

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**La necroptosis dependiente de mTOR que es inducida  
por el IFN- $\gamma$  en las células de Paneth y Paneth-like  
estimula la proliferación en las células epiteliales  
intestinales.**

**T E S I S**

Que presenta

**M. EN C. MARÍA DEL ROCÍO ENCARNACIÓN GARCÍA**

**Para obtener el grado de  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la tesis:

**Dr. Porfirio Nava Domínguez.**

## **Dedicatoria**

Para mis abuelos

Para mi mamá y papá

Para mis bellas hermanas

Para mí.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi profunda gratitud al Dr. Porfirio Nava Domínguez, mi director de tesis, por su orientación experta, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso de investigación. Sus consejos y comentarios han sido y serán invaluable no solo para el desarrollo de este trabajo sino para mi desarrollo profesional.

También deseo agradecer a la Dra. Lilia G. Noriega López por sus valiosas sugerencias y contribuciones que han enriquecido enormemente este proyecto. Su experiencia y visión han sido de gran ayuda en cada etapa del proceso.

Quiero agradecer al Conahcyt y al Cinvestav por proporcionar los recursos y el ambiente propicio para llevar a cabo este proyecto. Asimismo, quiero agradecer a mis asesores de tesis por su apoyo, que ha sido fundamental para mi desarrollo académico.

Agradezco a la M. en C. Aurora Antonia Candelario Martínez y a la Lic. Norma Trejo Estrada por el apoyo técnico prestado durante la realización de este proyecto.

Agradezco sinceramente a todos los colaboradores cuya contribución fue fundamental para la realización de esta investigación.

Agradezco especialmente a mi familia por su amor incondicional, comprensión y apoyo inquebrantable. Son mi inspiración, mi lugar seguro, mi ejemplo a seguir y mi amor verdadero.

A mis amigos Mine Araiza, Nacho Cerda, César Navarro, Rox Romero, Lore Rosas, Gera Guerrero, Rubí Pérez, Jyostna Falcón, Natalia Camargo, Bere Barrón, Gaby Ramos, Karen Tapia, Rulo de la Torre, Dany Diaz, Felipe Castro y Rocio Pérez quiero expresarles mi profunda gratitud por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional y por entender mis ausencias y distracciones durante este tiempo. Su amistad ha sido una fuente constante de alegría y consuelo, y no podría haber llegado hasta aquí sin ustedes.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a los ratones utilizados en este estudio, cuyo sacrificio fue esencial para la realización de los experimentos. Su contribución no pasará desapercibida y será recordada con respeto y gratitud.

Sin el apoyo de todos los anteriores, este trabajo no habría sido posible.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
Homeostasis del epitelio intestinal	9
Regulación de la homeostasis intestinal: el papel de las células de Paneth y Paneth-like.	11
Regulación de la secreción de las células de Paneth	13
El Interferón gamma.	14
Efectos del IFN- $\gamma$ sobre las células epiteliales intestinales	15
Vía de señalización mTOR y su papel en la regulación de las CEI	16
Necroptosis en el epitelio intestinal	19
Necroptosis durante patologías que afectan la homeostasis intestinal: el caso de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)	20
<b>Justificación</b>	<b>21</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
Objetivo general	21
Objetivos particulares	22
<b>Material y métodos</b>	<b>22</b>
Anticuerpos y reactivos	22
Modelo experimental para evaluar el efecto del IFN- $\gamma$ sobre la proliferación y muerte del epitelio intestinal	23
Aislamiento de criptas intestinales	23
Generación de organoides intestinales	23
Western blot	24
Ensayo de cuantificación de citoquinas	24
Inmunofluorescencia (IF) y detección de Especies reactivas de oxígeno	24
Análisis de apoptosis, necroptosis y proliferación celular	25
Evaluación de la citoarquitectura de la base de la cripta intestinal (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ)	25
Citometría de flujo	25

PCR en tiempo real	26
Análisis bioenergético en mitocondrias aisladas	26
Análisis estadístico	27
<b>Resultados</b>	<b>27</b>
IFN- $\gamma$ se produce y se secreta constitutivamente en el intestino delgado	27
El IFN- $\gamma$ estimula la proliferación y la muerte de las CEI dependiente del tiempo	30
La proliferación de CEI mediada por IFN- $\gamma$ parece ser independiente de la $\beta$ -catenina	33
IFN- $\gamma$ aumenta la actividad mitocondrial, la producción de ROS y la señalización de mTORC1 en la mucosa intestinal	36
El IFN- $\gamma$ aumenta la IECP a través de mTORC1	40
El IFN- $\gamma$ estimula la secreción de células de Paneth.	42
La necroptosis mediada por mTORC1 estimula la secreción de células de Paneth.	45
El IFN- $\gamma$ estimula la biogénesis de las CP y modula la homeostasis del intestino delgado.	49
<b>Discusión</b>	<b>51</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>55</b>
<b>Conclusión</b>	<b>55</b>
<b>Referencias</b>	<b>55</b>
<b>Anexos</b>	<b>68</b>
<b>Figuras suplementarias</b>	<b>72</b>

## Resumen

Los mediadores inmunitarios afectan múltiples funciones biológicas de las células epiteliales intestinales (CEI) y, en conjunto con que las células de Paneth y Paneth-like, desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal. El IFN- $\gamma$  es una citocina proinflamatoria prototipo que altera la homeostasis epitelial intestinal. Sin embargo, el mecanismo subyacente a este proceso sigue siendo desconocido. En este estudio, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, demostramos que el IFN- $\gamma$  se secreta espontáneamente en el intestino delgado. Además, hemos observado que esta citocina promueve la secreción de componentes citoplásmicos en células de Paneth y Paneth-like, lo que induce un aumento en la proliferación de las CEI, culminando en la expansión de las células troncales que expresan OLFM4. La secreción de los gránulos de las células de Paneth y Paneth-like río abajo del IFN- $\gamma$ , como se identifica aquí, depende de mTORC1 y de la inducción de necroptosis. Por lo tanto, nuestros hallazgos han revelado que las funciones pleiotrópicas del IFN- $\gamma$  también abarcan la regulación de las células troncales en la mucosa intestinal. Este proceso se lleva a cabo mediante la estimulación de la secreción de las células de Paneth y Paneth-like en el epitelio intestinal y ocurre en condiciones basales.

## **Abstract**

Immune mediators affect multiple biological functions of intestinal epithelial cells (IECs) and, like Paneth and Paneth-like cells, play an important role in intestinal epithelial homeostasis. IFN- $\gamma$  a prototypical proinflammatory cytokine disrupts intestinal epithelial homeostasis. However, the mechanism underlying the process remains unknown. In this study, using *in vivo* and *in vitro* models we demonstrate that IFN- $\gamma$  is spontaneously secreted in the small intestine. Furthermore, we observed that this cytokine stimulates mitochondrial activity, ROS production, Paneth and Paneth-like cells secretion, IEC proliferation and OLFM4 stem cell biogenesis. Paneth and Paneth-like secretion downstream of IFN- $\gamma$ , as identified here, is mTORC1 and necroptosis-dependent. Thus, our findings revealed that the pleiotropic function of IFN- $\gamma$  also includes the regulation of stemness and Paneth cell function in the homeostatic gut.

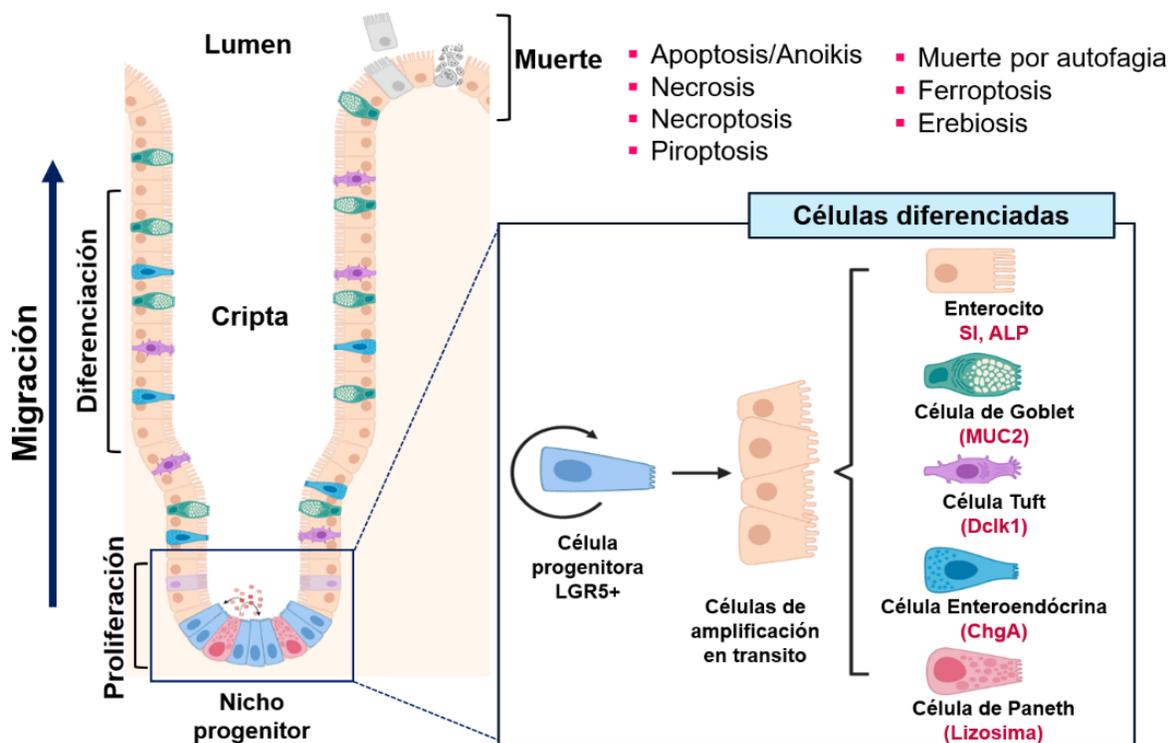
## **Introducción**

### **Homeostasis del epitelio intestinal**

El intestino es un órgano hueco que está revestido por una barrera física conformada por una capa de moco, un epitelio columnar simple y la lámina propia donde las células inmunes residen. Dicha barrera tiene varias funciones entre las que se incluyen: 1) la absorción de nutrientes, iones y agua; 2) separar el medio externo del intersticio; y 3) contribuir al establecimiento/mantenimiento de la tolerancia inmunológica (1,2). El efector central de dicha estructura es el epitelio intestinal, el cual está formado por una capa continua de células epiteliales intestinales (CEI) altamente especializadas que se unen fuertemente entre sí y que recubre el lumen intestinal (1,3). Dicha capa de células epiteliales se organiza a lo largo del tracto intestinal en estructuras únicas, así, en el intestino delgado se forman vellosidades y criptas intestinales, mientras que en el intestino grueso solo observamos criptas pronunciadas.

Para el tenor de este trabajo debemos considerar que el epitelio intestinal es una estructura que está en homeostasis, lo que implica que el número de CEI que lo conforman se mantiene constante. Por ello las células epiteliales intestinales que se dañan en la superficie por acción del ambiente tan severo que existe en el lumen intestinal deben ser reemplazadas por células jóvenes nuevas recién generadas (3,4). Es decir, es necesario que el mismo número de células que mueren sea el mismo número de células que se generen de novo. En dicho proceso la principal función biológica asociada a la cripta intestinal es indispensable. Brevemente, la cripta intestinal es una invaginación del epitelio en cuya porción más basal se encuentra confinado el nicho progenitor intestinal, sitio donde residen las células progenitoras intestinales (CPI). Dichas células son esenciales para mantener constante el número de CEI en todo el intestino ya que son las células que al dividirse dan origen a todos los linajes celulares intestinales (3,5–7). Se ha postulado que las CPI se replican constantemente de forma asimétrica dando origen a células progenitoras nuevas cuya finalidad es mantener el nicho progenitor, pero al mismo tiempo dan origen a un grupo de células con alta capacidad replicativa quienes además pueden diferenciarse, y que se denominan células de amplificación

en tránsito (CAT). Las CAT migran hacia arriba en el eje cripta-superficie, y en el proceso, se exponen a estímulos que inducen su diferenciación a los distintos linajes celulares que componen a la cripta. De todos los linajes celulares diferenciados a partir de las CAT solamente las células de Paneth migran en dirección opuesta es decir desde la zona de amplificación en tránsito hasta la base de la cripta que es donde residen junto con las células progenitoras intestinales (8–10). Por todo lo anterior es fácil entender porqué el delicado equilibrio que se establece entre la proliferación, la diferenciación y la muerte de las CEI es el encargado de mantener la homeostasis epitelial intestinal (**Figura 1**).



**Figura 1. Homeostasis del epitelio intestinal.**

Ahora, cuando el balance homeostático se pierde, el flujo de antígenos luminales al intersticio incrementa y se dispara una respuesta inflamatoria que tratará de reparar el tejido dañado (11,12). Sin embargo, en individuos genéticamente susceptibles o sometidos a detonantes higiénico-dietéticos, las reacciones inflamatorias pueden

tornarse excesivas o crónicas, esto provoca un deterioro continuo del epitelio, alteración de equilibrio de la biota intestinal, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteración del metabolismo mitocondrial y una mayor exposición a los antígenos lo que empeora aún más la inflamación (13–16). En conjunto, estos procesos pueden contribuir al desarrollo de patología como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (ambas variantes de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)) (12,17–20), la enterocolitis necrosante (21,22), el síndrome de colon irritable (20), entre otras. Por lo tanto, entender los procesos que mantienen y regulan la homeostasis del epitelio intestinal es crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas que nos permitan frenar el daño epitelial y la aparición de patologías que afectan el tracto gastrointestinal.

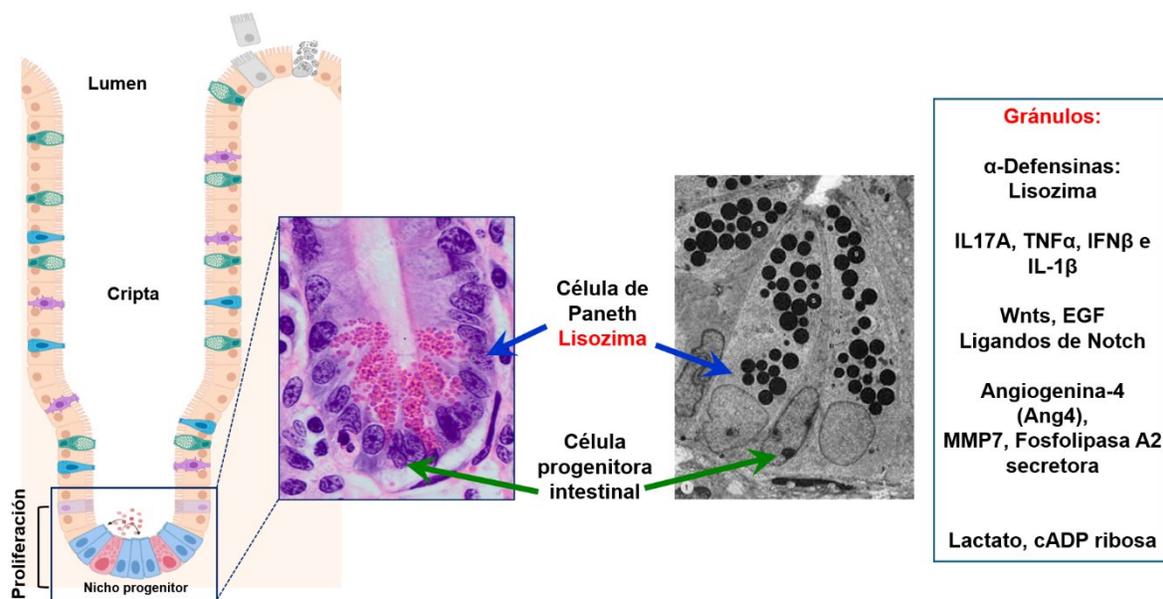
### **Regulación de la homeostasis intestinal: el papel de las células de Paneth y Paneth-like.**

La homeostasis epitelial intestinal es fundamental para mantener la función normal del intestino, por lo tanto, en un epitelio sano es imperativo mantener un absoluto equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la muerte de las CEI. Así, cualquier alteración en uno de estos procesos debe ser contrarrestada por cambios compensatorios en el/los otro(s). Es importante mencionar que en la mucosa intestinal todos los procesos homeostáticos del epitelio intestinal incluidos la proliferación, la diferenciación y la muerte de las CEI está influenciada por múltiples señales que son liberadas por diversas estirpes celulares presentes en la mucosa intestinal, entre los que se incluyen los fibroblastos de la submucosa, las células del sistema inmunológico presentes en la lámina propia y las CEI del linaje secretor (4,10). Al respecto, un tipo particular de CEI secretoras, las células de Paneth (CP), son células que se consideran piedras angulares de la homeostasis intestinal (8–10,23).

Las CP son CEI localizadas en el nicho progenitor de las criptas del intestino delgado. Estas células poseen cualidades únicas que las distinguen del resto de las CEI, por ejemplo, tienen una vida media mayor al promedio de las otras células epiteliales (~30 días vs ~6 días), poseen múltiples gránulos citosólicos y un sistema de transporte activo hiperactivo (8,23). De hecho, las CP son CEI hipersecretoras

que producen: 1) factores de crecimiento como ligandos Wnt, EGF, y Notch; 2) mediadores inmunológicos tales como: IL17A, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, CD15, ligando CD95 y la prostaglandina E2; 3) metaloproteinasas y otras proteínas como: MMP7, Angiogenina-4 (Ang4); 4) metabolitos como: Lactato, cADP ribosa; y 5) péptidos antimicrobianos como son  $\alpha$ -defensinas (cripdinas, en ratones) las que incluyen a la defensina humana (HD)-5 y -6, lisozima-1, la lectina RegIIIy y fosfolipasa A2 secretora (sPLA2). Dentro de las defensinas, la lisozima-1 es la proteína más abundante de ellas por lo que se considera el marcador clásico de las células de Paneth (9,10,23,24).

Morfológicamente, las CP poseen una forma piramidal con múltiples gránulos acidófilos en el citosol que se encuentran orientados apicalmente. Los gránulos contienen muchas de las proteínas y péptidos que se mencionaron anteriormente y que son secretados al medio externo bajo un estricto control y regulación (10,25) (Figura 2).



**Figura 2. Células de Paneth.**

Se sabe que los componentes liberados/excretados actúan de forma autocrina y paracrina como agentes moduladores de la homeostasis intestinal. Así, por todo lo anteriormente expuesto y considerando el contenido de los gránulos de las células

de Paneth podemos mencionar dos funciones principales de estas células: 1) mantenimiento y regulación de la biota intestinal, mediada por la secreción de defensinas; 2) participación en el control de la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, regulada por la secreción de los factores de crecimiento (10,23).

De notar es el hecho de que, en el tracto gastrointestinal las CP sólo se localizan en el intestino delgado. Sin embargo, en el intestino grueso, una subpoblación de CEI de linaje secretor llamadas células de Paneth-like (CPL) tienen una función análoga a la de las CP en el intestino delgado (26,27). Estas últimas células, son un linaje secretor esencial poco estudiado que poseen algunas características de las células caliciformes intestinales, incluida la expresión de mucina 2 (Muc2) y que producen y secretan ligandos de Notch y EGF. Además, ya se demostró que esta población celular expresa el receptor del factor de células madre tirosin-cinasa c-Kit (28); y a la proteína derivada de los islotes en regeneración 4 (Reg4) (26). Por lo tanto, Reg4 se puede considerar como el marcador específico para las CPL.

Es importante destacar que la ablación dirigida de células lisozima-1+ y/o Reg4+ conduce a la pérdida o disfunción del nicho progenitor en el intestino delgado (SI) e intestino grueso (LI) respectivamente (23,29,30). Este hallazgo, respalda aún más la idea de que estas estirpes celulares actúan como una especie de nodrizas y/o marcapasos para mantener a las células madre intestinales. Por lo tanto, podemos aseverar que la secreción de los mediadores biológicos que son producidos por las CP y CPL es fundamental para el mantenimiento del nicho progenitor y de la homeostasis del epitelio intestinal.

### **Regulación de la secreción de las células de Paneth**

Como mencionamos previamente, la homeostasis intestinal se ve influenciada, en parte, por las funciones desempeñadas por las CP, especialmente la secreción de su contenido intracelular. Al respecto, es bien sabido que el contenido de los gránulos de las CP llega al lumen intestinal mediante un proceso de secreción merocrina donde la membrana de un gránulo individual se fusiona con la membrana apical. Pero, los mecanismos que modulan dicho proceso aún no se comprenden en su totalidad. Múltiples trabajos han dilucidado algunos de los mecanismos

responsables de la exocitosis de los gránulos intracelulares presentes en las CP. Por ejemplo, se ha descrito que el betanecol, un secretagogo muscarínico colinérgico, induce la secreción en las CP (31). También, se ha documentado que la secreción de las CP aumenta en respuesta a la presencia de antígenos bacterianos o bien de agonistas de los receptores tipo Toll-Like -9 (TLR9) y -3 (TLR3). Por otro lado, también es sabido que algunas citocinas como el IFN- $\gamma$  (32), la IL-4, la IL-13 (33) y la IL-17 (34), son desencadenantes de la desgranulación de las CP. Desafortunadamente los principios bioquímicos subyacentes a dichos procesos no se conocen del todo.

### **El Interferón gamma.**

El interferón gamma es una citocina proinflamatoria con efectos pleiotrópicos que incluyen la regulación de la homeostasis tisular, la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias ante patógenos y la inmunovigilancia tumoral. Esta citocina es secretada exclusivamente por células del sistema inmune innato, como las células asesinas naturales (NK) y las células linfoides innatas (ILC), así como por células inmunitarias adaptativas, entre ellas las células T colaboradoras CD4+ de tipo 1 (Th1) y los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) (35,36). En los linfocitos innatos, la producción de interferón gamma es inducida principalmente por las interleucinas 12 (IL-12) e 18 (IL-18), o tras la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y receptores de antígenos. Entre los reguladores negativos de esta citocina se encuentran la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y los glucocorticoides (35).

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), tras su secreción, forma un homodímero que se une a su receptor, el cual es un heterodímero compuesto por dos proteínas transmembrana. Durante la interacción ligando-receptor, se forma un complejo hexamérico que inicia una señalización breve y dinámica mediante la vía JAK/STAT. Esta ruta es crucial para la regulación de la transcripción de una amplia gama de genes y modula distintas funciones biológicas. Brevemente, el receptor de IFN- $\gamma$  es un complejo tetrámero formado por dos subunidades de IFN $\gamma$ R1, que facilitan el acoplamiento del ligando, y dos subunidades de IFN $\gamma$ R2, que participan en la

transducción de la señal (35,37). El dominio intracelular de IFN $\gamma$ R1 posee sitios de unión específicos para la tirosina quinasa Janus (Jak1) y para el factor citosólico latente, transductor de señales y activador de la transcripción (Stat1). La unión del homodímero de IFN-gamma con el complejo tetramérico formado por el receptor provoca la activación de Jak1, lo que conduce a la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplásmico de IFN $\gamma$ R1, facilitando así la unión y activación de STAT1. Posteriormente, el acercamiento de STAT1 a JAK-1 permite que la quinasa fosforee el C-terminal de STAT1, lo que induce su dimerización, permitiendo que el dímero se disocie del receptor y migre al núcleo, donde se asocia con los elementos de respuesta a IFN $\gamma$  (GAS) para estimular la transcripción de genes relacionados (35–37).

La señalización inducida por el IFN- $\gamma$  tiene múltiples efectos y es fundamental en la protección contra infecciones causadas por una variedad de microorganismos. Pero es importante destacar que la respuesta mediada por esta citocina también es crucial en distintos procesos patofisiológicos independientes de patógenos. De hecho, la presencia de IFN- $\gamma$  se ha asociado consistentemente con la patogénesis de varias enfermedades. Así, los efectos proapoptóticos (38–40), antitumorales (36) y antiproliferativos (41) del IFN- $\gamma$  se consideran contribuyentes importantes a la alteración de la homeostasis tisular en ciertas patologías. Consistente con esta idea, se ha reportado un incremento en los niveles de esta citocina en la mucosa de pacientes y modelos animales con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (ambas formas de enfermedad inflamatoria intestinal), enterocolitis necrosante, síndrome del intestino irritable y cáncer colorrectal, entre otros, lo que sugiere una relación directa entre la presencia del IFN- $\gamma$  y las alteraciones en la homeostasis del epitelio intestinal observadas en estas patologías (36,37,39,42–44).

### **Efectos del IFN- $\gamma$ sobre las células epiteliales intestinales**

Como se ha mencionado previamente, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citocina clave en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales, y existe una relación directa entre su presencia y el deterioro de la función de barrera en la mucosa intestinal de estos pacientes (12,45). No obstante, los efectos de esta citocina sobre las células epiteliales intestinales trascienden el debilitamiento de la

barrera epitelial. Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  activa diversas vías de señalización que modulan las uniones estrechas (46), facilitan la translocación bacteriana (47) y regulan la proliferación y apoptosis celular (41). Además, hemos observado que el interferón gamma induce la secreción polarizada de IL-6 por parte de las células epiteliales intestinales (48) y promueve la autofagia mediante la hiperactivación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR (40).

La investigación científica indica que los efectos del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) sobre las células epiteliales intestinales varían según el subtipo celular, la duración de la estimulación y la concentración de la citocina. Farin y colaboradores han demostrado que el IFN- $\gamma$  induce la secreción en las células de Paneth y en las células caliciformes; no obstante, un estímulo excesivo o una exposición prolongada a la citocina resulta en la liberación continua del contenido citosólico y la subsiguiente destrucción de estas células secretoras (32). Además, se ha observado que la exposición prolongada al IFN- $\gamma$  puede provocar la muerte de las células de Paneth mediante un proceso dependiente de las caspasas-3/7 (42), así como por apoptosis, necroptosis y piroptosis (43). Estos hallazgos sugieren que, independientemente del mecanismo de muerte, la exposición prolongada al IFN- $\gamma$  conduce a la pérdida de las CP que son esenciales para el mantenimiento del nicho progenitor.

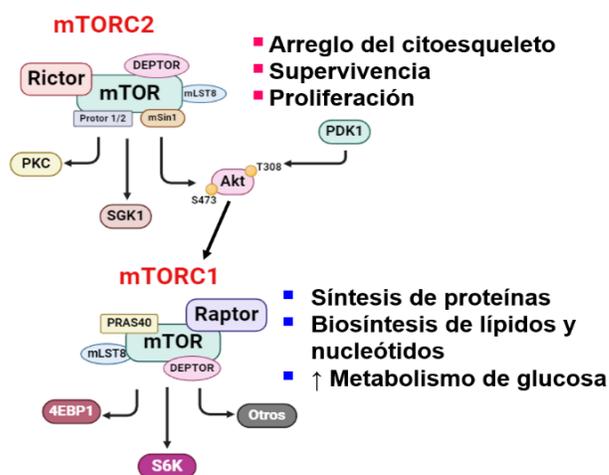
Los hallazgos anteriores evidencian claramente que el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) tiene múltiples efectos biológicos sobre las células epiteliales intestinales (CEI). No obstante, considerando la variedad de efectos observados en contextos patológicos, sostenemos que aún es necesario determinar cuáles son los efectos que el IFN- $\gamma$  ejerce en condiciones basales, si es que existen, y si estos son comparables con los ya descritos en situaciones patológicas.

### **Vía de señalización mTOR y su papel en la regulación de las CEI**

La diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), es una serina/treonina proteína cinasa de 289 kDa perteneciente a la familia de proteínas relacionadas con PI3K. Esta proteína puede formar dos complejos funcionalmente distintos, llamados mTOR complejo 1 (mTORC1) y complejo 2 (mTORC2) (49) (**Figura 3**).

Ambos complejos están integrados por un precomplejo central constituido por: mTOR, la proteína mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) que estabiliza el dominio cinasa de mTOR y DEPTOR (proteína que interactúa con mTOR que contiene el dominio DEP). Si este precomplejo se asocia a la subunidad reguladora Raptor (esencial para la localización subcelular) y PRAS40 (sustrato Akt rico en prolina de 40 kDa) se formará el complejo mTORC1. Por su parte el ensamble del complejo mTORC2 requiere de la proteína de andamio no relacionada Rictor, mSIN1 (proteína 1 que interactúa con MAPK) y PROTOR 1/2 (proteína asociada con rictor 1 o 2) (49,50).

mTORC2 actúa como un regulador citoesquelético a través de la fosforilación de PKC $\alpha$ , un miembro de la familia de proteínas quinasas AGC (PKA/PKG/PKC), aunque la base mecanicista de este proceso no está del todo clara. mTORC2 también colabora con PDK1 para activar otras cinasas de la familia AGC, incluidas varias clases de PKC, la proteína cinasa 1 (SGK1) y activa a la proteína cinasa B (PKB) también llamada Akt a través de su fosforilación en la serina 473, un proceso que es necesario para la activación máxima de la cinasa y que promueve la supervivencia, la proliferación y el crecimiento celular (49,51,52). En los colonocitos, la vía de señalización rictor/mTORC2 es un regulador positivo de supervivencia.



**Figura 3. Vía de señalización mTOR.**

Mecánicamente, mTORC2 activa completamente a Akt, e inhibe la apoptosis de las CEI al fosforilar a Bad (BCL2 (B-cell lymphoma 2) asociado al agonista de muerte celular) lo cual previene la liberación de citocromo C hacia el citoplasma y consecuentemente impide la activación de la Caspasa-3 (53–55). Sin embargo, nosotros hemos observado que durante colitis

inducida por DSS, en los colonocitos superficiales la señalización de Rictor/mTORC2 disminuye, la actividad de Akt se reduce, se activa la caspasa-3 y dichas células entran apoptosis y/o anoikis, lo que contribuye a la pérdida de la continuidad de la barrera epitelial (38).

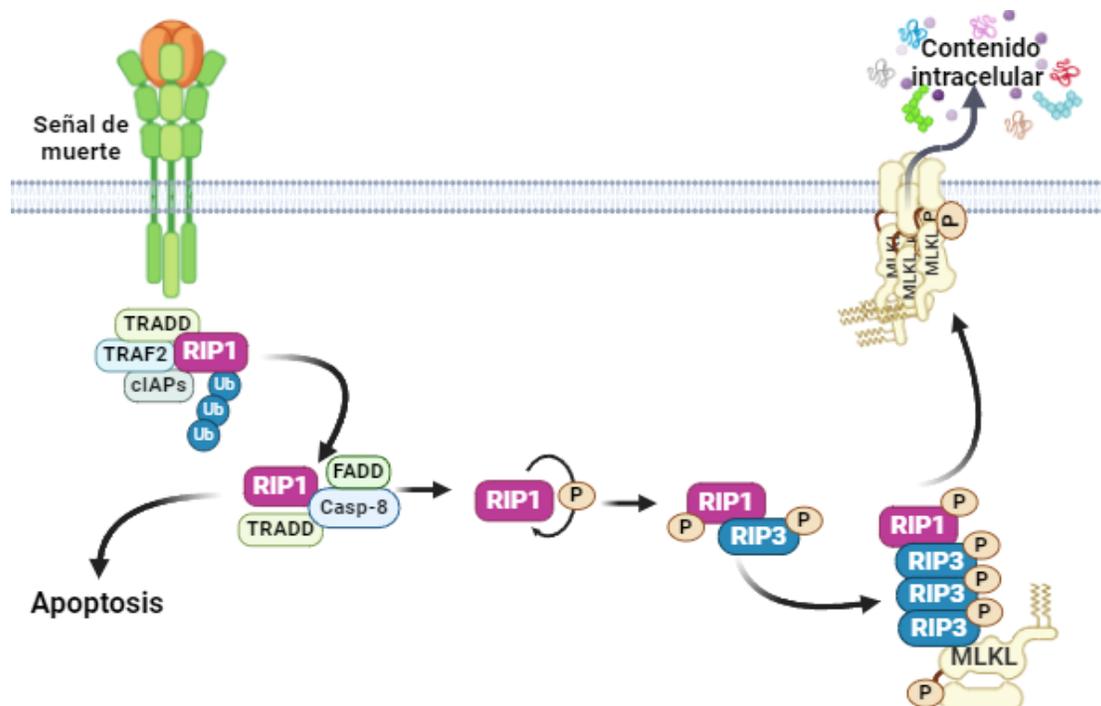
Por otra parte, en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento, energía, aminoácidos y oxígeno, mTORC1 induce la síntesis de proteínas a través del factor de iniciación eucariota 4E (4E-BP) y la cinasa p70 S6 1 (S6K1); asimismo impulsa la síntesis de lípidos lo cual hace a través de la proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1/2 (SREBP1/2) (56). Sin embargo, no son sus únicas funciones ya que cuando mTORC1 se activa también puede estimular la biosíntesis de nucleótidos en las células en proliferación; incrementar la biogénesis mitocondrial al promover la formación del complejo transcripcional yin-yang 1 (YY1)/PGC1 $\alpha$ ; o inhibir la autofagia catabólica (57).

En las CEI, la activación de mTORC1 promovida por la exposición prolongada al IFN- $\gamma$ , inhibe la proliferación y disminuye el daño al DNA (58). Por otro lado, en las CP se ha demostrado que esta citocina altera la integridad mitocondrial y el potencial de membrana, lo que da como resultado un mecanismo de muerte celular dependiente de mTORC1 (59). Además, de manera indirecta, al inhibir la autofagia ejerce control sobre la secreción de proteínas, la producción de péptidos antimicrobianos y la degradación de orgánulos o proteínas aberrantes, mecanismos clave en la fisiología de las CP (56). Recientemente, un informe mostró que la sobre-activación de mTORC1 en el epitelio intestinal mediante la delección de Tsc1 (un inhibidor directo del complejo mTORC1) resulta en un incremento de la muerte por necroptosis en las CEI (60). Además, se debilita la función de barrera del epitelio intestinal y por consiguiente dichos organismos tienen un peor pronóstico durante la colitis inducida por DSS.

Por todo lo anteriormente expuesto, es fácil de entender que existe un vínculo real y directo entre los mecanismos que rigen la homeostasis del epitelio intestinal y el estado de activación de la señalización mediada por mTORC1 y mTORC2.

## Necroptosis en el epitelio intestinal

En el 2005, Degterev y colaboradores describieron por primera vez un proceso de muerte celular programada que es independiente de caspasas, pero dependiente de proteínas cinasas de interacción con el receptor también llamadas proteínas RIP por sus siglas en inglés (Receptor-Interacting Protein kinase-1), a dicho proceso de muerte celular se le denominó necroptosis (61–63). Brevemente, este proceso de muerte ocurre tras la detección de una "señal de muerte" y en ausencia de actividad de caspasa-8, RIP1 se autofosforila, recluta y activa a RIP3, formando un complejo llamado ripoptosoma. El complejo RIP1/RIP3 recluta y fosforila a la proteína similar al dominio de linaje mixto MLKL en los residuos Thr357 y Ser3582, formando el denominado necrosoma. Finalmente, los oligómeros pMLKL se translocan a parches ricos en fosfatidilinositol fosfato (PIP) en la membrana celular y forman poros que permiten la entrada de iones, salida del contenido citosólico al intersticio (DAMPs), edema y lisis celular (64–67) (**Figura 4**).



**Figura 4. Necroptosis**

La liberación del contenido citoplásmico al intersticio provoca la activación de las células del sistema inmunológico residentes, secreción de citocinas y reclutamiento de más componentes del sistema inmunológico, lo que lleva al inicio de la inflamación (66).

Además de pMLKL, otro de los efectores de la necroptosis son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (15,68,69) inducidas por RIP1 y RIP3. Se sabe que RIP1 aumenta la transcripción del coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- $\alpha$ ), lo que conduce al aumento de la actividad mitocondrial con la consecuente formación y liberación de ROS mitocondriales al citosol (15,69). Mientras que, por su parte RIP3 aumenta la glicolisis, el metabolismo del glutamato, así como la actividad del ciclo de Krebs, lo que resulta en hiperactividad mitocondrial que conduce al aumento de la producción de ROS (15).

### **Necroptosis durante patologías que afectan la homeostasis intestinal: el caso de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)**

Aunque diferentes tipos de muerte celular se han vinculado al desarrollo y establecimiento de las EII, se desconoce cuál es la contribución real de cada uno de estos mecanismos a la fisiopatología de estas enfermedades. La importancia de la necroptosis en la patogénesis y evolución de las EII ha quedado de manifiesto recientemente por múltiples hallazgos entre los que se incluyen: 1) la presencia de pRIP3 en células de Paneth vistas en biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn (EC) (70); 2) en muestras provenientes de íleon y colon de niños con EII se observó que la necroptosis contribuye a perpetuar el proceso inflamatorio probablemente porque estimula la inflamación intestinal (71); 3) el análisis de bases de datos de pacientes con EII indicó que existe una correlación directa entre la regulación positiva de genes implicados en la necroptosis y la gravedad de la enfermedad (72,73); 4) la necrosulfonamida (NSA) y la necrostatina-1 (nec-1), dos inhibidores de RIPK1, reducen la inflamación intestinal en un modelo murino de colitis inducida por DSS (73,74); y 5) la presencia de citocinas proinflamatorias en sangre periférica de pacientes con colitis ulcerosa (un tipo de EII) y en ratones con colitis inducida por DSS se reduce tras la administración del inhibidor de RIPK3,

GSK872 (75). Sin embargo, a pesar de la evidencia acumulada, aún se desconoce el papel específico de la necroptosis en la regulación de la homeostasis del epitelio intestinal.

### **Justificación**

La pérdida de la homeostasis del epitelio intestinal se asocia con el desarrollo de diversas patologías gastrointestinales. En el caso de las Enfermedades Inflamatorias Intestinales se sabe que aumenta la muerte y disminuye la proliferación de las células epiteliales intestinales por lo que se pierde la función de barrera del epitelio intestinal. Los mecanismos moleculares implicados en dichos procesos se desconocen.

La necroptosis es un tipo de muerte celular regulado positivamente por mTORC1 y se ha sugerido que es responsable de la muerte de las células de Paneth en pacientes con Enfermedades Inflamatorias Intestinales. Además, el IFN- $\gamma$  induce hiperactivación de la vía PI3K/Akt/mTORC1 en la mucosa colítica.

Sin embargo, el papel que desempeña el eje de señalización PI3K/Akt/mTORC1/necroptosis en el intestino en homeostasis no se ha definido. Así como tampoco se conoce el papel que juega el IFN- $\gamma$  en dicho proceso.

### **Hipótesis**

El IFN- $\gamma$  presente en la mucosa intestinal en homeostasis induce necroptosis dependiente de mTORC1 en las células de Paneth y favorece la degranulación de dichas células.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar si el IFN- $\gamma$  induce necroptosis dependiente del complejo 1 de la diana de rapamicina en mamíferos en las CEI y si este proceso estimula la degranulación de las células de Paneth.

### **Objetivos particulares**

1. Identificar los mediadores inflamatorios que se encuentran en el intestino bajo condiciones basales.
2. Analizar el efecto del IFN- $\gamma$  sobre la proliferación y muerte del epitelio intestinal.
3. Identificar las vías de señalización que regulan positivamente la proliferación de las CEI que son estimuladas con IFN- $\gamma$ .
4. Investigar si el IFN- $\gamma$  induce degranulación de las células de Paneth
5. Identificar el mecanismo por el cual mTORC1 regula la degranulación de las CP  
río abajo del IFN- $\gamma$ .

### **Material y métodos**

#### **Anticuerpos y reactivos**

Los anticuerpos y reactivos se utilizaron acorde a lo sugerido por el fabricante. Akt1 (CST-2938), pAkt (Ser473) (CST-4060), Caspasa 3 activa (Asp175) (CST-9661), Proteína ribosomal p-S6 (S235/236) (CST-4858), Proteína ribosomal S6 (CST-2217), PCNA (CST-13110), p-Histona H3 (Ser10) (CST-9701), RIP (CST-3493), p-MLKL (Ser345) (CST-3733), pLRP6 (CST-2568), LRP6 (CST-2560) y  $\beta$ -catenina no fosforilada (activa) (ABC) (Ser33/37/Thr41) (CST-8814) se adquirieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). RIP3 (ab56164) y lisozima (ab108508) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). La anti-actina de ratón fue amablemente donada por el Dr. Manuel Hernández; Departamento de Biología Celular, CINVESTAV. REG4 (A13129) se adquirieron de ABclonal (Woburn, MA). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP se adquirieron de Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA). El IFN- $\gamma$  recombinante humano y murino se obtuvo de PeproTech (Rocky Hill, Nueva Jersey) y se utilizaron a 100 U/mL para el tratamiento *in vitro* y 2.5  $\mu$ g/kg para el tratamiento *in vivo*. AZD8055 (HY10422) y AZD5363 (HY-15431) se adquirieron de MedChemExpress® (Monmouth Junction, Nueva Jersey). N-Acetil-L-cisteína (A9165), Necrostatina-1

(N9037), Solución de peróxido de hidrógeno (H1009), Everolimus (94687) y Akt VIII (124018) se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).

### **Modelo experimental para evaluar el efecto del IFN- $\gamma$ sobre la proliferación y muerte del epitelio intestinal**

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se aprobaron por la Unidad Institucional de Producción y Experimentación con Animales de Laboratorio (UPEAL, protocolo 0186-16). Se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6J de entre 6-8 semanas de edad los cuales se alojaron en el bioterio del CINVESTAV en condiciones estándar ciclo luz/oscuridad, con libre acceso a alimento y agua. El IFN- $\gamma$  recombinante de ratón se disolvió en albúmina sérica de ratón al 0,002 % (MSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se administró a una concentración de 2,5  $\mu$ g/kg. Como control negativo se administró MSA (vehículo). El MSA y el IFN- $\gamma$  se administraron por vía intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados a las 4 o 18 h posteriores a la inyección, y el colon y el intestino delgado colectados y procesados para RT-PCR, citometría de flujo, aislamiento de criptas para análisis de proteínas de interés por Western blot, medición de ROS, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, H&E y ensayo de actividad mitocondrial.

### **Aislamiento de criptas intestinales**

Se aisló el colon e intestino delgado y se extrajo un segmento de 1-2 cm. La víscera se abrió, se lavó en PBS 1x frío para retirar las heces y se procesaron según la técnica estándar. Las criptas aisladas se lisaron en buffer RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, ácido desoxicólico 0,5%, SDS 0,1%, Tris 50 mM, pH 8,0) para Western Blot (76).

### **Generación de organoides intestinales**

Se generaron organoides intestinales de ratón siguiendo el protocolo establecido (5) que brevemente consiste en el aislamiento de criptas intestinales, las cuales se hacen pasar por múltiples filtraciones que permiten su purificación y posteriormente son sembradas en un domo o cúpula de Matrigel con factores de crecimiento. Dicha matriz permite la expansión y diferenciación de las CPI. Generando estructuras

esferoidales que son denominadas organoides. Los organoides tardan aproximadamente 5-7 días en gemar. Una vez gemados se procedió a realizar los experimentos. A intervalos semanales, los organoides se disociaron mecánicamente y se volvieron a sembrar.

### **Western blot**

Las muestras de mucosa total y criptas aisladas fueron colectadas en solución amortiguadora de RIPA (50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% ácido desoxicólico, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) y fueron homogenizados empleando un homogenizador Benchmark BeadBlaster (Benchmark Scientific; Sayreville, NJ). La concentración de proteína fue determinada empleando el ensayo de cuantificación de la proteína BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Se cargaron 20 µg de proteína en SDS PAGE desnaturizante para Western Blot.

### **Ensayo de cuantificación de citoquinas**

Los explantes intestinales se colocaron en 500 µl de medio estéril (RPMI 10% SFB) por 2 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, o en buffer de disociación (PBS1X/Triton x-100 0.1%). Se centrifugaron a 10.000 gy 4°C durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante. El primero corresponde a las citocinas secretadas constitutivamente mientras que el segundo a las citocinas producidas constitutivamente por el tejido. La concentración de citocinas de los sobrenadantes se midió utilizando Biolegend LEGENDplex (Mouse Inflammation Panel 13-plex, 740446). El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante y se cuantificó usando un citómetro Sysmex XF1600. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el paquete de software de análisis de datos LEGENDplex.

### **Inmunofluorescencia (IF) y detección de Especies reactivas de oxígeno**

Las muestras de colon se criopreservaron en O.C.T. (Sakura Finetekm Torrance, CA) y seccionan (20 µm); se procesaron según el protocolo previamente descrito (77). Para la detección de ROS, se incubaron secciones de tejido de 20 µm de espesor con el kit de ensayo de detección de ROS celular DCFDA 10 µM (Abcam) o el reactivo Green CellROX 5 µM (Life Technologies) durante 30 minutos a 37 °C. Cuando se utilizó el reactivo Green CellROX, el tejido se fijó con formaldehído al 3,7

% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes representativas fueron obtenidas usando el microscopio de barrido láser confocal Leica-TCP-SP8 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) a 20x, 40x y 63x. Se utilizó Fiji-Image J 2.1.0./1.53c (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Bethesda, MD) para analizar las imágenes.

### **Análisis de apoptosis, necroptosis y proliferación celular**

La apoptosis, necroptosis y proliferación se evaluaron analizando la presencia de caspasa 3 activa (ACasp3), RIP3, pHist3, PCNA y la incorporación del análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (Edu) respectivamente. La tinción de IHC (78) e IF (79) se realizó según procedimientos estándar.

### **Evaluación de la citoarquitectura de la base de la cripta intestinal (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ)**

Las muestras de colon se limpiaron y se fijaron en formalina tamponada neutra al 4% (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) durante 12-24 horas y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de parafina (4  $\mu$ m/sección), se desparafinaron y se procesaron para tinción con H&E utilizando técnicas estándar. Posteriormente, se evaluó la morfología de las células de Paneth, se determinó el largo de cripta y vellosidad intestinal.

### **Citometría de flujo**

Se disecó y se lavó el intestino delgado, se retiraron las placas de Peyer y luego se cortó el tejido en trozos de 2 cm de largo. Estas piezas se colocaron en un tubo cónico de 50 mL con 20 mL de 1x solución Hanks. El tejido se agitó a 250 rpm durante 20 min a 37°C, se filtró con un colador de malla 20 de acero inoxidable y se lavó con PBS 1x. El tejido se recogió en un tubo cónico de 50 mL con 20 mL de RPMI. El tejido se cortó finamente. Luego se agregaron 20 mg de Colagenasa I y 10 mg de DNasa I (Sigma), esta mezcla se colocó en una incubadora con agitador orbital (200 rpm) a 37°C durante 20 minutos. La suspensión celular se filtró a través de una malla de 100  $\mu$ m, luego se centrifugó (5 minutos, 1500 rpm) y se lavó una vez con 5 mL de PBS 1x frío. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X suplementado con FBS al 5%. La citometría de flujo se realizó utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: AF700 anti-CD45, BV510 anti-EpCAM, APC anti-Sca-1, APC/Fire 750 anti-CD117 (c-kit), PECy7 anti-CD31, todos de

Biolegend (San Diego, CA). Las células vivas se detectaron utilizando el tinte de viabilidad reparable ViaKrome 808 de Beckman Coulter (Carlsbad, CA). La adquisición de datos se realizó en el citómetro de flujo CytoFLEX LX (Beckman Coulter, Carlsbad, CA) y se analizó utilizando CytExpert v2.4.0.28

### **PCR en tiempo real**

El ARN total se aisló de criptas aisladas de intestino delgado y grueso utilizando el kit Quick-DNA Miniprep Plus (Zymo), de acuerdo con el protocolo del fabricante con digestión con ADNasa en columna. El ADNc se generó utilizando el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen), según el protocolo del fabricante. El ADNc se utilizó como plantilla para la PCR cuantitativa en tiempo real utilizando PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo) y cebadores para Lgr5 (F, TGAGCGGGACCTTGAAGATT; R, AGGTGCTCACAGGGCTTGAA), Olfm4 (F, ATCCACCTATCACTTCAGA; R, GAGCCTCTTCTCATAAC), Lyz (F, ATGGCTACCGTGGTGTCAAG; R, CGGTCTCCACGGTTGTAGTT) y gapdh (F, TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC; R, AAGATGGTGATGGGCTTCCCG). La PCR y el análisis se realizaron utilizando un ciclador AriaMx (Agilent) y la expresión génica se calculó en relación con gapdh.

### **Análisis bioenergético en mitocondrias aisladas**

La respiración mitocondrial se determinó en mitocondrias aisladas del íleon y colon utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96 (Agilent Technologies). Se sacrificaron los ratones y, después de la disección del intestino, se colocaron aproximadamente 40 mg de íleon y colon en un tampón de aislamiento mitocondrial frío (MIB1 210 mM, d-Manitol 70 mM) y se centrifugaron a 800 xg durante 10 minutos a 4 °C. Luego se homogeneizó el tejido usando un Polytron PT 0-35 y se centrifugó a 800 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante recogido se centrifugó a 8000 xg (10 min a 4 °C), y el sedimento que contenía las mitocondrias se lavó tres veces con MIB1 y se resuspendió en Solución de ensayo mitocondrial (MAS1, d-manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 2 mM, EGTA 1 mM, BSA al 0,2%, pH 7,2) con la adición de sustratos (glutamato 10 mM y 5 mM malato). La proteína total se determinó usando el fluorómetro Qubit® 3.0. Se diluyeron 6 µg de mitocondrias aisladas en tampón MAS1 con sustratos y se cargaron por pocillo

en la placa XFe96. Las mitocondrias en placas se centrifugaron a 2000 xg durante 20 min a 4 °C. La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se midió en 7 réplicas técnicas para cada ratón utilizando los siguientes compuestos: ADP (4 mM), oligomicina (2,5 μM), FCCP (3 μM) y antimicina A (1 μM)/rotenona (1 μM). . Se calcularon los cuatro estados de respiración mitocondrial: respiración basal (respiración de las mitocondrias con sustratos, pero sin ADP), producción de ATP o respiración fosforilante (tasa de formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico), fuga de protones o respiración no fosforilante (tasa de consumo de oxígeno mientras la ATP sintasa es inhibida por la oligomicina) y la respiración máxima después de la inyección de FCCP.

### **Análisis estadístico**

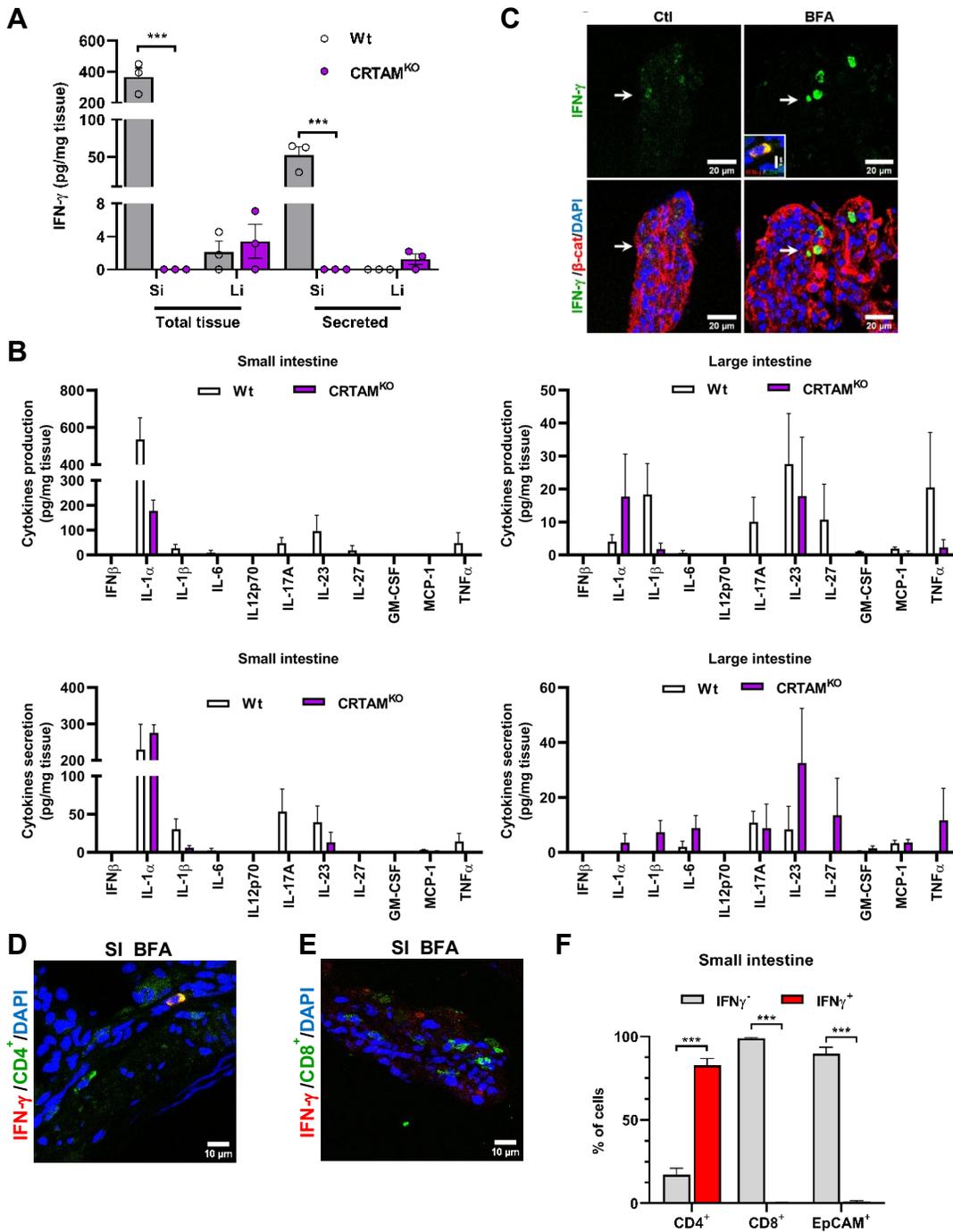
Las especificaciones estadísticas que incluyen: el tamaño de la muestra, las mediciones de precisión y las pruebas estadísticas se proporcionan en los pies de la figura según corresponda. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de: ns= no significativo, \*p <0.05; \*\* p <0.01 y \*\*\* p <0.001. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

### **Resultados**

#### **IFN-γ se produce y se secreta constitutivamente en el intestino delgado**

Los mediadores inmunológicos son reguladores importantes que controlan la homeostasis del epitelio intestinal. Sin embargo, su expresión en la mucosa intestinal durante condiciones basales no se ha evaluado adecuadamente. Por ello, investigamos la producción y secreción de diversas citocinas tales como: CCL2 (MCP-1), GM-CSF, IFN-γ, IFN-β, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-17A, IL-23, IL-27 y TNF-α en el intestino de ratones C57BL/6J. Inesperadamente, observamos que los ratones Wt normales produjeron ~100 veces más IFN-γ en el intestino delgado (SI, small intestine) en comparación con el intestino grueso (LI, large intestine), además de que la citoquina se secretó constitutivamente en el SI (**Figura 5A**). También observamos que otras citocinas incluidas IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-27 y TNF-α, se produjeron y secretaron diferencialmente tanto en el

colon (LI) como en el intestino delgado (SI) de ratones Wt (**Figura 5B**). Sin embargo, fue la producción y secreción del IFN- $\gamma$  la que llamó nuestra atención, porque hasta donde se conoce en el intestino existen múltiples poblaciones celulares que pueden producir la gran variedad de citoquinas que observamos en la mucosa excepto el IFN- $\gamma$  ya que este solo se produce por células inmunes. Así, decidimos validar nuestros hallazgos y para ello analizamos la producción y secreción de CCL2 (MCP-1), GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-17A, IL-23, IL-27 y TNF- $\alpha$  en ratones transgénicos con deficiencia de la molécula asociada a células T restringida a clase I intestinal o también llamada CRTAM (CIRTAMKO), por sus siglas en inglés. Dichos ratones carecen de IFN- $\gamma$  en las mucosas ya que tienen células T no funcionales (80,81). En disposición con lo anteriormente publicado, el IFN- $\gamma$  fue indetectable en el SI de CRTAMKO, validando nuestro ensayo y nuestros hallazgos anteriores. Sin embargo, y sorprendentemente, se detectó la presencia de IFN- $\gamma$  en el colon de CRTAMKO, lo que indica que la producción de IFN- $\gamma$  en la mucosa del colon pudo ser originada por otra estirpe celular diferente a las células T (**Figura 5B**). También se detectaron otras citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-27 y TNF- $\alpha$  en la mucosa intestinal de animales CRTAMKO, indicando lo que ya habíamos propuesto que múltiples linajes celulares de la mucosa intestinal pueden producir citocinas. Debido a estos resultados, procedimos a confirmar si los linfocitos T del SI realmente producían IFN- $\gamma$ . Para este fin, se disecaron intestinos de animales Wt, se colocaron en medio con Brefeldina A (un inhibidor de elección de la secreción de proteínas (82)). Posteriormente, se enrolló el tejido y se procesó para IF. El análisis de tinción por inmunofluorescencia reveló que las células inmunes intraepiteliales son las principales productoras de IFN- $\gamma$  en el SI (**Figura 5C**). Una evaluación adicional mediante citometría de flujo evidenció que, efectivamente, las células T CD4+ son la principal fuente que produce y secreta de forma constitutiva el IFN- $\gamma$  en el SI (**Figura 5D-E**). Por lo tanto, en conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el IFN- $\gamma$  es producido y secretado constitutivamente por las células T CD4+ presentes en el SI.



**Figura 5. El  $IFN-\gamma$  se secreta constitutivamente en el intestino delgado.**

Se realizó la cuantificación de  $IFN-\gamma$  (A),  $IFN\beta$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL12p70$ ,  $IL-17A$ ,  $IL-23$ ,  $IL-27$ , GM-CSF, MCP-1 y  $TNF\alpha$  (B) en intestino delgado (SI) y grueso (LI) de ratones Wt y  $CRTAM^{KO}$ . Se analizó la presencia de citocinas en la mucosa completa (producción constitutiva de citocinas) o en los medios de cultivo RPMI 10% de la mucosa no estimulada (secreción constitutiva de citocinas).

Ambos sobrenadantes se analizaron usando un ensayo Biolegend LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Cat. No. 740446). Se evaluaron 3 animales diferentes.

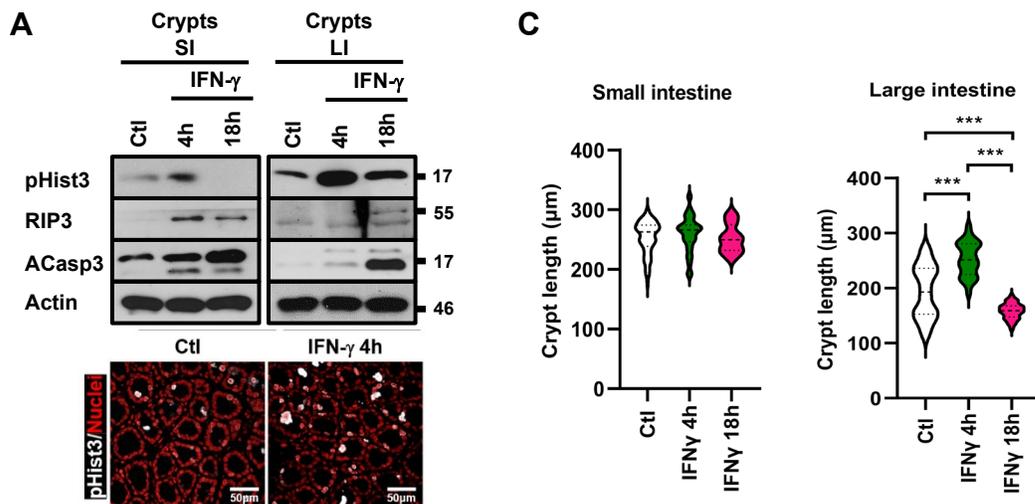
- C) Inmunofluorescencia (IF) de IFN- $\gamma$  (verde) y  $\beta$ -catenina (rojo) en SI de ratones Wt. Se tiñeron criosecciones de 20  $\mu$ m de explantes control y tratados con Brefeldin A (BFA). El tratamiento con BFA se llevó a cabo durante 3 horas. Núcleos=azul. Flecha = células inmunes intraepiteliales positivas. Barra=20 $\mu$ m. Se evaluaron 3 animales diferentes y se muestra una imagen representativa.
- D) IF para IFN- $\gamma$  (rojo) y CD4+ (verde) (**D**) o IFN- $\gamma$  (rojo) y CD8+ (verde) (**E**) en criosecciones de SI. El tratamiento con BFA se llevó a cabo durante 3 h. Núcleos=azul. Punta de flecha = célula positiva CD4+, Flecha = célula doble positiva. Barra=10 $\mu$ m. Se evaluaron 3 animales diferentes y se muestra una imagen representativa.
- F) Identificación por citometría de flujo de células IFN- $\gamma$ + en preparaciones obtenidas a partir del íleon de ratones C57BL/6J. Los valores representan el porcentaje medio de eventos que se encuentran dentro de sus respectivos cuadrantes. SI se obtuvo de ratones no tratados. n=4.

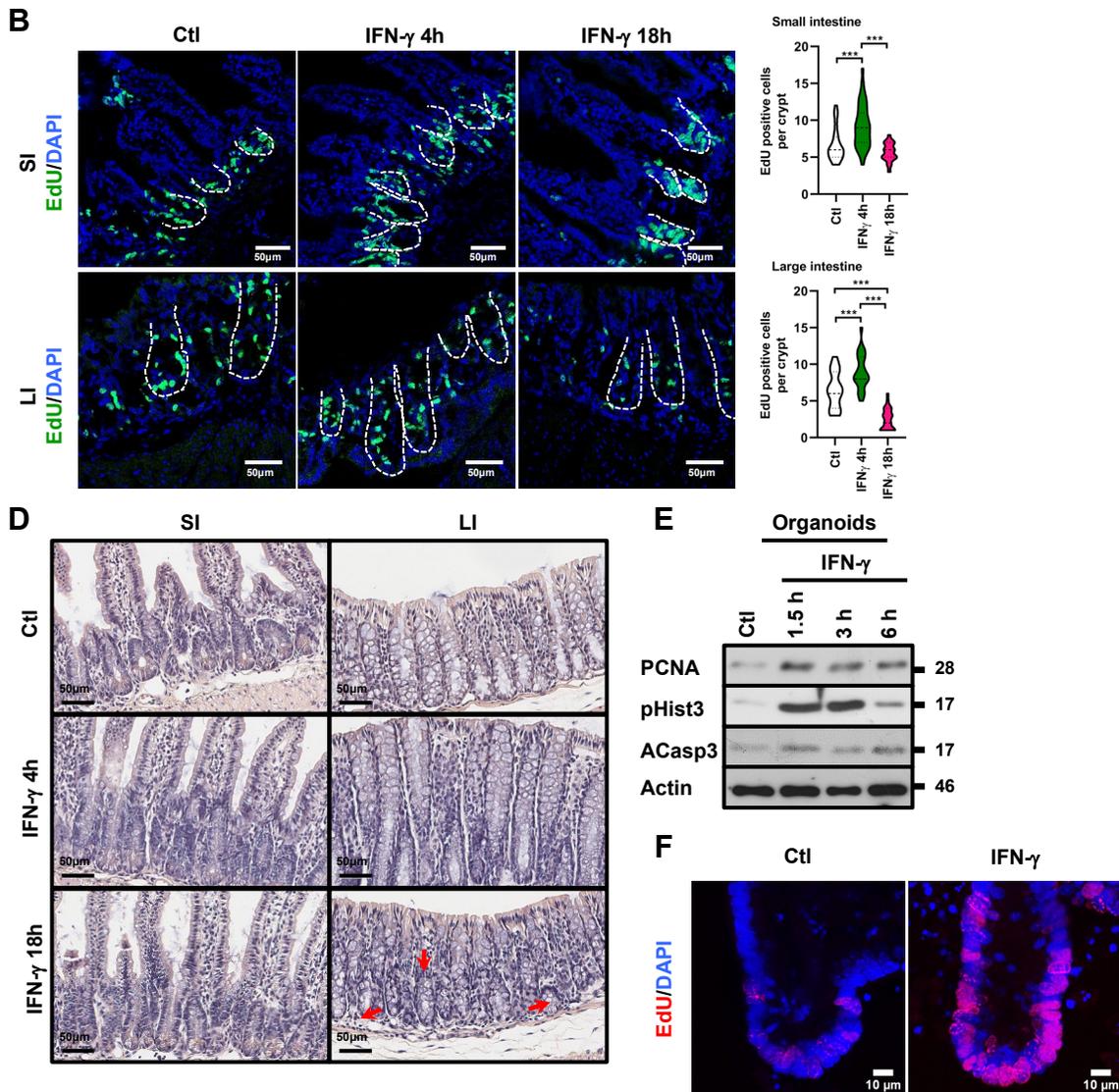
Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de p se calcularon mediante análisis de t de student (A, B), análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba post hoc de Tukey (E) o anova bidireccional con la prueba post hoc de Sidak (F) \*\*\*p < 0,001.

### **El IFN- $\gamma$ estimula la proliferación y la muerte de las CEI dependiente del tiempo**

Durante procesos inflamatorios intestinales, el IFN- $\gamma$  inhibe la proliferación de células epiteliales intestinales (IECP) mientras estimula la muerte de las células epiteliales intestinales (IECD) a tiempos tardíos (41). Por lo tanto, considerando la producción y secreción diferencial de IFN- $\gamma$  observada previamente, decidimos investigar el efecto de la citocina sobre la homeostasis de las CEI. Para ello tomamos ventaja de un método confiable y controlable para analizar los efectos pleiotrópicos de la citocina en el tracto gastrointestinal el cual ha sido implementado en nuestro laboratorio, la administración intraperitoneal de IFN- $\gamma$  (38,41,58). Para evaluar los efectos tempranos y tardíos que ejerce el IFN- $\gamma$  sobre la homeostasis del epitelio intestinal consideramos la IECP y la IECD en el intestino de ratones expuestos a la citocina durante 4 y 18 horas. Es importante mencionar que encontramos que una sola dosis de la citocina administrada por vía IP produjo

respuestas similares en el colon y en el SI. Los efectos que observamos fueron los siguientes, después de 18 h de administración de IFN- $\gamma$  se encontró que existe una marcada reducción de la IECP, un acortamiento de la longitud de las criptas y un evidente colapso de la luz de las criptas intestinales (**Figura 6A-D**). Sin embargo, a 4 h de tratamiento con IFN- $\gamma$  se estimularon la IECP y agrandaron las criptas del colon sin inducir modificaciones citoarquitectónicas claras en el tejido. En este periodo solo se observaron cambios mínimos en la citoarquitectura de las criptas y vellosidades del SI (**Figura 6A-D**). Es importante destacar que la apoptosis y la necroptosis aumentaron, gradual y sostenidamente, principalmente en las CEI de la mucosa superficial después de la estimulación con IFN- $\gamma$  (**Figura 6A**). Dado que la inducción en la IECP mediada por el tratamiento con IFN- $\gamma$  fue inesperada, validamos nuestros hallazgos utilizando un modelo *in vitro* de organoides. Como se muestra en las **Figuras 6E y F**, el tratamiento con IFN- $\gamma$  estimuló eficientemente la proliferación celular en los enteroides, como lo muestra el aumento en PCNA y pHist3, así como el incremento en la incorporación EdU en el núcleo, lo que corrobora nuestros hallazgos *in vivo*. Como era de esperarse por datos reportados previamente (83), el tratamiento con IFN- $\gamma$  también desencadenó la activación de caspasa-3 en los organoides. Así que, en conjunto, nuestros resultados sugieren que el IFN- $\gamma$  influye positivamente en la IECP y la IECD y que esto ocurre con una temporalidad distinta.





**Figura 6. El IFN- $\gamma$  induce la proliferación y muerte de las células epiteliales intestinales dependiente del tiempo.**

- A)** Panel superior: pHist3, RIP3 y ACasp3 se evaluaron mediante Western Blot (Wb) de criptas aisladas de SI y LI obtenidas de ratones C57BL/6J inyectados intraperitonealmente (i.p.) con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg). Los ratones fueron sacrificados 4 o 18 h después de la inyección. Actina se usó como control de carga. Panel inferior: tinción de inmunofluorescencia (IF) para pHist3 (blanco) en criosecciones de LI de ratones control y tratados con IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citocina. Núcleos=rojo. Barra=50 $\mu$ m. Se evaluaron 6 animales diferentes y se muestran imágenes representativas.
- B)** La incorporación de EdU (verde) en CEI se analizó mediante microscopía confocal en criosecciones de Si y Li de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg).

Los ratones fueron sacrificados 4 o 18 h después de la inyección. Se muestran imágenes representativas. Núcleos=azul. Una línea blanca discontinua limita la cripta. Barra= 50µm. En los gráficos se muestran las cuantificaciones de las células EdU positivas por cripta.

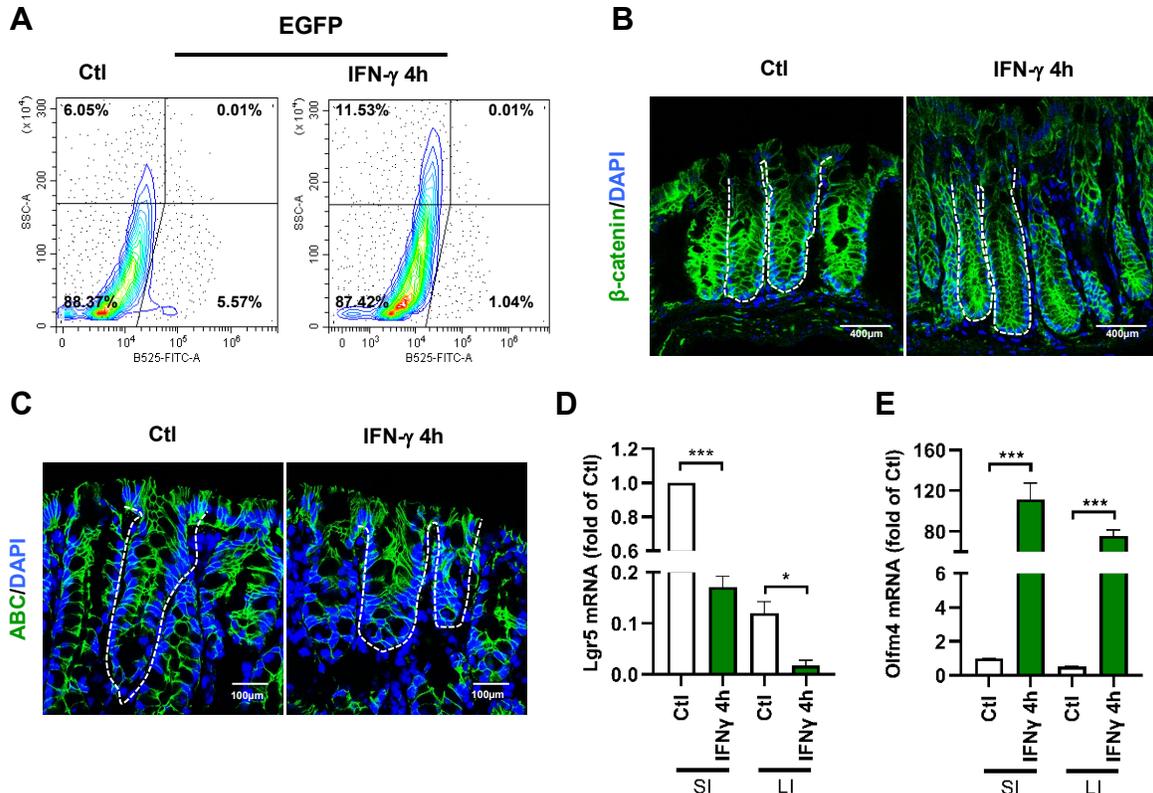
- C) La longitud de la cripta se analizó en SI y LI de ratones inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5 µg/kg). Los ratones fueron sacrificados 4 o 18 h después de la inyección. El gráfico representa un conjunto de 100 criptas analizadas en 6 animales.
- D) Tinción de H&E representativa de la mucosa de Si y Li de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5 µg/kg). Los ratones fueron sacrificados 4 o 18 h después de la inyección. La flecha indica el lumen de una cripta colapsada. Barra= 50 µm. Se muestran imágenes representativas. n=6 animales por grupo.
- E) PCNA, pHist3 y ACasp-3 se evaluaron mediante Wb en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5, 3 y 6 h. Actina se utilizó como control de carga. Wb representativo de n = 3 experimentos independientes.
- F) Ensayo de incorporación de EdU (rojo) en organoides Wt. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. Se muestra imagen representativa. Núcleos=azul. Barra= 10µm.

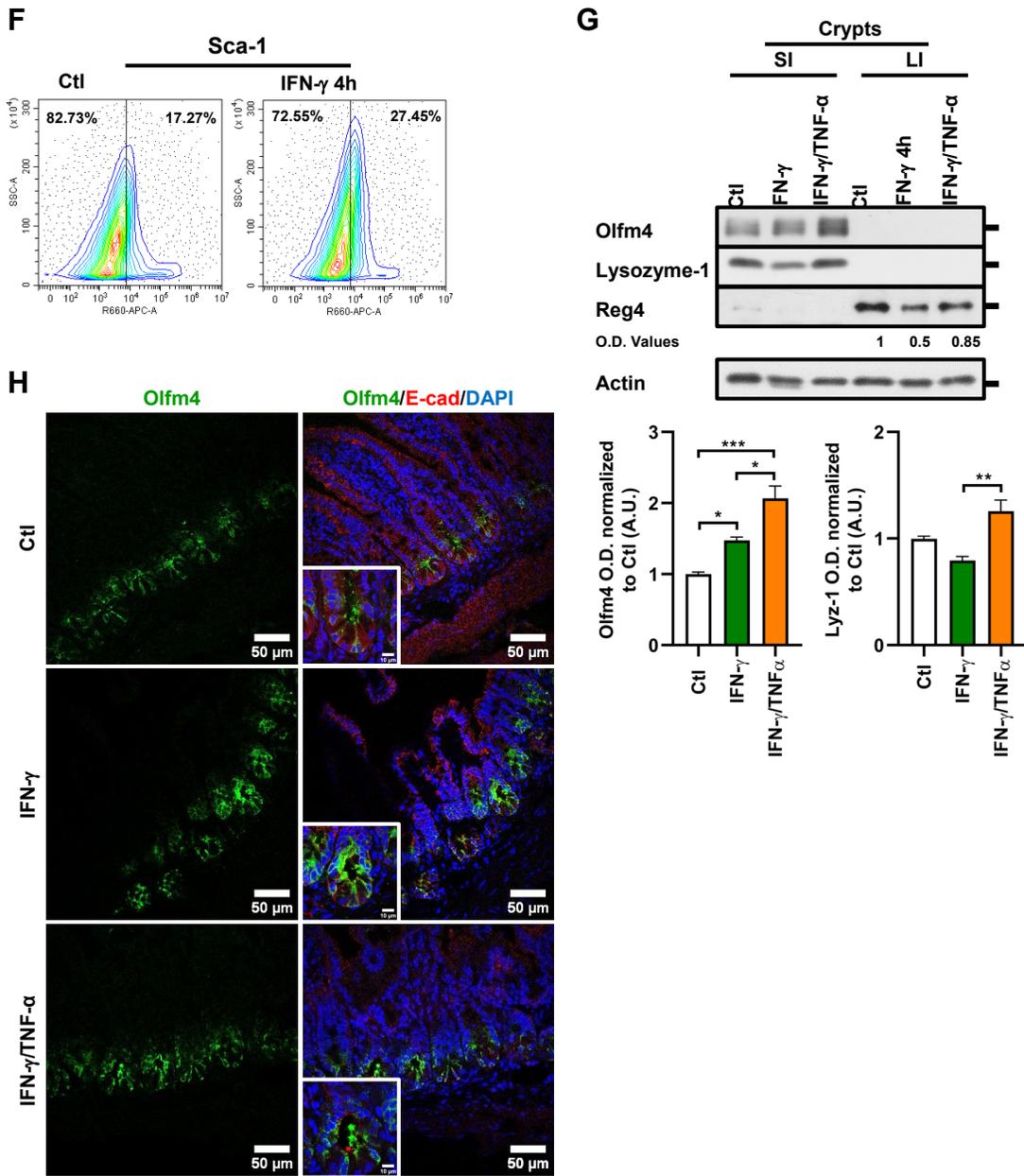
Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey (B, C). \*\*\*p < 0.001.

### **La proliferación de CEI mediada por IFN- $\gamma$ parece ser independiente de la $\beta$ -catenina**

Los efectos nocivos inducidos a largo plazo por IFN- $\gamma$  sobre las CEI han sido ampliamente documentados (39,41,42). Por lo tanto, en este trabajo nos enfocaremos a estudiar la respuesta temprana que estimula la IECP y la cual no ha sido analizada a profundidad. En el intestino, la IECP está impulsada principalmente por la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina (41,84,85). Sin embargo, los resultados obtenidos en el laboratorio mostraron que el tratamiento con IFN- $\gamma$  inhibe rápidamente la señalización de  $\beta$ -catenina en el intestino de ratones reporteros Lgr5-EGFP, como lo indica la disminución de EGFP y la proteína 6 relacionada con el receptor de fosfo-LDL (LRP6) (**Figura 7A y figura suplementaria 1**). Estos cambios ocurrieron sin afectar ni la cantidad ni la localización de  $\beta$ -catenina o de su forma activa ( $\beta$ -catenina activa o ABC) (**Figura 7B-C**). Sin embargo, para nuestra sorpresa, después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , el marcador de células madre Sca-1

(44,58) aumentó en la mucosa intestinal (**Figura 7D**). Dados estos resultados decidimos corroborar estos hallazgos, para ello aislamos criptas tanto de SI como de LI de ratones Wt expuestos a IFN- $\gamma$  y posteriormente analizamos la expresión de dos marcadores de células madre epiteliales intestinales, el ya mencionado Lgr5, que depende de Wnt/ $\beta$ -catenina (85,86), y la proteína Olfactomedina 4 (Olfm4), que es un marcador de células troncales que indica que el sistema es independiente de Wnt/ $\beta$ -catenina (27). Como se muestra en la **Figura 7E-F**, en ambos tejidos, la expresión de Lgr5 se redujo después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , mientras que la expresión de Olfm4 aumentó claramente. Además, por WB e IHC comprobamos que el tratamiento con IFN- $\gamma$  aumenta el número de CEI Olfm4+ en la base de las criptas ileales (**Figura 7G-H**). Es de destacar que la administración de IFN- $\gamma$  no logró aumentar los niveles del gen Olfm4 en las criptas del colon a pesar de que la citocina estimuló la expresión de la proteína en esas células (**Figura 7E y 7G**). Así, nuestros datos sugieren que el IFN- $\gamma$  promueve una fase proliferativa temprana y transitoria que probablemente sea independiente de la  $\beta$ -catenina.





**Figura 7. El tratamiento con IFN- $\gamma$  reduce el número de CEI LGR5+ en la mucosa intestinal.**

**A)** Identificación por citometría de flujo de células EGFP+ en preparaciones de íleon de ratones "knock-in" Lgr5-EGFP-IRES-creERT2. Los valores representan el porcentaje medio de eventos que caen dentro de sus respectivos cuadrantes. Si se obtuvo de ratones tratados i.p. durante 4 h con vehículo (Ctl) o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg).

IF para  $\beta$ -catenina (verde) **(B)** o  $\beta$ -catenina activa (ABC, verde) **(C)** en criosecciones de LI de ratones control y tratados con IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección del IFN- $\gamma$ .

Núcleos=azul. Una línea blanca discontinua rodea la cripta intestinal. Barra = 400  $\mu\text{m}$  (B), 100  $\mu\text{m}$  (C). Se evaluaron 6 animales diferentes y se muestran imágenes representativas.

La expresión de ARNm de Lgr5 (D) y Olfm4 (E) se analizó en SI y LI mediante qPCR. El aislamiento de criptas se llevó a cabo a partir de ratones tratados durante 4h con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i.p. La expresión de Lgr5 y Olfm4 se normalizó con GAPDH. n=3.

- F) Identificación por citometría de flujo de células Sca-1+ en preparaciones de íleon de ratones "knock-in" Lgr5-EGFP-IRES-creERT2. Las células se marcaron con Sca-1-FITC. Los valores representan el porcentaje medio de eventos que caen dentro de sus respectivos cuadrantes, se obtuvo el SI de ratones tratados durante 4 h con vehículo (Ctl) o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
- G) Olfm4, Lizosima-1 y Reg4 se evaluaron mediante Wb de criptas aisladas recolectadas de SI y LI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o IFN- $\gamma$ /TNF $\alpha$  (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección. Actina se utilizó como control de carga. Se muestra una transferencia representativa de n = 3 experimentos independientes. Los gráficos representan un análisis densitométrico para Olfm4 y Lizosima-1.
- H) Olfm4 (verde) y E-cadherina (rojo) se evaluaron mediante inmunofluorescencia en criosecciones obtenidas de SI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o IFN- $\gamma$ /TNF $\alpha$  (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección. Cuadro = aumento de la base de la cripta. Se muestran imágenes representativas. Núcleos=azul. Barra= 50  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ .

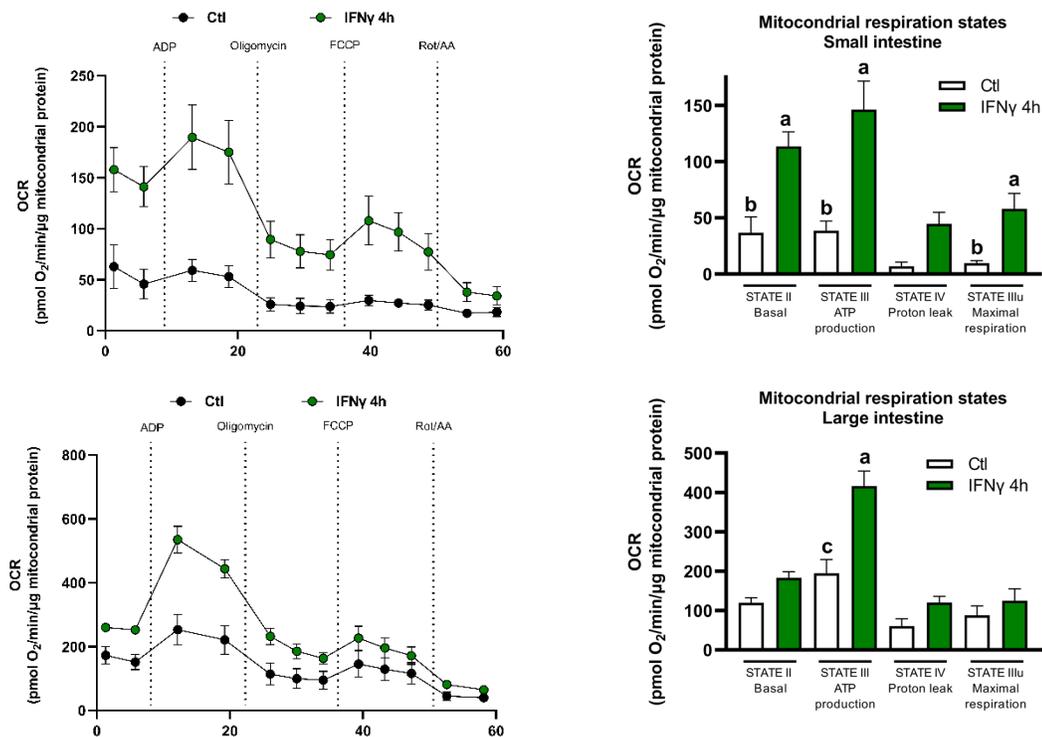
Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante análisis de t de student (D, E) o mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey (G). \*p<0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

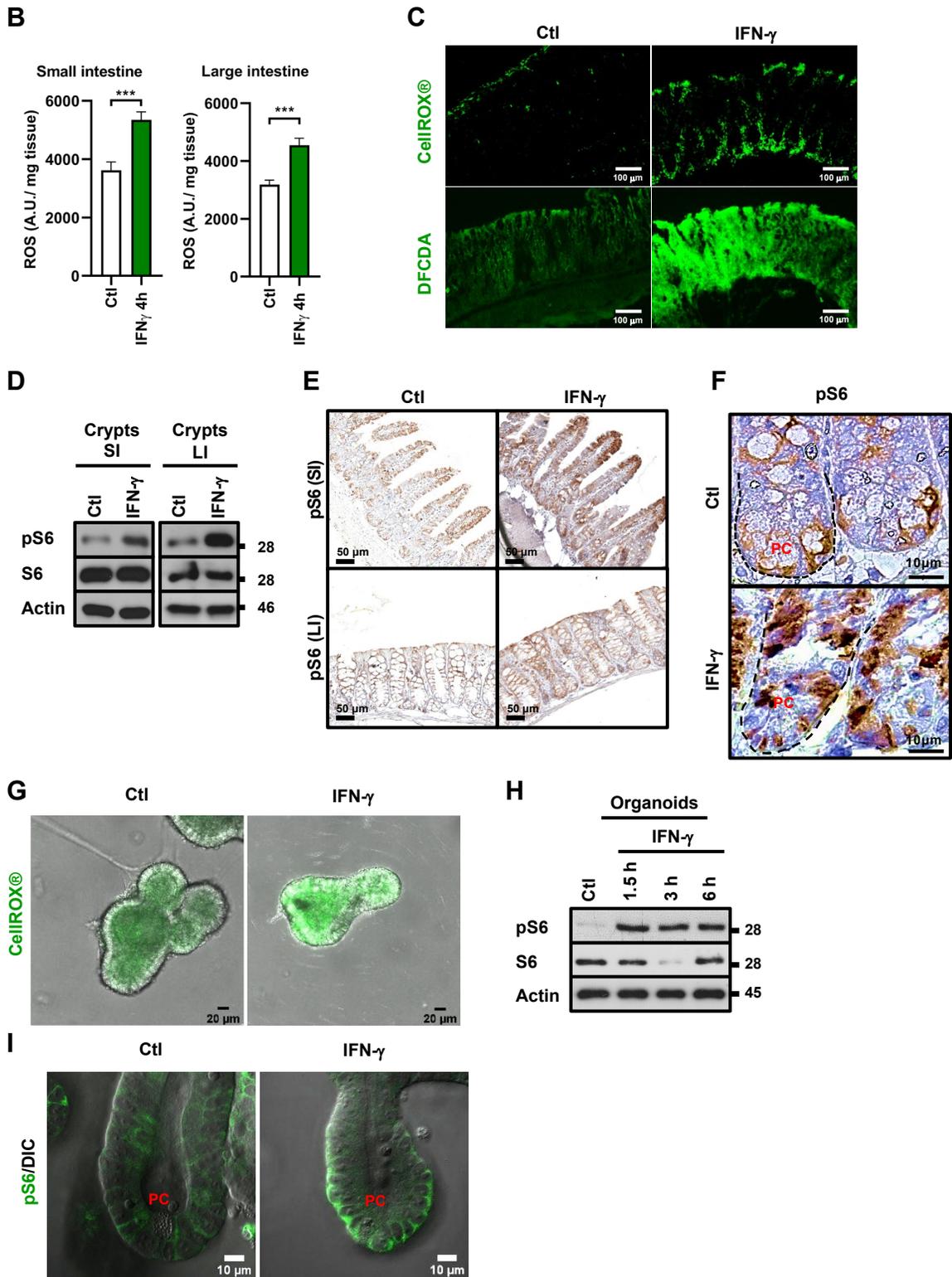
### **IFN- $\gamma$ aumenta la actividad mitocondrial, la producción de ROS y la señalización de mTORC1 en la mucosa intestinal**

Dados nuestros resultados anteriores, nuestro siguiente objetivo fue identificar qué mecanismo(s) incrementan la IECP tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . Múltiples factores podrían potencialmente impulsar la IECP río abajo del IFN- $\gamma$ , incluida la actividad mitocondrial (14,87), la producción de ROS (87,88) y la activación de mTORC1 (57,58). Por lo tanto, evaluamos dichos mecanismos en el intestino de ratones tratados con la citoquina. Primero, examinamos la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en los diferentes estados de la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de SI y LI de ratones tratados con IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la **Figura**

**8A**, la OCR mitocondrial aumentó significativamente después de la administración de la citoquina, específicamente, la respiración basal, la respiración máxima y la respiración asociada a la producción de ATP aumentaron en las mitocondrias. Además, el IFN- $\gamma$  provocó una fuerte inducción de ROS en el epitelio intestinal (**Figura 8B-C**). En cuanto a la señalización de mTORC1, evidenciamos que el tratamiento con IFN- $\gamma$  induce su activación, como lo muestra el aumento de la proteína ribosómica s6 (pS6), un efector clásico de mTORC1 (50). Es importante destacar que la señalización de mTORC1 aumentó en CEI del SI y LI a lo largo del eje cripta-vellosidad (**Figura 8D y E, flechas**), y especialmente en la parte inferior de la cripta (**Figura 8F**). Se obtuvieron resultados similares en nuestro modelo in vitro de organoides (**Figura 8G-I**). En conjunto, estos resultados muestran que el IFN- $\gamma$  induce la señalización de mTORC1, la activación mitocondrial y la formación de ROS en CEI.

**A**





**Figura 8.** El IFN- $\gamma$  aumenta la actividad mitocondrial, la producción de ROS y la señalización de mTORC1 en la mucosa intestinal.

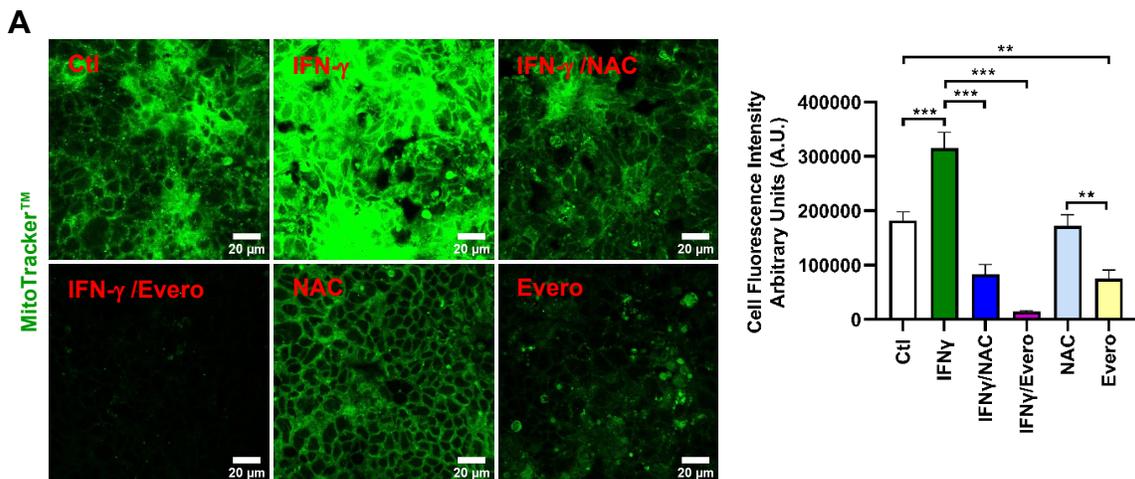
- A)** Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en mitocondrias aisladas de SI y LI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) durante 4 h. La OCR se midió en condiciones basales y después de la inyección de ADP, oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona. Los estados respiratorios se calcularon restando los valores de OCR después de la administración de antimicina A/rotenona. n=4-8 ratones por grupo.
- B)** Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mucosa colónica de SI y LI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) durante 4 h. La mucosa colónica se incubó durante 30 minutos con reactivo CellROX™ y se cuantificó la fluorescencia en un fluorómetro de microplacas Fluoroskan FL. n=6.
- C)** Se evaluó la distribución de ROS mediante microscopía de fluorescencia en la mucosa colónica de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección. Se utilizaron CellROX™ (verde) o diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DFCDA, verde) para la detección de ROS. Barra=100 $\mu\text{m}$ . n=6. Se muestra una imagen representativa.
- D)** pS6 y S6 se evaluaron en CEI del SI y LI de ratones C57BL/6J inyectados con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) mediante Wb (D) e inmunohistoquímica (IHQ) (E, F). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de citocinas. Las secciones incluidas en parafina tenían un espesor de 4  $\mu\text{m}$ . CP= célula de Paneth. Barra=50  $\mu\text{m}$  (E), 10  $\mu\text{m}$  (F). Se utilizaron S6 y actina como control de carga. Se muestran el Wb y las micrografías representativas de n = 6 experimentos independientes.
- G)** Se evaluaron las ROS en organoides Wt mediante microscopía de fluorescencia. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. Se utilizó CellROX™ (verde) para la detección de ROS. Se muestra imagen representativa. Núcleos=azul. Barra= 20  $\mu\text{m}$ .
- H)** Se evaluaron pS6 y S6 mediante Wt de organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5, 3 y 6 h. Actina se utilizó como control de carga. Wb representativo de n = 6 experimentos independientes.
- I)** Tinción de IF para pS6 (verde) en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. CP= célula de Paneth. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . Se realizaron 3 experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.

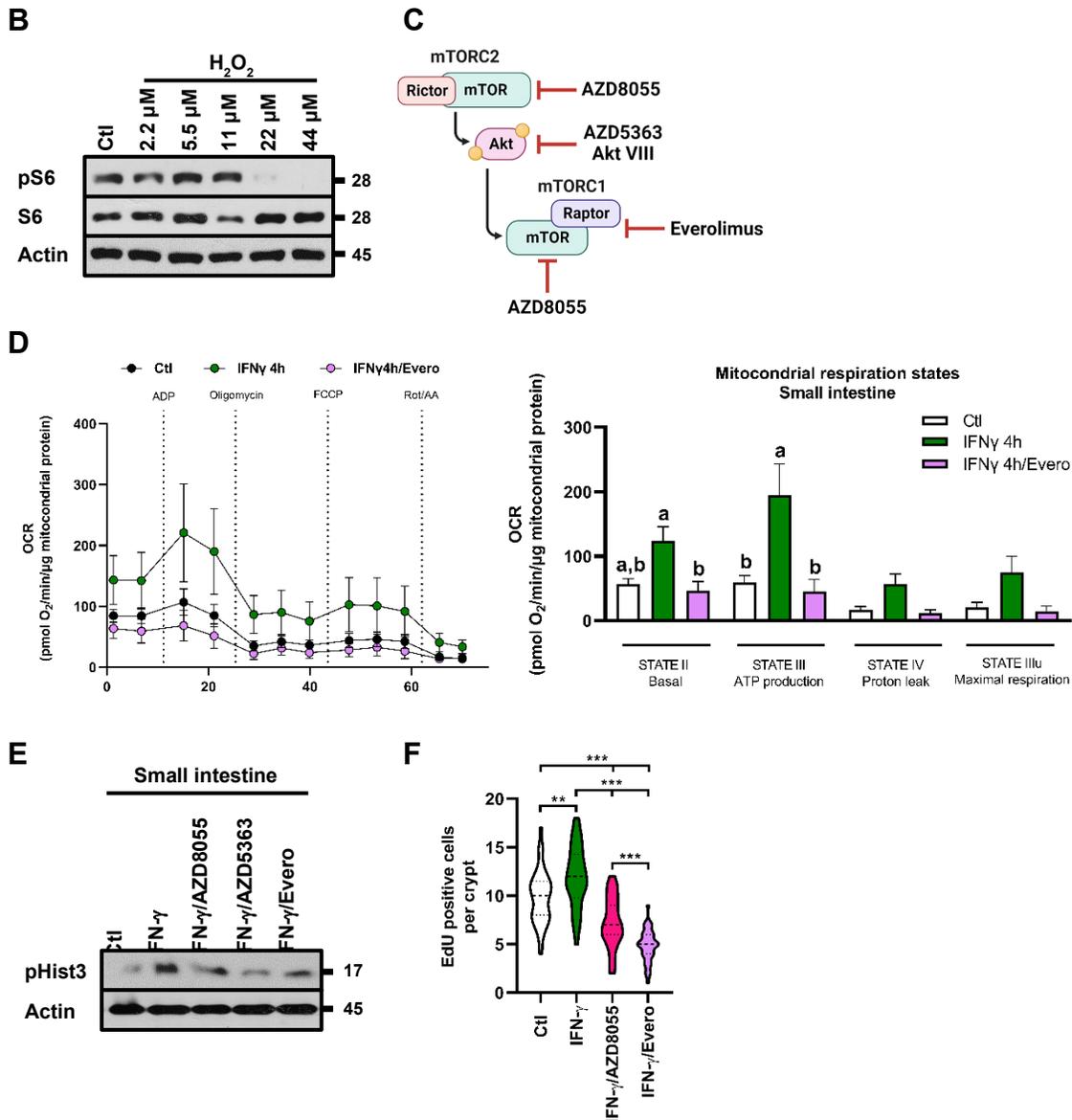
Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ . Los valores medios con diferentes letras minúsculas muestran diferencias estadísticas entre sí fueron  $a > b > c$  (A). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (B).

## El IFN- $\gamma$ aumenta la IECP a través de mTORC1

Los experimentos in vitro que realizamos posteriormente mostraron que el IFN- $\gamma$  incrementa eficientemente la actividad mitocondrial en CEI de manera dependiente de mTORC1 y ROS. Además, para nuestra sorpresa, la actividad mitocondrial en las células Caco-2, en el estado basal, dependía de mTORC1, pero era independiente de ROS (**Figura 9A**). Siendo que, en las CEI, la activación de mTORC1 es regulada parcialmente de la formación de ROS (**Figura 9B**), lo que indica que mTORC1 ejerce un rol crucial en dichos procesos.

Por lo tanto, evaluamos la actividad mitocondrial de SI y LI de ratones que fueron tratados con IFN- $\gamma$  más vehículo o IFN- $\gamma$  más Everolimus, un conocido inhibidor de mTORC1 (**Figura 9C**). Como se muestra en la **Figura 9D y en la Figura suplementaria 2**, everolimus suprime eficazmente el aumento de la respiración mitocondrial desencadenado por IFN- $\gamma$  tanto en SI como en LI, lo que demuestra de manera convincente el papel central de mTORC1 en el proceso. Además, la inhibición de la señalización de mTOR (AZD8055), Akt (AZD5363, inhibidor de Akt VIII) o mTORC1 (Everolimus) (**Figura 9C**) previene el aumento de IECP inducido por la citocina (**Figura 9E-F y Figura suplementaria 2B**), sugiriendo que mTORC1 es responsable de dicho efecto. Por ende, podemos concluir que nuestros resultados demuestran fehacientemente que mTORC1 tiene un efecto directo en el aumento de la IECP y en la activación mitocondrial desencadenada por el IFN- $\gamma$ .





**Figura 9. El aumento de IECP y de la actividad mitocondrial mediado por IFN- $\gamma$  es depende de la actividad de mTORC1.**

A) Se analizó la actividad mitocondrial utilizando MitoTracker™ Red CMXRos en monocapas de células Caco-2 estimuladas con IFN- $\gamma$ . Las monocapas confluentes se trataron con IFN- $\gamma$  (100 U/mL), IFN- $\gamma$ /Everolimus (20  $\mu$ M), IFN- $\gamma$ /NAC (100  $\mu$ M), Everolimus (20  $\mu$ M) o NAC (100  $\mu$ M). Los inhibidores se administraron 15 minutos antes de la estimulación con la citocina. El tratamiento con IFN- $\gamma$  se llevó a cabo durante 60 minutos. Barra= 20  $\mu$ m. n=3. La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia celular se muestra en el gráfico.

- B)** pS6 y S6 se evaluaron por Wb en CEI expuestas a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se estimularon células Caco-2 durante 4 h. Actina se utilizó como control de carga. Se muestra un Wb representativo de n = 3 experimentos independientes.
- C)** La diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR) es el núcleo central de mTORC1 y mTORC2. AZD8055 es un inhibidor competitivo de mTOR. AZD5363 y el inhibidor VIII de AKT inhabilitan potentemente todas las isoformas de Akt (Akt1/Akt2/Akt3). El rapálogo, Everolimus, suprime la actividad de mTORC1.
- D)** Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en mitocondrias aisladas de SI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg) o IFN- $\gamma$ /Everolimus (1 mg/Kg). Se administró Everolimus (Evero) 30 minutos antes de la administración de la citocina. El tratamiento con la citocina se llevó a cabo durante 4 h. La OCR se midió en condiciones basales y después de la inyección de ADP, oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona. Los estados respiratorios se calcularon restando los valores de OCR después de la administración de antimicina A/rotenona. n=4-8 ratones por grupo.
- E)** Se evaluó pHist3 mediante Wb de muestras de SI y LI obtenidas de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg) o IFN- $\gamma$  más inhibidores de la señalización de mTOR. Los inhibidores se administraron 30 minutos antes de la inyección de IFN- $\gamma$  de la siguiente manera: AZD8055 (25 mg/kg, ip), AZD5363 (30 mg/kg, ip) y Everolimus (1 mg/kg, ip). Los ratones fueron sacrificados después de 4 horas de la inyección de citocinas. Actina se utilizó como control de carga. Se muestra un Wb representativo de n = 3 experimentos independientes.
- F)** Ensayo de incorporación de EdU (rojo) en CEI del SI en ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /AZD8055 (25 mg/Kg, i.p.) o IFN- $\gamma$ /Everolimus (1 mg/Kg, i.p.). El tratamiento con IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg) se realizó durante 4 horas. La cuantificación se muestra en forma de gráfico.

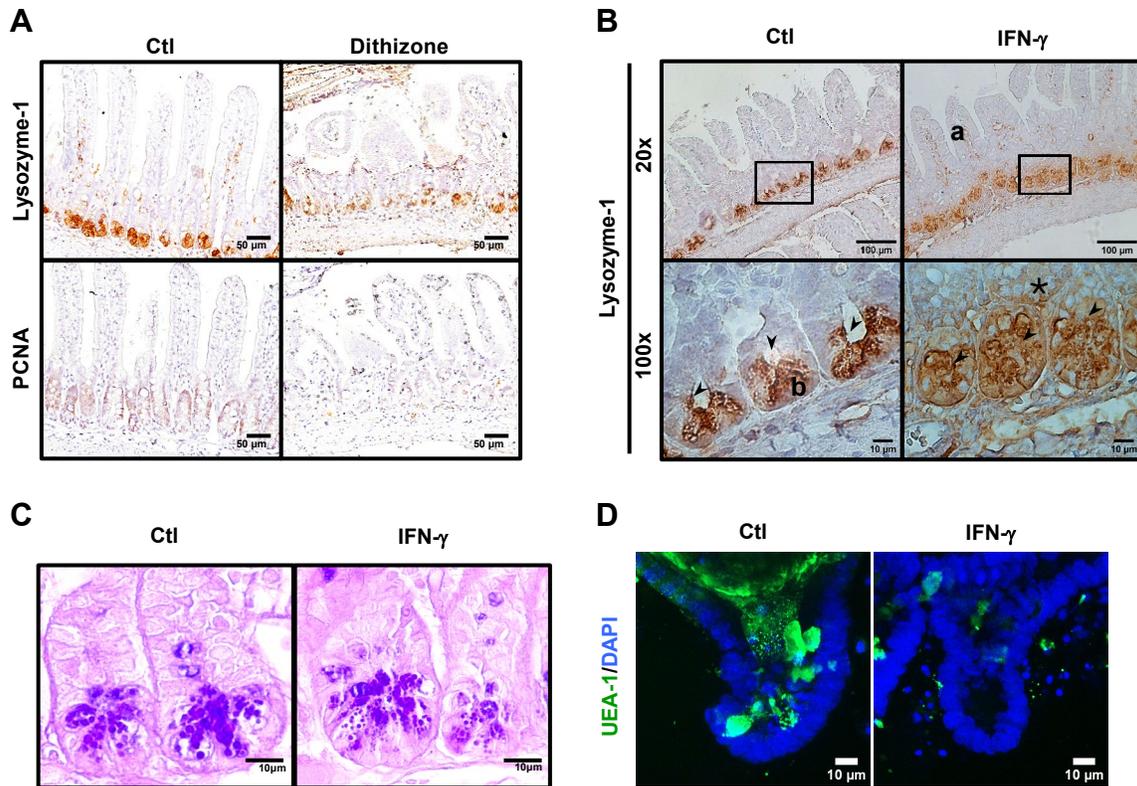
Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de p se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey (A, F). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los valores medios con diferentes letras minúsculas muestran diferencias estadísticas entre sí fueron  $a > b > c$  (D).

### **El IFN- $\gamma$ estimula la secreción de células de Paneth.**

El IFN- $\gamma$  estimula la secreción de células de Paneth (CP) y células Paneth-like (CPL), que son células secretoras que regulan positivamente la IECP en SI (29) y LI (3,26,27), respectivamente. De hecho, en nuestras manos, la inhibición in vivo de la

función de las células de Paneth con ditizona (30) redujo fuertemente la IECP (**Figura 10A**). Por lo tanto, el aumento de IECP que se produce río abajo de IFN- $\gamma$  podría depender de las células CP/CPL. En consecuencia, evaluamos la secreción de CP/CPL en la mucosa de ratones tratados con IFN- $\gamma$ . Dada la escasez y la confiabilidad limitada de los marcadores para analizar las funciones de las CPL, decidimos centrar nuestra investigación en analizar la función de las CP y para ello usamos a lisozima-1 un marcador característico para evaluar a dicha población celular (8,30,89).

Como era de esperarse, en condiciones basales, la lisozima-1 está presente en los gránulos citosólicos de las CP y solo se detectaron cantidades mínimas de la proteína en la luz de la cripta intestinal (**Figura 10B, punta de flecha**). Sin embargo, tras la estimulación con IFN- $\gamma$ , la lisozima-1 se nota menos granular y en cambio exhibió un patrón citosólico más difuso. Curiosamente, se observó una cantidad sustancial de lisozima-1 dentro de la luz de la cripta (**Figura 10B, punta de flecha**) y rodeando la membrana lateral de las células vecinas (**Figura 10B, Asterisco**). Los cambios en la distribución de la lisozima-1 fueron independientes de su expresión, ya que parece que el IFN- $\gamma$  inhibe su transcripción, pero no la proteína en sí (**Figura suplementaria 3A-C**). Es importante destacar que se observó con frecuencia la presencia de células no epiteliales lisozima-1+ en la submucosa después de la administración de IFN- $\gamma$ , lo que indica la inducción de la expresión de dicha proteína en células inmunes (**Figura 10B, a**). El análisis histológico reveló que en el grupo control las CP son normales en la base de la cripta y estas células tienen una gran cantidad de gránulos citosólicos, mientras que posterior al tratamiento con IFN- $\gamma$  las CP aparecen también en la base de la cripta, pero parcialmente vacías (**Figura 10C**). En el cultivo in vitro de organoides, observamos que el tratamiento con IFN- $\gamma$  redujo el número de CP y su contenido intracelular, como lo muestra la reducción del número de células UEA-1+ por cripta y la tinción de UEA-1 en CP (32) (**Figura 10D**). Así, en conjunto, nuestros resultados corroboran que el tratamiento con IFN- $\gamma$  estimula la secreción de CP.



**Figura 10. mTORC1 estimula la secreción de células de Paneth rio abajo de IFN- $\gamma$ .**

- A)** La distribución de Lisozima-1 y PCNA se analizó mediante IHQ en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de SI incluidas en parafina. Los ratones tratados con vehículo o ditizona se sacrificaron 12 h después de la inyección. n= 6 animales por grupo. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- B)** La distribución de lisozima-1 se analizó mediante IHC en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de SI incluidas en parafina obtenidas de ratones tratados con vehículo y con IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citocina. Panel inferior = amplificación de la región marcada con un cuadro en el panel superior. Puntas de flecha = lisozima-1 del lumen de la cripta. a= células lisozima-1+no epiteliales. Asterisco = lisozima-1+ no célula de Paneth. b= célula de Paneth lisozima-1+. n= 6 animales por grupo. Barra=100 $\mu\text{m}$  y 10 $\mu\text{m}$ .
- C)** Micrografía de células de Paneth de ratones control y tratados con IFN- $\gamma$ . La tinción con H&E se llevó a cabo en secciones de SI incluidas en parafina de 4  $\mu\text{m}$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de citocinas. Flechas = CP atrófica. Barra=10  $\mu\text{m}$ .
- D)** IF para UEA-1 (verde) en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . Se realizaron 6 experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.

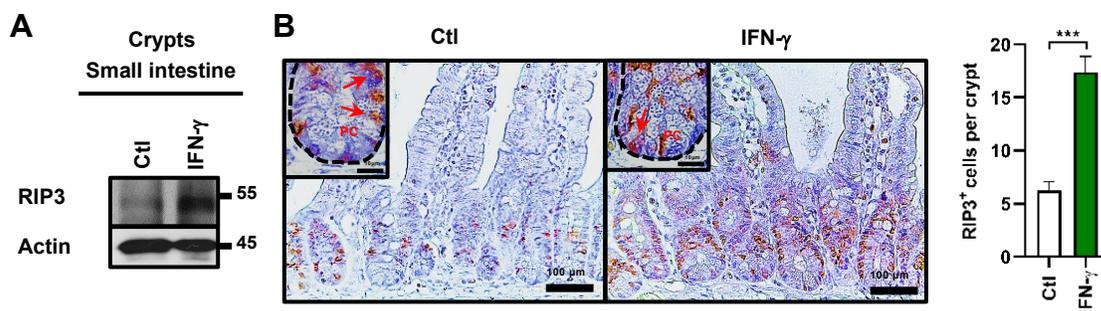
### **La necroptosis mediada por mTORC1 estimula la secreción de células de Paneth.**

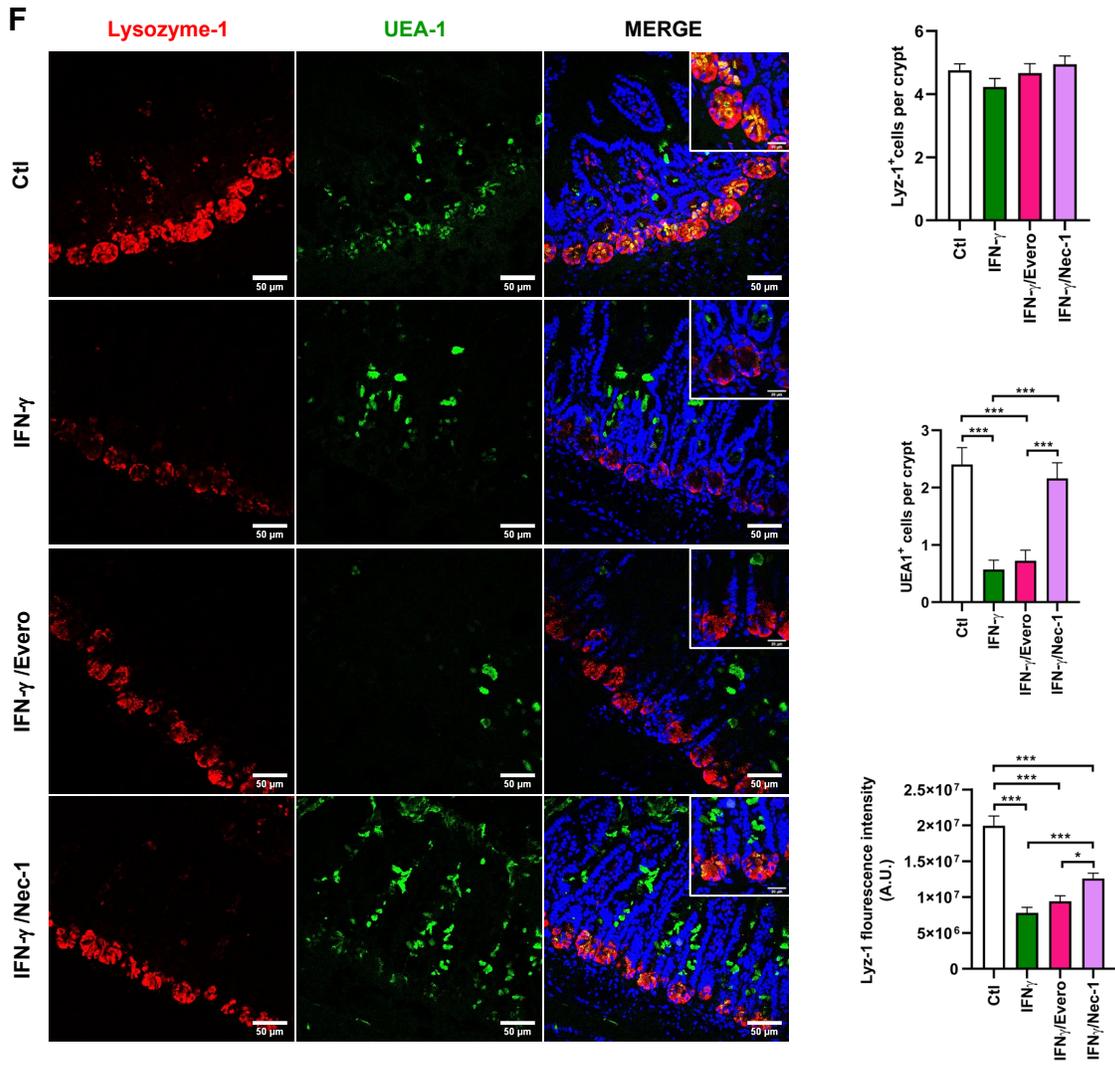
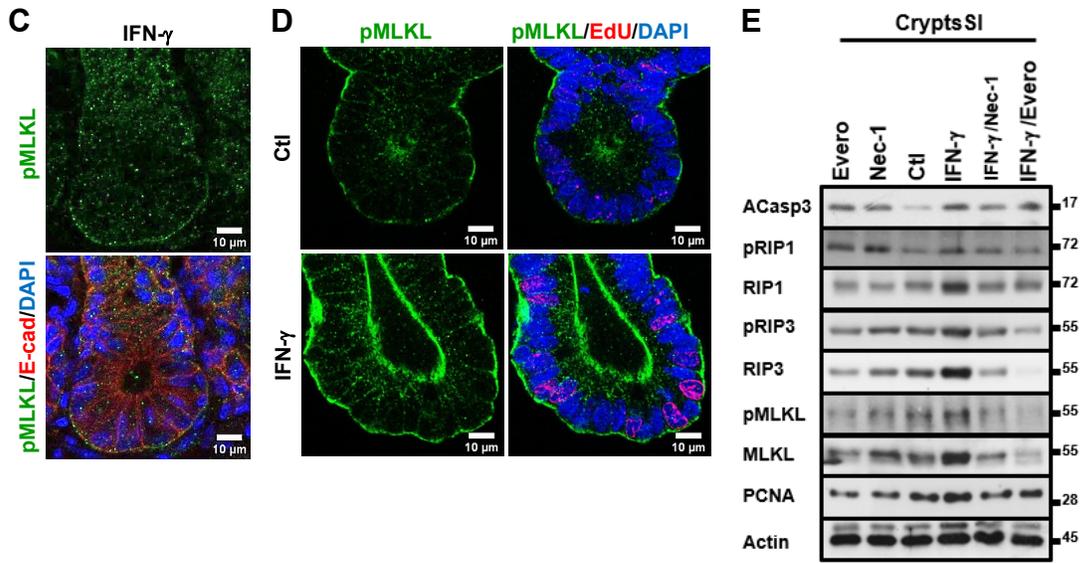
Nuestro siguiente objetivo fue identificar la conexión que existe entre mTORC1 y la degranulación de las PC que es inducida por IFN- $\gamma$ . En principio decidimos investigar si la necroptosis formaba parte de este mecanismo ya que: 1) es un proceso recurrente y ampliamente documentado en las CP (60,70,90,91); 2) es un proceso dependiente de mTORC1 (60) y 3) es bien sabido que la necroptosis es un mecanismo que facilita la liberación del contenido intracelular de sus células diana (66). Además, como se muestra en el inmunoblot de la **figura 11A**, el tratamiento con IFN- $\gamma$  indujo la acumulación de RIP3 en las CEI del SI. Además, los estudios de IHC revelaron que el IFN- $\gamma$  induce una fuerte acumulación de dicha molécula en la base de las criptas intestinales en comparación con lo observado en animales control. Además, mientras que, en condiciones basales, RIP3 es claramente citosólico (**Figura 11B, flechas**), el tratamiento con citoquinas indujo la agregación de RIP3 en estructuras de las denominadas “amiloide-like”, claramente indicando agregación de la molécula (**Figura 11B, puntas de flecha**). El tratamiento con IFN- $\gamma$  también estimuló, en la base de la cripta, el enriquecimiento de pMLKL en la membrana basolateral de las CEI (**Figura 11C y Figura suplementaria 4A**). En apoyo a los resultados obtenidos en nuestro modelo in vivo, se observaron resultados similares en nuestro modelo in vitro cuando los organoides fueron tratados con la citocina (**Figura 11D y Figura suplementaria 4 B-C**). Además, puesto que TNF- $\alpha$  es el principal inductor de necroptosis, la administración de IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) / TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a ratones Wt indujo significativamente la expresión de Olfm4 en las IEC mientras que se observó una reducción de Lizosima-1 reducida y Reg4 (**Figura 7G-H**). Por lo tanto, nuestros resultados respaldan la implicación de la necroptosis en la secreción por parte de las células Paneth y en la biogénesis de las células Olfm4+.

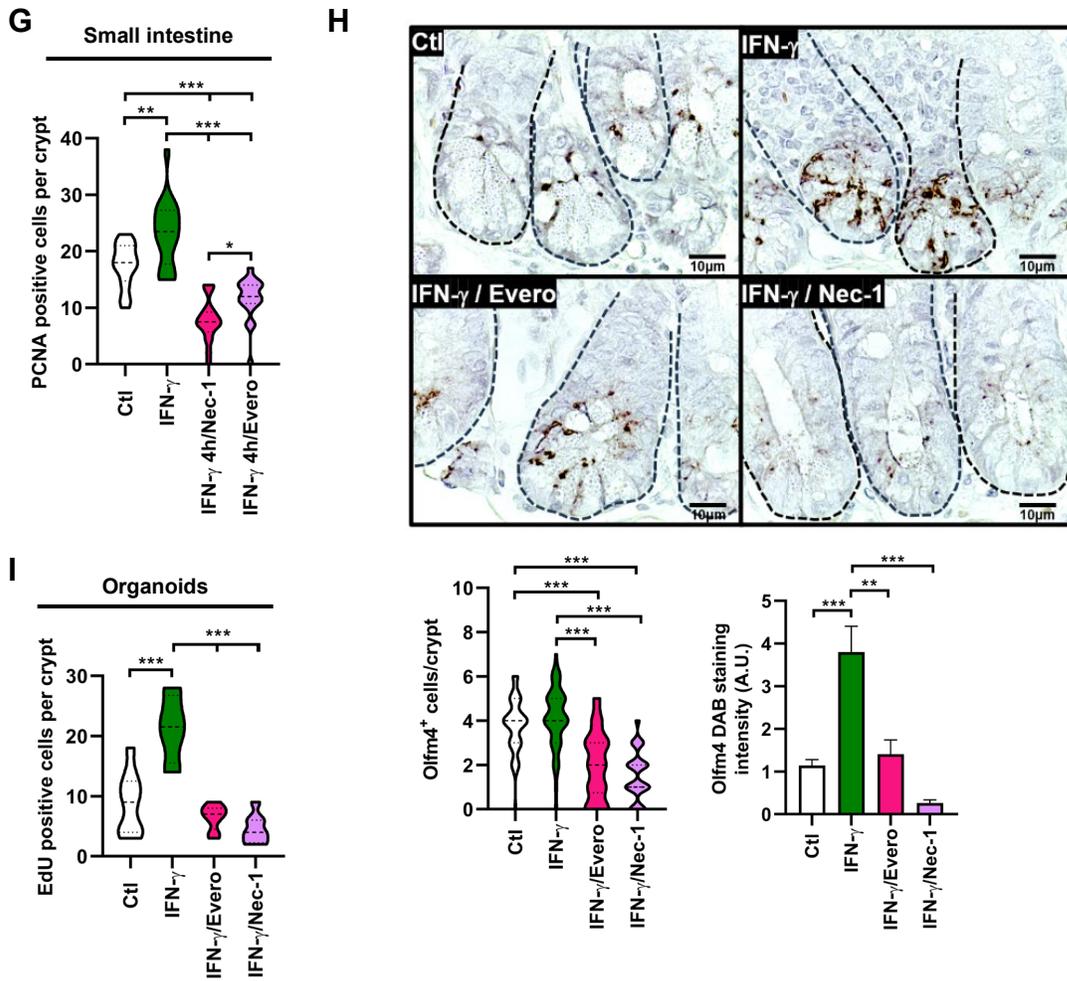
Posteriormente, evaluamos el grado de implicación de mTORC1 en el proceso antes mencionado. Para ello analizamos el efecto que tienen tanto el tratamiento con everolimus (inhibidor de mTORC1), y lo comparamos con el efecto que tiene el inhibidor de la necroptosis, Necrostatina-1 (62,74) en la inducción de proliferación y

necroptosis río abajo del IFN- $\gamma$ . Como se puede observar en la **Figura 11E** y en la **Figura suplementaria 4D**, ambos tratamientos previenen el incremento en la IECP, así como la acumulación de pRIP1, RIP1, pRIP3, RIP3, pMLKL y MLKL, tres marcadores bien conocidos de necroptosis (15,62,92–95); que es estimulada normalmente por el IFN- $\gamma$ , indicando que ambos procesos dependen de mTORC1. Además, en condiciones basales observamos que la necrostatina y el everolimus, redujeron RIP1, RIP3, pMLKL e IECP en las criptas del SI de ratones no estimulados. Curiosamente, la necrostatina y el everolimus no afectaron de manera significativa la activación de Caspasa-3 mediada por el IFN- $\gamma$ , pero estimularon apoptosis en condiciones control (**Figura 11E**).

Con respecto a las CP nuestros resultados muestran que tanto el everolimus como la necrostatina-1 previnieron eficazmente la disminución de lisozima-1 inducida por IFN- $\gamma$  en las CP (**Figura 11F y Figura suplementaria 4E**). Como era de esperarse, el aumento en la IECP observado en respuesta a la estimulación con la citocina fue atenuado por los inhibidores, como lo muestra el análisis de PCNA, pHist3 y Olfm4+ en la mucosa ileal (**Figuras 11G-H y Figuras suplementarias 4D-F**). Nuestros resultados también evidenciaron que el número de PC se mantuvo constante en todas las condiciones, lo que indica que los tratamientos afectaron principalmente la función dichas células (**Figura 11F, células Lyz-1+ por cripta**). En apoyo a estos hallazgos se observaron resultados similares en nuestro modelo in vitro de organoides (**Figura 11I, Figura suplementaria 4G**). Por lo tanto, todo en conjunto, indica fuertemente que el IFN- $\gamma$  modula la homeostasis del epitelio intestinal al estimular la secreción de las CP a través de un proceso necroptótico que es dependiente de mTORC1.







**Figura 11. La necroptosis mediada por mTORC1 estimula la secreción de las células de Paneth.**

- A)** Se evaluó RIP3 mediante Wb en criptas aisladas colectadas del SI de ratones inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citocina. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra un Wb representativo de 3 experimentos independientes.
- B)** RIP3 se evaluó mediante IHQ en el SI de ratones inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Panel superior= Ampliación de la base de la cripta de Lieberkühn. Puntas de flecha= necrosomas RIP3+. CP= células de Paneth. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ . n= 6 animales por grupo. La grafica muestra la cuantificación de las células RIP3+ por cripta.
- C)** Tinción de inmunofluorescencia para pMLKL (verde) en la base de la cripta de Lieberkühn de ratones tratados con IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de IFN-

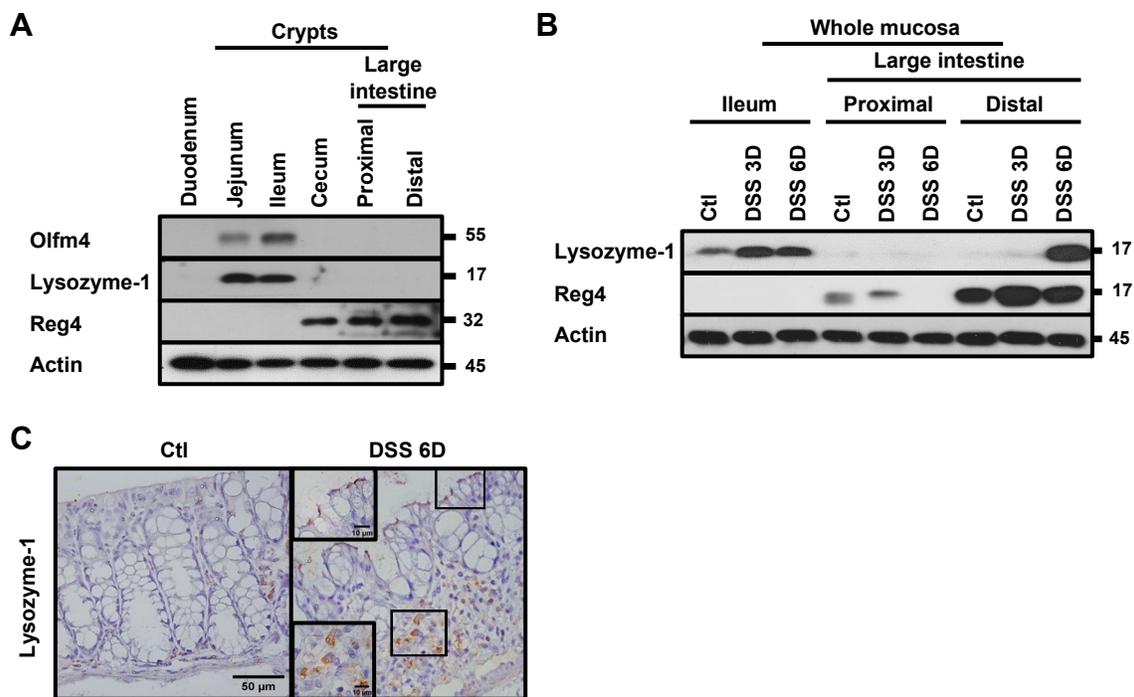
- $\gamma$ . Núcleos=azul, Célula de membrana (E-cadherina)= rojo. Barra = 10  $\mu$ m. Se evaluaron 3 animales diferentes y se muestra una imagen representativa.
- D)** IF para pMLKL (verde) y EdU (rojo) en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. Barra = 10  $\mu$ m. Se realizaron 3 experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.
- E)** Se evaluaron ACasp-3, pRIP1, RIP1, pRIP3, RIP3, pMLKL, MLKL y PCNA mediante Wb en criptas aisladas colectadas del SI de ratones inyectados i.p. con vehículo o IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg). Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citocina. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra un Wb representativo de n = 3 experimentos independientes.
- F)** Lisozima-1 (rojo) y UEA-1 (verde) se analizaron por IF en criosecciones de SI. Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citocina. Se administraron necrostatina-1 y Everolimus por vía i.p. 30 minutos antes de la estimulación con la citocina. Núcleos=azul. Barra= 50  $\mu$ m. Panel superior= Ampliación de la base de la cripta de Lieberkühn. Barra= 20  $\mu$ m. En los gráficos se muestran el número de células Lisozima-1+ por cripta, células UEA1+ por cripta y la intensidad de fluorescencia de lisozima-1.
- G)** Cuantificación de PCNA en células epiteliales del SI. Se evaluaron 50 criptas en 6 animales diferentes por condición.
- H)** Olfm4 se analizó mediante inmunohistoquímica en secciones del SI incluidas en parafina. Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de citocinas. Se administraron necrostatina-1 y everolimus i.p. 30 minutos antes de la estimulación con interferon. Barra= 10  $\mu$ m. En los gráficos se muestran la cuantificación de células Olfm4+ por cripta y la intensidad de la tinción Olfm4+ DAB.
- I)** La incorporación de EdU (rojo) en CEI se analizó mediante microscopía confocal en organoides. Se administraron necrostatina-1 y Everolimus 30 minutos antes de la estimulación con la citocina. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) se realizó durante 1.5 horas. Se muestra la cuantificación.

Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante t de student (B) o un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey (F, G, H, I). \*p < 0.05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

### **El IFN- $\gamma$ estimula la biogénesis de las CP y modula la homeostasis del intestino delgado.**

Finalmente, debido a que nuestros resultados indican que el IFN- $\gamma$  se secreta espontáneamente en la mucosa ileal pero no en la colónica, planteamos la hipótesis de que la citoquina podría afectar la biogénesis de las CP. Por lo tanto, evaluamos

tal posibilidad analizando la presencia de Olfm4, un precursor de CP (27), y lisozima-1 en criptas intestinales extraídas de yeyuno, duodeno, íleon, ciego y colon proximal y distal. Como se esperaba, Olfm4 y lisozima-1 solo se detectaron en el íleon y el duodeno, donde se produjo y secretó la citocina, pero no en el ciego, el colon proximal y distal, lo que respalda firmemente nuestra teoría (**Figura 12 A**). Mientras tanto, Reg4 solo se detectó en el ciego, colon proximal y distal. Además, en la mucosa colítica donde el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  están fuertemente enriquecidos (12,96), se indujo lisozima-1 en el colon distal, lo que confirma que un ambiente proinflamatorio es capaz de estimular la biogénesis de la CP (**Figura 12B-C**). Así, en conjunto, nuestros resultados sugieren que efectivamente si es el IFN- $\gamma$  quien influencia la homeostasis del intestino delgado, y lo hace al controlar la secreción y biogénesis de las células Paneth.



**Figura 12. El IFN- $\gamma$  estimula la biogénesis de las Células de Paneth.**

**A)** Se evaluaron Olfm4, Lizosima-1 y Reg4 mediante Wb en criptas aisladas colectadas duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon proximal y distal de ratones Wt. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra un blot representativo de n = 3 experimentos independientes.

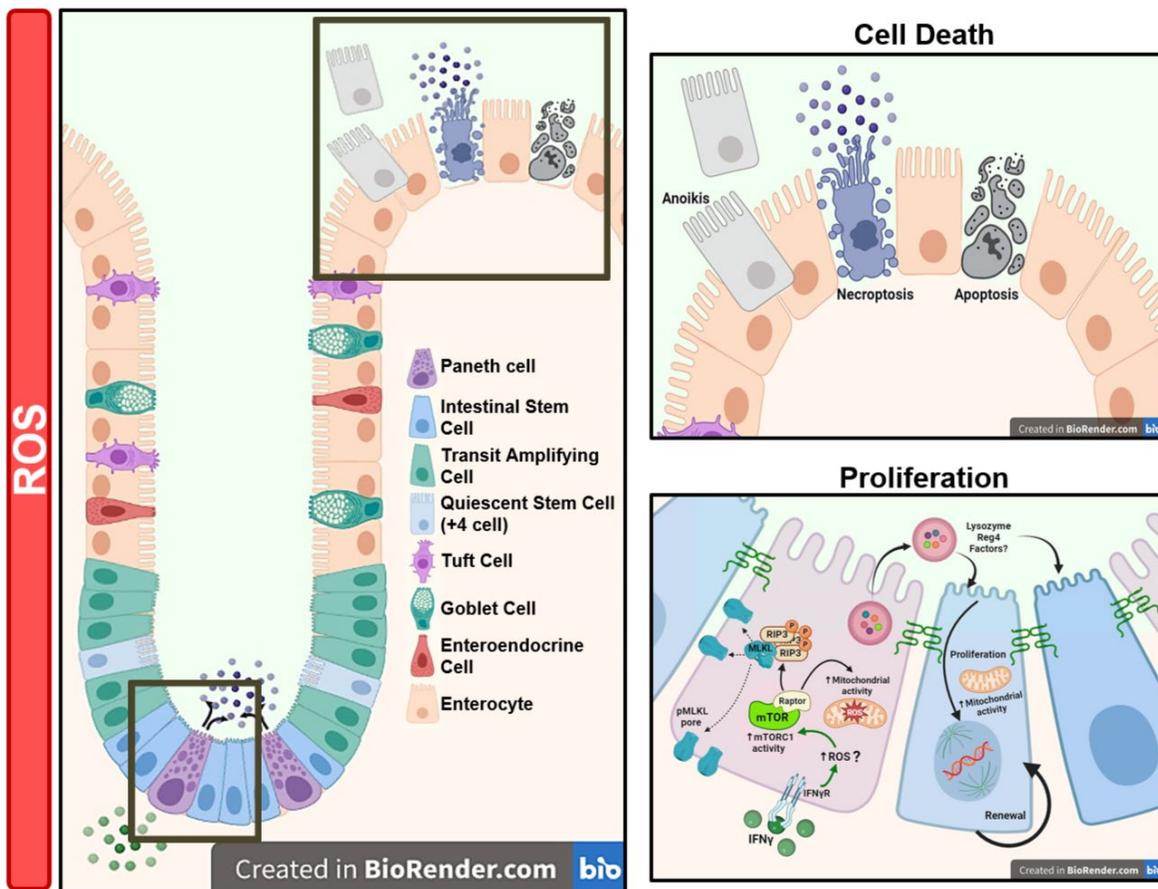
- B)** Se evaluaron Lizosima-1 y Reg4 mediante Wb en criptas aisladas extraídas del íleon, colon proximal y distal de ratones Ctl y tratados con DSS. El DSS fue administrado al 2,5% durante 3 y 6 días en agua del grifo. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra una transferencia representativa de n = 3 experimentos independientes.
- C)** Se evaluó lisozima-1 mediante IHQ en secciones de intestino grueso, de ratones tratados con DSS, incluidas en parafina de 4  $\mu$ m. Los ratones fueron sacrificados después de 6 días de tratamiento. Cuadro= Amplificación de colonocitos Lisozima-1+. n=3 animales por grupo. Barra de escala: 50  $\mu$ m, 10  $\mu$ m.

## **Discusión**

El epitelio intestinal es una barrera semipermeable que permite el transporte vectorial selectivo de solutos y líquidos desde el lumen intestinal al intersticio. Para que la barrera epitelial se mantenga funcional, el número de CEI que la conforman debe mantenerse constante, es decir, el mismo número de células que nacen y/o se diferencian es el mismo número de células que mueren. Este equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular es el responsable de mantener la homeostasis del epitelio intestinal (2,3,20) . A la fecha se han descrito múltiples reguladores que afectan la homeostasis del epitelio intestinal tales como las citocinas (12,16,45,97,98). Dentro de estas últimas se encuentra el IFN- $\gamma$ , una citocina con efectos pleiotrópicos que incrementa durante diversas patologías, incluidas las enfermedades en que se altera la función de barrera del epitelio (39,41–43,58). Pese a que la evidencia muestra que el IFN- $\gamma$  es capaz de producir múltiples y variados efectos sobre las funciones biológicas de las CEI, el papel de dicha citocina en el mantenimiento de la homeostasis intestinal es controversial y poco comprendido.

En este trabajo se muestra evidencia clara de que el IFN- $\gamma$  es secretado constitutivamente por los linfocitos T CD4+ en el intestino delgado. Además, exponemos el IFN- $\gamma$  es una citocina que juega un papel esencial en la regulación de la homeostasis intestinal y que esto lo hace a través de estimular la secreción de las células de Paneth y Paneth-like (CP/PLC) en el intestino delgado y colon, respectivamente. Además, descubrimos que el aumento en la secreción de las CP/PLC inducido por la citocina necesita de la hiperactivación de mTORC1 y la

inducción de necroptosis en las células blanco. La consecuencia de la hipersecreción de CP/PLC inducida por la citocina es un incremento rápido de la proliferación de las células epiteliales intestinales. Así, nuestros hallazgos muestran evidencia de un nuevo efecto del IFN- $\gamma$  sobre la homeostasis del epitelio intestinal (Figura 12).



**Figura 12. El IFN- $\gamma$  estimula la necroptosis dependiente de mTORC1 en las células de Paneth e induce su degranulación.** En la célula de Paneth de la cripta de Lieberkühn, el IFN- $\gamma$  estimula la activación mitocondrial que provoca la sobreproducción de ROS y la activación de mTORC1. El mTORC1 activo induce necroptosis para permitir la desgranulación de la CP. La liberación del contenido intracelular de las CP estimula la proliferación en las células adyacentes. Eventos similares se desencadenan en las células Paneth-like de las criptas del colon.

Aun cuando nuestra evidencia apunta a que la citocina estimula la proliferación de las CEI a través de la hipersecreción de las CP/PLC, también es factible que en

respuesta a dicho proceso se puedan estimular otros procesos biológicos como son la diferenciación, la supervivencia celular y, en un sentido más amplio, aún modificar la homeostasis del epitelio intestinal. Si bien estos efectos pueden ser considerados beneficiosos para el mantenimiento de la integridad del epitelio durante condiciones basales, dicho fenómeno puede resultar contraproducente en ciertas condiciones (41,44,72,85). Por ejemplo, resulta verosímil pensar que el incremento en la liberación de la citocina durante procesos inflamatorios conlleva no sólo a un incremento desmedido de la proliferación de las CEI sino que también puede resultar en una hipersecreción de defensinas y otros productos de las CP/PLC causando así un desequilibrio de la biota intestinal (24,24,25).

En el intestino normal, las células de Paneth se consideran células altamente secretoras y diferenciadas con características particulares como son su elevada vida media de aproximadamente 30 días, y con presencia de abundantes gránulos citosólicos enriquecidos en iones divalentes como el zinc. Las células de Paneth experimentan diferentes tipos de muerte celular programada como la apoptosis y la necroptosis. En este tenor el IFN- $\gamma$ , a dosis altas y/o después de un estímulo prolongando, induce la muerte de las CP al provocar tanto la liberación de todo su contenido citosólico, incluidos los organelos celulares, así como la extrusión de las células de Paneth, procesos que evocan la eribiosis (99) y la anoikis (64,100,101), respectivamente. Sin embargo, dado que existe evidencia reciente que sugiere que pese a la activación de los efectores finales de muerte celular como son la caspasa-3, pMLKL, gasdermina, etc., algunos tipos de muerte pueden ser reversibles (63,65,102,103), la propuesta de muerte celular para las CP por la activación de procesos de muerte programada podría ser solo parcialmente cierto. De hecho, en algunos contextos específicos se plantea la posibilidad de que existan mecanismos de muerte subletales (103–105). Esto cobra especial interés debido a que algunos de los mecanismos de muerte celular culminan con la formación de poros en la membrana tal es el caso de la piroptosis y la necroptosis, que concluyen con la formación de poros de Gasdermina y pMLKL respectivamente (65,95,106). Dichos poros que evocan al complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento (107) y que permiten tanto la entrada de agua y iones extracelulares,

así como la salida de contenido citosólico, parecen sin embargo tener cierta selectividad iónica. Por lo tanto, la activación de un cierto tipo de muerte favorecería la entrada de un tipo específico de iones que podrían actuar como segundos mensajeros para favorecer la secreción merocrina de las CP (25). Algo que podría ocurrir en nuestro sistema tras la administración de IFN- $\gamma$ . Por lo que, la necroptosis observada en las CP podría considerarse un mecanismo regulador de la secreción y no solo un mecanismo de muerte.

Por otro lado, durante una lesión y/o inflamación intestinal, las células de Paneth pueden adquirir características similares a las de las células madre y entonces contribuir a las necesidades de regeneración epitelial (108–110) . En este sentido la secreción de los productos de las CP tras la estimulación con citocinas como el IFN- $\gamma$ , cobra una mayor relevancia. Nuestra evidencia sugiere que, tras la administración de la citocina, se favorece la expresión del gen *Olfm4* (olfactomedina-4), una proteína expresada principalmente en células progenitoras semicomprometidas que se localizan a lo largo de la base de la cripta del intestino delgado (27) . Además, dicha proteína posee propiedades adicionales, tales como su actividad de mucina-like (111), que le permite su unión a las defensinas y que pueda ser secretada en el moco durante procesos inflamatorios. Así, en respuesta al IFN- $\gamma$  se podrían estar generando células nuevas con propiedades antiinflamatorias. Aunque nuestros resultados sugieren que se incrementa una subpoblación de células madre, no queda claro si se trata de “nuevas células” derivadas de la población LGR5+ o bien CP dediferenciadas evidenciando su plasticidad, por lo cual sugerimos realizar estudios adicionales donde se monitoree en tiempo real la actividad secretora de la células de Paneth así como sus dianas tras la administración del secretagogo para corroborarlo.

Dados todos estos resultados, nosotros concluimos que el IFN- $\gamma$  puede regular la homeostasis gastrointestinal a múltiples niveles ya sea de manera directa o indirecta. Y estos efectos pueden ser tanto beneficiosos como potencialmente perjudiciales destacando la naturaleza altamente compleja de la respuesta que tiene el intestino hacia dicha citocina.

## **Perspectivas**

1. Investigar el papel de la necroptosis mediada por IFN- $\gamma$  en la diferenciación del epitelio intestinal
2. Evaluar si la modulación de la necroptosis durante procesos inflamatorios previene el desarrollo de enfermedades.

## **Conclusión**

El interferón gamma debería ser considerado como un secretagogo y morfógeno que regula la homeostasis del epitelio intestinal, al controlar la biogénesis y función de las células de Paneth que están presentes en el intestino delgado.

## **Referencias**

1. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*. 2018 Sep 1;39(9):677–96.
2. Lee J, Gonzales-Navajas JM, Raz E. The “polarizing–tolerizing” mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Seminars in Immunopathology*. 2008 Feb 1;30(1):3–9.
3. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jan;15(1):19–33.
4. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics*. 2006 May 1;7(5):349–59.
5. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 May 1;459(7244):262–5.
6. McCracken KW, Howell JC, Wells JM, Spence JR. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols*. 2011 Dec 1;6(12):1920–8.

7. Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology*. 2008 Mar 1;134(3):849–64.
8. Bry L, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T, Gordon JI. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Oct 25;91(22):10335–9.
9. Clevers HC, Bevins CL. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology*. 2013 Feb 10;75(Volume 75, 2013):289–311.
10. Cray P, Sheahan BJ, Dekaney CM. Secretary Sorcery: Paneth Cell Control of Intestinal Repair and Homeostasis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2021 Jan 1;12(4):1239–50.
11. Rees WD, Tandun R, Yau E, Zachos NC, Steiner TS. Regenerative Intestinal Stem Cells Induced by Acute and Chronic Injury: The Saving Grace of the Epithelium? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:1333.
12. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*. 2019;50(4):992–1006.
13. Khaloian S, Rath E, Hammoudi N, Gleisinger E, Blutke A, Giesbertz P, et al. Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence. *Gut*. 2020 Nov 1;69(11):1939–51.
14. Rath E, Moschetta A, Haller D. Mitochondrial function — gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2018 Aug 1;15(8):497–516.
15. Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong CQ, Chen X, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nature Communications*. 2017 Feb 8;8(1):14329.
16. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in Cell Biology*. 2016 Apr 1;26(4):249–61.

17. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013 Jun;9(6):367–74.
18. Balmus I, Ciobica A, Trifan A, Stanciu C. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. *Saudi J Gastroenterol*. 2016 Jan 1;22(1):3–17.
19. Chen L, Park SM, Turner JR, Peter ME. Cell death in the colonic epithelium during inflammatory bowel diseases: CD95/Fas and beyond. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010 Jun 1;16(6):1071–6.
20. Hanning N, Edwinston AL, Ceuleers H, Peters SA, De Man JG, Hassett LC, et al. Intestinal barrier dysfunction in irritable bowel syndrome: a systematic review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2021 Jan 1;14:1756284821993586.
21. Xing T, Camacho Salazar R, Chen YH. Animal models for studying epithelial barriers in neonatal necrotizing enterocolitis, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *null*. 2017 Oct 2;5(4):e1356901.
22. McElroy SJ, Underwood MA, Sherman MP. Paneth Cells and Necrotizing Enterocolitis: A Novel Hypothesis for Disease Pathogenesis. *Neonatology*. 2012 Sep 20;103(1):10–20.
23. Wallaey C, Garcia-Gonzalez N, Libert C. Paneth cells as the cornerstones of intestinal and organismal health: a primer. *EMBO Molecular Medicine*. 2023 Feb 8;15(2):e16427.
24. Bel S, Pendse M, Wang Y, Li Y, Ruhn KA, Hassell B, et al. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science*. 2017 Sep 8;357(6355):1047–52.
25. Holly MK, Smith JG. Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis. *Viruses*. 2018;10(5).
26. Sasaki N, Sachs N, Wiebrands K, Ellenbroek SIJ, Fumagalli A, Lyubimova A, et al. Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem

cells in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Sep 13;113(37):E5399–407.

27. Sakahara M, Okamoto T, Srivastava U, Natsume Y, Yamanaka H, Suzuki Y, et al. Paneth-like cells produced from OLFM4+ stem cells support OLFM4+ stem cell growth in advanced colorectal cancer. *Commun Biol*. 2024 Jan 5;7(1):1–12.

28. Rothenberg ME, Nusse Y, Kalisky T, Lee JJ, Dalerba P, Scheeren F, et al. Identification of a cKit+ Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5+ Stem Cells in Mice. *Gastroenterology*. 2012 May 1;142(5):1195-1205.e6.

29. Liu L, Guo Y, Zheng J, Lu Y, Shen Y, Huang C, et al. Paneth cell ablation increases the small intestinal injury during acute necrotizing pancreatitis in rats. *Molecular Medicine Reports*. 2019 Jul 1;20(1):473–84.

30. Berger JN, Gong H, Good M, McElroy SJ. Dithizone-induced Paneth cell disruption significantly decreases intestinal perfusion in the murine small intestine. *Journal of Pediatric Surgery*. 2019 Nov 1;54(11):2402–7.

31. Bethanechol and a G-protein activator, NaF/AlCl<sub>3</sub>, induce secretory response in Paneth cells of mouse intestine | *Cell and Tissue Research* [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00319611>

32. Farin HF, Karthaus WR, Kujala P, Rakhshandehroo M, Schwank G, Vries RGJ, et al. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- $\gamma$ . *Journal of Experimental Medicine*. 2014 Jun 30;211(7):1393–405.

33. Stockinger S, Albers T, Duerr CU, Ménard S, Pütsep K, Andersson M, et al. Interleukin-13-Mediated Paneth Cell Degranulation and Antimicrobial Peptide Release. *Journal of Innate Immunity*. 2014 Feb 19;6(4):530–41.

34. Brabec T, Vobořil M, Schierová D, Valter E, Šplíchalová I, Dobeš J, et al. IL-17-driven induction of Paneth cell antimicrobial functions protects the host from microbiota dysbiosis and inflammation in the ileum. *Mucosal Immunology*. 2023 Aug 1;16(4):373–85.

35. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004 Feb 1;75(2):163–89.
36. The role of interferon-gamma and its receptors in gastrointestinal cancers. *Pathology - Research and Practice*. 2023 Aug 1;248:154636.
37. Ivashkiv LB. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018 Sep;18(9):545–58.
38. Castro-Martinez F, Candelario-Martinez A, Encarnacion-Garcia MR, Piedra-Quintero Z, Bonilla-Moreno R, Betanzos A, et al. Rictor/Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Signaling Protects Colonocytes from Apoptosis and Prevents Epithelial Barrier Breakdown. *The American Journal of Pathology*. 2021 Sep 1;191(9):1537–49.
39. Fang P, Hwa V, Rosenfeld RG. Interferon-gamma-induced dephosphorylation of STAT3 and apoptosis are dependent on the mTOR pathway. *Experimental Cell Research*. 2006 May 1;312(8):1229–39.
40. Wang QS, Shen SQ, Sun HW, Xing ZX, Yang HL. Interferon-gamma induces autophagy-associated apoptosis through induction of cPLA2-dependent mitochondrial ROS generation in colorectal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018 Apr 15;498(4):1058–65.
41. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, et al. Interferon- $\gamma$  Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging  $\beta$ -Catenin Signaling Pathways. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):392–402.
42. Eriguchi Y, Nakamura K, Yokoi Y, Sugimoto R, Takahashi S, Hashimoto D, et al. Essential role of IFN- $\gamma$  in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI Insight* [Internet]. 2018 Sep 20 [cited 2024 Apr 16];3(18). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/121886>

43. Araujo A, Safronova A, Burger E, López-Yglesias A, Giri S, Camanzo ET, et al. IFN- $\gamma$  mediates Paneth cell death via suppression of mTOR. Harris NL, Garrett WS, Harris NL, Coakley G, Rothlin CV, editors. *eLife*. 2021 Oct 11;10:e60478.
44. Hernández-Trejo JA, Suárez-Pérez D, Gutiérrez-Martínez IZ, Fernandez-Vargas OE, Serrano C, Candelario-Martínez AA, et al. The pro-inflammatory cytokines IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium. *Biochemical Journal*. 2016 Oct 27;473(21):3805–18.
45. Velikova T, Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Spassova Z, Stanilova S, Altankova I. Cytokines in Inflamed Mucosa of IBD Patients [Internet]. *New Insights into Inflammatory Bowel Disease*. IntechOpen; 2016 [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id>
46. Beaurepaire C, Smyth D, McKay DM. Interferon- $\gamma$  Regulation of Intestinal Epithelial Permeability. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009 Mar;29(3):133–44.
47. Interferon-gamma signals via an ERK1/2-ARF6 pathway to promote bacterial internalization by gut epithelia - Smyth - 2012 - *Cellular Microbiology* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 May 29]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2012.01796.x>
48. Serrano C, Galán S, Rubio JF, Candelario-Martínez A, Montes-Gómez AE, Chánez-Paredes S, et al. Compartmentalized Response of IL-6/STAT3 Signaling in the Colonic Mucosa Mediates Colitis Development. *J Immunol*. 2019 Feb 15;202(4):1239.
49. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020 Apr 1;21(4):183–203.
50. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960–76.
51. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017 Apr 20;169(3):381–405.

52. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014;4:64.
53. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2004 Apr 1;15(2):177–82.
54. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):231–41.
55. Seo SU, Woo SM, Lee HS, Kim SH, Min K jin, Kwon TK. mTORC1/2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy. *Oncogene*. 2018 Sep;37(38):5205–20.
56. Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. Lane JD, Korolchuk VI, Murray JT, editors. *Essays in Biochemistry*. 2017 Dec 12;61(6):565–84.
57. de la Cruz López KG, Toledo Guzmán ME, Sánchez EO, García Carrancá A. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 31];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01373>
58. Gutiérrez-Martínez IZ, Rubio JF, Piedra-Quintero ZL, Lopez-Mendez O, Serrano C, Reyes-Maldonado E, et al. mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development. *Translational Oncology*. 2019;12(1):24–35.
59. Abe K, Yano T, Tanno M, Miki T, Kuno A, Sato T, et al. mTORC1 inhibition attenuates necroptosis through RIP1 inhibition-mediated TFEB activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019 Dec 1;1865(12):165552.
60. Xie Y, Zhao Y, Shi L, Li W, Chen K, Li M, et al. Gut epithelial TSC1/mTOR controls RIPK3-dependent necroptosis in intestinal inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2020 Apr 1;130(4):2111–28.

61. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 2005 Jul 1;1(2):112–9.
62. Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008 May;4(5):313–21.
63. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*. 2021 May 1;18(5):1106–21.
64. Ashrafizadeh M, Mohammadinejad R, Tavakol S, Ahmadi Z, Roomiani S, Katebi M. Autophagy, anoikis, ferroptosis, necroptosis, and endoplasmic reticulum stress: Potential applications in melanoma therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019 Nov 1;234(11):19471–9.
65. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ*. 2019 Jan;26(1):99–114.
66. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):209–23.
67. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010 Oct 1;11(10):700–14.
68. Hsu SK, Chang WT, Lin IL, Chen YF, Padalwar NB, Cheng KC, et al. The Role of Necroptosis in ROS-Mediated Cancer Therapies and Its Promising Applications. *Cancers*. 2020;12(8).
69. Deragon MA, McCaig WD, Patel PS, Haluska RJ, Hodges AL, Sosunov SA, et al. Mitochondrial ROS prime the hyperglycemic shift from apoptosis to necroptosis. *Cell Death Discovery*. 2020 Nov 26;6(1):132.

70. Günther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, et al. Caspase-8 regulates TNF- $\alpha$ -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*. 2011 Sep;477(7364):335–9.
71. Pierdomenico M, Negroni A, Stronati L, Vitali R, Prete E, Bertin J, et al. Necroptosis Is Active in Children With Inflammatory Bowel Disease and Contributes to Heighten Intestinal Inflammation. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* [Internet]. 2014;109(2). Available from: [https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2014/02000/Necroptosis\\_Is\\_Active\\_in\\_Children\\_With.22.aspx](https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2014/02000/Necroptosis_Is_Active_in_Children_With.22.aspx)
72. Simmonds N, Furman M, Karanika E, Phillips A, Bates AW. Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterology*. 2014 May 15;14(1):93.
73. Lee SH, Kwon J ye, Moon J, Choi J, Jhun J, Jung K, et al. Inhibition of RIPK3 Pathway Attenuates Intestinal Inflammation and Cell Death of Inflammatory Bowel Disease and Suppresses Necroptosis in Peripheral Mononuclear Cells of Ulcerative Colitis Patients. *Immune Netw* [Internet]. 2020 Apr;20(2). Available from: <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e16>
74. Liu ZY, Wu B, Guo YS, Zhou YH, Fu ZG, Xu BQ, et al. Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):3174–85.
75. Liu X, Xie X, Ren Y, Shao Z, Zhang N, Li L, et al. The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm*. 2021;2(4):730–55.
76. Ahmad AA, Wang Y, Gracz AD, Sims CE, Magness ST, Allbritton NL. Optimization of 3-D organotypic primary colonic cultures for organ-on-chip applications. *Journal of Biological Engineering*. 2014 Apr 1;8(1):9.
77. AU - Castro-Martínez F, AU - Encarnación-García M del R, AU - Candelario-Martinez A, AU - Medina-Contreras O, AU - Patiño-Lopez G, AU - Schnoor M, et al. Evaluation and Quantification of Micro Epithelial Gaps in the Colonic Mucosa using Immunofluorescence Staining. *JoVE*. 2021 Jun 11;(172):e62204.

78. Immunocytochemistry and immunofluorescence protocol | Abcam [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol>
79. Cell Signaling Technology [Internet]. [cited 2024 May 27]. Immunofluorescence Formaldehyde Fixation Protocol. Available from: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/protocol-if>
80. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, McDonald KG, Tussiwand R, et al. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+ T cells in the steady state and maintenance of gut CD4+ Th17 during parasitic infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2014 Mar 31;211(4):623–33.
81. Takeuchi A, Badr MESG, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, et al. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *Journal of Experimental Medicine*. 2015 Dec 22;213(1):123–38.
82. Kovacs SB, Oh C, Aachoui Y, Miao EA. Evaluating cytokine production by flow cytometry using brefeldin A in mice. *STAR Protocols*. 2021 Mar 19;2(1):100244.
83. Woznicki JA, Saini N, Flood P, Rajaram S, Lee CM, Stamou P, et al. TNF- $\alpha$  synergises with IFN- $\gamma$  to induce caspase-8-JAK1/2-STAT1-dependent death of intestinal epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2021 Sep 23;12(10):1–15.
84. Moon RT. Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Science's STKE*. 2005 Feb 15;2005(271):cm1–cm1.
85. Shenoy AK, Fisher RC, Butterworth EA, Pi L, Chang LJ, Appelman HD, et al. Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors. *Cancer Res*. 2012 Oct 1;72(19):5091–100.
86. Yee KK, Li Y, Redding KM, Iwatsuki K, Margolskee RF, Jiang P. Lgr5-EGFP Marks Taste Bud Stem/Progenitor Cells in Posterior Tongue. *Stem Cells*. 2013 Apr;31(5):992–1000.

87. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012 May 15;16(10):1150–80.
88. VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, et al. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*. 2012 Feb 1;139(3):488–97.
89. Yu S, Balasubramanian I, Laubitz D, Tong K, Bandyopadhyay S, Lin X, et al. Paneth Cell-Derived Lysozyme Defines the Composition of Mucolytic Microbiota and the Inflammatory Tone of the Intestine. *Immunity*. 2020 Aug 18;53(2):398-416.e8.
90. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu D e, Hoti N, et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular Signalling*. 2007 Oct 1;19(10):2056–67.
91. Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 2013 Jul 1;62(7):1062.
92. Alvarez-Diaz S, Dillon CP, Lalaoui N, Tanzer MC, Rodriguez DA, Lin A, et al. The Pseudokinase MLKL and the Kinase RIPK3 Have Distinct Roles in Autoimmune Disease Caused by Loss of Death-Receptor-Induced Apoptosis. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):513–26.
93. Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, Livingston-Rosanoff D, Daley-Bauer LP, Hakem R, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*. 2011 Mar 1;471(7338):368–72.
94. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu D e, Hoti N, et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular Signalling*. 2007 Oct 1;19(10):2056–67.
95. Xia B, Fang S, Chen X, Hu H, Chen P, Wang H, et al. MLKL forms cation channels. *Cell Res*. 2016 May;26(5):517–28.

96. Bergamo A, Gerdol M, Pallavicini A, Greco S, Schepens I, Hamelin R, et al. Lysozyme-Induced Transcriptional Regulation of TNF- $\alpha$  Pathway Genes in Cells of the Monocyte Lineage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Jan;20(21):5502.
97. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6164.
98. Andrews C, McLean MH, Durum SK. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1270.
99. Erebosis, a new cell death mechanism during homeostatic turnover of gut enterocytes | *PLOS Biology* [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3001586>
100. Taddei M, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*. 2012 Jan 1;226(2):380–93.
101. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death & Differentiation*. 2005 Nov 1;12(2):1473–7.
102. Evavold CL, Hafner-Bratkovič I, Devant P, D'Andrea JM, Ngwa EM, Boršič E, et al. Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Ragulator-Rag-mTORC1 pathway. *Cell*. 2021 Aug 19;184(17):4495-4511.e19.
103. Vucur M, Ghallab A, Schneider AT, Adili A, Cheng M, Castoldi M, et al. Sublethal necroptosis signaling promotes inflammation and liver cancer. *Immunity*. 2023 Jul 11;56(7):1578-1595.e8.
104. Killarney ST, Tait SWG, Green DR, Wood KC. Sublethal engagement of apoptotic pathways in residual cancer. *Trends in Cell Biology*. 2024 Mar 1;34(3):225–38.
105. *IJMS* | Free Full-Text | Mutagenic Consequences of Sublethal Cell Death Signaling [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/6144>

106. Kolbrink B, Riebeling T, Kunzendorf U, Krautwald S. Plasma Membrane Pores Drive Inflammatory Cell Death. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Aug 21 [cited 2024 Apr 17];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00817>
107. Complement and its role in innate and adaptive immune responses | *Cell Research* [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://www.nature.com/articles/cr2009139>
108. Colozza G, Lee H, Merenda A, Wu SHS, Català-Bordes A, Radaszkiewicz TW, et al. Intestinal Paneth cell differentiation relies on asymmetric regulation of Wnt signaling by Daam1/2. *Science Advances*. 2023 Nov 24;9(47):eadh9673.
109. Jones JC, Brindley CD, Elder NH, Myers MG, Rajala MW, Dekaney CM, et al. Cellular Plasticity of Defa4Cre-Expressing Paneth Cells in Response to Notch Activation and Intestinal Injury. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019 Jan 1;7(3):533–54.
110. Mei X, Gu M, Li M. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Aug 12;11(1):349.
111. Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD☆ | *Journal of Crohn's and Colitis* | Oxford Academic [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/6/4/425/426150>

## Research Article

**IFN- $\gamma$  stimulates Paneth cell secretion through necroptosis mTORC1 dependent**

María R. Encarnacion-García<sup>\*1</sup> , Raúl De la Torre-Baez<sup>\*1</sup> , María A. Hernandez-Cueto<sup>\*2</sup>, Laura A. Velázquez-Villegas<sup>3</sup>, Aurora Candelario-Martínez<sup>1</sup>, Ana Beatriz Sánchez-Argáez<sup>4</sup>, Perla H. Horta-López<sup>1</sup>, Armando Montoya-García<sup>4</sup>, Gustavo Alberto Jaimes-Ortega<sup>5,6</sup>, Luis Lopez-Bailon<sup>7</sup>, Zayda Piedra-Quintero<sup>4</sup> , Gabriela Carrasco-Torres<sup>8</sup>, Marlon De Ita<sup>9,10</sup>, María del Pilar Figueroa-Corona<sup>4</sup>, José Esteban Muñoz-Medina<sup>2</sup>, Magdalena Sánchez-Uribe<sup>11</sup>, Arturo Ortiz-Fernández<sup>12</sup>, Marco Antonio Meraz-Ríos<sup>4</sup> , Angélica Silva-Olivares<sup>13</sup>, Abigail Betanzos<sup>13</sup>, Guillermina Juliana Baay-Guzman<sup>14</sup>, Fernando Navarro-García<sup>12</sup> , Saúl Villa-Treviño<sup>12</sup>, Francisco García-Sierra<sup>12</sup>, Bulmaro Cisneros<sup>9</sup>, Michael Schnoor<sup>4</sup>, Vianney F. Ortíz-Navarrete<sup>4</sup>, Nicolás Villegas-Sepúlveda<sup>4</sup> , Ricardo Valle-Rios<sup>5,15</sup>, Oscar Medina-Contreras<sup>16</sup> , Lilia G. Noriega<sup>3</sup>  and Porfirio Nava<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Clinical Laboratory of Infectology, National Hospital "La Raza" Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Physiology of Nutrition Department, The National Institute of Health Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Immunology and Proteomics Research Laboratory, Children's Hospital of Mexico "Federico Gómez" (HIMFG), Mexico City, Mexico

<sup>6</sup> Experimental Biology Postgraduate Program, Department of Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University (UAM), Mexico City, Mexico

<sup>7</sup> Immunology Department and Immunology Postgraduate Program, National School of Biological Sciences of the National Polytechnic Institute (ENCB-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>8</sup> CICATA Unidad Morelos, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard de la Tecnología, 1036 Z-1, P 2/2, Atlacholoya, 62790, México

<sup>9</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>10</sup> Medical Research Unit in Human Genetics, UMAE Children's Hospital, National Medical Center "Siglo XXI", IMSS, Ciudad de México, 06720, Mexico

<sup>11</sup> Pathological Anatomy, Specialized hospital "Dr. Antonio Fraga Mouret", National Hospital "La Raza" Medical Center, IMSS, Ciudad de México, México

<sup>12</sup> Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>13</sup> Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>14</sup> Unit of Investigative Research on Oncological Diseases, Children's Hospital of Mexico "Federico Gomez", Mexico City, Mexico

Correspondence: Prof. Lilia G. Noriega and Prof. Porfirio Nava  
e-mail: [lilia.noriega@incmnsz.mx](mailto:lilia.noriega@incmnsz.mx); [pnava@fsio.cinvestav.mx](mailto:pnava@fsio.cinvestav.mx)

\*These authors contributed equally to this work.

© 2024 The Author(s). European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

[www.eji-journal.eu](http://www.eji-journal.eu)

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.



CELL INJURY, REPAIR, AGING, AND APOPTOSIS

# Rictor/Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Signaling Protects Colonocytes from Apoptosis and Prevents Epithelial Barrier Breakdown



Felipe Castro-Martínez,<sup>\*</sup> Aurora Candelario-Martínez,<sup>\*</sup> María R. Encarnación-García,<sup>\*</sup> Zayda Piedra-Quintero,<sup>1</sup> Raul Bonilla-Moreno,<sup>1</sup> Abigail Betanzos,<sup>1</sup> Rocío Pérez-Orozco,<sup>1</sup> María A. Hernández-Cueto,<sup>4</sup> José E. Muñoz-Medina,<sup>5</sup> Genaro Patiño-López,<sup>1</sup> Michael Schnoor,<sup>1</sup> Nicolás Villegas-Sepulveda,<sup>1</sup> and Porfirio Nava<sup>\*</sup>

From the Departments of Physiology, Biophysics, and Neurosciences,<sup>\*</sup> the Department of Molecular Biomedicine,<sup>1</sup> and the Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis,<sup>2</sup> Center for Research and Advanced Studies-National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico-City, Mexico; the Medicine Program for the Teaching and Development of Scientific Research in Itzacala (MEDICI Program),<sup>3</sup> Faculty of Advanced Studies Itzacala, National Autonomous University of Mexico, Mexico-City, Mexico; the Central Laboratory of Epidemiology,<sup>4</sup> Mexican Institute of Social Security, Mexico-City, Mexico; and the Laboratory of Research in Immunology and Proteomics,<sup>5</sup> Federico Gómez Children's Hospital of Mexico, Mexico-City, Mexico

Accepted for publication  
June 7, 2021.

Address correspondence to Porfirio Nava, Ph.D., Departments of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies-National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico-City, Mexico; or Nicolás Villegas-Sepulveda, Ph.D., the Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies-National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico-City, Mexico. E-mail: [pnava@cinvestav.mx](mailto:pnava@cinvestav.mx) or [nvillega@cinvestav.mx](mailto:nvillega@cinvestav.mx).

Epithelial barrier impairment is a hallmark of several pathologic processes in the gut, including inflammatory bowel diseases. Several intracellular signals prevent apoptosis in intestinal epithelial cells. Herein, we show that in colonocytes, rictor/mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) signaling is a prosurvival stimulus. Mechanistically, mTORC2 activates Akt, which, in turn, inhibits apoptosis by phosphorylating B-cell lymphoma 2 (BCL2) associated agonist of cell death (Bad) and preventing caspase-3 activation. Nevertheless, during inflammation, rictor/mTORC2 signaling declines and Akt activity is reduced. Consequently, active caspase-3 increases in surface colonocytes undergoing apoptosis/anoikis and causes epithelial barrier breakdown. Likewise, *Rictor* ablation in intestinal epithelial cells interrupts mTORC2/Akt signaling and increases apoptosis/anoikis of surface colonocytes without affecting the crypt architecture. The increase in epithelial permeability induced by *Rictor* ablation produces a mild inflammatory response in the colonic mucosa, but minimally affects the development/establishment of colitis. The data identify a previously unknown mechanism by which rictor/mTORC2 signaling regulates apoptosis/anoikis in intestinal epithelial cells during colitis and clarify its role in the maintenance of the intestinal epithelial barrier. (*Am J Pathol* 2021, 191: 1537–1549; <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.06.004>)

The equilibrium established by the proliferating cells at the crypt base and the cells shedding at the crypt surface is essential for maintaining a functional epithelial barrier in the colonic mucosa. Low rates of apoptosis are necessary to eliminate damaged or aged cells in the intestinal epithelium.<sup>1</sup> However, acute or chronic insults [eg, mucosal proinflammatory cytokines in the colon of patients with inflammatory bowel diseases (IBDs)] fuel apoptosis in intestinal epithelial cells (IECs).<sup>2</sup> In addition, the loss of cell junction proteins in the inflamed epithelium of IBD patients triggers anoikis, a specific apoptotic process aimed to eliminate damaged cells at the tip of intestinal villi.<sup>3</sup>

Thus, apoptosis and anoikis limit the reestablishment of the intestinal epithelial homeostasis and directly contribute to the destruction of the epithelial barrier in the mucosa of

Supported by the Dr. Rubén Lisker Biomedicine Award second edition, 2016, from the Institute of Beverages of the Mexican industry of Coca-Cola; the Secretary of Public Education-National Council of Science and Technology (SEP-Conacyt) grant 179 (N.V.-S./P.N.); and the sectorial funding for research and education via the grant for basic science from the National Council of Science and Technology (Conacyt) A1-S-20887 (P.N.).

F.C.-M., A.C.-M., and M.d.R.E.-G. contributed equally to this work.  
Disclosures: None declared.

# Evaluation and Quantification of Micro Epithelial Gaps in the Colonic Mucosa using Immunofluorescence Staining

Felipe Castro-Martínez<sup>1,2</sup>, María del Rocío Encarnación-García<sup>1,2</sup>, Aurora Candelario-Martínez<sup>1,2</sup>, Oscar Medina-Contreras<sup>3</sup>, Genaro Patiño-López<sup>4</sup>, Michael Schnoor<sup>2</sup>, Porfirio Nava<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) <sup>2</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) <sup>3</sup>Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología, y Nutrición (UIEEN), Hospital Infantil de México Federico Gómez <sup>4</sup>Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez

\*These authors contributed equally

## Corresponding Author

Porfirio Nava  
pnava@cinvestav.mx

## Citation

Castro-Martínez, F., Encarnación-García, M.d.R., Candelario-Martínez, A., Medina-Contreras, O., Patiño-López, G., Schnoor, M., Nava, P. Evaluation and Quantification of Micro Epithelial Gaps in the Colonic Mucosa using Immunofluorescence Staining. *J. Vis. Exp.* ( ), e62204. doi:10.3791/62204 (2021).

## Date Published

April 28, 2021

## DOI

10.3791/62204

## URL

jove.com/l/62204

## Abstract

Epithelial cells lining the intestinal mucosa create a physical barrier that separates the luminal content from the interstitium. Epithelial barrier impairment has been associated with the development of various pathologies such as inflammatory bowel diseases (IBD). In the inflamed mucosa, superficial erosions or micro-erosions that corrupt epithelial monolayers correspond to sites of high permeability. Several mechanisms have been implicated in the formation of micro-erosions including cell shedding and apoptosis. These micro-erosions often represent microscopic epithelial gaps randomly distributed in the colon. Visualization and quantification of those epithelial gaps has emerged as an important tool to investigate intestinal epithelial barrier function. Here, we describe a new method to visualize the specific location of where transcellular and paracellular permeability is enhanced in the inflamed colonic mucosa. In this assay, we apply a 10 kDa fluorescent dye conjugated to a lysine fixable dextran to visualize high permeability regions (HPR) in the colonic mucosa. Additional use of cell death markers revealed that HPR encompass apoptotic foci where epithelial extrusion/shedding occurs. The protocol described here provides a simple but effective approach to visualize and quantify micro-erosions in the intestine, which is a very useful tool in disease models, in which the intestinal epithelial barrier is compromised.

## Introduction

The gastrointestinal (GI) mucosa creates a physical barrier that separates the extracellular environment and the internal host milieu, and is involved in the absorption of nutrients, water and electrolytes. The intestinal barrier encompasses

a mucus layer constituted of glycoproteins, a monolayer of epithelial cells, and the underlying lamina propria where immune and stromal cells reside. Intestinal epithelial cells forming the physical barrier are linked together by different protein

# Tight Junctions in the Inflamed Gut



Maria del Rocio Encarnacion-Garcia and Porfirio Nava

**Abstract** The gastrointestinal system digests and absorbs nutrients while integrating exogenous and endogenous signals that contribute to create immune tolerance. Epithelial cells forming the physical barrier regulate ion, solutes, and water absorption in the gut. Tight junctions (TJs) are specialized cell-cell junctions that bring adjacent gastrointestinal epithelial cells together and seal the paracellular space. Additionally, TJs are important for maintaining cellular polarity in epithelial cells and in the gastrointestinal epithelium itself. Dysfunctional gastrointestinal TJ enhances leakage of luminal contents into the interstitium, a process that stimulates the development of inflammatory disorders. Therefore, the pathophysiology of the TJs has gained attention in the medical field. Several studies aimed to investigate the viability of those structures are now used in the diagnosis for patients with chronic gastrointestinal inflammation. This chapter focuses on analyzing the role of the TJs in the gut, the techniques employed to study these structures, as well as various mechanisms responsible for compromising the TJs and the intestinal epithelial barrier.

**Keywords** Gastrointestinal tract · Inflammation · Claudins · Occludin · Epithelial cells

## Abbreviations

AJ	Adherens junctions
AJC	Apical junctional complex
CK1	Casein kinase 1
cPKC	Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase C

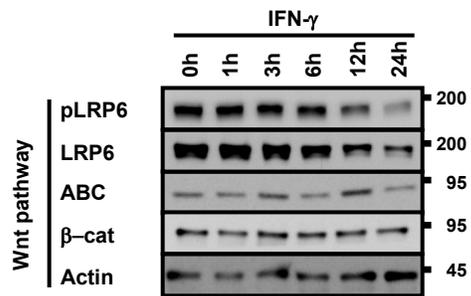
---

M. del Rocio Encarnacion-Garcia · P. Nava (✉)  
Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN),  
Mexico City, Mexico  
e-mail: [pnav@cinvestav.mx](mailto:pnav@cinvestav.mx)

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2022  
L. González-Mariscal (ed.), *Tight Junctions*,  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-97204-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-97204-2_6)

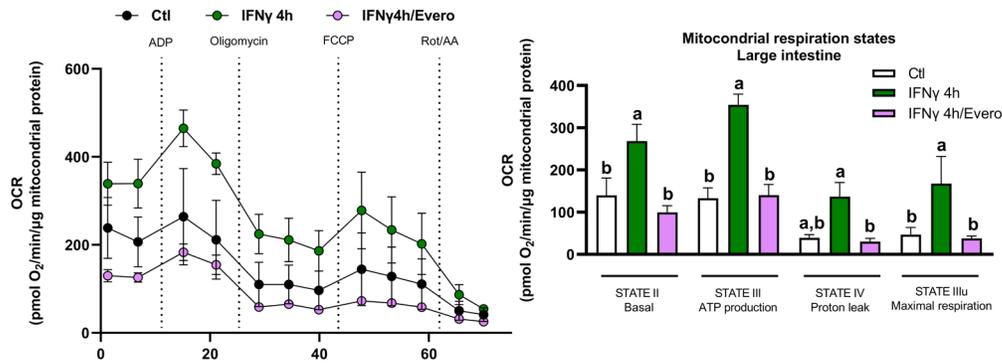
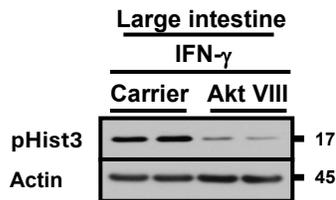
109

## Figuras suplementarias



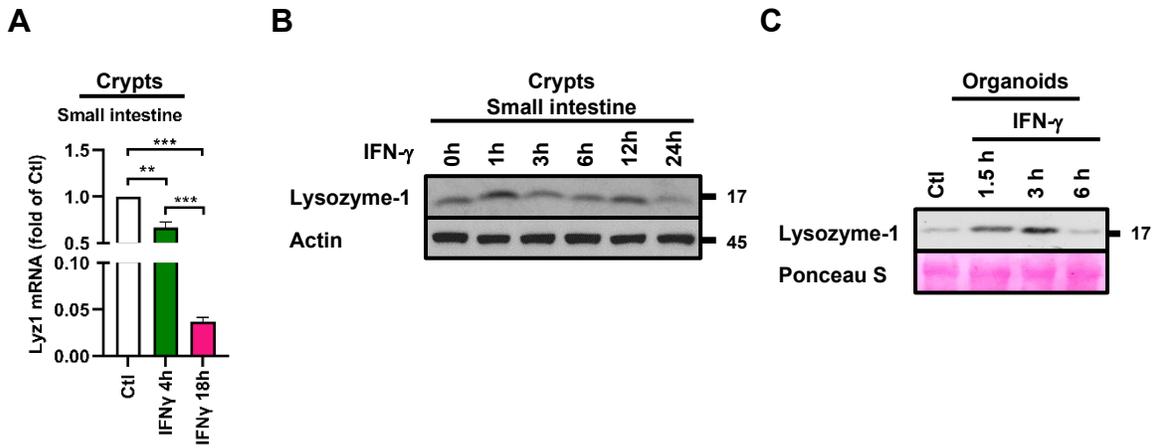
### **Figura suplementaria 1.**

Se evaluaron pLRP6, LRP6, ABC y  $\beta$ -catenina mediante Wb de mucosa colónica obtenida de animales control y tratados con IFN- $\gamma$ . Se sacrificaron ratones "knock-in" Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 1, 3, 6, 12 y 24 h después de la administración de la citocina. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra un Wb representativo de n=4 experimentos independientes.

**A****B****Figura suplementaria 2.**

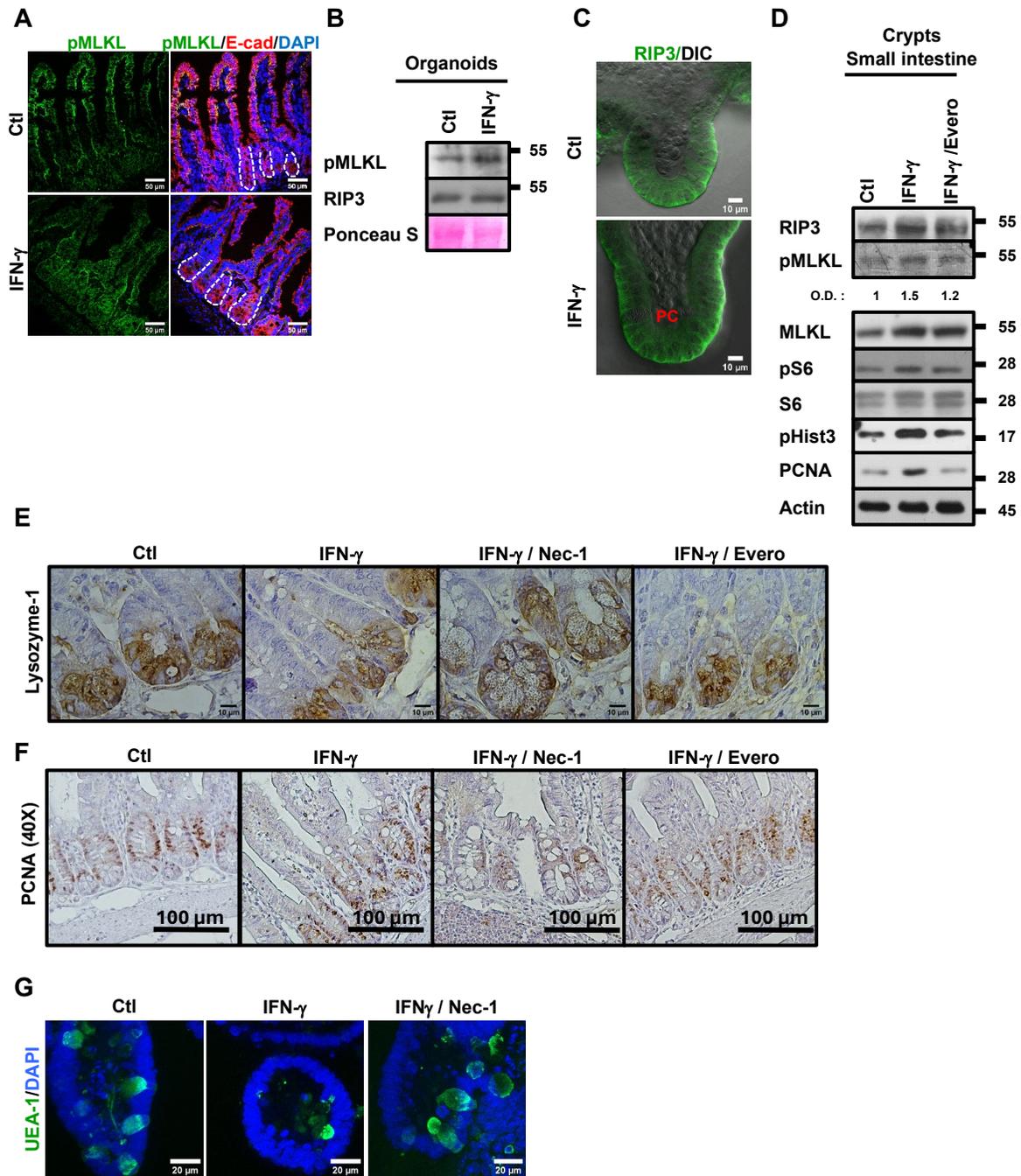
- A. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en mitocondrias aisladas de LI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o IFN- $\gamma$ /Everolimus (1 mg/Kg). Se administró everolimus (Evero) 30 minutos antes de la administración de IFN- $\gamma$ . El tratamiento llevó a cabo durante 4 h. La OCR se midió en condiciones basales y después de la inyección de ADP, oligomycin, FCCP y antimicina A/rotenona. Los estados respiratorios se calcularon restando los valores de OCR después de la administración de antimicina A/rotenona. n=4-8 ratones por grupo.
- B. pHist3 se evaluó mediante Wt de muestras SI y LI obtenidas de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o IFN- $\gamma$  más el inhibidor de la señalización de mTOR. Se administró Akt Inhibitor VIII (10 mg/kg, ip) 30 minutos antes de la inyección de IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados después de 4 horas después de la inyección de la citoquina. Actina se utilizó como control de carga. Se muestra un Wt representativo de n = 3 experimentos independientes.

Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y se combinan a partir de 3 experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los valores medios con diferentes letras minúsculas muestran diferencias estadísticas entre sí fueron  $a > b > c$  (A).



**Figura suplementaria 3.**

- Expresión de ARNm de Lyz1 en criptas aisladas de intestino delgado de ratones Wt tratados con MSA i.p. (Ctl) o IFN-  $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg, i.p.). Los ratones fueron sacrificados 4 o 18 h después de la inyección de citoquinas. La expresión de Lyz1 se normalizó a GAPDH.
- La lisozima-1 se evaluó mediante Wb de criptas aisladas colectadas del intestino delgado de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con IFN-  $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg). Los ratones fueron sacrificados 1 h, 3 h, 6 h, 12 h o 24 h después de la inyección de la citocina. Se utilizó actina como control de carga. n=6 experimentos independientes.
- La lisozima-1 se evaluó mediante Wb en organoides. El tratamiento con IFN-  $\gamma$  (20 ng/ml) se realizó durante 1,5, 3 y 6 h. La tinción de Ponceau se utilizó como control de carga. Transferencia representativa de n = 3 experimentos independientes.



**Figura suplementaria 4.**

- A. Tinción de inmunofluorescencia para pMLKL (verde) en criosecciones de SI de ratones control y tratados con IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de IFN. Núcleos=azul, Membrana celular (E-cadherina)= rojo. Barra = 50  $\mu$ m. Línea discontinua=Cripta. Se evaluaron 3 animales diferentes y se muestra una imagen representativa.

- B. pMLKL y RIP3 se evaluaron mediante Wb en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) se realizó durante 1.5 h. Se utilizó tinción de Ponceau como control de carga. Transferencia representativa de n = 3 experimentos independientes.
- C. Tinción de inmunofluorescencia (IF) para RIP3 (verde) en organoides. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) se llevó a cabo durante 1.5 horas. Barra = 10  $\mu$ m. Se realizaron 3 experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.
- D. RIP3, pMLKL, MLKL, pS6, S6, pHist3 y PCNA se evaluaron mediante Wb en criptas aisladas recolectadas de SI de ratones C57BL/6J inyectados i.p. con vehículo, IFN- $\gamma$  (2,5  $\mu$ g/kg) o IFN- $\gamma$ /Everolimus. Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de la citoquina. Se administró everolimus i.p. 30 minutos antes de la estimulación con citocinas. Actina se utilizó como control de carga. Se muestra una transferencia representativa de n = 3 experimentos independientes. D.O.= densidad óptica.
- E. La lisozima-1 se analizó mediante IHC en las criptas de Lieberkühn. Se tiñeron secciones de 4  $\mu$ m de tejido embebido en parafina. Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de citoquinas. Se administraron necrostatina-1 y everolimus por vía i.p. 30 minutos antes de la estimulación con citocinas. Barra= 10  $\mu$ m. n=3 animales.
- F. La distribución de PCNA se analizó mediante IHC en secciones de SI incluidas en parafina provenientes de ratones tratados con vehículo, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /Everolimus e IFN- $\gamma$ /Necrostatina-1. Los ratones fueron sacrificados 4 h después de la inyección de citoquinas. Se administraron necrostatina-1 y everolimus por vía i.p. 30 minutos antes de la estimulación con la citocina. Barra= 100  $\mu$ m.
- G. Tinción de inmunofluorescencia (IF) para UEA-1 (verde) en organoides. Los tratados con IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) o IFN- $\gamma$ /Necrostatina-1 se llevaron a cabo durante 1.5 horas. Se administró necrostatina-1 30 minutos antes de la estimulación con la citocina. Barra = 20  $\mu$ m. Se realizaron 3 experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.