



ABIERTO

Un inhibidor bitópico de mTORC revierte los fenotipos en un modelo de complejo de esclerosis tuberosa

Sulagna Mukherjee¹, Matthew J. Wolan¹, Mary K. Scott¹, Victoria A. Riley¹, Aidan M. Sokolov¹ y David M. Feliciano^{1,2}

Las células madre neurales (CMN) de la zona ventricular-subventricular (ZV-SV) generan diversos tipos celulares, incluyendo la glía estriatal, durante el período neonatal. La progenie de las CMN desacopla los transcritos de ARNm relacionados con las células madre de su traducción durante la diferenciación. Previamente demostramos que Tsc2

La inactivación, que ocurre en el trastorno del desarrollo neurológico Complejo de Esclerosis Tuberosa (TSC), previene que esto suceda. La pérdida de Tsc2 causa hiperactivación de la proteína quinasa diana mecánica del complejo 1 de rapamicina (mTORC1), traducción alterada, retención de pluripotencialidad en la glía estriatal y la producción de neuronas citomegálicas mal ubicadas que tienen arborizaciones dendritas hipertróficas. Estos fenotipos modelan características de los hamartomas de TSC llamados astrocitomas subependimarios de células gigantes (SEGA). Los inhibidores de mTORC1 llamados análogos de rapamicina (rapalogos) se utilizan actualmente para tratar TSC y para evaluar el papel de mTORC1 en la regulación de los fenotipos relacionados con TSC. Los rapalogos son útiles para tratar SEGA. Sin embargo, requieren aplicación de por vida, tienen efectos secundarios adversos y puede ocurrir resistencia. También inhiben mTORC1 de forma incompleta y tienen una eficacia limitada. Rapalink-1 es un inhibidor bitópico que une la rapamicina a un inhibidor competitivo de ATP de mTOR de segunda generación, MLN0128.

Aquí exploramos el efecto de Rapalink-1 en un modelo de hamartoma de TSC. El modelo se creó mediante electroporación neonatal de ratones con genes Tsc2 condicionales. El tratamiento prolongado con Rapalink-1 se logró con 1,5 o 3,0 mg/kg inyectados intraperitonealmente cada cinco días. Rapalink-1 inhibió la vía mTORC1, disminuyó el tamaño celular, redujo las arborizaciones dendríticas neuronales y redujo el tamaño del hamartoma.

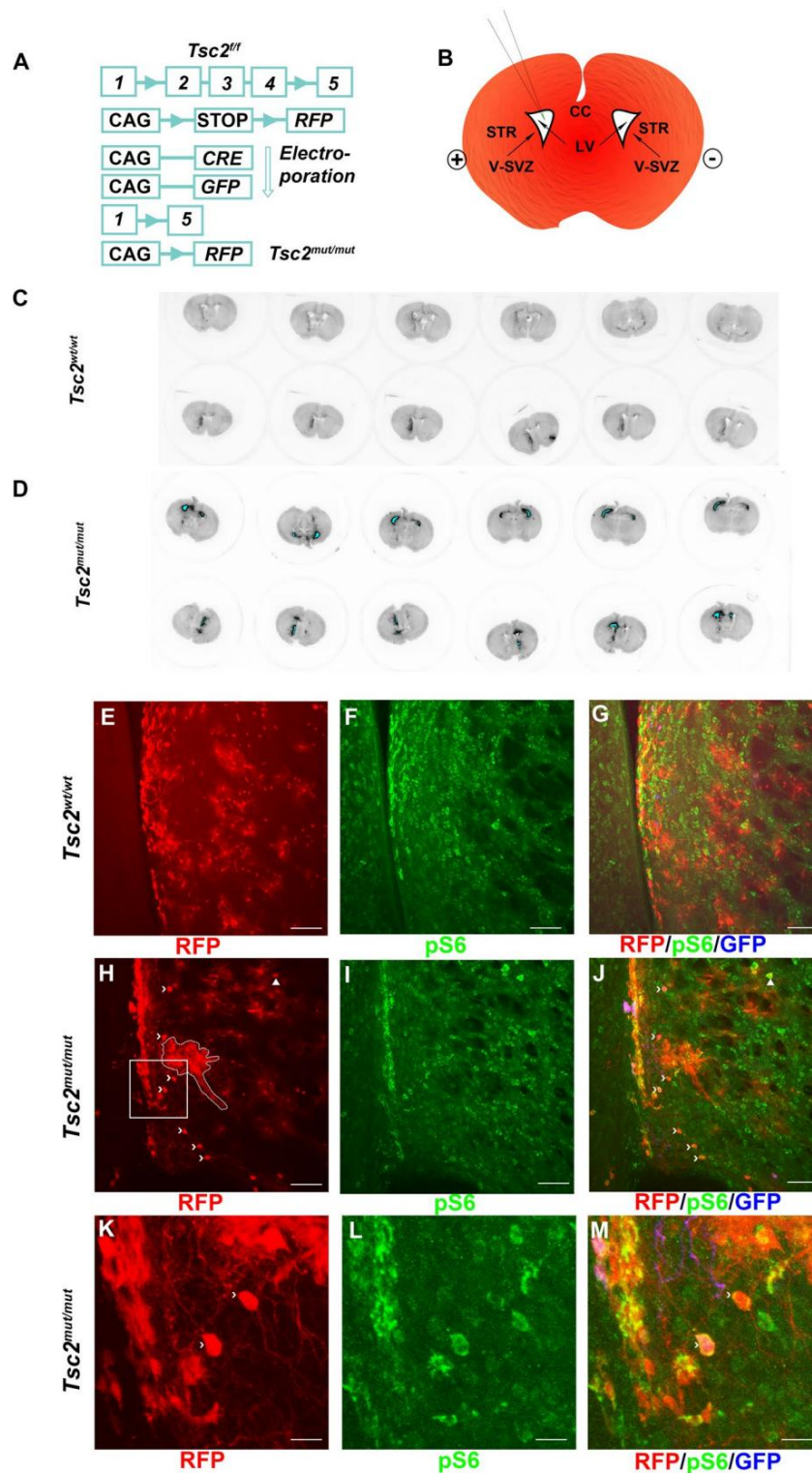
En conclusión, estos resultados demuestran que los fenotipos celulares en un modelo SEGA de TSC se revierten con Rapalink-1, lo que puede ser útil para resolver los hamartomas cerebrales de TSC.

Palabras clave Tsc2, complejo de esclerosis tuberosa, TSC, SEGA, astrocitoma subependimario de células gigantes, Nódulo subependimario, Rapalink-1, mTORC1, Neurogénesis

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es un trastorno genético multisistémico que afecta a aproximadamente el 0,0166 % de la población¹. La TSC es causada por mutaciones de pérdida de función en TSC1 o TSC2^{2,3}. TSC1 y TSC2 codifican las proteínas hamartina y tuberina que inhiben la señalización de Rheb-mTORC1⁴. Las mutaciones de pérdida de función de TSC1/2 activan la vía mTORC1⁵⁻⁸. mTORC1 es un complejo de proteína quinasa que promueve el crecimiento y la proliferación celular⁹. Los pacientes con TSC tienen demasiada actividad de mTORC1 y células agrandadas que crean tumores llamados hamartomas en el corazón, riñón, pulmón, piel y cerebro^{10,11}. Identificar los mecanismos que causan la formación de hamartomas es importante para comprender los muchos trastornos cuyas mutaciones genéticas afectan las vías moleculares que se intersecan con mTORC1 y para desarrollar estrategias terapéuticas para tratar a los pacientes con TSC.

Los pacientes con TSC tienen hamartomas cerebrales llamados nódulos subependimarios (SEN) que invaden el cuerpo estriado y la zona subependimaria (SEZ)^{12,13}. Los SEN se detectan comúnmente durante la infancia^{3,13}. Aproximadamente una cuarta parte de los SEN se clasifican como astrocitomas subependimarios de células gigantes (SEGA)¹²⁻¹⁴. Los SEN pueden transformarse en SEGA¹⁵. Los SEN y los SEGA comparten todas las características histopatológicas¹⁶. Aunque no hay consenso, el criterio de diagnóstico de SEGA es >0,5–1,0 cm de tamaño o crecimiento serial¹⁷. Si bien los SEGA se presentan en todo el sistema ventricular, el bloqueo de la circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR) a lo largo del surco caudotalámico puede causar hidrocefalia obstructiva asociada con migrañas, convulsiones y muerte. Los cambios inexplicables en el estado neurológico o los trastornos neuropsiquiátricos asociados con TSC (TAND) también pueden ser un signo de crecimiento de SEGA¹⁸. La edad media de diagnóstico de SEGA es de 1 año. Solo aproximadamente el 2,4 % de los SEGA se identifican después de los 40 años. Los SEGA pueden sangrar al extirparse, lo que provoca hidrocefalia no obstructiva, daño tisular y mortalidad. Dado que los SEGA se presentan en

¹Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Clemson, Clemson, SC 29634-0314, EE. UU. ²Centro de Genética Humana, Universidad de Clemson, Greenwood, SC, Estados Unidos. Correo electrónico: dfelici@clemson.edu



Los niños pequeños y las personas con este tipo de cáncer se encuentran en las profundidades del cerebro y, como la cirugía implica riesgos, se justifica una intervención farmacológica.

Los inhibidores de mTORC1, incluidos los análogos de rapamicina (rapalogs), son actualmente el tratamiento de referencia, excepto en casos de hidrocefalia aguda. ²¹ Aproximadamente el 57 % de los SEGA se reducen en un 50 % en un plazo de dos años, y las dosis de mantenimiento no suelen asociarse con cambios en el volumen de SEGA. ^{18,19,22} Por lo tanto, los SEGA no siempre responden a los rapalogs. Los niños pueden tolerar mal los rapalogs y, si se interrumpen los tratamientos, los SEGA vuelven a crecer. ²³ Incluso la extirpación quirúrgica de los SEGA se acompaña de un recrecimiento en casi el 40 % de los pacientes. Los mecanismos que explican el recrecimiento de los SEGA no están claros, pero podrían estar relacionados con el hecho de que los inhibidores alostéricos de mTORC1 inhiben de forma incompleta la fosforilación de mTORC1 de sustratos selectos. ^{24,25} Alternativamente, puede producirse resistencia a la unión del rapalog. ²⁶ Se generó un nuevo inhibidor bístico que une MLN0128 a la rapamicina, llamado Rapalink-126. Rapalink-1 inhibe simultáneamente mTORC1 a través de la fracción de rapamicina, actuando sobre la proteína de unión a FK506 12 (FKBP12) y la

Fig. 1. Tratamiento con Rapalink-1 en un modelo murino de TSC. (A) Diagrama esquemático de Tsc2 condicional y Genes RFP inducibles. La recombinasa CRE provoca la recombinación de los exones 2 a 4 de Tsc2 y la expresión de RFP. (B) Diagrama esquemático de la electroporación de los plásmidos CAG-CRE y CAG-GFP (verde). El plásmido se inyecta intraventricularmente en ratones P0-1. Los electrodos colocados en la cabeza de la cría provocan posteriormente la captación de los plásmidos por las células madre neurales que recubren los ventrículos laterales al aplicar un campo eléctrico. C, D) Imágenes macroscópicas de secciones coronales de ratones P60 tras la electroporación. El negro indica la expresión de RFP, mientras que el azul indica la saturación de RFP. EG) Imágenes de la sección coronal 20× Tsc2wt/wt que muestran la inducción de RFP (rojo, E), la tinción de pS6 (verde, F) y la composición con la expresión de GFP (azul, G). HJ) Imágenes de la sección coronal 20× Tsc2mut/mut que muestran la inducción de RFP (rojo, H), la tinción de pS6 (verde, I) y la composición con la expresión de GFP (azul, J). KL) Zoom digital 4× de HI que muestra células con morfología neuronal y pS6 elevado. Los cheurones indican neuronas macroscópicas y la punta de flecha indica una célula gigante. EJ) Barra de escala = 75 µm. KM) Barra de escala = 75 µm.

Dominio de unión de rapamicina FKBP12 de mTOR e inhibición de ambos mTORC a través de la fracción inhibidora competitiva de ATP, MLN012826.

Creamos un modelo murino de SEGA de TSC mediante electroporación de la recombinasa CRE en células madre neurales (CMN) de ratones con genes Tsc2 condicionales para comprender mejor el mecanismo de la patogénesis de SEGA^{27,28}. Los ratones desarrollaron hamartomas con lesiones similares a SEN que se transforman en hamartomas similares a SEGA. Previamente, descubrimos que los programas traduccionales de las CNM mutantes de TSC estaban alterados, lo que impedía la diferenciación, lo que provocaba la producción aberrante de neuronas en el cuerpo estriado. Estas lesiones se asociaban con conjuntos de neuronas citomegálicas y células gigantes. Realizamos la secuenciación de ARN de núcleo único (snRNA-Seq) de estos ratones y descubrimos estados transicionales alterados de las CNM causados por la pérdida de Tsc2. Además, las neuronas eran una característica fundamental de este modelo y presentaban transcriptomas alterados. No se evaluó en qué medida la actividad de mTOR podría causar estos fenotipos.

Lo que sigue son los resultados de un estudio que utiliza el inhibidor bistérico Rapalink-1 en un modelo TSC del estriado. hamartomas que representan lesiones tipo SEGA.

Resultados

Tratamiento con Rapalink-1 de un modelo de ratón TSC

Ratones neonatales Tsc2wt/wt y Tsc2ff x RFP se electroporaron con recombinasa Cre y plásmidos de ADN que codifican GFP (Fig. 1A). La electroporación permite la localización de las células madre neurales (CMN) laterales del V-SVZ, que generan glía estriatal (Fig. 1B). Esto provoca la recombinación, que conlleva la delección de los exones 2-4 de Tsc2 y fluorescencia roja a lo largo de los ventrículos laterales, que aparecen como hamartomas tipo SEGA en ratones Tsc2ff de 30 días postnatales (Fig. 1C, D). Además, las NSC V-SVZ generan neuronas de células granulares que migran al bulbo olfatorio (BO) y maduran por completo 30 días después. Previamente, informamos que los hamartomas en P30 tenían una actividad elevada de mTORC1 evaluada por p4E-BP en células gliales²⁷. También informamos un aumento de mTORC1 evaluado por tinción de pS6 en neuronas producidas a partir de las NSC V-SVZ²⁹. Además, informamos mediciones del crecimiento de neuronas del hamartoma P60 y OB. Por lo tanto, estos puntos temporales ayudaron a guiar el diseño de nuestros experimentos. De hecho, en comparación con las NSC Tsc2wt/wt (Fig. 1E-G) que produjeron principalmente glía, hubo numerosas neuronas positivas para pS6 Tsc2mut/mut y células gigantes cerca del límite estriatal con el V-SVZ (Fig. 1H-M).

Como confirmación de la recombinación de Tsc2, se observó un aumento medio del 23,3 % en pS6 por neurona mutante positiva a RFP (Tsc2wt/wt 1,000 ± 0,03042, n = 110 frente a Tsc2mut/mut 1,233 ± 0,04392, n = 110) (Fig. 1A del Suplemento). Se recogieron células V-SVZ electroporadas con CRE de ratones con Tsc2 condicional y se cultivaron células madre neurales (CMN) para evaluar la recombinación según la RFP (Fig. 1B del Suplemento). Además, se verificaron altas tasas de recombinación de Tsc2 en células RFP, pero no en células madre neurales no positivas a RFP (Figs. 1C y D del Suplemento). Verificamos que la fosforilación del sustrato de mTORC1, Ulk1, fue resistente a 100 nM de rapamicina, pero sensible a 100 nM de inhibidores de mTORC competitivos con ATP (Fig. Suplementaria 1E, F). Estos resultados confirman que la recombinación mediada por CRE ocurre en el modelo de TSC y que algunos sustratos de mTORC1 son resistentes a la rapamicina.

Los ratones neonatos Tsc2ff x RFP fueron posteriormente aleatorizados, se les asignó un número de identificación único y se trataron con Rapalink-1 o DMSO (vehículo) durante 30 días o hasta su sacrificio (Fig. 2A). Los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de euthasol o inhalación de CO₂, seguida de una decapitación rápida. Ningún ratón del grupo control murió y no se observaron cambios significativos en el comportamiento ni signos de angustia (Fig. 2B). Las cohortes de ratones recibieron 1,5 mg/kg o 3,0 mg/kg de Rapalink-1 una vez cada cinco días. Los ratones tratados con 3,0 mg/kg de Rapalink-1 sobrevivieron un promedio de 88,2 días (N=8) (Fig. 2B). Asimismo, 1,5 mg/kg de Rapalink-1 fue bien tolerado (N=5), y todos los ratones sobrevivieron 90 días. Estas dosis fueron generalmente toleradas y en ocasiones se produjo la muerte con dosis de 3,0 mg/kg y con pesos ligeramente inferiores al final del tratamiento (Fig. 2C).

Rapalink-1 inhibe la actividad de mTORC1

La actividad de mTORC1 y la fosforilación del sustrato en el cerebro dependen del tipo celular²⁹⁻³¹. Observamos que los niveles de pS6 fueron altos en células Tsc2 nulas, positivas para RFP, con morfologías similares a las de las neuronas (Fig. 3A-F)²⁷. Se analizó pS6 en neuronas mutantes Tsc2 tratadas con vehículo, Rapalink-1 (1,5 mg/kg) o Rapalink-1 (3,0 mg/kg) (Fig. 3G-L). 1,5 mg/kg de Rapalink-1 redujo pS6 (p<0,05) en comparación con los ratones tratados con vehículo. 3,0 mg/kg de Rapalink-1 también redujo significativamente pS6 (p<0,0001) en comparación con las condiciones del vehículo (Vehículo = 1,066 ± 0,029, n = 857 frente a 1,5 mg/kg de Rapalink-1). kg=0,9127±0,065, n=218 frente a Rapalink-1 3,0 mg/kg=0,835±0,029 n=452) (Fig. 3M).

Confirmamos el grado de reducción de la señalización de mTORC1 mediante el tratamiento agudo diario con Rapalink-1 durante cinco días. Rapalink-1 se ha utilizado en dosis más altas en experimentos agudos in vivo³². Por lo tanto, evaluamos la eficacia aguda de Rapalink-1 a una dosis mayor (6 mg/kg) pero inferior a 10 mg/kg, que es la dosis de rapamicina utilizada para comparar ambos fármacos²⁶. Rapalink-1 redujo la señalización de mTORC1, como se detectó mediante el examen de las tinciones de p4EBP y pS6.

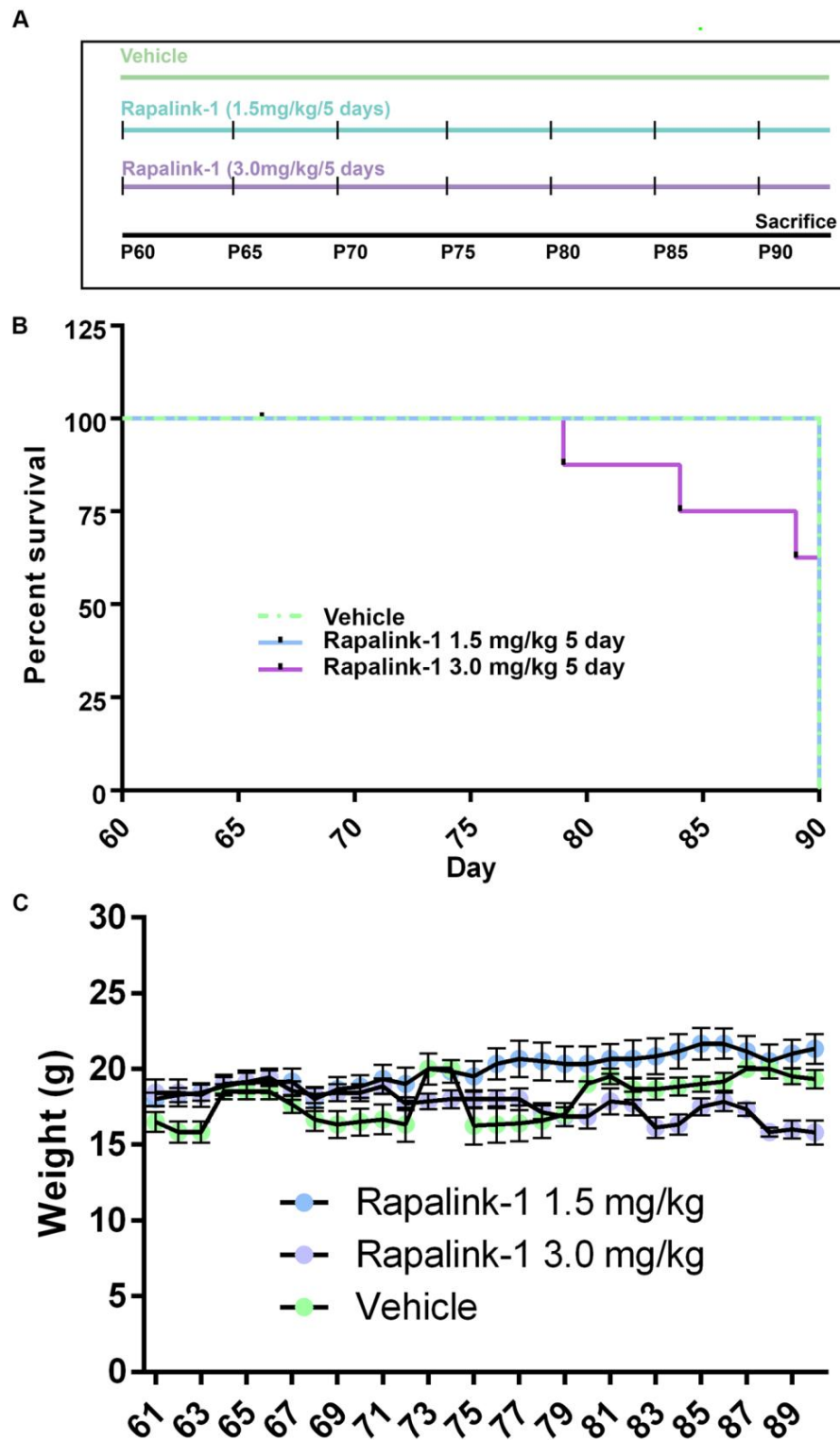


Fig. 2. (A) Esquema de dosis. (B) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones control y tratados con Rapalink-1. (C) Pesos de los ratones control y tratados con Rapalink-1. Los datos se representan como media $\pm$ EEM.

En el cerebro y mediante inmunotransferencia para pS6 (Vehículo = $1,000 \pm 0,04189$, N = 3 vs. Rapalink-1 = $0,7707 \pm 0,02518$, N = 3; P = 0,0094) (Fig. Suplementaria 2). La inhibición de mTORC2 por Rapalink-1 se confirmó mediante una reducción de pAKT, como se informó previamente (Fig. Suplementaria 2)32. Estos resultados confirman que Rapalink-1 puede, efectivamente, reducir la señalización de mTOR in vivo.

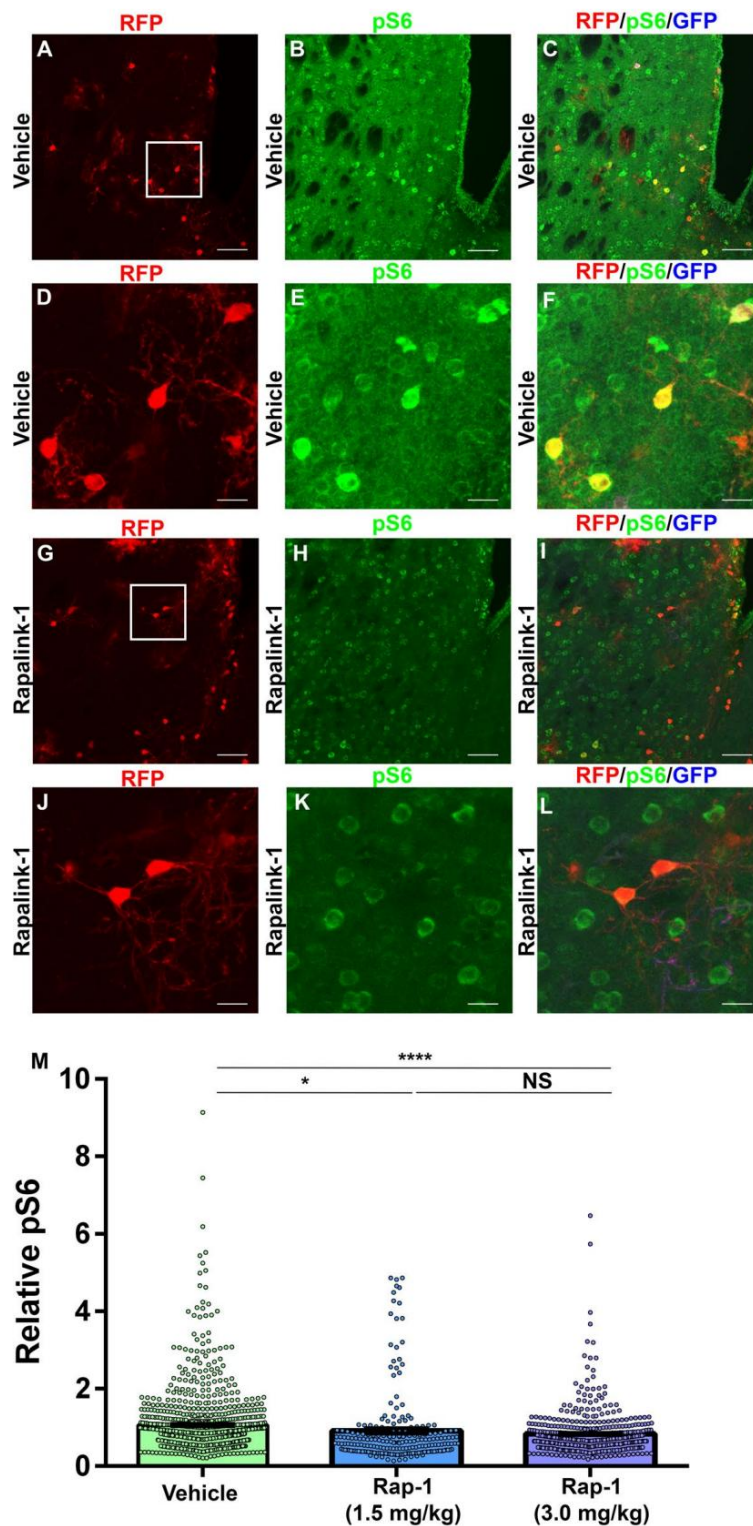


Fig. 3. Rapalink-1 inhibe la actividad de mTORC1. AC) Imágenes a 20x de RFP (rojo, A), pS6 (verde, B) y compuesto con GFP (azul, C) en una sección coronal de un cerebro de ratón tratado con el vehículo Tsc2mut/mut P90. El rectángulo indica la región ampliada en DF. DF) Imágenes digitales ampliadas a 4x de AC que muestran la morfología neuronal. GI) Imágenes a 20x de RFP (rojo, G), pS6 (verde, H) y compuesta con GFP (azul, I) en una sección coronal del cerebro de un ratón tratado con Tsc2mut/mut P90 Rapalink-1 (3 mg/kg). JL) Imágenes digitales ampliadas a 4x de GI que muestran la morfología neuronal. M) Cuantificación de pS6 en células RFP positivas. * $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$. Los datos se representan como media $\pm$ EEM. Barra de escala de AC y GI = 75 μ m. Barra de escala de DF y JL = 18,75 μ m.

Rapalink-1 reduce el tamaño del soma neuronal del mutante Tsc2
mTOR regula el crecimiento del soma de las células granulares OB33. La pérdida de mTOR y la inhibición de mTORC1 con rapamicina disminuyen el tamaño del soma de las células granulares³³. Por el contrario, la pérdida de Tsc2 aumenta el tamaño del soma de las células granulares y las neuronas estriatales^{27,29}. Nos preguntamos hasta qué punto podría disminuir el tamaño del soma en las neuronas mutantes Tsc2 tras el tratamiento con Rapalink-1. Las dosis bajas de Rapalink-1 (1,5 mg/kg) y altas (3,0 mg/kg) disminuyeron el tamaño promedio del soma de las neuronas mutantes Tsc2 (Vehículo = $1,00 \pm 0,016$ frente a Rapalink-1 1,5 mg/kg = $0,7463 \pm 0,01$ frente a Rapalink-1 3,0 mg/kg = $0,689 \pm 0,015$, $p < 0,0001$) (Fig. 4A-H, K). Documentamos una población de células gigantes con alta actividad de mTORC1 incluso después del tratamiento con 3,0 mg/kg de Rapalink-1 (Fig. 4I, J). Sin embargo, la proporción relativa de células clasificadas como gigantes en relación con el número total de células por sección se redujo en la condición de 3,0 mg/kg de Rapalink-1 (Vehículo = $0,0451 \pm 0,0044$ vs. Rapalink-1 1,5 mg/kg = $0,0415 \pm 0,0125$ vs. Rapalink-1 3,0 mg/kg = $0,0274 \pm 0,03623$, $p < 0,01$). En conjunto, Rapalink-1 parece disminuir el tamaño promedio de las neuronas mutantes Tsc2.

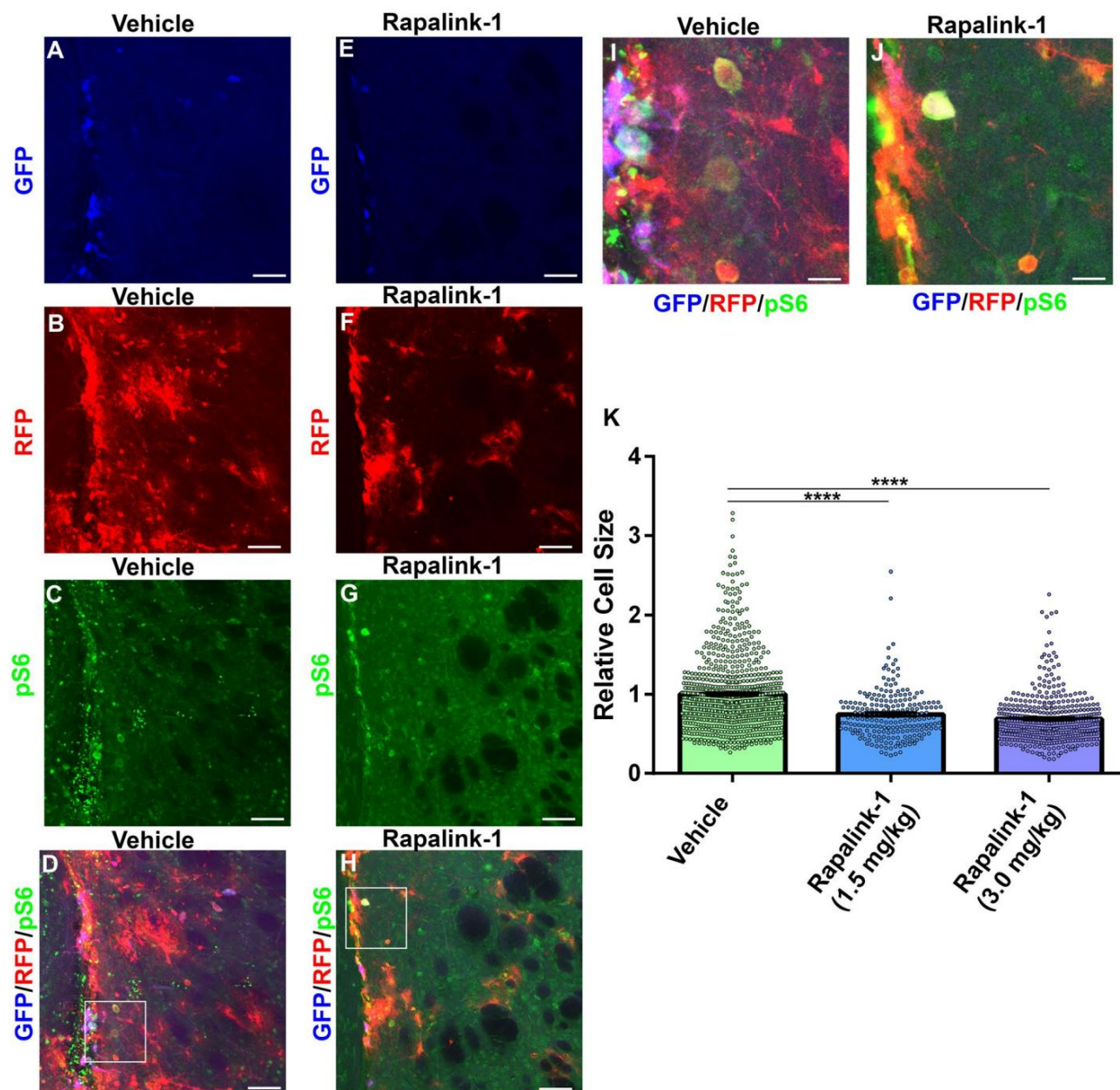


Fig. 4. Rapalink-1 reduce el tamaño celular. AD) Imágenes a 20x de GFP (azul, A), RFP (rojo, B), pS6 (verde, C) y compuesto (D) en cerebros control Tsc2mut/mut P90. EH) Imágenes a 20x de GFP (azul, E), RFP (rojo, F), pS6 (verde, G) y compuesto (H) en cerebros con Tsc2mut/mut P90 Rapalink-1 (3 mg/kg). I, J) Imágenes de D y H ampliadas al 400% que muestran ejemplos de células gigantes. K) Cuantificación del tamaño del soma neuronal en relación con los controles. Los datos se representan como media $\pm$ EEM. Barra de escala = 75 μ m. ****= $p < 0,0001$.

El tratamiento con Rapalink-1 disminuye las arborizaciones dendríticas neuronales

Previamente demostramos que la pérdida de Tsc1 y Tsc2, o el aumento de Rheb, aumentaba la densidad de las arborizaciones dendríticas de las neuronas de células granulares OB producidas a partir de las células madre neurales V-SVZ^{29,34,35}. Esto probablemente se deba a que mTOR y los componentes del complejo mTOR, raptor y rictor, regulan la densidad de las arborizaciones dendríticas de las células granulares³³. Las neuronas presentes en el cuerpo estriado del modelo SEGA también presentan más dendritas que las neuronas de células granulares OB de tipo silvestre o mutantes con Tsc2²⁷. Estas neuronas mutantes también son más grandes y presentan una mayor complejidad dendrítica en comparación con cualquier neurona de tipo silvestre de control presente en el cuerpo estriado.

Se observaron reducciones significativas en los arboretos dendríticos causadas por Rapalink-1 a bajo aumento (Fig. 5A, B). Para confirmar y cuantificar esta observación, se rastrearon las neuronas de ratones control y tratados con Rapalink-1 (Fig. 5C, D). Rapalink-1 redujo sustancialmente la longitud y la complejidad de las dendritas neuronales Tsc2mut/mut. Rapalink-1 (3,0 mg/kg) redujo significativamente ($p < 0,01$, ANOVA con prueba de comparaciones múltiples de Tukey) el número total de cruces de dendritas en comparación con las condiciones tratadas con el vehículo (Vehículo = $713,0 \pm 74,53$, $n = 24$ vs. Rapalink-1 1,5 mg/kg = $563,8 \pm 46,64$, $n = 24$ vs. Rapalink-1 3,0 mg/kg = $465,5 \pm 33,85$, $n = 50$) (Fig. 5E, F). Por lo tanto, el tratamiento a largo plazo con Rapalink-1 reduce significativamente las arborizaciones dendritas en las neuronas mutantes Tsc2.

Eficacia de rapalink-1 para el tratamiento de hamartomas de TSC

El determinante final de la eficacia de Rapalink-1 fue el tamaño promedio de la lesión en P90. Los hamartomas estriales se midieron trazando las lesiones como se describió previamente²⁷. Se observó que el área transversal proyectada en z de los hamartomas continúa aumentando notablemente en P90, y algunos hamartomas se muestran agresivos e invaden diferentes regiones, alcanzando un tamaño diez veces mayor que los medidos en P60 (Figs. 1 y 6). En comparación, los ratones tratados con 1,5 mg/kg de Rapalink-1 tuvieron hamartomas que fueron considerablemente (~68,6 %) más pequeños calculados utilizando el área de sección transversal proyectada z y 3,0 mg/kg de Rapalink-1 redujeron significativamente ($p = 0,0363$) los tamaños de los hamartomas a la mitad en relación con las condiciones de control (vehículo = 40096 ± 8461 , $n = 38$ frente a Rapalink-1 1,5 mg/kg = 27520 ± 2243 , $n = 58$ frente a Rapalink-1 3,0 mg/kg = 19636 ± 3266 , $n = 33$) (Fig. 6I).

Discusión

Los SEGA son una causa importante de morbilidad en pacientes con CET. Los rapálogos son un tratamiento de primera línea para los SEGA^{36–39}. Aquí demostramos que, de igual manera, Rapalink-1 es útil para revertir fenotipos neuronales en un modelo murino de TSC con hamartomas tipo SEGA (Fig. 6J). Aunque aproximadamente el 57 % de los SEGA en TSC se reducen al 50 % en dos años, el tratamiento continuo no reduce aún más el volumen de SEGA^{18,19,22}. El uso prolongado de Rapalogs también es necesario porque la interrupción del tratamiento se asocia con el recrecimiento de SEGA. Se deben desarrollar nuevas terapias basadas en la eficacia limitada de los Rapalogs y sus efectos secundarios²³. Los estudios también han demostrado el desarrollo de resistencia a la rapamicina a través de cambios en el dominio de unión a rapamicina FKB12 de mTOR²⁶. Finalmente, la rapamicina no inhibe completamente la fosforilación de varios sustratos de mTORC1²⁵. Existe una necesidad urgente de probar nuevas terapias que puedan superar estos problemas. Rapalink-1 es un candidato excelente, ya que satisface la necesidad de inhibir completamente la fosforilación de mTORC1 en sustratos resistentes a la rapamicina y, simultáneamente, inhibe mTORC2 y soluciona los problemas de resistencia²⁶. Por lo tanto, es concebible que Rapalink-1 pueda ser útil para tratar la CET. Para cumplir con el objetivo de examinar terapias adicionales para la CET, probamos Rapalink-1 en un modelo murino de hamartomas tipo SEGA de CET.

Los mecanismos que explican el crecimiento de SEGA no están claros en pacientes, lo que podría deberse a la escasa comprensión de la composición celular, las diferencias regionales en los SEGA y si los mecanismos moleculares involucrados en las diferentes regiones y el momento de su aparición pueden variar. El hecho de que la composición de los SEGA se haya debatido durante casi un siglo demuestra que los experimentos deben examinar cuidadosamente el efecto de los fármacos no solo en el tamaño de los SEGA, sino también en los diferentes tipos celulares dentro de los SEGA^{40,41}.

Los SEGA también parecen cambiar con el tiempo. Experimentos de imagenología y secuenciación de ARN sugieren un cambio gradual en su composición, llegando a contener neuronas y células gigantes citomegálicas (42–48). También se produce cicatrización gliótica, calcificación e invasión de células inmunitarias (48). Esto es similar a lo que ocurre en los tubérculos corticales de pacientes con CET.

Aunque los SEGA no suelen causar convulsiones de forma directa, la presencia de neuronas mutantes y células gigantes justifica una inspección más minuciosa, como también la determinación de sus contribuciones a la presentación del paciente.

La pérdida de Tsc2 en los neuroprogenitores V-SVZ resulta en la transición aberrante de estados quiescentes a activos y durante la diferenciación^{30,31,49,50}. La pérdida de Tsc2 previene la regulación negativa adicional de la actividad de mTORC1 en un subconjunto de células dentro del cuerpo estriado, lo que lleva a crecimientos que incluyen hamartomas nodulares que contienen células con morfologías heterogéneas. Los hamartomas se caracterizan por grupos heterotópicos anormales de células morfológicamente heterogéneas que incluyen neuronas tanto dentro como fuera de los crecimientos. Por lo tanto, el modelo de ratón de hamartoma tipo TSC SEGA nos permitió examinar la utilidad del tratamiento con Rapalink-1 en el control de fenotipos neuronales y tamaño del hamartoma. Se utilizaron ratones machos y hembras, y no se observaron diferencias entre sexos, pero los estudios aquí no fueron diseñados ni estadísticamente potenciados para explorar esta variable. Esta variable biológica podría ser relevante para examinar en futuros estudios. La administración intermitente de Rapalink-1 (1,5 mg/kg y 3,0 mg/kg cada cinco días) fue generalmente tolerada durante el estudio, pero experimentos preliminares demostraron toxicidad aguda durante el tratamiento diario (datos no mostrados). Como se predijo, Rapalink-1 redujo la actividad de mTORC1. Sin embargo, esta se redujo solo entre un 15 % y un 23 %, medido utilizando pS6 como indicador, y pS6 permaneció visible en todo el cerebro.

Por lo tanto, estas dosis podrían inhibir de forma incompleta mTORC1. De hecho, también se evaluó una dosis más alta (6 mg/kg) basándose en la eficacia en gliomas y pareció más efectiva mediante inmunohistoquímica y Western blot, pero se asoció con toxicidad³². No está claro si los tratamientos prolongados de 1,5 mg/kg y 3,0 mg/kg de Rapalink-1 durante más de 30 días estarían acompañados de efectos secundarios adicionales. Además, los ratones tratados con 1,5 y 3,0 mg/kg de Rapalink-1 fueron sacrificados 5 días después de la última inyección de Rapalink-1. Por lo tanto, la actividad de mTORC1 podría recuperarse y nuestros datos podrían subestimar la eficacia de Rapalink-1. No obstante, la reducción en pS6 sirvió como indicador de que Rapalink-1 inhibió mTORC1.

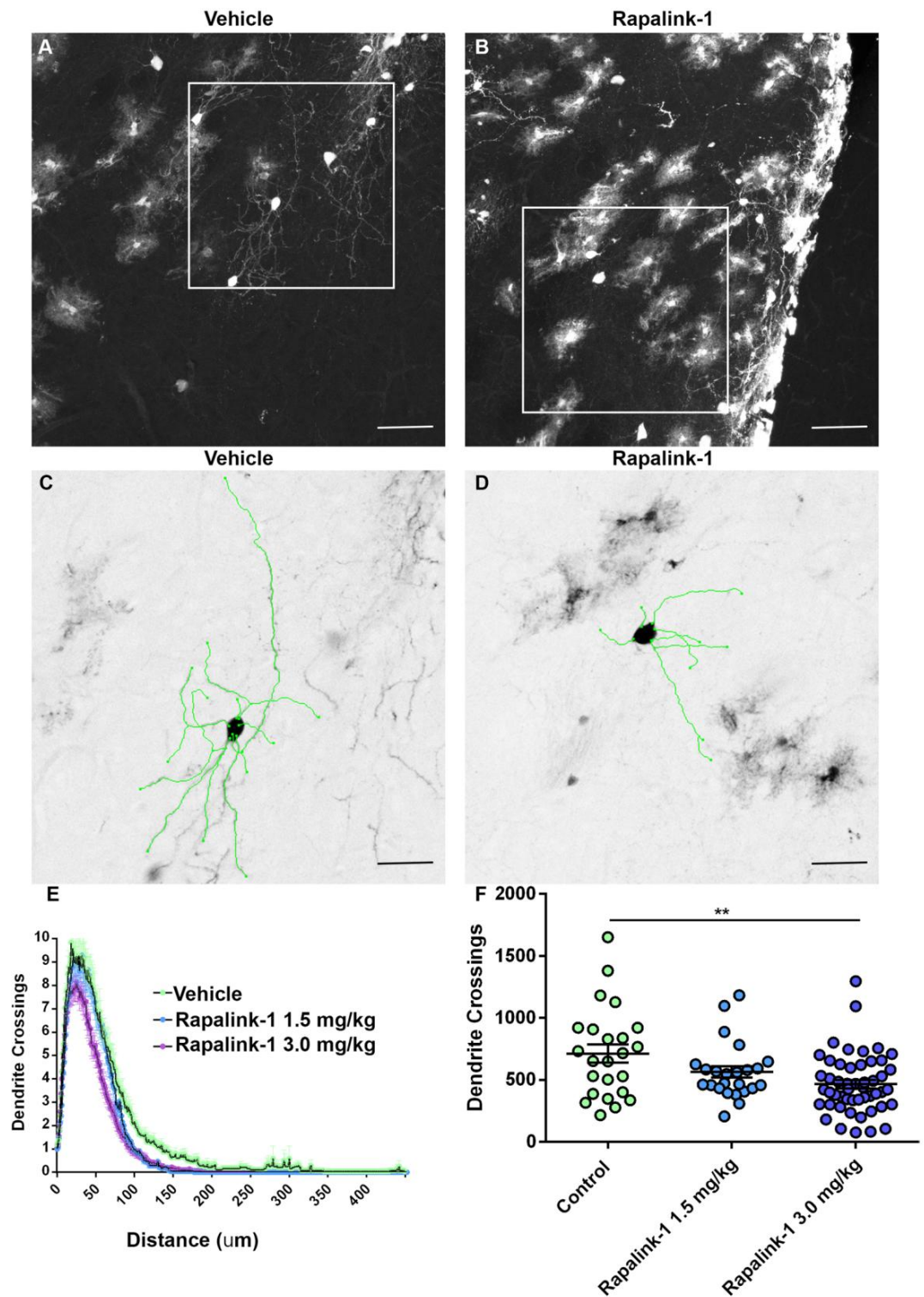


Fig. 5. Rapalink-1 reduce las arborizaciones dendríticas en un modelo de células madre dendríticas (TSC). (A) Imagen a 20x de RFP de un cerebro de ratón con Tsc2mut/mut P90 tratado con vehículo. (B) Imagen a 20x de RFP de un cerebro de ratón tratado con Tsc2mut/mut P90 3,0 mg/kg de Rapalink-1. (C) Imagen ampliada con una neurona en el cuadrado de A sometida a rastreo (resaltada en verde). (D) Imagen ampliada con una neurona en el cuadrado de B sometida a rastreo (resaltada en verde). (E) Análisis de Sholl que demuestra el efecto de Rapalink-1 en las arborizaciones dendríticas. (F) Número total de cruces dendríticos en cada neurona de los ratones control y tratados con Rapalink-1. Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos se representan como media $\pm$ EEM. Barra de escala = 75 μm (A, B) o 37,5 μm (C, D). **= $p < 0,01$.

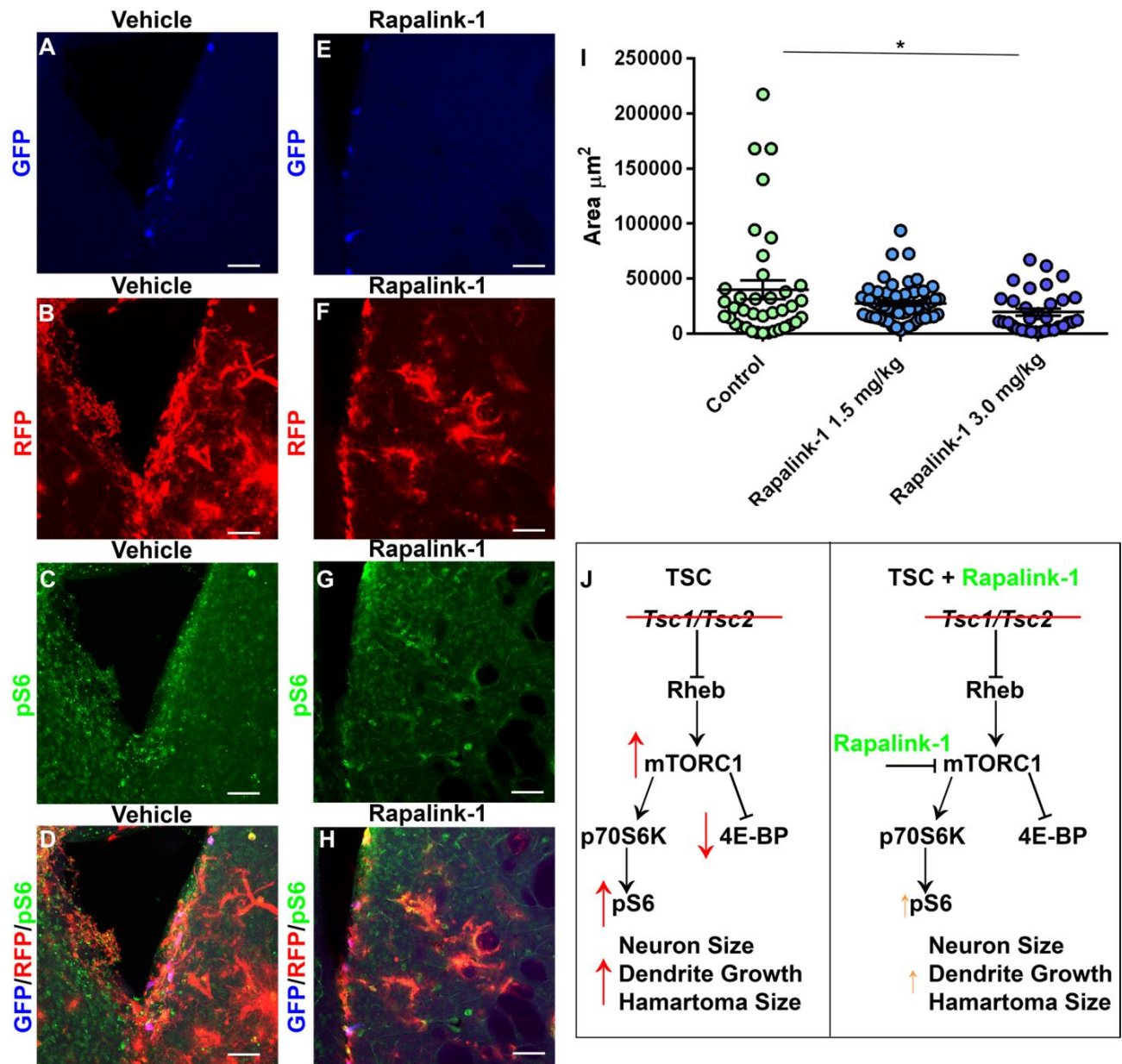


Fig. 6. Rapalink-1 reduce el tamaño del hamartoma. AD) Imágenes a 20x de GFP (azul), pS6 (verde) y RFP (rojo) en cerebros con *Tsc2mut/mut P90* tratados con vehículo o EH. Imágenes a 20x de GFP (azul), pS6 (verde) y RFP (rojo) en cerebros tratados con *Tsc2mut/mut P90* 3,0 mg/kg de Rapalink-1. I) Cuantificación del área de la lesión. J) Diagrama esquemático de las vías moleculares reguladas por *Tsc1/Tsc2* en el modelo de TSC en cerebros control y tratados con Rapalink-1. *Tsc1/Tsc2* desactiva la vía mTORC1 en condiciones normales. Sin embargo, en el modelo TSC SEGA (izquierda), *Tsc1/Tsc2* Los productos proteicos codificados no pueden desactivar mTORC1, lo que genera neuronas ectópicas/citomegálicas con actividad excesiva de mTORC1, dendritas hipertróficas, células gigantes y lesiones similares a SEGA (es decir, hamartomas estriatales). Rapalink-1 parece corregir parcialmente estos cambios con la inhibición de mTORC1, la disminución del tamaño neuronal y la reducción de las lesiones tipo SEGA. Los datos se representan como media $\pm$ EEM. Barra de escala = 150 μm (A, B) o 37,5 μm (C, D). $*=p < 0,05$.

Razonamos que la inhibición prolongada de mTORC1 disminuiría el bien documentado efecto de mTORC1. fenómeno regulado del crecimiento celular⁵¹. Trabajos previos de nuestro laboratorio y nuestros colegas han demostrado que las células granulares generadas por NSC V-SVZ neonatal crecen cuando se eliminan *Tsc1* o *Tsc2*^{29,34}. Además, la expresión ectópica de Rheb de tipo silvestre o mutante puede impulsar el crecimiento celular en células granulares^{35,52}. El crecimiento de las células granulares depende de mTOR, ya que la electroporación CRE de mTOR condicional reduce el tamaño del soma³³. Además, el tratamiento con rapamicina reduce el tamaño del soma de las células granulares, lo que respalda la importancia de mTORC1 en este proceso³³. Como era de esperar, Rapalink-1, en ambas dosis, redujo el tamaño celular de las neuronas mutantes *Tsc2* entre un 25 % y un 31 %. Estos resultados respaldan la probabilidad de que Rapalink-1 inhiba los eventos celulares dependientes de mTORC1.

Aunque el papel de las neuronas estriatales en el modelo de hamartoma tipo SEGA no está claro, las neuronas ectópicas pueden afectar a una amplia gama de otros tipos de células. Los tubérculos corticales y las malformaciones focales del desarrollo cortical parecen experimentar cambios análogos, incluyendo astrogliosis y activación de la microglía¹¹. Y esto está directamente relacionado con la hiperexcitabilidad neuronal. Por lo tanto, un objetivo principal para la investigación de TSC y trastornos relacionados ha sido reducir el crecimiento de las dendritas con la esperanza de modular la actividad neuronal. mTOR, a través de mTORC1 y mTORC2, regula los árboles dendríticos de las células granulares OB33. Mientras que la regulación del citoesqueleto se atribuye con mayor frecuencia a mTORC2, la rapamicina y mTORC1 se han estudiado cuidadosamente en relación con el crecimiento de las dendritas. Por ejemplo, al igual que el crecimiento celular, la pérdida de Tsc1 y Tsc2, así como el aumento de la actividad de Rheb, promueven [el crecimiento de las dendritas](#)^{29,34,35,52}. Observamos que Rapalink-1 redujo de forma similar las dendritas de las neuronas mutantes Tsc2 estriatales. Por lo tanto, Rapalink-1 podría ser ventajoso al unirse a ambos brazos de la señalización de mTOR32.

Esto es particularmente importante ya que varios grupos han postulado que vías adicionales pueden regular el crecimiento de SEGA. Por ejemplo, un grupo eliminó simultáneamente Pten y Tsc1 en NSC V-SVZ postnatales¹⁶. Esto resultó en la generación de SEGA que recapitulaban la mayoría de los aspectos de los pacientes. Las NSC mutantes Pten/Tsc1 se inyectaron subcutáneamente y generaron tumores. Las NSC mutantes Pten/Tsc1 también alteraron la actividad de Erk y Akt. La supresión del componente mTORC2 rictor o la inhibición combinada de rapamicina y PI3K-mTOR redujeron el crecimiento tumoral¹⁶. Por lo tanto, los inhibidores que actúan tanto en mTORC1 como en mTORC2, como Rapalink-1, tienen varias ventajas. En consonancia con estos resultados, encontramos que Rapalink-1 produjo un efecto moderado pero significativo en el tamaño promedio de las SEGA. El efecto de Rapalink-1 fue desproporcionado al observado en el tamaño celular o las dendritas. No está claro si la eficacia de Rapalink-1 se debe a su efecto sobre la actividad neuronal o sobre otros tipos celulares, y se requerirán más experimentos. Una limitación de la inhibición de mTORC2 es que podría provocar efectos secundarios adicionales no observados con los rapálogos. Estudios futuros deberían comparar directamente la eficacia de la rapamicina o los rapálogos con Rapalink-1.

En conjunto, este estudio proporciona evidencia in vivo de la utilidad de Rapalink-1 para controlar mTOR, el tamaño celular, hipertrofia dendrítica y crecimiento de hamartomas tipo SEGA que pueden tener importancia clínica.

Métodos

Modelo experimental y detalles del sujeto

Animales

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Clemson y la Oficina de Revisión de Cuidado y Uso de Animales (ACURO), dependiente de la Oficina de Protección de la Investigación (ORP) del USAMRDC, perteneciente al Departamento de Defensa (DoD). Todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes. Todos los métodos se informan de acuerdo con las directrices ARRIVE.

La proteína fluorescente roja (RFP+/-, +/-) (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J) (cepa n.º 007909, RRID: IMSR_JAX:007909) y Tsc2tm1.1Mjg/J (cepa n.º 027458, RRID: IMSR_JAX:027458) se adquirieron en Jackson Laboratories⁵³. El tratamiento farmacológico de las células madre neurales cultivadas se realizó en ratones CD1. Los ratones centinela se mantuvieron libres de patógenos durante todo el estudio. Las muestras/sujetos se asignaron aleatoriamente al grupo experimental.

Se realizaron manipulaciones experimentales en crías de ratón no involucradas en procedimientos previos y se sacrificaron según correspondía. Se utilizaron ratones de ambos sexos, y las edades se indican en las figuras. Los ratones se alojaron en condiciones estándar libres de patógenos en jaulas sobre bastidores dentro de cubículos aislados con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y se alimentaron ad libitum. Se les inyectó intraperitonealmente con las dosis y la pauta indicadas. Los fármacos se prepararon como se describió previamente con DMSO, PEG-300 y [PBS](#)³². Las inyecciones se realizaron en cabinas de seguridad biológica.

Los ratones se pesaron de 5 a 7 días a la semana y se registró su peso. Los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de euthasol o inhalación de CO₂, seguida de una decapitación rápida.

Electroporación

Las crías de ratón B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J) x Tsc2tm1.1Mjg/J se electroporaron como se describió previamente^{^{54,55}}. Se inyectaron a los ratones concentraciones y volúmenes iguales de plásmidos de ADN diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,1 % de verde rápido. Se utilizaron los plásmidos CAG-CRE (plásmido n.º 13775, Addgene) y CAG-GFP (plásmido n.º 11150, Addgene)^{^{56,57}}. Se cargó con ADN una micropipeta de vidrio de borosilicato generada a partir de tubos capilares extraídos y se inyectó en los ventrículos laterales. La generación de pulsos cuadrados se realizó utilizando un generador de pulsos (ECM830; BTX) y electrodos de pinza (modelo 520; BTX) con cinco pulsos cuadrados de 100 voltios de 50 ms de duración con intervalos de 950 ms.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de dedos o cola se sometieron a una extracción de ADN modificada con tecnología Hotshot y se genotiparon mediante PCR utilizando la polimerasa Taq Platinum™ de Invitrogen™, mezclada con agua sin nucleasas, tampón de PCR sin magnesio, MgCl₂, mezcla de dNTP con cebadores y ADN, según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Los cebadores para Tsc2 fueron 5'-ACAATGGG. AGGCACATTACC-3' y 5-AAGCAGCAGGTCTGCAGTG-3' y para tomate (RFP) 5'-AAGGGAGCTGCA GTGGAGTA-3' y 5'-CCGAAATCTGTGGGAAGTC-3' y 5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3' y 5'-

CTGTTCTGTACGGCATGG-3'. Los amplicones se cargaron en geles de agarosa con Blue Juice 1X y se procesaron a 100 V durante 20-30 minutos. Posteriormente, se visualizaron en un analizador BioRad Chemidoc MP.

Inmunohistoquímica

Los cerebros se extrajeron en PBS a temperatura ambiente, se transfirieron a paraformaldehído al 4% en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los cerebros se enjuagaron en PBS y se montaron en agarosa al 3%. Se utilizó un vibratomo Leica VTS 1000 para seccionar los cerebros coronalmente. Las secciones se bloquearon en Triton X-100 al 0,1%, Tween-20 al 0,1% y BSA al 2% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron en Tween-20 al 0,1% en PBS. Las secciones se incubaron en anticuerpo primario, anti-pS6 (1:500; Cell Signaling Technology; Ser 240/244, 61H9, #4838), en Tween-20 al 0,1% y BSA al 2% en PBS durante la noche a 4 °C. Las secciones se sometieron a tres lavados adicionales en PBS que contenía Tween-20 al 0,1%.

Las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado (serie Alexa Fluor; 1:500; Invitrogen) en Tween-20 al 0,1 % y BSA al 2 % en PBS durante la noche a 4 °C. Las secciones se montaron en el medio de montaje ProLong Antifade (ThermoFisher). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal espectral (Leica SPE) con un objetivo seco de $\times 20$ (NA 0,75). Las imágenes de bajo aumento se adquirieron con un objetivo seco de $\times 10$ o $\times 5$ (NA 0,15).

Análisis de imágenes

Se cargaron imágenes ($\times 20$) de células RFP positivas en FIJI (ImageJ 1,5 g) y se analizaron como se describe en otro lugar²⁷.

La herramienta de selección a mano alzada se utilizó para rastrear somas celulares electroporadas y no electroporadas en la misma sección Z y se cuantificaron los valores grises medios para pS6. Se compararon las proporciones de células electroporadas y no electroporadas para células RFP positivas en condiciones Tsc2wt/wt y Tsc2mut/mut para tener en cuenta la variación inmunohistoquímica. El tamaño del soma se registró simultáneamente para las células rastreadas. El perímetro del hamartoma RFP positivo se delineó en cada sección Z a mano desplazándose a través de secciones Z individuales y los hamartomas se rastrearán posteriormente en imágenes ($\times 20$). La herramienta de selección a mano alzada se utilizó para rastrear lesiones RFP positivas. Las imágenes ($\times 20$) se utilizaron para medir la morfología de las dendritas. Las dendritas se rastrearán utilizando el complemento trazador de neuritas simple. El análisis de Sholl se realizó a intervalos de 1 μm para cuantificar la arborización de las dendritas utilizando el complemento Sholl. El número total de cruces dendríticos se calculó tomando la suma de los cruces en todos los intervalos para cada neurona rastreada y promediando el número total de cruces por neurona en cada condición.

Western blot

Se extrajo tejido (0,1 g) y se trituró finamente en SDS al 2 %, cóctel inhibidor de proteasas (Pierce) y cóctel inhibidor de fosfatasa, en tampón RIPA (Tris HCl 25 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM; NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 1 %, SDS al 0,1 %). Las muestras se sonicaron brevemente a la configuración máxima (100 Amplitude, QSonica) durante 10 s tres veces, con intervalos de reposo de 30 s. El lisado se transfirió en hielo a un tubo de reacción limpio y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min en una centrífuga de sobremesa Eppendorf 5415 a 4 °C. La concentración de proteínas se cuantificó mediante el ensayo MicroBCA de Pierce. Se igualaron cantidades de proteína con tampón de lisis, como se describió anteriormente, y tampón Laemmli, y se calentó a 95 °C durante 5 min. Las proteínas se resolvieron mediante geles mini-Protein prefabricados de poliacrilamida al 10 % (BioRad) y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas de PVDF se enjuagaron en solución salina tamponada con Tris (TBS-T, Tween 20 al 0,1 %) durante 5 min a temperatura ambiente y se bloquearon con un bloque de grado de transferencia al 5 % (BioRad) en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos de Cell Signaling Technology a una dilución 1:1000: fosfo-RPS6 (D68F8, Cat# 5364), RPS6 (5G10, Cat# 2217), fosfo-Ulk (D706U, Cat# 14202), Ulk (D8H5, Cat# 8054), fosfo-AKT (D9E, Cat# 4060) y AKT (Cat# 9272). Las membranas se enjuagaron tres veces durante 10 min cada una en TBS-T. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-conejo de burro o cabra en tampón de bloqueo. Las membranas se lavaron durante 15 min en TBS-T y se visualizaron utilizando un sistema de imágenes Bio-Rad Chemidoc MP utilizando reactivo de quimioluminiscencia mejorada (Pierce).

Las membranas de PVDF se pelaron a temperatura ambiente utilizando el tampón de pelado Western Blot Restore de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Cat. n.º 21059, Thermo Fisher Scientific).

Cultivo de células primarias

Brevemente, se anestesiaron ratones P0-1 CD1 en hielo y se decapitaron. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en medio Neurobasal A a 4 °C en placas de Petri preenfriadas. Las V-SVZ microdisecadas se colocaron en tripsina al 0,05 % con EDTA al 0,02 % en Neurobasal A durante 7 min en una incubadora a 37 °C. Se añadieron volúmenes iguales de inhibidor de tripsina definido (1X; Life Technologies; lote n.º 1837475). Las muestras se centrifugaron a 300 xg durante 5 min. El sedimento se resuspendió con 1 ml de Neurobasal A. El sedimento se trituró con tres pipetas de pasto con diámetro interior secuencialmente reducido para disociar el tejido. Las células se centrifugaron a 300 xg durante 5 min y se resuspendieron en 200 μL de medio Neurobasal A completo (1X Glutamax, 50 unidades/mL de penicilina/estreptomicina, 20 ng/mL de EGF, 20 ng/mL de FGF-2 y 2% de suplemento B27). Las células se colocaron en cubreobjetos recubiertos con laminina en placas de 24 pocillos en medio Neurobasal A completo para experimentos farmacológicos realizados 24 h después o se colocaron en placas de 6 pocillos para análisis de recombinación como se describió previamente^{27,29}. Las muestras se recogieron en SDS al 2%, cóctel de inhibidores de proteasa (Pierce) y cóctel de inhibidores de fosfatasa, en tampón RIPA para transferencia Western. Alternativamente, las muestras se sometieron a aislamiento de ADN y PCR de largo alcance para productos de recombinación de Tsc2 como se describió previamente^{27,29}.

Tratamientos farmacológicos

Las células madre neurales (CMN) se trataron con rapamicina 100 nM (#9904s, Cell Signaling Technology) o con Torin1, un inhibidor competitivo de ATP 100 nM (#14379, Cell Signaling Technology). Torin1, a partir de una solución madre de 1 mM, se reconstituyó en DMSO (MP Biomedicals). La rapamicina se reconstituyó en DMSO para una solución madre de 100 mM. Se utilizó DMSO equimolar en todas las condiciones. Para el experimento de inanición celular primaria, las CMN se colocaron en PBS durante 2 h antes del tratamiento farmacológico o se volvieron a colocar en un medio completo para activar mTORC1 durante el tratamiento farmacológico (2 h).

Cuantificación y análisis estadístico

Las mediciones se graficaron y el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (versión 8.2.0, GraphPad Software Inc.). La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba T de Student. N (número de ratones) y n (número de células o hamartomas) se enumeran cuando corresponde. El análisis de la Figura 3 (pS6) y la Fig. 4 (tamaño celular) se realizó en ratones con vehículo (N = 6), Rapalink-1 1,5 mg/kg (N = 4) y Rapalink-1 3,0 mg/kg (N = 7). El análisis de Sholl y hamartoma se informa para los ratones con vehículo (N = 4), Rapalink-1 1,5 mg/kg (N = 4) y Rapalink-1 3,0 mg/kg (N = 6) en las Figs. 5 y 6. Los datos suplementarios se obtuvieron en N = 3 ratones para todas las condiciones de análisis inmunohistoquímico y transferencia Western. Las barras de error se informan como la media del error estándar.

Tabla de recursos clave

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Anticuerpos		
anticuerpo monoclonal de conejo pS6 Ser 240/244	Señalización celular Tecnología	Gato#4838; RRID: AB_659977; Clon: 61H9
p4EBP Thr 37/46 monoclonal de conejo	Señalización celular Tecnología	Gato n.º 2855; RRID: AB_560835; Clon: 236B4
anticuerpo monoclonal de conejo RPS6	Señalización celular Tecnología	Gato#2217; RRID: AB_331355; Clon: 5G10
Productos químicos, péptidos y proteínas recombinantes		
Modelos experimentales: organismos/cepas		
Ratón: RFP+/-, RFP+/-; B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J	Jackson Laboratorios	Gato#007909; RRID: IMSR_JAX: 007909
Ratón: Tsc2wt/wt, Tsc2mut/mut: Tsc2tm1.1Mjg/J	Jackson Laboratorios	Gato n.º 027458; RRID: IMSR_JAX: 027458
Oligonucleótidos		
Cebadores: Tsc2: 5'-ACAATGGGAGGCACATTACC-3', 5'-AAGCAGCAGGTCTGCAGTG-3'	ADN integrado Tecnologías	N / A
Cebadores: RFP: 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAG TA-3', 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAG TC-3', 5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3', 5'-CTGTTCCGTACGGCATGG-3'	ADN integrado Tecnologías	N / A
Cebadores: Para detectar la recombinación de Tsc2 5'-AAGATCCGGCTTGAAG GAG-3', 5'-CACTA-GTCTAGCCTGACTCT-3' y 5'-GAGGACAAGCC AACATCCAT-3'	ADN integrado Tecnologías	N / A
ADN recombinante		
Plásmido: CAG-CRE	57	Gato n.º 13.775; RRID: Addgene_13775
Plásmido: CAG-GFP	58	Gato n.º 11.150; RRID: Addgene_11150
Software y algoritmos		
FIJI (ImageJ 1.5 g)		https://imagej.net/software/fiji/downloads
GraphPad Prism (versión 8.2.0)	GraphPad Software Inc	https://www.graphpad.com/

Disponibilidad de datos

Los conjuntos de datos generados o analizados durante el presente estudio están disponibles en los repositorios de Mendeley Data y Neu-roMorpho. Los datos de Western blot se depositaron en Mendeley Data como Feliciano, David (2025), “Un inhibidor bitópico de mTORC revierte fenotipos en un modelo complejo de esclerosis tuberosa”, V1, doi: 10.17632/hjt-9m462d3.1 (<https://data.mendeley.com/datasets/hjt9m462d3/1>) . Los rastros neuronales están disponibles en NeuroMorpho.org, en la sección “Un inhibidor bitópico de mTORC revierte fenotipos en un modelo complejo de esclerosis tuberosa” o en neuromorpho.org/dableFiles/mukherjee_feliciano/Supplementary/Mukherjee_Feli-ciano.zip.

Recibido: 11 de febrero de 2025; Aceptado: 20 de junio de 2025
Published online: 01 July 2025

Referencias

1. Northrup, H. et al. Criterios actualizados de diagnóstico, vigilancia y tratamiento del complejo internacional de esclerosis tuberosa. Recomendaciones. *Pediatr. Neurol.* 123 <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.07.011> (2021).

2. Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16. Identificación y caracterización del gen de la esclerosis tuberosa en el cromosoma 16. *Cell* 75, 1305–1315. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90618-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90618-Z) (1993).

3. Van Sleightenhorst, M. et al. Identificación del gen de la esclerosis tuberosa TSC1 en el cromosoma 9q34. *Science* 277, 805–808. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.805> (1997).

4. Feliciano, DM. Modelado del mosaicismismo genético de la vía de la diana de la rapamicina en mamíferos en la corteza cerebral. *Portada. Ciencias de los mamíferos* 2. (2023). <https://doi.org/10.3389/fmamm.2023.1231778>

5. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. y Guan, KL. La Rheb GTPasa es un objetivo directo de la actividad de TSC2 GAP y regula la señalización de mTOR. *Genes Dev.* 17, 1829–1834. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003> (2003).

6. Beugnet, A., Tee, AR, Taylor, PM y Proud, CG Regulación de los objetivos de la señalización de mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) por Disponibilidad intracelular de aminoácidos. *Biochem. J.* 372, 555–566. <https://doi.org/10.1042/BJ20021266> (2003).

7. Garami, A. et al. La activación insulínica de rheb, un mediador de la señalización de mTOR/S6K4E-BP, es inhibida por TSC1 y 2. *Mol. Cell.* 11, 1457–1466. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00220-X) (2003).

8. Zhang, Y. et al. Rheb es un objetivo directo de las proteínas supresoras de tumores de la esclerosis tuberosa. *Nat. Cell. Biol.* 5, 578–581. <https://doi.org/10.1016/j.1016.0rg/10.1038/ncb999> (2003).

9. Saxton, RA y Sabatini, DM Señalización de mTOR en Crecimiento, Metabolismo y Enfermedad. *Cell* 168, 960–976. (2017). <https://doi.org/10.1016/j.celda.2017.02.004>

10. Feliciano, DM et al. Circuitos y bases bioquímicas para los síntomas de la esclerosis tuberosa: desde la epilepsia hasta los déficits neurocognitivos. (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jdevneu.2013.02.008>

11. Feliciano, DM La patogénesis del neurodesarrollo del complejo de esclerosis tuberosa (TSC) en *Frontiers*, (2020). <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00039>

12. Northrup, H. et al. Actualización de los criterios diagnósticos del complejo de esclerosis tuberosa: recomendaciones de la conferencia internacional de consenso sobre el complejo de esclerosis tuberosa de 2012. *Pediatr. Neurol.* 49, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001> (2013).
13. Chan, DL, Calder, T., Lawson, JA, Mowat, D. y Kennedy, SE. Historia natural de los astrocitomas subependimarios de células gigantes en el complejo de esclerosis tuberosa: Una revisión. *Rev. Neurosci.* 29, 295–301. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0027> (2018).
14. Adriaensens, MEAPM et al. Prevalencia de tumores subependimarios de células gigantes en pacientes con esclerosis tuberosa y una revisión de la literatura. *Eur. J. Neurol.* 16, 691–696. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02567.x> (2009).
15. Fujiwara, S., Takaki, T., Hikita, T. y Nishio, S. Astrocitoma subependimario de células gigantes asociado con esclerosis tuberosa: ¿Crecen los nódulos subependimarios? *Child's Nerv. Syst.* 5, (1989). <https://doi.org/10.1007/BF00706748>
16. Zordan, P. et al. Las anomalías del SNC asociadas al complejo de esclerosis tuberosa dependen de la hiperactivación de mTORC1 y Akt. *J. Clin. Invest.* 128, 1688–1706. <https://doi.org/10.1172/JCI96342> (2018).
17. Jóźwiak, S., Nabbut, R. y Curatolo, P. Manejo del astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA) asociado al complejo de esclerosis tuberosa (CET): Recomendaciones clínicas. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 17 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.12.008>
18. Jansen, AC et al. Características clínicas del astrocitoma subependimario de células gigantes en el complejo de esclerosis tuberosa. *Portada. Neurol.* <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00705> (2019).
19. Jansen, AC et al. Astrocitoma subependimario de células gigantes de reciente diagnóstico y en crecimiento en adultos con complejo de esclerosis tuberosa: resultados del estudio internacional TOSCA. *Front. Neurol.* 10 <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00821> (2019).
20. Ryoo, JS et al. Tendencias en la supervivencia y el tratamiento del SEGA: Análisis de la Base de Datos Nacional de Cáncer. *Neuro-Oncology Pract.* 8, (2021). <https://doi.org/10.1093/nop/npaa060>
21. Franz, DN et al. Eficacia y seguridad del everolimus para los astrocitomas subependimarios de células gigantes asociados con el complejo de esclerosis tuberosa (EXIST-1): Un ensayo multicéntrico, aleatorizado y controlado con placebo de fase 3. *Lancet* 381, 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61134-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61134-9) (2013).
22. Kotulska, K. et al. Efecto a largo plazo del everolimus sobre la epilepsia y el crecimiento en niños menores de 3 años tratados por astrocitoma subependimario de células gigantes asociado con el complejo de esclerosis tuberosa. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 17 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.03.002>
23. Franz, DN y Capal, JK Inhibidores de MTOR en el tratamiento farmacológico del complejo de esclerosis tuberosa y su potencial papel en otros trastornos raros del desarrollo neurológico, (2017). <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0596-2>
24. Thoreen, CC et al. Un objetivo mamífero competitivo con ATP del inhibidor de la rapamicina revela funciones resistentes a la rapamicina de mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284, 8023–8032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900301200> (2009).
25. Kang, SA et al. Los sitios de fosforilación de mTORC1 codifican su sensibilidad a la inanición y a la rapamicina. *Science* 341, 364–373. <https://doi.org/10.1126/science.1236566> (2013).
26. Rodrik-Outmezguine, VS et al. Superando las mutaciones de resistencia a mTOR con un inhibidor de mTOR de nueva generación. *Nature* 534 <https://doi.org/10.1038/nature17963> (2016).
27. Riley, VA et al. Tsc2 coordina la diferenciación de neuroprogenitores. *iScience* 26, 108442. (2023). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108442>
28. Holmberg, J., Riley, V., Sokolov, A., Mukherjee, S. y Feliciano, D. Protocolo para la electroporación y el aislamiento de células (sub)ventriculares murinas. *Células zonales para núcleos ómicos individuales (Star Protoc.* 2024).
29. Riley, VA, Holmberg, JC, Sokolov, AM y Feliciano, DM Tsc2 modela las células granulares del bulbo olfatorio desde el punto de vista molecular y morfológico. *Características. Anverso. Mol. Neurosci.* 15, 19 (2022).
30. Pallouras, GN et al. La diana mamífera de la señalización de rapamicina es un regulador clave del conjunto de progenitores amplificadores de tránsito en el prosencéfalo adulto y envejecido. *J. Neurosci.* 32, 15012–15026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2248-12.2012> (2012).
31. Hartman, NW et al. mTORC1 se dirige al represor traduccional 4E-BP2, pero no a la quinasas S6 1/2, para regular la auto-Renovación in vivo. *Cell. Rep.* 5, 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.017> (2013).
32. Fan, QW et al. Un inhibidor de quinasas dirigido a mTORC1 impulsa la regresión en el glioblastoma. *Cancer Cell.* 31, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.014> (2017).
33. Skalecka, A. et al. La quinasas mTOR es necesaria para el desarrollo y la estabilización de las arborizaciones dendríticas en neuronas del bulbo olfatorio recién nacidas. *Dev. Neurobiol.* 76, 1308–1327. <https://doi.org/10.1002/dneu.22392> (2016).
34. Feliciano, DM, Quon, JL, Su, T., Taylor, MM y Bordey, A. La neurogénesis posnatal genera heterotopías, micronódulos olfatorios e infiltración cortical tras la delección de TSC1 en una sola célula. *Hum. Mol. Genet.* 21, 799–810. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr511> (2012).
35. Sokolov, AM, Holmberg, JC y Feliciano, DM El transportador de aminoácidos Slc7a5 regula la vía mTOR y es necesario para el desarrollo de células granulares. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa186> (2020).
36. Franz, DN et al. Everolimus para el astrocitoma subependimario de células gigantes: análisis final a los 5 años. *Ann. Neurol.* 78, 929–938. <https://doi.org/10.1002/ana.24523> (2015).
37. Krueger, DA et al. Seguridad y eficacia a largo plazo del everolimus en el astrocitoma subependimario de células gigantes. *Neurology* 80, 574–580. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182815428> (2013).
38. Bobeff, K. et al. Terapia de mantenimiento con everolimus para el astrocitoma subependimario de células gigantes en pacientes con esclerosis tuberosa: resultados finales del estudio EMINENTS. *Front. Neurol.* 12, (2021). <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.581102>
39. Sasongko, TH, Ismail, NFD y Zabidi-Hussain, ZAMH Rapamicina y Rapalogs para el complejo de esclerosis tuberosa (2016). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011272.pub2>
40. Critchley, M. y Earl, CJC. Esclerosis tuberosa y afecciones afines. *Brain* 55, (1932). <https://doi.org/10.1093/brain/55.3.311>
41. Buccoliero, AM et al. Astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA): ¿Es un astrocitoma? Morfológico e inmunohistoquímico. y estudio ultraestructural. *Neuropatología* 29, (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2008.00934.x>
42. Gelot, AB y Represa, A. Progresión de las lesiones cerebrales fetales en el complejo de esclerosis tuberosa. *Portada. Neurosci.* 14, (2020). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00899>
43. Eichmüller, OL et al. La amplificación de progenitores de interneuronas humanas promueve tumores cerebrales y defectos neurológicos. *Ciencia* 375 <https://doi.org/10.1126/science.abf5546> (2022).
44. Stefansson, K. y Wollmann, R. Distribución de la proteína ácida fibrilar glial en las lesiones del sistema nervioso central de la esclerosis tuberosa. *Acta Neuropathol.* 52 <https://doi.org/10.1007/BF00688011> (1980).
45. Stefansson, K. y Wollmann, R. Distribución de la proteína neuronal específica, 14-3-2, en lesiones del sistema nervioso central de células tuberosas. esclerosis. *Acta Neuropathol.* 53 <https://doi.org/10.1007/BF00689991> (1981).
46. Tobo, M., Mitsuyama, Y. y Kaku, T. Proteína ácida fibrilar glial en la esclerosis tuberosa. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 37, 95–100. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1983.tb00307.x> (1983).
47. Mizuguchi, M. Células gigantes anormales en las lesiones cerebrales del complejo de esclerosis tuberosa. *Congenit Anom. (Kioto).* 47, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2006.00134.x> (2007).
48. Martin, KR et al. El panorama genómico del complejo de esclerosis tuberosa. *Nat. Commun.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms15816> (2017).
49. Blair, JD, Hockemeyer, D., Doudna, JA, Bateup, HS y Floor, SN Remodelación traslacional generalizada durante la Diferenciación neuronal. *Cell. Rep.* 21, 2005–2016. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.095> (2017).
50. Baser, A. et al. El inicio de la diferenciación está controlado postranscripcionalmente en células madre neurales adultas. *Nature* 566, 100–104. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0888-x> (2019).
51. Saxton, RA y Sabatini, DM. Señalización de mTOR en el crecimiento. *Enfermedades del metabolismo.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004> (2017).

52. Lafourcade, CA et al. La activación de Rheb en progenitores de la zona subventricular conduce a heterotopía, diferenciación neuronal ectópica y micronúcleos olfativos sensibles a la rapamicina e hipertrofia dendrítica en neuronas recién nacidas. *J. Neurosci.* 33, 2419–2431. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1840-12.2013> (2013).
53. Hernandez, O., Way, S., McKenna, J. y Gambello, MJ. Generación de una disrupción condicional del gen *Tsc2*. *Génesis* 45, 101–106. <https://doi.org/10.1002/dvg.20271> (2007).
54. Feliciano, DM, Lafourcade, CA y Bordey, A. Electroporación de la zona subventricular neonatal. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/50197> (2013).
55. Holmberg, JC, Riley, VA, Sokolov, AM, Mukherjee, S. y Feliciano, DM. Protocolo para la electroporación y aislamiento de células de la zona (sub)ventricular murina para la ómica de núcleo único. *STAR. Protoc.* 5, 103095. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103095> (2024).
56. Matsuda, T. y Cepko, CL. Expresión controlada de transgenes introducidos mediante electroporación in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 104. (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0610155104>
57. Matsuda, T. y Cepko, CL. Electroporación e interferencia de ARN en la retina de roedores in vivo e in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 101. (2004). <https://doi.org/10.1073/pnas.2235688100>

Expresiones de gratitud

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos de América, Premio a la Actividad de Investigación Médica del Ejército de los EE. UU., Programa de Investigación Médica Dirigido por el Congreso, Programa de Investigación del Complejo de Esclerosis Tuberosa W81XWH2010447.

Contribuciones del autor

Conceptualización, DF; Metodología, SM, DF, MW, MS, AS, VR; Validación, DF, VR, MW, MS, AS; Análisis formal, SM, MW, MS, AS, DF; Investigación, DF, SM, VR, MW, MS, AS; Recursos, DF; Curación de datos, DF, MW, MS; Redacción del borrador original, DF; Redacción, revisión y edición, DF, SM, VR, MW, MS, AS; Visualización, SM, DF; Supervisión, DF; Administración del proyecto, DF; Adquisición de fondos, DF.

Fondos

DMF cuenta con el apoyo del Departamento de Defensa de los Estados Unidos de América Premio a la actividad de investigación médica del ejército de los EE. UU. Programa de investigación médica dirigido por el Congreso Programa de investigación del complejo de esclerosis tuberosa W81XWH2010447.

Declaraciones

Intereses en competencia

Los autores declaran no tener intereses en conflicto.

Incompatibilidad

Los autores declaran que los investigadores no tienen intereses financieros en competencia.

Información adicional

Información complementaria La versión en línea contiene material complementario disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08345-z>.

La correspondencia y las solicitudes de materiales deberán dirigirse a DMF

La información sobre reimpresiones y permisos está disponible en www.nature.com/reprints.

Nota del editor: Springer Nature permanece neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales.

Acceso abierto. Este artículo está bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional, que permite cualquier uso no comercial, compartir, distribuir y reproducir en cualquier medio o formato, siempre que se otorgue el crédito correspondiente al autor o autores originales y a la fuente, se proporcione un enlace a la licencia Creative Commons y se indique si se modificó el material licenciado. Esta licencia no permite compartir material adaptado derivado de este artículo o partes del mismo. Las imágenes u otros materiales de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito del material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y el uso previsto no está permitido por la normativa legal o excede el uso permitido, deberá obtener el permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© El autor(es) 2025