

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **BIOLOGÍA**

### **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADAS POR P38, AKT Y STAT3 EN UN MODELO ANIMAL DE EXPOSICIÓN A PHIP: MODULACIÓN MEDIANTE SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON FIBRA Y PROBIÓTICOS**

**Sara Arizaga Cortés**

**Departamento de Biología Funcional  
Área de Fisiología**

**Mayo de 2024**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## RESÚMEN

El cáncer colorrectal es uno de los más comunes en la actualidad y las enfermedades que causan inflamación en el intestino aumentan el riesgo de desarrollar esta patología. A su vez, una dieta rica en carnes procesadas y cocinadas es fuente de aminas heterocíclicas (AHCs), unos compuestos con potencial carcinogénico. Estas pueden producir cambios en la regulación de las rutas metabólicas dentro de las células, llevando a respuestas proinflamatorias prolongadas que promueven el cáncer. Por el contrario, algunos tipos de fibra o los probióticos podrían tener efectos beneficiosos sobre estas rutas y contrarrestar el efecto de las AHCs.

En este trabajo se analizaron las proteínas p38, Akt y STAT3 para ver la modulación de sus respectivas rutas en tejido muscular estriado de rata, tras la administración de la AHC PhIP, junto con el compuesto dextrano sulfato de sodio (DSS). Asimismo, también se analizaron estas proteínas en tejido de ratas suplementadas con fibra y el probiótico VSL#3® para ver su posible efecto atenuante, comparándolo con el efecto del PhIP. Para ello se realizó la homogeneización del tejido y, posteriormente se llevaron a cabo técnicas de electroforesis y Western-Blot, con el fin de identificar y cuantificar las proteínas de interés.

Tras la obtención de los resultados se observó cierta modulación de las vías en algunos casos en el grupo PhIP+DSS. Sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes para el probiótico y la fibra. Se concluye en que se necesitan más estudios para confirmar el efecto del PhIP, probiótico y fibra en tejido muscular estriado de rata.

## ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common cancers nowadays and diseases that cause inflammation in the gut increase the risk of developing this pathology. In turn, a diet rich in processed and cooked meats is a source of heterocyclic amines (HCAs), compounds with carcinogenic potential. These can cause changes in the regulation of metabolic pathways within cells, leading to prolonged pro-inflammatory responses that promote cancer. Conversely, some types of fibre or probiotics may have beneficial effects on these pathways and counteract the effect of HCAs.

In this project, p38, Akt and STAT3 proteins were analysed for the modulation of their respective pathways in rat striated muscle tissue following the administration of the HCA PhIP together with the compound dextran sulphate sodium (DSS). In addition, these proteins were also analysed in rat tissue supplemented with fibre and the probiotic VSL#3® to see their possible attenuating effect, compared with the effect of PhIP. For this purpose, tissue homogenisation was performed and, subsequently, electrophoresis and Western-Blot techniques were carried out in order to identify and quantify the proteins of interest.

After the results were obtained, certain modulation of the pathways was observed in some cases in the PhIP+DSS group. However, no conclusive results were obtained for the probiotic and fibre. It is concluded that further studies are needed to confirm the effect of PhIP, probiotic and fibre on rat striated muscle tissue.

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

Dña. Sara Arizaga Cortés, estudiante del Grado en Biología de la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo, DECLARO:

Que el Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa, titulado “Vías de señalización intracelular mediadas por p38, Akt y STAT3 en un modelo animal de exposición a PhIP: modulación mediante suplementación dietética con fibra y probióticos.” y cuyas tutoras son Dña. Sonia González Solares y Dña. Aida Zapico Linares, es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

**Firma:**

Oviedo, a 29 de Mayo de 2024

## LISTADO DE ABREVIATURAS

AGCC – Ácido graso de cadena corta

AHC – Amina heterocíclica

AOM -Azoximetano

BMP - Proteína morfogenética ósea

CAC – Cáncer colorrectal asociado a colitis

CCR – Cáncer colorrectal

CMI – Célula madre intestinal

CU – Colitis ulcerosa

DO – Densidad óptica

DSS – Dextrano sulfato de sodio

EC – Enfermedad de Crohn

EI – Enfermedad inflamatoria del intestino

EGF – Factor de crecimiento epidérmico

ERK - Quinasas reguladas por señales extracelulares

GSK – Glucógeno sintasa

IL - Interleucina

ISAPP - Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos

JNK - Quinasa N-terminal c-Jun

MAPK – Proteínas quinasas activadas por mitógeno

mTORC - Complejo mamífero diana de la rapamicina

PhIP - 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinasa

PKB – Proteína quinasa B

PTEN - Fosfatasa

STAT3 – Transductor de señales y activador de transducción 3

*Sara Arizaga Cortés*



Universidad de Oviedo

TEM – Transición epitelio-mesenquimal

TGF – Factor de crecimiento transformante

TNF – Factor de necrosis tumoral

VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Factores que influyen en el CCR</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Factores de riesgo.....	1
1.1.2	Inflamación crónica.....	2
1.1.3	Fibra .....	2
1.1.4	Probióticos.....	3
<b>1.2</b>	<b>Causas del inicio del tumor en el colon</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Vías metabólicas y marcadores</b> .....	<b>4</b>
1.3.1	Vía MAPK/p38 .....	4
1.3.2	Vía PI3K/Akt.....	6
1.3.3	Vía STAT3.....	7
<b>1.4</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Diseño experimental previo al trabajo</b> .....	<b>9</b>
2.1.1	Ratas.....	9
2.1.2	Xenobiótico .....	9
2.1.3	Probiótico y fibra.....	10
2.1.4	Tratamiento y grupos experimentales.....	10
<b>2.2</b>	<b>Materiales</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Soluciones .....	11
2.2.2	Anticuerpos .....	12
<b>2.3</b>	<b>Procedimiento experimental</b> .....	<b>13</b>
2.3.1	Homogeneización de tejidos .....	13
2.3.2	Electroforesis y Western-Blot.....	13
2.3.3	Preparación de los geles de electroforesis .....	13
2.3.3.1	Electroforesis y transferencia .....	13
2.3.3.2	Incubación con anticuerpos y revelado .....	14
2.3.4	Análisis estadístico .....	15
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Análisis de la expresión y activación de p38</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Análisis de la expresión y activación de AKT</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Análisis de la expresión y activación de STAT3</b> .....	<b>19</b>



<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>22</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el cuarto tipo de cáncer con más incidencia en todo el mundo y la quinta causa de muerte por cáncer, según datos del año 2022, recogidos del Observatorio Global de Cáncer. Europa es el segundo continente con un mayor número de nuevos casos (30%), siendo Asia el único que lo supera con un 47,6% de incidencia. Además, se prevé que, a pesar de que en la actualidad son más comunes los programas de detección que permiten detectar un mayor número de casos a tiempo, tanto el número de nuevos casos como la mortalidad sigan aumentando de manera que para el año 2040 la incidencia haya ascendido al 63% a nivel mundial y la mortalidad al 73% (1,2).

## 1.1 Factores que influyen en el CCR

### 1.1.1 Factores de riesgo

Los factores de riesgo de CCR son muy variados. A veces puede haber un componente hereditario, pero normalmente la mayoría de los casos son esporádicos. La presencia de otras patologías, como, por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o enfermedades autosómicas dominantes como el pólipo adenomatoso familiar o el síndrome de Lynch incrementan el riesgo de CCR (2).

Por otra parte, existen otros factores que también contribuyen a aumentar el riesgo de CCR, pero que pueden ser modificados por el individuo. Entre estos cabe mencionar un estilo de vida sedentario, el estrés, la contaminación, el consumo de tabaco, la obesidad o el microbioma (2–4). Los dos últimos están estrechamente relacionados con el tipo de dieta, que constituye uno de los factores modificables más importantes en el contexto del CCR. Por ejemplo, existen evidencias de que una dieta occidental, caracterizada por una elevada ingesta de grasas, carbohidratos y productos refinados, bajo contenido en fibra y alimentos frescos (5) está relacionada con una mayor incidencia del CCR (2). A nivel individual, las carnes rojas y procesadas se encuentran entre los principales alimentos que acumulan evidencias en cuanto al CCR, puesto que contienen compuestos como sulfuros, grasas saturadas y hierro hemo, los cuales generan un mayor estrés oxidativo y provocan que se formen potenciales agentes carcinogénicos (6). Además, durante el cocinado a altas temperaturas de este tipo de carnes también se generan compuestos con potencial mutagénico, entre los cuales destacan las aminas heterocíclicas (AHCs), un tipo de xenobióticos, es decir, “agentes químicos que se encuentran en los organismos o el medio ambiente pero no son producidos en estos”. Algunos de ellos, como los antibióticos o los antioxidantes tienen efectos beneficiosos, pero existe un gran número de xenobióticos cuya exposición prolongada puede dar

lugar a patologías como el cáncer (7). Las AHCs son absorbidas en el intestino y llegan a las células pudiendo producir mutaciones tras un consumo excesivo y habitual de los alimentos que las contienen (4,6). Una de las más comunes es el 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP), un agente carcinogénico que se encuentra en carnes fritas y que es la AHC que presenta mayores niveles de ingesta en la población (8).

### **1.1.2 Inflamación crónica**

La inflamación crónica es una condición que predispone a padecer CCR y es característica de patologías como la colitis ulcerosa (CU) o la enfermedad de Crohn (EC). Durante un estado inflamatorio prolongado la función de la barrera intestinal se ve afectada, de modo que aumenta su permeabilidad, lo que facilita que moléculas genotóxicas penetren el epitelio y entren en las células madre intestinales (CMIs), provocando daños en el ADN (9). Estos cambios pueden dar lugar a mutaciones en las CMIs en genes clave para la formación y promoción de tumores, mediante la activación de la transcripción de oncogenes e inhibición de los genes supresores de tumores, dando lugar al inicio del cáncer (4,9).

Asimismo, debido a la inflamación, el epitelio intestinal se está renovando constantemente, lo que conlleva a una regeneración excesiva que fomenta el crecimiento celular y la proliferación de las células tumorales, provocando la promoción del tumor. (4).

Para estudiar los procesos inflamatorios y simular distintos estados de inflamación del tracto intestinal en modelos animales, suele utilizarse el compuesto dextrano sulfato de sodio (DSS), un polisacárido que induce daño en el epitelio intestinal, de manera que provoca un incremento de la permeabilidad de la barrera, lo que termina dando lugar a inflamación. Por ello, este compuesto es muy útil para producir efectos similares a los de la CU humana en ratones. El nivel de daño producido depende de la concentración administrada, así como de la frecuencia y de la duración de cada estudio. Normalmente se suelen utilizar concentraciones de entre 1,5% y 3% (10).

### **1.1.3 Fibra**

La fibra se define como “*polímeros de carbohidratos comestibles con tres o más unidades monoméricas que son resistentes a enzimas digestivos endógenos y que, por tanto, no son hidrolizados ni absorbidos en el intestino delgado*” (11). Existen distintos tipos de fibra dependiendo de sus propiedades (11), por ejemplo, las insolubles contribuyen a aumentar la masa fecal, mientras que la mayoría de fibras solubles son fermentables. Estas son utilizadas como sustrato por la microbiota, definida como el conjunto de microorganismos que habitan en el intestino e interaccionan entre sí y con el hospedador, conformando un ecosistema complejo, dinámico y heterogéneo en el espacio (12). Algunas de las bacterias que forman parte de la microbiota tras la fermentación producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estos son utilizados por los colonocitos como fuente de energía y tienen efectos beneficiosos, como la

contribución al mantenimiento de la barrera intestinal mediante la estimulación de producción de moco. Además, el consumo regular de fibra reduce el uso de otros nutrientes por parte de la microbiota, como los aminoácidos, cuya fermentación genera metabolitos más perjudiciales con efectos proinflamatorios (11).

Por tanto, algunas fibras se consideran prebióticos, que, según se ha establecido en el convenio de la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP), son “sustratos selectivamente utilizados por la microbiota intestinal que confieren beneficios para la salud”. Asimismo, cabe resaltar que no todas las fibras se ajustan a estos requisitos, pues depende de sus propiedades, así como del tipo de organismo que las consuma (13).

#### **1.1.4 Probióticos**

Los probióticos son una o más cepas seleccionadas de microorganismos que en las cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos en el organismo y ayudan a mantener el equilibrio de la microbiota (14). En relación con el CCR, algunas especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de promover apoptosis e inhibir el crecimiento y la proliferación de células tumorales, además de intervenir en la protección de la barrera intestinal, ya que son eficaces en la fermentación de carbohidratos complejos que producen AGCC. Asimismo, los probióticos también poseen la capacidad de unirse a sustancias carcinogénicas como las AHCs, por lo que se ha visto que su consumo en conjunto con productos cárnicos fritos reducía la mutagenicidad (15).

## **1.2 Causas del inicio del tumor en el colon**

Las mutaciones que inician el tumor se producen principalmente en las CMI y provocan una reprogramación metabólica en estas, es decir, cambios en el metabolismo celular que promueven la activación de genes relacionados con la proliferación y crecimiento celular de forma excesiva. Por esta razón, se activan también rutas del metabolismo de la glucosa, lípidos, glutamina y otros metabolitos, ya que las células requieren de una gran cantidad de energía para estar dividiéndose constantemente (16). Las CMI reprogramadas, posteriormente se diferencian a otros tipos celulares como los enterocitos del epitelio intestinal, que mantendrán esas mutaciones y funcionarán como células tumorales (17).

No obstante, no hay una única mutación que inicie el tumor, sino que dependiendo de las posibles causas que lleguen a producir estos cambios metabólicos, pueden ocurrir unas mutaciones u otras, de modo que las rutas metabólicas que se activen o inhiban pueden variar entre casos y esto determinará el desarrollo del cáncer. En el 70% de los casos, el tumor se inicia por mutación en el gen de la poliposis adenomatosa coli (*APC*), contribuyendo a la pérdida de su función (16).

### 1.3 Vías metabólicas y marcadores

Existen múltiples vías metabólicas implicadas en el CCR, las cuales interactúan entre sí a través de distintos factores. Muchas de ellas activan procesos que favorecen el inicio y/o el desarrollo del tumor, como la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, la cual es activada en exceso tras una mutación en el gen APC y posterior mutación del gen KRAS (16–20). Además de esta, son también importantes la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK/p38), la del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt o la ruta del transductor de señales y activador de transducción 3 (STAT3). Todas ellas, están implicadas en la activación y transcripción de genes con funciones como la proliferación y el crecimiento celular, la supervivencia por medio de inactivación de apoptosis, angiogénesis o la progresión hacia metástasis. Como resultado de la reprogramación metabólica, estas vías están desreguladas y sobre activadas en el CCR dando lugar a la formación de mutaciones y la producción de ciertas moléculas que las activan, como algunas citocinas producidas por células del microambiente tumoral (16–18,20).

Por el contrario, también existen algunas rutas metabólicas que contribuyen a contrarrestar la progresión tumoral como son la vía Hippo, la del gen supresor de tumores p53 y la ruta de la proteína morfogenética ósea (BMP)/SMAD, que en el contexto de CCR se encuentran inhibidas o con poca actividad como resultado de la mutación y silenciamiento de determinados genes. Por último, vías como la de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y la del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) presentan una función ambigua, y, dependiendo del estado en el que se encuentre el cáncer en un momento determinado y la existencia de otras vías activas, tendrán funciones anti o pro oncogénicas (18,20).

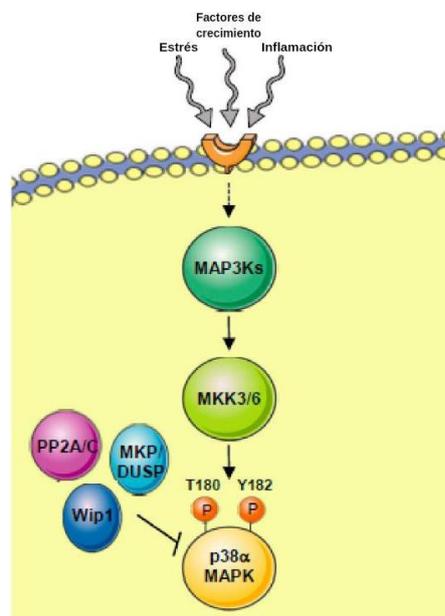
Existen muchas más rutas metabólicas implicadas en el desarrollo de CCR, además de las mencionadas, sin embargo, en este trabajo se profundizará en aquellas en las que están implicadas las proteínas p38, Akt y STAT3.

#### 1.3.1 Vía MAPK/p38

La proteína p38 forma parte de la vía de MAPK, junto con otras subfamilias de proteínas como las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y las JNK. Por ello, dentro de las MAPK existen varias rutas metabólicas intracelulares (21,22), las cuales son activadas por factores externos de estrés, generalmente ambientales o metabolitos tóxicos producidos por las células. Su activación depende de la duración y la intensidad del estrés, lo que modulará la fosforilación de los factores y determinará el efecto final ya que se regulará la vía de una forma u otra. Asimismo, existen cuatro isoformas de p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ ) las cuales pueden variar dependiendo del tipo de tejido y, por tanto, también influirán en la modulación de las vías y sus múltiples funciones (22,23), entre las que se encuentran la regulación de la proliferación celular,

diferenciación, apoptosis y migración celular (18,22,23), y algunos procesos de envejecimiento celular (24).

Existe más de una ruta de activación de p38, pero la más conocida es la canónica, que consiste en que la activación del receptor por la unión de su ligando provoca la activación de un tipo de quinasas, las MAP3K, que a su vez fosforilan a otras dos quinasas, la MKK3 y la MKK6, las cuales se encargan de fosforilar y activar a p38 (**Figura 1**). Aparte de factores externos de estrés, otros activadores de la vía pueden ser la citocina inflamatoria factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), las interleucinas (IL)-1 e IL-6 (21–23), o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (18). Por otro lado, los efectores sobre los que actúa p38 son muy variados y se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. Estos pueden ser factores de transcripción o citocinas y pueden presentar regulación a nivel transcripcional o postranscripcional (22).

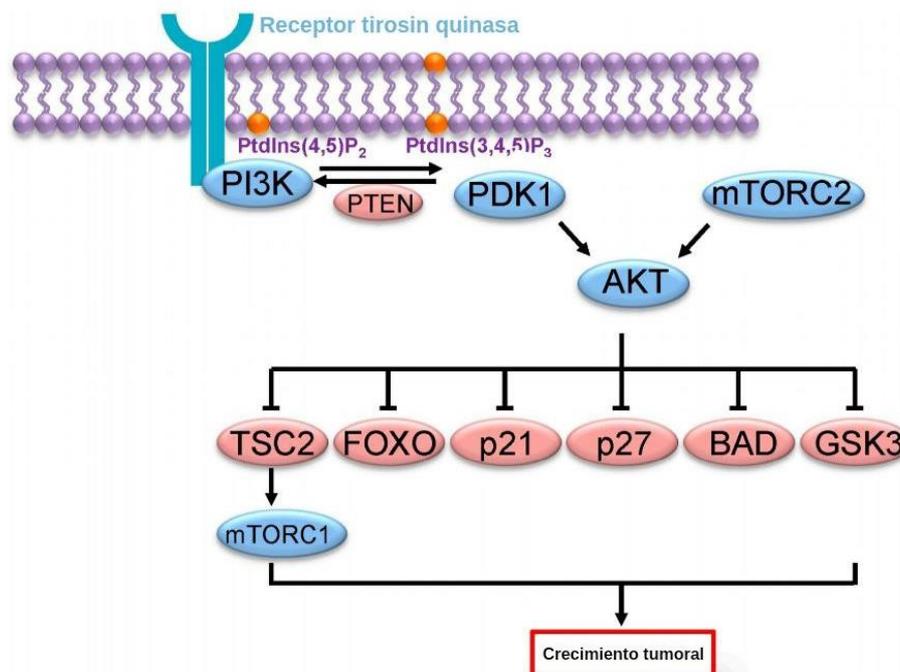


**Figura 1:** Esquema de la ruta canónica de activación de p38. (Imagen adaptada, (23))

Hay evidencias de que esta vía se encuentra con mayor actividad en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), CU o la EC, ya que en estos casos la activación de la cascada conlleva a una mayor producción de citocinas proinflamatorias en el ambiente intestinal, y al reclutamiento y la activación de linfocitos y neutrófilos, así como una menor apoptosis de estas células inmunes (21). En relación con el cáncer colorrectal, no están demasiado claras las funciones de p38, ya que se ha visto que tiene un papel dual, dependiendo de diversos factores, como el tipo de tejido o el estado del tumor. En algunos casos, además de funciones oncogénicas como la supervivencia, la expresión de p38 también estimula la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos y la metástasis (23).

### 1.3.2 Vía PI3K/Akt

La proteína quinasa B (PKB), también llamada Akt es una quinasa que forma parte de la ruta PI3K/Akt (25,26), la cual puede ser activada por diversas moléculas, entre ellas, factores de crecimiento como el EGF (17,25,27) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o proteínas G (25). Tras la unión del ligando al receptor, este se auto fosforila y activa a la quinasa PI3K, que actúa fosforilando a PIP2 dando lugar a PIP3 en la membrana plasmática (18,20,26). Este último, provoca el reclutamiento de las proteínas quinasa 1 dependiente de fosfoinositida (PDK1) y el complejo mamífero diana de la rapamicina (mTORC2), ambas necesarias para la fosforilación de Akt en residuos de serina-treonina (28) (**Figura 2**). En condiciones normales esta vía está regulada por la fosfatasa PTEN, la cual es activada por la propia vía y actúa sobre PIP3, desfosforilándolo e inactivando la vía (26). Por otra parte, una vez activada, Akt fosforila un amplio número de proteínas, como la proteína TSC2 o la quinasa glucógeno sintasa 3 (GSK3), entre otros, lo cual conlleva a la regulación de procesos implicados en la supervivencia de las células y su crecimiento, controlando el ciclo celular, la síntesis de proteínas y el metabolismo del glucógeno (26,28).



**Figura 2:** Activación de Akt a través de la fosforilación de PI3K por un receptor tirosin quinasa. También se muestran algunas de las proteínas que fosforila Akt una vez activo. (Imagen adaptada (28))

En el caso del CCR ocurre una desregulación de la vía debido a mutaciones que se acumulan, que terminan causando una activación constitutiva de la ruta, es decir, se mantiene activa sin necesidad de que el ligando se una a su receptor y, por tanto, se produce una sobreexpresión de Akt fosforilada, además de una expresión anormal de PTEN que, en conjunto, impide detener la cascada. A causa de ello, se ha visto que se promueve en exceso la división celular y se produce la supresión de apoptosis en el 70% de pacientes (18). Además, Akt también puede fosforilar y

activar proteínas que participan en la transición epitelio-mesenquimal (TEM), de modo que promueve la expresión de factores que favorecen la migración celular como los marcadores mesenquimales; e inhibe marcadores epiteliales, los cuales juegan un papel crucial en la progresión hacia metástasis (29).

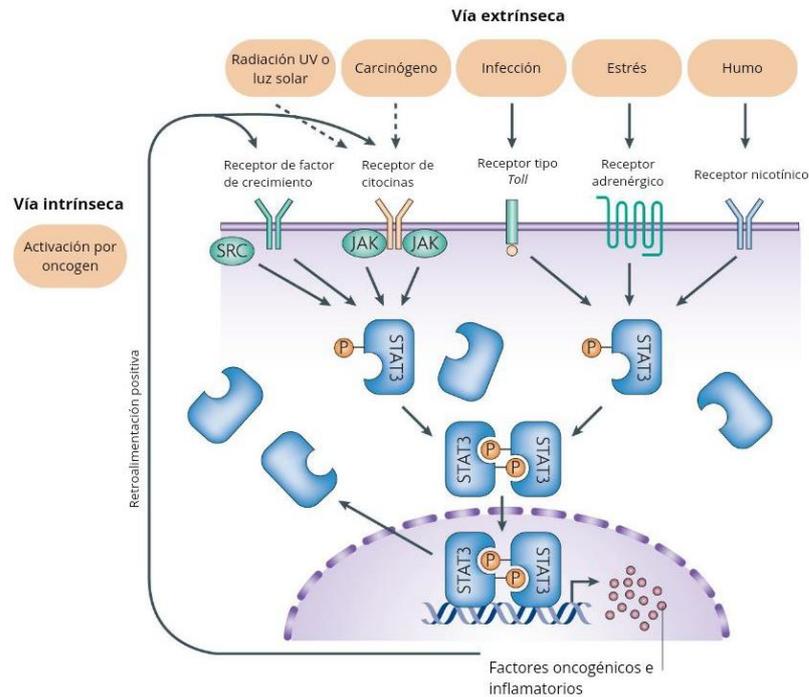
### 1.3.3 Vía STAT3

STAT3 es una proteína de la familia de transductores de señales y activadores de factores de transcripción (STAT). Cuando se activa, se transloca al núcleo para activar distintos genes, por lo que participa en múltiples procesos. Esto se debe a que puede ser activada por un gran número de factores, entre ellos, citocinas como IL-6, IL-11; factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el VEGF (17), o proteínas de la familia *Janus*-quinasas (JAK). Estas últimas, a su vez, pueden ser activadas por STAT3, de modo que la vía se retroalimenta (30,31). Asimismo, también puede intervenir en su activación la ruta de las MAPK (17). En condiciones normales, STAT3 participa en procesos que promueven la proliferación y el crecimiento celular (30).

En cambio, al igual que ocurre con otras rutas metabólicas, en los tumores hay una desregulación metabólica que provoca que la cascada esté activa constitutivamente y, por tanto, contribuya al avance del tumor mediante la inhibición de apoptosis y la promoción de la angiogénesis y metástasis (30,31), además promover la evasión del sistema inmune mediante la inactivación de células inmunes con respuesta antitumoral como los linfocitos Th1, o la proliferación de células supresoras de la respuesta inmune contra el cáncer, como linfocitos Th2, Th17 o Treg, entre otras (30).

Asimismo, la activación constitutiva de STAT3 puede darse de forma extrínseca o intrínseca (**Figura 3**). En la vía extrínseca diversos factores ambientales de estrés relacionados con el cáncer como el efecto de un agente carcinogénico o la radiación ultravioleta contribuyen a la activación de distintos tipos de receptores, entre ellos, receptores de factores de crecimiento o receptores de citocinas, lo que resulta en la posterior fosforilación y activación de la proteína STAT3 en el citoplasma y su translocación al núcleo en forma de dímeros para activar la expresión de un amplio número de oncogenes y genes de citocinas proinflamatorias. A su vez, esos productos pueden actuar directamente sobre los receptores de la propia célula u otras. Por otro lado, la vía intrínseca ocurre en células ya tumorales, en las que los factores oncogénicos e inflamatorios

producidos por estas provocan una sobre activación en receptores de factores de crecimiento tipo quinasa y a receptores de citocinas de la familia JAK y, por tanto, de STAT3 (32).



**Figura 3:** Rutas extrínseca e intrínseca de la activación de STAT3 durante la inflamación y sus activadores. (Imagen adaptada (32))

## 1.4 Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta la evidencia disponible en la literatura hasta el momento, y que las rutas metabólicas en el CCR y en la inflamación crónica expuestas en los apartados anteriores suelen activarse y promover procesos proinflamatorios, se espera que, por un lado, la ingesta de un xenobiótico contribuya a su activación y, por otro lado, la ingesta de fibra o probiótico contrarresten este efecto.

El objetivo de este trabajo es analizar la modulación de tres rutas metabólicas (MAPK/p38, PI3K/Akt y STAT3) en el contexto del CCR, tras la inducción de inflamación por la ingesta del carcinógeno PhIP, junto con DSS e identificar el papel de la suplementación con fibra o con probiótico como componentes capaces de revertir este efecto.

## 2 METODOLOGÍA

Las muestras utilizadas en este trabajo forman parte del Proyecto RTI2018-098288-B-I00 (acrónimo MIXED), financiado por el MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, “Una manera de hacer Europa”. Para las determinaciones efectuadas se utilizarán muestras biológicas que habían sido congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  previamente y para la interpretación de los datos obtenidos se consideraran algunas variables obtenidas previamente por el equipo investigador y que se encuentran actualmente en proceso de revisión (33).

## 2.1 Diseño experimental previo al trabajo

### 2.1.1 Ratas

Ratas Fischer 344/NHsd macho de 7 semanas de edad y 200 g de peso, obtenidas de los Laboratorios Charles River, las cuales se mantuvieron en el Bioterio de la Universidad de Oviedo bajo ciclos regulados de 12 h de luz-oscuridad y a temperatura constante ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa ( $55\pm 15\%$ ). Los animales fueron alojados por parejas en jaulas de polipropileno, teniendo acceso libre a agua del grifo y dieta en *pellets*. Se mantuvieron 7 días en aclimatación antes de clasificarlos en grupos experimentales.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Oviedo (PROAE 48/2019). La investigación y manipulación de animales fue estrictamente adherida a la normativa nacional e internacional de la experimentación animal: Ley española 32/2007 del 9 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transportación, experimentación y sacrificio, en el Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y en la Orden ECC/566/2015, del 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de formación que debe reunir el personal para el manejo de los animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia. Siempre se garantizó el bienestar de los animales, en la medida de lo humanamente posible, siendo conscientes de que no existe ningún método de experimentación animal diseñado para el proyecto. Los procedimientos utilizados con animales se clasifican en la categoría A: estudios o experimentos que causan poca incomodidad o estrés. Podrían incluir el mantenimiento de animales cautivos, inyecciones, sangrados no terminales, métodos de eutanasia aceptados para la extracción de tejidos, experimentos de agudeza terminal en animales totalmente anestesiados. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el Bioterio de la Universidad de Oviedo (N.º de registro: ES 33 044 0003591). Esta parte del trabajo se efectuó previamente al TFG por personal con la capacitación específica para el desarrollo de estas tareas.

### 2.1.2 Xenobiótico

Se administró mediante sonda intragástrica el xenobiótico PhIP (1mg/kg), además de DSS al 1,5% (v/v) disuelto en el agua de bebida. El PhIP se les administró desde la semana 2 hasta la 5 (de lunes a viernes), y el DSS durante el mismo periodo de tiempo (de miércoles a domingo), lo que implica que durante tres días se solapó el efecto de los dos compuestos.

### 2.1.3 Probiótico y fibra

El probiótico empleado fue VSL#3®, el cual lo componen 4 cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus*), 3 cepas de *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum*, y *B. infantis*) y 1 cepa de *Streptococcus* (*S. salivarius* subespecie *thermophilus*). Se administró una dosis de  $10^8$ - $10^9$  microorganismos vivos por gramo, en forma de polvo dentro de la dieta.

Se administró una dieta prebiótica con fibra al 5,9%.

### 2.1.4 Tratamiento y grupos experimentales

El tratamiento que se había administrado a las ratas tuvo una duración de cinco semanas. Los primeros siete días se alimentó a todos los individuos con una dieta estándar y, al cabo de ese tiempo, los animales se dividieron en 4 grupos de 11 ratas cada uno. Así, durante las tres semanas posteriores se aplicaron los siguientes tratamientos para cada grupo:

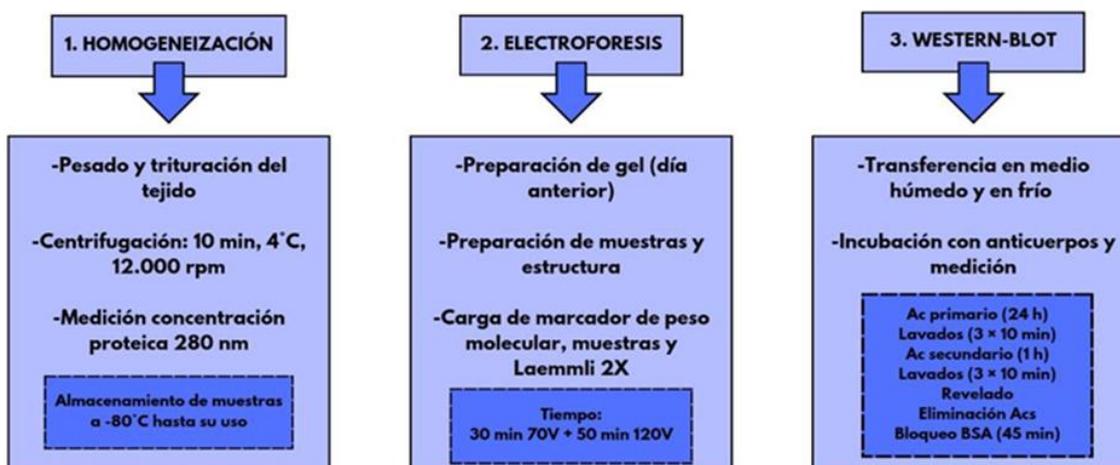
- ♦ Grupo Control (C): dieta estándar.
- ♦ Grupo Xenobiótico (X): dieta estándar y administración de PhIP y DSS.
- ♦ Grupo Xenobiótico-Probiótico (XP): dieta con probiótico VSL#3® y administración de PhIP y DSS.
- ♦ Grupo Xenobiótico-Fibra (XF): dieta con la fibra y administración de PhIP y DSS.

Para los grupos X, XP y XF la semana 6 consistió en un periodo de recuperación, donde se dejó de dar PhIP y DSS y tan sólo se continuó administrando la dieta en cada caso (estándar, probiótico o fibra). Después, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> para extraer el tejido muscular estriado.

## 2.2 Materiales

Durante el procedimiento experimental de este trabajo de fin de grado, primero se homogeneizó tejido muscular estriado de rata para, posteriormente, realizar experimentos de electroforesis y Western-Blot con el fin de cuantificar las proteínas de interés. Después, se analizaron los

resultados mediante programas informáticos. En la **Figura 4** se muestra un esquema de los pasos seguidos, explicados más adelante.



**Figura 4:** Resumen esquemático del procedimiento seguido en el laboratorio.

### 2.2.1 Soluciones

Para la homogeneización:

- Tampón de homogeneización: 20 mM solución HEPES para *buffer* (ITW Reagents), 100 mM cloruro de sodio (NaCl) (*Sodium Chloride*, >= 99,5%, Thermo Scientific Chemicals, Fisher Scientific), fluoruro sódico (NaF) (Merck), 5 mM EDTA (Gold Biotechnology®, Goldbio), 1% Triton X-100 (J. T. Baker®, Fisher Scientific). Al tampón de homogeneización se le añadieron 12 µL de inhibidores de proteasa, 3 µL de ortovanadato de sodio 1mM (MP Biomedicals) y 1,5 µL de pirofosato 0,25 mM.
- Tampón de carga Laemli 2X: 4% SDS (*Dodecyl sulfate, sodium salt, 85%, pure*, Thermo Scientific™, Fisher Scientific), 10% 2-mercaptoetanol (VWR Chemicals), 20% glicerol (Sigma-Aldrich®), 0,0004% azul bromofenol (Sigma-Aldrich®), 0,125M TRIS (Thermo Scientific™, Fisher Scientific).

Para los geles:

- Acrilamida (*Acrylamide Liquid (30%) Solutions*, Thermo scientific™, Fisher scientific), Bis (*bis-Acrylamide, 2% solution*, Fisher bioreagents™), TRIS, APS, SDS, TEMED (Santa Cruz Biotechnology)

Para la electroforesis y la transferencia:

- Tampón de electroforesis 10X: 248 mM TRIS, 1,92 M glicina (Fisher Scientific), 1% SDS y agua destilada.
- Tampón de transferencia a pH 8,3: 248 mM TRIS, 1,92 M glicina, agua destilada.

- TBST 10X a pH 7,6: 200 mM TRIS, 1,5 M NaCl, 1% Tween 20.
- PBS a pH 7,4: 1,4M NaCl, 0,03M cloruro de potasio (KCl) (Merck), 0,1M fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (*Sodium hydrogen phosphate, anhydrous, ACS, 99.0% min*, Thermo Scientific™, Fisher Scientific), 0,02M dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (*VWR Chemicals*), agua destilada.
- Solución de bloqueo: 5% albúmina serobovina (BSA) libre de proteasas (Gold Biotechnology®, *Goldbio*), en solución TBST 1X, elaborada a partir de la solución de TBST 10X.
- Tinción Amido Black: 50% metanol (CH<sub>3</sub>OH) (*Methanol, >= 99,9%*, Fisher Scientific), 10% ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) (*Acetic acid, glacial 99,5% AGR*, Labkem), 0,1% Amido Black, agua destilada.
- Solución de lavado: 20% metanol, 7,5% ácido acético, agua destilada.
- Solución para la eliminación de anticuerpos unidos a membrana a pH 2,2: 0,2M Glicina, 0,1% SDS, 1% Tween 20 (Santa Cruz Biotechnology), agua destilada.
- ECL (*ECL Prime, chemiluminiscent western*, Cytiva Amersham™, Fisher Scientific)

### 2.2.2 Anticuerpos

Los anticuerpos empleados para realizar el Western-Blot fueron los siguientes: anticuerpo policlonal p38 rabbit pAb (ES8347, ELK Biotechnology) y p38 MAPK rabbit pAb (fosforilada) (p38 MAPK rabbit pAb, s. f.), anticuerpo policlonal Akt (ES1626, ELK Biotechnology) y Akt (phospho Ser473) rabbit pAb (ES1255, ELK Biotechnology), anticuerpo policlonal STAT3 rabbit mAb (A22434, Abclonal) y STAT3 (phospho Tyr705) rabbit pAb (ES1406, ELK Biotechnology), B-actina (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), anticuerpo secundario Rabbit (Abcam) y el marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant, 1 ml #1610363*, BioRad s. f.). Las diluciones empleadas para cada anticuerpo se muestran en la **Tabla 1**.

ANTICUERPO	DILUCIÓN
<b>P38 (TOTAL Y FOSFORILADA)</b>	1:3000
<b>AKT (TOTAL Y FOSFORILADA)</b>	1:2000
<b>STAT3 (TOTAL Y FOSFORILADA)</b>	1:3000
<b>B-ACTINA</b>	1:5000
<b>ANTICUERPO SECUNDARIO</b>	1:30000

Tabla 1: Concentraciones empleadas para cada anticuerpo

## 2.3 Procedimiento experimental

### 2.3.1 Homogeneización de tejidos

De cada muestra de tejido muscular estriado, las cuales se encontraban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se pesaron con una balanza y se cortaron con un bisturí 10 mg a los que se le añadieron 300  $\mu\text{L}$ /muestra del buffer de homogenización. Para extraer las proteínas del tejido muscular se realizó una homogeneización mecánica empleando un émbolo para triturar el tejido, siempre manteniendo los tubos en hielo. Luego, se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  a 12.000 rpm durante 10 min. Se recogió el sobrenadante, del que se determinó la concentración de proteína total de cada muestra midiendo su absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro *NanoDrop*. Finalmente, las proteínas extraídas se mantuvieron congeladas hasta su análisis en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  de muestra + 25  $\mu\text{L}$  del tampón de carga, Laemmli 2X).

### 2.3.2 Electroforesis y Western-Blot

Se llevaron a cabo estas técnicas varias veces con el fin de analizar un número de muestras (n) que permitiera obtener resultados significativos, teniendo en cuenta los posibles errores que pudieran ocurrir durante el proceso. El procedimiento realizado en el laboratorio fue el siguiente:

### 2.3.3 Preparación de los geles de electroforesis

Para cada ensayo de Western-Blot se prepararon geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) un día antes de realizar la electroforesis. Para cada uno de ellos se prepararon las mezclas del gel de empaquetamiento al 5% de acrilamida y del gel de resolución al 8%, en tubos de ensayo según las cantidades indicadas en la **Tabla 2**. Una vez formados, los geles se envolvieron en papel empapado con agua para mantenerlos húmedos y se dejaron en una nevera durante toda la noche para facilitar su polimerización.

PREPARACIÓN DE GELES	GEL RESOLUCIÓN (8%)	GEL EMPAQUETAMIENTO (5%)
AGUA DESTILADA (%)	35,3	60,5
ACRILAMIDA (%)	26,67	16,75
BIS (%)	11	7
TRIS (%)	25 (a pH 8,8)	12,5 (a pH 6,8)
APS (%)	1	1
SDS (%)	1	1
TEMED (%)	0,004	0,1

Tabla 2: Reactivos y proporciones utilizados para la realización de los geles de poliacrilamida al 8% (gel de resolución) y al 5% (gel de empaquetamiento).

#### 2.3.3.1 Electroforesis y transferencia

Se prepararon ocho muestras por cada gel para la electroforesis (en cada gel dos C, dos X, dos XP y dos XF). Para ello, a partir de las muestras en Laemmli 2x, se calculó el volumen de muestra

necesario para tener 20µg de proteína en tubos Eppendorf de PCR y se llevó a un volumen total de 12 µL añadiendo Laemmli 1X. Las alícuotas se agitaron con vórtex para mezclar, se calentaron a 100°C en el termociclador durante 5 minutos para su desnaturalización, se volvieron a agitar y se les dio un pulso en la microcentrífuga. A continuación, se preparó la estructura para la electroforesis y 1 L de tampón de electroforesis 1X, realizado a partir de una disolución 10X. Después, se cargaron 12 µl de cada muestra en cada pocillo del gel, de la calle número 2 a la 9, mientras que la calle 1 se cargó con 10 µl del marcador de peso molecular y la calle 10 con 12 µl de solución Laemmli 2X. Para facilitar el empaquetamiento, la electroforesis se estableció a 70 V durante los primeros 30 minutos y después, se cambió hasta 120 V durante 50 minutos más. Una vez finalizada la electroforesis, se preparó la estructura de sándwich para la transferencia, colocando los elementos siguiendo un orden determinado, de modo que se comenzó colocando la esponja sobre la base, seguida de un filtro (*Western Blotting Filter Paper, 8 cm x 10.5cm*, Thermo Fisher Scientific) cm y, a continuación, el gel, el cual se marcó con una muesca sobre una esquina para saber el orden correcto de las calles. Encima de este, se colocó la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon®-P, Sigma-Aldrich), previamente activada en metanol, seguida de otro filtro y otra esponja. Por último, se cerró la estructura asegurando que el interior quedaba bien sujeto. A continuación, la proteína se transfirió del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF mediante la transferencia en condiciones de medio húmedo y en frío con 1,5 L de tampón de transferencia 1X. Para las proteínas Akt y p38 se dejó la transferencia durante 2 horas y media, mientras que para STAT3 se dejó hasta 3 horas y cuarto.

La proteína se transfirió del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF mediante la transferencia en condiciones de medio húmedo y en frío con 1,5 L de buffer de transferencia 1X. Para las proteínas Akt y p38 se dejó la transferencia durante 2 horas y media, mientras que para STAT3 se dejó hasta 3 horas y cuarto.

Al finalizar se comprobó la presencia de proteína en la membrana mediante tinción con *Amido Black* durante dos minutos y, después, se retiró la tinción con solución de lavado en dos veces de dos minutos cada una. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con solución de bloqueo durante 45 min.

#### 2.3.3.2 *Incubación con anticuerpos y revelado*

Una vez finalizado el bloqueo, se dejó la membrana incubando en cámara fría, durante toda la noche, con la dilución previamente preparada del anticuerpo primario correspondiente en TBST.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de diez minutos a la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo primario con solución TBST 1X y a continuación, la membrana se incubó con una dilución de anticuerpo secundario Rabbit en oscuridad durante una hora. Después, se realizaron

otros tres lavados de 10 minutos y se procedió al revelado con 3 mL de ECL, también en oscuridad. El revelado se realizó mediante el sistema generador de imágenes de UVP.

En cada membrana, se midió la forma fosforilada y no fosforilada de cada anticuerpo y, por último, la  $\beta$ -actina. Para ello, tras cada revelado, los anticuerpos anteriormente unidos a la membrana se eliminaron mediante dos lavados con solución para la eliminación de anticuerpos unidos a membrana de 7 minutos, seguidos de dos lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno y dos últimos lavados de TBST 1X de 5 minutos. Después, se añadió la solución de bloqueo a las membranas durante 45 min y la membrana se incubó con el siguiente anticuerpo correspondiente.

#### 2.3.4 Análisis estadístico

En primer lugar, empleando el programa informático *Image J* se obtuvieron los valores de la densidad óptica (DO) de cada muestra (proteína total, fosforilada y  $\beta$ -actina, esta última, empleada para normalizar los datos. Se utilizó *Microsoft Excel* para calcular el ratio DO proteína total/DO  $\beta$ -actina y DO proteína fosforilada/DO proteína total. Con esos nuevos datos, dentro de una misma membrana se calcularon los valores medios de cada grupo y a continuación, se realizó la corrección frente al control para comparar cada uno de los tres grupos experimentales con el grupo control. Finalmente, mediante gráficas se representaron los valores medios obtenidos de la expresión relativa respecto al control de proteína total/ $\beta$ -actina y proteína fosforilada/proteína total. Previamente, se analizó cada imagen de cada membrana por separado para descartar las muestras que no se vieran de forma clara y evitar posibles errores en los cálculos posteriores. Por ello, se encontrará que el número de muestras (n) difiere a veces entre grupos.

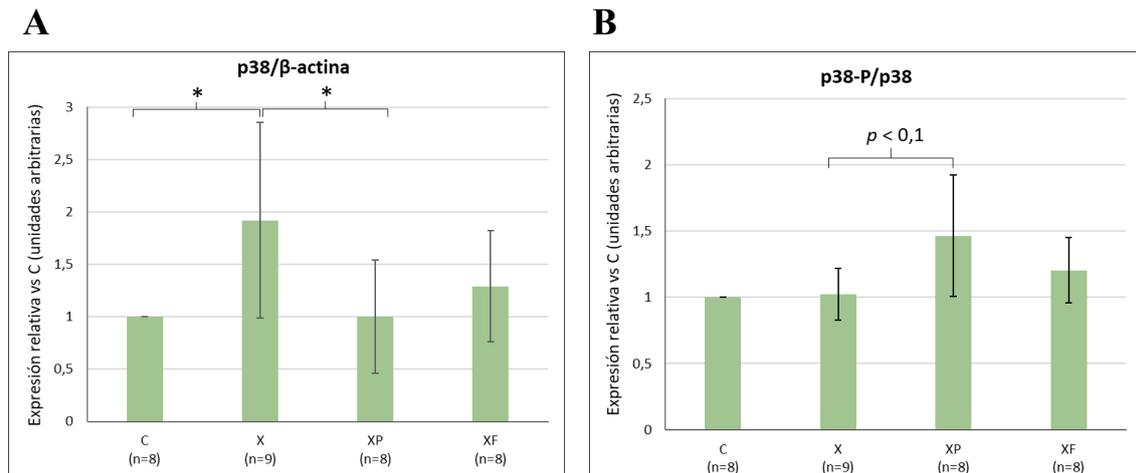
Asimismo, se empleó también el programa *SPSS Statistics 24* para realizar las pruebas estadísticas. En todas las comparaciones se realizó la prueba T por pares para la igualdad de medias, comparando, por un lado, el grupo X con el grupo C, y por otro, el grupo XP con el X, y, de igual manera, el XF con el X. Se realizó también la prueba de Levene para la igualdad de varianzas, asumiendo que el p-valor  $< 0,05$ .

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis de la expresión y activación de p38

En este trabajo se ha observado que la expresión relativa de p38 con respecto a la de la  $\beta$ -actina se incrementó significativamente en el grupo de animales que recibieron PhIP+DSS, respecto al grupo C ( $p < 0,05$ ) tal y como se observa en la **Figura 5A**. Estos resultados han sido los esperados en base a las evidencias previas acerca de la vía de señalización p38-MAPK, que se habría activado como respuesta a la inflamación. No obstante, para determinar la expresión de la proteína activa, se cuantificó la expresión relativa de p38 fosforilada, no observándose diferencias

significativas entre el grupo C y el X para la expresión de p38 fosforilada/proteína total **Figura 5B**. No se ha encontrado ningún estudio que como tal mida la activación de la vía p38 MAPK en un modelo de colitis tratado con PhIP, sin embargo, un estudio en un modelo de ratones con DSS al 3% que evaluó el efecto de SB203580, un inhibidor de p38, demostró que este ejercía su efecto sobre la vía, que se había activado tras la inducción de inflamación (34). Por tanto, esto apoyaría la hipótesis de que, en este trabajo, la expresión de p38 fosforilada debería haberse visto aumentada en el grupo X con respecto al grupo C.



**Figura 5:** Representación gráfica de la expresión relativa de p38 en cada grupo experimental con respecto al grupo C. **A:** expresión relativa de p38 total con respecto a la expresión relativa de la  $\beta$ -actina.  $p < 0,05$ . **B:** expresión relativa de p38 fosforilada con respecto a la de proteína total.  $n$ , tamaño muestral de cada grupo experimental. **p38-P**, p38 fosforilada.

En el caso del grupo XP, en este trabajo se ha observado una menor expresión relativa de p38 con respecto a la de la  $\beta$ -actina en comparación con el grupo X (**Figura 5A**). Los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis establecida ya que se esperaba que los niveles de p38 estuvieran disminuidos en el grupo XP respecto al X. Además, teniendo en cuenta las evidencias existentes acerca del efecto protector del probiótico VSL#3® sobre los síntomas de colitis, se esperaría también una expresión relativa de p38 fosforilada menor en el grupo XP respecto al X, tal y como muestra un estudio en el que los síntomas de colitis en tejido intestinal de ratones, inducida con DSS al 3,5% durante 7 días, se vieron disminuidos tras la administración del probiótico VSL#3® (0,075 mg/ $\mu$ L por día) (35). Por el contrario, en este trabajo fin de grado, se ha detectado la tendencia opuesta en el caso de la expresión de p38 fosforilada/proteína total, aunque los resultados no son significativos ( $p < 0,1$ ) (**Figura 5B**).

Por otra parte, en el caso de la fibra no se han obtenido niveles de expresión relativa de p38/ $\beta$ -actina o p38 fosforilada/proteína total estadísticamente significativos en comparación con el grupo X (**Figura 5**). A pesar de ello, algunos trabajos presentes en la bibliografía, como en el caso de un estudio realizado en tejido de colon de ratones en los que se indujo colitis administrando DSS al 2,5% durante 7 días, además de una dieta rica en grasas y suplementación con guisantes verdes (10%) durante 9 semanas. En este se vieron menores niveles de inflamación y un menor

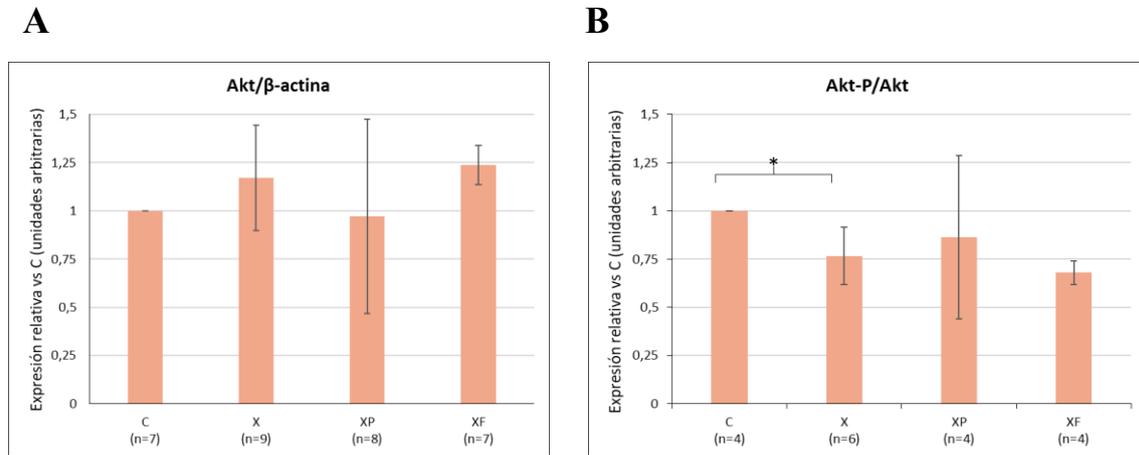
estrés oxidativo (36). De igual manera se obtuvieron resultados similares en otro estudio en tejido de colon de ratas a las que se indujo la formación de tumores con DSS al 4% en dos ciclos de una semana, y el carcinógeno azoximetano (AOM) (15mg/kg), además de suplementación con granos de arroz (24g/100g) (37). En ambos casos los daños inducidos en el tejido fueron más potentes que en este trabajo, ya que se emplearon mayores proporciones de DSS y un carcinógeno distinto al PhIP. Asimismo, la cantidad de fibra administrada fue mayor que la empleada en este trabajo (5,9%), por lo que la falta de significación podría deberse a dichos factores.

Cabe destacar que como se mencionó anteriormente, las funciones de p38 también dependen de la isoforma. El anticuerpo empleado en este trabajo se corresponde con la isoforma p38 $\alpha$  el cual presenta un papel dual en la regulación de la inflamación y CCR. Según un estudio realizado en tejido de colon y células epiteliales intestinales sobre un modelo con AOM/DSS, esta isoforma tendería a suprimir los efectos del CCR asociado a colitis produciendo efectos antiinflamatorios al inicio del tumor, mientras que en estados más avanzados del tumor adquiriría un efecto proinflamatorio contribuyendo a la proliferación de las células tumorales (38). Estas evidencias pueden ser claves para comprender el papel de p38 en este trabajo, pues una mayor expresión relativa en este caso podría deberse a que está ejerciendo un efecto protector, ya que con las dosis administradas se habrían simulado los efectos de una inflamación temprana y no de CCR.

### 3.2 Análisis de la expresión y activación de AKT

En la **Figura 6** se muestra la expresión relativa de Akt total con respecto a la expresión relativa de la  $\beta$ -actina en tejido de músculo estriado de rata (**Figura 6A**) y la expresión relativa de Akt fosforilada con respecto a la total (**Figura 6B**). En el grupo de animales a los que se les suministró el xenobiótico se ha visto significativamente reducida la expresión relativa de Akt fosforilada/proteína total en un 23,4% ( $y = 0,7659$ ), en comparación con la del grupo C ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión de Akt total respecto a la de la  $\beta$ -actina. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la administración del carcinógeno PhIP, disminuye la activación de Akt y son, por tanto, contrarios a lo que se había esperado en base a la información disponible en la literatura donde se muestra que la vía PI3K/Akt se activa en casos de inflamación intestinal, como en un estudio en el que se administró DSS al 5% durante 7 días a tres grupos experimentales de ratones y se evaluó el efecto del inhibidor de inflamación wortmanina. Este estudio demostró que en ratones tratados con DSS, la expresión relativa de Akt fosforilada se vio aumentada, sugiriendo que cuando se da inflamación intestinal, la vía PI3K se activa (39). Asimismo, otro estudio también en tejido de colon de ratones inducidos a colitis ulcerosa con DSS al 3% en tres ciclos de 7 días y ratones inducidos a CCR con un carcinógeno distinto al estudiado en este trabajo, la dimetil-hidracina (DMH), también demostró la activación de esta vía, ya que mediante Western-Blot SDS-PAGE 12% se vio mayor actividad

de las proteínas Akt fosforilada, PI3K y mTORC en los grupos inducidos a colitis y CCR (40). Sin embargo, ambos estudios emplean una proporción de DSS considerablemente mayor que la administrada en este trabajo y ninguno emplea el carcinógeno PhIP, lo cual puede explicar las diferencias en la expresión de Akt obtenidas en este trabajo.



**Figura 6:** Representación gráfica de la expresión relativa de Akt en cada grupo experimental con respecto al grupo C. **A:** expresión relativa de Akt total con respecto a la expresión relativa de la  $\beta$ -actina. **B:** expresión relativa de Akt fosforilada con respecto a la de Akt total.  $p < 0,05$ . **n**, tamaño muestral de cada grupo experimental. **Akt-P**, Akt fosforilada.

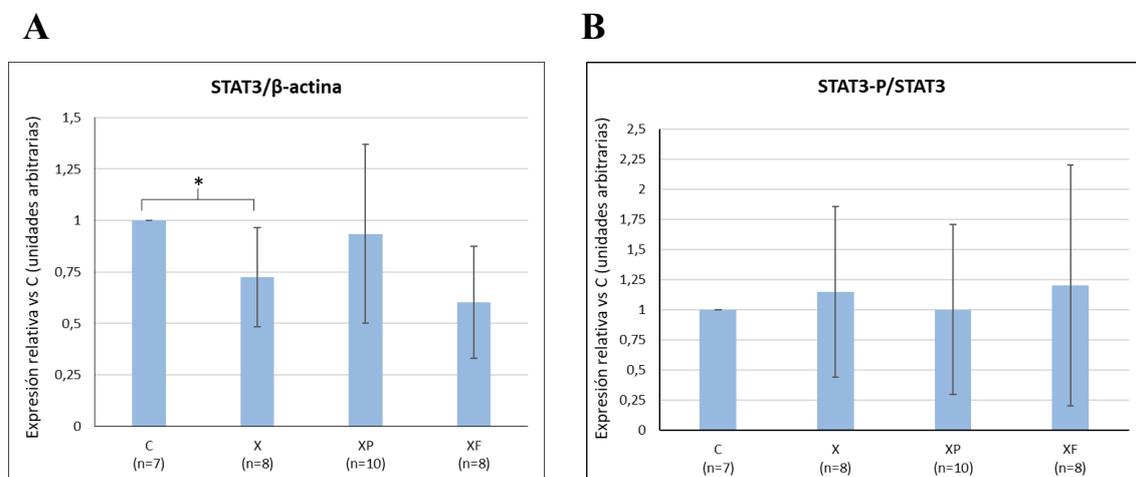
En el caso de los grupos experimentales XP y XF, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión relativa de la AKT total respecto  $\beta$ -actina o AKT fosforilada respecto a total. Pero se han encontrado evidencias de que el probiótico VSL#3® puede tener un efecto atenuante sobre la vía PI3K/Akt, como en el caso de un estudio realizado en tejido de colon de ratas a las que se les indujo una colitis moderada con DSS al 3,5% administrado durante 7 días. Mediante Western-Blot, se vio que la expresión relativa de Akt fosforilada fue significativamente menor en las ratas que consumieron dicho probiótico que en el grupo al que solo se administró DSS (41). Por tanto, estas evidencias sugieren que algo parecido debería haber ocurrido en este trabajo. Sin embargo, es importante resaltar que en el estudio mencionado se empleó una dilución de Akt total y fosforilada más concentrada (1:1000) que en el presente trabajo (1:2000), lo cual podría, en parte, explicar esa falta de significación.

En relación al efecto de la fibra sobre la inflamación y la vía PI3K/Akt, se encontró que una suplementación con polvo de arándano entero sobre un modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis produjo la atenuación de la enfermedad y una inhibición de la vía mencionada (42). En dicho estudio se empleó el modelo AOM/DSS y una suplementación con polvo de arándano entero del 1,5%. En el grupo suplementado se vio un menor ratio de PI3K fosforilada/PI3K total y de Akt fosforilada/Akt total comparado con el grupo AOM/DSS. Estas evidencias sugieren que, en este trabajo, en el grupo XF también debería haber una disminución significativa de la ruta PI3K/Akt. No obstante, es preciso tener en cuenta que en este trabajo se emplea un carcinógeno

distinto y no se han encontrado evidencias de la relación entre la modulación de la vía a través de la fibra en un modelo que emplee PhIP.

### 3.3 Análisis de la expresión y activación de STAT3

La **Figura 7** muestra la expresión relativa respecto al control de STAT3 total respecto a  $\beta$ -actina (**Figura 7A**) y de STAT3 fosforilada respecto a la proteína total (**Figura 7B**). El grupo X redujo la expresión relativa de STAT3 total con respecto a  $\beta$ -actina un 27,5% ( $y = 0,7244$ ) en comparación con el grupo C, aunque las diferencias no fueron significativas en el caso de STAT3 fosforilada respecto a la proteína total. Estos resultados presentan una tendencia opuesta a las evidencias obtenidas en estudios recientes en modelos animales de colitis. Uno de ellos se realizó con un modelo de ratones de colitis aguda (DSS al 2,5% y al 4% durante 7 días) y otro de colitis crónica (DSS al 2,5% y al 4% en tres ciclos de 7 días). En ambos casos se vio una activación de STAT3 fosforilada mediante Western-Blot (10% SDS-PAGE), siendo mayor en los modelos de colitis crónica y DSS al 4% (43). Esto permite deducir que aumentando la proporción de DSS administrado se podrían obtener resultados más significativos para la expresión de STAT3 en el grupo X comparado con el control. En otro trabajo se administró DSS al 2,5% en ratones y se vio que a partir del cuarto día, la cantidad de STAT3 total no variaba, pero sí se vio aumentada STAT3 fosforilada, indicando una activación de la vía (44). Sin embargo, no hay resultados disponibles en modelos PhIP/DSS.



**Figura 7:** Representación gráfica de la expresión relativa de STAT3 en cada grupo experimental con respecto al grupo Control. **A:** expresión relativa de STAT3 total con respecto a la expresión relativa de la  $\beta$ -actina.  $p < 0,05$ . **B:** expresión relativa de STAT3 fosforilada con respecto a la de STAT3 total. *n* representa el número de muestras para cada grupo. **STAT3-P**, STAT3 fosforilada.

En comparación con el grupo X, en el caso de los grupos XP y XF no se han observado diferencias significativas en la expresión relativa de STAT3 total respecto a la de la  $\beta$ -actina ni de la expresión relativa de STAT3 fosforilada. Sin embargo, en relación con el efecto del probiótico VSL#3® se ha encontrado un estudio en el que se demuestran los efectos preventivos sobre el cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC) del probiótico VSL#3® y de un agente antiinflamatorio, la

balsalazida (BSZ), mediante la modulación de la vía IL-6/STAT3, en un modelo de ratones con DSS al 2% administrado en dos ciclos de una semana cada uno, junto con una única inyección del carcinógeno AOM (10 mg/kg). Tanto el probiótico (1,3 millones de bacterias/día) como el BSZ (300 mg/kg) se aplicaron durante 9 semanas y tras ese tiempo se encontró que el VSL#3®, tanto administrado de forma única como en conjunto con el antiinflamatorio, produjo una disminución de los síntomas de colitis, menor formación de tumor y una inhibición de la vía de IL-6/STAT3 con respecto al grupo al que solo se le había administrado AOM+DSS (45). Otro trabajo demostró algo parecido en ratas, empleando el mismo probiótico en estado normal y después de haberlo calentado 100°C, en un modelo de colitis con DSS al 5% durante 7 días. Como resultado, también se vio disminuida la expresión de proteínas como la IL-6, STAT3 total y fosforilada y TGFβ en ambos grupos de probiótico con respecto al grupo con solo DSS (46). Por tanto, estas observaciones sugieren que algo parecido debería haber ocurrido en el caso de este trabajo. No obstante, es preciso tener en cuenta las diferencias, ya que en estos estudios se empleó un carcinógeno distinto y dosis de DSS mayores.

En cuanto al efecto de la fibra, en un estudio se investigó sobre los efectos de la suplementación en un 5% con frambuesas rojas sobre un modelo de colitis inducida con dos ciclos de DSS al 1% en ratones. En el mismo se encontró que tanto los niveles de ARN mensajero de IL-6, como los niveles de proteína se vieron reducidos en los ratones suplementados en comparación con el grupo al que solo se administró DSS. De la misma forma, la expresión de STAT3 fosforilada se vio también disminuida, sugiriendo que la suplementación con frambuesas rojas tiene un efecto inhibitorio sobre la vía (47). Por tanto, al igual que en los casos anteriores, siguiendo estas evidencias, esto indicaría que en este trabajo en el grupo XF la expresión relativa de STAT3 debería haberse visto disminuida significativamente.

Por último, es preciso tener en cuenta que la principal diferencia entre este trabajo y las evidencias encontradas es que estas hacen referencia a estudios realizados sobre tejido de colon, mientras que en este trabajo se ha analizado músculo estriado, con lo cual es necesario saber las posibles funciones de las vías estudiadas sobre este tejido. En relación con el cáncer y la inflamación, el músculo se puede ver afectado por estas condiciones a nivel metabólico, de modo que se inducen mecanismos de atrofia, la cual implica un aumento del catabolismo de las proteínas musculares y una disminución de su síntesis y, por tanto, una pérdida de masa muscular (48). La atrofia muscular está regulada por distintas vías de señalización, entre ellas, las que se han analizado en este trabajo.

Por ejemplo, algunos estudios realizados sobre músculo estriado han observado que la vía p38-MAPK puede ser activada por el factor TNF-α para promover la degradación de proteínas

mediante la activación de genes para la ubiquitina (49) y también mediante la degradación a través de la autofagia (50), lo cual podría indicar una mayor degradación muscular en el grupo expuesto a PhIP+DSS en este trabajo.

Por otro lado, la isoforma Akt1 parece ser fundamental para promover la diferenciación de las fibras musculares, mediante la promoción de vías que estimulan la síntesis de proteínas, inhiben la atrofia y previenen la muerte celular (51). Por tanto, los niveles de expresión más reducidos de Akt fosforilada en el grupo X podrían ser resultado de una menor activación de la vía PI3K/Akt en el tejido muscular estriado tras la ingesta de PhIP+DSS y la estimulación, por consiguiente, de la atrofia. Sin embargo, no hay estudios disponibles en la literatura en este contexto con los que comparar los resultados obtenidos.

STAT3 es activado en células de músculo estriado mediante la vía IL-6/JAK/STAT3, la cual promueve el desarrollo de la atrofia muscular durante el cáncer. Se ha visto que podría tener un efecto directo e indirecto sobre los sistemas de ubiquitinización, contribuyendo a la degradación de proteínas en el músculo (52). Según esta información, se habría esperado obtener una mayor expresión relativa de STAT3 en el grupo X. Sin embargo, no se han encontrado evidencias que indiquen un aumento de la expresión de la proteína en músculo estriado tras la ingesta de un carcinógeno.

#### **4 CONCLUSIONES**

1. Los datos obtenidos sugieren que la inflamación inducida por el carcinógeno PhIP junto con DSS al 1,5% llega a producir un efecto en tejido muscular estriado de rata, con una tendencia a la atrofia muscular, debido a la expresión relativa de p38 y Akt fosforiladas, que indicarían que las vías se encontraban más activa y reducida, respectivamente.
2. No se puede deducir con seguridad el efecto que ha producido la administración del probiótico y la fibra, debido a la falta de resultados significativos.
3. Puesto que la mayoría de los estudios existentes en la literatura utilizaron diferentes tejidos la ausencia de efecto del PhIP en estudios en tejido muscular estriado necesita ser confirmada en futuros estudios.

## 5 BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 23 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
2. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*. 12 de septiembre de 2023;59(9):1646.
3. Long D, Mao C, Zhang Z, Liu Y, Li J, Xu Y, et al. Long-term trends in the burden of colorectal cancer in Europe over three decades: a joinpoint regression and age-period-cohort analysis. *Front Oncol*. 2023;13:1287653.
4. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. octubre de 2021;21(10):653-67.
5. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, et al. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells*. noviembre de 2021;10(11):3164.
6. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*. mayo de 2015;148(6):1244-1260.e16.
7. Soucek P. Xenobiotics. En: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011 [citado 5 de marzo de 2024]. p. 3964-7. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5\\_6276](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_6276)
8. Teunissen SF, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JHM, Beijnen JH. Revisión sobre el análisis de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- *b*]piridina y sus metabolitos fase I y fase II en matrices biológicas, alimentos y bebidas. *Journal of Chromatography B*. 1 de diciembre de 2010;878(31):3199-216.
9. Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*. marzo de 2022;162(3):715-730.e3.
10. Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 7 de septiembre de 2017;23(33):6016-29.
11. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*. 13 de junio de 2018;23(6):705-15.
12. Cheng FS, Pan D, Chang B, Jiang M, Sang LX. Probiotic mixture VSL#3: An overview of basic and clinical studies in chronic diseases. *World J Clin Cases*. 26 de abril de 2020;8(8):1361-84.
13. Gibson G, Hutkins R, Sanders M, Prescott S, Reimer R, Salminen S, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. Department of Food Science and Technology: Faculty Publications [Internet]. 1 de enero de 2017; Disponible en: <https://digitalcommons.unl.edu/foodsciefacpub/234>
14. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 15 de septiembre de 2017;9(9):1021.

15. Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol.* agosto de 2019;234(10):17127-43.
16. La Vecchia S, Sebastián C. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 1 de febrero de 2020;98:63-70.
17. Hon KW, Zainal Abidin SA, Othman I, Naidu R. The Crosstalk Between Signaling Pathways and Cancer Metabolism in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol.* 23 de noviembre de 2021;12:768861.
18. Ahmad R, Singh JK, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). *Int J Mol Med.* marzo de 2021;47(3):14.
19. Kerk SA, Papagiannakopoulos T, Shah YM, Lyssiotis CA. Metabolic networks in mutant KRAS-driven tumours: tissue specificities and the microenvironment. *Nat Rev Cancer.* agosto de 2021;21(8):510-25.
20. Wan M lin, Wang Y, Zeng Z, Deng B, Zhu B sheng, Cao T, et al. Colorectal cancer (CRC) as a multifactorial disease and its causal correlations with multiple signaling pathways. *Biosci Rep.* 20 de marzo de 2020;40(3):BSR20200265.
21. Feng YJ, Li YY. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* octubre de 2011;12(5):327-32.
22. Reino Fernández P del. Implicación de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  MAPKs en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis [Internet] [doctoralThesis]. 2012 [citado 12 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/12057>
23. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 11 de marzo de 2020;21(6):1913.
24. He D, Wu H, Xiang J, Ruan X, Peng P, Ruan Y, et al. Gut stem cell aging is driven by mTORC1 via a p38 MAPK-p53 pathway. *Nat Commun.* 2 de enero de 2020;11(1):37.
25. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 16 de diciembre de 2021;6:425.
26. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2014 [citado 3 de diciembre de 2023];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2014.00064>
27. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, et al. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 23 de septiembre de 2021;22(19):10260.
28. Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* septiembre de 2015;16(9):21138-52.
29. Maharati A, Moghbeli M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells. *Cell Commun Signal.* 14 de agosto de 2023;21(1):201.

30. Tolomeo M, Cascio A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2021;22(2):603.
31. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. noviembre de 2014;14(11):736-46.
32. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. noviembre de 2009;9(11):798-809.
33. Zapico A, Salazar N, Arboleya S, Diaz E, Alonso A, Gueimonde M, et al. In vivo study to evaluate the ability of a probiotic and a prebiotic to counteract the effects of PhIP administration on gut microbiota. 2024; *Artículo pendiente de revisión*
34. Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J*. octubre de 2004;18(13):1550-2.
35. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. mayo de 2009;296(5):G1140-9.
36. Bibi S, de Sousa Moraes LF, Lebow N, Zhu MJ. Dietary Green Pea Protects against DSS-Induced Colitis in Mice Challenged with High-Fat Diet. *Nutrients*. 18 de mayo de 2017;9(5):509.
37. Tajasuwan L, Kettawan A, Rungruang T, Wunjuntuk K, Prombutara P, Muangnoi C, et al. Inhibitory Effect of Dietary Defatted Rice Bran in an AOM/DSS-Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer Experimental Animal Model. *Foods*. 2 de noviembre de 2022;11(21):3488.
38. Gupta J, del Barco Barrantes I, Igea A, Sakellariou S, Pateras IS, Gorgoulis VG, et al. Dual Function of p38 $\alpha$  MAPK in Colon Cancer: Suppression of Colitis-Associated Tumor Initiation but Requirement for Cancer Cell Survival. *Cancer Cell*. 14 de abril de 2014;25(4):484-500.
39. Huang XL, Xu J, Zhang XH, Qiu BY, Peng L, Zhang M, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflamm Res*. agosto de 2011;60(8):727-34.
40. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Biomed Pharmacother*. octubre de 2014;68(8):1023-9.
41. Dai C, Zheng CQ, Meng F ji, Zhou Z, Sang L xuan, Jiang M. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. *Mol Cell Biochem*. 1 de febrero de 2013;374(1):1-11.
42. Wu X, Song M, Cai X, Neto C, Tata A, Han Y, et al. Chemopreventive Effects of Whole Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) on Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018;62(24):1800942.
43. Qu D, Shen L, Liu S, Li H, Ma Y, Zhang R, et al. Chronic inflammation confers to the metabolic reprogramming associated with tumorigenesis of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 25 de febrero de 2017;18(4):237-44.

44. López Méndez O. mTOR regula positivamente la activación de STAT3 en el epitelio intestinal durante colitis experimental. [Ciudad de Mexico]: Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional; 2018.
45. Do E ju, Hwang SW, Kim SY, Ryu YM, Cho EA, Chung EJ, et al. Suppression of colitis-associated carcinogenesis through modulation of IL-6/STAT3 pathway by balsalazide and VSL#3. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016;31(8):1453-61.
46. Sang LX, Chang B, Dai C, Gao N, Liu WX, Jiang M. Heat-killed VSL#3 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Experimental Colitis in Rats. *Int J Mol Sci*. 19 de diciembre de 2013;15(1):15-28.
47. Bibi S, Du M, Zhu MJ. Dietary Red Raspberry Reduces Colorectal Inflammation and Carcinogenic Risk in Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition*. 1 de mayo de 2018;148(5):667-74.
48. Yang J, Cao RY, Li Q, Zhu F. Muscle Atrophy in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:329-46.
49. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF- $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. marzo de 2005;19(3):362-70.
50. McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*. marzo de 2010;298(3):C542-9.
51. Wilson EM, Rotwein P. Selective Control of Skeletal Muscle Differentiation by Akt1 \*. *Journal of Biological Chemistry*. 23 de febrero de 2007;282(8):5106-10.
52. Guadagnin E, Mázala D, Chen YW. STAT3 in Skeletal Muscle Function and Disorders. *Int J Mol Sci*. 2 de agosto de 2018;19(8):2265.