



**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional**
Unidad Zacatenco
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“La delección genética de Rictor en células epiteliales
intestinales induce la activación de mTORC1.”**

LBM. Juan Raúl De la Torre Báez

Tesis para obtener el grado en

Maestría en Ciencias

En la especialidad de:

Fisiología Celular y Molecular

Director de la tesis:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Comité Tutorial:

Ciudad de México, Enero 2021

Comité Tutorial:

Dr. Ricardo Valle Ríos

Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Dr. Fanis Missirlis

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Matrícula: 191100009

CVU: 954035

Índice.

1. [Introducción](#)
 - a. [Mucosa gastrointestinal](#)
 - b. [Epitelio intestinal](#)
 - c. [Enfermedades inflamatorias intestinales](#)
 - i. [Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias](#)
 - ii. [Señalización activada por los receptores JAK y PI3K/Akt](#)
 - iii. [Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR](#)
 - d. [mTORC1 y mTORC2: funciones generales y regulación](#)
 - i. [Ensamble y activación de mTORC2](#)
 - ii. [Función específica de mTORC2 en el epitelio intestinal](#)
2. [Planteamiento del problema](#)
3. [Hipótesis](#)
4. [Objetivo general](#)
 - a. [Objetivos específicos](#)
5. [Diseño experimental](#)
6. [Materiales y métodos](#)
7. [Discusión](#)
8. [Conclusión](#)
9. [Referencias bibliográficas](#)

Índice de tablas e imágenes.

[Tabla 1. Activación de JAK cinasas y su significancia biológica.](#)

[Figura 1. Vía JAK/STAT canónica.](#)

[Figura 2. Vías JAK/STAT no canónicas.](#)

[Figura 3. Vía mTOR.](#)

[Figura 4. Efectos de la delección de Rictor en colonocitos.](#)

Agradecimientos.

A mis papás, Lucy y Raúl, por todo su apoyo y amor incondicionales. Gracias por su paciencia y esfuerzo, por confiar y creer siempre en mí. Este triunfo no sólo es mío, sino también de ustedes.

A Zaly, mi eterna cómplice. Gracias por siempre estar hermana, en las buenas y más aún en las malas.

A Luis, gracias por llegar, por estar y por permanecer. Eres y siempre serás mi rayito de luz.

A Mich, porque sin tu amistad, sin tu ayuda, sin tus consejos (y algunas veces regaños), jamás lo habría logrado.

A Susy, porque a pesar de la distancia y el tiempo, sé que siempre estarás para mí. JTAMV3Bcps mon amish!

Al Doctor Porfirio Nava, director de esta tesis, con admiración, respeto y agradecimiento por la paciencia, orientación y conocimientos que llevaron a la terminación de este trabajo.

A mi comité tutorial, el Doctor Fanis Missirlis y el Doctor Ricardo Valle, por su guía con la que pude concluir esta tesis.

Al equipo y compañeros de laboratorio Ari, Chío García, Chío Pérez, Felipe Castro, Aurora Candelario, por todo el apoyo y conocimientos brindados durante este tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por la beca recibida durante la realización de la maestría.

Resumen.

Debido a la falta de herramientas químicas, la función específica de Rictor/mTORC2 y los mecanismos de retroalimentación entre Raptor/mTORC1 y Rictor/mTORC2 han sido pobremente estudiados. Gracias al desarrollo y uso de herramientas moleculares, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la delección de Rictor en las células epiteliales intestinales no solo es necesaria para activar la señalización de mTORC2/Akt y la supervivencia de los colonocitos diferenciados, sino que también existe mayor proliferación y muerte celular en las células epiteliales, pero que esto no afecta la viabilidad en enteroides. En general, esto indica que existen mecanismos compensatorios que se disparan en las células epiteliales intestinales carentes de Rictor/mTORC2, siendo la activación de Raptor/mTORC1 uno de ellos.

Abstract.

Due to the lack of chemical tools, the specific function of Rictor / mTORC2 and the feedback mechanisms between Raptor / mTORC1 and Rictor / mTORC2 have been poorly studied. Thanks to the development and use of molecular tools, in our laboratory it has been demonstrated that the Rictor deletion in intestinal epithelial cells is not only necessary to activate mTORC2 / Akt signaling and the survival of differentiated colonocytes, but that there is also greater proliferation and cell death in epithelial cells, but this does not affect viability in enteroids. In general, this indicates that there are compensatory mechanisms that are triggered in intestinal epithelial cells lacking Rictor / mTORC2, being the activation of Raptor / mTORC1 one of them.

Abreviaciones

PAM	Péptido antimicrobiano	GSK-3β	Glucógeno Sintasa Cinasa 3 β
SIgA	Inmunoglobulina A secretora	FOXO	Factores transcripcionales <i>Forkhead</i>
ZO	<i>Zonula Occludens</i>	HEAT	Factor de Elongación de Huntington 3
EII	Enfermedades Inflamatorias intestinales	FAT	Dominio FRAP-ATM-TRAPP
NOD2	Dominio de Oligomerización por unión de Nucleótidos que contiene la proteína 2	FRB	Dominio FKBP12 unión a rapamicina
OCTN1/2	Transportador Orgánico de Cation/Carnitina	PIKK	Cinasa Similar a la PI3K
DLG5	Discos grandes homólogo 5	RD	Dominio de represión
TLR-4	Receptor Tipo Toll-4	TSC	Complejo de Esclerosis Tuberosa
LPS	Lipopolisacáridos	GAP	Proteína Activadora de GTP-asa
IL	Interleucina	RAPTOR	Proteína Reguladora Asociada con mTOR
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α	mLST8	Proteína 8 Letal de Mamífero Letal con Sec13
IFN	Interferon	PRAS40	Sustrato de Akt Rico en Prolinas de 40 kDa
JAK	Cinasa Janus	DEPTOR	Dominio DEP que contiene a la proteína que interactúa con mTOR
STAT	Transductores de la Señalización y Activadores de la Transcripción	RICTOR	Compañera de mTOR Insensible a la Rapamicina
RTK	Receptores asociados a Tirosin-Cinasa	mSIN1	Proteína 1 de Mamífero que interactúa con la Proteína Cinasa activada por Estrés
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos y Monocitos	PROTOR	Proteína Observada con RICTOR
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico	AMPK	Cinasa de Adenosil Monofosfato
PDGF	Factor de Crecimiento derivado de plaquetas	SGK1	Proteína Serin-Treonin cinasa 1
TYR2	Tirosin Cinasa no Receptora 2	PKCα	Proteín-Cinasa C α
JH	Dominio de homología a JAK	S6K1	Proteína Ribosomal S6 cinasa β 1
FERM	Dominio de proteína 4.1, Ezrina, Radixina y Moesina	PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
gp130	Glucoproteína 130	ACasp-3	Caspasa-3 activa
EPO	Eritropoyetina	Rictor^{ACEI}	Células Epiteliales Intestinales carentes de RICTOR
TPO	Trombopoyetina	BTC	Betacelulina
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Cinasa	HB-EGF	Factor de Crecimiento similar al EGF de Unión a Heparina
mTOR	Diana de Rapamicina en células de Mamífero	TACE	Enzimas convertidoras del Factor de Necrosis Tumoral α
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	MMP	Metaloproteasas de Matriz
PIP3	Fosfatidil Inositol 3,4,5-Trifosfato	sE-cad	E-cadherina no Soluble
PH	Dominio de Homología a Pleckstrina	LncRNA	ARN Largo No Codificante
PKD1	Proteína Cinasa 1	Cb-1	Ubiquitin-ligasa Linfoma de linaje B de Casitas 1

1. Introducción.

a. Mucosa intestinal.

El cuerpo humano tiene múltiples epitelios mucosos que forman barreras físicas entre el ambiente y el medio interno del huésped. La mucosa gastrointestinal, por lo tanto, es una barrera semipermeable que permite la absorción de nutrientes y sustancias presentes en lumen intestinal, pero a la vez limita el transporte de antígenos y microorganismos potencialmente dañinos. Es por eso que la mucosa intestinal juega un papel esencial para mantener la homeostasis en el sistema inmunitario, un proceso también conocido como tolerancia inmunitaria (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

La mucosa intestinal está compuesta por un epitelio columnar simple recubierto por capas superficiales de moco, y una lámina propia que contiene células inmunes (Luissint et al., 2016). La capa mucosa es la primera línea de defensa física en el lumen del intestino, y previene que el contenido luminal entre en contacto directo con las células epiteliales. El moco está formado por proteínas de mucina altamente glicosiladas que forman un tamiz superpuesto sobre el epitelio intestinal. De estas, la mucina 2 es la proteína del moco más abundante del intestino, siendo secretada por las células caliciformes. El intestino delgado únicamente tiene una capa de gel de moco, mientras que el colon tiene dos: una exterior, holgada, que permite la colonización a largo plazo de bacterias comensales, y la interior, más densa y libre de bacterias. Algunos reguladores inmunes, como, por ejemplo, moléculas de PAM (péptidos antimicrobianos) y sIgA (inmunoglobulina A secretora), son liberadas en la mucosa para reforzar la separación física en gradiente de la microbiota desde el epitelio hasta el lumen. Estos reguladores inmunes se presentan en una mayor concentración en el intestino delgado donde la capa de moco es menos densa. Además, la composición de la mucosa puede afectar la microbiota en el intestino, y a su vez, la microbiota también determina las propiedades de la mucosa (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

b. Epitelio intestinal.

Debajo de la capa de moco, las células epiteliales son el determinante más fuerte de la barrera intestinal. Debido a sus funciones biológicas de absorción y barrera, las células epiteliales intestinales se deterioran con el tiempo y deben ser reemplazadas constantemente. Las células madre epiteliales intestinales localizadas en la base de la cripta dan origen a los múltiples linajes celulares presentes en el intestino, incluyendo los enterocitos (linaje de absorción), las células caliciformes (productoras de moco), las células enteroendócrinas (secretoras de hormonas) y las

células de Paneth (productoras de péptidos antimicrobianos). Otros linajes celulares generados a partir de las células madre incluyen las células quimiosensoriales o células penacho, las cuales juegan un papel importante en la protección contra helmintos, y las células M, que son integrales para la presentación de antígenos lumbinales hacia las células del sistema inmune (Allaire et al., 2018; Luissint et al., 2016). En conjunto, todas estas células epiteliales establecen una monocapa continua que forma una barrera física que separa el lumen de la lámina propia. La función de barrera del epitelio debe mantenerse en todo momento, inclusive cuando las células madre progenitoras de la cripta se encuentren en proliferación o cuando las células de la superficie se desprendan hacia la cavidad luminal. Sin embargo, aunque las membranas celulares son impermeables a solutos hidrofílicos, las células epiteliales expresan transportadores específicos que permiten y/o restringen altamente el paso de muchas moléculas a través del epitelio intestinal. La absorción de muchas moléculas depende, por lo tanto, de la ruta transcelular que es mediada por acarreadores o mecanismos de endocitosis mediados por receptores. Sin embargo, las sustancias para las que no existen receptores se absorben por difusión simple a través de la ruta paracelular, regulada por las proteínas transmembranales que forman parte de los distintos complejos de unión, específicamente las proteínas que forman las uniones estrechas y adherentes (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

Las uniones estrechas son los complejos adhesivos más apicales y sellan el espacio intercelular. Están constituidos por proteínas transmembranales (claudinas y ocludinas), periféricas de membrana (*zonula occludens* ZO-1, ZO-2, MAGIS) y proteínas accesorias y/o regulatorias, que, en conjunto, regulan el transporte vectorial de agua y electrolitos a través del epitelio intestinal y previenen la fuga de macromoléculas al lumen del intestino. Por su parte, las uniones adherentes se encuentran justo debajo de las uniones estrechas y están formadas por cadherinas (proteínas transmembranales) y cateninas (periféricas de membrana). Junto con los desmosomas, las uniones adherentes proveen fuertes enlaces adhesivos que mantienen la integridad del epitelio. Tanto las uniones estrechas como las adherentes están ligadas al anillo de actina y miosina que circunscribe el borde apicolateral y cuya función es regular la tensión celular. Dado todo lo anterior, es fácil entender por qué la barrera intestinal no es una estructura estática, sino al contrario, es una entidad altamente dinámica que responde a estímulos internos y exógenos (Laukoetter et al., 2008; Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Por lo tanto, los cambios en la expresión o las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas de las uniones estrechas o el citoesqueleto de actina resultan generalmente en una pérdida parcial o total de la función de la barrera epitelial.

c. Enfermedades inflamatorias intestinales.

El deterioro de la barrera intestinal se ha observado en un gran número de patologías del tracto gastrointestinal, como la enfermedad celiaca, las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) y el carcinoma de colon. Sin embargo, el mal funcionamiento de la barrera intestinal también se ha ligado a desordenes extraintestinales, como la enfermedad crónica hepática, diabetes tipo 1 y obesidad. Para todas estas enfermedades, es común hipotetizar que la disfunción de la barrera intestinal y el flujo no controlado de antígenos a través del epitelio intestinal están desafiando el sistema inmune de individuos susceptibles. Dicho proceso podría no solo afectar el balance huésped-microorganismo, sino que sería el responsable de iniciar mecanismos inflamatorios en el intestino o algunos órganos más distantes (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), son desordenes inflamatorios crónicos que afectan el tracto gastrointestinal. Existen dos formas clínicas de EII principalmente: la enfermedad de Crohn, que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal, y la colitis ulcerosa, que se restringe a la mucosa del colon. Las EII tienen una etiología desconocida, pero se sabe que resultan de una interacción anómala entre factores ambientales, la microbiota intestinal y el sistema inmune del intestino, lo que genera una respuesta inmune irregular que compromete la función de barrera del epitelio (Maloy & Powrie, 2011; Torres et al., 2017).

Las fallas en el mantenimiento operacional de la barrera epitelial contribuyen al desarrollo de los desórdenes inflamatorios crónicos en la mucosa intestinal (Luissint et al., 2016). Los mecanismos implicados en la ruptura de la barrera epitelial en la mucosa colónica de los pacientes con EII son variados, e incluyen la discontinuidad de las uniones estrechas, la disrupción de la homeostasis epitelial y el daño tisular. La carga o susceptibilidad genética también juega un papel muy importante en la destrucción de la barrera epitelial en los pacientes con EII. Por ejemplo, mutaciones genéticas como CARD15/NOD2 en el cromosoma 16, OCTN1/2 en el cromosoma 5 y DLG5 en el cromosoma 10 incrementan la permeabilidad intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn. Además, la mutación en el gen del receptor tipo Toll 4 (TLR-4), que resulta en una señalización dañada por LPS, se asocia con un aumento en la permeabilidad intestinal durante el desarrollo de colitis ulcerosa (Laukoetter et al., 2008). Sin embargo, diversos factores ambientales que alteran un sinnúmero de procesos biológicos incluidas, distintas vías de señalización vitales para las células epiteliales también contribuyen al deterioro de la barrera epitelial. Entender estos mecanismos

celulares es por lo tanto muy importante, ya que permitirá desarrollar en un futuro tratamientos dirigidos a paliar o contener el desarrollo de estos procesos inflamatorios.

i. Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

A principios de la década de los 90's, se encontró que los enterocitos secretan un arreglo de quimiosinas y citocinas al entrar en contacto directo con las bacterias o sus productos. Varias de las moléculas secretadas reclutan y activan neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células T que son clave tanto en la respuesta inmune local durante la resolución de infecciones, así como en la reparación de la mucosa intestinal dañada (Allaire et al., 2018). Los pacientes con EII presentan un espectro patológico amplio y heterogéneo, lo que implica la activación de diversos efectores inmunes innatos y adaptativos. Sin embargo, los distintos módulos inmunes que definen la respuesta inflamatoria en cada individuo son coordinados de manera eficiente por las citocinas presentes en la mucosa intestinal. Se ha postulado que los leucocitos innatos, así como macrófagos y células dendríticas intestinales son los mayores productores de dichas citocinas (Maloy & Powrie, 2011).

Las citocinas son mensajeros moleculares de la inmunidad innata y adaptativa que permiten a las células del sistema inmune comunicarse a través de distancias cortas de manera parácrina y autócrina (Conlon et al., 2019). Las citocinas que promueven la cascada de inflamación se consideran mediadores proinflamatorios, e incluyen la interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , quimiosinas, y la familia de interferones, mientras que las citocinas que inhiben la inflamación al modular las respuestas de las citocinas pro-inflamatorias, se conoce como citocinas anti-inflamatorias, e incluyen al antagonista del receptor a IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13 (Boshtam et al., 2017). Al interactuar con su receptor, todas las citocinas emiten señales en la célula blanco para que incremente o decrezca una actividad enzimática específica, o para modificar la transcripción génica, lo que a la postre altera las funciones metabólicas y biológicas de un tejido/órgano. Dado que en la mucosa gastrointestinal de individuos con EII hay un enriquecimiento de estas citocinas, es de especial importancia biológica y médica encontrar los mecanismos moleculares responsables de la traducción de señales río abajo de dichas moléculas.

ii. Señalización activada por los receptores JAK y PI3K/Akt.

La vía JAK (quinasas Janus)/STAT (Transductores de la señalización y activadores de la transcripción) es una de las cascadas de señalización más importantes que median la inmunidad innata y la

adaptativa (Yan et al., 2018). Esta vía consiste en tres componentes principales: un receptor asociado a tirosin-cinasa (RTKs), las cinasas JAK y los factores transcripcionales STAT. Los RTKs son receptores localizados en la membrana celular con la capacidad de transducir señales de estímulos muy variados, dentro de los que se incluyen interleucinas (IL), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e interferones (IFNs). Los RTKs carecen de actividad de cinasa, pero tienen un sitio de unión a las tirosin-cinasas JAK en el dominio intracelular (Shea et al., 2015; Xin et al., 2020).

Tabla 1. Activación de JAK cinasas y su significancia biológica. La señalización por citocinas es mediada por la combinación específica de JAK y STAT debido a la unión preferencial a los dominios intracelulares del receptor (Gao et al., 2016)

Citocina	IFN γ , gp130	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO, TPO	IL-12, IL-23	IFNs tipo 1
Dímero	JAK1 + JAK2	JAK1 + JAK3	JAK2 + JAK2	TYK2 + JAK2	TYK2 + JAK1
Proceso involucrado	Inflamación Diferenciación de células T	Inmunidad adaptativa Inflamación Crecimiento y maduración de células linfoides	Mielopoyesis Eritropoyesis Producción de megacariocito	Diferenciación de células Th1 y Th17 Inmunidad innata Inflamación crónica	Inflamación Diferenciación de células T vírgenes

IFN γ : interferón gamma, gp130: glucoproteína 130, IL: interleucina, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, EPO: eritropoyetina, TPO: trombopoyetina, IFN's: interferones, TYK2: tirosin cinasa no receptora 2.

La familia de cinasas Janus está compuesta por JAK1, JAK2, JAK3 y la tirosin-cinasa no receptora 2 (TYR2). Todos los miembros presentan siete dominios conservados de homología a JAK (JH): los dominios JH1 y JH2 presentes en el extremo C-terminal, que poseen actividad catalítica de tirosina; los dominios JH3, JH4 y JH5, que se encuentran en el dominio similar a SH₂ y anclan el extremo C-terminal con el extremo N-terminal; y los dominios JH6 y JH7, que constituyen el dominio FERM en el extremo N-terminal, y median la asociación de las JAK con los receptores de citocinas a través de dominios ricos en prolina. Estas cinasas solas como monómeros, o como homo o heterodímeros han estado involucradas en las vías de transducción de señales iniciadas en respuesta a la estimulación

por una amplia gama de hormonas de crecimiento y citocinas (**Tabla 1**) (Gao et al., 2016; Pencik et al., 2018; Schindler et al., 2007).

De manera clásica, se asume que las proteínas JAK estimulan río abajo a los factores de transcripción STAT, que son una familia de proteínas formadas por siete miembros (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) (Xin et al., 2020). Por lo tanto, cuando una citosina se une a su receptor, se promueve 1) la auto-activación de la cinasa JAK, 2) la oligomerización del receptor, y 3) la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor lo que permite el acoplamiento para los STAT (**Figura 1**). Una vez unidos al receptor a través de sus dominios SH2, los STAT son fosforilados por las cinasas JAK en residuos de tirosinas, resultando en la formación de homo o heterodímeros que se translocan hacia el núcleo para, en la mayoría de los casos, activar la transcripción de genes, aunque también interactúan con elementos regulatorios distales del ADN, controlando la actividad potenciadora y/o el estado epigenético de los genes asociados (Pencik et al., 2018; Villarino et al., 2017; Yan et al., 2018).

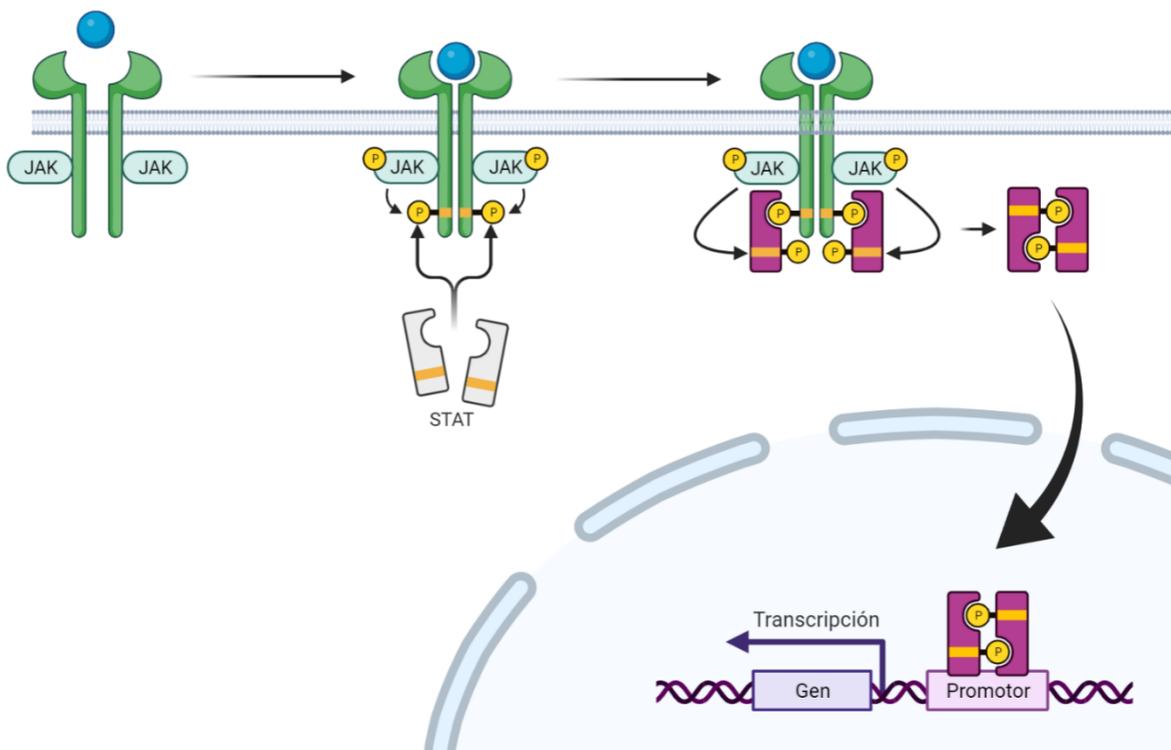


Figura 1. Vía JAK/STAT canónica. Cuando una citosina se une a su receptor, se fosforilan y activan las JAKs, así como la cola del receptor. Esto crea un sitio de acoplamiento para los STATs, que se unen al dominio citoplasmático del receptor. Los STATs se fosforilan y dimerizan, permitiendo su translocación hacia el núcleo, para regular la expresión génica. Modificado de (Shea et al., 2015).

iii. Vía de señalización PI3K/Akt/mTor.

Sin embargo, se sabe que de manera no clásica (**Figura 2**), las cinasas JAK funcionan como activadores de otras vías de señalización, dentro de las cuales está la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/Akt y de la diana de rapamicina de células de mamífero (mTOR) (Gao et al., 2016). Esta cascada participa en diversos procesos celulares como son el crecimiento y la supervivencia, y se encuentran tan interconectadas la una con la otra, que podrían considerarse como una sola vía. Dado que la vía PI3K/Akt/mTOR es un regulador clave para la supervivencia durante el estrés celular, la activación descontrolada de ésta resulta en una profunda perturbación del crecimiento celular y la supervivencia (Porta et al., 2014).

Las PI3K's son una familia de cinasas de lípidos cuya función es la generación de segundos mensajeros a partir de la fosforilación específica del grupo hidroxilo 3' del fosfatidilinositol. La clase I de PI3K está formada por heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica (p110) y otra adaptadora/reguladora (p85). Estas cinasas se clasifican en aquellas que son activadas por receptores con actividad de tirosin cinasa (PI3K $\alpha\beta\delta$) y aquellas que son activadas por receptores acoplados a proteínas G (PI3K γ). Entonces, una vez activadas las JAK, estas tienen la capacidad de desprenderse de su receptor y entonces fosforilar residuos de tirosina de otros RTK's que se encuentren localizados en la cercanía, como, por ejemplo, el EGFR. Esto promueve la activación del receptor y el consiguiente reclutamiento de la PI3K aún en ausencia de un estímulo extracelular. Cuando la PI3K es reclutada a la membrana por su unión directa a las fosfotirosinas en el C-terminal de los receptores o adaptadores, la subunidad catalítica se activa, lo que lleva a que en pocos segundos se produzca el segundo mensajero fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PI3, 4, 5-P3). El PIP3 membranal recluta a un subgrupo de proteínas de señalización que tienen dominios de homología a pleckstrina (dominio PH), incluidas la proteína 3-fosfoinositido dependiente de la proteína cinasa 1 (PDK1) y Akt, lo que permite la interacción y activación de dichas moléculas de señalización. (Porta et al., 2014).

Akt es uno de los efectores primarios de la señalización por PI3K. Es una serin/treonin cinasa de la familia AGC, caracterizada por la presencia de una cola reguladora en el extremo carboxilo terminal que contiene uno o más sitios de fosforilación. En ausencia de estímulo, Akt está constitutivamente fosforilada en el residuo de treonina 450, el cual mantiene a Akt en una forma estable y la protege de la degradación al permitir la interacción de la cola con un parche básico en la superficie del lóbulo

amino del dominio de cinasa. Cuando se genera PIP₃, Akt se transloca hacia la membrana plasmática en donde es fosforilada en el residuo de Treonina 308 por PDK1 y en el residuo de Serina 473 por mTORC2. Una vez activada, Akt regula diversos procesos celulares como la supervivencia y proliferación celular a través de varios efectores río abajo, tales como la GSK-3 β , FOXO, y mTORC1 entre otros (Chamcheu et al., 2019; Siess & Leonard, 2019).

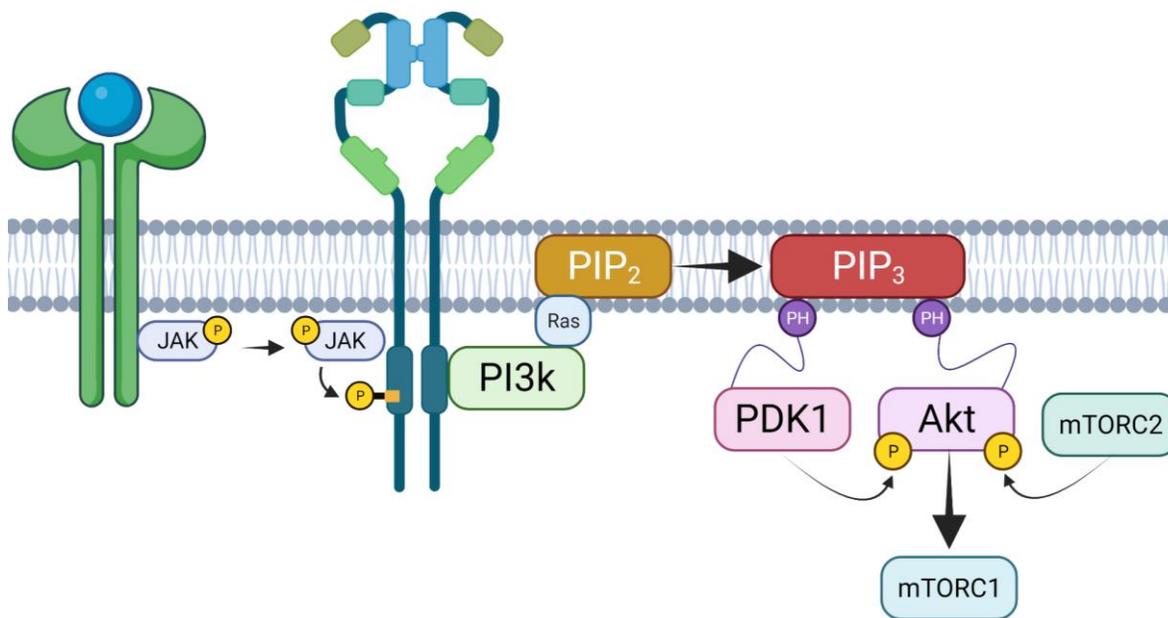


Figura 2. Vías JAK/STAT no canónicas. La fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio citoplasmático del RTK por la unión de la citocina, permite la unión directa no sólo con STATs, sino también con otras proteínas como PI3K y Scr. Esto desencadena la activación de cascadas de señalización implicadas en procesos celulares como la proliferación y supervivencia. Modificado de (Gao et al., 2016).

d. mTORC1 y mTORC2: funciones generales y regulación.

mTOR es un una serin/treonin cinasa que controla el crecimiento, proliferación, supervivencia, motilidad, síntesis de proteínas, transcripción y autofagia, y se considera como un regulador central de varios tipos de tumorigénesis y metástasis, así como en algunos desórdenes tales como la obesidad, diabetes tipo 2 y neurodegeneración. mTOR está compuesta por seis dominios funcionales: HEAT (factor de elongación de Huntington 3, que media interacciones proteína-proteína), FAT (dominio FRAP-ATM-TRAPP), FRB (FKBP12 unión a rapamicina, que muestra acción inhibitoria de rapamicina cuando RAPTOR está unida a mTOR, y cuyos residuos son necesarios para

la unión de RAPTOR y RICTOR), PIKK (cinasa similar a la PI3K), RD (dominio de represión), y FATC (dominio carboxilo terminal) (Sharma et al., 2017).

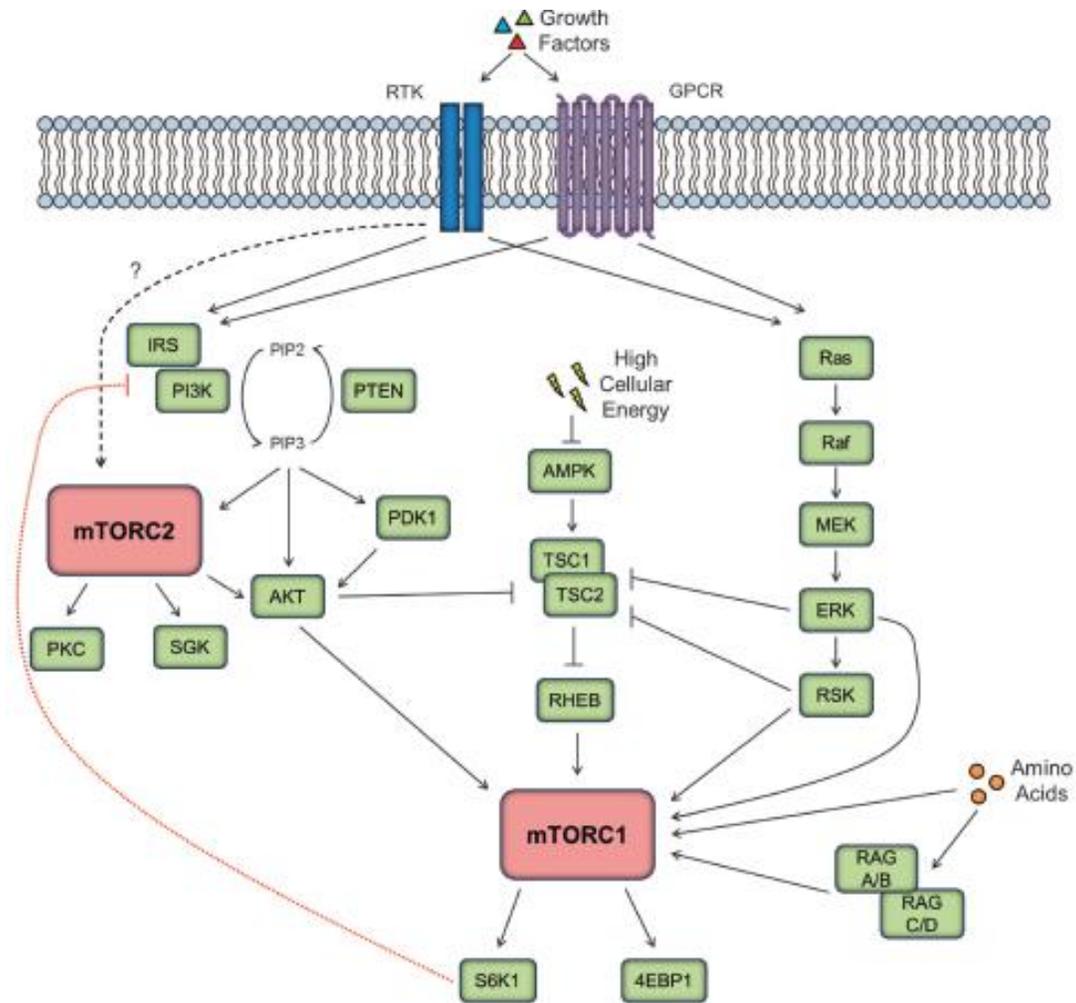


Figura 3. Vía mTOR. mTORC1 y mTORC2 integran información ambiental río arriba para controlar su propia activación. Debido a que mTORC1 controla la entrada celular en un estado anabólico que requiere grandes cantidades de energía y macromoléculas, la activación del complejo solo debe ocurrir cuando los aminoácidos, la insulina/ factores de crecimiento, el ATP y el oxígeno se encuentran disponibles. Muchas entradas convergen en el complejo de esclerosis tuberosa (TSC), que actúa como un GAP para Rheb. Se cree que mTORC2 está regulado principalmente por factores de crecimiento. Aunque no está claro dónde se produce la activación de mTORC2, el dominio de homología de pleckstrina en la proteína 1 que interactúa con MAPK (mSIN1) puede reclutar mTORC2 a la membrana plasmática. (Kim et al., 2017; Liu & Sabatini, 2020; Lone et al., 2019).

mTOR regula procesos celulares anabólicos y metabólicos a través de la formación de dos complejos funcional y estructuralmente diferentes: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 está formado por tres componentes centrales: 1) mTOR, 2) la proteína reguladora asociada con mTOR (RAPTOR) que facilita el reclutamiento de sustratos hacia mTORC1 a través de la unión del motivo de señalización TOR y 3) la proteína 8 letal de mamífero letal con Sec13 (mLST8) que se asocia con el dominio catalítico de mTORC1 y estabiliza el bucle de activación de cinasa. Adicionalmente, mTORC1 contiene dos subunidades inhibitorias, el sustrato de Akt rico en prolinas de 40 kDa (PRAS40) y el dominio DEP que contiene a la proteína que interactúa con mTOR (DEPTOR) (Saxton & Sabatini, 2017). Por su parte, mTORC2 también contiene a las subunidades mTOR, DEPTOR y mLST8, pero en vez de RAPTOR, mTORC2 se asocia con RICTOR (compañera de mTOR insensible a la rapamicina), PROTOR (proteína observada con Rictor), y a la subunidad regulatoria mSin1 (proteína 1 de mamífero que interactúa con la proteína cinasa activada por estrés), la cual recientemente se ha descubierto que interactúa directamente con Ras y permite el correcto ensamblaje y funcionamiento de mTORC2. A diferencia de mTORC1, mTORC2 se caracteriza por su insensibilidad al tratamiento agudo con rapamicina (Lone et al., 2019; Saxton & Sabatini, 2017).

La actividad de mTORC1 y mTORC2 está altamente ligada y depende de la señalización mediada por la proteína Akt (**Figura 3**). Cuando el complejo mTORC2 está ensamblado y activo, fosforila el C-terminal de Akt en la serina 473 e induce la activación total de la molécula. Una vez que está completamente activada, AKT fosforila al complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2) y bloquea su asociación con TSC1. Dado que TSC1/2 es un regulador negativo de RHEB, quien actúa como activador de mTORC1, la fosforilación de TSC2 mediada por Akt activa a mTORC1. Además, Akt también fosforila a PRAS40, para disociarlo de Raptor y estimular la activación de mTORC1. Por lo tanto, la cascada de señalización mTORC2/Akt regula positivamente la activación de mTORC1 mediada por RHEB. Es importante clarificar que, a pesar de que la señalización inducida por los factores de crecimiento estimula la cascada de PI3K/Akt, y que esta es clave para disparar la proliferación celular, las células no proliferan si los nutrientes, energía y macromoléculas necesarias no están disponibles. Por lo tanto, mTORC1 es altamente sensible a la concentración de ATP intracelular, glucosa y ciertos aminoácidos. De hecho, se ha observado que los bajos niveles de ATP (y por lo tanto, altos niveles de AMP), activan a la cinasa de AMP (AMPK), la cual promueve la formación del complejo TSC1/2 y se inhibe a mTORC1. Entonces, la acumulación de AMP anula las señales de los factores de crecimiento y bloquea la proliferación celular en ausencia de energía (Kim et al., 2017).

Las funciones biológicas de los complejos de mTOR son amplias y variadas. Mientras que mTORC1 regula el crecimiento celular y el metabolismo, mTORC2 por su parte controla la proliferación y supervivencia celular al estimular la actividad de varios miembros de la familia de proteínas cinasas AGC (PKA, PKG, PKC). El papel más importante de mTORC2 es probablemente la fosforilación y activación de Akt, que una vez activa, promueve la supervivencia, proliferación y crecimiento celular a través de la fosforilación e inhibición de varios sustratos claves, incluidos los factores transcripcionales FoxO1/3a, el regulador metabólico GSK3 β y el inhibidor de mTORC1 TSC2. mTORC2 también fosforila y activa SGK1, una cinasa AGC que regula el transporte de iones así como la supervivencia celular (Saxton & Sabatini, 2017).

i. Ensamble y activación de mTORC2.

Los mecanismos de retroalimentación entre mTORC1 y mTORC2 son bastante complejos. Se ha postulado que la formación de un complejo u otro depende de la concentración de subunidad regulatoria existente en ese momento; es decir, de la concentración de Raptor o Rictor (Rosner & Hengstschläger, 2008). El problema es que se desconocen los mecanismos que conllevan al ensamble y la posterior activación de mTORC2. De manera clásica se ha reportado que la estimulación con factores de crecimiento y la hiperactividad ribosomal son los principales activadores de mTORC2. Pero, recientemente, se demostró que la activación de Ras por aniones superóxido hace que Ras secuestre a mSin1 a la membrana plasmática, lo que permite que mTORC2 se active y fosforile a sus dianas moleculares, AKT y PKC α (Lone et al., 2019).

No obstante, la inexistencia de un inhibidor específico de mTORC2 ha dificultado el estudio de tal complejo. Todo lo que se sabe hoy en día sobre los mecanismos de ensamble y activación de mTORC2, es gracias al uso de herramientas moleculares que han permitido la delección del gen que codifica la subunidad regulatoria *rictor* (sistema CRISPR/Cas9), o bien, aquellas que inhiben la transcripción de Rictor (ARNs pequeños de interferencia o ARNs cortos de horquilla) (Lone et al., 2019; Martínez Calejman et al., 2020; Un et al., 2018). Sin embargo, existen herramientas que son más específicas y que actualmente se encuentran en boga, siendo uno de ellos el Sistema de Recombinación mediada por Cre-*loxP*. Esta es una poderosa herramienta que permite la edición de genes mediante el uso de líneas celulares o animales modificados transgénicamente. Uno de los padres tiene codificado el gen *cre* bajo el control de un promotor tejido específico, mientras que el otro tiene flanqueado el gen de interés con secuencias *loxP*. La progenie va a expresar a la Cre-recombinasa de manera específica, reconociendo y cortando las secuencias *loxP*. Esta herramienta

ofrece ventajas sobre otras, ya que la delección es constitutiva, inducible y tejido específica (McLellan et al., 2017).

ii. Función específica de mTORC2 en el epitelio intestinal.

Haciendo uso de este sistema de delección génica, se ha logrado eliminar de manera tejido específico a la subunidad reguladora Rictor al expresar a la Cre-recombinasa bajo el control del promotor de la villina-1, proteína que se expresa únicamente en las microvellosidades presentes en las células epiteliales intestinales (CEI) (Madison et al., 2002; Magee et al., 2012). En nuestro laboratorio, empleando este modelo animal (ratón carente de Rictor), hemos observado que la señalización de PI3K/Akt/mTOR es importante no solo en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal, sino que también juega un papel esencial en la destrucción de la barrera epitelial y en los procesos de diferenciación celular (Gutiérrez-Martínez et al., 2019).

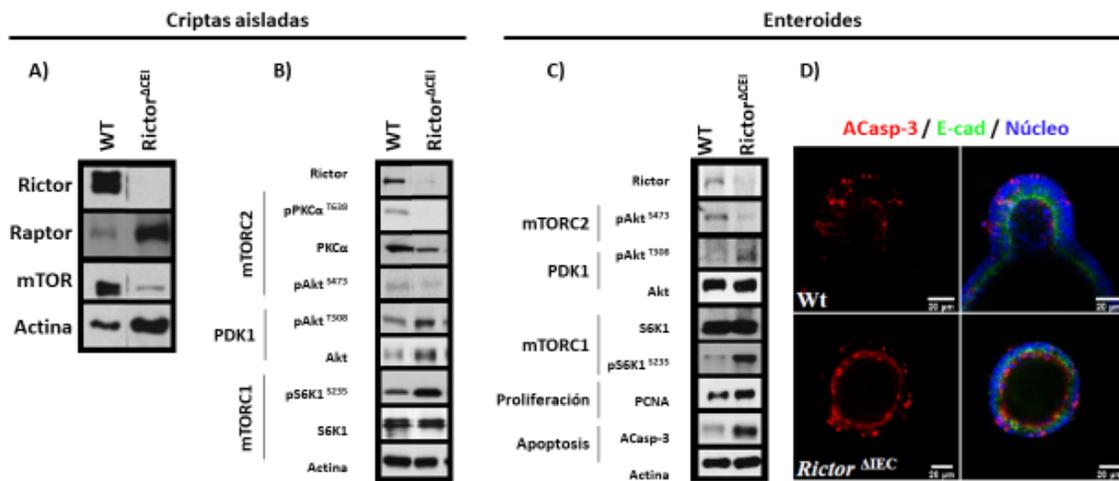


Figura 4. Efectos de la delección de Rictor en colonocitos. Rictor y mTOR fueron evaluadas por *Western blot* en lisados de criptas aisladas obtenidas de ratones WT o carentes de Rictor ($Rictor^{\Delta CEI}$) (A). Posteriormente se realizó el análisis por *Western Blot* del fosfoestado de efectores moleculares de mTORC2 (PKC α T638 y Akt S473), mTORC1 (S6K1 S235) y PDK1 (AKT T308) en criptas aisladas (B) y enteroides (C) de ratones WT o $Rictor^{\Delta CEI}$. Adicionalmente, por medio de ensayos de *Western Blot* (C) e inmunofluorescencia (D) se evaluó la proliferación (PCNA) y muerte celular por apoptosis (ACasp-3) en enteroides WT Y carentes de Rictor (Castro-Martínez et al., 2021).

Recientemente también se encontró que la delección genética de *rictor* tanto en criptas intestinales aisladas como en enteroides, promueve un incremento en la concentración de la subunidad reguladora Raptor (Figura 4A), mismo que se ve reflejado en el aumento de la fosforilación del

residuo S235/236 de la proteína ribosomal S6 cinasa β 1 (efector molecular de mTORC1), y la disminución en la fosforilación de la S473 de Akt y de la T638 de PKC α (efectores moleculares directos de mTORC2) (**Figuras 4B y 4C**). Entonces, estos resultados sugieren que después de la pérdida de Rictor, mTOR se asocia con Raptor, favoreciendo la formación y activación de mTORC1, fomentando así el cambio de mTORC2 hacia mTORC1 de manera independiente de señales extracelulares.

Aún más relevante, la pérdida de Rictor/mTORC2 evidenció tener efectos sobre la viabilidad celular de los enteroides, ya que se mostró que existe un aumento en la concentración del marcador de proliferación celular PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) y en el corte y activación de caspasa-3 (marcador de muerte celular por apoptosis) (**Figuras 4C y 4D**). Todo esto en conjunto indica que existen señales todavía desconocidas en el intestino que promueven la proliferación celular como un mecanismo compensatorio al exceso de muerte celular, mismo que es mediado por Rictor/mTORC2 (Castro-Martinez et al., 2021).

De manera notoria, la eliminación de *rictor* también resulta en el incremento de Akt fosforilada en la Treonina 308, una fosforilación mediada por la cinasa PDK1 (**Figuras 4B y 4C**). Dicho resultado evidencia claramente que existen mecanismos compensatorios desconocidos que podrían estar retroalimentando a la vía mTORC1 en la ausencia de Rictor/mTORC2.

2. Planteamiento del problema.

La delección de Rictor en las células epiteliales intestinales estimula la activación de Raptor/mTORC1 y la muerte por apoptosis. Sin embargo, usando un cultivo primario de enteroides, nosotros identificamos que en estas células epiteliales también existe mayor proliferación, por lo que no se afecta la viabilidad de los organoides. El mecanismo por el cual mTORC1 regula todos estos procesos biológicos aún no se ha investigado.

3. Hipótesis.

La hiperactivación de mTORC1 inducida por la ausencia de Rictor promueve cambios en la viabilidad y diferenciación celular en las células epiteliales intestinales del ratón Rictor^{ΔCEI}.

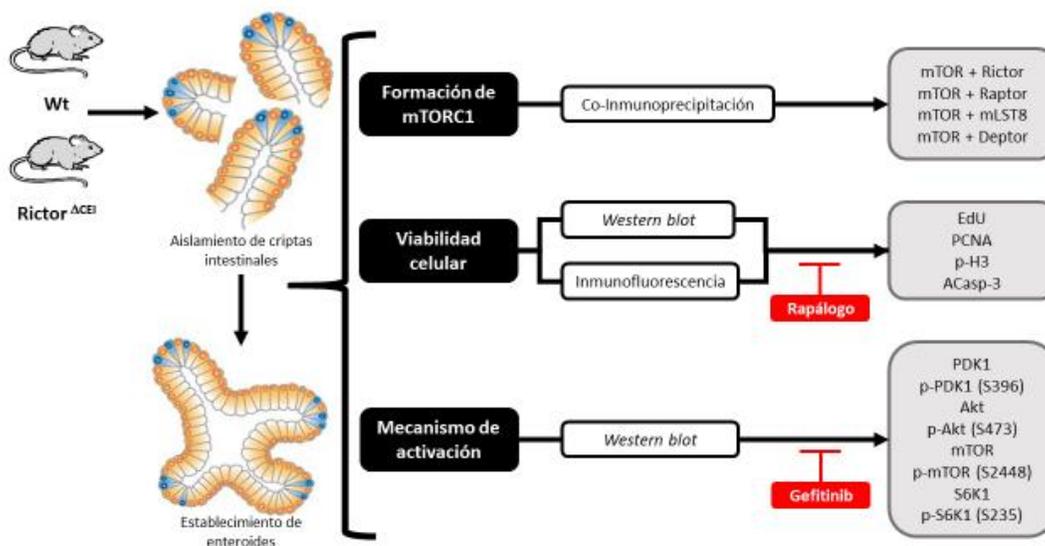
4. Objetivo general.

Identificar los efectos biológicos de la activación del complejo mTORC1 en las criptas intestinales de los animales $Rictor^{\Delta CEI}$.

a. Objetivos específicos.

1. Analizar la muerte celular en las CEI del ratón $Rictor^{\Delta CEI}$.
2. Analizar cambios morfológicos en las CEI del ratón $Rictor^{\Delta CEI}$.

5. Diseño experimental.



6. Materiales y métodos.

a. Experimentos animales.

Se usaron ratones de 6 a 8 semanas de edad C57BL/6J (Wt) y deficientes de Rictor en las células epiteliales intestinales (Rictor^{ΔCEI}) (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Los ratones B6. Cg-Tg(Vil1-cre)997Gum/J (Stock No:004586) y STOCK Ptprc^b Thy1^a 86 Rictor^{tm1.1Klg}/SjmJ (Stock No: 020649) fueron comprados de Jackson Laboratory. Los animales fueron alojados en un ciclo día/noche estándar, con acceso libre a comida y agua.

b. Anticuerpos y reactivos.

Los anticuerpos y reactivos fueron usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Akt1 (CST-2938), pPKCα/β (Thr638/641) (CST-9375) Y PKCα (CST-2056), Proteína Ribosomal S6 (CST-2317), Proteína ribosomal pS6 (Ser235/236) (CST-4858), pAkt473 (Ser473) (CST-4060) se obtuvieron de Santa Cruz (Santa Cruz, CA). La Caspasa-3 escindida (Asp175) (CST-9661), mTOR, raptor y rictor (D16H9; CST-9476), p-PDK1 (Ser241) (CST-3061), Receptor del Factor de Crecimiento Epidermico EGFR (D38B1), p-EGFR (Tyr1045) (CST-2237) y p-Histona 3 (Ser10) (CST-9701) se obtuvieron de Cell Signalling (Danvers, MA). PCNA PC10 (ab29) de Abcam (Cambridge, MA).

c. Aislamiento de criptas intestinales.

Se identificó el colon proximal y se removieron segmentos de 1-2 cm. Las vísceras se abrieron, se enjuagaron en PBS frío y fueron incubadas en solución de quelación Ca²⁺ por 30 minutos a temperatura ambiente (966 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM TRIS, 27 mM EDTA o NaEGTA, 45 mM sorbitol, 28 mM sacarosa y 0.1% BSA). Después de la quelación el tejido fue agitado manualmente para liberar las criptas. El tejido fue removido y la solución fue centrifugada a 2000 rpm durante 2 minutos. Las criptas aisladas fueron lisadas en RIPA para el posterior análisis en *Western blot* (Mahe et al., 2015).

d. Establecimiento de enteroides.

El Matrigel se diluyó a 4°C hasta obtener una concentración del 50% en medio de cultivo completo (MCC: DMEM-F12 avanzado con suplemento N2, suplemento B27, 1 × GlutaMAX, tampón HEPES 10 μM, penicilina 1 μg/mL, estreptomycin 1 μg/mL, Y27632 3.2 mg/mL y 163.2 mg/mL NAC). Los micropozos se esterizaron con etanol, se lavaron x 3 en tampón de enjuague y se colocaron a 4 ° C antes de plaquear las criptas. Se añadió una suspensión de 400 μL de criptas a cada micropocillo

(5000 criptas/mL) y se dejó que las criptas se asentaran en los pocillos durante 2 min. A continuación, se eliminó con cuidado el sobrenadante y se añadió Matrigel enfriado con hielo (400 µL). El Matrigel se complementó con las siguientes concentraciones de factor de crecimiento: 5 ng/mL Wnt-3a, 50 ng/mL EGF, 100 ng/mL Noggin y 1 µg/mL R-spondin1. Se polimerizó el Matrigel durante 15 min a 37°C, y posteriormente se añadieron 1.6 mL de medio de cultivo completo sobre el Matrigel. Los factores de crecimiento se repusieron mediante la adición directa al medio cada 2 días y el medio se cambió cada 4 días. Se usó R-spondin1 a 1 µg/mL para la siembra inicial y 500 ng/mL durante la duración del cultivo. Y27632 y NAC solo se incluyeron en el MCC en el momento de la siembra inicial y se eliminaron de los medios de cultivo posteriores (Ahmad et al., 2014).

e. Western blot.

Las muestras colectadas en amortiguador de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% ácido deoxicólico, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) fueron homogenizadas usando un homogenizador Benchmark BeadBlaster™ (Benchmark Scientific; Sayreville, NJ). La concentración de proteína se determinó por medio del ensayo de proteína BCA, (Pierce, Thermo Fisher Scientific; Walthman, MA). Se cargaron 25 µg en SDS-PAGE desnaturante para WB. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios en amortiguador de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

f. Análisis de proliferación celular.

La proliferación fue evaluada *in vivo* por inyección intraperitoneal de 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU) (200 mg/kg). La incorporación de EdU fue determinada con el Kit de Proliferación Celular Click-iT EdU (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific; Walthman, MA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

g. Análisis de apoptosis.

La apoptosis se evaluó analizando la presencia de Caspasa 3 activa (ACasp-3). La presencia de ACasp-3 se determinó usando un anticuerpo comercial contra Caspasa-3 escindida (CST-9664). La tinción de inmunofluorescencia se realizó de acuerdo con instrucciones del fabricante.

h. Inmunofluorescencia.

Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente permeabilizadas con 0.1% Triton X-100 por 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente bloqueadas con 2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora a

temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, y entonces se añadieron anticuerpos secundarios marcados con Alexa por 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LMS 510 (Zeiss, Jena, Alemania), o con un Leica TCS SP8x (Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji-Image J (Bethesda, MD).

7. Discusión.

La fosforilación de la Serina 308 de Akt por la PDK1 es resultado de la generación del segundo mensajero PIP3 a partir del reclutamiento de la PI3K hacia la membrana plasmática por activación de receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). De manera clásica, la unión de un factor de crecimiento promueve la autofosforilación de su receptor, permitiendo el reclutamiento y activación de la PI3K. Sin embargo, de manera no canónica la activación de la vía JAK/STAT puede activar también a la PI3K aún en ausencia de estímulo. Entonces, dado que hay un enriquecimiento de citocinas en el colón, la fosforilación de la Serina 308 de Akt que se observa en las criptas intestinales del ratón que carecen de Rictor, probablemente sea resultado de este mecanismo. Sin embargo, esto no explica el aumento, aunque en menor medida, en la fosforilación de este residuo en los organoides, ya que estos son crecidos en medios controlados. Es decir, crecidos en un sistema donde no hay factores ambientales interactuando con ellos (como citocinas, microbiota, productos bacterianos, por citar algunos ejemplos). Por lo tanto, deben de existir otros mecanismos que estén activando a la PI3K.

Se sabe que los ligandos del EGFR como la anfiregulina, la betacelulina (BTC), la epirregulina, las neurorregulinas, el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina (HB-EGF) y el propio factor de crecimiento epidérmico (EGF) pueden ser escindidos por múltiples miembros de la familia de enzimas convertidoras del factor de necrosis tumoral α (TACE, también conocidas como ADAM's). Estas metaloproteasas se encuentran ancladas en la membrana plasmática y su función es cortar el ectodominio de las proteínas de la superficie celular, incluidos los ligandos del EGFR, liberándolas para que así puedan interactuar y activar al EGFR (Daub et al., 1996; Ohtsu et al., 2006; Prenzel et al., 1999). Así pues, el incremento en la fosforilación del residuo de Serina 308 en Akt que se observa en los organoides carentes de Rictor podría requerir la activación constante de la metaloproteasa TACE/ADAM.

Otra molécula importante que probablemente se encuentra involucrada en la activación del EGFR es la E-cadherina. Esta es una glicoproteína transmembranal que media las uniones adherentes

entre células y se encarga del mantenimiento de la estructura normal de los epitelios. La principal función de la E-cadherina es establecer y reforzar la adhesión intercelular en las uniones adherentes que se anclan al citoesqueleto de actina para mantener la estructura y forma de la célula (Hu et al., 2016). La formación de uniones homofílicas de E-cadherina favorecen el reclutamiento de la subunidad reguladora p85 de PI3K, lo que contribuye a la activación de la vía PI3K/Akt en los sitios de unión célula-célula, y este podría ser un mecanismo por el cual la Serina 308 de Akt está siendo fuertemente fosforilada en los organoides carentes de Rictor (De Santis et al., 2009). Aunado a esto, la E-cadherina podría estar participando en la formación y mantenimiento de balsas lipídicas que conservan a los pro-factores de crecimiento en cercanía de TACE y RTK's, facilitando la activación de estos últimos. Sin embargo, un mecanismo que no se puede descartar es el procesamiento proteolítico de E-cadherina que es mediado por varias proteasas membranales, incluidas la α -secretasa, ayudada por metaloproteasas de matriz (MMP-2/3/7/9/14), TACEs (TACE10/15/17), kallikreina 7 y plasmina. Dichas proteasas procesan proteolíticamente a E-cadherina para generar un fragmento extracelular N-terminal de 80 kDa que es soluble y que se denomina E-cadherina soluble (sE-cad), y un fragmento intracelular C-terminal de 38 kDa (CTF1) que es generalmente citosólico (Hu et al., 2016). Aunque ambos fragmentos tienen alta actividad biológica, específicamente la sE-cad actúa como ligando del EGFR y promueve la activación de las vías de señalización PI3K y ERK1/2 río abajo de dicho receptor (Inge et al., 2011). Entonces, el aumento en la fosforilación de la Serina 308 de Akt podría ser un efecto de la activación de la PI3K río abajo de algún RTK que es activado directamente por la forma soluble de la E-cadherina liberada en los organoides carentes de Rictor a través de alguna de las proteasas antes mencionadas.

Recientemente, se demostró la participación de ARN's largos no codificantes (LncRNA's) en la señalización PI3K/Akt (Koirala et al., 2017; Lin et al., 2017; Zhou et al., 2020). Los LncRNA's son ARN que no tienen la capacidad de codificar proteínas, por lo que se consideraban como "basura evolutiva". Sin embargo, evidencias recientes sugieren que este tipo de ARN regulan múltiples procesos biológicos a través de su asociación con otras macromoléculas. Es así que se ha demostrado que, por ejemplo, el LncRNA AK023948 interactúa con la ARN helicasa A dependiente de ATP DHX9 y con la subunidad reguladora p85 de PI3K, lo cual estabiliza a la p85 y promueve la actividad de Akt (Koirala et al., 2017). También, bajo ciertas condiciones el LncRNA LINK-A es necesario para la interacción Akt-PIP3 y la consecuente activación enzimática de Akt (Lin et al., 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que algunos LncRNA's regulan la actividad del EGFR al controlar la ubiquitinación de la molécula. Cuando el EGFR se encuentra fosforilado en la Tirosina

1045, la ubiquitin-ligasa Cb1 se une directamente y entonces el EGFR es marcado para degradación lisosomal (Grøvdal et al., 2004). Sin embargo, cuando el LncRNA LINC01485 se sobreexpresa, se une al residuo de fosfotirosina 1045 y de esta forma inhibe la unión del EGFR con la Cb1, bloqueando de manera parcial la ubiquitinación y posterior degradación del EGFR. El resultado final es una activación sostenida de la vía PI3K/Akt, promoviendo el crecimiento tumoral (Zhou et al., 2020). Entonces, no se descarta la idea de que exista algún LncRNA que se esté sobreexpresando en las células epiteliales carentes de Rictor y que este sea capaz de mantener hiperactivada la vía de señalización PI3K/Akt.

8. Conclusión.

Debido a la contingencia sanitaria causada por la pandemia Covid-19, no tuve la posibilidad de entrar a laboratorio, por lo cual, los objetivos de esta tesis aún se encuentran inconclusos. Sin embargo, se realizó una exhaustiva investigación teórica, analizando los posibles mecanismos moleculares que conllevan a la activación de Raptor/mTORC1 en ausencia de Rictor/mTORC2 en células epiteliales intestinales. De acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos en nuestro laboratorio y a la revisión bibliográfica, proponemos el siguiente mecanismo molecular (**Figura 5**). Gracias a la eliminación de Rictor/mTORC2 de las células epiteliales intestinales por utilizando un sistema de delección génica Cre-LoxP, se encontró que estas células entran en procesos de muerte celular por apoptosis o por anoikis. Ambos mecanismos de muerte celular provocan la liberación de grandes concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven la activación de metaloproteasas de la familia TACE/ADAM. Como resultado, las células apoptóticas generan por escisión, factores de crecimiento maduros, los cuales al interactuar con su receptor conllevan a la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1. Dado que también en estas células se abolió a Rictor/mTORC2, y por lo tanto se está favoreciendo la formación del complejo Raptor/mTORC1, la estimulación con factores de crecimiento provoca una hiperactivación de Raptor/mTORC1, resultando en la activación de procesos celulares de supervivencia, proliferación y diferenciación. Se pretende que este mecanismo molecular propuesto sea investigado durante la realización del doctorado. No obstante, tampoco se pueden descartar otros mecanismos alternos e intrínsecos que estén promoviendo la activación de Raptor/mTORC1 a falta e Rictor/mTORC2 (E-cadherina o LncARN's, por ejemplo).

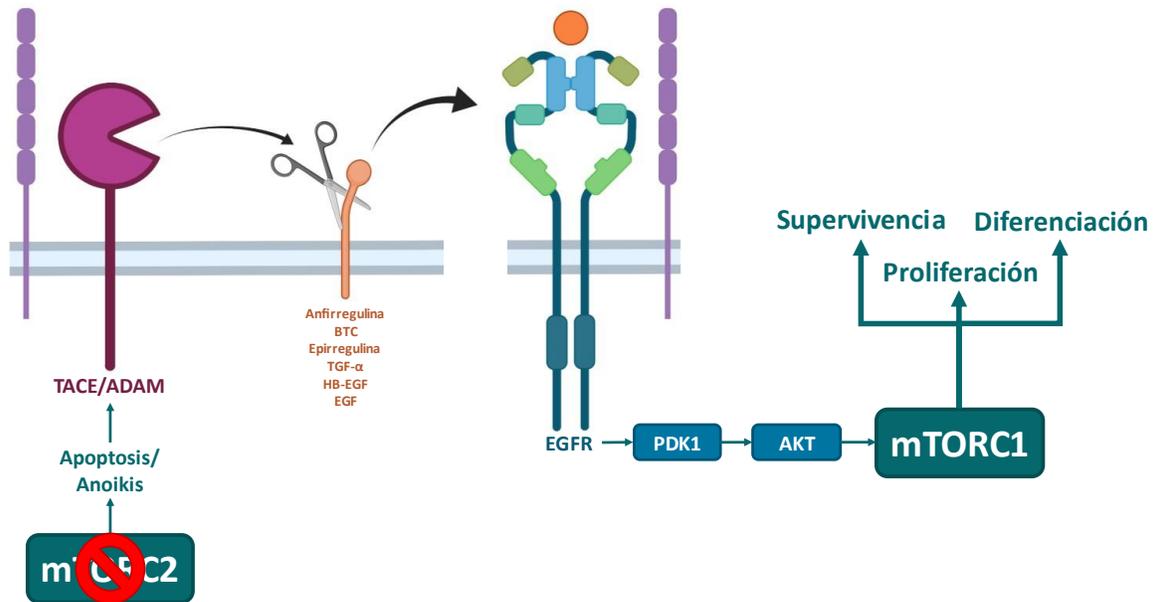


Figura 5. Mecanismo molecular propuesto. Ante la ausencia de Rictor/mTORC2, las células epiteliales intestinales mueren por apoptosis o anoikis, lo cual promueve la activación de metaloproteasas que generan factores de crecimiento maduros. Estos, al interactuar con su receptor en células vecinas, activan cascadas de señalización (PI3k/Akt/mTORC1) que inician procesos celulares de supervivencia, proliferación y diferenciación, como mecanismos compensatorios al exceso de muerte celular originado por la delección de Rictor/mTORC2.

9. Referencias.

- Ahmad, A. A., Wang, Y., Gracz, A. D., Sims, C. E., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2014). Optimization of 3-D organotypic primary colonic cultures for organ-on-chip applications. *Journal of Biological Engineering*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-9>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*(9), 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., & Khanahmad, H. (2017). Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*, *40*(1), 340–349. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0477-1>
- Castro-Martinez, F., Candelario-Martinez, A., Encarnacion-Garcia, M. del R., Piedra-Quintero, Z., Bonilla-Moreno, R., Betanzos, A., Perez-Orozco, R., Hernandez-Cueto, M. de los A., Muñoz-Medina, J. E., Patiño-Lopez, G., Schnoor, M., Villegas-Sepulveda, N., & Nava, P. (2021). Rictor/mTORC2 signaling protects colonocytes from apoptosis and prevents epithelial barrier breakdown. *The American Journal of Pathology*, *S0002-9440*(21), 00259–5. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.06.004>
- Chamcheu, J. C., Roy, T., Uddin, M. B., Banang-Mbeumi, S., Chamcheu, R. C. N., Walker, A. L., Liu, Y. Y., & Huang, S. (2019). Role and Therapeutic Targeting of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Skin Cancer: A Review of Current Status and Future Trends on Natural and Synthetic Agents Therapy. *Cells*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080803>
- Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., & Waldmann, T. A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *39*(1), 6–21. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, *379*(6565), 557–560. <https://doi.org/10.1038/379557a0>
- De Santis, G., Miotti, S., Mazzi, M., Canevari, S., & Tomassetti, A. (2009). E-cadherin directly contributes to PI3K/AKT activation by engaging the PI3K-p85 regulatory subunit to adherens junctions of ovarian carcinoma cells. *Oncogene*, *28*(9), 1206–1217.

<https://doi.org/10.1038/onc.2008.470>

Gao, Q., Liang, X., Shaikh, A. S., Zang, J., Xu, W., & Zhang, Y. (2016). JAK/STAT Signal Transduction: Promising Attractive Targets for Immune, Inflammatory and Hematopoietic Diseases.

Current Drug Targets, 487–500. <https://doi.org/10.2174/1389450117666161207163054>

Grøvdal, L. M., Stang, E., Sorkin, A., & Madshus, I. H. (2004). Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation.

Experimental Cell Research, 300(2), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.07.003>

Gutiérrez-Martínez, I. Z., Rubio, J. F., Piedra-Quintero, Z. L., Lopez-Mendez, O., Serrano, C., Reyes-Maldonado, E., Salinas-Lara, C., Betanzos, A., Shibayama, M., Silva-Olivares, A., Candelario-Martinez, A., Meraz-Ríos, M. A., Schnoor, M., Villegas-Sepúlveda, N., & Nava, P. (2019).

mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development. *Translational Oncology*, 12(1), 24–35.

<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.08.016>

Hu, Q. P., Kuang, J. Y., Yang, Q. K., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2016). Beyond a tumor suppressor:

Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. *International Journal of Cancer*, 138(12), 2804–2812. <https://doi.org/10.1002/ijc.29982>

Inge, L. J., Barwe, S. P., D'Ambrosio, J., Gopal, J., Lu, K., Ryazantsev, S., Rajasekaran, S. A., & Rajasekaran, A. K. (2011). Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor. *Experimental Cell Research*, 317(6), 838–848.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.025>

Kim, L. C., Cook, R. S., & Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36(16), 2191–2201. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>

Koirala, P., Huang, J., Ho, T. T., Wu, F., Ding, X., & Mo, Y. Y. (2017). LncRNA AK023948 is a positive regulator of AKT. *Nature Communications*, 8(May 2016), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/ncomms14422>

Laukoetter, M. G., Nava, P., & Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(3), 401–407.

<https://doi.org/10.3748/wjg.14.401>

Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., Wang, S., Park, P. K.,

- Marks, J. R., Zhou, Y., Zhou, J., Hung, M. C., Liang, H., Hu, Z., Shen, H., ... Yang, L. (2017). The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nature Cell Biology*, *19*(3), 238–251. <https://doi.org/10.1038/ncb3473>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(4), 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
- Lone, M. U. D., Miyan, J., Asif, M., Malik, S. A., Dubey, P., Singh, V., Singh, K., Mitra, K., Pandey, D., Haq, W., Amita, H., Singh, P. K., Kiess, W., Kaessner, F., Garten, A., & Bhadauria, S. (2019). Direct physical interaction of active Ras with mSIN1 regulates mTORC2 signaling. *BMC Cancer*, *19*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6422-6>
- Luissint, A. C., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2016). Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte–Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair. *Gastroenterology*, *151*(4), 616–632. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.008>
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., & Gumucio, D. L. (2002). Cis Elements of the Villin Gene Control Expression in Restricted Domains of the Vertical (Crypt) and Horizontal (Duodenum, Cecum) Axes of the Intestine. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(36), 33275–33283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204935200>
- Magee, J. A., Ikenoue, T., Nakada, D., Lee, J. Y., Guan, K. L., & Morrison, S. J. (2012). Temporal changes in PTEN and mTORC2 regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia suppression. *Cell Stem Cell*, *11*(3), 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.026>
- Mahe, M. M., Sundaram, N., Watson, C. L., Shroyer, N. F., & Helmrath, M. A. (2015). Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*(97), 1–13. <https://doi.org/10.3791/52483>
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, *474*(7351), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>
- Martinez Calejman, C., Trefely, S., Entwisle, S. W., Luciano, A., Jung, S. M., Hsiao, W., Torres, A., Hung, C. M., Li, H., Snyder, N. W., Villén, J., Wellen, K. E., & Guertin, D. A. (2020). mTORC2-AKT signaling to ATP-citrate lyase drives brown adipogenesis and de novo lipogenesis. *Nature*

Communications, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14430-w>

- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
- Ohtsu, H., Dempsey, P. J., & Eguchi, S. (2006). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00620.2005>
- Pencik, J., Thi, H., Pham, T., Schmoellerl, J., & Javaheri, T. (2018). JAK-STAT signaling in cancer : From cytokines to non-coding genome. *Cytokine*, 87, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.017>.JAK-STAT
- Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4 APR(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402(6764), 884–888. <https://doi.org/10.1038/47260>
- Rosner, M., & Hengstschläger, M. (2008). Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: Rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Human Molecular Genetics*, 17(19), 2934–2948. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn192>
- 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>
- Schindler, C., Levy, D. E., & Decker, T. (2007). JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20059–20063. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700016200>
- Sharma, V. R., Gupta, G. K., Sharma, A. K., Batra, N., Sharma, D. K., Joshi, A., & Sharma, A. K. (2017). PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. *Current Pharmaceutical Design*, 23(11), 1633–1638. <https://doi.org/10.2174/1381612823666161116125218>

- Shea, J. J. O., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT Pathway : Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annual Review of Medicine*, 66:1, 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Siess, K. M., & Leonard, T. A. (2019). *Lipid-dependent Akt-ivity : where , when , and how*. 0, 897–908.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Un, S., Seon, S., Woo, M., Sang, H. L., Kim, H., Taeg, K. M., & Kwon, K. (2018). mTORC1 / 2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy. *Oncogene*, 5205–5220. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0345-6>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 11(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Villarino, A. V., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2017). Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nature Immunology*, 18(4), 374–384. <https://doi.org/10.1038/ni.3691>
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., & Zhou, X. (2020). The role of JAK / STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*, 80(October 2019), 106210. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106210>
- Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., & Benveniste, E. N. (2018). Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical Immunology*, 189, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.014>
- Zhou, J., Wu, L., Li, W., Xu, X., Ju, F., Yu, S., Guo, J., Li, G., Shi, J., & Zhou, S. (2020). Long noncoding RNA LINC01485 promotes tumor growth and migration via inhibiting EGFR ubiquitination and activating EGFR/Akt signaling in gastric cancer. *OncoTargets and Therapy*, 13, 8413–8425. <https://doi.org/10.2147/OTT.S257151>