



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS

**“mTOR regula positivamente la activación de  
STAT3 en el epitelio intestinal durante colitis  
experimental”**

TESIS

Que presenta

IBQ. Octavio López Méndez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR

**Director de tesis:**

Dr. Porfirio Nava Domínguez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico a través de una beca de maestría (número de beca 781790) otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Avanzados del IPN por proporcionarme las facilidades necesarias en cuanto a materiales e instalaciones, así como el buen trato que me brindó el personal que labora ahí en toda mi estancia.

Al Doctor Porfirio Nava Domínguez por la dirección de esta tesis y por darme la oportunidad de incursionar en la investigación científica en su laboratorio.

A mis asesores de tesis el Dr. Gerardo Contreras Patiño y al Dr. Marcos Nahmad Bensusan por tomarse un poco de su tiempo en asesorar la conducción de esta tesis y por sus consejos.

A la M.C. Aurora Candelario Martínez por su apoyo técnico, sus consejos y su gran aprecio hacia mi persona.

A mis compañeros de laboratorio Carolina, Fernando y Felipe por su apoyo técnico, sus consejos y su apoyo moral necesarios para concluir esta etapa académica de mi vida.

A mis compañeros de generación Balduino, Alan, Karen, Marilyn, Narek, Antonio, Cristina y Enrique por contribuir de forma directa o indirecta en mi entusiasmo para continuar con este proyecto de vida así como por bríndame sus consejos.

## **DEDICATORIA**

...A mis padres por darme lo más valioso en la vida, la educación.

## Contenido

1. Introducción .....	6
2. Marco teórico.....	6
2.1 El epitelio intestinal.....	6
2.2 Las vías de señalización que se afectan durante los procesos inflamatorios intestinales.....	8
2.3 Papel de mTORC1 en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales .....	10
2.4 La vía de señalización Interleucina 6/STAT3 juega un papel clave en el desarrollo de las EII	11
3. Planteamiento del problema .....	12
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivo general.....	12
5.1 Objetivos particulares .....	12
6. Materiales .....	13
6.1 Ratones.....	13
6.2 Anticuerpos y reactivos.....	13
7. Metodología .....	14
7.1 Ensayos In Vitro .....	14
7.2 Tratamiento con citocinas in vivo .....	14
7.3 Obtención de ratones modelo de colitis aguda .....	15
7.4 Extracción del Colon.....	15
7.5 Inmunofluorescencia.....	15
7.6 Western Blot .....	16
8. Resultados .....	17
8.1 STAT3 se activa desde el día 4 en la mucosa del colon de ratones con colitis experimental .	17
8.2 mTORC1 y STAT3 se activan en el epitelio del colon expuesto a IL-6 e IFN $\gamma$ , citocinas característica de la mucosa inflamada.....	18
8.3 La inhibición de mTORC1 abate la activación de STAT3 in vivo e in vitro .....	21
9. Discusión .....	24
10. Conclusión .....	25
11. Perspectivas .....	25
12. Bibliografía .....	26

## **Resumen**

El factor de transcripción STAT3 juega un papel importante en el desarrollo de varias patologías y en el mantenimiento de la homeostasis tisular. En el epitelio intestinal ha sido demostrado que STAT3 juega un papel crítico en la homeostasis intestinal y la regeneración de la mucosa después de un daño por inflamación. Usando un modelo murino de inflamación del colon inducido por Dextran Sulfato de Sodio, nosotros demostramos que STAT3 es activado en células epiteliales durante el progreso de la inflamación. Además, encontramos que mTORC1 es necesario para mediar la activación de STAT3 río abajo del receptor a IL-6 e IFN $\gamma$ . Además encontramos que mTORC1 que se encuentra río abajo de estos receptores, no es activado a través del eje de señalización PI3K/Akt. Nuestros resultados demuestran que mTORC1 juega un papel importante en la activación de STAT3, río abajo de la señalización del receptor a IL-6 e IFN $\gamma$  en las células epiteliales durante inflamación.

## **Abstract**

The transcription factor STAT3 plays a major role in the development of several autoimmune and cancer pathologies. In the Intestinal epithelium it has been shown that STAT3 plays a critical role in the maintenance of intestinal homeostasis and in the mucosa regeneration after inflammation insult. Here, using a murine model of colon inflammation induced by Dextran sulfate sodic, we show that STAT3 is activated in epithelial cells during the progress of inflammation. Furthermore, we found that mTORC1 mediates STAT3 activation downstream of IL-6 and IFN $\gamma$  receptors. Interestingly, we also found that mTORC1 under these receptors is not activated through the PI3K/Akt axis. In conclusion, our data elucidated an important role of mTORC1 on STAT3 activation downstream of IL-6 and IFN $\gamma$  receptors in the epithelial cells during inflammation.

## 1. Introducción

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son conocidas colectivamente como enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Estas patologías se caracterizan por la presencia de una inflamación crónica en colon, la excreción de diarrea con sangre y el dolor abdominal (Hanauer, 2006). Las EII son un problema de salud a nivel mundial con una incidencia cada vez mayor en países desarrollados y en vías de desarrollo como México (Kaplan, 2015). En el periodo entre 2004 y 2008 solo en el noroeste de México, 4 pacientes de cada 1000 que ingresaron al hospital por año fue por colitis ulcerativa (Bosques et al., 2011).

Las EII son padecimientos crónicos que perturban la homeostasis del epitelio intestinal al alterar el balance existente entre proliferación y apoptosis. Se desconoce la etiología de estas enfermedades, pero la patogénesis depende directamente de las reacciones inmunes locales contra factores ambientales a los que se someten los individuos y, también, a su susceptibilidad genética (Melgar, 2005). Además, en pacientes con EII tal como colitis ulcerativa, el riesgo de desarrollar cáncer colorectal es mucho más alto que en la población en general (Grivennikov et al., 2010).

En general, el desarrollo de terapias dirigidas a curar o atenuar la sintomatología de las EII, depende de conocer cómo las células epiteliales responden a los estímulos pro- y anti-inflamatorios que se disparan en la mucosa intestinal de los pacientes con EII, así como los mecanismos moleculares que participan en la renovación y muerte de las células epiteliales.

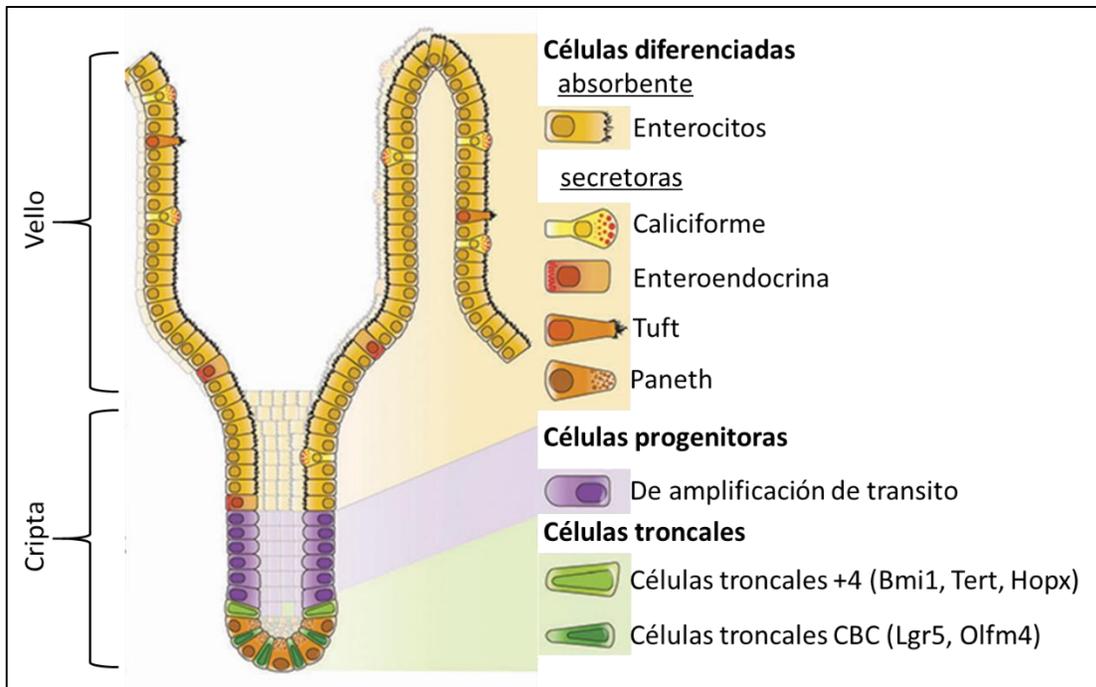
## 2. Marco teórico

### 2.1 *El epitelio intestinal*

El epitelio intestinal es una monocapa de células que recubre el lumen del intestino y funciona como una barrera selectiva y permeable. Tiene dos funciones

críticas: primero, actúa como una barrera física que impide el paso de patógenos y sustancias tóxicas al interior del organismo, y segundo, actúa como un filtro selectivo que permite la absorción de nutrientes esenciales, electrolitos y agua desde el lumen hasta la circulación (Groschwitz & Hogan, 2009). Estudios in vitro e in vivo en diferentes animales han demostrado que las funciones del epitelio intestinal se regulan no solo por las proteínas de las células epiteliales, sino que múltiples factores entre los que incluyen factores exógenos, citocinas y células inmunes también afectan la función epitelial (Ma et al., 2017).

Debido a su función de barrera las células que conforman el epitelio intestinal sufren daños y necesitan cambiarse constantemente, por ello debe mantenerse un balance entre el número de células que nacen y las que mueren. Para efectuar tal función el organismo creó un sistema en donde las diversas poblaciones del epitelio intestinal son renovadas y repuestas continuamente a partir de nichos de células troncales que residen en la base de las criptas (**Figura 1**; Potten, 1998) . Estas células troncales se dividen de forma asimétrica, lo que les permite mantener un número constante de células troncales en la base de la cripta al mismo tiempo que se genera una población de células con alta capacidad de replicación que dan origen a todos los linajes celulares que forman las criptas epiteliales. Estas células proliferativas se conocen como células de amplificación en tránsito, se dividen rápidamente y migran desde la base de la cripta hacia las partes superiores del vello, durante este proceso de migración las células son estimuladas por diferentes factores que estimulan su diferenciación y compromiso hacia un linaje celular específico: enterocitos absorbentes, células secretoras caliciformes, células enteroendocrinas, células paneth y células penacho (Barthel, 2017).



**Figura 1. Esquema de la cripta y el vello del epitelio intestinal.** Las células troncales se localizan en la base de las criptas y las células diferenciadas en el vello (Elliott & Kaestner, 2015).

Un desbalance de los procesos biológicos encargados de mantener la homeostasis intestinal conlleva al desarrollo de diversos procesos patológicos entre los que se incluyen las EII y el cáncer (Zhang & Li, 2014).

## 2.2 Las vías de señalización que se afectan durante los procesos inflamatorios intestinales

Una característica de las enfermedades inflamatorias es el aumento de citocinas en la mucosa intestinal (Nava et al., 2010). Se ha demostrado que el Interferón- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) y el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) son citocinas proinflamatorias que están implicadas en el desarrollo y progresión de las EII ya que regulan negativamente la autorenovación del epitelio e incrementan la muerte de las células epiteliales (Fais et al., 1994; MacDonald et al., 1990). Nava et al. (2010) demostraron, in vitro e in vivo, que el  $IFN\gamma$  y el  $TNF\alpha$  ejercen un efecto bifásico sobre las células epiteliales intestinales (IECs); la exposición durante unas horas o

días, aumenta la proliferación de las IECs a través de la activación de la vía de señalización Akt- $\beta$ -Catenina. Sin embargo, cuando las IECs se exponen durante semanas a las citocinas, estas disminuyen su proliferación debido a la sobreexpresión de Dkk1, un inhibidor de la vía Wnt-  $\beta$ -Catenina (Nava et al., 2010).

Akt es una cinasa de serinas y treoninas que participa en la regulación de diversos procesos biológicos, como son la proliferación, supervivencia, muerte y migración celular. Akt es parte de la vía de señalización intracelular conocida como PI3K/Akt/mTORC1 la cual está directamente relacionada con la quiescencia celular, la proliferación, el cáncer y la longevidad. Esta vía de señalización es una rama corriente abajo de los receptores tirosina cinasa y es controlada por PI3K. La activación de PI3K induce un aumento de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática creando un microdominio de membrana cargado positivamente que estimula el reclutamiento de moléculas con dominios de pleckstrina (PH), tal es el caso de Akt. Una vez que Akt se localiza en la membrana plasmática entra en contacto con dos cinasas de serina y treonina, la cinasa dependiente de fosfoinosítido 1 y 2 (PDK1 y PDK2) (Xu et al., 2012). Estas cinasas fosforilan a Akt en dos residuos claves que disparan su activación, la treonina 308 (PDK1) y la serina 473 (PDK2) (Mora et al., 2004; Sarbassov et al., 2004). Una vez activada Akt fosforila a sus diversos sustratos/efectores. Uno de los principales efectores corriente abajo de Akt es el complejo 1 del blanco en mamífero de rapamicina (mTORC1). mTORC1 es un complejo proteico formado por mTOR que es una cinasa de serina y treonina que tiene la tendencia a asociarse con diferentes proteínas, para formar al menos dos complejos proteicos. Estos complejos proteicos regulan diferentes procesos biológicos en la célula. mTORC1 está formado por: raptor, una proteína regulatoria esencial que facilita el reclutamiento de sustratos al complejo y mLST8 el cual se cree que estabiliza el dominio catalítico de mTORC1 (Yoon, 2017). Akt activa mTORC1 fosforilando e inactivando al complejo de esclerosis tuberosa (TSC) el cual es un regulador negativo de mTORC1 (Inoki et al., 2002). Por otra parte mTORC2 también está formado por mLST8, pero en lugar de raptor, contiene a rictor, una proteína que

posiblemente cumple con funciones análogas a raptor del complejo 1 (Saxton & Sabatini, 2017). mTORC2 se conoce también como PDK2 y es responsable de la fosforilación de Akt en el residuo 473. Por lo tanto se encuentra río arriba de mTORC1 en la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1.

mTORC1 es un complejo proteico clave en el cual convergen muchas vías de señalización que promueven procesos anabólicos tales como proliferación y crecimiento celular. El principal efector de mTORC1 es S6K, una cinasa que promueve la síntesis proteica. Sin embargo, se sabe que mTORC1 también inhibe procesos catabólicos como la autofagia en este caso mediante la inhibición de la proteína ULK1, cuya función principal es la formación del autofagosoma. Por su parte, mTORC2 controla la proliferación y la supervivencia celular mediante la fosforilación de varios miembros de la familia de proteínas cinasas AGC, principalmente Akt (Saxton & Sabatini, 2017).

### *2.3 Papel de mTORC1 en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales*

Poco se sabe sobre la regulación de mTORC1 durante los procesos inflamatorios intestinales. En ratones tratados con Dextran Sulfato Sódico (DSS), para inducir inflamación, la actividad de mTORC1 aumenta en las células epiteliales del colon. Si en estas condiciones mTORC1 se inhibe con rapamicina, el daño del epitelio intestinal y la mortalidad temprana aumenta en comparación con ratones no tratados con la droga. Así mismo, la represión de mTORC1 disminuye la expresión de citocinas anti-inflamatorias como Interleucina-10, mientras que aumenta los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias como Interleucina-6, Interleucina-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en el tejido del colon de ratones con colitis inducido con DSS (Guan et al., 2015). Estos resultados sugieren que mTORC1 juega un papel esencial en la respuesta antiinflamatoria durante colitis.

Estudios recientes demuestran que, durante la inflamación, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  promueven la interacción de Raptor con 14-3-3 $\zeta$ , lo que resulta en la degradación de 14-3-3 $\eta$ , la inhibición de mTORC1 y la consecuente activación de la autofagia.

14-3-3 $\eta$  usualmente impide la activación de PDK1, por lo que, al degradarse, PDK1 se activa, lo que conduce a la hiperactivación y translocación de Akt al núcleo donde promueve apoptosis (Gómez et al., 2016). Además, la activación de la autofagia y de la vía PI3K-Akt, promueven la diferenciación y mantenimiento celulares de las células enteroendocrinas, durante la inflamación. Por lo tanto se sugiere que mTORC1 juega un papel relevante en el mantenimiento de la función de barrera y del mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal.

Poco se sabe sobre la participación de mTORC2 durante EII. Sin embargo, estudios reciente con ratones deficientes de Rictor en condiciones normales han demostrado que mTORC2 contribuye de manera importante al mantenimiento de las diferentes poblaciones de células epiteliales intestinales (Sampson et al., 2016). Además otros estudios han demostrado que existe un incremento en la expresión de Rictor en el tejido obtenido de pacientes con cáncer colorectal, lo que lleva a sugerir que mTORC2 puede ser un complejo clave durante el desarrollo de cáncer colorectal asociado a inflamación crónica (Wang et al., 2017).

#### *2.4 La vía de señalización Interleucina 6/STAT3 juega un papel clave en el desarrollo de las EII*

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina pleitrópica que juega un papel importante en varias enfermedades autoinmunes. En la colitis experimental, esta citocina estimula la recuperación del epitelio intestinal a través del Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3 (STAT3). La activación de STAT3 induce su translocación al núcleo, donde estimula la expresión de genes de supervivencia, proliferativos y anti-apoptóticos, como el de la Ciclina D1 y Bcl-X<sub>L</sub> (Kuhn et al. 2014). La actividad de STAT3 es inhibida en ratones modelo de colitis experimental deficientes de mTORC1 estimulados con IL-6 (Guan et al., 2015). Esto sugiere que existe un mecanismo de retroalimentación entre la vía de señalización de mTORC1 y de STAT3.

### **3. Planteamiento del problema**

mTORC1 es crucial en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos (Saxton & Sabatini, 2017). En las EII existe un desbalance de los procesos biológicos que mantienen la homeostasis del epitelio intestinal. A consecuencia de ello se destruye la barrera intestinal, aumenta el infiltrado de células inmunitarias que exacerban la inflamación y se observa una acumulación de citocinas proinflamatorias en la mucosa intestinal, tal es el caso del  $\text{IFN}\gamma$  y el  $\text{TNF}\alpha$ . Los estudios actuales demuestran que estas citocinas promueven la inhibición de mTORC1 y la hiperactivación de la vía  $\text{PI3K/mTORC2/Akt}/\beta\text{-Catenina}$  lo que promueve la apoptosis de las células epiteliales. Además, mTORC1 tiene un papel protector en las células no hematopoyéticas del colon en condiciones de colitis experimental al mediar la vía  $\text{IL-6/STAT3}$  (Guan et al., 2015; Sampson et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos y las bases moleculares por los cuales mTORC1 regula la homeostasis epitelial durante colitis no se conocen del todo.

### **4. Hipótesis**

La activación de mTORC1 en las células epiteliales del colon es necesaria para activar STAT3 durante colitis experimental.

### **5. Objetivo general**

Evaluar el papel de mTORC1 en la activación de STAT3 en el epitelio intestinal de ratones C57BL/6J inducidos a colitis experimental.

#### *5.1 Objetivos particulares*

- Evaluar la activación de STAT3 en el colon de ratones C57BL/6J en un modelo de colitis experimental.

- Analizar la activación de STAT3 en el colon de ratones C57BL/6J inducidos a colitis experimental en los cuales mTOR será inhibido farmacológicamente.
- Evaluar los efectos de la administración de IL-6 e IFN $\gamma$  sobre la activación de mTORC1 y STAT3 en el colon de ratones C57BL/6J.
- Evaluar si la inhibición de las proteínas de la vía PI3K/Akt/mTORC1 reduce la activación de STAT3 en un modelo *In vitro*.

## 6. Materiales

### 6.1 Ratones

La cepa de ratones tipo salvaje C57BL/6J se adquirirán del bioterio del CINVESTAV Unidad Zacatenco.

### 6.2 Anticuerpos y reactivos

Para los ensayos de Western Blot los anticuerpos primarios que se utilizaron fue como sigue: Raptor 1:1000 (Cell Signaling Technology), STAT3 1:1000 (Cell Signaling Technology), Fosfo-STAT3 (pSTAT3) 1:1000 (Cell Signaling Technology), pS6 1:1000 (Cell Signaling Technology), p70S6 1:1000 (Cell Signaling Technology), Akt 1:1000 (Santa Cruz), pAkt 1:1000 (Cell Signaling Technology), pSTAT1 1:1000 (Cell Signaling Technology), GAPDH 1:25000 (Santa Cruz).

Para los ensayos con inhibidores y citocinas *in vivo*, las citocinas recombinantes de ratón IFN $\gamma$  y IL-6 se compraron de PeproTech y el inhibidor de mTOR, AZD8055 de Astra Zeneca. Se disolvieron al 0.002% en albumina de suero de ratón (MSA). Estas fueron utilizadas a la siguiente dosis: 2.5  $\mu$ g/Kg de peso de ratón para IFN $\gamma$ , 1  $\mu$ g/Kg de peso para IL-6 y 7.5 mg/Kg de peso para AZD8055.

Para los ensayos *in vitro*, el IFN $\gamma$  se utilizó a una concentración de 100 U/ml, la rapamicina (Calbiochem) se utilizó como inhibidor de mTOR a una concentración de 20nM, AZD8186 (Astra Zeneca) como inhibidor de PI3K a 4 nM, AZD5363 (Calbiochem) como inhibidor de Akt a 8 nM y AZD8055 (Astra Zeneca) como inhibidor de mTOR a 50 nM.

El Dextran Sulfato Sodico (DSS) se compró de Affimetrix y se disolverá a 2.5% en agua potable.

## **7. Metodología**

### *7.1 Ensayos In Vitro*

Se sembraron células SW480 en cajas de 6 pozos. Se adicionó 1.5 ml de medio DMEM-F12 mas suero fetal bovino por cada pozo. Posteriormente se dejaron incubando a 37 °C y 5% de CO $_2$  durante toda la noche. Cuando las células estuvieron a 80% de confluencia se realizaron los tratamientos con las citocinas. Posterior al término de los tratamientos se retiró el medio y se realizaron 3 lavados rápidos con PBS. Seguido, las cajas se metieron a congelar a -20 grados por toda la noche. Al día siguiente, las cajas se sacaron del congelador y se les agregó a cada pozo 80  $\mu$ l de RYPA. Se recolecto todo el contenido de los pozos con un raspador y se transfirió a tubos eppendorf. Se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis mediante Western Blot.

### *7.2 Tratamiento con citocinas in vivo*

Se emplearon ratones silvestres machos de la cepa C57BL/6J de 7 a 8 semanas de edad. Una vez aclimatados durante 3 días en jaulas especiales, a temperatura ambiente y agua potable, se inyectaron intraperitonealmente con Interleucina 6 o IFN $\gamma$ . Posteriormente los ratones se dejaron reposar durante 2 horas. Terminado este tiempo se sacrificaron y el colon fue aislado para su posterior análisis mediante Inmunofluorescencia y Western Blot.

### 7.3 Obtención de ratones modelo de colitis aguda

Se emplearon ratones silvestres machos de la cepa C57BL/6J con el mismo fondo genético de 6 hasta 8 semanas de edad. Los ratones una vez obtenidos se dejaron aclimatar 3 días antes del tratamiento en jaulas especiales a temperatura ambiente, con alimento y agua purificada. Cumplido los 3 días, se les cambió el agua por una solución de DSS al 2.5%. Los ratones se pesaron cada día hasta su sacrificio. Los ratones se sacrificaron en el día 1, 2, 3, 4 y 5 días post-tratamiento. Para la inhibición *in vivo* de mTOR los ratones se inyectaron diariamente vía intraperitoneal con AZD8055 desde el día 3 hasta el día 5 pos-tratamiento con DSS.

### 7.4 Extracción del Colon

Para la extracción del colon los ratones se anestesiaron en una cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se sacrificaron. El colon se extrajo y se midió su longitud y peso. Posteriormente se cortaron longitudinalmente y se lavaron con PBS para eliminar restos de excremento y sangre.

Para su análisis, el colon se cortó en 3 secciones; la parte proximal se colectó en Tissue-Tek y se guardó a -80 °C para su posterior análisis. La sección media se depositó en tubos eppendorf con 200 µL de optime para el análisis de secreción. La sección distal se depositó en tubos eppendorf con 300 µl de RYPA y se guardó a -80 °C.

### 7.5 Inmunofluorescencia

Las muestras previamente congeladas y colectadas en Tissue-tek se cortaron empleando un criostato, los cortes se hicieron de 20 micras de grosor y se montaron en portaobjetos gelatinizados para asegurar su adhesión. Posteriormente se trataron durante 15 minutos con acetona a 4 °C para fijar y permeabilizar el tejido, terminado los 15 minutos se retiró la acetona y se realizó un lavado con PBS durante 10 minutos. Seguido, se secó el exceso de PBS y se

delimitó la región de la muestra con plumón hidrofóbico. Posterior a esto, se bloquearon las muestras con 95 µl de BSA al 2% en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 1 hora. Terminado el bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Todos los anticuerpos se diluyeron 1:300 en BSA 2%. Los anticuerpos primarios empleados fueron: pS6rib y pSTAT3 (conejo). Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se lavaron las muestras con PBS durante 10 minutos. Posterior al lavado se incubaron con anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora. El anticuerpo secundario se diluyó a 1:1500 en BSA 2% y DAPI 1:2000 para teñir los núcleos. Terminada la hora de incubación se realizó un último lavado con PBS durante 10 minutos. Finalmente las laminillas se montaron con medio de montaje, se cubrieron con cubreobjetos, se sellaron con barniz y se guardaron en completa oscuridad. El análisis de las imágenes se realizó empleando un microscopio confocal Leica TCS SP8 y el programa LAS AF.

### *7.6 Western Blot*

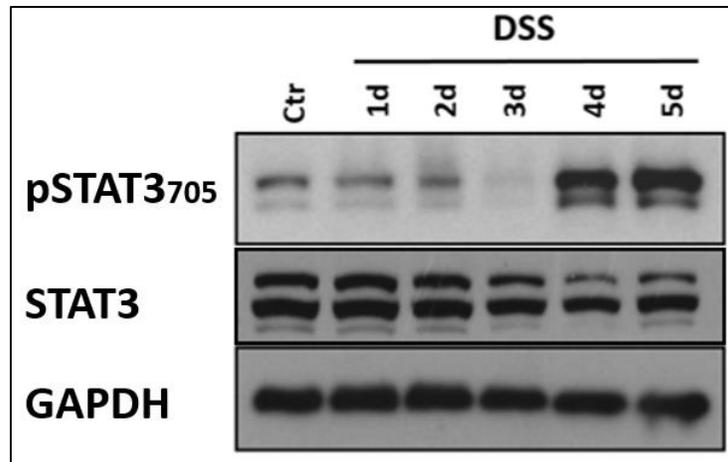
El tejido colectado en RIPA se congeló a -80 grados para su almacenamiento. Posteriormente se dejó descongelar a cuatro grados centígrados para su posterior homogenización. Una vez homogenizadas las muestras se centrifugaron a 12000 RPM durante 10 minutos en frío. El sobrenadante se recuperó para la determinación de proteínas implicadas en las vías de señalización de mTORC1, proliferación, apoptosis y autofagia. Posterior a esto, se calculó la concentración de proteína en cada muestra mediante un ensayo de BCA y se cargó 25 µg de proteína por muestra en geles de acrilamida. Determinado el volumen de carga se procedió a incubar las muestras con β-mercaptoetanol y buffer de muestra a 95 °C durante 10 minutos. Finalizado el tiempo de incubación las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 10 y 12 % y se corrió en una cámara electroforética a 125 Voltios durante 1 hora y media. Terminada la corrida electroforética, se procedió a transferir a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia a 0.95 Amper durante 2 horas y media. Una vez terminada la transferencia las membranas se incubaron con rojo de ponceau. Las membranas

se secaron y se escanearon para la comprobación de la transferencia. Posteriormente se realizó 1 lavado con TTBS de las membranas durante 10 minutos. Una vez lavadas las membranas se prosiguió a bloquear incubando las membranas con leche al 2% durante 1 hora. Terminado el tiempo de bloqueo se procedió a incubar las membranas con anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en BSA 2% a -4 °C durante toda la noche. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: STAT3 y pSTAT3 (conejo), STAT1 y pSTAT1 (conejo), Akt1 (ratón), pAktS473 (conejo), P70S6K y pP70S6K (mouse) y GAPDH (ratón). Terminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno de las membranas con TTBS para eliminar el excedente de anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima Perosidaxa de rábano picante (HRP) diluido 1:10000 en leche al 2% durante 1 hora. Pasado la hora de incubación, se prosigió a ser los últimos 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS de las membranas para eliminar el excedente de anticuerpo secundario. Finalmente las membranas se secaron y realizó el revelado para el análisis de las bandas de interés.

## **8. Resultados**

### *8.1 STAT3 se activa desde el día 4 en la mucosa del colon de ratones con colitis experimental*

Lo primero que hicimos fue analizar la fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 que indica su activación. El modelo de colitis experimental que utilizamos consiste en la administración oral de DSS en agua de tomar a ratones macho C57BL6/J. El análisis mediante Western blot de tejido del colon muestra que la fosforilación/activación de STAT3 aumenta a partir del día 4 post-tratamiento con DSS, sin que se alteren significativamente en la cantidad total de STAT3 (**Figura 2**).



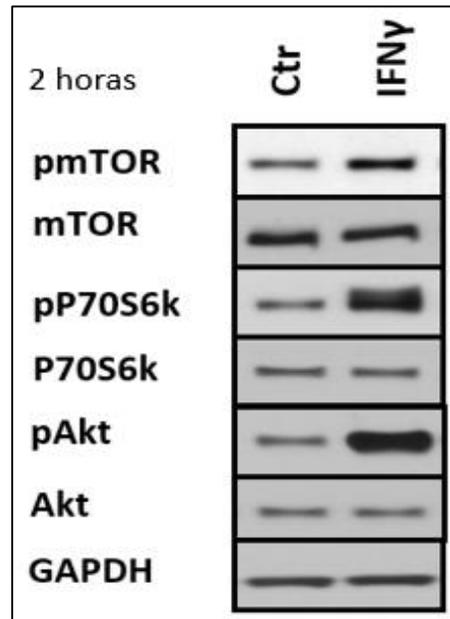
**Figura 2. La activación de STAT3 se induce a partir del día 4 en la mucosa del colon de ratones inducidos a colitis experimental.** La fosforilación de STAT3 en la tirosina 305 durante colitis experimental fue evaluada mediante Western Blot del extracto proteico obtenido del colon de ratones C57BL/6J. A los ratones se les dio a beber en lugar de agua, una solución de DSS al 2.5% para inducir inflamación de la mucosa del colon. Los ratones fueron sacrificados en los días 1, 2, 3, 4 y 5 del tratamiento. Se utilizó GAPDH como control de carga. n=3.

Dado a lo observado en este ensayo, nuestros siguientes análisis *in vivo* se realizaron al día 3 y 5 pos-tratamiento con DSS para garantizar que se observaran cambios.

### 8.2 mTORC1 y STAT3 se activan en el epitelio del colon expuesto a IL-6 e IFN $\gamma$ , citocinas característica de la mucosa inflamada

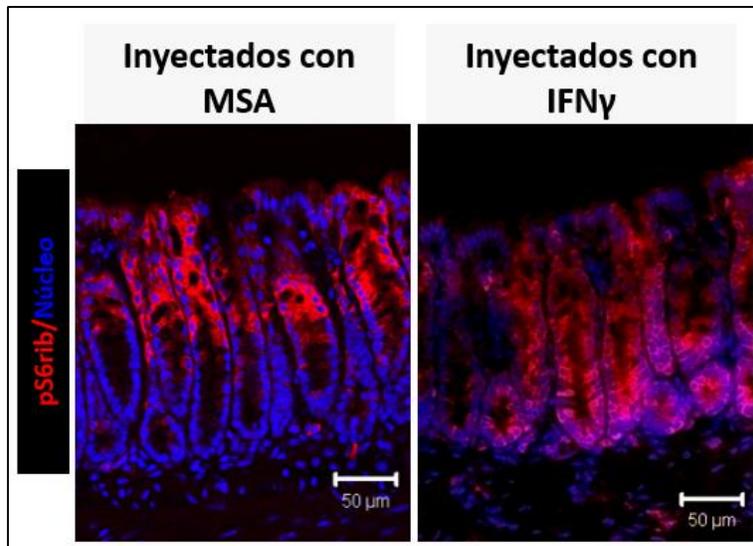
Dado que las citocinas IL-6 e IFN $\gamma$  aumentan en las EII (Nava et al., 2010), enseguida se investigó si mTORC1 también se activa en la mucosa de ratones C57BL/6J administrados vía intraperitoneal con estas citocinas. Como lo muestran los análisis de Western Blot realizados a lisados totales obtenidos de colon distal de ratones, la administración de IFN $\gamma$  induce la fosforilación/activación de las proteínas mTOR, Akt, p70S6K y S6 demostrando que existe un incremento en la activación de mTORC1 la mucosa de colon de los ratones (**Figura 3**). Esto ocurre sin afectar el nivel total de dichas moléculas. Estas observaciones sugieren que

mTORC1 podría jugar un papel importante durante la inflamación inducida por el IFN $\gamma$ .



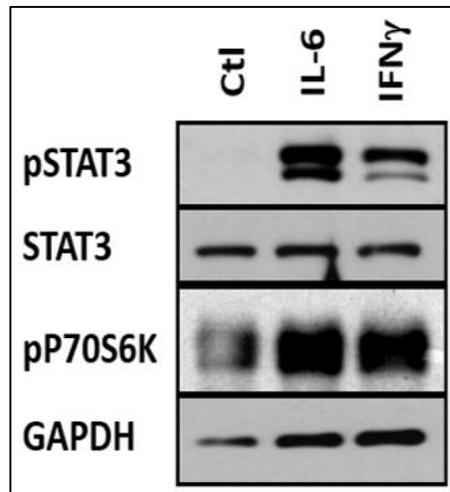
**Figura 3.** *El IFN $\gamma$  activa la vía de señalización de Akt y mTORC1 . Los efectos de la inyección intraperitoneal de IFN $\gamma$  sobre proteínas de las vías de mTORC1 fueron analizadas en el lisado de tejidos de colon de ratones C57BL/6J mediante Western Blot. Los ratones fueron sacrificados a 2 horas Post-inyección. Los ratones control fueron inyectados con MSA. La actina fue utilizado como control de carga. n=3.*

La activación de mTORC1 por el IFN $\gamma$  se confirma por el aumento de su efector pS6rib a todo lo largo de la superficie de la cripta del colon (**Figura 4**). Este resultado además demuestra que la respuesta inflamatoria desatada por la citocina proinflamatoria IFN $\gamma$  ocurre principalmente en el epitelio intestinal. Así el IFN $\gamma$  activa al eje de señalización de Akt/mTORC1 en las células epiteliales de la mucosa del colon.



**Figura 4.** *El IFN $\gamma$  activa a S6rib, el efector corriente abajo de mTORC1. pS6rib (rojo) fue analizado mediante Inmunofluorescencia del tejido de colon de ratones de la cepa C57BL/6J inyectados intraperitonealmente con IFN $\gamma$  y sacrificados a 2 horas post-inyección. El núcleo se visualiza en azul. Los ratones control fueron administrados con MSA. n=2.*

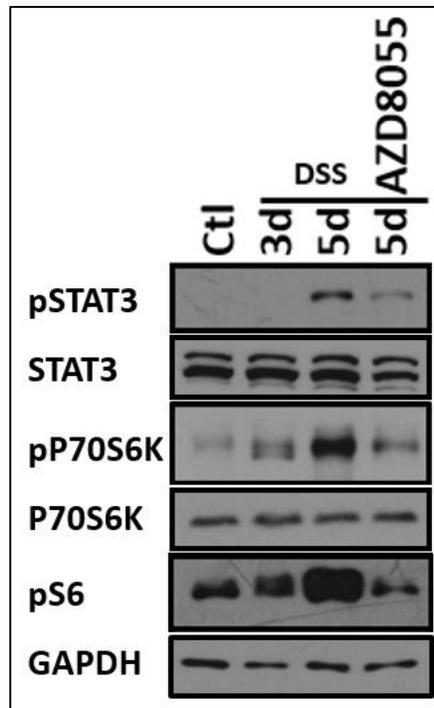
Nuestro siguiente objetivo fue analizar si las citocinas proinflamatorias IFN $\gamma$  e IL-6 inducen la activación de STAT3 en la mucosa intestinal de los ratones C57BL6J. Para ello ratones C57BL/6J fueron administrados intraperitonealmente con MSA, IL-6 (10  $\mu$ g/Kg) o IFN $\gamma$  (2.5  $\mu$ g/Kg). Como se observa en la figura 5, existe un incremento en la fosforilación de STAT3 en el residuo 705 en las muestras del lisado de tejido de colon obtenidas de los ratones tratados con IL-6. Esta activación es acompañada de un incremento de la activación del efector de mTORC1; P70S6K. De forma interesante, la administración de IFN $\gamma$  también aumenta la fosforilación de STAT3 y además esta activación también fue acompañada de la activación de P70S6K, efector de mTORC1. Estos resultados corroboran que la IL-6 y el IFN $\gamma$  inducen la activación tanto de mTORC1 como de STAT3. Cabe preguntarse si la activación de mTORC1 es necesaria para la de STAT3.



**Figura 5. STAT3 y los efectores de mTORC1 son activados por IFN $\gamma$  y IL-6.** La activación de STAT3, P70S6K y S6 fue analizada mediante Western Blot del lisado de tejido de colon de ratones C57BL/6J estimulados con IL-6 o IFN $\gamma$  mediante inyección intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados 2 horas después de la inyección. Los ratones control fueron inyectados con MSA. n=3.

### 8.3 La inhibición de mTORC1 abate la activación de STAT3 in vivo e in vitro

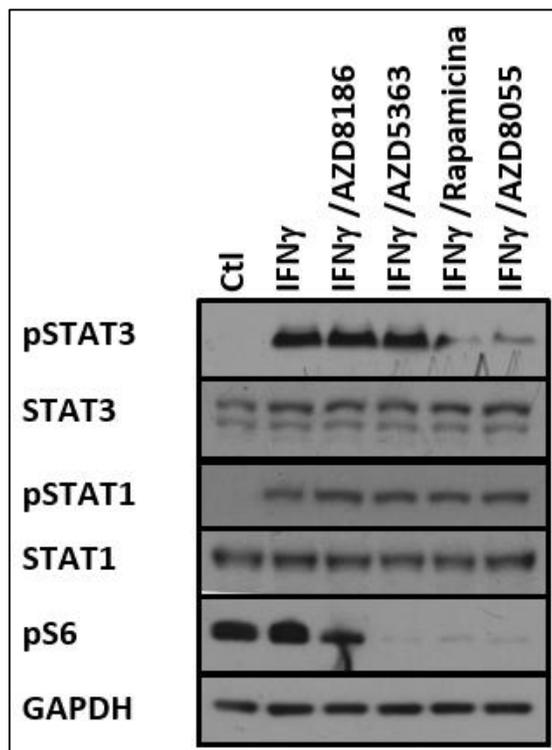
Para investigar si la activación de mTORC1 se requiere para activar a STAT3, durante el desarrollo de las EII, empleamos ratones modelos de colitis experimental inducida por DSS y el inhibidor de mTOR, AZD8055. Como se observa en la figura 6, durante la inflamación experimental se activa a los efectores de mTORC1 desde el día 3 del tratamiento con DSS, alcanzando un máximo de activación el día 5 post-tratamiento, momento en el que también incrementa la fosforilación/activación de STAT3. La inhibición farmacológica de la función de mTORC1 con AZD8055 reduce claramente la fosforilación de STAT3. La disminución en la fosforilación de los efectores de mTORC1, P70S6K y S6, luego del tratamiento con AZD8055, demuestra la eficiencia y especificidad de nuestros tratamientos. En conclusión, este resultado sugiere fuertemente que mTORC1 media la activación de STAT3 y sugiere que ambas proteínas participan en la respuesta anti-inflamatoria del epitelio intestinal.



**Figura 6. La inhibición de mTOR abate la actividad de STAT3 durante EII.** El efecto de la inhibición de mTOR por AZD8055 sobre la activación de STAT3, STAT1, Akt, p70S6K, S6 fueron evaluadas durante colitis experimental inducida por DSS mediante Western Blot de un lisado de tejido de colon de ratones C5BL/6J. Los ratones recibieron agua potable o agua potable con DSS al 2.5%. Se le administro AZD8055 por inyección intraperitoneal diariamente desde el tercer día con DSS hasta su sacrificio. Los ratones fueron sacrificados al tercer o quinto día post-tratamiento. Se utilizó GAPDH como control de carga. n=3.

mTORC1 es activado río arriba por el eje de señalización PI3K/Akt, que juega un papel importante en el desarrollo y establecimiento de varias patologías. Nava et al. (2010) demostró *in vitro* e *in vivo* que el IFN $\gamma$  estimula la proliferación a tiempos tempranos al estimular la vía PI3K/Akt/ $\beta$ -catenina, por ello enseguida se determinó si esta vía era la responsable de la activación de mTORC1 y, consecuentemente, de STAT3 en células epiteliales estimuladas con IFN $\gamma$ . Para ello se trataron células SW480 con inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTORC1. Como se observa en la figura 7, la incubación de células SW480 con IFN $\gamma$  induce un incremento en la fosforilación de los residuos Y701 de STAT1 y Y705 de STAT3, los cuales han sido implicados en la activación de dichas moléculas. La activación de STAT1 no

se afecta cuando las células son pre-tratadas con inhibidores contra los componentes de la vía PI3K (AZD8186, PI3K; AZD5363, Akt; Rapamicina, mTORC1, AZD8055, mTOR). En contraste, cuando las células se incubaron con rapamicina y AZD8055, inhibidores de mTOR, disminuye muy claramente la activación de STAT3, efecto que no se observó cuando se usaron los inhibidores de PI3K, AZD8186 y Akt AZD5363. Como se muestra en la figura 8, los tratamientos con dichos inhibidores no afectan el nivel proteico de STAT1 o STAT3 pero sí de pS6 y pP70s6K, demostrando que los tratamientos son eficaces y específicos, que mTORC1 activa a STAT3, que ambas activaciones son esenciales para el desarrollo de la respuesta inflamatoria y que PI3K y Akt no están implicadas en esta regulación.



**Figura 7. La inhibición de mTORC1 disminuye la activación de STAT3 estimulada por IFN $\gamma$ .** Los efectos del tratamiento con inhibidores de la vía PI3k/Akt/mTORC1 sobre pSTAT3, pSTAT1, y efectores de mTORC1 en lisados celulares de células SW480 estimuladas con IFN $\gamma\gamma$  (100 U/ml) por 6 horas, fueron analizados mediante Western Blot. Los inhibidores se agregaron 15 minutos antes de la estimulación con las citocinas. AZD8186, inhibidor de PI3K, AZD5363, inhibidor de Akt,

*Rapamicina, inhibidor de mTOR, AZD8055, inhibidor de mTOR. GAPDH fue utilizado como control de carga. n=5.*

## **9. Discusión**

STAT3 es un factor clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y es activado *rio abajo* por diversas citocinas y factores. Durante un proceso inflamatorio intestinal STAT3 estimula la regeneración del epitelio intestinal inducido por un daño inflamatorio. Utilizando un modelo de colitis ulcerativa en ratón inducida por DSS, aquí mostramos un incremento en la fosforilación/activación de STAT3 a partir del día 4 con el tratamiento. Esta activación tardía sugiere que STAT3 se activa cuando existe mayor daño en el epitelio intestinal y por lo tanto mayor infiltrado de células inmunes y mayor cantidad de citocinas proinflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . En concordancia con otros grupos los cuales han reportado que STAT3 es un substrato directo de mTORC1 (Dodd, Yang, Shen, Sampson, & Tee, 2015), encontramos de forma interesante que mTORC1 también se activa durante colitis experimental y que la activación de STAT3 es abatida cuando los ratones son tratados con inhibidores de mTORC1. Esta activación de mTORC1 posiblemente sucede *rio abajo* de los receptores a citocinas proinflamatorias secretadas en la mucosa intestinal durante el daño a la barrera epitelial causada por la inflamación. De hecho nosotros observamos mediante inmunofluorescencia y Western blot que la inyección intraperitoneal de IFN $\gamma$  una citocina con mayor aumento en la mucosa durante inflamación induce fosforilación de STAT3 y S6 a lo largo de toda cripta. Nava y colaboradores demostraron que el IFN $\gamma$  induce la activación de la vía PI3K/Akt/ $\beta$ -Catenina para promover proliferación y supervivencia a tiempos tempranos (Nava et al., 2010). Sin embargo, en este estudio demostramos mediante ensayos *in vitro* que la activación de mTORC1 y su posterior efecto sobre la activación de STAT3 no suceden mediante la vía clásica PI3K/Akt *rio abajo* del receptor a IFN $\gamma$ , por lo que posiblemente mTORC1 podría estar siendo activado mediante otra vía aún desconocida.

Las EII son el producto de un desbalance en la homeostasis de la mucosa intestinal. Aún se desconoce la etiología de esta patología, sin embargo se conoce que diversas vías de señalización están perturbadas durante la patología. Debido a que la activación de STAT3 en el epitelio intestinal promueve proliferación y supervivencia, posiblemente la activación de STAT3 por  $\text{IFN}\gamma$  mediante mTORC1 podría ser un mecanismo de protección para inhibir ya sea apoptosis o estimular diferenciación del epitelio intestinal. El entendimiento de la vía que controla la activación de mTORC1 y su posterior efecto sobre STAT3 río abajo de citocinas proinflamatorias como  $\text{IFN}\gamma$  podría ser particularmente importante para el establecimiento de blancos terapéuticos que promuevan la regeneración del epitelio intestinal durante inflamación y alivien los síntomas causados por el proceso inflamatorio.

## **10. Conclusión**

En conclusión STAT3 es activado durante inflamación de la mucosa del colon a partir del día 4, día el cual se ha reportado existe mayor daño del epitelio del colon por el tratamiento con DSS en ratones. Esta activación se localiza predominantemente en las células epiteliales. La activación de STAT3 también es inducida por  $\text{IFN}\gamma$  mediante mTORC1 por una vía de señalización aún desconocida en la cual no participa el eje de señalización PI3K/Akt. Esto apunta a que la activación de mTORC1 por un mecanismo desconocido río abajo de  $\text{IFN}\gamma$  es necesaria para la activación de STAT3 durante inflamación del epitelio intestinal del colon.

## **11. Perspectivas**

Nuestro siguiente objetivo será analizar la activación de STAT3 en ratones knock out tejido específico (intestino) para raptor. Estos ratones knock out podrían confirmar nuestros resultados. De igual manera, la utilización de estos ratones nos proporcionara mucha información sobre la participación de mTORC1 en la

señalización río abajo de receptores a citocinas proinflamatorias durante un proceso inflamatorio intestinal.

## 12. Bibliografía

- Barthel, E. R. (2017). On the utility of a compartmental population kinetics model of intestinal epithelial stem cell proliferation and differentiation. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 14(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12976-017-0071-8>
- Bosques-Padilla, F., Sandoval-García, E., Martínez-Vázquez, M., Garza-González, E., & Maldonado-Garza, H. (2011). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México*, 76(1), 34–38. Retrieved from <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es/epidemiologia-caracteristicas-clinicas-colitis-ulcerosa/articulo/X0375090611023563/>
- Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., & Tee, A. R. (2015). mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*, 34(17), 2239–2250. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.164>
- Elliott, E. N., & Kaestner, K. H. (2015). Epigenetic Regulation of the Intestinal Epithelium Ellen. *J Prenat Perinat Psychol Health.*, 29(3), 157–176. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1997-9>.Epigenetic
- Fais, S., Capobianchi, M. R., Silvestre, M., Mercuri, F., Pallone, F., & Dianzani, F. (1994). Interferon Expression in Crohn's Disease Patients: Increased Interferon- $\gamma$  and - $\alpha$  mRNA in the Intestinal Lamina Propria Mononuclear Cells. *J. of Interferon Research*, 238, 235–238.
- Gómez-Suárez, M., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Hernández-Trejo, J. A., Hernández-Ruiz, M., Suárez-Pérez, D., Candelario, A., ... Nava, P. (2016). 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), 1060–1072. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.163>
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G., Vallabhapurapu, S., ... Karin, M. (2010). IL-6 and STAT3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis associated cancer. *Cancer Cell*, 15(2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>.IL-6
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3-20; quiz 21–2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Guan, Y., Zhang, L., Li, X., Zhang, X., Liu, S., Gao, N., ... Li, D. (2015). Repression of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Inhibits Intestinal

- Regeneration in Acute Inflammatory Bowel Disease Models. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(May), 339–346.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303356>
- Hanauer, S. B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*, 12 Suppl 1(January), S3-9.  
<https://doi.org/00054725-200601001-00002> [pii]
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), 648–657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(12), 720–727.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Kuhn, K. A., Manieri, N. A., & Liu, T. (2014). IL-6 Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Repair after Injury. *PLoS ONE*, 12(December), 1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114195>
- MacDonald, T. T., Hutchings, P., Choy, M. Y., Murch, S., & Cooke, A. (1990). Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clinical and Experimental Immunology*, 81(2), 301–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb03334.x>
- Melgar, S. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1328–G1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>
- Mora, A., Komander, D., Van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(2), 161–170.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.022>
- Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraff, K., Capaldo, C. T., ... Nusrat, A. (2010). Interferon- $\gamma$  Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging  $\beta$ -Catenin Signaling Pathways. *Immunity*, 32(3), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.001>
- Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1370), 821–830.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0246>
- Sampson, L. L., Davis, A. K., Grogg, M. W., & Zheng, Y. (2016). MTOR disruption causes intestinal epithelial cell defects and intestinal atrophy postinjury in mice. *FASEB Journal*, 30(3), 1263–1275. <https://doi.org/10.1096/fj.15-278606>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2004). Phosphorylation and Regulation of Akt / PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, 307(February), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Wang, L., Qi, J., Yu, J., Chen, H., Zou, Z., Lin, X., & Guo, L. (2017). Overexpression of rictor protein in colorectal cancer is correlated with tumor progression and prognosis. *Oncology Letters*, 14(5), 6198–6202. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6936>
- Xu, N., Lao, Y., Zhang, Y., & Gillespie, D. A. (2012). Akt: A double-edged sword in cell proliferation and genome stability. *Journal of Oncology*, 2012(December), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/951724>
- Yoon, M.-S. (2017). The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibition in the Treatment of Advanced Breast Cancer. *Current Oncology Reports*, 9(October), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11912-012-0277-1>
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>