78, n. 5, p. 895–909, 2013.

NUYTEMANS, K.; THEUNS, J.; CRUTS, M.; BROECKHOVEN, C. VAN. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update. **Human Mutation**, v. 31, n. 7, p. 763–780, 2010.

O'BRIEN, T. F.; GORENTLA, B. K.; XIE, D.; *et al.* Regulation of T-cell survival and mitochondrial homeostasis by TSC1. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 11, p. 3361–3370, 2011.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–61, jun 2010.

OH, H.; BOGHOSSIAN, S.; YORK, D. A.; PARK-YORK, M. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. **Brain Research**, v. 1537, p. 191–200, 2013.

OH, W. J.; JACINTO, E. mTOR complex 2 signaling and functions. **Cell Cycle**, v. 10, n. 14, p. 1–12, 2011.

OSBORNE, J. P.; FRYER, A.; WEBB, D. Epidemiology of Tuberous Sclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 615, p. 125–127, 1991.

PALOP, J. J.; CHIN, J.; MUCKE, L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 768–73, 19 out 2006.

PANKRATZ, N.; PAUCIULO, M. W.; ELSAESSER, V. E.; *et al.* Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. **Neuroscience Letters**, v. 408, n. 3, p. 209–213, 2006.

PARK, Y.; JIN, H. S.; LOPEZ, J.; *et al.* TSC1 regulates the balance between effector and regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 12, p. 5165–5178, 2013.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2nd editio ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2001.

PLANK, T. L.; LOGGINIDOU, H.; KLEIN-SZANTO, A.; HENSKE, E. P. The expression of hamartin, the product of the TSC1 gene, in normal human tissues and in TSC1- and TSC2-linked angiomyolipomas. **Mod Pathol**, v. 12, n. 5, p. 539–545, 1999.

PLANK, T. L.; YEUNG, R. S.; HENSKE, E. P. Hamartin , the Product of the Tuberous Sclerosis 1 (TSC1) Gene, Interacts with Tuberin and Appears to Be Localized to Cytoplasmic Vesicles. **Cancer Research**, v. 58, p. 4766–4770, 1998.

POTTER, C. J.; PEDRAZA, L. G.; HUANG, H.; XU, T. The tuberous sclerosis complex (TSC) pathway and mechanism of size control. **Biochemical Society transactions**, v. 31, n. Pt 3, p. 584–6, jun 2003.

PRABOWO, A. S.; ANINK, J. J.; LAMMENS, M.; *et al.* Fetal brain lesions in tuberous sclerosis complex: TORC1 activation and inflammation. **Brain Pathology**, v. 23, n. 1, p. 45–59, 2013.

PRESNEAU, N.; SHALABY, A.; IDOWU, B.; *et al.* Potential therapeutic targets for chordoma : PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. **British Journal of Cancer**, v. 100, p. 1406–1414, 2009.

QIN, J.; WANG, Z.; HOOGEVEEN-WESTERVELD, M.; *et al.* Structural basis of the interaction between tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7). **Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. in press, p. jbc.M115.701870, 2016.

RADIMERSKI, T.; MONTAGNE, J.; HEMMINGS-MIESZCZAK, M.; THOMAS, G. Lethality of *Drosophila* lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. **Genes & development**, v. 16, n. 20, p. 2627–32, out 2002.

RAMIREZ, A.; HEIMBACH, A.; GRÜNDEMANN, J.; *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. **Nature Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1184–1191, 2006.

REYES, T. M. High-fat diet alters the dopamine and opioid systems: effects across development. **International Journal of Obesity Supplements**, v. 2, n. S2, p. S25–S28, 2012.

RIEU, I.; POWERS, S. J. Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. **The Plant cell**, v. 21, n. 4, p. 1031–3, abr 2009.

ROGAEVA, E.; JOHNSON, J.; LANG, A. E.; *et al.* Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 61, p. 1898–1904, 2004.

ROLLS, E. T. Reward systems in the brain and nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 14.1–14.36, 2016.

ROSNER, M.; FREILINGER, A.; HANNEDER, M.; *et al.* p27Kip1 localization depends on the tumor suppressor protein tuberlin. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 13, p. 1541–56, 1 jul 2007.

ROSNER, M.; FREILINGER, A.; HENGSTSCHLA, M. The tuberous sclerosis genes and regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. **Mutation Research**, v. 613, p. 10–16, 2006.

ROSNER, M.; HENGSTSCHLA, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. Tuberlin binds p27 and negatively regulates its interaction with the SCF component Skp2. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48707–15, nov 2004.

RUZANKINA, Y.; PINZON-GUZMAN, C.; ASARE, A.; *et al.* Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. **Cell stem cell**, v. 1, n. 1, p. 113–26, 7 jun 2007.

SACI, A.; CANTLEY, L. C.; CARPENTER, C. L. Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size. **Molecular Cell**, v. 42, n. 1, p. 50–61, 2011.

SANTIAGO LIMA, A. J.; HOOGEVEEN-WESTERVELD, M.; NAKASHIMA, A.; *et al.* Identification of Regions Critical for the Integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 Complex. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e93940, jan 2014.

SAUCEDO, L. J.; GAO, X.; CHIARELLI, D. A.; *et al.* Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. **Nature cell biology**, v. 5, n. 6, p. 566–71, jun 2003.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 215–24, out 2004.

SHRESTHA, S.; YANG, K.; WEI, J.; *et al.* Tsc1 promotes the differentiation of memory CD8+ T cells via orchestrating the transcriptional and metabolic programs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14858–14863, 2014.

SLEGTENHORST, M. VAN; CARR, E.; STOYANOVA, R.; KRUGER, W. D.; HENSKE, E. P. Tsc1+ and tsc2+ regulate arginine uptake and metabolism in Schizosaccharomyces pombe. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12706–13, 26 mar 2004.

SLEGTENHORST, M. VAN; HOOGT, R. DE; HERMANS, C.; *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. **Science**, v. 277, n. August, p. 805–808, ago 1997.

SMITH, C.; FINGER, J.; HAYAMIZU, T.; *et al.* The mouse Gene Expression Database (GXD): 2014 update. **Nucleic Acid Research**, v. 42, n. D1, p. D818–D824, 2014.

SMITH, K. B.; SMITH, M. S. Obesity Statistics. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 43, p. 121–135, 2016.

SPIELMAN, L. J.; LITTLE, J. P.; KLEGERIS, A. Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. **Journal of Neuroimmunology**, v. 273, n. 1-2, p. 8–21, 2014.

SQUARIZE, C. H.; CASTILHO, R. M.; BUGGE, T. H.; GUTKIND, J. S. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

TANG, H.; INOKI, K.; LEE, M.; *et al.* mTORC1 promotes denervation-induced muscle atrophy through a mechanism involving the activation of FoxO and E3 ubiquitin ligases. **Science signaling**, v. 7, n. 314, p. ra18, 2014.

TANG, Y.; PURKAYASTHA, S.; CAI, D. Hypothalamic microinflammation: a common basis

of metabolic syndrome and aging. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 1, p. 36–44, 2015.

TEE, A. R.; BLENIS, J.; PROUD, C. G. Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. **FEBS Letters**, v. 579, n. 21, p. 4763–4768, 2005.

TOKER, A. mTOR and Akt Signaling in Cancer: SGK Cycles In. **Molecular Cell**, v. 31, n. 1, p. 6–8, 2008.

TOMASONI, R.; MONDINO, A. The tuberous sclerosis complex: balancing proliferation and survival. **Biochemical Society transactions**, v. 39, n. 2, p. 466–71, 1 abr 2011.

TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; *et al.* Different Approaches, One Target: Understanding Cellular Mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's Diseases. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 2, p. 194–218, out 2012.

TRINH, J.; FARRER, M. Advances in the genetics of Parkinson disease. **Nature reviews. Neurology**, p. 1–10, 16 jul 2013.

UHLMANN, E. J.; WONG, M.; BALDWIN, R. L.; *et al.* Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. **Annals of neurology**, v. 52, n. 3, p. 285–96, set 2002.

VALENTE, E. M.; ABOU-SLEIMAN, P. M.; CAPUTO, V.; *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, v. 304, p. 1158–1160, 2004.

VEELEN, W. VAN; KORSSE, S. E.; LAAR, L. VAN DE; *et al.* The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. **Oncogene**, v. 30, n. 20, p. 2289–303, 19 maio 2011.

VILARIÑO-GÜELL, C.; WIDER, C.; ROSS, O. A.; *et al.* VPS35 mutations in Parkinson disease. **American Journal of Human Genetics**, v. 89, n. 1, p. 162–167, 2011.

VRIES, P. J. DE; WHITTEMORE, V. H.; LECLEZIO, L.; *et al.* Tuberous Sclerosis Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND) and the TAND checklist. **Pediatric Neurology**, v. 52, n. 1, p. 25–35, 2015.

WALTEREIT, R.; JAPS, B.; SCHNEIDER, M.; VRIES, P. J. DE; BARTSCH, D. Epilepsy and Tsc2 haploinsufficiency lead to autistic-like social deficit behaviors in rats. **Behavior Genetics**, 2011.

WANG, Y.; GREENWOOD, J. S. F.; CALCAGNOTTO, M. E.; *et al.* Neocortical hyperexcitability in a human case of tuberous sclerosis complex and mice lacking neuronal expression of TSC1. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 2, p. 139–152, 2007.

WIENECKE, R.; JR, J. C. M.; REED, J. A.; *et al.* Expression of the TSC2 Product Tuberin and Its Target Rap1 in Normal Human Tissues. **American Journal of Pathology**, v. 150, n. 1, p. 43–50, 1997.

WOUTERS, B. G.; KORITZINSKY, M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded

protein response in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 11, p. 851–64, nov 2008.

WU, Y.; ZHOU, B. P. Kinases meet at TSC. **Cell research**, v. 17, n. 12, p. 971–3, dez 2007.

XIANG, X.; LAN, H.; TANG, H.; *et al.* Tuberous Sclerosis Complex 1–Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Signaling Determines Brown-to-White Adipocyte Phenotypic Switch. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 519–528, 2015.

YAN, L.; MIEULET, V.; LAMB, R. F. mTORC2 is the hydrophobic motif kinase for SGK1. **The Biochemical Journal**, v. 416, n. 3, p. e19–e21, 2008.

YUAN, E.; TSAI, P. T.; GREENE-COLOZZI, E.; *et al.* Graded loss of tuberin in an allelic series of brain models of TSC correlates with survival, and biochemical, histological and behavioral features. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 19, p. 4286–4300, 2012.

ZACHAREK, S. J.; XIONG, Y.; SHUMWAY, S. D. Negative regulation of TSC1-TSC2 by mammalian D-type cyclins. **Cancer Research**, v. 65, n. 24, p. 11354–11360, 2005.

ZENG, L.-H.; RENSING, N. R.; ZHANG, B.; *et al.* Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex. **Human molecular genetics**, v. 20, n. 3, p. 445–54, 1 fev 2011.

ZHANG, B.; ZOU, J.; RENSING, N. R.; YANG, M.; WONG, M. Inflammatory mechanisms contribute to the neurological manifestations of tuberous sclerosis complex. **Neurobiology of Disease**, v. 80, p. 70–79, 2015.

ZHANG, J.; ZHAO, J.; JIANG, W.; *et al.* Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 13, n. 7, p. 511–24, jul 2012.

ZHANG, Y.; GAO, X.; SAUCEDO, L. J.; *et al.* Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 6, p. 578–581, 2003.

ZHENG, X.; LIANG, Y.; HE, Q.; *et al.* Current models of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation by growth factors and amino acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20753–20769, 2014.

ZHU, L.; YANG, T.; LI, L.; *et al.* TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. **Nature Communications**, v. 5, p. 4696, 2014.

ZIMPRICH, A.; BISKUP, S.; LEITNER, P.; *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 601–607, 2004.

ZONCU, R.; BAR-PELED, L.; EFEYAN, A.; *et al.* mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678–683, 3 nov 2011.