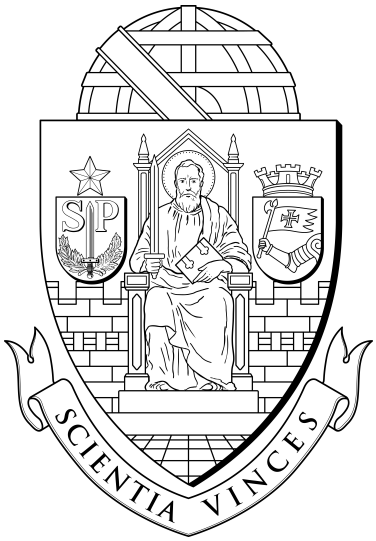
Universidade de São Paulo

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 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 Neurobiolologia 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, Pedaço, 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 euthanasiaThere 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 imunoperoxidase 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 ($N_{Expected} = 85$; $N_{observed} = 0$; $X^2 = 348.185$, $p < 0.0001$) 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios funcionais de TSC1 e TSC2 ..... **2**

Figura 2. Modelo Rheb-Rhebulator **5**

Figura 3. Vias TSC1-TSC2-TBC1D7 ..... **7**

Figura 4. Regiões encefálicas analisadas para detecção de espécies reativas por DHE em animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **24**

Figura 5. Massa corpórea de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada ao longo de oito semanas **29**

Figura 6. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE no córtex cingulado de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **30**

Figura 7. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE na amídala de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **31**

Figura 8. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE no hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **32**

Figura 9. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* no córtex cerebral de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **34**

Figura 10. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc2* no córtex cerebral de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **34**

Figura 11. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* no cerebelo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **35**

Figura 12. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc2* no cerebelo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **36**

Figura 13. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* no hipocampo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **37**

Figura 14. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc2* no hipocampo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **37**

Figura 15. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* no mesencéfalo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **38**

Figura 16. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc2* no mesencéfalo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **38**

Figura 17. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* e *Tsc2* no estriado de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **39**

Figura 18. Análise dos níveis de RNAm de *Tsc1* e *Tsc2* no hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **40**

Figura 19. Análise dos níveis de pS6 no córtex, cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **41**

Figura 20. Análise dos níveis de S6 no córtex, cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **42**

Figura 21. Análise da razão pS6/S6 no córtex, cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **42**

Figura 22. Análise dos níveis de p4E-BP1 no córtex, cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **43**

Figura 23. Análise dos níveis de 4E-BP1 no córtex, cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada **44**

Figura 24. Análise da razão p4E-BP1/4E-BP1 no cerebelo e hipotálamo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada ....……..…….……..…**44**

Figura 25. Análise dos níveis de AIF no córtex e cerebelo de animais alimentados com dietas hiperlipídica e balanceada ....……..…….……...……..…**44**

Figura 26. Análise dos níveis de tirosina hidroxilase no estriado de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA ……...……..…**63**

Figura 27. Análise da expressão de tirosina hidroxilase na SNc de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA ……...……..…**64**

Figura 28. Análise da expressão de TSC2 no estriado de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA ……...……..…**64**

Figura 29. Análise da expressão de TSC2 em outras regiões encefálicas de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA...……..…**66**

Figura 30. Imunoperoxidase do córtex cerebral com anticorpo anti-TSC2 pré-adsorvido ou não em peptídeo imunogênico.…….……..…**67**

Figura 31. Análise da expressão de TSC1 no estriado de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA.…….……..…**68**

Figura 32. Análise da expressão de TSC1 em outras regiões encefálicas de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA.…….……..…**69**

Figura 33. Imunoperoxidase do estriado com anticorpo anti-TSC1 pré-adsorvido ou não em peptídeo imunogênico.……...…….……..…**70**

Figura 34. Imunofluorescência dupla para TSC1 e Iba1 no encéfalo de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA …...…….……..…**71**

Figura 35. Análise da expressão de S6 no estriado de animais submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA …...……..…….……..…**72**

Figura 36. Genotipagem dos alelos de *Tsc1* e do transgene *Cre* para geração de um nocaute condicional de *Tsc1*……..**74**

Figura 37. Cruzamentos entre linhagens para obtenção de um nocaute condicional para *Tsc1* ……..…….**75**

Figura 38. Análise da expressão de TSC1 no estriado e cerebelo de animais heterozigotos $Tsc1^{wt}/Tsc1^{flox}$ e positivos para *Cre*, com ou sem tamoxifeno…….**78**

Figura 39. Análise da expressão de TSC1 no estriado de animais heterozigotos $Tsc1^{wt}/Tsc1^{flox}$ e positivos para *Cre*, sem tamoxifeno, submetidos a injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA ……..……**79**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de ingredientes das dietas balanceadas e hiperlipídicas ……..…**22**

Tabela 2. Composição nutricional das dietas balanceadas e hiperlipídicas em porcentagem de calorias ……...……..…**22**

Tabela 3. Concentração de anticorpos e peptídeos imunogênicos na pré-adsorção para controles de imunoperoxidase …….....……..…**59**

Tabela 4. Resultados observados e esperados nos cruzamentos para geração de nocaute condicional para *Tsc1* …….....……..…**76**

Tabela 5. Grupos experimentais para análise da neurodegeneração induzida por 6-OHDA em nocaute condicional para *Tsc1* …….....……..…**78**

SUMÁRIO

Auxílio Financeiro IX

Resumo X

Abstract XIII

Lista de figuras XVI

Lista de tabelas XX

Prefácio XXIII

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 *Tsc1* e *Tsc2* em encéfalos de animais submetidos a dieta hiperlipídica 18

2.1. Introdução 19

2.2. Objetivos específicos 20

2.3. Material e Métodos 20

2.4. Resultados 28

2.5. Discussão 45

CAPÍTULO 3. Os produtos dos genes *Tsc1* e *Tsc2* em modelo de doença de Parkinson 50

3.1. Introdução 51

3.2. Objetivos específicos 56

3.3. Material e métodos 56

3.4. Resultados 62

3.5. Discussão 81

Conclusões 86

Referências 87

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 (***m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin*), um regulador central da síntese proteica (GAO et al., 2002; INOKI et al., 2002; RADIMERSKI et al., 2002) ao reprimir a pequena GTPase Rheb [***R**as-**h**omolog **e**nriched in **b**rain*, (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; VEELEN, 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).

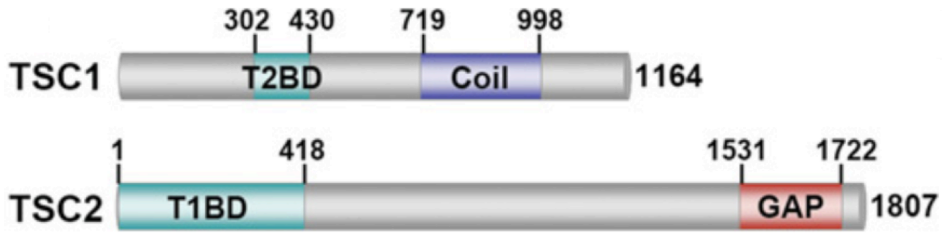


Figura 1. Domínios funcionais de TSC1 e TSC2, com números representando resíduos de aminoácidos na proteína ortóloga humana. Abreviaturas: **T2BD**: domínio de ligação a TSC2; **T1BD**: domínio de ligação a TSC1; **Coil**: domínio coiled-coil; **GAP**: domínio GAP. Retirado de (HUANG; MANNING, 2008).

Em 2007, Nakashima e colaboradores observaram que a proteína TBC1D7 (***T**re2-**B**ub2-**C**dc16 **1** **D**omain 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)].

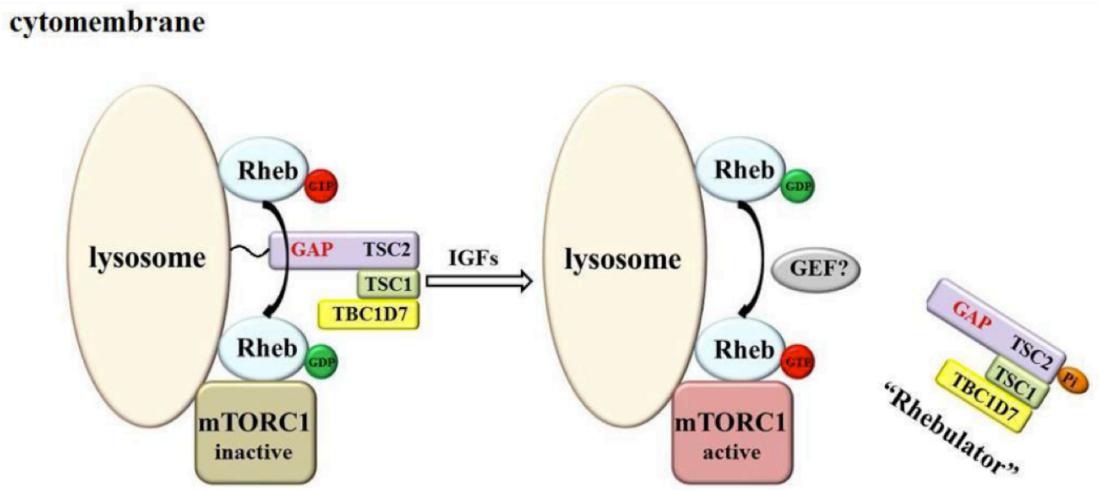


Figura 2. Modelo Rheb-Rhebulator da ativação de mTORC1 por fatores de crescimento. mTOR, Rheb e o complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 estão co-localizados na superfície lisossomal. Estímulos de fatores de crescimento induzem a fosforilação do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7, causando sua dissociação do lisossomo. Essa 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 (***S****erum and* ***G****lucocorticoid-induced protein* ***K****inase* ***1***) e PKCα (***P****rotein* ***K****inase* ***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 GSK3β (***G****lycogen* ***S****ynthase* ***K****inase* ***3β***) também sobre TSC2, de forma regulada por Wnt [***W****in****N****gless-****T****ype*, (INOKI et al., 2006)]. De maneira indireta através de AMPK, TSC2 é ativado por ATM (***A****taxia-****T****elangiectasia*

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).

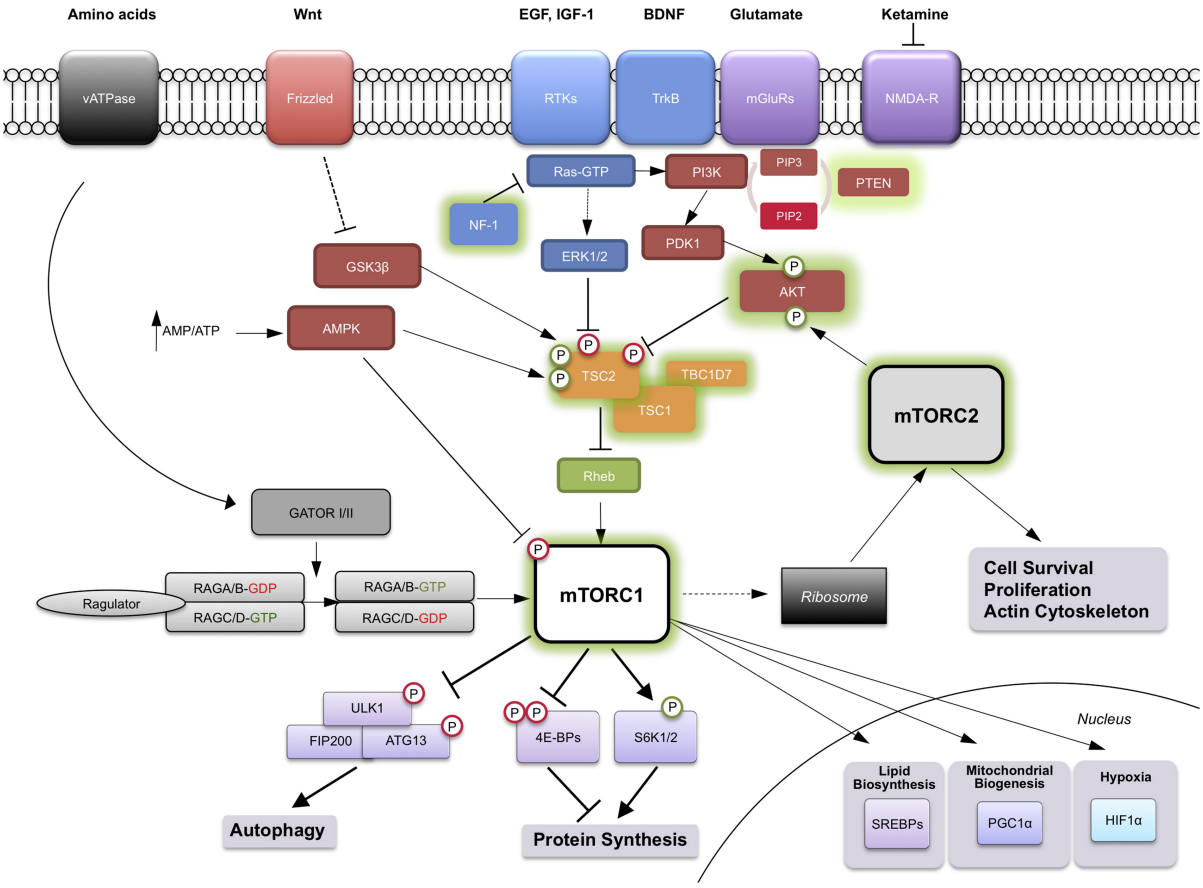


Figura 3. Vias que interceptam os complexos TSC1-TSC2-TBC1D7, mTORC1 e mTORC2, integrando sinais nutricionais, de fatores de crescimento, de citocinas e outros para agir sobre diversas respostas celulares cruciais, como autofagia e síntese proteica. Abreviações: **RTKs**: *receptor tyrosine kinases*; **TrkB**: *tyrosine receptor kinase B*; **mGluRs**: *metabotropic glutamate receptors*; **NMDA-R**: *N-methyl-D-aspartate receptor*; **PGC-1a**: *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 TNFα (***T**umor **N**ecrosis **F**actor-**α***), por exemplo, inibe TSC1 por sua fosforilação por IKKβ (cinase ß do inibidor de NFκB) em Ser487 e Ser511. A via de NFκB 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 imunoistoquímica. 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 ependimárias 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 hipocampais 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 hipocampal 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 hipocampal 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, amídala 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 imunoistoquímica (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 ependimais (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 terão 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 amidala (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.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J mantidos no Biotério de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, em gaiolas adequadas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimentos, de acordo com o protocolo de dieta, como definido abaixo. Foram utilizados machos adultos de oito semanas de idade (início do protocolo). Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP com número de protocolo 183/2013.

Reagentes

Para extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR, foram utilizados TRIzol® (Life Technologies, Inc.), sistema de transcriptase reversa A3500 (Promega, Co.), iniciadores e o sistema SYBR® Green (Life Technologies, Inc.). Anticorpos para a proteína ribossomal S6 (clone 5G10) e sua versão fosforilada em Ser240/244 (clone D68F8) e para 4E-BP1 (policlonal #9452) e sua versão fosforilada em Thr37/46 (clone 236B4) foram adquiridos da Cell Signalling Technology®, e anticorpos secundários da Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Reagentes para tampões e soluções em geral foram adquiridos da Synth®.

Estratégia experimental

Quarenta animais foram divididos em dois grupos e receberam dieta balanceada (N = 20) ou hiperlipídica (N = 20) por oito semanas. Encéfalos de animais alimentados com dieta hiperlipídica (DHL) foram comparados aos encéfalos de animais alimentados com dieta balanceada (DB). Para extração de tecidos para análise de proteínas (N = 15 por grupo) e de transcritos (N = 15 por grupo), cada estrutura, como o cerebelo, por exemplo, foi dividida em seus dois hemisférios. Um deles foi destinado à análise de transcritos por qPCR e o outro destinado à análise proteica por *Western blotting*. Para isso, os animais foram colocados em caixa com CO_2 e rapidamente decapitados e as estruturas removidas foram congeladas em nitrogênio líquido, posteriormente mantidas a -80°C até seu uso. Para detecção de espécies reativas de oxigênio (N = cinco animais por grupo), encéfalos coletados da mesma maneira foram emblocados inteiros em meio OCT Tissue Tek, congelados e mantidos a -80°C até seu uso.

Dietas hiperlipídica e balanceada

Camundongos machos alimentados com dieta balanceada comercial até oito semanas de vida tiveram sua alimentação substituída por uma dieta hiperlipídica (DHL) por oito semanas, quando foram então sacrificados para análise. Como controle,

camundongos machos da mesma idade receberam dieta balanceada (DB) produzida em laboratório. Animais de ambos os grupos foram pesados semanalmente. A composição das dietas foi diferenciada; no entanto, a quantidade calórica ingerida era a mesma entre os grupos. A DB foi composta por 5g/dia de ração e a DHL por 3g/dia de ração, elaborada no laboratório da Profa. Alice Cristina Rodrigues, do Departamento de Farmacologia do ICB/USP. As composições das rações são mostradas nas Tabelas 1 (ingredientes) e 2 (tabela nutricional).

Tabela 1 . Composição de ingredientes das dietas balanceada e hiperlipídica.

Ingredientes	**Balanceada (g)**	**Hiperlipídica (g)**
Amido	467,5	115,5
Caseína	200,0	200,0
Amido de milho dextrinizado	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	312,0
Celulose microfibra (fibra)	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Total	**1000,0**	**1000,0**

Tabela 2. Composição nutricional das dietas balanceada e hiperlipídica, em porcentagem de calorias.

Componente	**Balanceada (%)**	**Hiperlipídica (%)**
Carboidratos	76	26
Proteínas	15	15
Gorduras	9	59
Total	**100**	**100**

Detecção de espécies reativas de oxigênio

A diidroetidina (DHE) é um marcador que ao ser oxidado por superóxido intracelular se liga ao DNA da célula e emite fluorescência vermelha na faixa de comprimento de onda de 605 nm no corpo celular, permitindo avaliar indiretamente o estresse oxidativo pelos níveis de fluorescência.. Para análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares, os animais foram sacrificados por decapitação, os encéfalos dissecados e imersos em meio para congelamento OCT Tissue Tek (Leica Instruments) e congelados em gelo seco. Os encéfalos foram cortados transversalmente em criostato, com secções de 18μm coletadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram incubados em PB contendo o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) a 100μM por 10min, seguido por DHE a 5μM diluída em PB contendo DTPA 100μM, em câmara úmida (5 minutos, a 37º C), protegida de luz. As lâminas foram então lavadas em PB com DTPA 100μM e imediatamente observadas ao microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon DXM 1200).

Em cada dia de experimento, foram processados dois encéfalos, sendo um de cada grupo (DB e DHL) que, posteriormente, foram analisados de forma pareada. Foram observadas as regiões do córtex cingulado, amídala e hipotálamo. Para córtex cingulado e amídala, foram capturadas imagens dessas estruturas em três cortes sequenciais nas alturas aproximadas de AP Bregma 0,86mm (córtex cingulado, Figura 4A) e -1,34mm (amídala, Figura 4B). O hipotálamo foi dividido em quatro regiões distribuídas em dois níveis antero-posteriores: AP Bregma -0,58 e -1,34 (Figura 4C e 4D). Para cada uma dessas regiões, foram também capturadas imagens em três cortes sequenciais.

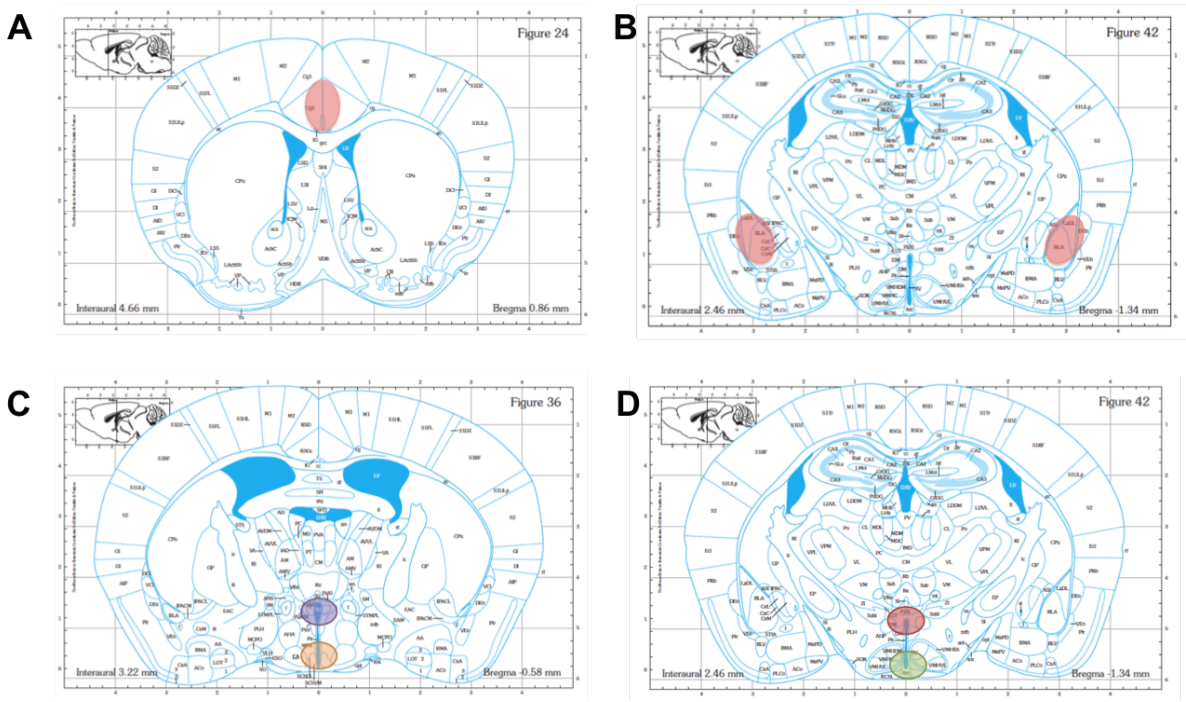


Figura 4. Regiões encefálicas analisadas para detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE. Córtex cingulado e amídala destacados em vermelho em (**A**) e (**B**), respectivamente. As quatro regiões do hipotálamo destacadas em roxo, laranja, vermelho e verde em (**C**) e (**D**), correspondem respectivamente as regiões I, II, III e IV (ver Figura 8). Adaptado de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

A marcação foi quantificada por densidade integrada através do programa ImageJ (GALLAGHER, 2010). A quantificação foi feita em áreas padronizadas para cada estrutura (ou sub-região, no caso do hipotálamo). Logo, para cada animal, foram obtidas três medidas de cada estrutura ou sub-região e a média desses valores. Medidas discrepantes, determinadas tanto numericamente quanto pela qualidade da imagem, foram desconsideradas desse cálculo. Os resultados foram analisados de forma pareada, de forma que fossem comparados encéfalos processados no mesmo dia.

PCR quantitativa

Para análise da expressão de transcritos de *Tsc1* e *Tsc2* em estruturas encefálicas de camundongos submetidos a DB e DHL, utilizamos a técnica de PCR após transcrição reversa (RT-PCR) em análise quantitativa pela incorporação de corante fluorescente *sybr green*, aqui abreviada por qPCR. A extração do RNA total foi realizada com TRIzol®, de

acordo com as recomendações do fabricante. O RNA obtido foi dosado no Nanodrop (Thermo Scientific, Inc.) e 1μg submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, para verificação da sua integridade. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA para cada amostra, de acordo com as instruções do fabricante do sistema de transcriptase reversa A3500 Promega, empregando oligonucleotídeo dT. Amostras da mesma estrutura encefálica, na mesma condição (com ou sem jejum) foram sintetizadas no mesmo experimento. O cDNA resultante foi submetido à qPCR. Para essas reações, foram preparadas reações em volume final de 10 μL contendo a mistura de reagentes SYBR® Green 1X contendo tampão, nucleotídeos, polimerase de DNA e o corante *sybr green*, concentrações variadas de iniciadores *sense* ou *forward* (S ou *fw*) e anti-sense ou *reverse* (A ou *rv*) para *Tsc1* (Gene ID 64930), *Tsc2* (Gene ID 22084), *Rplp0* (*Ribosomal protein, large, P0*, Gene ID 11837), *B2m* (*beta-2 microglobulina*, Gene ID 12010) ou *Gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, Gene ID 14433), concentrações variadas de cDNA e água deionizada tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) para completar o volume da reação. Após averiguação da eficiência de reação para volumes diferentes de cDNA e cada iniciador de PCR, a análise apresentada foi realizada com 40 ng de cDNA e as seguintes concentrações de pares de iniciadores: 200 nM para *Tsc1* e *Tsc2*, 50 nm para *Rplp0* e *B2m*, e 80 nm para *Gapdh*. A qPCR foi realizada no 7500 Real Time PCR System (Life Technologies, Inc.) nas condições sequenciais: (i) ativação da polimerase de DNA a 50°C por dois minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, (ii) 45 ciclos de amplificação com desnaturação de duplas fitas a 95°C por 15 segundos, seguida de emparelhamento de iniciadores e amplificação a 60°C por um minuto e (iii) dissociação de iniciadores em temperaturas crescentes de 60°C a 95°C. As sequências dos pares de iniciadores, desenhados nos softwares Beacon Designer™ (Premier Biosoft) e IDT SciTools Real Time PCR, e o tamanho de cada amplicom em pares de bases (pb) são mostrados a seguir:

- *Tsc1* (147 pb)
  - Tsc1-2S: CAGGAGCCACACGATAAG
  - Tsc1-2A: CAGAAGAGGTGCTTGAGAG
- *Tsc2* (120 pb)
  - Tsc2-2S: GAGAGGTTCTTCAGGAATG
  - Tsc2-2A: GACCACCGAGTTAATCAG
- *Gadph* (110 pb)
  - Gapdh-fw: CTCCCACTCTTCCACCTTCG
  - Gapdh-rv: CCACCACCCTGTTGCTGTAG
- *B2m* (166 pb)
  - B2m-fw: CATGGCTCGCTCGGTGACC
  - B2m-rv: AATGTGAGGCGGGTGGAACTG
- *Rplp0* (292 pb)
  - Rpl-fw: TAAAGACTGGAGACAAGGTG
  - Rpl-rv: GTGTACTCAGTCTCCACAGA

Western blotting

Os animais foram rapidamente decapitados e as estruturas encefálicas de interesse coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas a -80°C até o uso. As amostras foram lisadas em homogeneizador com tubo e haste com pistilo de polipropileno e sonicadas a 4°C em tampão de extração (tris pH 7,4 100mM; EDTA 10mM; PMSF 2mM; aprotinina 8μg/mL; NaF a 10mM e Na_3VO_4 a 1mM). Em seguida foi adicionado triton X-100 para concentração final de 1%, as amostras incubadas a 4°C por 30 minutos e então centrifugadas por 20 minutos a 15.300 x *g* e o precipitado desprezado. A partir de uma amostra do sobrenadante foi feita a determinação da concentração proteica através do método de Bradford e o restante tratado com tampão de Laemmli com DTT a 100mM, fervido por 5 minutos e armazenado a -20°C. Setenta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida em concentrações variadas, transferidas para membrana de nitrocelulose, e coradas com Ponceau 1% em ácido acético 1%. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com caseína a 2% (Novagen/Merck KGaA) por uma hora e incubadas com os anticorpos

primários de interesse por 16 horas, a 4°C, seguido por anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 2h. Bloqueio e anticorpos foram diluídos em tampão TBS-T (tris 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%). Na solução de anticorpo secundário, foi adicionado 1% de albumina sérica bovina. Para detecção, as membranas foram incubadas em solução de ECL comercial de acordo com as instruções do fabricante (BioRad Clarity, Millipore ou Amersham ECL GE) e escaneadas no sistema Li-Cor C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Inc.). A análise densitométrica de bandas foi feita através do programa que acompanha esse sistema, Image Studio, ou através do programa ImageJ. Após a revelação as membranas foram coradas com preto de amido 0,1% em ácido acético 10%, escaneadas e quantificadas com a ferramenta de quantificação de gel do programa ImageJ.

Análise estatística

Os valores de massa corpórea dos animais foram submetidos ao teste de Anova de duas vias, com pós teste de Sidak, com significância de $p<0,05$. A análise estatística da detecção de EROs por DHE foi feita através de teste *t* de Student pareado, com pareamento entre encéfalos das diferentes dietas processados no mesmo dia, com significância quando $p<0,05$.

As análises de transcritos por qPCR foi baseada em (RIEU; POWERS, 2009). Para cada amostra foram montadas reações em triplicatas que geraram, cada uma, um valor de Cq (ciclo de quantificação). Para uma triplicata, foi excluído o valor de Cq que discrepou em mais de 0,5°C dos outros e uma média foi obtida para os valores restantes. Esta média foi utilizada para calcular o valor de RQ (do inglês *relative quantity*), $RQ=E^{-Cq}$, onde E representa eficiência da reação, calculada por uma curva-padrão para cada par de iniciadores. Para normalização, dentro da mesma amostra, o valor RQ de um gene de interesse, *Tsc1* ou *Tsc2*, foi dividido pela RQ de um normalizador e/ou da média de RQs de dois normalizadores (*Gapdh, Rplp0, B2m*). Os valores normalizados foram analisados

através de teste *t* de Student (significância $p<0,05$), após identificação e exclusão de eventuais pontos discrepantes pela análise ROUT (Q=1%). Foi também realizada a análise de variância pelo teste F. Quando as variâncias eram significativamente diferentes entre os grupos ($p<0,05$) o teste *t* de Student foi refeito com a correção de Welch, que assume variâncias diferentes. Valores não normalizados de RQ dos genes normalizadores para cada estrutura foram também comparados entre animais alimentados com DB e DHL, e somente quando não havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos esse normalizador foi usado.

Os valores obtidos por análise densitométrica de bandas dos diferentes anticorpos no *Western blot* foram normalizados pelos valores da análise de preto de amido e comparados entre grupos através do teste t sem pareamento, com significância quando $p<0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism® 6.

2.4. RESULTADOS

Massa corpórea

Em animais alimentados com dieta hiperlipídica (DHL; n=20) houve ganho de massa corpórea estatisticamente significativo a partir da segunda semana de idade em relação aos animais alimentados com dieta balanceada (DB; n=19, Figura 5). Ao final do protocolo, a massa média do grupo alimentado com DHL (36,35g) foi 34% maior do que a massa média do grupo alimentado com DB (26,5g).

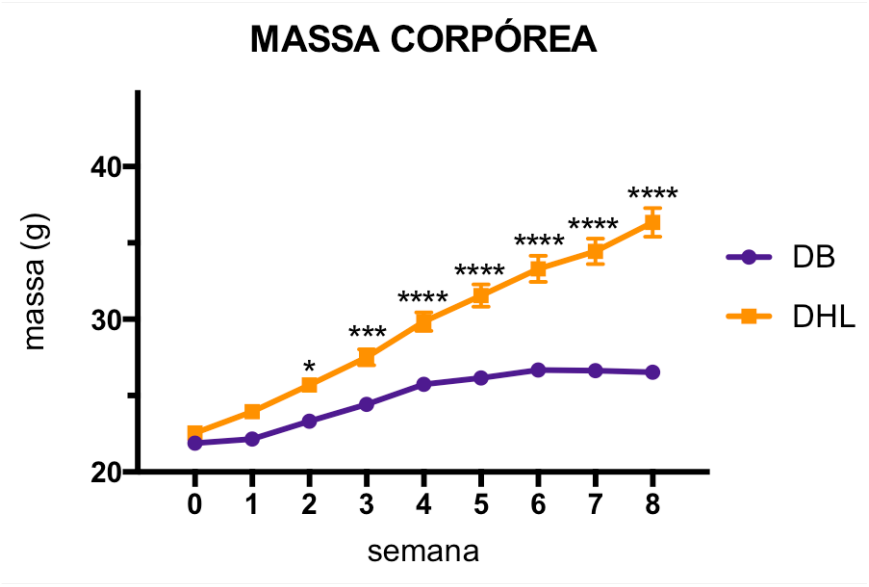


Figura 5. Massa corpórea em gramas de animais alimentados com dieta balanceada (**DB**) ou dieta hiperlipídica (**DHL**) em relação ao número de semanas após o início destas (0), quando os animais tinham oito semanas de vida. O grupo DHL apresenta aumento significativo de massa em relação ao grupo DB a partir da segunda semana. Teste de Anova de duas vias com pós-teste de Sidak, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

Detecção de espécies reativas de oxigênio

Para comparar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) entre encéfalos de animais submetidos a DB ou a DHL, foi utilizada a marcação por dihidroetidina (DHE), que ao ser oxidado se liga ao DNA da célula emitindo fluorescência vermelha. Foram escolhidas para análise três diferentes regiões do encéfalo: córtex cingulado, amídala e hipotálamo. Esta seleção foi justificada pelo envolvimento do córtex cingulado e amídala em circuitos relacionados a recompensa e prazer associados à alimentação e pelo envolvimento do hipotálamo na homeostase energética (ROLLS, 2016). Os animais foram submetidos a jejum de 6h antes da eutanásia.

Houve aumento significativo da intensidade de fluorescência no córtex cingulado de animais alimentados com DHL em relação a animais alimentados com DB (Figura 6, N = 5 para cada grupo, 1,000 para DB *Vs.* 1,305 para DHL; p*=0,0393).

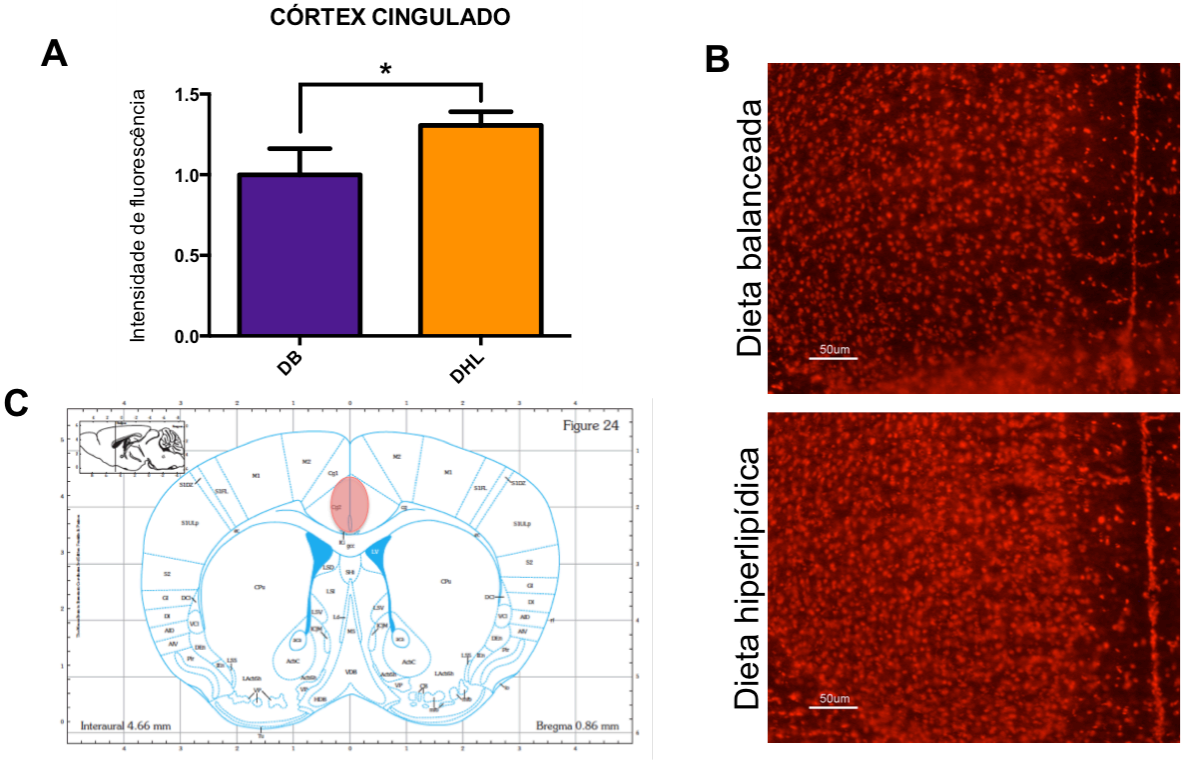


Figura 6. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE no córtex cingulado. (**A**) Gráfico mostrando a intensidade do sinal de fluorescência obtida com o corante dihidroetídeo em seções de 18µm do córtex cingulado (**B**) de animais submetidos às dietas balanceada (DB) e hiperlipídica (DHL). A região encefálica analisada é mostrada em (**C**). Teste *t* de Student comparando a média de três seções de cada animal, com pareamento por tecidos processados no mesmo dia, no total de cinco animais por grupo. A média do grupo controle foi definida como 1,0 (100%). Houve aumento estatisticamente significante, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001]. Barra de escala: 50µm. Ilustração da estereotaxia do cérebro de camundongo adaptada de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Amídala (Figura 7) e hipotálamo (Figura 8) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos DB e DHL para a intensidade do sinal quantificado a partir da imunofluorescência (N = 4 animais por grupo, 1,000 para DB *Vs.* 0,9900 para DHL; *p*=0,9261 para amídala; N = 4 animais por grupo). A análise do hipotálamo foi realizada

em dois níveis, em altura mais dorsal e mais ventral, totalizando quatro regiões. Os dados, tanto analisados por sub-área hipotalâmica ou analisados em conjunto, não revelaram diferenças significativas (1,000 para DB *Vs.* 0,8512 para DHL, p=0,3811 para região I; 1,000 para DB *Vs.* 0,8462 para DHL, p=0,4549 para região II; 1,000 para DB *Vs.* 1,027 para DHL, p=0,8463 para região III; 1,000 para DB *Vs.* 1,040 para DHL, p=0,7168 para região IV).

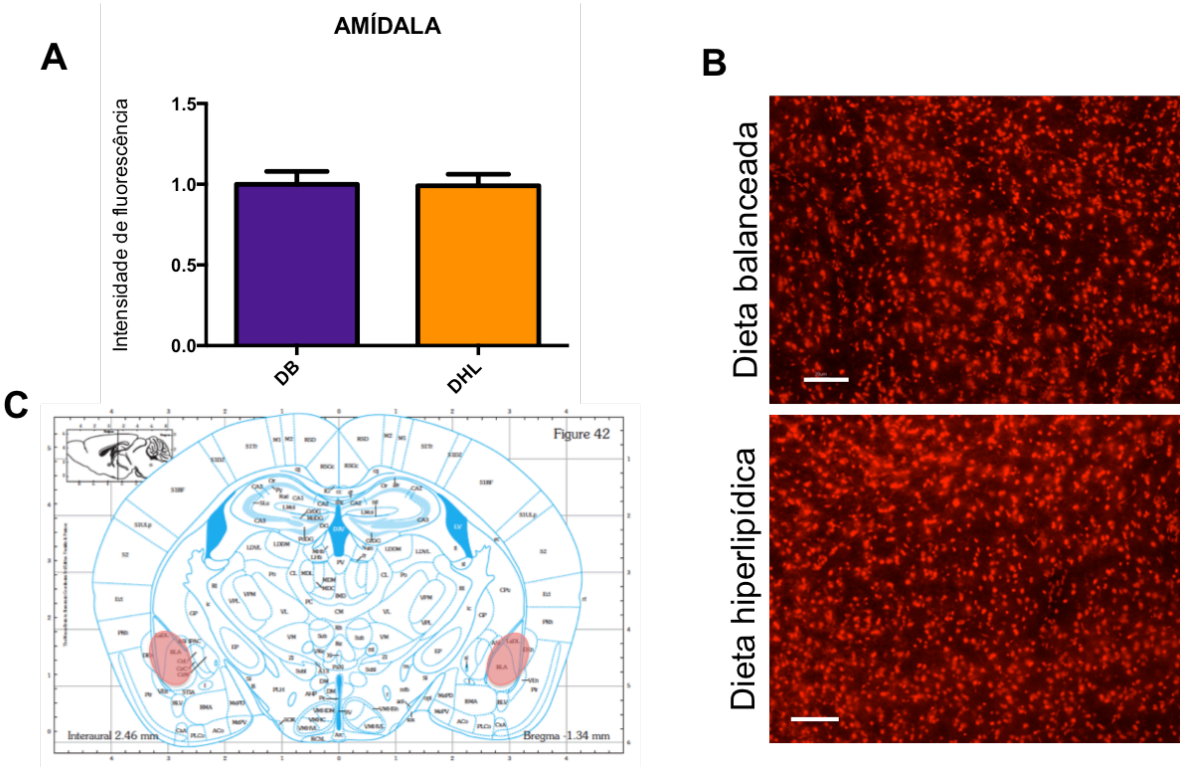


Figura 7. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE na amídala. (**A**) Gráfico mostrando a intensidade do sinal de fluorescência obtida com o corante dihidroetídeo em seções de 18µm da amídala (**B**) de animais submetidos às dietas balanceada (DB) e hiperlipídica (DHL). A região encefálica analisada é mostrada em (**C**). Teste *t* de Student comparando a média de três seções de cada animal, com pareamento por tecidos processados no mesmo dia, no total de quatro animais por grupo. A média do grupo controle foi definida como 1,0 (100%). Não houve diferença estatisticamente significante, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001]. Barra de escala: 50µm. Ilustração da estereotaxia do cérebro de camundongo adaptada de FRANKLIN & PAXINOS, 2007.

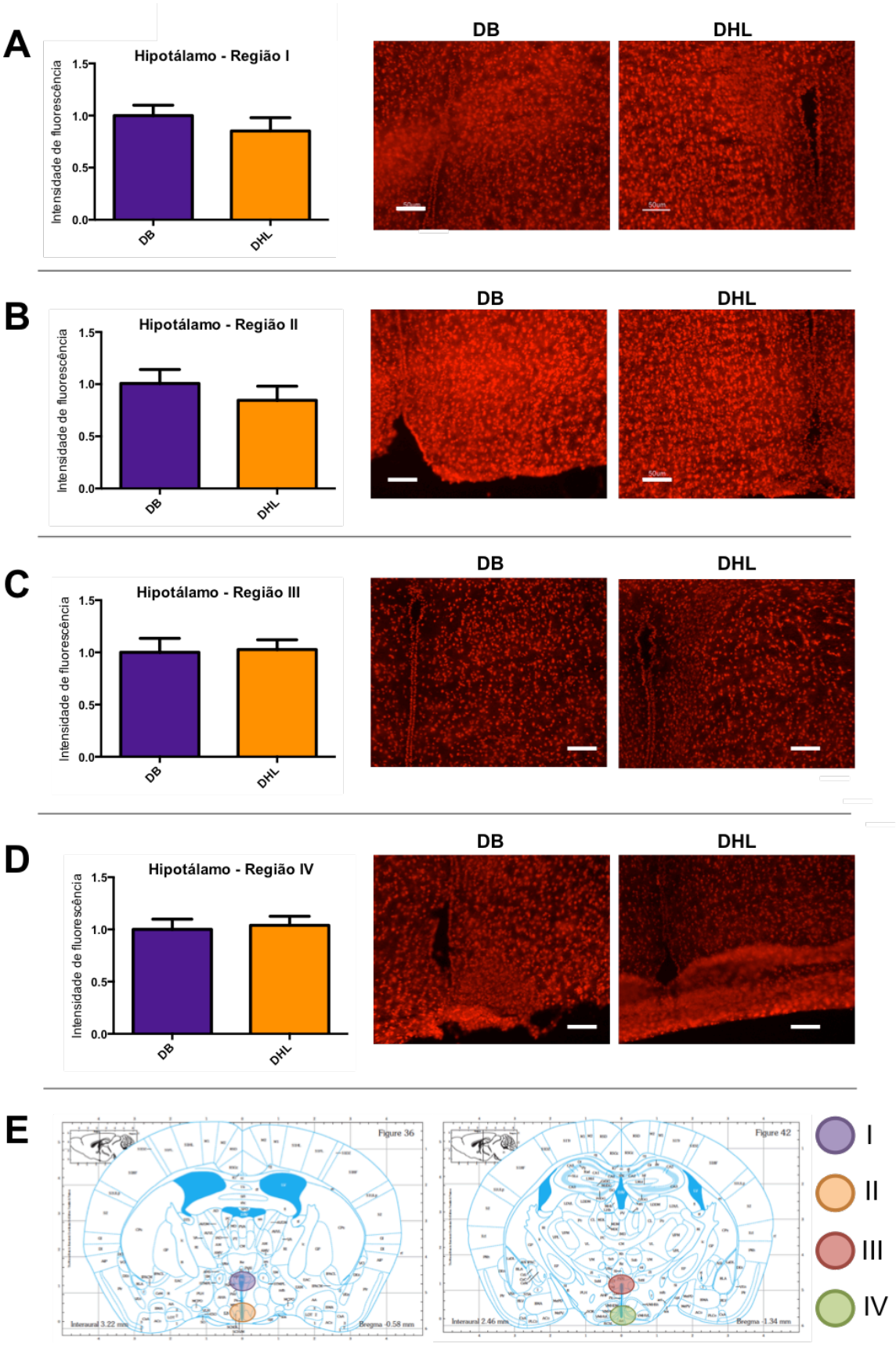


Figura 8. Detecção de espécies reativas de oxigênio por DHE no hipotálamo. (**A**), (**B**), (**C**) e (**D**) mostram, à esquerda, gráficos com a intensidade do sinal de fluorescência obtida com o corante

dihidroetídeo em seções de 18μm do hipotálamo de animais submetidos às dietas balanceada (DB) e hiperlipídica (DHL). Quatro diferentes regiões do hipotálamo foram estabelecidas e analisadas separadamente: (**A**) I, (**B**) II, (**C**) III e (**D**) IV. Essas regiões estão mostradas em (**E**) em roxo (I), laranja (II), vermelho (III) e verde (IV). Teste *t* de Student comparando a média de três seções de cada animal, com pareamento por tecidos processados no mesmo dia, no total de quatro animais por grupo. A média do grupo controle foi definida como 1,0 (100%). Não houve diferença estatisticamente significante em nenhuma das regiões, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$]. Barra de escala: 50μm. Ilustração da estereotaxia do cérebro de camundongo adaptada de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Análise da expressão dos transcritos de *Tsc1* e *Tsc2*

A quantidade de RNAm de *Tsc1* e *Tsc2* foi analisada por meio de RT-PCR quantitativa (qPCR) de cDNA no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, mesencéfalo, estriado e hipotálamo, comparando-se animais alimentados com DHL àqueles alimentados com DB.

O córtex cerebral foi coletado em toda a sua extensão de animais submetidos a jejum de seis horas (N = 5 para DB e N = 4 para DHL) antes da eutanásia ou sem jejum (N = 10 para cada grupo). Nessa região, observou-se redução na quantidade de RNAm de *Tsc1* (p=0,0268, Figura 9) e *Tsc2* (p=0,0484, Figura 10) quando os animais foram submetidos a jejum prévio. Não houve alteração nos níveis desses transcritos quando os animais foram sacrificados sem jejum prévio (p=0,86 para *Tsc1* e p=0,7815 para *Tsc2*), assim como quando os dados desses dois subgrupos (com e sem jejum) foram analisados em conjunto (p=0,7015 para *Tsc1* e p=0,8212 para *Tsc2*, Figuras 9 e 10).

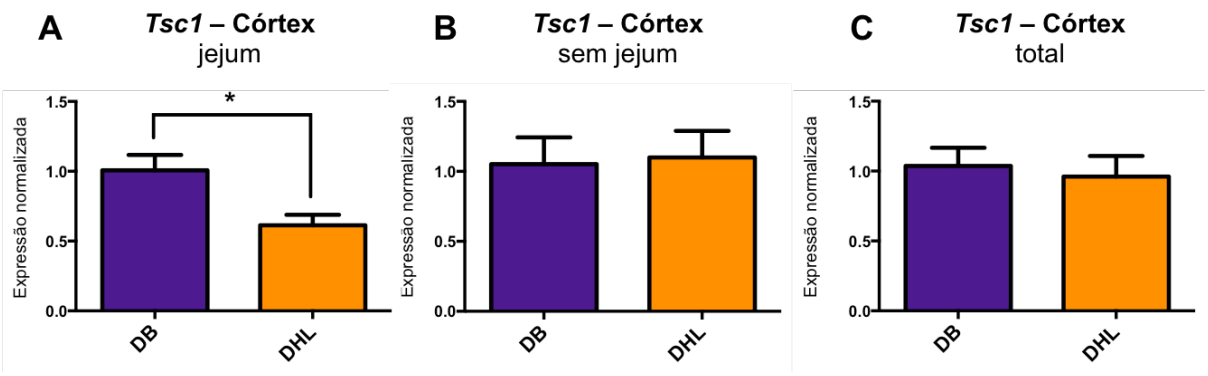


Figura 9. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* no córtex cerebral total de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Observa-se redução significante (*, p<0,05) dos níveis de RNAm de *Tsc1* quando os animais foram sacrificados após o jejum [(**A**), N = 5 para DB e N = 4 para DHL], o que não ocorre quando os animais foram sacrificados sem jejum [(**B**), N = 10 para cada grupo] ou quando são analisados independentemente da ocorrência deste [(**C**), somatória de com e sem jejum, N = 15 para DB e N = 14 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Gapdh*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

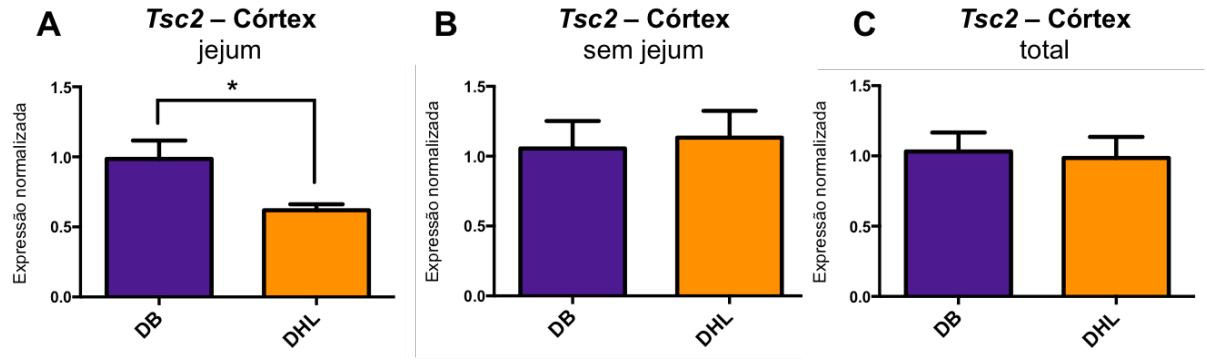


Figura 10. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc2* no córtex cerebral total de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Observa-se redução significante (*, p<0,05) dos níveis de RNAm de *Tsc1* quando os animais foram sacrificados após o jejum [(**A**), N = 5 para DB e N = 4 para DHL], o que não ocorre quando os animais foram sacrificados sem jejum [(**B**), N = 10 para cada grupo] ou quando são analisados independentemente da ocorrência deste [(**C**), somatória de com e sem jejum, N = 15 para DB e N = 14 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Gapdh*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1.0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

Assim como para o córtex cerebral, o cerebelo total foi coletado de animais submetidos a jejum de seis horas antes da eutanásia (N=3 para cada grupo) e de animais não submetidos a jejum (N=7 para DB e N=8 para DHL). Não houve alterações nos níveis de transcrito de *Tsc1* (Figura 11) e *Tsc2* (Figura 12) em nenhuma das situações, assim como quando os subgrupos foram analisados de forma conjunta (p=0,0976 para *Tsc1* e p=0,1621 para *Tsc2* com jejum; p=0,0766 para *Tsc1* e p=0,5709 para *Tsc2* sem jejum; p=0,5227 para *Tsc1* e p=0,8158 para *Tsc2* na análise conjunta dos dois subgrupos).

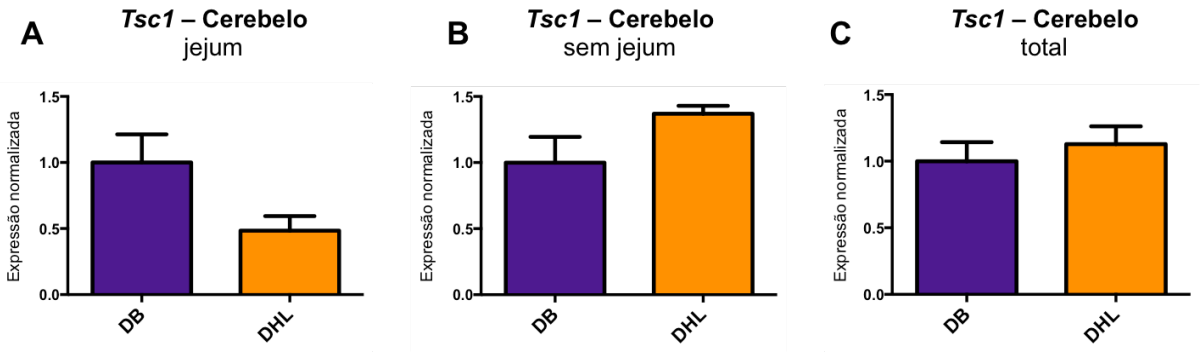


Figura 11. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* no cerebelo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Não há diferença significante entre os grupos, tanto em animais submetidos a jejum [(**A**), N = 3 para cada grupo] quanto em animais não submetidos [(**B**), N = 7 para DB e N = 8 para DHL], assim como quando a análise é feita de forma independente do jejum [(**C**), somatória dos com e sem jejum, N = 10 para DB e N = 11 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Rplp0*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

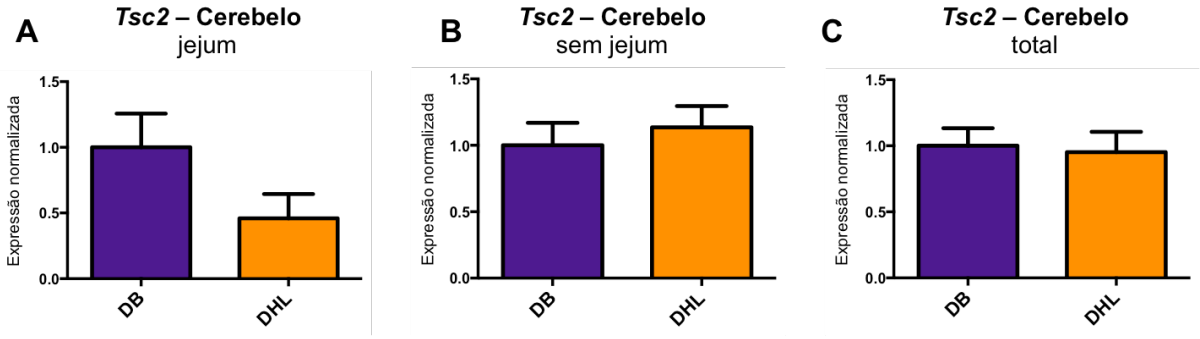


Figura 12. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc2* no cerebelo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Não há diferença significante entre os grupos, tanto em animais submetidos a jejum [(**A**), N = 3 para cada grupo] quanto em animais não submetidos [(**B**), N = 7 para DB e N = 8 para DHL], assim como quando a análise é feita de forma independente do jejum [(**C**), somatória dos com e sem jejum, N = 10 para DB e N = 11 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Rplp0*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

O hipocampo foi coletado de animais submetidos (N=5 para DB e N=4 para DHL) ou não (N=5 para DB e N=8 para DHL) a jejum de seis horas antes da eutanásia. Nesta estrutura, houve redução estatisticamente significativa nos níveis de transcritos de *Tsc1* (p=0,0064, Figura 13) e *Tsc2* (p=0,0322, Figura 14), em animais não submetidos a jejum. Não houve alteração em animais submetidos ao jejum para nenhum dos transcritos (p=0,8636 para *Tsc1* e p=0,8830 para *Tsc2*), e somente a redução nos níveis de *Tsc2* se manteve quando os dois subgrupos foram analisados de forma conjunta (p=0,3207 para *Tsc1* e p=0,0455 para *Tsc2*).

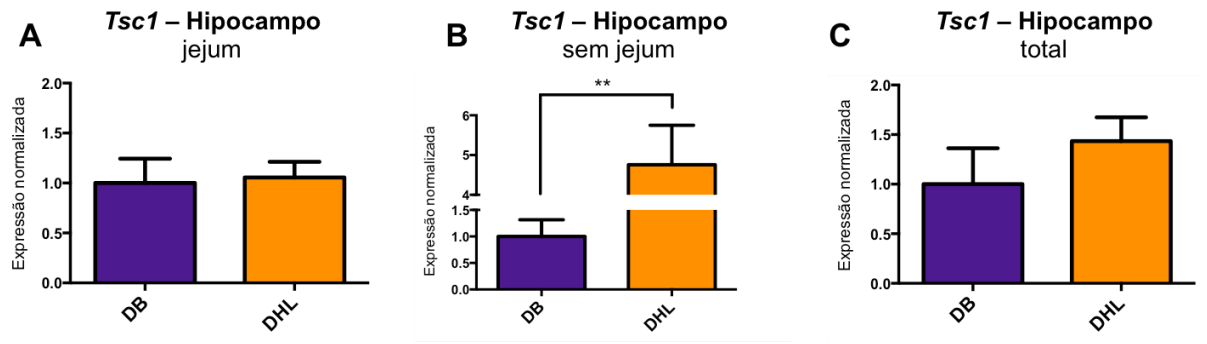


Figura 13. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* no hipocampo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Observa-se aumento significativo (**; 0,01>p>0,001) do transcrito em animais não submetidos ao jejum [(**B**), N = 5 para DB e N = 8 para DHL], o que não ocorre em animais submetidos ao jejum [(**A**), N = 5 para DB e N = 4 para DHL] ou quando a análise é feita de forma independente deste [(**C**), somatória dos com e sem jejum, N = 11 para DB e N = 12 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Rplp0*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento (**A** e **C**) e teste t sem pareamento com correção de Welch (**B**), com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

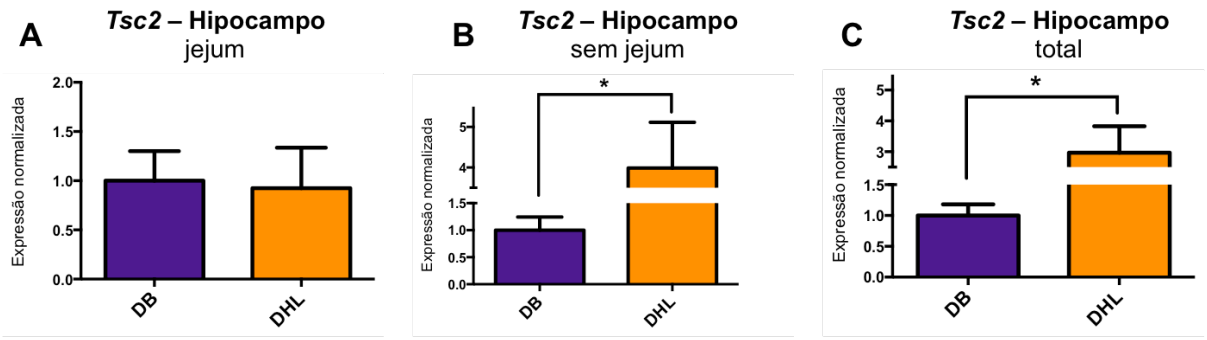


Figura 14. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc2* no hipocampo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Observa-se aumento significativo (*; p<0,05) do transcrito em animais não submetidos ao jejum [(**B**) N = 5 para DB e N = 8 para DHL] e quando a análise é feita de forma independente deste [(**C**) somatória dos com e sem jejum, N = 11 para DB e N = 12 para DHL]. Não há diferenças significativas em animais submetidos ao jejum [(**A**) N = 5 para DB e N = 4 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Rplp0*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento (**A**) e teste *t* de Student sem pareamento com correção de Welch (**B** e **C**), com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

Não houve alteração nos níveis de *Tsc1* e *Tsc2* no mesencéfalo de animais submetidos à DHL em comparação aos animais submetidos à DB, com ou sem jejum prévio de seis horas (Figuras 15 e 16; N=4 para DB e N=3 para DHL, *p*=0,9719 para *Tsc1* e *p*=0,7790 para *Tsc2* em animais submetidos a jejum; N=7 para DB e N=5 para DHL, *p*=0,1935 para *Tsc1* e *p*=0,4371 para *Tsc2* em animais não submetidos a jejum; e *p*=0,3445 para *Tsc1* e *p*=0,6573 para *Tsc2* na análise conjunta dos dois subgrupos).

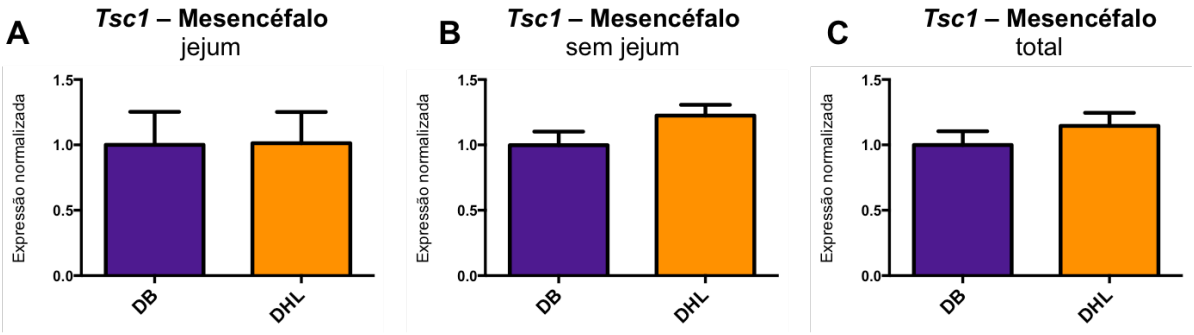


Figura 15. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* no mesencéfalo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Não há diferença significante entre os grupos, tanto em animais submetidos a jejum [(**A**), N = 4 para DB e N = 3 para DHL] quanto em animais não submetidos [(**B**), N = 7 para DB e N = 5 para DHL], assim como quando a análise é feita de forma independente do jejum [(**C**), somatória dos com e sem jejum, N = 11 para DB e N = 9 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Gapdh*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

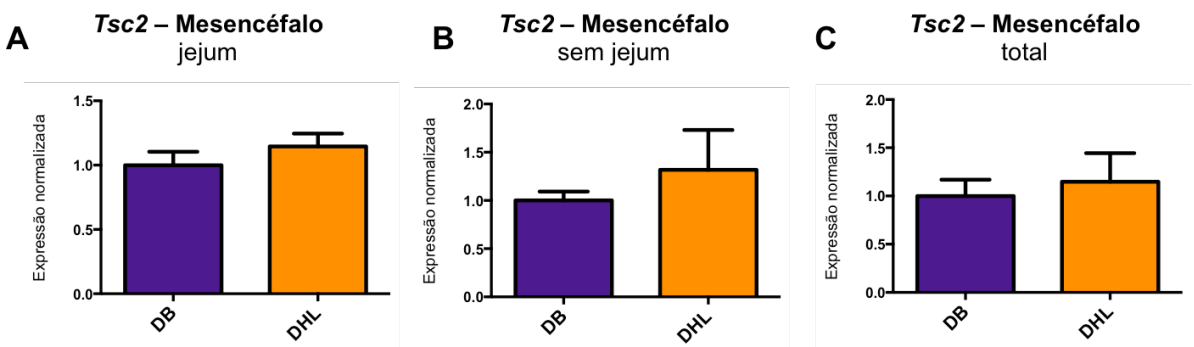


Figura 16. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc2* no mesencéfalo de animais alimentados com DHL ou DB, submetidos (**A**) ou não (**B**) a jejum de seis horas antes da eutanásia, ou analisados de forma independente deste (**C**). Não há diferença significante entre os grupos, tanto em animais submetidos a jejum [(**A**), N = 4 para DB e N = 3 para DHL] quanto em animais não submetidos [(**B**), N = 7 para DB e N = 5 para DHL], assim como quando a análise é feita de forma independente do jejum [(**C**), somatória dos com e sem jejum, N = 11 para DB e N = 9 para DHL]. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *Gapdh*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

O estriado e o hipotálamo de animais submetidos a DB e DHL foram analisados somente na ausência de jejum prévio à eutanásia. No estriado (N=9 para DB e N=10 para DHL), houve aumento significativo do RNAm de *Tsc1* em animais submetidos à DHL em relação a animais submetidos à DB (p=0,0453), o que não ocorreu com o RNAm de *Tsc2* (p=0,1859, Figura 17). O mesmo foi observado no hipotálamo (N=9 para DB e N=10 para DHL, p=0,0075 para *Tsc1* e p=0,227 para *Tsc2*, Figura 18).

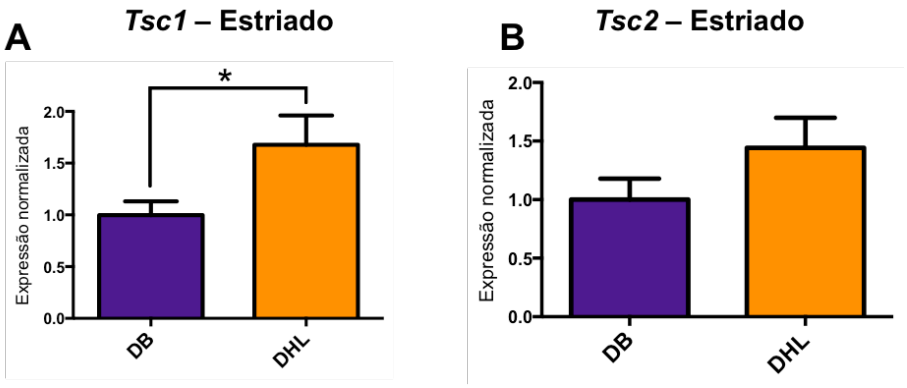


Figura 17. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* (**A**) e *Tsc2* (**B**) no estriado de animais em DHL (N = 9) ou DB (N = 10), não submetidos a jejum. Há aumento do transcrito de *Tsc1* em animais alimentados com DHL em relação a animais alimentados com DB. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *B2m*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento com correção de Welch (**A**) e teste *t* de Student sem pareamento (**B**), com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

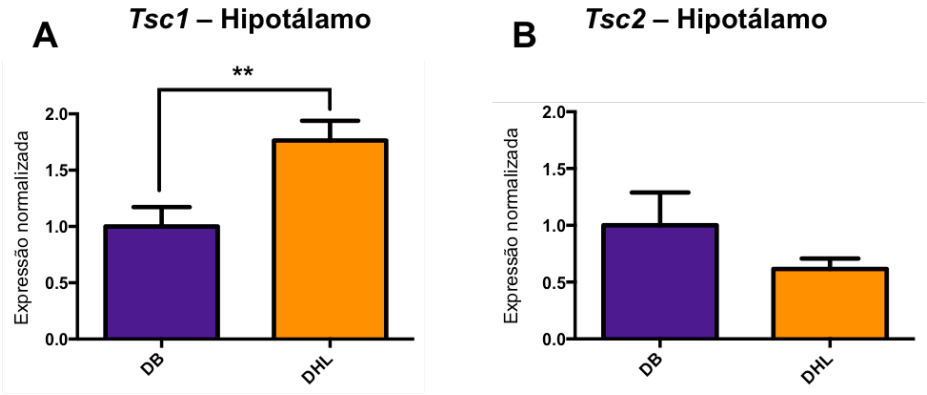


Figura 18. Análise quantitativa de RNAm de *Tsc1* (**A**) e *Tsc2* (**B**) no hipotálamo de animais alimentados com DHL (N = 9) ou DB (N = 10), não submetidos a jejum. Observa-se aumento significativo do transcrito de *Tsc2*, o que não ocorre com *Tsc1*. Os níveis de RNAm foram normalizados pela quantidade de transcrito de *B2m*, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento (**A**) e teste *t* de Student sem pareamento com correção de Welch (**B**), com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

Análise da expressão dos alvos de mTORC1

Uma forma comumente aceita para análise da atividade da via TSC/mTORC1 é a avaliação da expressão dos alvos desta cinase e de sua fosforilação específica. Assim, utilizamos anticorpos específicos para análise da expressão da proteína ribossomal S6 (anti-S6) e sua fosforilação nos resíduos Ser240/244 (anti-pS6); e do ligante do fator de iniciação de tradução 4E, 4E-BP1 (anti-4EBP1) e e sua fosforilação nos resíduos Thr37/46 (anti-p4EBP1). Esse estudo foi realizado com córtex cerebral, cerebelo e hipotálamo de animais submetidos à DB ou DHL.

O *immunoblotting* de pS6 apresentou uma banda única com migração à eletroforese em gel de poliarilamida com massa esperada (32kDa), enquanto S6 produziu uma banda dupla com essa massa aproximada. Não houve alteração nos níveis dessa proteína, fosforilada ou não, em nenhuma das três estruturas quando animais submetidos a DHL,

sem jejum, foram comparados aos animais submetidos a DB (*Córtex*: N=7 para DB e N=8 para DHL, p=0,5983 para pS6 e p=0,7185 para S6; *Cerebelo*: N=6 para DB e N=8 para DHL, p=0,6387 para pS6 e p=0,9885 para S6; *Hipotálamo*: N=7 para cada grupo, p=0,8217 para pS6 e p=0,1426 para S6; Figuras 19 e 20). A razão entre a média da intensidade da banda de *Western blot* para anticorpo anti-pS6 e a intensidade média para as bandas com anti-S6 foi semelhante entre grupos (p=0,1683 para córtex; p=0,8621 para cerebelo e p=0,6087 para hipotálamo; Figura 18).

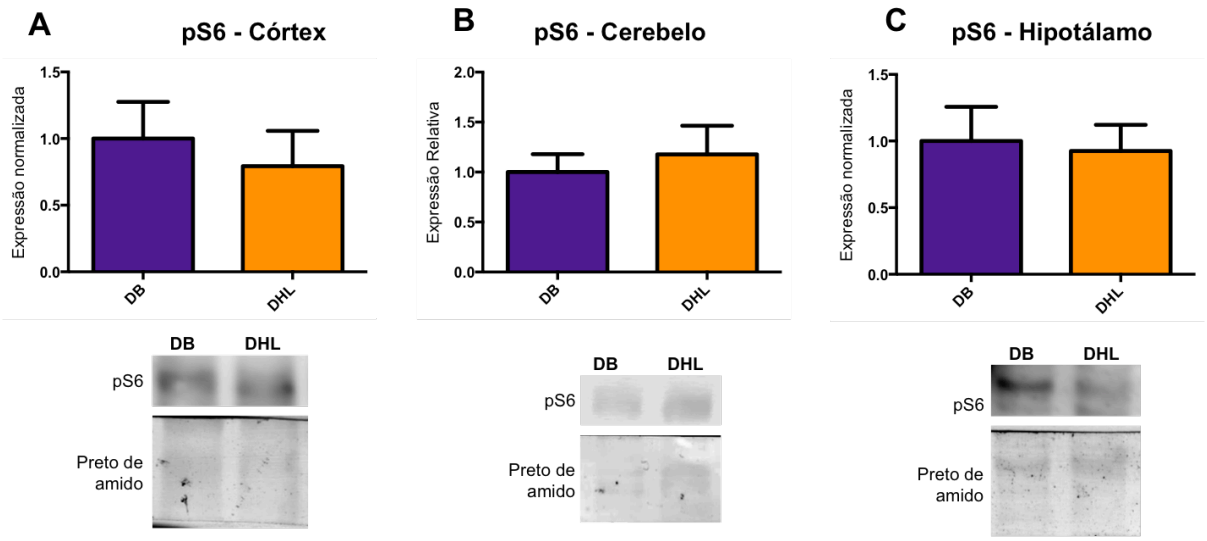


Figura 19. Análise dos níveis de pS6 no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais alimentados com DB ou DHL, sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

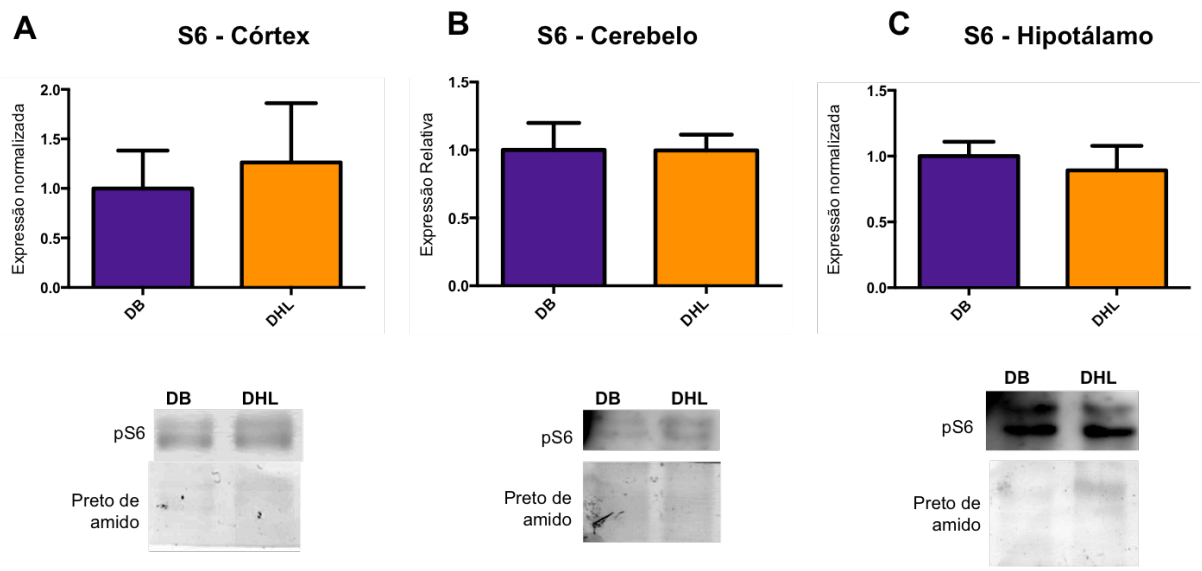


Figura 20. Análise dos níveis de S6 total no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais em DB ou DHL sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

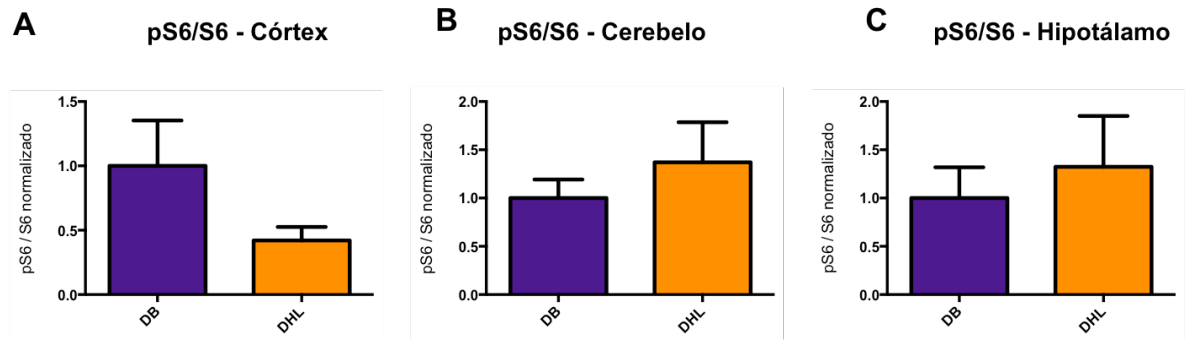


Figura 21. Análise da razão entre as intensidades médias das bandas de *Western blot* com anticorpos anti-pS6 e anti-S6 no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais alimentados com DB ou DHL, sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

Western blotting com anticorpo que detecta o total da proteína 4E-BP1 produziu bandas únicas no córtex cerebral e quatro bandas no cerebelo e hipotálamo, com migração esperada para a masssa (15-20kDa). Não houve alteração nos níveis dessa

proteína, fosforilada ou não, em nenhuma das três estruturas quando animais submetidos a DHL foram comparados com animais submetidos a DB, não submetidos ao jejum (*Córtex*: N=7 para cada grupo, *p*=0,5010 para *p*4E-BP1 e *p*=0,6698 para 4E-BP1; *Cerebelo*: N=7 para DB e N=8 para DHL, *p*=0,2204 para p4E-BP1 e *p*=0,7213 para 4E-BP1; *Hipotálamo*: N=7 para cada grupo, *p*=0,3654 para p4E-BP1 e *p*=0,4211 para 4E-BP1; Figuras 22 e 23). A razão entre as intensidades médias das bandas de *Western blot* com anticorpos anti-p4E-BP1 e anti-4E-BP1 também não foi alterada entre os grupos (*p*=0,4511 para cerebelo e *p*=0,8201 para hipotálamo; Figura 24).

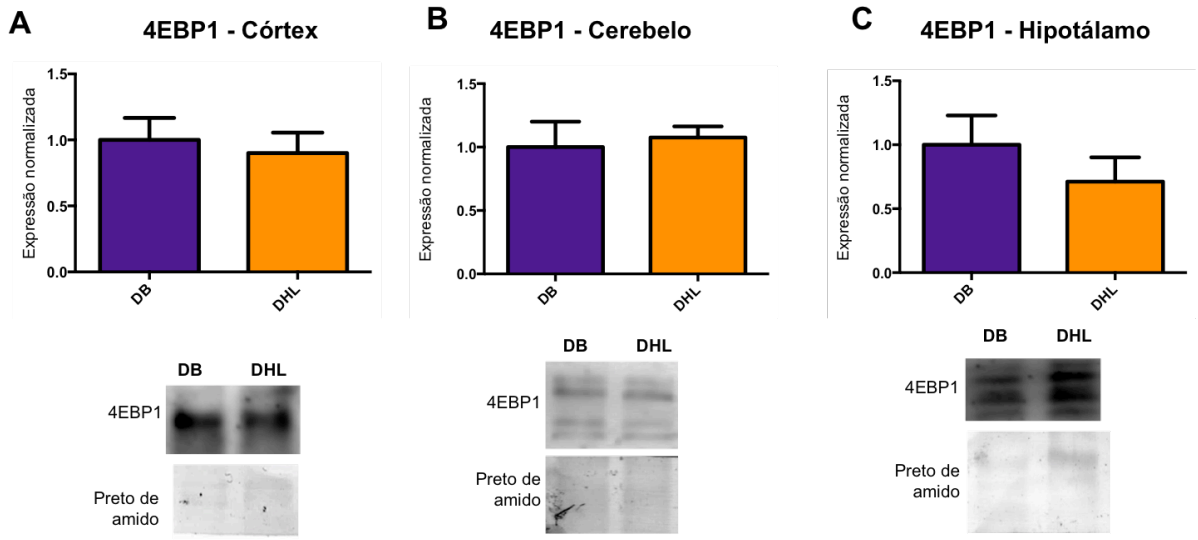


Figura 22. Análise dos níveis de 4E-BP1 no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais submetidos a DB ou DHL, sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

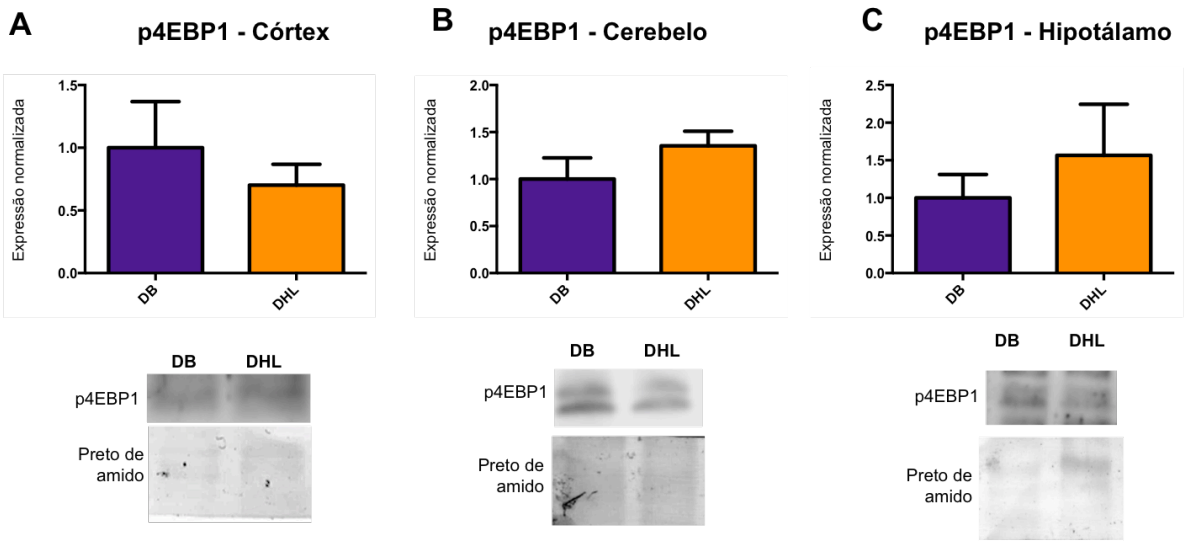


Figura 23. Análise dos níveis de p4E-BP1 no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais submetidos a DB ou DHL, sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

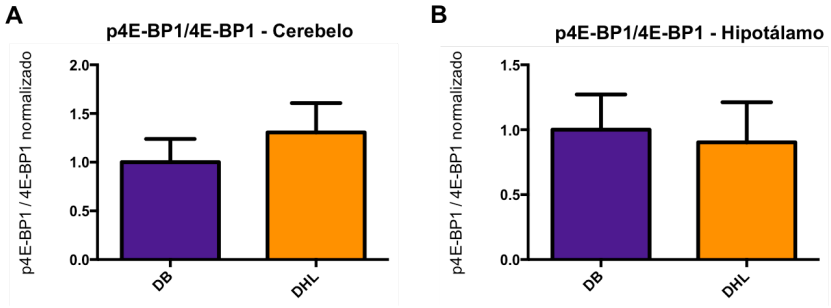


Figura 24. Análise da razão entre as intensidades médias das bandas de *Western blot* com anticorpos anti-p4E-BP1 e anti-4E-BP1 no córtex cerebral (**A**), cerebelo (**B**) e hipotálamo (**C**) de animais submetidos a DB ou DHL, sem jejum. Não há alterações significativas em nenhuma das três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

A proteína AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) é um mediador de apoptose independente de caspase, e anticorpos dirigidos a ela são utilizados como marcador deste processo. O *immunoblotting* com anti-AIF produziu bandas nítidas com massa esperada (57

kDa) e a análise densitométrica de intensidade dessas bandas não mostrou diferenças significativas para o córtex cerebral e o cerebelo entre animais alimentados com DHL e aqueles alimentados com DB (Figura 25).

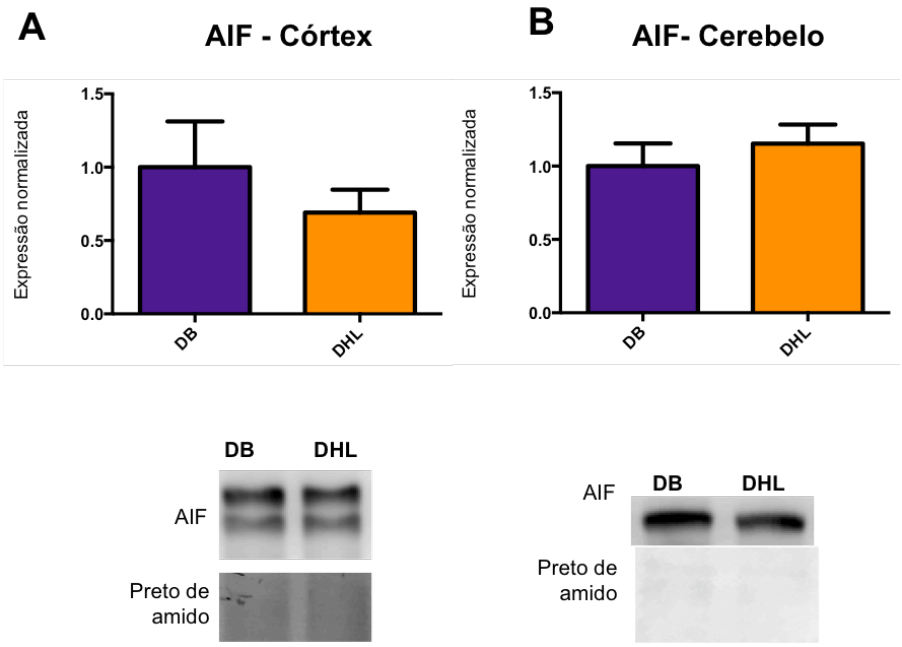


Figura 25. Análise dos níveis de AIF no córtex cerebral (**A**) e cerebelo (**B**) de animais em DB ou DHL sem jejum. Não há alterações significativas nas três estruturas. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

2.5. DISCUSSÃO

Pela sua crescente prevalência, a obesidade é um assunto de interesse cada vez maior em saúde pública. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, a prevalência de obesidade mais do que dobrou entre 1980 e 2014. Neste ano, 39% dos adultos acima de 18 anos tinham sobrepeso (índice de massa corpórea maior ou igual a 25) e 13% eram obesos (índice de massa corpórea maior ou igual a 30). Atualmente, sobrepeso e obesidade são ligados a mais mortes do que a desnutrição (*World Health*

Organization; www.who.int/en). Em 2013, cerca de 82 milhões de brasileiros (56,9%) estavam com sobrepeso e a obesidade acometia 20% dos brasileiros adultos, com mais de 18 anos de idade, incidindo mais sobre mulheres (24,4%) do que homens (16,8%; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; http://www.ibge.com.br).

Quando associada a condições como resistência a insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia e esteatose hepática, a obesidade compõe a chamada síndrome metabólica (BUETTNER *et al.*, 2007). Diversos fatores ligados à dieta podem contribuir para a obesidade em humanos, e um dos mais importantes é a composição de macronutrientes (BRAY *et al.*, 2004). Para melhor entender a patogênese da obesidade e síndrome metabólica, são usados modelos de indução por dietas hiperlipídicas. É bem aceito que esse tipo de intervenção nutricional gera um modelo válido de síndrome metabólica com resistência a insulina e hiperglicemia (BUETTNER *et al.*, 2007). Detalhes metodológicos variam, com diferentes porcentagens e fontes de gordura. Neste trabalho, animais foram alimentados com uma dieta hiperlipídica caseira, em que 59% das calorias eram oriundas de gorduras, por oito semanas antes da eutanásia (grupo DHL). Em comparação, animais da mesma idade foram alimentados com uma dieta balanceada, em que somente 9% das calorias eram oriundas de gorduras (grupo DB). Como esperado, a massa corpórea do grupo DHL foi significativamente maior do que a do grupo DB, especificamente a partir da segunda semana.

Várias são as regiões encefálicas relacionadas à alimentação. O hipotálamo, localizado no diencéfalo ventral, é a principal estrutura encefálica na detecção de sinais metabólicos centrais e periféricos. Apresenta populações neuronais especializadas na regulação da ingestão e gasto energético. Destacam-se nesse sistema os neurônios POMC, de atividade anorexígena, e os neurônios NPY/AgRP, de atividade orexígena, que, a partir de sinais hormonais (leptina e grelina, por exemplo) e disponibilidade de glicose,

ATP e ácidos graxos, regulam a homeostase energética do organismo (DIETRICH; HORVATH, 2013). Outras estruturas, como córtex cingulado, amídala e outras áreas corticolímbicas, participam do processamento de recompensa hedônico da alimentação (MÜNZBERG *et al.*, 2016). De acordo, hipotálamo, amídala e córtex cingulado foram as regiões escolhidas para análise da quantidade relativa de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela reação com dihidroetidina. Observou-se aumento de EROs no córtex cingulado de animais alimentados com DHL. Não houve diferença nas outras estruturas. Em humanos, o córtex cingulado é ativado por estímulos alimentares prazerosos, como ingestão de sacarose e textura de alimentos com gordura. Neurônios dessa região apresentam também atividade sensorial decrescente em resposta a glicose quando o animal está saciado (ROLLS, 2016). É possível que a DHL atue no sistema de recompensa, agindo em circuitos relacionados ao prazer, e que essa atuação ative neurônios do córtex cingulado. Estudos indicam que a geração de EROs, no hipotálamo, não é somente um subproduto da oxidação de substratos, mas sim um fator mediador de respostas celulares envolvidas na regulação do metabolismo energético (DIANO, 2013). Detalhes da resposta do córtex cingulado nessa situação precisariam ser elucidados.

Sabe-se que DHLs administradas durante a gravidez alteram de forma importante aspectos do sistema nervoso central, como comportamentos de ansiedade, arborização dendrítica hipocampal, neurogênese no hipotálamo e expressão de genes serotonérgicos, dopaminérgicos, relacionados a inflamação e de neuropeptídeos. Em adultos, observa-se, de forma geral, redução da expressão e função gênica em sistemas de recompensa (REYES, 2012). Aqui, observou-se redução dos transcritos de *Tsc1* e *Tsc2* no córtex de animais alimentados com DHL somente quando estes foram submetidos a jejum prévio à eutanásia. É possível que essa regulação sofra interferência de grelina, que é secretada em períodos de jejum. Ao contrário do córtex, observou-se aumento do RNAm de *Tsc1* e

Tsc2 no hipocampo somente em animais alimentados com DHL não submetidos ao jejum. Em animais saciados, ocorre a liberação de leptina. Sabe-se, no entanto, que em situações de obesidade existe insensibilidade a esse hormônio (BUETTNER *et al.*, 2007). Seria interessante então investigar se a alteração observada no hipocampo é relacionada a insensibilidade a leptina, tecnicamente presente nesses animais. Por outro lado, o jejum leva à hipoglicemia. O córtex cerebral pode ser mais sensível à hipoglicemia e, com esta, a privação nutricional mantém TSC1 e TSC2 ativos e estáveis, e células quiescentes, sem necessidade de ativação da expressão desses genes. Isso pode justificar mais baixos níveis de ambos os RNAm (*Tsc1* e *Tsc2*) no córtex cerebral após o jejum de animais alimentados com DHL e refletir um efeito mais ao curto prazo para a regulação desses genes.

Observamos também aumento do transcrito de *Tsc1* no hipotálamo e no estriado. O estriado, assim como a amídala e o córtex cingulado, é relacionado a circuitos de prazer induzidos pela alimentação, contendo neurônios que respondem a sabor e visão de alimentos (ROLLS, 2016). A ação de leptina no hipotálamo é dependente de mTORC1 (COTA *et al.*, 2006). Observa-se que a leptina aumenta a sinalização de mTORC1 e que a inibição desta cinase prejudica o efeito anorexígeno desse hormônio. Um aumento na transcrição de *Tsc1* poderia causar um aumento nos níveis de TSC1 e, consequentemente, maior inibição de mTORC1. O possível papel do aumento de TSC1 e inibição de mTORC1 em situações de leptina aumentada, como ocorre em DHL, é uma questão a ser levantada.

Apesar da observação de alterações de transcritos de *Tsc1* e *Tsc2*, não foram observadas alterações nos níveis totais e fosforilados dos alvos de mTORC1. São duas então as possibilidades. O aumento de RNAm não se traduz em aumento de proteína ou, se a proteína é aumentada, isso não altera a ação de mTORC1 em seus alvos. Essa possiblidade envolve outros fatores regulatórios de ação, estabilidade e controle de TSC1

e TSC2 e, possivelmente, de TBC1D7. A segunda possibilidade é que os experimentos de *Western blotting* tenham resultados falsos negativos.

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 familiais 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, amídala, 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 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 familiais 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, familiais ou esporádicos (OBESO et al., 2010). Casos de Parkinson tardio com causas genéticas conhecidas são associados a mutações nos genes *LRRK2* [codificador para ***L****eucine-****R****ich* ***R****epeat* ***K****inase* ***2***, (ZIMPRICH et al., 2004)], *VPS35* [codificador para ***V****acuolar* ***P****rotein* ***S****orting* ***35***,(VILARIÑO-GÜELL et al., 2011)] e *EIF4G1* [codificador para *Elongation Initiation Fator 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 ***P****hosphatase and* ***T****ensin* ***H****omolog (****PTEN****)-IN**duced putative* ***K****inase* ***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.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J mantidos no Biotério de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, em gaiolas adequadas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimentos. Foram também utilizados animais das linhagens B6.Cg-

Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/J e Tsc1^{tm1Djk}/J, gentilmente doados pelos Profs. José Donato e William Festuccia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, respectivamente, e mantidos sob as mesmas condições. Para eutanásia, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (0,17mg/g e 0,03mg/g de massa corpórea, respectivamente) e decapitados. Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP com número de protocolo 183/2013.

Reagentes

Foram utilizados dois anticorpos para detecção de TSC1: clone D43E2 (Cell Signalling Technology®) e anti-TSC1 e seu peptídeo imunogênico (coelho, ab32936; Abcam plc.). Para detecção de TSC2, foi utilizado o anticorpo C20 e seu peptídeo imunogênico (coelho; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Além destes, foram utilizados também anticorpos anti-tirosina hidroxilase (camundongo, clone 2/40/15; Chemicon/EMD Millipore, Co.) e anti-S6 (clone 5G10, Cell Signalling Technology®). Anticorpos secundários conjugados a peroxidase de raiz forte (HRP) para *Western blotting*, e à biotina para imunoperoxidase, assim como soros normais para bloqueio, foram adquiridos da Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Os anestésicos tribromoetanol, quetamina e xilazina foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich, Co., Sespo Indústria e Comércio e Divisão Vetbrands Saúde Animal, respectivamente. A droga 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi adquirida da Sigma Aldrich, Co. Reagentes para dosagem de proteínas e *Western blotting* foram adquiridos da BioRad Laboratories, Inc., e reagentes para tampões e soluções em geral foram adquiridos da Synth®.

Estratégia experimental

O objetivo desta etapa do projeto foi desenvolvido em duas fases. Na primeira fase, a aluna foi treinada para realizar o modelo murinho experimental de indução de

neurodegeneração pela 6-hidroxidopamina. Neste modelo, 30 camundongos de 14 a 15 semanas de vida foram submetidos à indução por cirurgia estereotáxica e, 14 dias depois, foram sacrificados e os tecidos coletados. Quatro animais foram destinados ao estudo por *Western blotting* e dez às análises morfológicas. No modelo experimental, a indução da doença de Parkinson ocorre somente em um lado do encéfalo, de forma que o lado contralateral do mesmo animal pode ser utilizado como controle. Assim, as análises estatísticas foram feitas de forma pareada.

Na segunda fase para este objetivo, foram realizados cruzamentos entre duas linhagens de camundongos para obtenção de um camundongo nocaute condicional para o gene *Tsc1*, em homozigose, isto é, sem expressão de TSC1, com o objetivo de submetê-lo ao modelo de neurodegeneração induzida pela 6-OHDA, buscando responder se a falta de expressão de *Tsc1* altera o efeito deste tratamento.

Indução da neurodegeneração

Na indução do modelo de doença Parkinson, 6-OHDA foi administrada estereotaxicamente por microinfusão no estriado com microseringa Hamilton (Hamilton Company) para efetuar uma lesão retrógrada dos neurônios nigro-estriatais de camundongos machos com 14-15 semanas de idade (BLUM et al., 2001). Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.) e, após a trepanação, foram injetados 5μg de 6-OHDA diluídos em 1μL de solução salina (NaCl a 0,9%) e 0,2% de ácido ascórbico, nas seguintes coordenadas: antero-posterior +0,4mm; laterais: +/-2mm; ventral: +3mm, a partir do Bregma (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). No lado direito foi injetada a droga e do lado esquerdo somente o veículo, para controle. Os animais foram sacrificados após 15 dias.

Imunoperoxidase em tecidos

Para estudos de imunoperoxidase indireta em encéfalos, camundongos foram profundamente anestesiados com quetamina e xilazina (0,17mg/g e 0,03mg/g de massa corpórea, respectivamente) e perfundidos via transcardíaca com solução salina tamponada [NaCl a 0,9% em tampão fosfato a 0,1M (PB, NaH_2PO_4 23mM e Na_2HPO_4 a 77mM)] e com paraformaldeído (PFA) a 4% em PB, 4°C. Após dissecção, os cérebros foram pós-fixados em PFA a 4%, por quatro a seis horas, a 4°C; crioprotegidos em sacarose a 30%, por 48 horas, a 4°C; cortados em micrótomo em secções de 30μm e coletados em PB. Os cortes foram incubados em anticorpo primário diluído em PB contendo triton X-100 a 0,3% e soro normal do hospedeiro do anticorpo secundário a 5% *overnight*, seguido por incubação em anticorpo secundário conjugado à biotina diluído em PB contendo triton X-100 a 0,3%. A seguir, incubação em complexo avidina-biotina-peroxidase foi feita por duas horas e a marcação revelada com di-amino-benzidina e peróxido de hidrogênio. Após montagem dos cortes em lâminas gelatinizadas e secagem em placa quente, a marcação foi intensificada em tetróxido de ósmio a 0,05% por 15 a 50 segundos e os cortes desidratados em bateria de etanol seguido por xilol. As lâminas foram fechadas com permount (Fisher Scientific, Inc.). Tecidos assim processados foram observados ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E1000), acoplado à câmera digital (Nikon DXM 1200).

Para os anticorpos anti-TSC1 e C20 foram realizados experimentos de pré-adsorção com o peptídeo utilizado na produção destes, de forma a analisar sua especificidade. Os anticorpos primários, nas concentrações abaixo, foram combinados com o peptídeo imunizante por uma hora, em tampão fosfato, à temperatura ambiente. Em seguida, foram usados na incubação de cortes. Experimentos com os anticorpos primários apenas foram realizados em paralelo, para uma comparação adequada.

Tabela 3 . Concentração de anticorpos e peptídeos na pré-adsorção para imunoperoxidase.

Alvo	Anticorpo	Peptídeo
TSC1	1,2µg/mL	2,4µg/mL
TSC2 (C20)	0,8µg/mL	1,6µg/mL

Para quantificação das imagens foram utilizadas as ferramentas de densidade integrada (estriado) e contador de células (estriado e substância negra) no programa ImageJ.

Western blotting

Os procedimentos para detecção de proteínas por *Western blotting* foram idênticos aos mencionados na metodologia do capítulo 2.

Desenvolvimento de nocaute condicional para *Tsc1*

Para desenvolvimento de um nocaute condicional para *Tsc1* sob controle farmacológico, foram cruzadas as linhagens *B6.Cg-Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/J* (estoque 008085 do Jackson Laboratory) e *Tsc1^{tm1Djk}/J* (estoque 005680 do Jackson Laboratory), gentilmente cedidas pelos Profs. José Donato e William Festuccia, respectivamente. Para facilitar a representação dos resultados, os alelos referentes a essas linhagens serão assim nomeados:

- ***Tsc1*^{wt}**: alelo tipo-selvagem *Tsc1* ;
- ***Tsc1*^{fl}**: alelo *Tsc1* que tem o segmento genômico do éxon 17 ao 18 flanqueado por sequências *lox* (KWIATKOWSKI et al., 2002);
- ***Cre:*** transgene, sob controle transcricional do promotor de ubiquitina C humana (*UBC*), que produz uma proteína de fusão tendo a recombinase Cre na porção N-terminal e o domínio de ligação ao ligante do receptor de estrógeno humano (ERT2) no segmento C-terminal (RUZANKINA et al., 2007).

Para coleta de amostras para análise genética dos animais, foi seccionada a ponta da cauda destes, sob anestesia de isoflurano. Ainda sob anestesia, os animais foram marcados com furos nas orelhas. Cada ponta de cauda foi incubada em 600 µL de NaOH 50mM a 95°C por 10 a 12 minutos, e então foram adicionados 50 µL de Tris-HCl 1M pH 6,8. As amostras foram centrifugadas e 5 µL do sobrenadante utilizado para PCR.

A reação de genotipagem foi composta de tampão de PCR 1X, mistura de dNTPs a 0,2 mM, $MgCl_2$ a 2 mM, iniciadores a 1 µM e enzima Platinum *Taq* a 0,03 U/µL, num volume final de 30 µL. As sequências dos iniciadores foram baseadas naquelas propostas para as linhagens no *Jackson Laboratory* e são mostradas abaixo. Para genotipagem de *Cre*, foram utilizados dois pares de iniciadores diferentes (Cre-S e Cre-A; CZ054 e CZ058). Para controle interno, foi amplificado um segmento de 324 pares de base.

- *Tsc1*
    - Tsc1F-S: GTCACGACCGTAGGAGAAGC
    - Tsc1F-A: GAATCAACCCCACAGAGCAT
- *Cre*
    - Cre-S: GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC
    - Cre-A: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
    - CZ054: TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT
    - CZ058: GTGAAACAGCATTGCTGTCAC
- **Controle positivo interno para genotipagem de *Cre***
    - IPC-S: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
    - IPC-A: GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Dez microlitros dos produtos de cada reação foram submetidos à eletroforese a 100V em gel de agarose a 3%, corado com Sybr® Safe (Life Technologies) e fotografados sob luz ultravioleta.

Para indução da recombinação por *Cre*, animais com 14 a 16 semanas de vida foram injetados intraperitonealmente com 100mg/kg de 4-hidroxitamoxifeno diluído em óleo de amendoim (Sigma-Aldrich) uma vez por dia, por cinco dias. Para análise da neurodegeneração induzida por 6-OHDA, os animais foram submetidos a indução do modelo de hemiparkinson uma semana após a última injeção e sacrificados após 14 dias.

Análise estatística

Para análises proteicas por *Western blotting*, a normalização foi feita através de níveis totais de proteína, visualizados por coloração da membrana com preto de amido. Foi utilizado o teste *t* de Student pareado, com significância quando $p<0,05$. Para imunoperoxidase, a quantidade de células positivas ou a densidade integrada foram comparadas entre dois lados do mesmo animal, e os valores foram também analisados por teste t pareado, com significância quando $p<0,05$. A expressão de S6 e de tirosina hidroxilase foram comparadas também pela correlação r de Pearson, com significância quando $p<0,05$. Para análise dos dados dos cruzamentos de linhagens, foi utilizado o teste do chi quadrado, com significância quando $p<0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism® 6.

3.4. RESULTADOS

Modelo de hemiparkinson em camundongos selvagens

A injeção de 6-OHDA causa a depleção do conteúdo de dopamina nos terminais nervosos e corpos celulares do estriado e da SNc, respectivamente. A droga é captada por transportadores noradrenérgicos e da dopamina e, uma vez acumulada no citosol, é auto-oxidada e causa grande estresse oxidativo. Assim, promove a perda de neurônios dopaminérgicos, que se inicia logo após a sua injeção (TORRÃO et al., 2012). A

marcação para tirosina hidroxilase por imunoperoxidase revela, no estriado e na SNc, a morfologia de neurônios dopaminérgicos. Assim, é possível observar, na SNc, a marcação de corpos celulares e, no estriado, a marcação de feixes neuronais. Em animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA, observou-se redução significativa de tirosina hidroxilase em ambas as estruturas, por densidade integrada no estriado e contagem de células na SNc (N = 9, 1,00 para veículo *Vs.* 0,75 para 6-OHDA, teste *t* de Student p^{**} = 0,0081 para estriado e N = 8, 161,2 para veículo *Vs.* 65,9 para 6-OHDA, teste *t* de Student p^{**} = 0,0021 para SNc, Figuras 26 e 27). Esses resultados foram corroborados por *Western blotting* no estriado (Figura 26; N = 4, 1,00 para veículo *Vs.* 0,6078 para 6-OHDA, teste *t* de Student p^{*} = 0,0154).

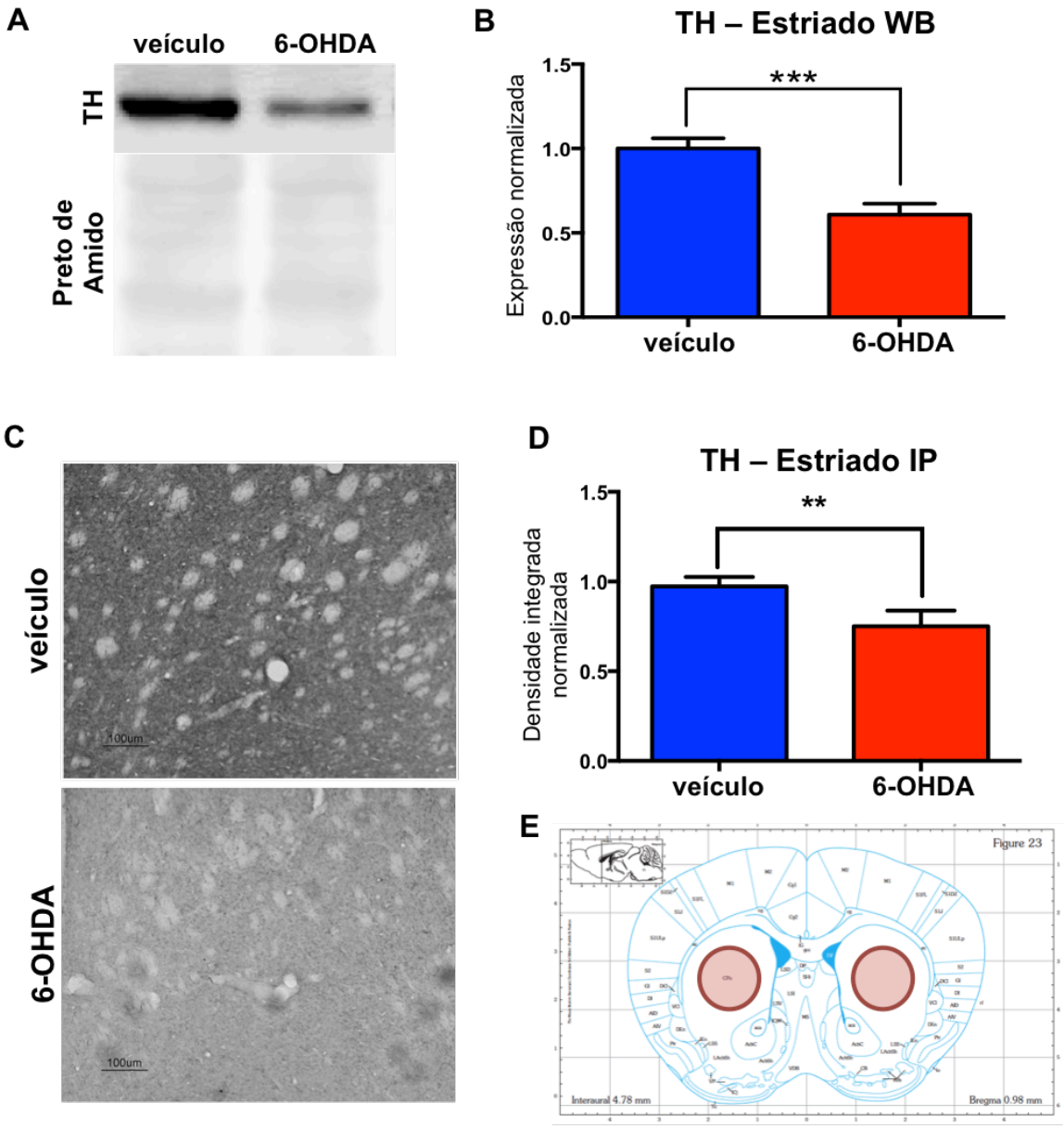


Figura 26. Análise dos níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado por *Western blotting* (**A** e **B**) e imunoistoquímica (**C** e **D**) de animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA, em comparação à injeção de veículo. A região encefálica analisada em (**C**) e (**D**) é mostrada em (**E**). Observa-se, por ambas as técnicas, redução significativa de marcação por TH no estriado no lado que recebeu 6-OHDA. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (veículo) como 1,0 (100%). Imagens quantificadas por densidade integrada, também com média do grupo controle (veículo) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student pareado por animal, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$]. Ilustração adaptada de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

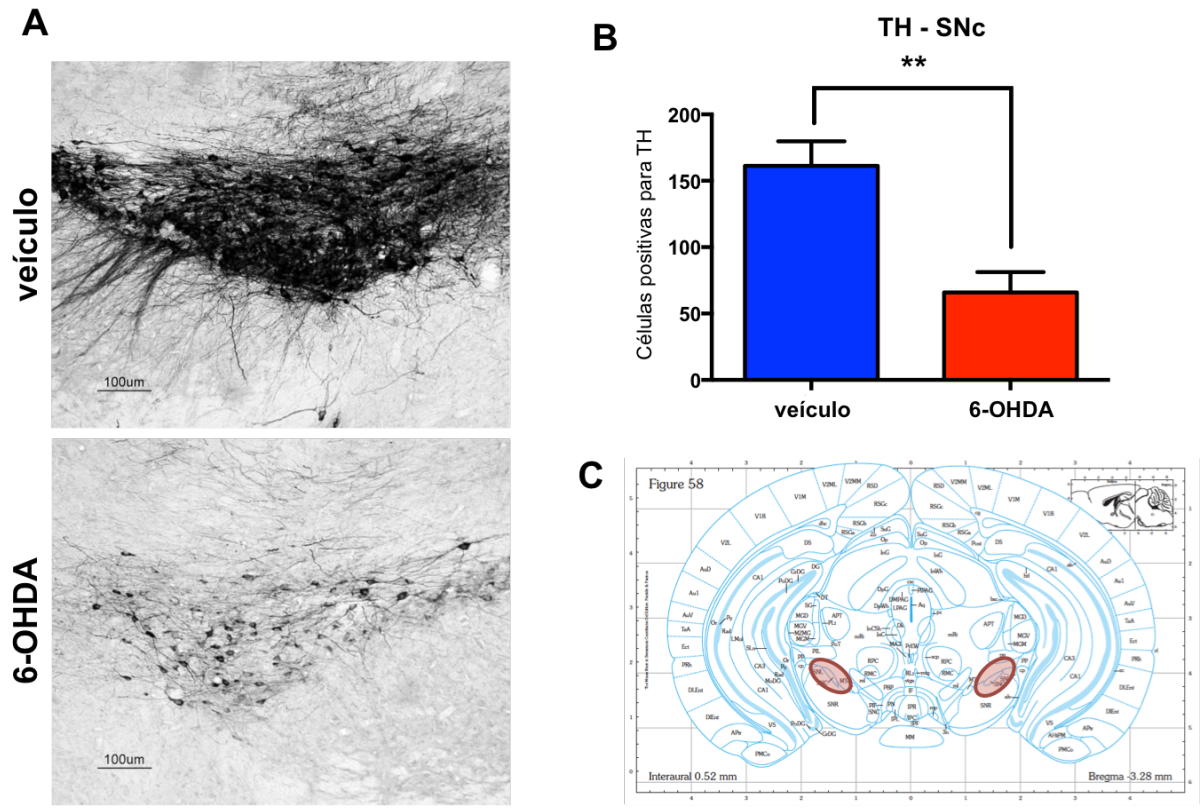


Figura 27. Células positivas para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra *pars compacta* por imunoperoxidase (**A**) de animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA, em comparação à injeção de veículo. Observa-se redução significativa do número de células positivas para TH no estriado do lado que recebeu 6-OHDA (**B**). A região encefálica analisada é mostrada em (**C**). Teste *t* de Student pareado, com significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001]. Ilustração adaptada de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Nesses animais, observaram-se também corpos celulares positivos para TSC2 no estriado. O número dessas células não diferiu entre os dois lados, lesado e controle, dos encéfalos dos animais (N = 7, 17,78 para veículo *Vs.* 17,72 para 6-OHDA, teste *t* de Student p = 0,9788), assim como os níveis de TSC2 por *Western blotting* (Figura 28; N = 4, 1,00 para veículo *Vs.* 0,7603 para 6-OHDA, teste *t* de Student p = 0,1669).

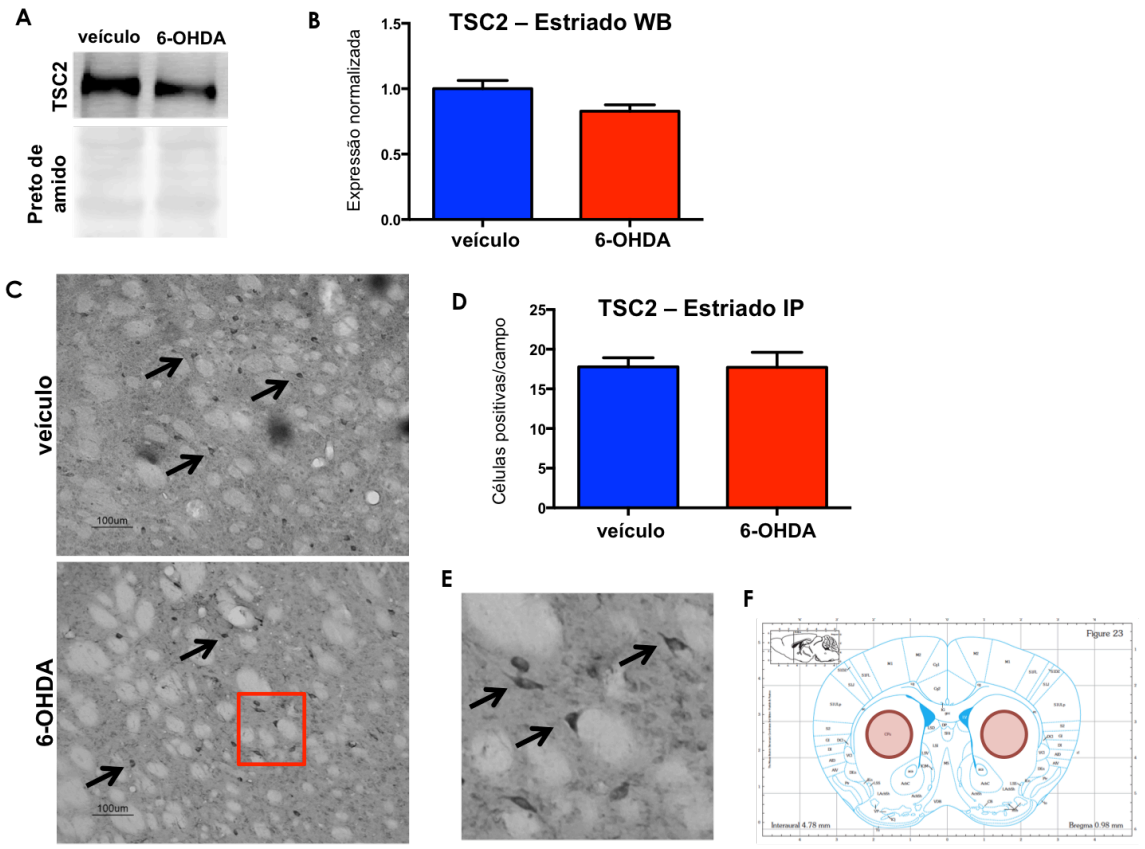
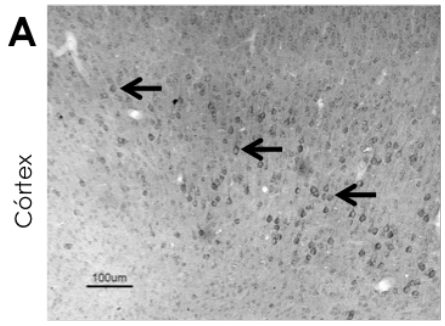
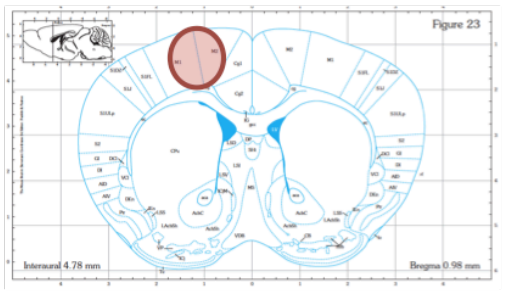
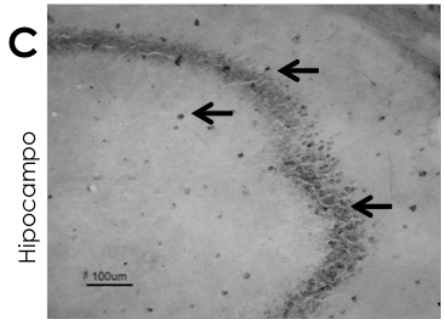


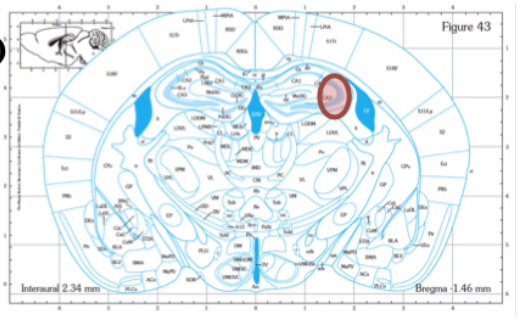
Figura 28. Análise dos níveis de TSC2 no estriado por *Western blotting* (**A** e **B**) e imunoperoxidase (**C** a **E**) de animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA, em comparação à injeção de veículo. Em (**E**) é mostrado detalhe da imagem do lado do teste (6-OHDA), com células positivas indicadas por setas. A região encefálica analisada é mostrada em (**F**). Não há alterações significantes na expressão dessa proteína. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (DB) como 1,0 (100%) e imagens de imunoistoquímica foram analisadas por contagem de células positivas. Teste *t* de Student pareado por animal, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

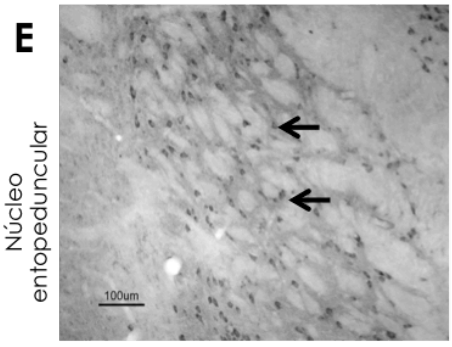
TSC2 foi também observado por imunoperoxidase em regiões não diretamente afetadas pelo protocolo cirúrgico. Houve marcação em corpos e processos celulares por todo o córtex cerebral (Figura 26A), em corpos celulares do hipocampo (Figura 26C) e globo pálido (Figura 26E) e marcações pequenas e puntiformes na região periventricular (Figura 26G e I). Essa marcação puntiforme foi observada por toda a região talâmica e hipotalâmica (da qual faz parte a região periventricular). Esses resultados foram observados tanto no lado injetado com 6-OHDA com no lado injetado com veículo.


A
Córtex
100um

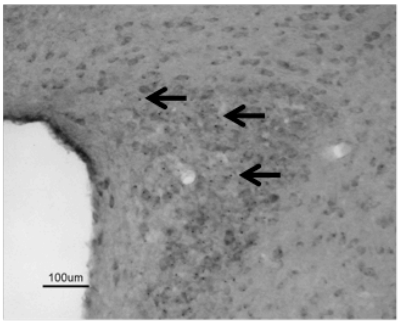

B
Figure 23
Interaural 4.78 mm
Bregma 0.98 mm

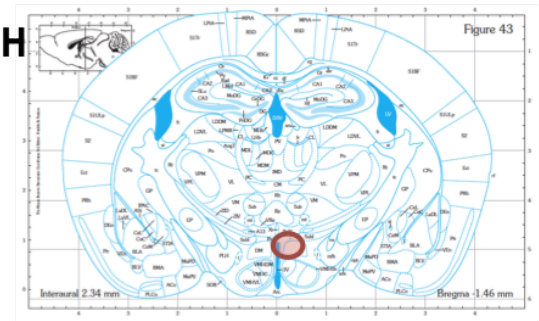

C
Hipocampo
100um


D
Figure 43
Interaural 2.34 mm
Bregma -1.46 mm


E
Núcleo entopeduncular
100um

F
Figure 38
Interaural 2.98 mm
Bregma -0.82 mm


G
Núcleo paraventricular
100um


H
Figure 43
Interaural 2.34 mm
Bregma -1.46 mm

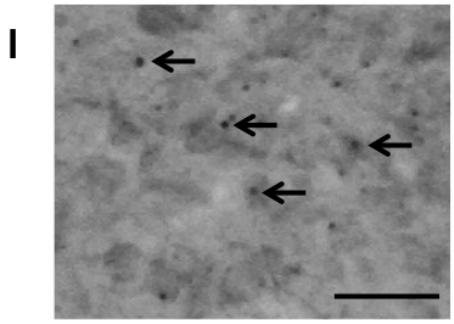

I

Figura 29. Expressão de TSC2 em outras regiões do encéfalo no modelo murinho de hemiparkinsonismo: córtex cerebral (**A**), hipocampo (**C**), globo pálido (**E**) e na região periventricular (**G** e **I**, em maior detalhe). (**B**), (**D**), (**F**) e (**H**) ilustram as regiões observadas em (**A**), (**C**), (**E**) e (**G**), respectivamente. Escala: 100 μ m (**A**), (**C**), (**E**) e (**G**) e 25 μ m (**I**). Ilustrações modificadas de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Para confirmação da especificidade desses resultados, cortes adjacentes foram incubados com anti-TSC2 pré-adsorvido com peptídeo imunogênico. Nessa situação, não houve marcação, corroborando a especificidade do anticorpo. A Figura 30 mostra esses resultados para o córtex cerebral.

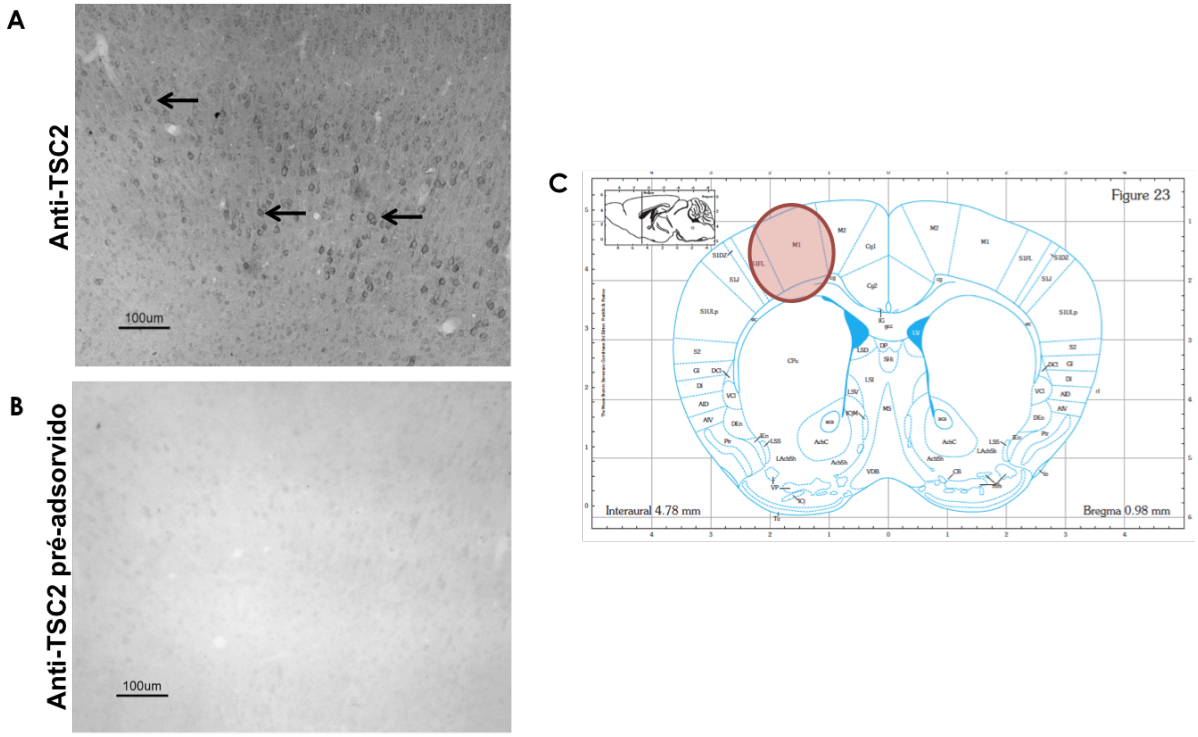


Figura 30. Imunoperoxidase do córtex cerebral do hemisfério de lado controle com anticorpo anti-TSC2 (**A**) e anti-TSC2 pré-adsorvido com peptídeo imunogênico (**B**), no córtex cerebral. A região encefálica é mostrada em (**C**). Observa-se que a pré-adsorção do anticorpo remove reduz consideravelmente a marcação de corpos e processos celulares observados nessa região. Ilustrações modificadas de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

A imunoperoxidase com anticorpo anti-TSC1 revelou células positivas pequenas e ramificadas no estriado, tanto no lado injetado com 6-OHDA quanto no lado injetado com veículo (Figura 31). A marcação dessas células não foi observada de maneira consistente entre os animais, de forma que não foi possível realizar a sua quantificação.

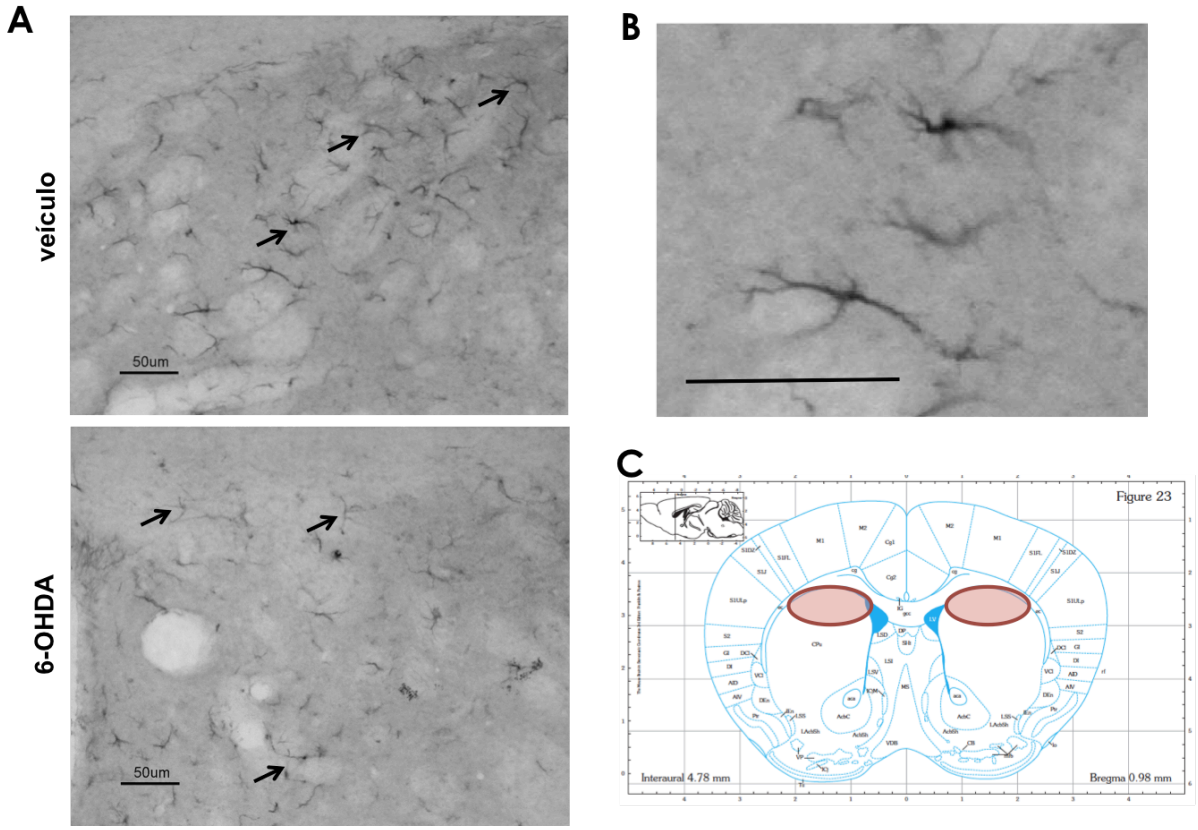


Figura 31. Imunoperoxidase com anti-TSC1 no estriado de animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA (**A**). Em (**B**), é mostrado um detalhe da imagem *veículo* de (**A**), e (**C**) mostra a região encefálica em questão. Observam-se células positivas para TSC1, pequenas e ramificadas em ambos os lados. Ilustrações modificadas de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Assim como para TSC2, marcação de TSC1 foi também observada em áreas não diretamente relacionadas ao protocolo de indução de hemiparkinson. Foram observadas células pequenas e ramificadas, assim como no estriado, nos núcleos entopeduncular e arqueado (Figura 32). Esses resultados foram observados tanto no lado injetado com 6-OHDA quanto no lado injetado com veículo.

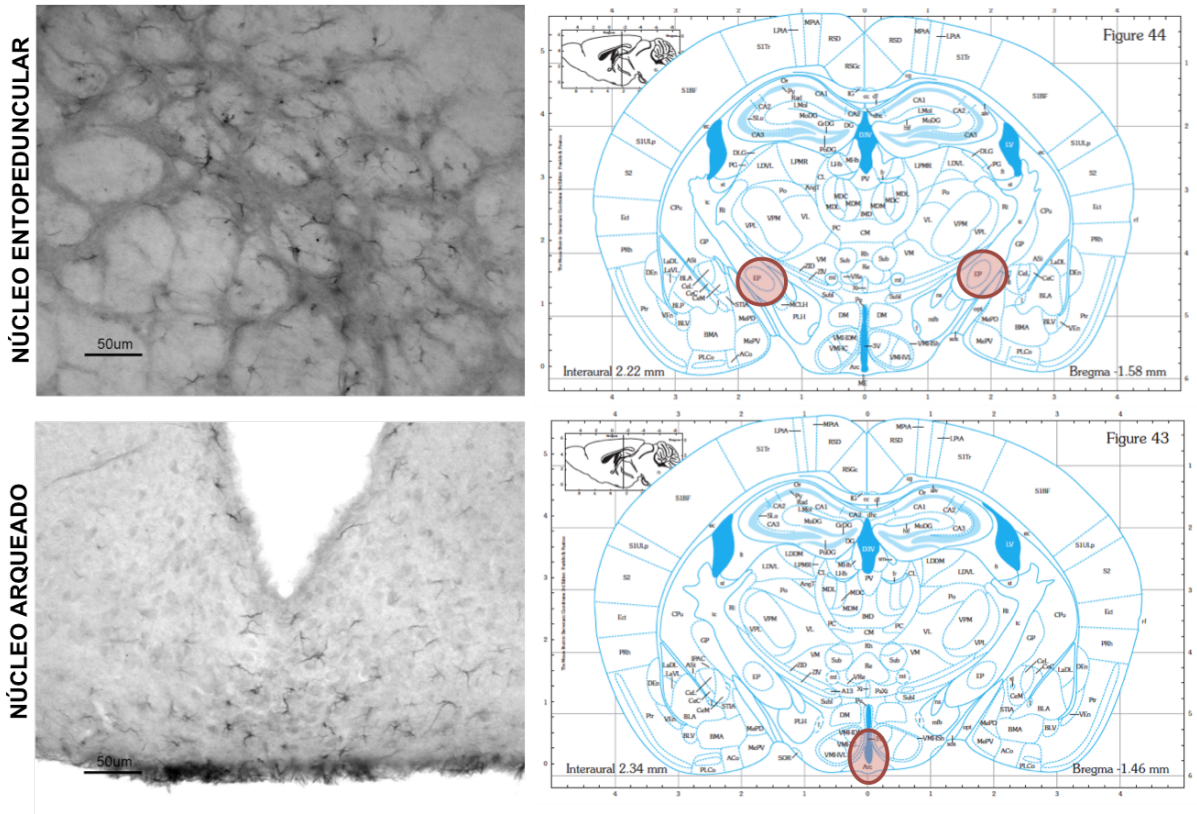


Figura 32. Expressão de TSC1 em outras regiões do encéfalo hemiparkinsoniano: núcleo entopeduncular (**A**) e núcleo arqueado (**C**). (**B**) e (**D**) ilustram as regiões observadas em (**A**) e (**C**) respectivamente. Barra de escala: 50µm. Ilustrações modificadas de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Para confirmar a especificidade dessa marcação, cortes adjacentes foram incubados com anticorpo anti-TSC1 pré-adsorvido pelo peptídeo imunogênico. Nesses cortes, não houve marcação de células com esta morfologia (Figura 33).

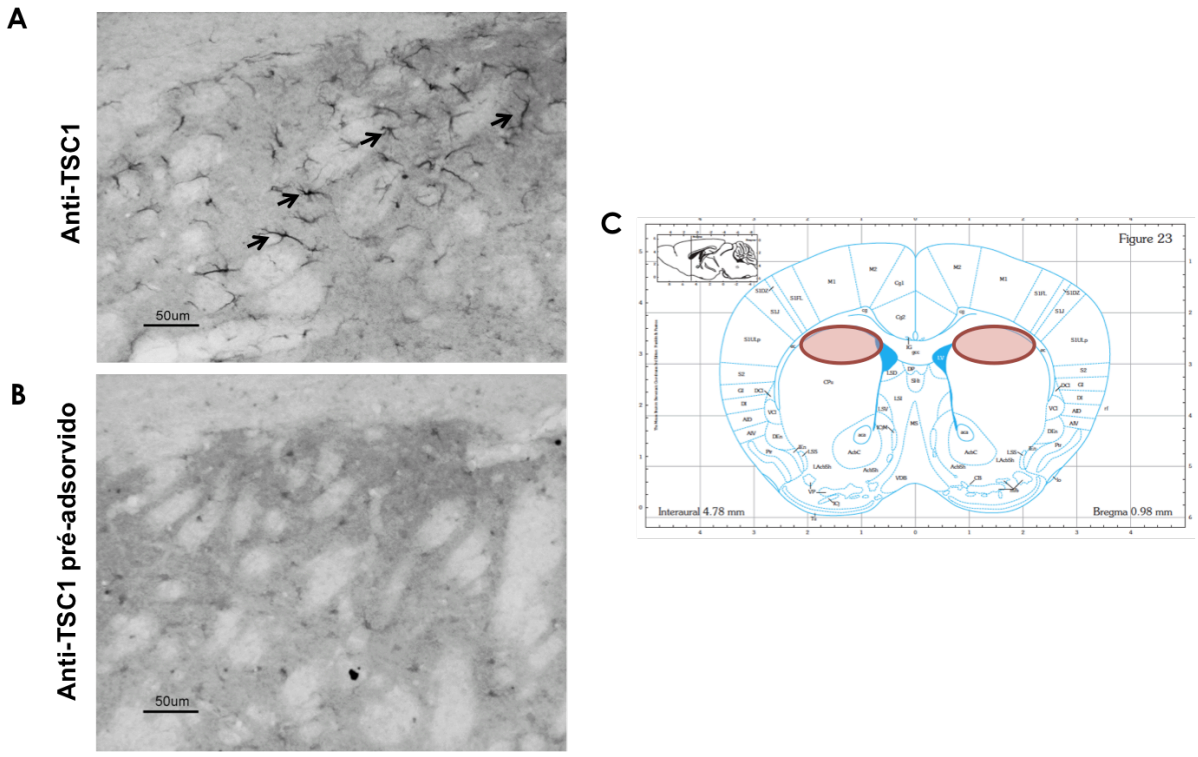


Figura 33. Imunoperoxidase com anti-TSC1 (**A**) e anti-TSC1 pré-adsorvido com peptídeo imunogênico (**B**), no estriado. A região encefálica é mostrada em (**C**). Observa-se que a pré-adsorção do anticorpo remove a marcação observada nessa região. Ilustrações modificadas de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Dada a morfologia das células positivas para TSC1, foi realizada a dupla marcação com um marcador de microglia, Iba1 (*Ionized calcium binfing adaptor molecule 1*). Nas três estruturas observadas, estriado, núcleo peduncular e núcleo arqueado, não houve colocalização entre essas proteínas (Figura 34).

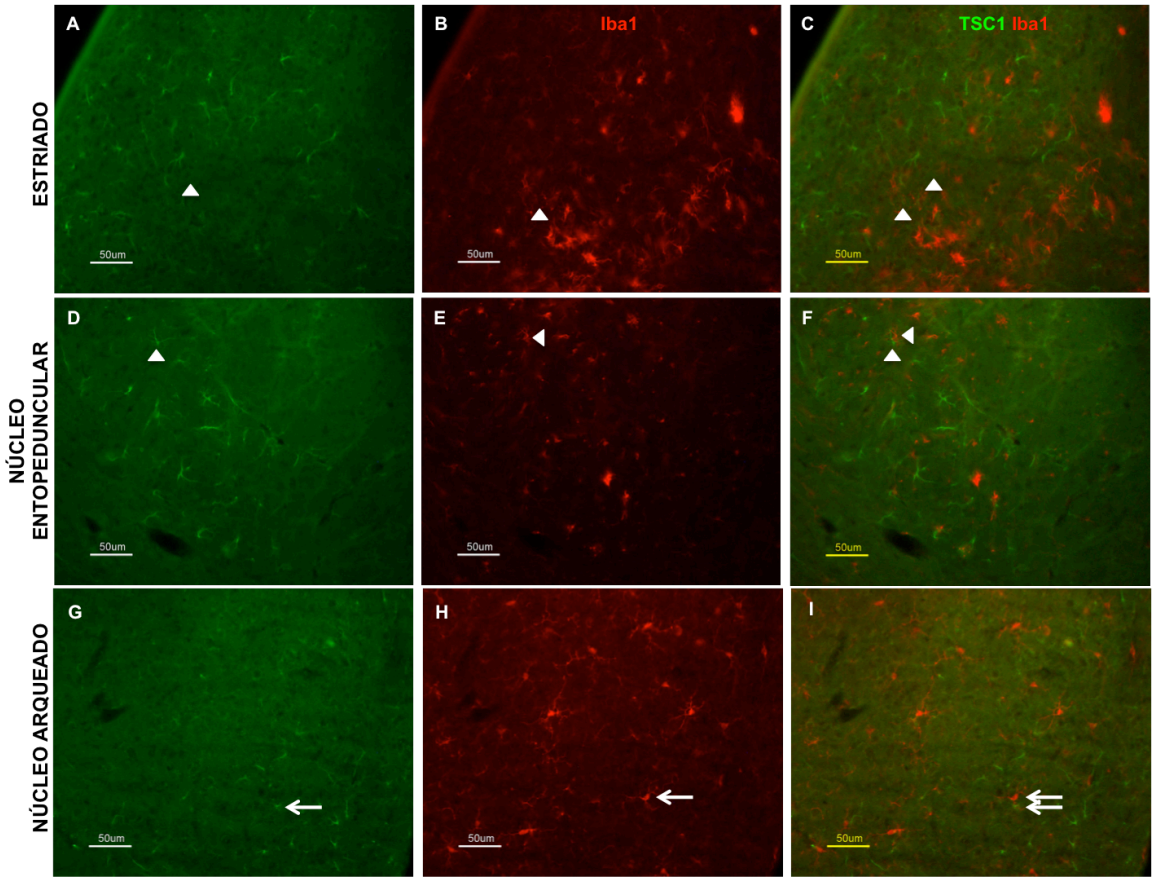


Figura 34. Imunofluorescência para TSC1 (**A**, **D** e **G**) e Iba1 (**B**, **E** e **H**) no estriado, núcleo entopeduncular e núcleo arqueado, respectivamente. Em (**C**), (**F**) e (**I**) é mostrada a sobreposição das imagens de TSC1 e Iba1 para cada uma das estruturas. Não há colocalização entre os anticorpos. Barra de escala: 50µm.

O estriado dos animais submetidos ao protocolo de indução de hemiparkinson por injeção de 6-OHDA foi também utilizado para análise da expressão da proteína ribossômica S6. Houve redução estatisticamente significativa do lado lesado, quando comparado ao lado controle (Figura 35A-B). Para melhor entender a relação entre a variação de S6 e a morte de neurônios dopaminérgicos, foi testada a correlação entre os níveis de S6 e TH. Apesar de limítrofe, houve correlação estatisticamente significativa (N =5 p**=0,004; r=0,8795), o que sugere que as amostras que apresentaram menos proteína S6 tendem a ser as mesmas que têm níveis mais baixos de TH. Isto fica mais evidente na Figura 35C, em que se observa o agrupamento de três das quatro amostras

do grupo do lado tratado, indicadas em vermelho, com cerca de metade da quantidade de ambas as proteínas.

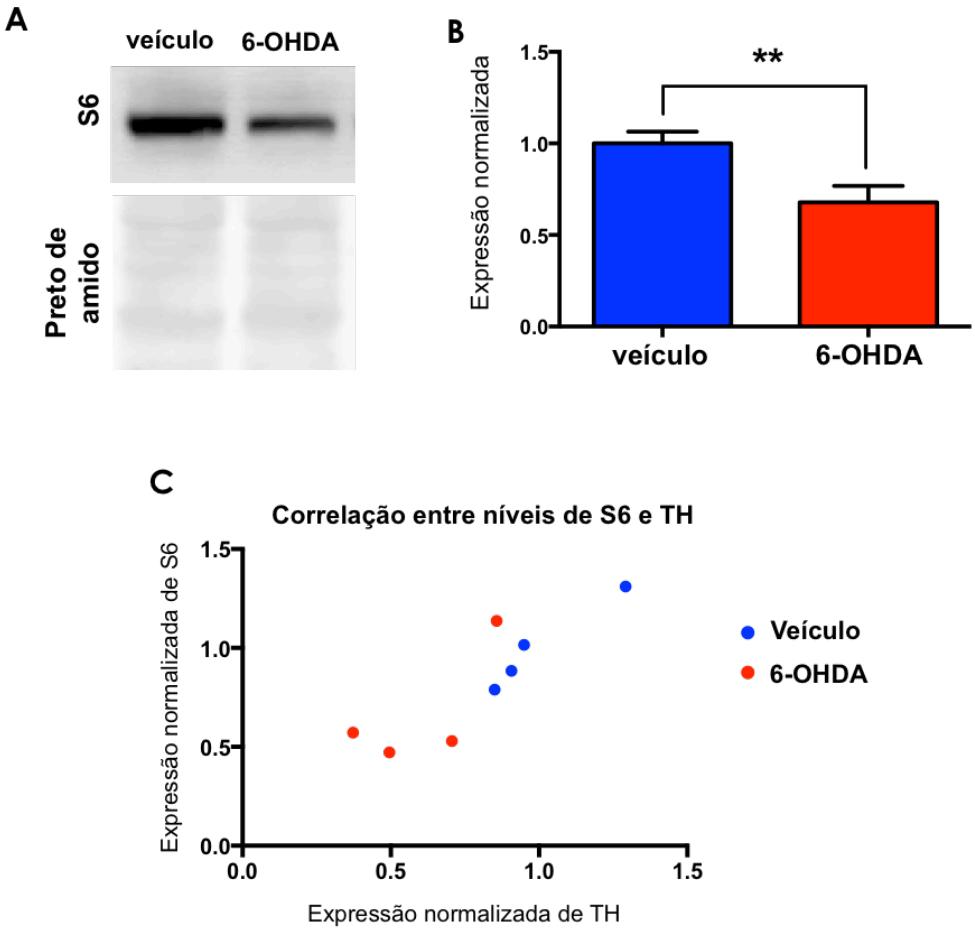


Figura 35. Análise dos níveis de S6 no estriado de animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA, em comparação deão lado que recebeu veículo (**A** e **B**). Observa-se redução significativa dos níveis dessa proteína. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (veículo) como 1.0 (100%). Teste *t* de Student pareado (**B**). Em (**C**) os níveis de S6 são correlacionados com os níveis de TH, para cada animal (N = 4). Há uma correlação significativa (p** =0,004 e r=0,8795) pelo teste de Pearson (IC: 95%). (Azul: lado veículo; Vermelho: lado controle). Significância quando p<0,05 [(*) se 0,05>p>0,01, (**) se 0,01>p>0,001, (***) se 0,001>p>0,0001 e (****) se p<0,0001].

Geração de um nocaute condicional para *Tsc1*

O nocaute dos genes *Tsc1* ou *Tsc2* em homozigose é letal ainda na gestação. Embriões de camundongo *Tsc1*$^{-/-}$ e *Tsc2*$^{-/-}$ morrem entre o nono e o décimo segundo dia

embrionário, apresentando defeitos no fechamento do tubo neural, hipoplasia renal, engrossamento no miocárdio e menor tamanho corporal (FUKUDA et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2001). Desta forma, para estudos funcionais sobre os produtos da expressão desses genes, nocautes heterozigotos ou nocautes homozigotos condicionais são utilizados. Para a geração de nocautes condicionais, a expressão da recombinase Cre, derivada de do bacteriófago P1, vem sendo extensivamente utilizada (GIERUT et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Com a disponibilidade de linhagem *lox* para o gene *Tsc1* de forma mais ampla do que para *Tsc2*, a primeira já foi amplamente utilizada para a deleção de *Tsc1* em homozigose especificamente em determinado tipo celular (ABS et al., 2013; BATEUP et al., 2011; BYLES et al., 2013; FELICIANO et al., 2012; FU et al., 2012; JIANG et al., 2013; KAYYALI et al., 2015; MALHOWSKI et al., 2011; MCMAHON et al., 2012; MEIKLE et al., 2007; O'BRIEN et al., 2011; PARK et al., 2013; SHRESTHA et al., 2014; SQUARIZE et al., 2010; TANG et al., 2014; WANG et al., 2007; XIANG et al., 2015; ZHU et al., 2014).

Neste trabalho, definimos deletar *Tsc1* em período pós-natal, de forma independente do tipo célula. Para isso, utilizamos um promotor de reconhecimento ubíquo (derivado do gene *UBC*) e optamos pela indução da localização nuclear da recombinase Cre de forma induzida por 4-hidroxitamoxifeno, o qual foi administrado intraperitonealmente, diariamente por cinco dias, entre as décima quarta e décima sexta semana pós-natais.

Desta forma, para a geração de nocautes condicionais para *Tsc1* sob controle do promotor de ubiquitina *Ubc* e tamoxifeno, em uma primeira etapa, foram realizados cruzamentos entre as linhagens Tsc1$^{tm1Djk/J}$ e B6.Cg-Tg(UBC-cre/ESR1)1Ejb/J com o objetivo de se obter homozigotos para *Tsc1*^{flox} que carregassem também o transgene Cre.

A identificação destes alelos foi realizada por PCR de DNA genômico obtido do DNA da cauda de cada animal, permitindo sua genotipagem. À eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose, o alelo *Tsc1*^{flox} produziu uma banda de 230 pares de base, e o tipo-selvagem produziu uma banda de 193 pares de base (Figura 36A). Para verificação da presença do segmento genômico de *Cre*, além de iniciadores para um controle interno de 324 pares de base, foram utilizados dois pares de iniciadores para o transgene. Um deles produziu uma banda de 100 pares de base, e o segundo produziu uma banda de 213 pares de base (Figura 36B).

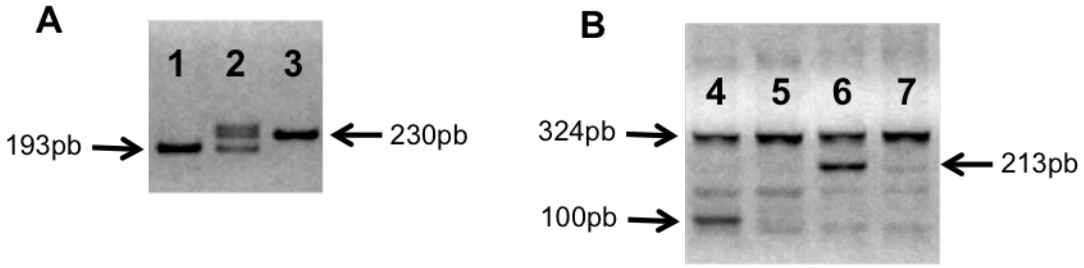


Figura 36. Genotipagem para a identificação e seleção de indivíduos portadores dos alelos *Tsc1*^{flox} e *Cre*, buscando a geração de linhagem de nocaute condicional de *Tsc1*. Em (**A**) são mostradas as bandas referentes aos alelos *Tsc1* tipo-selvagem (*Tsc1*^{wt}, 193 pares de base) e mutado (*Tsc1*^{flox}, 230 pares de base) em um animal homozigoto para o tipo-selvagem (***1***), heterozigoto (***2***) e homozigoto para o alelo mutado (***3***). Em (**B**) são mostradas as bandas referentes ao transgene Cre (100 ou 213 pares de base) e a banda de controle interno (324 pares de base) em um animais positivos para o transgene (***4*** e ***6***) e em animais negativos (***5*** e ***7***).

Para a primeira geração, foram cruzados animais *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{flox}, negativos para *Cre*, com animais *Tsc1*^{wt}/*Tsc1*^{wt}, positivos para *Cre*. Foram obtidos 49 animais heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt}, sendo que 36 (73,5%) deles eram positivos para *Cre*. Estes foram selecionados e retrocruzados com animais *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{flox}, negativos para *Cre*. Foram obtidos 341 animais, sendo 188 (55%) heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e positivos para *Cre*, e 153 (45%) animais homozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{flox} negativos para *Cre*. Não

foram observados animais heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e negativos para *Cre*, assim como não foram obtidos animais homozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{flox} e positivos para *Cre* (Figura 37).

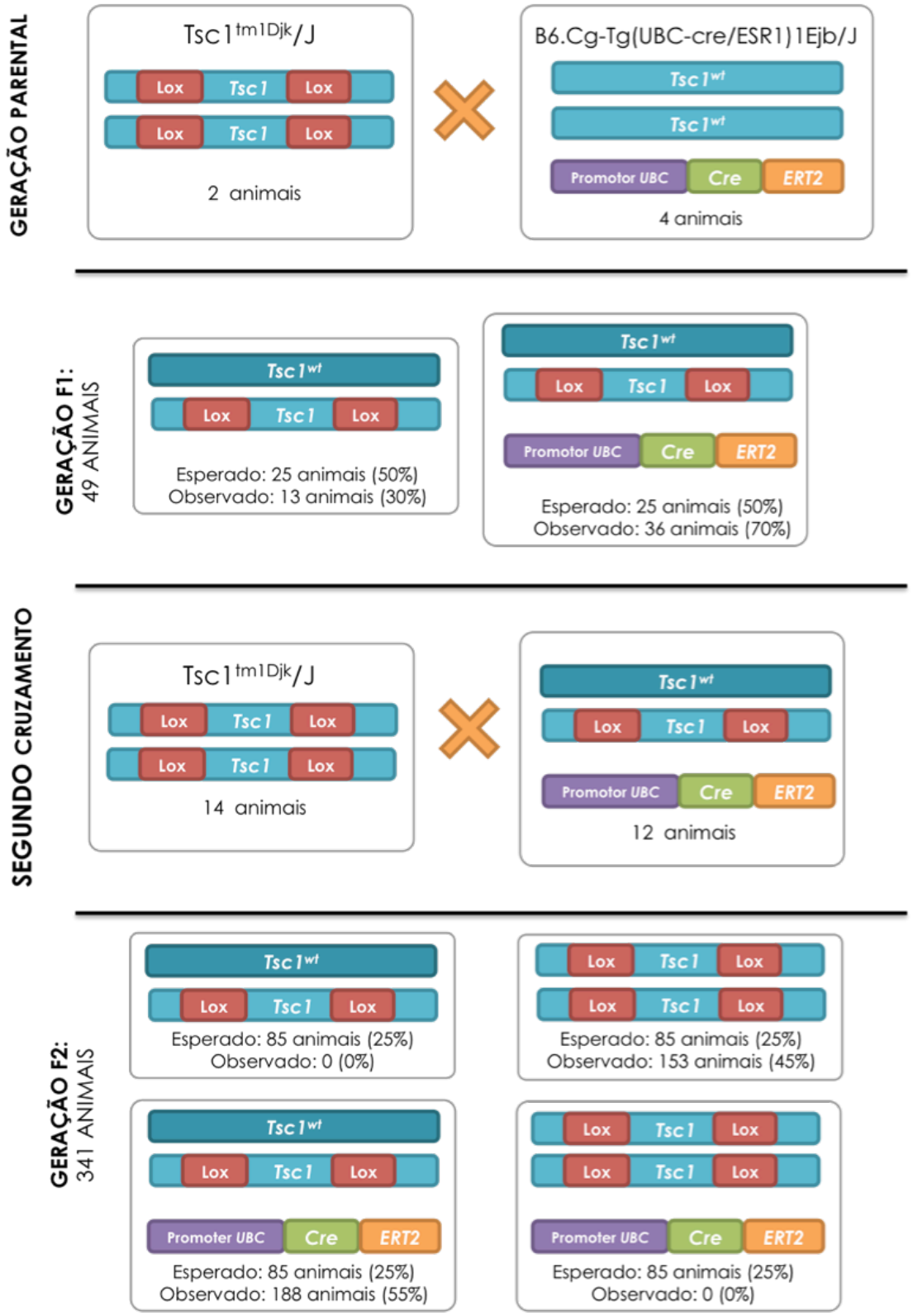


Figura 37. Cruzamentos entre linhagens Tsc1$^{tm1Djk/J}$ e B6.Cg-Tg(UBC-cre/ESR1)1Ejb/J para obtenção de um nocaute condicional para *Tsc1*, sendo indicados o número de animais de cada cruzamento e as quantidades de animais esperados e observados para a primeira (F1) e a segunda (F2) gerações.

No planejamento desses cruzamentos, esperávamos que alelos do gene *Tsc1* e o transgene *Cre* segregassem de forma independente. Sabe-se o mapeamento cromossômico do *Tsc1* no camundongo (cromossomo 2 B-C1.1, Gene ID: 64930); no entanto, a localização do transgene *Ubc-Cre* nessa linhagem, ao nosso conhecimento, não foi registrada na literatura. Os resultados esperados, no entanto, diferiram dessa previsão. A Tabela 4 indica as proporções observadas e as proporções esperadas para cada genótipo nas gerações F1 e F2. Para analisar a relação entre os resultados observados e a distribuição esperada para o fenômeno de herança independente, foi realizado o teste χ^2 para cada genótipo. Nesse teste, a hipótese nula é de que os resultados observados não são diferentes dos esperados, e a hipótese alternativa é de que existe diferença entre as frequências. Em ambas as gerações, a hipótese nula foi rejeitada, com p=0,001 (F1) e p=0,0001 (F2).

Tabela 4. Resultados observados e esperados nos cruzamentos para geração de nocaute condicional de *Tsc1*.

Geração	Genótipo	Observado	Esperado	GL	χ^2	p de χ^2
F1	*Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt}; *Cre* negativo	13 (30%)	24,5 (50%)	1	10,796	0,001***
	Tsc1^{flox}/*Tsc1*^{wt}; *Cre* positivo	36 (70%)	24,5 (50%)			
F2	*Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt}; *Cre* negativo	0 (0%)	85,25 (25%)	3	348,185	0,0001****
	Tsc1^{flox}/*Tsc1*^{wt}; *Cre* positivo	188 (55%)	85,25 (25%)			

Tsc1^{flox}/*Tsc1*^{flox}; *Cre* negativo	153 (45%)	85,25 (25%)
Tsc1^{flox}/*Tsc1*^{flox}; *Cre* positivo	0 (0%)	85,25 (25%)

GL: grau de liberdade; χ^2: valor do teste do qui-quadrado; Significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

Esses resultados indicavam que toda vez que o transgene *Cre* era herdado, havia necessariamente a segregação de um alelo tipo-selvagem, impossibilitando a geração de um animal homozigoto para *Tsc1*^{flox} positivo para o transgene *Cre*. Prosseguimos então com animais *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt}, buscando o nocaute condicional de um dos alelos de *Tsc1*. À administração de 4-hidroxitamoxifeno nos animais *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} positivos para *Cre*, espera-se que Cre expresso de forma ubíqua seja translocada ao núcleo celular somente na presença do tamoxifeno, o qual se liga ao domínio do receptor de estrógeno presente em fusão com a recombinase. Nestes animais, haverá deleção do segmento genômico de parte do íntron 16 ao íntron 18 do alelo Flox do gene *Tsc1*. Isso significa que, nesses heterozigotos, somente o alelo tipo-selvagem deverá ser expresso.

Vinte e seis animais foram divididos em cinco grupos para o protocolo cirúrgico de indução de hemiparkinson (Tabela 5). Para verificar diferenças entre os níveis de TSC1 no modelo gerado, utilizaram-se cerebelo e estriado de animais heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e positivos para *Cre*, com injeção de tamoxifeno ou veículo (óleo de amendoim). Não houve diferença entre os níveis de TSC1 no cerebelo desses animais na presença de tamoxifeno (Figura 35A). Já no estriado, ao contrário do que era esperado, observou-se aumento estatisticamente significativo dos níveis de TSC1 na presença desta droga (Figura 35B).

Tabela 5. Grupos experimentais para análise da neurodegeneração induzida por 6-OHDA em neurônios dopaminérgicos em nocaute condicional de *Tsc1*.

Grupo	*Tsc1*	*Cre*	Tamoxifeno	Cirurgia	N
1	wt/flox	+	+	-	2
3	wt/flox	+	+	+	6
4	wt/flox	+	-	+	6
5	flox/flox	-	+	+	6
6	flox/flox	-	-	+	6

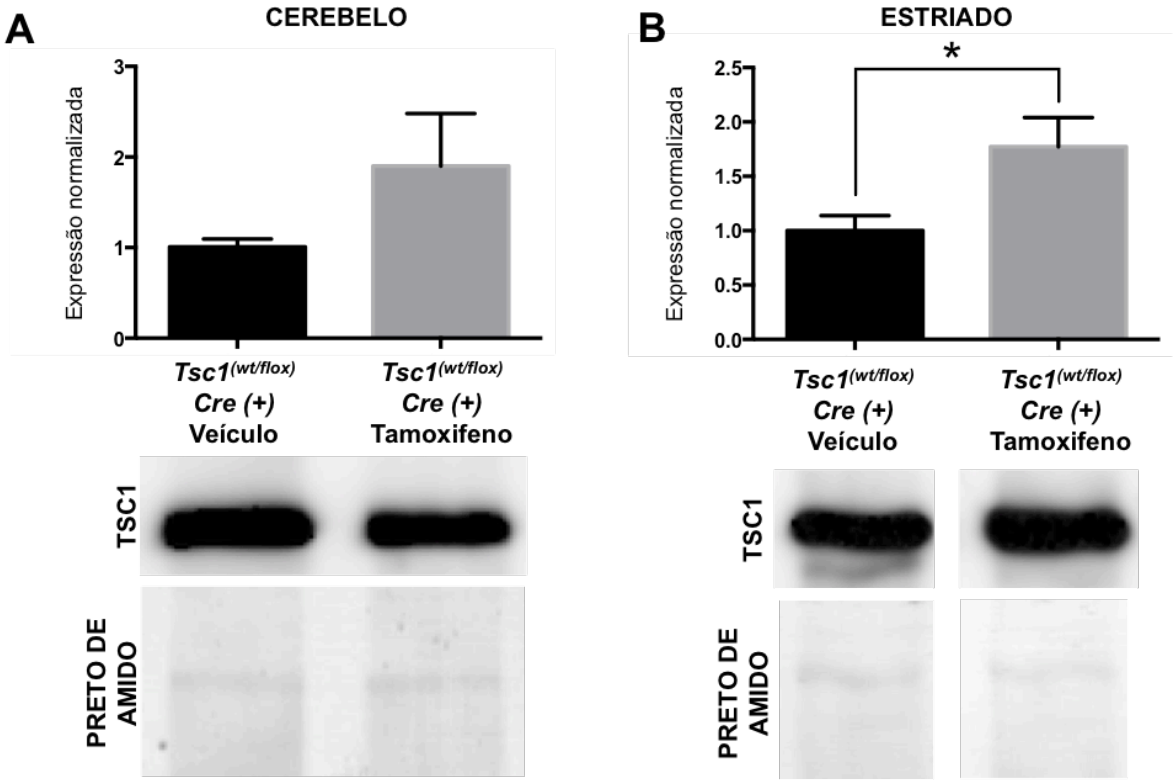


Figura 38. Análise dos níveis de TSC1 no cerebelo (**A**) e no estriado (**B**) por *Western blotting* em animais heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e positivos para *Cre*, com injeção de tamoxifeno ou de veículo. Não há diferença estatisticamente significativa no cerebelo, enquanto há um aumento de TSC1 no estriado na presençaa de tamoxifeno. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (veículo) como 1.0 (100%). Teste t com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

Dado que o objetivo da geração do animal nocaute era a avaliação dos efeitos da injeção unilateral de 6-OHDA, analisamos também os níveis de TSC1 no estriado de animais submetidos a esse protocolo, heterozigotos para *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e positivos para *Cre*, com injeção de veículo. Não houve diferença na expressão de TSC1 entre os lados lesado e controle (Figura 39).

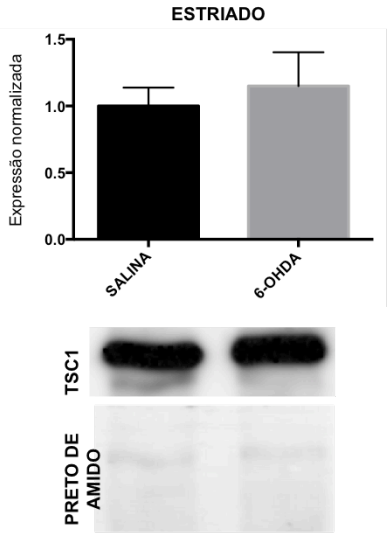


Figura 39. Análise dos níveis de TSC1 no estriado de animais heterozigotos *Tsc1*^{flox}/*Tsc1*^{wt} e positivos para *Cre*, submetidos à injeção com veículo e à indução de hemiparkinsonismo por injeção intracerebroventricular de 6-OHDA. Não há diferença significativa entre os lados injetados com 6-OHDA e com solução salina. Níveis de proteína foram normalizados pela marcação com preto de amido, tendo sido definida a média do grupo controle (injeção de veículo) como 1,0 (100%). Teste *t* de Student sem pareamento com correção de Welch, com significância quando $p<0,05$ [(*) se $0,05>p>0,01$, (**) se $0,01>p>0,001$, (***) se $0,001>p>0,0001$ e (****) se $p<0,0001$].

3.5. DISCUSSÃO

Muitas doenças crônicas, próprias do envelhecimento, têm alguns aspectos em comum: senescência celular com encurtamento dos telômeros, ativação da via de sinalização de PI3K-AKT-mTOR, autofagia deficiente, disfunção mitocondrial, exaustão de renovação e diferenciação de células-tronco, modificações epigenéticas, perfis anômalos de expressão de microRNAs, além de imunossenescência e processos inflamatórios de baixo grau. Muitos desses aspectos são mediados por estresse oxidativo (BARNES, 2015). Células deficientes em TSC1 ou TSC2 são deficientes na homeostasia redox (DAS *et al.*, 2008; FINLAY *et al.*, 2005). Assim, sugere-se que inibição de mTOR deve estender a longevidade (JOHNSON, 2013).

A expressão de TSC2 foi analisada no estriado de animais hemiparkinsonianos por *Western blotting*. Comparando-se lado controle (injeção de solução salina) e lado lesado (injeção de 6-OHDA), não observamos diferenças nos níveis de expressão dessa proteína. Por imunoperoxidase, foram observadas marcações para TSC2 específicas no estriado, uma estrutura diretamente envolvida nesse modelo de doença de Parkinson, e em outras estruturas relacionadas ao circuito motor. TSC2 foi também observado em corpos celulares neuronais no estriado, no tálamo e no globo pálido. Na literatura, existe o registro da expressão de TSC2 no tálamo, e o relato de tumores no estriado de animais nocaute para *Tsc2*, mas não há relatos da expressão desse gene no globo pálido (JOHNSON *et al.*, 1999; MIZUGUCHI *et al.*, 2000). O estriado, além de fibras de neurônios oriundos da SNc, possui interneurônios GABAérgicos e colinérgicos (KANDEL *et al.*, 2013). É possível que alguma dessas populações seja aquela que expressa o TSC2.

TSC1 foi observado em células de morfologia similar à microglial no estriado superior e na região do núcleo entopeduncular. Ao nosso conhecimento, não existem

relatos da expressão de TSC1 nessas estruturas. Como primeira tentativa de confirmar a identidade microglial dessas células, realizamos experimento de dupla imunofluorescência com anticorpo anti-Iba1, um marcador de microglia. As imagens mostram que não há nenhuma co-localização entre as duas proteínas.

Esses resultados mostram a importância do estudo dessas proteínas no modelo de indução de doença de Parkinson aqui utilizado. A correta identificação dessas células e a quantificação da sua expressão e atividade em estruturas lesadas ou não pela injeção de 6-OHDA permitirão identificar possíveis alterações de TSC1 e TSC2 nesse contexto. Não só o estriado e a SNc, mas também o globo pálido, tálamo, núcleo entopeduncular e SNr são atingidos nesse modelo experimental (BLANDINI *et al.*, 2008). Esses resultados indicam também que a expressão de TSC1 e TSC2 em estruturas atingidas no modelo, como estriado, é bastante discreta. Assim, é possível que resultados mais informativos sejam obtidos a partir de técnicas de imagem, como imunofluorescência e imunoperoxidase, do que a partir da técnica de *Western blotting*.

Nos experimentos de imunoperoxidase realizados até o momento, não observamos padrões de marcação semelhantes entre TSC1 e TSC2. Esse efeito pode ter sido causado por diferentes disponibilidades de epítopo entre diferentes tipos celulares e regiões, além da possibilidade de somente uma das duas proteínas serem expressas em determinados tipos celulares.

Ainda nos animais submetidos a indução de neurodegeneração por 6-OHDA, observamos redução da proteína S6, alvo de mTORC1, no lado lesado do estriado em comparação ao lado controle. Essa redução foi significativamente correlacionada com a expressão de tirosina hidroxilase, um marcados de neurônios dopaminérgicos nessa estrutura. É possível então que a redução de S6 esteja diretamente relacionada a perda de terminais dopaminérgicos. Sabe-se que em terminais pós-sinápticos, como os dessa

estrutura, ocorre tradução local de proteínas regulada por mTORC1 (BATISTA; HENGST, 2016). Nesse contexto, faz sentido que S6 esteja presente também nesses terminais e tenha seus níveis reduzidos quando esses terminais são destruídos pela ação da 6-OHDA.

Nocaute condicional

A morte neuronal em modelos de Doença de Parkinson, inclusive o mediado pela 6-OHDA, pode depender da ação inibitória de TSC2 sobre mTOR (MALAGELADA *et al.*, 2006). No planejamento dos cruzamentos para a produção de um nocaute condicional para *Tsc1*, esperávamos que a herança do gene *Tsc1* e do transgene *Ubc-Cre* se desse de forma independente. Sabe-se a localização cromossômica do *Tsc1*, no entanto, a localização de *Ubc-Cre* não foi registrada na literatura. Embora nossos resultados sugiram que esse transgene esteja inserido numa localização genômica próxima a *Tsc1*, de forma que o transgene é frequentemente herdado com o alelo selvagem deste gene, esta hipótese precisa ser testada. Assim, não foi possível a produção de um animal homozigoto para *Tsc1*^{flox} e positivo para *Ubc-Cre*, que nos possibilitaria a geração de um modelo de nocaute total de *Tsc1* sob controle farmacológico. No entanto, a produção de animais heterozigotos para essa mutação é também interessante, já que possibilita o estudo da susceptibilidade de animais à indução de doença de Parkinson por 6-OHDA na condição de haploinsuficiência de *Tsc1*, como é visto na maioria das células de pacientes com TSC.

Os dados preliminares com camundongos heterozigotos e portadores do transgene não revelaram redução da quantidade de TSC1. Contudo, não pudemos testar aqui se, de fato, ocorreu a deleção entre os íntrons 16 e 18 de *Tsc1* de forma mediada por 4-hidroxitamoxifeno. Isso poderá ser feito por PCR de DNA genômico de qualquer tecido, uma vez que se espera expressão ubíqua do transgene, dado seu promotor

reconhecido universalmente. Outra possibilidade é de um efeito traducional de retroalimentação. Se, em um primeiro momento, houve níveis mais baixos de TSC1, uma ativação traducional sobre o RNAm do alelo selvagem de *Tsc1*, causaria elevação na síntese de TSC1.

Não podemos descartar a possibilidade de acentuação transcricional do alelo tipo-selvagem pelo reconhecimento por 4-hidroxitamoxifeno de um elemento responsivo a estrógeno (ERE) associado ao gene *Tsc1* (MEHTA *et al.*, 2011). Isso ocorreria de forma independente da expressão do transgene *UBC-CreESR1*. Como 4-hidroxitamoxifeno apresenta afinidade pela ligação ao domínio do ligante de esteroide do receptor de estrógeno, esta ligação permitiria a ativação e translocação nuclear do receptor pela sua dimerização, habilitando-o como um fator transcricional específico, o qual ativa a expressão de genes associados a EREs. Embora o efeito de 4-hidroxitamoxifeno seja o antagonismo desses receptores, sabe-se que, para alguns EREs há ativação transcricional pelo fármaco [revisto por (HELDRING *et al.*, 2007)]. Uma forma de testar essa hipótese seria pela análise quantitativa do RNAm do alelo tipo selvagem de *Tsc1* (com amplicom para os éxons 16 e 17, por exemplo), além de controles positivos e negativos, como transcritos expressos por genes que sabidamente estão respectivamente associados ou não a EREs. No caso do *TSC1* humano, há relato de variante de base única que confere a habilidade de ERE, associado a casos de câncer de mama (MEHTA *et al.*, 2011). É curioso observar que obtivemos um aumento significante nos níveis de TSC1 no estriado. Isso poderia ocorrer pela participação de proteínas com expressão diferenciada no estriado em relação ao cerebelo que, no efeito combinatorial da expressão do gene *Tsc1* do camundongo culminaria em exacerbação.

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.; MICALE, 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 ß-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 Diasease: 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 PKCa , 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 tuberin: 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 tuberin 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.* IKKβ 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.; MATTSON, 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 supressor 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 tuberin 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.; MISCHEL, 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 beight. **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 tuberin. **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. Tuberin 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.