

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Las proteínas 14-3-3 regulan la fosforilación de Akt en la treonina 308 en las
células epiteliales intestinales.”**

Tesis que presenta

M. en C. Mauricio Efrén Gómez Suárez

Para Obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

México, Distrito Federal.

NOVIEMBRE, 2016

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio #41 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Porfirio Nava Domínguez.

Agradecimiento especial al CONACYT, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto

Agradecimientos

Agradezco al CINVESTAV por la oportunidad de pertenecer al programa de Doctorado en Ciencias e igualmente al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Agradezco al Dr. Porfirio Nava Domínguez por todo su apoyo, dedicación, paciencia y conocimiento que me brindo para lograr concluir este proyecto.

Así como a la M. en C. Aurora Candelario Martínez por su colaboración, sugerencias y apoyo en la experimentación, y seguimiento del proyecto.

De la misma forma quiero agradecer a la C.D. Norma Trejo Estrada por todo el apoyo técnico que me brindo al tener lo necesario en la experimentación que se realizó para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Rúben G. Contreras por brindarme su apoyo y asesoría en la revisión de esta tesis, así como a todos los integrantes de su laboratorio.

A la Dra. Catalina Flores Maldonado, por su gran apoyo y motivación para la culminación de mi proyecto de tesis

A la Dra. Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por su asesoría y sugerencias como parte de mi comité durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Michael Schnoor por haberme brindado su asesoría durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Oscar Medina Contreras por su apoyo y orientación durante la realización de este trabajo.

Y finalmente a mis compañeros del laboratorio 41, la M. en C. Itzel Zenidel Gutiérrez Martínez, al M. en C. José Antonio Hernández Trejo, a la M. en C. Carolina Serrano García, por su compañerismo y apoyo durante la realización de mi proyecto de tesis.

Dedicatorias

A mi mamá, Teresa Gómez Suárez por todo el apoyo moral y económico que me ha brindado en el transcurso de la vida.

A mis hermanos Fabiola, Daniel y Adán por las convivencias y buenos momentos que hemos pasado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
Lista de abreviaturas	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 El tracto gastrointestinal.	3
II.2 El epitelio intestinal.	4
II.3 Rutas del transporte celular en el epitelio intestinal.	6
II.4 La homeostasis intestinal.	8
II.5 Las uniones intercelulares del epitelio intestinal.	10
II.6 Alteraciones en la función de barrera del epitelio intestinal.	12
II.7 Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) alteran la homeostasis del epitelio intestinal.	13
II.8 El interferón gamma (IFN- γ).	14
II.9 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).	15
II.10 Papel del IFN- γ y TNF- α en el desarrollo de las EII.	16
II.11 La vía PI3K/Akt durante la inflamación intestinal.	17
II.12 Las proteínas 14-3-3.	20
II.13 Las proteínas 14-3-3 son reguladas de la autofagia.	21
II.14 La autofagia	22
III. Hipótesis	25
IV. Objetivos	25
IV.1 Objetivo general	25
IV.2 Objetivos particulares	25

Contenido	Página
V. Materiales y métodos	26
V.1 Anticuerpos y reactivos	26
V.2 Cultivo celular.	26
V.3 Transfección de las diferentes construcciones en las células SW480.	27
V.4 Experimentos en animales.	27
V.5 Tratamientos con IFN- γ y TNF- α en las células SW480	27
V.6 Inducción de colitis con DSS	27
V.7 Ensayos de proliferación y apoptosis	28
V.8 Ensayos de inmunodetección en las membranas de nitrocelulosa	28
V.9 Microscopía de inmunofluorescencia.	30
V.10 Fraccionamiento celular	30
V.11 Detección de Akt activa en los núcleos de CEI de ratón	31
V.12 Estadística.	32
VI. RESULTADOS	32
VI.1 La vía de señalización de Akt es activada en CEI de ratones con colitis.	32
VI.2 Durante la colitis la proteína 14-3-3 η regula la fosforilación de la Tre308 de Akt en las CEI.	37
VI.3 14-3-3 ζ fosforilada induce la degradación de 14-3-3 η y regula la fosforilación de Akt 308.	39
VI.4 La inhibición química de las proteínas 14-3-3 incrementa la muerte celular durante la inflamación.	50
VI.5 La activación de Akt induce apoptosis en las CEI durante inflamación	54
VII. DISCUSIÓN	64
VIII. CONCLUSIONES	69
IX. BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	El tracto gastrointestinal o canal alimentario.	4
2	Tipos de epitelios que recubren el tracto gastrointestinal.	6
3	Rutas del transporte celular (Secreción y re-absorción)	7
4	Homeostasis del epitelio intestinal (Colon).	8
5	La vía PI3K/Akt.	18
6	El IFN- γ regula la homeostasis de las CEI al modular de manera secuencial las vías de señalización Akt/ β -catenina y Wnt/ β -catenina.	19
7	Las principales funciones de las proteínas 14-3-3.	21
8	Representación esquemática del proceso de autofagia.	22
9	El complejo mTORC1 es el principal regulador de la autofagia.	23
10	La vía de señalización de Akt se activa en las células epiteliales intestinales durante la colitis.	33
11	La inflamación inducida por el DSS disminuye la proliferación celular y la longitud del colon.	35
12	El nivel de Akt fosforilada en los residuos Ser 246 y Tre450 aumenta durante la inflamación intestinal.	36
13	El nivel de 14-3-3 η disminuye durante procesos inflamatorios.	38
14	Las citocinas pro-inflamatorias inducen la degradación lisosomal y proteosomal de la proteína 14-3-3 η .	41
15	Durante colitis se induce la degradación de 14-3-3 η y aumenta el nivel de PDK-1 activa.	42
16	Las citocinas pro-inflamatorias promueven la asociación entre raptor y 14-3-3 ζ y aumentan la fosforilación de 14-3-3 ζ en la serina 58.	43
17	La forma monomérica de 14-3-3 ζ induce la degradación de 14-3-3 η y estimula la fosforilación de Akt durante la inflamación intestinal.	46

Figura		Página
18	14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ aumentan en la mucosa de ratones con colitis y regulan la activación de Akt al controlar la autofagia.	49
19	La inflamación intestinal incrementa la apoptosis en las CEI.	50
20	La inhibición de las proteínas 14-3-3 incrementa la activación de Akt y dispara apoptosis durante la inflamación.	53
21	La inhibición de Akt en un modelo de inducción de colitis reduce la muerte de las CEI.	55
22	Akt se acumula en el núcleo de las CEI y regula la proliferación celular durante la inflamación intestinal.	58
23	La sobre-expresión de 14-3-3 η reduce la muerte celular durante la inflamación.	60
24	Modelo hipotético de la activación de Akt en las CEI por el IFN- γ .	62

Resumen

El tracto gastrointestinal o canal alimentario de los organismos superiores es el sistema que digiere y absorbe los nutrientes de los alimentos, consiste esencialmente de un tubo que se extiende desde la boca hasta el ano, está revestido en su interior por una capa llamada mucosa formada por una monocapa de células epiteliales intestinales (CEI), que crece sobre la lámina propia constituida de tejido conectivo. La mucosa intestinal es la defensa más importante contra el medio externo, ya que actúa como una barrera que protege al organismo contra la invasión de microorganismos patógenos, la entrada de toxinas u otros compuestos. Para mantener esta barrera íntegra, la mucosa intestinal requiere un balance entre la proliferación, la migración, la diferenciación y la muerte de las CEI. Las citocinas pro-inflamatorias alteran la homeostasis del epitelio intestinal durante las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), activando las vías de señalización, PI3K/Akt, NOs y JAK/STAT, entre otras. La actividad de la cinasa Akt se asocia con la proliferación, la diferenciación, la sobrevivencia y la muerte de las CEI regulando de la homeostasis intestinal. Sin embargo, aún no se entienden completamente los mecanismos que controlan la activación de Akt en los desórdenes inflamatorios. Akt se fosforila en la treonina 308 por la cinasa dependiente de fosfatidilinositol-1 (PDK-1) y esta fosforilación es crítica para la actividad de la cinasa. En este proyecto, nosotros observamos que las proteínas 14-3-3 controlan la fosforilación de Akt en la treonina 308 durante la inflamación intestinal. La incubación de las CEI con las citocinas IFN- γ y TNF- α , induce la degradación de la proteína 14-3-3 η , que inhibe a PDK-1. Tal degradación depende de que otra proteína 14-3-3, la forma monomérica de 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58), se asocie con raptor, proteína esencial para la formación del complejo mTORC1 inactivándolo. La inactivación del complejo mTORC1 dispara la autofagia y lleva a la degradación a 14-3-3 η , como consecuencia PDK1 se activa. El proceso final de estos eventos es la fosforilación de Akt en la treonina 308 y su activación total, fosforilando a una amplia variedad de sustratos. Los resultados también muestran que la estimulación permanente del sistema, debido al aumento en la producción de citocinas en la mucosa inflamada, promueven la hiper-activación de Akt, que a la larga se acumula en el núcleo promoviendo la muerte de las CEI. Notablemente, la inhibición de las proteínas 14-3-3 con BV02, aumenta descontroladamente la actividad de la cinasa Akt, su acumulación en el núcleo y la muerte de las CEI. Los resultados obtenidos proveen un mecanismo novedoso que liga la sobrevivencia con la apoptosis de las CEI, durante los desórdenes inflamatorios como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII).

Abstract

The gastrointestinal tract or alimentary canal in vertebrates is a system that allows the digestion and absorption of nutrients. The alimentary canal is essentially a tube which extends from the mouth to the anus. The alimentary canal is lined by a membrane layer called mucosa, which is formed by a monolayer of intestinal epithelial cells (IEC) and an underlying connective tissue called lamina propria. The intestinal mucosa is the largest and most important defense against pathogens and the entry of toxins or other compounds. To maintain a functional barrier, the intestinal mucosa depends on the balance between proliferation, migration, differentiation and death of IEC. Together these processes maintain the homeostasis of the intestinal mucosa. It has been observed that pro-inflammatory cytokines alter the homeostasis of the intestinal epithelium during inflammatory bowel diseases (IBD), because they affect several signaling pathways, among which include PI3K / Akt, NOs and JAK / STAT. Akt kinase activity has been associated with proliferation, differentiation, survival and death of the IEC. However, while numerous studies have focused on analyzing how Akt regulates intestinal homeostasis, the mechanisms that control the activation of Akt in inflammatory disorders is not yet fully understood. Akt is phosphorylated at threonine 308 by phosphatidylinositol dependent kinase-1 (PDK-1), which is critical for the activity of this kinase. In this project, we observed that the 14-3-3 ζ and 14-3-3 η proteins controlled Akt phosphorylation at threonine 308 during intestinal inflammation. Mechanistically we found that IFN- γ and TNF- α treatment induced degradation of the PDK-1 inhibitor, the protein 14-3-3 η , in IEC. This mechanism requires association of the monomeric form of 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58) with raptor, this association prevents the formation of mTORC1 complex, causing its inactivation, the mTORC1 inactivation triggers autophagy and leads to 14-3-3 η degradation and activation of PDK1. The final process of this events is the phosphorylation of Akt in the 308 residue and Akt total activation. The results also show that constant stimulation of the system by the cytokines in the inflamed mucosa, promoting Akt hiper-phosphorylation. Activated Akt, it accumulates in the nucleus causing the death of the IEC. Notably, inhibition of 14-3-3 function by the chemical inhibitor BV02 resulted in uncontrolled Akt activation, nuclear Akt accumulation and ultimately intestinal epithelial cell death. Our results show here, provide a new mechanistic link between cell survival and apoptosis of intestinal epithelial cells during inflammation.

Lista de abreviaturas

ATG	Genes relacionados con la autofagia
AMPK	Cinasas activadas por AMP
CD	Células dendríticas
CEE	Células enteroendocrinas
CEI	Células epiteliales intestinales
CU	Colitis ulcerosa
CRC	Cáncer colorectal
CQ	Cloroquina
DAI	Índice de actividad de la enfermedad
DM	Desmosomas
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSS	Dextran sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
Edu	5-Etínil-2-deoxiuridina
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
FI	Filamentos intermedios
IFN- γ	Interferón gamma
ILC	Células linfoides del sistema innato
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de MLC
mTORC1	Complejo diana de rapamicina
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PDK-1	Cinasa dependiente de fosfatidilinositol-1
PKB	Proteína cinasa B
SII	Síndrome del intestino irritable
TA	Amplificación transitoria cíclica
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UA	Unión adherente
UE	Unión estrecha

I. Introducción.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son afecciones intestinales crónicas, que se presentan en dos formas clínicas: la enfermedad de Crohn (EC), que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal y la colitis ulcerosa (CU), cuya patología está restringida a la mucosa del colon. En la patogenia de las EII están implicados factores ambientales y genéticos como la alteración de la microbiota bacteriana, la respuesta inmunológica del huésped y el mantenimiento de los contactos célula-célula del epitelio intestinal. La alteración de estos factores permite que el contenido luminal se exponga a las células del sistema inmune, cuya reacción produce lesiones en el tracto gastrointestinal que se agravan con el tiempo. El epitelio intestinal funciona como una barrera que impide que bacterias comensales o patógenas se expongan al tejido subyacente, deteniendo su entrada al interior del organismo. Para mantener la barrera epitelial intacta, las células que la forman se recambian constantemente, proceso que ayuda a mantener la homeostasis epitelial intestinal. Se ha observado que durante las EII, varias citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gama (IFN- γ), alteran las vías de señalización que permiten mantener la homeostasis del epitelio intestinal. Por ejemplo, una vez que el IFN- γ se une a su receptor en las CEI, se activan las vías de JAK/STAT, NOs y PI3K/Akt. Particularmente en este proyecto se estudió la influencia que ejerce el IFN- γ sobre la vía PI3K/Akt, durante los periodos inflamatorios. La proteína cinasa B o PKB (también conocida como Akt), forma parte de una familia de cinasas de serina y/o treonina que regulan la sobrevivencia, la proliferación, el metabolismo y la migración celular en las CEI.

La familia de las Akt comprende a tres proteínas muy conservadas Akt-1, Akt-2 y Akt-3. Para poder actuar como cinasa, Akt tiene que ser fosforilada en la membrana plasmática en dos residuos importantes: la treonina 308 por PDK1 y la serina 473 por mTORC2. Una vez activa, Akt puede fosforilar a una gran variedad de substratos en las CEI.

Durante los procesos inflamatorios intestinales, la activación de la cinasa Akt contribuye al daño de la mucosa al inhibir la proliferación de las células epiteliales intestinales. La activación descontrolada de la cinasa Akt está asociada al desarrollo de diferentes enfermedades como el cáncer y la diabetes en humanos y durante la inflamación intestinal Akt disminuye la proliferación y sobrevivencia de las células epiteliales de la mucosa. Sin embargo, mientras numerosos estudios se han enfocado en analizar cómo Akt regula la proliferación, migración y muerte de las CEI en las EII, los mecanismos que controlan la activación de Akt durante desórdenes inflamatorios, no se conocen a profundidad. En este trabajo de tesis se observó que las proteínas 14-3-3 controlan la fosforilación de Akt en la treonina 308 durante la inflamación intestinal. Específicamente, la exposición al IFN- γ y TNF- α promueve la degradación del inhibidor de PDK-1, la proteína 14-3-3 η en las CEI. Para que esto suceda, previamente el IFN- γ promueve que la proteína 14-3-3 ζ fosforilada (p14-3-3 ζ S58) se una a Raptor, secuestrándolo en el citosol, esto impide el ensamble y actividad del complejo mTORC1, a consecuencia de esto se induce la autofagia. La autofagia disparada por p14-3-3 ζ S58 lleva a degradación a 14-3-3 η y permite que PDK-1 se localice en la membrana, donde fosforila a Akt. La constante exposición a las citocinas lleva a la hiper-activación de Akt permitiendo su acumulación en el núcleo, donde induce la muerte de las CEI. Esto resulta porque Akt induce arresto celular y a la larga, apoptosis de las CEI. Por esta razón y por la capacidad de Akt de regular múltiples procesos biológicos en las células epiteliales intestinales, es importante estudiar los mecanismos que llevan a la activación de esta proteína y su participación en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal durante las EII.

II. Antecedentes.

II.1. El tracto gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal o canal alimentario es básicamente un tubo que se extiende desde la boca hasta el ano. Es el encargado de transformar los alimentos en moléculas más sencillas llamadas nutrientes, para que puedan ser utilizados por el organismo como fuente de energía u otros procesos (**DeSesso** y Jacobson, **2001**). Anatómicamente el canal alimentario se divide en dos partes: el superior y el inferior; el canal alimentario superior comprende la boca, la faringe, el esófago y el estómago; el canal inferior al intestino y el ano. El intestino, a su vez, se divide en intestino delgado e intestino grueso. Las principales funciones del canal alimentario son la digestión de los alimentos, la absorción de nutrientes, la defensa y la excreción (**Figura 1**). Existen varios órganos accesorios que ayudan a la digestión de los alimentos que pasan a través del canal alimentario, entre los que se incluyen al hígado, la vesícula biliar y el páncreas. El hígado produce la bilis, un jugo digestivo que se almacena en la vesícula biliar. La bilis se secreta hacia el intestino delgado y se mezcla con la grasa de los alimentos ingeridos, para descomponer estas en ácidos grasos que pueden absorberse (**Rouiller, 2013**). El páncreas secreta un fluido que contiene enzimas que digieren los carbohidratos, las proteínas y las grasas dentro del intestino delgado (**Figura 1**) (**Jones** y Gores, 1997). El interior del canal alimentario está revestido a todo lo largo por una membrana llamada mucosa, formada por un epitelio y por el tejido conjuntivo laxo subyacente. En general, la mucosa realiza funciones de protección, secreción y absorción, además forma parte del sistema inmune innato (**Mestecky** y col. **2005**).

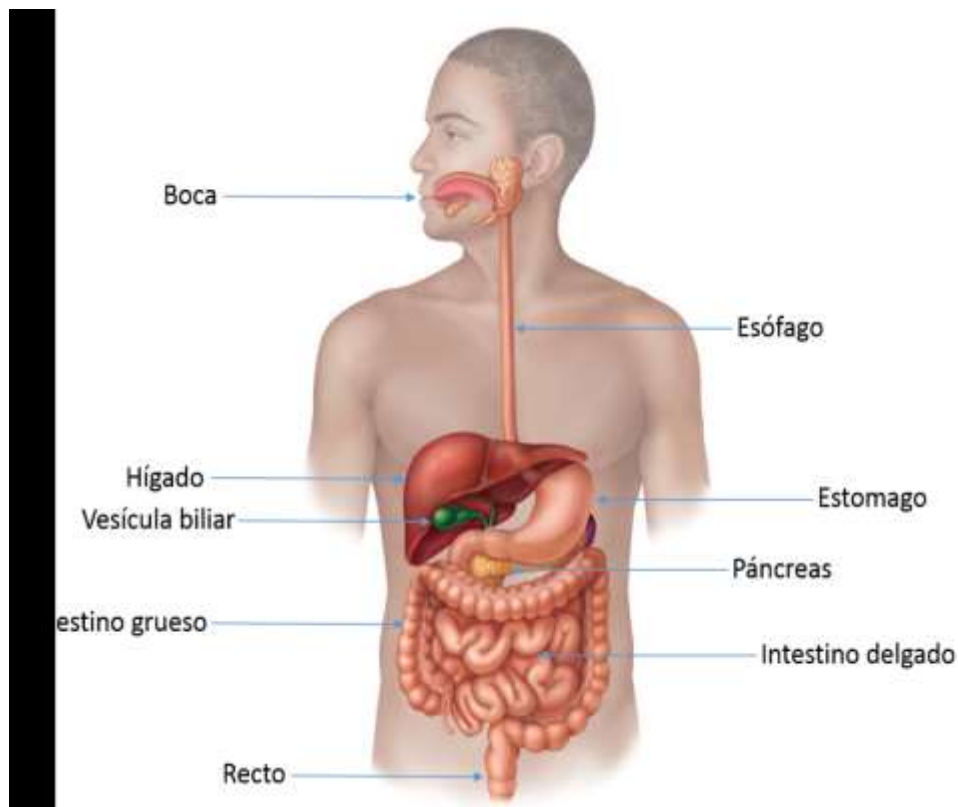


Figura 1. El tracto gastrointestinal o canal alimentario. Las funciones principales del tracto gastrointestinal son: la digestión, la absorción, la excreción, y la protección. Las funciones antes mencionadas son posibles gracias a una serie de órganos que realizan distintas funciones y se distribuyen desde la boca hasta el ano. El estómago y el intestino delgado son los principales responsables de la digestión de los alimentos y de la absorción de nutrientes. A su vez el intestino grueso (colon), se encarga de la compactación y eliminación de toda la materia que no se absorbió, los productos de deshecho se almacenan en el colon sigmoideo y en el recto antes de su eliminación.

II.2. El epitelio intestinal.

El epitelio intestinal está formado por una monocapa de células polarizadas unidas entre sí a través de uniones intercelulares. La estructura del epitelio intestinal varía dependiendo de su localización en el tracto gastrointestinal. Así, estratificado escamoso en el esófago y columnar simple en el resto del tracto gastrointestinal, a excepción del recto, donde vuelve a ser del tipo estratificado escamoso (**Figura 2**) (**Malin y col., 2013**).

El epitelio intestinal recubre las cavidades internas del tracto gastrointestinal y constituye así la mayor y más importante barrera que tiene el organismo contra el medio externo. La barrera epitelial es altamente selectiva, ya que permite el paso de nutrientes, iones y agua; mientras impide el paso de sustancias de deshecho y de patógenos al interior del organismo (**Blikslager** y col., **2007**).

Al funcionar como una barrera, el epitelio intestinal también protege a los tejidos subyacentes de patógenos, toxinas, daño mecánico y pérdida de agua (**Blikslager** y col., **2007**; **Podolsky**, **1999**). Además, esta barrera regula el intercambio de sustancias entre el medio externo y el intersticio. El epitelio intestinal no contiene vasos sanguíneos, sin embargo crece y se mantiene sobre el tejido conectivo situado debajo de la lámina basal epitelial y obtiene sus nutrientes directamente del tejido conectivo subyacente, el cual es alimentado por la sangre (**Figura 2**).

La lamina basal interactúa con una fina red de fibras de colágeno que brinda sostén a las células epiteliales intestinales (**Kang** y Kudsk, **2007**; **King**, **2008**; **Reed** y Wicham, **2009**). En conjunto, la lámina basal y a la red de fibras de colágeno se les denomina “membrana basal” (**Figura 2**) (**Kang** y Kudsk, **2007**; **King**, **2008**).

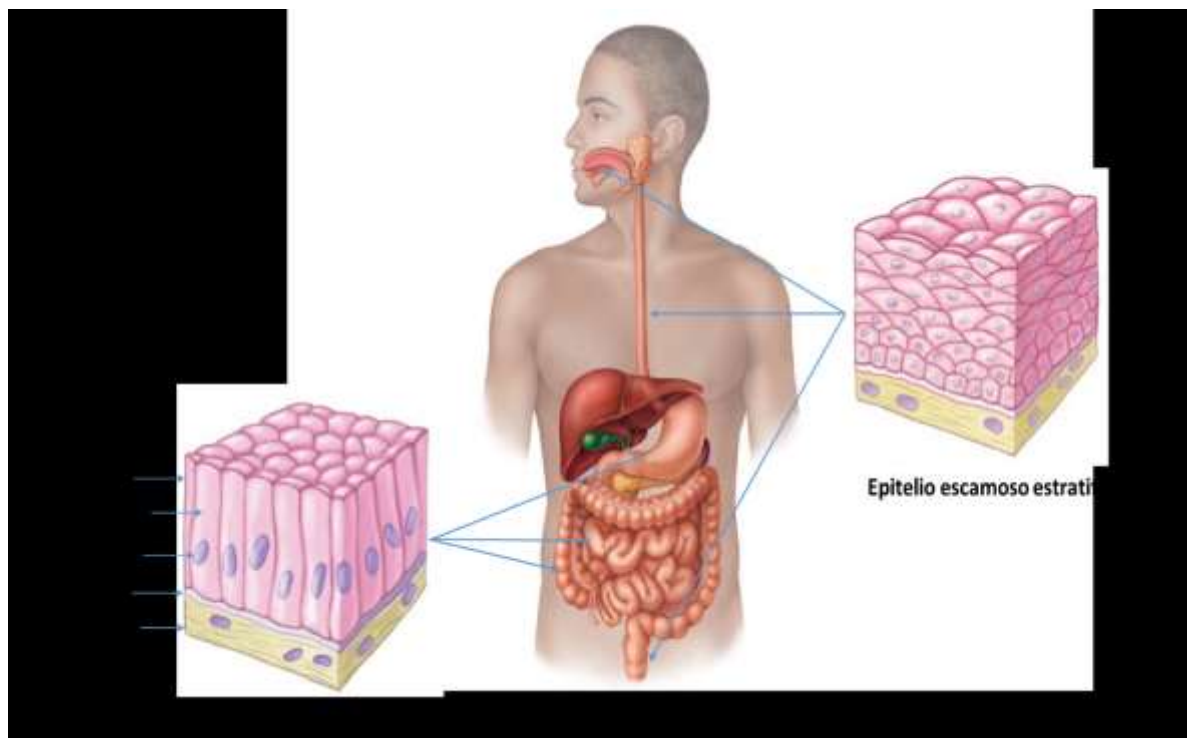


Figura 2. Tipos de epitelios que recubren el tracto gastrointestinal. Tanto la boca, como el esófago están recubiertos por un epitelio escamoso estratificado el cual a su vez contiene una ligera capa de moco. El estómago y el intestino están recubiertos por una monocapa de CEI, que también está recubierta por una capa de moco que sirve de protección al retener en el lumen intestinal posibles bacterias u otros compuestos potencialmente patógenos.

II.3. Rutas del transporte celular en el epitelio intestinal.

Las CEI conocidas como enterocitos, se encargan de la absorción de nutrientes. Su membrana plasmática está polarizada en una superficie apical y otra basolateral, de composición molecular diferente (**Figura 3**) (**Nelson, 1994, Cereijido y col., 1998**). La membrana apical se orienta hacia el lumen de la cavidad que recubre y está delimitada por las uniones estrechas (UE), estructuras que, además de unir a las células epiteliales unidas entre sí, mantienen la polaridad apico/basolateral y controlan y ejecutan el transporte paracelular transepitelial.

La polaridad celular permite el transporte vectorial de sustancias y por lo tanto, permite la absorción intestinal.

Dicha absorción, se lleva a cabo a través de dos rutas principales, la transcelular y la paracelular (**Figura 3**). La vía transcelular permite el transporte de solutos a través de las células epiteliales y requiere la presencia de transportadores, canales y bombas selectivos para aminoácidos, electrolitos, y ácidos grasos de cadena corta, entre otras sustancias (**Diamond, 1997, Kunzelmann y Mall, 2002, Bröer, 2008, Ferraris y col., 1997**). La ruta paracelular transporta iones y moléculas a través del espacio existente entre dos células epiteliales adyacentes y se regula por el complejo de unión apical localizado en la porción superior de la membrana lateral (Figura 3) (**Van Itallie y Anderson, 2006**).

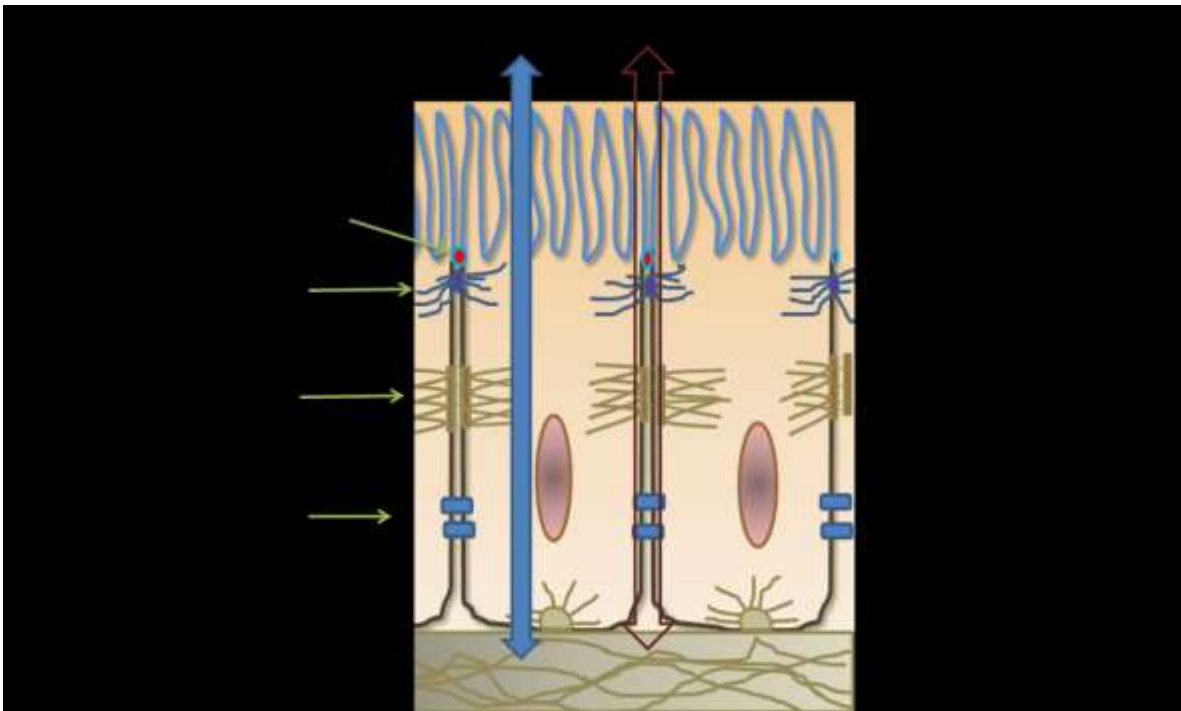


Figura 3. Rutas del transporte celular (secreción y absorción) del epitelio intestinal. La ruta transcelular transporta solutos o agua a través de las CEI. Por su parte la ruta paracelular mueve iones y compuestos a través del espacio inter-celular que se encuentra entre dos células vecinas. Este transporte se regula por la UE localizada en el límite de las membranas apical y lateral de las CEI.

La integridad de las uniones intercelulares que controlan la ruta paracelular es necesaria para mantener la homeostasis del epitelio intestinal y, por ende, un organismo saludable, debido a que diversas proteínas, implicadas en la regulación de diversos procesos biológicos, se reclutan en estas estructuras y porque las uniones intercelulares funcionan como barreras físicas que impiden la invasión de virus, bacterias y parásitos a las cavidades del organismo. La apertura de las uniones intercelulares permite a los patógenos entrar al organismo a través de la ruta paracelular de las células de la mucosa intestinal (**Bergelson, 2009; O'Hara y Buret, 2008**).

II.4. La homeostasis intestinal.

A fin de mantener una barrera intacta, las CEI necesitan recambiarse continuamente y mantener un número constante de células. Este proceso se regula finamente y se denomina la “homeostasis intestinal” y consiste de un balance entre el número de células que mueren en la superficie de la cripta por apoptosis y el número de células que surgen en la base de la misma por proliferación celular. En general se podría asumir que todas las células del epitelio intestinal están bajo recambio a partir de las células madre que se encuentran resguardadas en la base de la cripta (**Figura 4**).

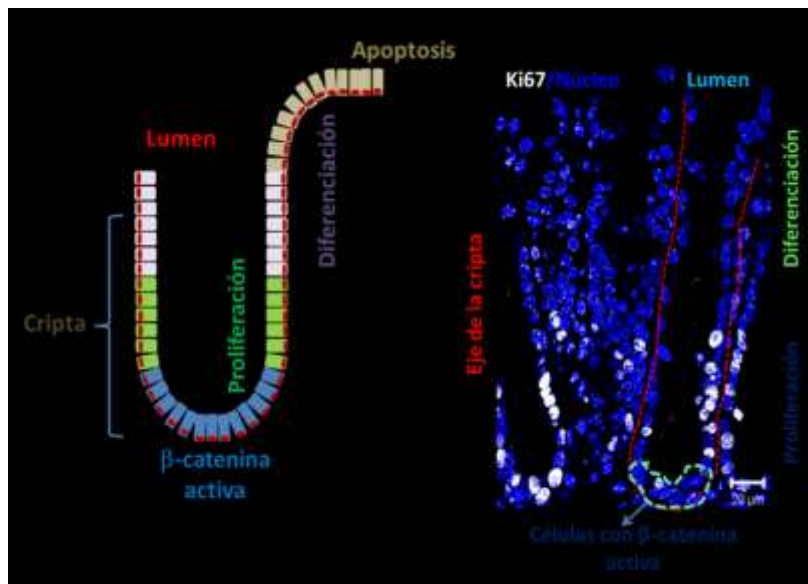


Figura 4. Homeostasis del epitelio intestinal (colon).

El colon está formado por unidades funcionales llamadas criptas, que contienen alrededor de 2000 células. En **a)** se observa un esquema que representa los diferentes procesos que dan lugar al recambio celular en las criptas del colon, y en **b)** se observa la imagen de un corte histológico de una cripta de colon de ratón. La tinción en blanco representa células que están proliferando (marcador Ki67), mientras que en azul podemos observar la tinción nuclear de todas las células (Topro3).

La renovación celular en las criptas del colon depende de las células madre localizadas en la base. Las células de reemplazo en las criptas se generan rápidamente por amplificación transitoria cíclica (TA) a partir de las células madre. Una vez que las células se dividen, migran hacia la parte superior de la cripta. En la punta de la cripta las células entran en apoptosis por falta de contactos (anoikis), donde se desprenden hacia la luz del intestino y son reemplazadas por células recién diferenciadas. Todo este proceso lleva alrededor de una semana (**Figura 4**) (**Potten y col., 1997**). Las células madre del epitelio intestinal se replican y se comprometen hacia un linaje determinado debido a estímulos específicos que disparan diferentes vías de señalización celular, entre las que se encuentran Notch, Sonic-Hedgehog y Wnt/ β -catenina (**Radtko y col., 2006**). El recambio celular da origen a 5 linajes celulares en el epitelio intestinal: las células calciformes, las células de Paneth, las células M, las células enteroendocrinas y los enterocitos de absorción.

Las células calciformes producen una delgada capa de moco que cubre al epitelio intestinal y actúa como defensa contra la microbiota y las bacterias patógenas (**McGuckin y col., 2011; Dharmani y col., 2009**). Este moco está compuesto principalmente por mucinas, pero además contiene enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas.

Las células de Paneth se localizan en la base de las criptas del intestino y producen una gran variedad de péptidos antimicrobianos como defensinas, catelicidinas, péptidos relacionados con criptidinas, quimicina CCL20; así como enzimas bacteriolíticas, tales como lisozimas y fosfolipasa A2.

La función principal de las células de Paneth, es proteger la superficie de la mucosa y a las criptas contra los microorganismos invasores (**Müller y col., 2005; Schaubert y col., 2006; Kelly y col., 2006**).

Las células enteroendocrinas (CEE) producen y secretan polipéptidos gastrointestinales. Estas células comparten características morfológicas y bioquímicas similares con las células del gusto en el epitelio lingual, ya que expresan a una serie de receptores que censan nutrientes. Las CEE se distribuyen a lo largo de la mucosa del tracto gastrointestinal y representan menos del 1% de la población total (**Mace y col., 2015**). Las CEE secretan una gran variedad de hormonas a través de la estimulación de varios receptores acoplados a proteínas G y múltiples transportadores de nutrientes que involucran diferentes vías de señalización. Las hormonas secretadas por las CEE median efectos tanto locales o sistémicos. Por ejemplo, la gastrina, un péptido de 17 aminoácidos, producido por las células G de la mucosa gástrica en respuesta a estímulos químicos, mecánicos o nerviosos. La gastrina estimula la secreción ácida gástrica de las células parietales y la liberación de histamina en la mucosa intestinal. Además de la gastrina, las CEE se producen el péptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistoquinina (CCK), motilina, somatostatina, y otras sustancias (**Lee y col., 2004**).

II.5. Las uniones intercelulares del epitelio intestinal.

Las uniones intercelulares mantienen unidas a las células epiteliales, sellan el espacio intercelular entre las células adyacentes y se anclan al citoesqueleto. Por tal razón, las uniones intercelulares son indispensables en el mantenimiento y función de la barrera epitelial en el intestino. Existen cuatro tipos principales de uniones intercelulares: la unión estrecha (UE), la unión adherente (UA), los desmosomas (DMS) y las uniones comunicantes (UC).

Las UE, son complejos de adhesión que forman un cinturón alrededor de las células que demarcan la región apical de la membrana lateral de las células epiteliales.

La UE tiene dos funciones principales: la función de *compuerta* y la de *cerca*. La función de compuerta se refiere a la capacidad de la UE de regular el tránsito de iones, moléculas y agua a través de la ruta paracelular (**Farquhar y Palade, 1963; Claude, 1978**). En la función de cerca, la UE actúa como una barrera física que impide la difusión libre de lípidos y proteínas entre el dominio apical y basolateral, en el plano de la membrana (**Dragsten y col., 1981; van Meer y Simons, 1986**).

La UE, está formada por proteínas transmembranales (occludinas, claudinas, tricelulina, JAM, entre otras) y proteínas intracelulares (ZO-1/2/3, ZONAB, etc.). En cada punto de unión, las proteínas transmembranales de la UE forman dímeros en cis y posteriormente se unen, en trans, a otro complejo idéntico en la célula adyacente (**Blasig y col., 2006; González-Mariscal y col., 2007; van Itallie y Anderson, 2006**).

En dirección apico-basolateral, la UA se localiza después de la UE y está formada por las proteínas transmembranales de la familia de las cadherinas, que se unen al citoesqueleto de actina mediante proteínas de andamiaje denominadas cateninas. Esta estructura es esencial para mantener unidas a las células epiteliales (**Green y col., 2010**). Las cadherinas más comunes son las de tipo -E, -P- y -N y sus dominios extracelulares interactúan con los de las cadherinas de las células vecinas (**Harris y Tepass, 2010**), mientras que los citoplasmáticos se unen a las cateninas p120, β -catenina y α -catenina.

Los DMs organizan y anclan a los filamentos intermedios (FI) con la membrana plasmática y, al igual que las uniones adherentes, su función es mantener unidas a las células. Sin embargo, su distribución “aleatoria” en la membrana lateral y su interacción con los filamentos intermedios les permite funcionar como “tensores” que distribuyen la fuerza aplicada a las células como consecuencia del estrés mecánico al que están sometidos los epitelios. Los DMs tienen cinco componentes principales: las desmogleinas y las desmocolinas (cadherinas desmosomales), plakoglobina y plakofilina (proteínas de la familia armadillo), además de desmoplakina (proteína de placa) (**Thomason y col., 2010**).

Por último se encuentran las UC. Estas uniones están formadas por pequeños canales que permiten la difusión intercelular de iones y moléculas solubles en agua.

Los canales están formados por dos hemi-canales compuestos de hexámeros de proteínas transmembranales denominados conexinas y cada hemi-canal de una célula interactúa con el hemicanal presente en la célula vecina para formar un conducto que comunica los citoplasmas de ambas células (**Goodenough** y col., **1996**).

II.6. Alteraciones en la función de barrera del epitelio intestinal.

Una variedad de factores externos e internos puede alterar la función de barrera del epitelio intestinal y desencadenar diferentes patologías. Las lesiones en el epitelio intestinal deben ser reparadas rápidamente para impedir que, tanto las bacterias comensales como las patógenas, penetren e invadan al organismo, poniendo en riesgo la sobrevivencia del huésped. Por lo tanto, una barrera epitelial íntegra es indispensable para mantener al organismo saludable (**Gill** y col., **2006**). Los cambios en la microbiota intestinal generan daños en la barrera epitelial y constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de varias enfermedades, como son las EII, el cáncer colorectal (CRC) y el síndrome del intestino irritable (SII). Este tipo de cambios comprenden el aumento en la concentración de las bacterias intestinales, ya que ciertas colonias microbianas se establecen y pueden influir sobre otras, además la interacción microbio-anfitrión llega a promover el desequilibrio de la homeostasis intestinal lo que contribuye al progreso de una enfermedad que inicia con la inflamación, como sucede en pacientes con las EII (**Matsuoka** y **Kanai**, **2014**). Los cambios en la microbiota pueden originarse por varios factores incluidos factores ambientales y genéticos (**Xavier** y **Podolsky**, **2007**) y se ha reportado que los factores genéticos alteran la función de barrera, además de la respuesta inmune innata y adaptativa.

En pacientes con EII existe una respuesta inmune anormal caracterizada por un incremento significativo de células pro-inflamatorias (**Groschwitz** y col., **2009**), que promueven la producción constante de citocinas, lo que afecta la homeostasis y la

función de barrera del epitelio intestinal (**Peeters** y col., **1997**). Por ejemplo, durante las EII existe un aumento de las citocinas interferón- γ (IFN- γ) y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), importantes mediadores de los procesos inflamatorios en la mucosa intestinal. El IFN- γ y el TNF- α , aumentan la permeabilidad paracelular, al inducir cambios la composición molecular de la UE, como la disminución y deslocalización de ZO-1, JAM-A, ocludina y de las claudinas 1 y 4, lo que exacerba la inflamación de la mucosa intestinal (**Adams** y col., **1993**; **Youakim** y Ahdieh; **1999**, **Mankertz** y col., **2000**; **Zolotarevsky** y col., **2002**). Estas citocinas además, disminuyen la proliferación y aumentan la muerte celular (**Kaiser** y Polk, **1997**; **Ruemmele** y col., **1998**) a través de la modulación de vías de señalización como Akt- β -catenina y Wnt- β -catenina (**Nava** y col., **2010**), lo que redundando en la disminución de la barrera intestinal.

II.7. Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) alteran la homeostasis del epitelio intestinal.

Las EII comprenden principalmente dos trastornos de etiología desconocida: la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas enfermedades afectan el canal alimentario inferior y se manifiestan con los síntomas de dolor abdominal y sangrado. La CU afecta al colon y al recto y se distingue por sangrado superficial y ulceraciones en la mucosa inflamada. La EC es una enfermedad granulomatosa, en la que los pacientes presentan abscesos perianales, rectales y, en ocasiones transmurales, llegando a lesionar, además del tracto gastrointestinal, a otros órganos como el hígado o la pared abdominal. La EC, daña todo el tracto gastrointestinal, pero más frecuentemente el íleon terminal y el colon proximal (**Xavier** y Podolsky, **2007**). Las causas que originan las EII se desconocen, pero factores ambientales y genéticos, así como la desregulación del sistema inmune del individuo, contribuyen a su aparición (**Bruewer** y col, **2006**) a través de una secuencia de eventos que comienza con la pérdida de la función de la barrera intestinal, continua con la exposición del contenido luminal a las células en la lámina propia y termina con una respuesta

inmune exagerada (**Clayburgh** y col., **2004**). La respuesta inflamatoria que se presenta durante las EII altera la propiedad de barrera del epitelio intestinal, llegando inclusive a permitir el paso de patógenos. La desaparición de la barrera epitelial intestinal conduce a una mayor infiltración de células inflamatorias, incrementando así la producción de citocinas y otros mediadores de la inflamación, e incrementan el daño al epitelio intestinal, creando un círculo vicioso que desencadena un cuadro crónico (**Bruewer** y col., **2003**; **Adams** y col., **1993**). En las EII, la microbiota intestinal promueve la respuesta de distintos componentes del sistema inmune, que serían los responsables de desencadenar la cascada inflamatoria inductora de lesiones en la mucosa intestinal (**Matsuoka** y Kanai, **2014**).

II.8. El interferón gamma (IFN- γ).

Los interferones, denominados así porque interfieren con la replicación viral, son citocinas pro-inflamatorias que ejercen funciones inmunomoduladoras, antivirales, antitumorales y antiproliferativas, cuando se unen a su receptor en las células blanco, tales como macrófagos y células epiteliales intestinales. (**Wheelock** y col., **1965**; **Groschwitz** y col., **2009**). Existen tres tipos de interferones: I, II y III. Los del tipo I, comprenden al α , β , ω y τ ; el tipo II está representado por el IFN- γ y los interferones de tipo III, comprenden a el IFN- λ 1, 2 y 3 (**Uzé** y col., **2007**). El IFN- γ es producido por linfocitos T CD4+, CD8+, las células T γ/δ , así como por las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés). Este interferón es un modulador de la inflamación, pero también puede ejercer actividad antiviral (**De Maeyer** y col., **1984**). El IFN- γ se produce a través la activación del receptor de células T, patógenos y estimuladores no específicos como la concanavalina-A, así como por factores de crecimiento y estrógenos (**Pestka** y col., **2004**; **Boehm** y col., **1997**; **Bogdan** y **Schleicher**, **2006**; **Sen**, **2001**). El IFN- γ regula tanto procesos inflamatorios como inmunes. Por ejemplo, participa en la defensa del huésped al promover la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II en una gran variedad de células del sistema inmune (**Vilcek** y col., **1985**; **Trinchieri** y **Perussia**, **1985**).

Además, el IFN- γ regula el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas en las células B (**Snapper** y Paul, **1987**). El IFN- γ también regula mecanismos efectores en células del sistema inmune. Así, en macrófagos, induce la expresión de receptores que reconocen a las células blanco, aumenta la biosíntesis de citocinas, como las especies reactivas de oxígeno, el óxido nítrico y el TNF- α (**Ding** y col., **1988**) así como diversas proteínas del complemento (**Strunk** y col., **1985**). Por otro lado, el IFN- γ se asocia al desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la nefritis autoinmune (**Heremans** y col., **1978**) y el lupus (**Jacob** y col., **1987**), que mejora con un tratamiento de anticuerpos monoclonales contra el IFN- γ . En conjunto estas observaciones demuestran que el IFN- γ participa en el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes.

II.9. El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) se nombró así por su habilidad de destruir células tumorales (**Carswell** y col., **1975**). El TNF- α es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por los macrófagos y los monocitos durante la inflamación aguda. Esta citocina activa a varias vías de señalización al unirse a su receptor en diferentes células blanco, induciendo necrosis o apoptosis (**Beyaert** y Fiers, **1994**; **Bazzoni** y Beutler, **1996**; **Locksley** y col., **2001**). El TNF- α , también puede promover la sobrevivencia celular a través de la activación del factor de transcripción NF κ B (**Bazzoni** and Beutler, **1996**; **Orlinick** y Chao, **1998**).

Las funciones biológicas del TNF- α en el organismo son varias e incluyen estimular la respuesta de las células inmunes ante una infección y la resistencia ante agentes patógenos (**Aggarwal** y col., **1991**; **Vilcek** y Lee, **1991**). El TNF- α se une a sus receptores las proteínas p55 y el p75 en la superficie de las células blanco. p55 y p75 forman homodímeros que interactúan con una molécula de TNF- α (**Mease**, **2002**). Existen 2 formas de TNF- α , una monomérica y otra trimérica, ésta última puede ser soluble y unirse a ambos receptores. Una vez que se une a sus receptores el TNF- α se internaliza rápidamente en vesículas cubiertas de clatrina y se lleva a los lisosomas, donde se degrada (**Thoma** y col., **1990**). El TNF- α ejerce sus efectos al

activar a proteínas G, los factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, cinasas como CK-II, Erk-1/2, MAP2, fosfolipasas como PLA2, PLC y esfingomielinasa y caspasas (**Beyaert y Fiers, 1994; Darnay y Aggarwal, 2000; Thornberry y Lazebnik, 1998; Vilcek y Lee, 1991**). El TNF- α , además, promueve la defensa del huésped contra la infección, ya que induce la maduración de las células dendríticas (CD) y promueve la expresión de las proteínas necesarias para la activación y migración de las células T (**Müller y col., 2009**). El TNF- α también puede inducir el reclutamiento de leucocitos al endotelio vascular, mediante la inducción de la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) (**McEver, 1991**). El TNF- α tiene propiedades pro-inflamatorias así como estimuladoras de la respuesta inmune y es un mediador muy importante de la progresión de varias enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y las EII tal como la enfermedad de Crohn.

II.10. Papel del IFN- γ y TNF- α en el desarrollo de las EII.

Durante las EII se liberan una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias incluidas el IFN- γ y el TNF- α . El incremento de citocinas pro-inflamatorias, en relación con las anti-inflamatorias, impide aliviar y perpetúa la inflamación, promoviendo la destrucción del tejido (**MacDonald y col., 1990, Fais y col., 1994**). Las citocinas pro-inflamatorias se asocian con las afectaciones observadas en las EII, como la estenosis intestinal, el sangrado rectal, los abscesos, la formación de fistulas, y las neoplastias asociadas con colitis (**Danese y Fiocchi, 2011; Baumgart y Sandborn, 2012; Peyrin-Biroulet y col., 2011**). En pacientes con EII las citocinas pro y anti-inflamatorias se producen por células dendríticas (CD), neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), células epiteliales intestinales (CEI), células linfoides del sistema innato (ILCs), células T efectoras de la mucosa (células T; TH1, TH2 y TH17) y células T reguladoras en la mucosa inflamada, en respuesta a factores ambientales como los microorganismos de la microbiota intestinal (**Moldoveanu y col., 2015**). Las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α participan en la destrucción de la barrera epitelial intestinal (**Suzuki, 2013; Beaurepaire y col., 2009; Wang y col., 2005**).

De hecho, la exposición constante a estas citocinas promueve la deslocalización de las proteínas de la UE ZO-1, JAM-A, ocludina y claudinas 1 y 4, de la membrana lateral hacia el citosol (**Zolotarevsky y col., 2002**).

La expresión anormal de estas proteínas aumenta la permeabilidad del epitelio intestinal y estimula vías de señalización que reducen la proliferación celular y aumentan la apoptosis (**Schmitz y col., 1999; Gitter y col., 2000; Bruewer y col., 2003; Nava y col., 2010**). Aunque los mecanismos que contribuyen en la reorganización de las proteínas de la UE no se han elucidado completamente, se cree que la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC, por sus siglas en inglés), por la cinasa de MLC (MLCK, por sus siglas en inglés), promueve la desorganización de las proteínas de la UE aumentando la permeabilidad del epitelio intestinal (**Zolotarevsky y col., 2002**). Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas de la UA controlan diversas vías de señalización que regulan diferentes procesos biológicos entre los que se incluyen: la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (**Miller y Moon, 1996; Peifer y col., 1997; Day y col., 1999**). Las citocinas pro-inflamatorias pueden afectar estos procesos biológicos, ya que influyen sobre las vías PI3K/Akt, NOs y JAK/STAT en las CEI (**Nguyen y col., 2001, Frost y col., 2009, Nava y col., 2010**).

II.11. La vía PI3K/Akt durante la inflamación intestinal.

La vía de señalización PI3K/Akt regula numerosos procesos biológicos celulares, como el crecimiento y la supervivencia. Varios factores de crecimiento y otros compuestos reguladores estimulan fisiológicamente esta vía. La activación de esta vía consta de varios pasos, la unión a su ligando (factor de crecimiento, insulina, etc.) induce la autofosforilación del receptor en la membrana plasmática quien a su vez, promueve la fosforilación y activación de la cinasa PI3K (**Figura 5**). PI3K activa promueve la conversión del fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) en fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3) en microdominios de la membrana plasmática.

Esto permite el reclutamiento de la proteína Akt a la membrana, debido a la interacción del dominio de homología con la pleckstrina (PH) de Akt con los fosfolípidos de membrana (**Figura 5**). Además del reclutamiento de Akt, PIP3 induce el reclutamiento de las cinasas PDK1 y PDK2 (mTORC2) a los mismos microdominios, lo que permite que estas cinasas fosforilen a Akt en los residuos treonina 308 y serina 473, respectivamente. Es importante mencionar que PDK1 es la única cinasa que fosforila la treonina 308, mientras que mTORC2 fosforila principalmente a la serina 473, un residuo que también puede ser fosforilado por otras cinasas, como la ligada a la integrina (ILK) (**Delcommenne** y col., **1998**) y PKC ϵ (**Kawakami** y col., **2004**). La fosforilación en estos residuos activa completamente Akt y permite que la molécula se disocie de la membrana y se relocalice a diferentes compartimentos celulares, donde interactúa con diferentes blancos que regulan la sobrevivencia, la proliferación, el metabolismo y la migración celular a través de la fosforilación de numerosos substratos (**Figura 5**) (**Downward**, **2004**).

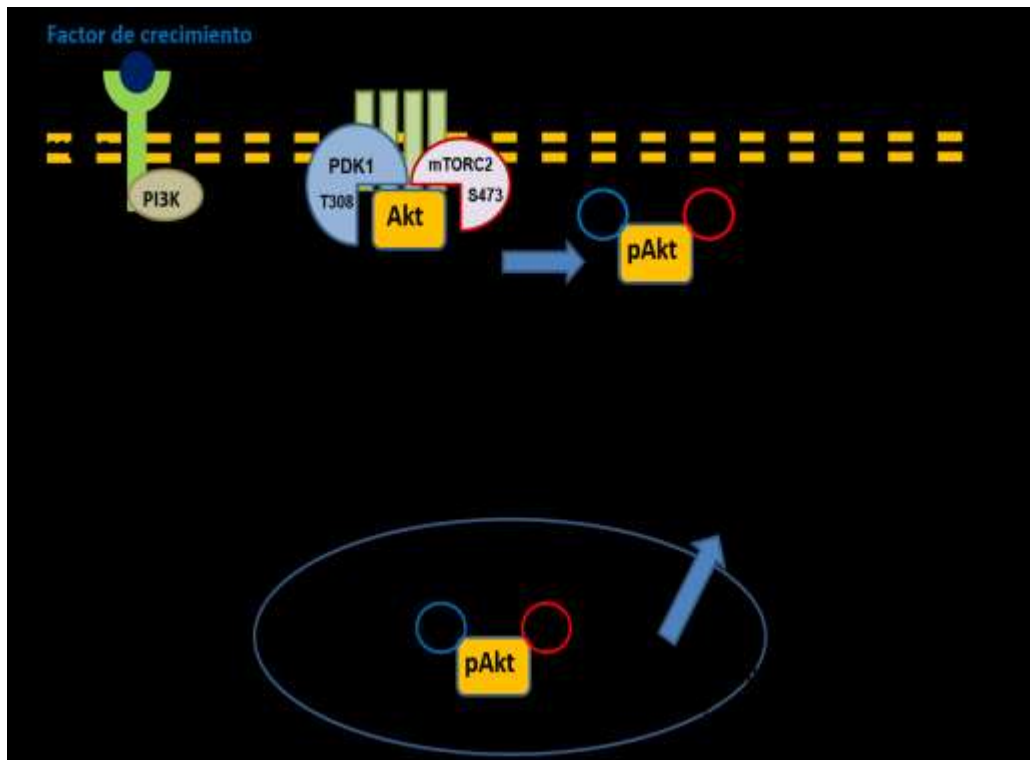


Figura 5. La vía PI3K/Akt. Esta vía se estimula fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana del tipo tirosina cinasa al unirse un factor de crecimiento (EGF, insulina,

etc.), mismos que se autofosforilan y fosforilan a su vez a PI3K. La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2), convirtiéndolo en fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual permite el reclutamiento a la membrana a la proteína Akt, donde esta es fosforilada por el complejo mTORC2 en la serina 473 y por PDK-1 en la treonina 308. Una vez que Akt se fosforila en estos dos residuos, se desprende de la membrana y fosforila, a una gran cantidad de sustratos citosólicos y nucleares, para regular la proliferación, la migración y la muerte de las células.

El IFN- γ y el TNF- α , sinérgicamente influyen en procesos tan distintos como la proliferación y la muerte de las CEI durante la inflamación intestinal, al promover la activación de la vía PI3K/Akt y regular positivamente la actividad transcripcional de la proteína β -catenina. La fosforilación de la β -catenina en la serina 552 por Akt promueve la proliferación celular pero después induce la expresión de la proteína DKK-1, que inhibe a la vía Wnt/ β -catenina. Durante la inflamación, la presencia de IFN- γ y TNF- α es crónica, por lo tanto la exposición prolongada a estas citocinas apaga la vía y lleva a la muerte celular (**Figura 6**).

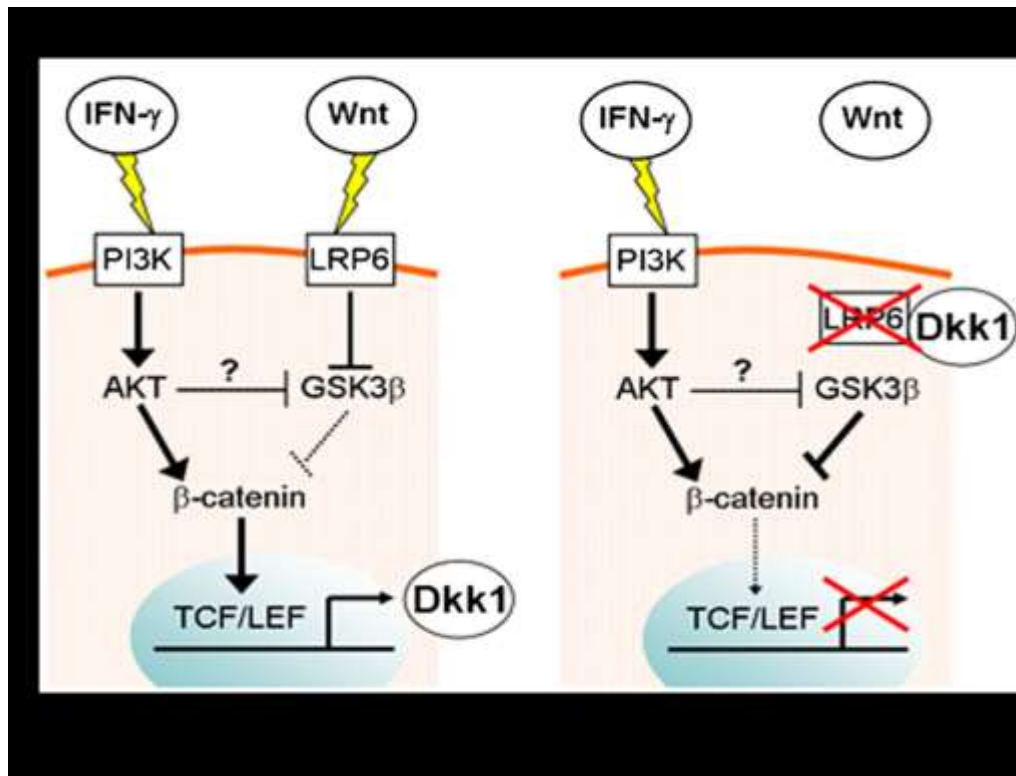


Figura 6. El IFN- γ regula la homeostasis de las CEI al modular de manera secuencial las vías de señalización Akt/ β -catenina y Wnt/ β -catenina. El IFN- γ activa o inhibe la proliferación celular al

modular la señalización de la β -catenina. Al inicio de la inflamación, el IFN- γ activa a la β -catenina a través de la vía PI3K/Akt, la β -catenina a su vez se transloca al núcleo, promoviendo la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular. Sin embargo, la translocación de la β -catenina al núcleo, también promueve la transcripción del inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina, DKK-1 en la mucosa intestinal. Cuando la activación de la vía Akt/ β -catenina por las citocinas se vuelve crónica DKK-1 promueve la degradación del complejo DKK-1/Kremen-1/LRP6, lo que inhibe la proliferación celular y dispara la apoptosis.

II.12. Las proteínas 14-3-3.

Las proteínas adaptadoras 14-3-3 constituyen una familia de proteínas muy conservadas que pesan alrededor de 30kDa. El nombre se deriva de su patrón de elución durante una cromatografía de DEAE celulosa (Dietilaminoetil-celulosa), ya que se obtiene en la 14 fracción y por la posición de migración después de una electroforesis en gel de dos dimensiones. Las proteínas 14-3-3 se expresan en varias isoformas y genes en diferentes organismos. Por ejemplo, en las levaduras existen únicamente dos genes, mientras que en los eucariotas superiores puede haber hasta 15 genes y existen varias isoformas. En los mamíferos se han identificado hasta la fecha 7 isotipos de 14-3-3: β , ϵ , η , γ , τ , ζ , y σ . Con excepción de la 14-3-3 σ , las proteínas 14-3-3 pueden formar homo o heterodímeros (**Wilker y col., 2005; Gardino y col., 2006**). Las proteínas 14-3-3 se unen de manera específica a residuos fosforilados en serina o treonina de las proteínas blanco y estas interacciones son de especial importancia para el ensamble de muchos complejos proteína-proteína (**Muslin y col., 1996**). Esta capacidad de asociación las hace especialmente importantes en la regulación y coordinación de muchos procesos biológicos celulares, como la progresión del ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo, la regulación de la transcripción, reparación del ADN y autofagia (**Figura 7**) (**Pozuelo-Rubio y col., 2004**).

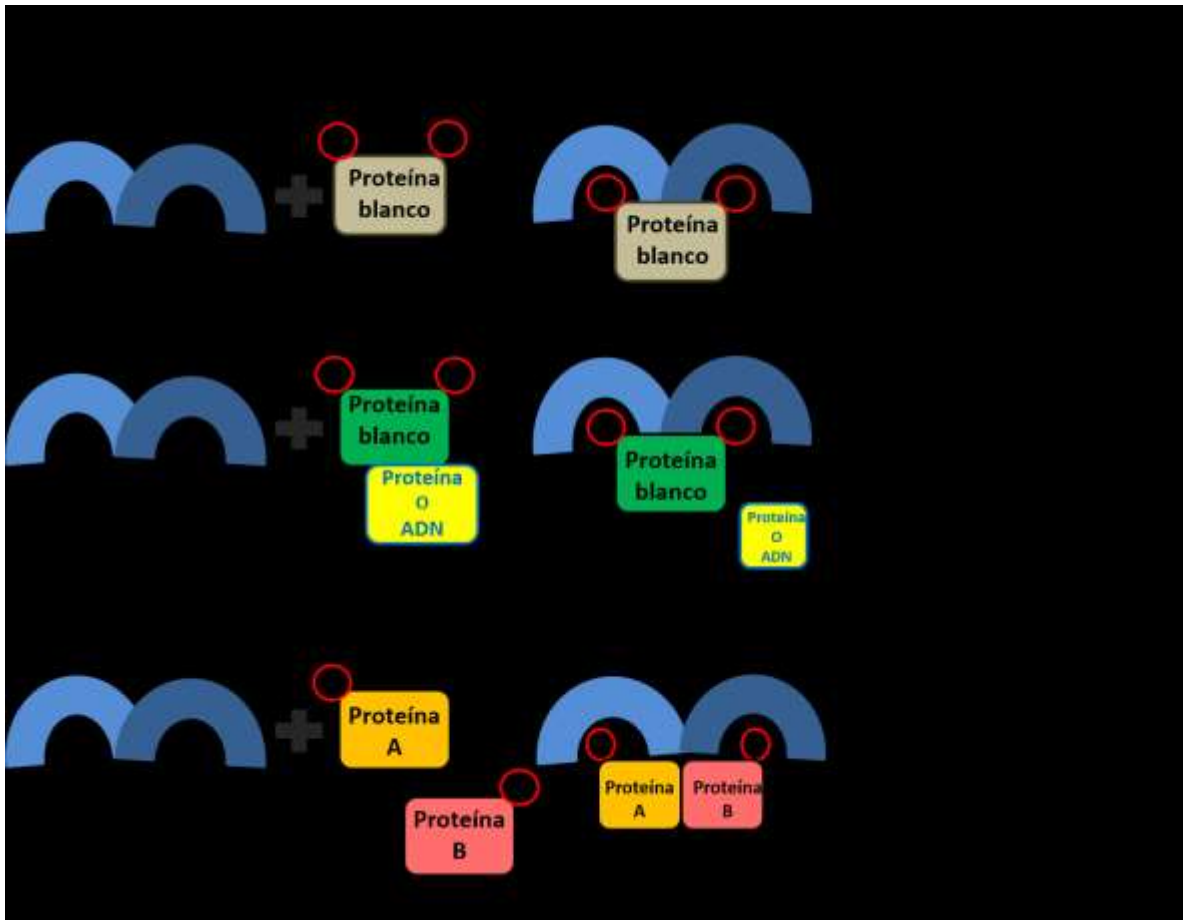


Figura 7. Las principales funciones de las proteínas 14-3-3. Las proteínas 14-3-3 regulan el ciclo celular, el tráfico y localización subcelular de las proteínas, el mantenimiento del citoesqueleto, la transcripción celular y la autofagia.

II.13. Las proteínas 14-3-3 son reguladoras de la autofagia.

La autofagia es regulada por diferentes vías de señalización, incluyendo las MAPKs, PI3K/Akt y mTORC1 (**Figuras 8 y 9**). Las proteínas 14-3-3 se unen a los iniciadores del proceso de la autofagia, mTORC1, TSC2 y PRAS40 impiden la progresión de la señal productora de autofagia (**Wullschlegler y col., 2006; Steinberg y Kemp, 2009**).

II.14. La autofagia.

La autofagia es un proceso adaptativo catabólico de auto-digestión. En la autofagia se promueve la sobrevivencia celular en respuesta a la carencia de nutrientes y por ello los organelos y las proteínas son llevadas a los lisosomas para su degradación y posterior reciclaje de sus componentes (**Levine** y Klionsky, **2004**). La carencia de cualquier nutriente esencial induce que una doble membrana, originada del retículo endoplásmico envuelva componentes citoplasmáticos, como las proteínas y los organelos. Esta estructura se denomina autofagosoma y posteriormente se fusiona con los lisosomas para generar el llamado autolisosoma. La autofagia involucra la expresión de varios genes de la familia de las proteínas relacionadas con la autofagia o ATG (**Mizushima** y col., **2011**) y de una maquinaria proteica requerida para el inicio, elongación y maduración de los autofagosomas, la fusión de estos con los lisosomas y así degradar el contenido de los autolisosomas (**Figura 8**).

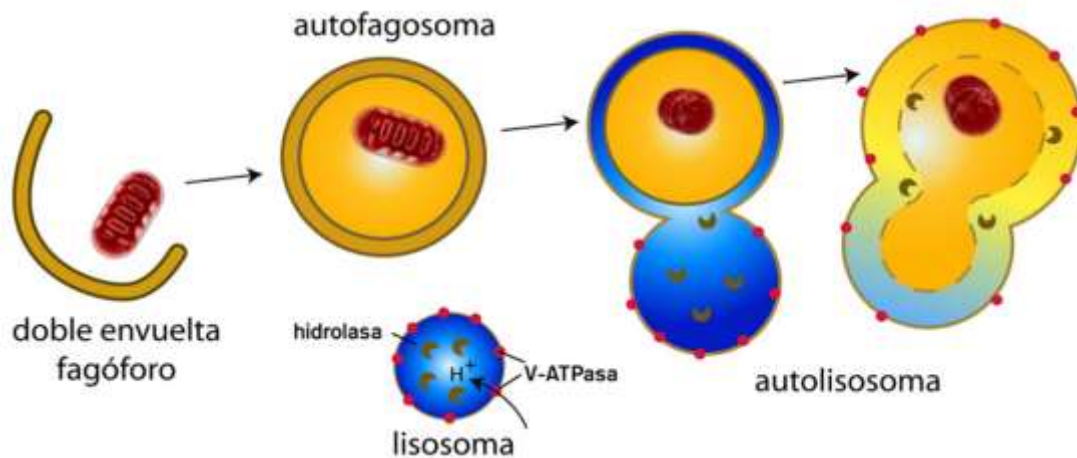


Figura 8. Representación esquemática del proceso de autofagia. La autofagia promueve la sobrevivencia celular en condiciones de estrés celular, como la carencia de nutrientes. La autofagia se caracteriza porque los componentes citoplasmáticos como las proteínas y los organelos se envuelven en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, que se llevan a degradación en los lisosomas para su reciclaje.

El regulador principal de la autofagia es el complejo blanco de la rapamicina en células de mamífero (mTORC1, por sus siglas en inglés). Cuando una célula tiene una fuente estable de energía y nutrientes, el complejo mTORC1 fosforila a las

proteínas iniciadoras de la autofagia ULK-1/2 (**Figura 9a**), lo que inhibe a la autofagia. En cambio, cuando una célula carece de nutrientes, la actividad de mTORC1 disminuye o se inhibe, induciendo el inicio de la autofagia (**Figura 9b**).

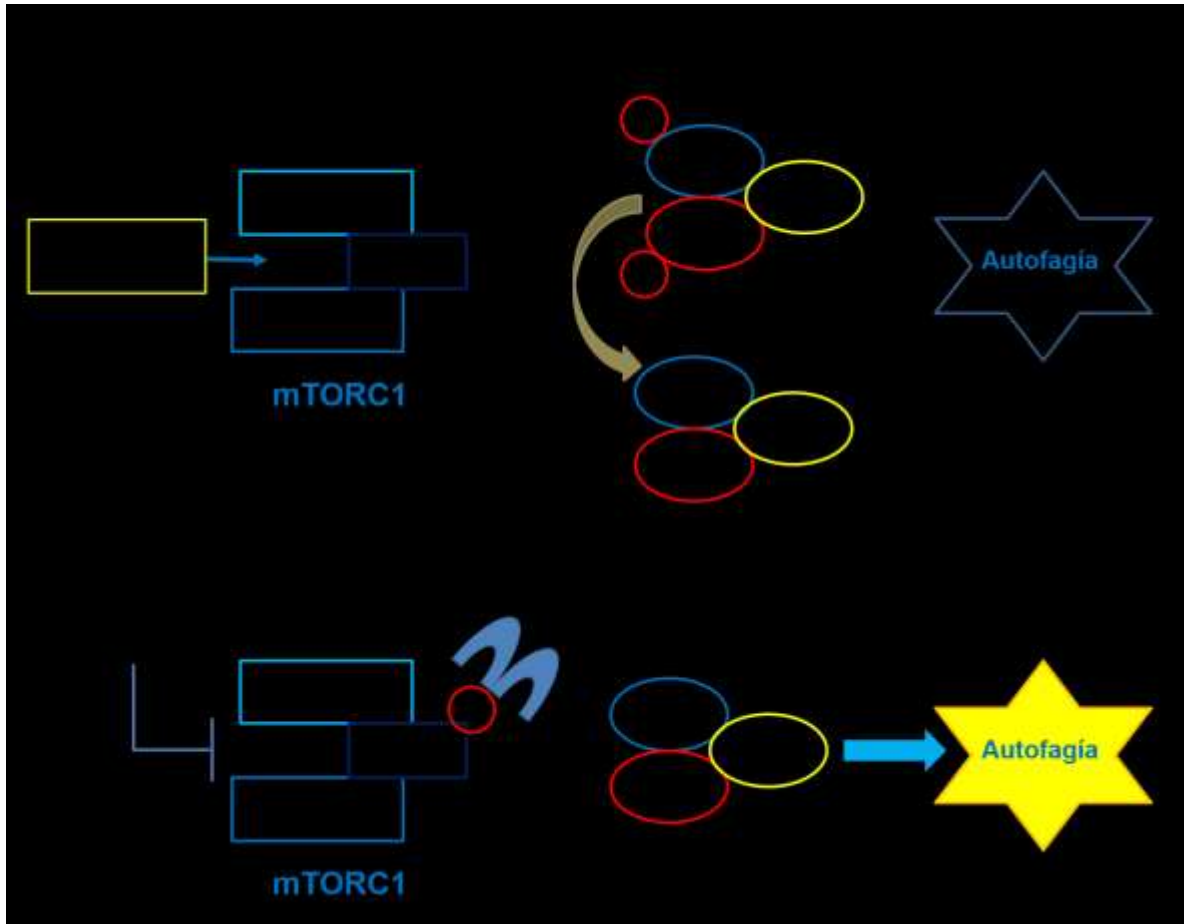


Figura 9. El complejo mTORC1 es el principal regulador de la autofagia. La inducción de la autofagia requiere de la inhibición del complejo mTORC1, que bajo condiciones normales bloquea el inicio de la autofagia al fosforilar a las proteínas ULK 1 y 2.

Para que se induzca la autofagia se necesita de un sistema que cense la disponibilidad de nutrientes y energía en las células. Tal papel lo realizan las cinasas de proteínas activadas por AMP (AMPKs, por sus siglas en inglés) que censan la relación AMP/ATP y regulan varias vías metabólicas que contribuyen a la sobrevivencia celular (**Wullschleger y col., 2006**).

El complejo mTORC1 responde a estas señales en condiciones de escasez de nutrientes o energía lo cual determinara el destino de la célula. La actividad de mTORC1, se regula por su asociación con las proteínas 14-3-3. Durante condiciones normales de crecimiento, las proteínas 14-3-3 se unen a las proteínas TSC2, PRAS40 y hVps34, bloqueando el inicio de la autofagia; ante la carencia de nutrientes, se unen a raptor del complejo mTORC1 y a ULK1, lo que promueve el inicio de la autofagia. Raptor es un substrato de las cinasas AMPKs, en ausencia de nutrientes AMPK fosforila a raptor en los residuos de Ser722 y de Ser 792, promoviendo su unión con las proteínas 14-3-3 lo que induce la inhibición del complejo mTORC1 e inicia la autofagia (**Gwinn** y col., **2008**). En esta tesis se investigó la relación que guardan las proteínas 14-3-3 con el inicio de la autofagia y la activación de Akt durante la inflamación en las CEI.

III. HIPÓTESIS

Las proteínas 14-3-3 regulan la fosforilación de Akt en la treonina 308 durante la inflamación en las células epiteliales intestinales.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Investigar si el IFN- γ y el TNF- α promueven la asociación de las proteínas 14-3-3 con PDK-1 para inhibir la fosforilación de Akt en la treonina 308 en las células epiteliales intestinales.

IV.2. Objetivos particulares

- I. Investigar si los estímulos pro-inflamatorios aumentan la fosforilación de Akt en la treonina 308 en las CEI.
- II. Analizar si PDK-1 se activa cuando las CEI se someten a estímulos pro-inflamatorios.
- III. Investigar si los estímulos pro-inflamatorios aumentan o disminuyen la cantidad de las proteínas 14-3-3 η y θ .
- IV. Identificar el mecanismo mediante el cual las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α inducen la degradación de la proteína 14-3-3 η .
- V. Analizar el efecto de la inhibición de Akt en las CEI durante los procesos inflamatorios.

V. MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se usaron modelos de inflamación así como técnicas bioquímicas que incluyen inmunodetección en membrana de nitrocelulosa (WB, western blot), la sobre-expresión de proteínas e inmunoprecipitación, las cuales se complementaron con el uso de los inhibidores de las proteínas 14-3-3 (BV02) o de la cinasa Akt (inhibidor VIII).

V.1 Anticuerpos y reactivos.

Las citocinas recombinantes humanas IFN- γ y TNF- α se obtuvieron de Peprotech (Rocky Hill, NJ) y se usaron a una concentración de 100 y 110 U/ml respectivamente para los tratamientos *in vitro*. La información sobre los anticuerpos primarios se describe en la tabla 1 (Nava y col., 2014). Las transfecciones de los plásmidos se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen; Grand Island, NY). El inhibidor de Akt, Akt inhibitor VIII (Calbiochem; Darmstadt, Germany) y el pan-inhibidor de 14-3-3, el BV02 (Sigma; St Louis, MO) se usaron de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores. El dextran sulfato de sodio (DSS, 40K-50K de peso molecular) se compró a Affymetrix, USB products (Santa Clara, CA). Los anticuerpos secundarios se compraron a Invitrogen y Jackson Immuno Research.

V.2. Cultivo celular.

Las líneas celulares de colon SW480 y RKO se cultivaron en medio DMEM con 10% suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C centígrados con 5% de CO₂. Las células se sembraron en cajas de cultivo para ser tratadas con las citocinas IFN- γ y TNF- α . Además, se sembraron células en cubreobjetos cubiertos de colágeno para los experimentos de inmunodetección.

V.3. Transfección de las diferentes construcciones en las células SW480.

Las células SW-480 se cultivaron y mantuvieron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Las células se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, San Diego, Calif.) según las instrucciones del proveedor.

V.4. Experimentos en Animales.

Todos los procedimientos con animales fueron revisados y aprobados por el comité institucional de manejo y uso de animales de laboratorio (Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals; CICUAL) en el CINVESTAV y desarrollados de acuerdo a los criterios establecidos por el CONACYT. Los ratones C57Bl/6J se compraron a The Jackson Laboratories. Los animales se mantuvieron en cautiverio en condiciones estándar y con ciclos de luz oscuridad 12 h/12 h con comida y agua *ad libitum* (Laukoetter y col., 2007). La inmunodetección e inmunofluorescencia de los tejidos animales se realizó siguiendo los lineamientos establecidos anteriormente (Laukoetter y col., 2007).

V.5. Tratamientos con IFN- γ y TNF- α en las células SW480 y RKO.

Las células SW480 y RKO, se sembraron a confluencia en medio DMEM. Posteriormente se trataron con IFN- γ y con TNF- α (Peprotech, Rocky Hill, NJ) a una concentración de 100 y 110 U/ml respectivamente.

V.6. Inducción de colitis con DSS.

Para realizar los ensayos de colitis experimental, los ratones se trataron con dextran sulfato de sodio (DSS 3%, US biologicals) en agua de beber. El índice de actividad de la enfermedad (DAI), se monitoreo diariamente de acuerdo al método descrito por Cooper y col., 1993.

V.7. Ensayos de proliferación y apoptosis.

La proliferación celular se determinó *in vivo* por la inyección intraperitoneal de 100µg de 5-etinil-deoxiuridina (EdU, Invitrogen). La incorporación de EdU se observó con el kit de proliferación celular Click-it EdU (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La apoptosis *in vivo* se determinó por WB e inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo contra caspasa-3 activa. Para estudiar la muerte de las CEI, se detectó la cantidad del antígeno CK18 por el ensayo M30, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (M30 CytoDEATH).

V.8. Ensayos de inmunodetección en membranas de nitrocelulosa.

Para las inmunodetecciones las muestras se colectaron en solución amortiguadora de lisis Ripa (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% ácido deoxycólico, 0.1% SDS, 50 mM Tris [pH 8.0]) suplementada con inhibidores de proteasas y fosfatasa (protease inhibitor cocktail, Roche). Posteriormente las muestras se sonicaron y clarificaron por centrifugación. La determinación de proteínas se hizo usando el sistema de BCA (Pierce; Rockford, IL), y las muestras se prepararon en solución amortiguadora de carga 4X (Bolt, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Ma.), adicionado con β-mercapto-etanol (Sigma; St. Louis, MO). Cantidades iguales de proteínas se fraccionaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 2% wt/vol de leche descremada disuelta en solución amortiguadora de Tris (Sigma; St. Louis, MO) y adicionada con 0.1% Tween-20 (Sigma; St. Louis, MO). Los anticuerpos primarios se incubaron en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron a través de una reacción de quimioluminiscencia (HyGLO Quick Spray, Denville Scientific, Inc.) usando placas fotográficas (Kodak, Rochester, N.Y.).

Tabla 1. Resumen de anticuerpos utilizados en los ensayos de Wb

Anticuerpo primario	Producido en	Dilución	Marca/Catálogo
Monoclonal Akt-1	Conejo	1:1,000	Cell Signalling/2938
Monoclonal pAkt T308	Conejo	1:1,000	Cell Signalling/9275
Monoclonal pAkt S473	Conejo	1:1,000	Cell Siganlling/9271
Policlonal pHistona 3 Ser 10	Conejo	1:1,000	Abcam/ab5176
Policlonal GSK3β	Conejo	1:1,000	Santa Cruz/sc-9166
Policlonal pGSK3β ser9	Conejo	1:1,000	Abcam/ab9769
Policlonal β-catenina	Conejo	1:1,000	Santa Cruz/sc-7199
Monoclonal pβ-catenina S552	Conejo	1:5,000	Cell Signalling/5651S
Policlonal PDK1	Conejo	1:2,000	Cell Signalling/3062
Policlonal pPDK1 S241	Conejo	1:1,000	Cell Signalling/3061
Policlonal Oct-A	Conejo	1:2,000	Santa Cruz/sc-807
Monoclonal 14-3-3η	Conejo	1:1,000	Cell Signalling/5521
Policlonal 14-3-3ζ	Conejo	1:2,000	Santa Cruz/sc-1019
Policlonal p14-3-3ζ S58	Conejo	1:1,000	Abcam/ab51109
Policlonal Raptor	Conejo	1:1,000	Abcam/ab5454
Monoclonal GAPDH	Ratón	1:30,000	Santa Cruz/sc-32233

V.9. Microscopía de inmunofluorescencia.

Las secciones de colon de ratón se trataron con paraformaldehído 2X (PFA en PBS) por 20min, pH=7.4. Después se realizaron 2 lavados con PBS 1X, y las secciones se dejaron reposar por 5 min en PBS en una cámara. Posteriormente los tejidos se fijaron con metanol a -20 °C por 20 min. Se hicieron dos lavados con PBS y las secciones de tejido se dejaron reposar por 5 min en PBS. Después se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos incubando con albumina sérica bovina al 1% (BSA libre de IgG) disuelta en PBS por 1 hora, para después incubar por 24 horas a 4 °C con los anticuerpos primarios disueltos en BSA al 1%. En seguida los tejidos se lavaron 3 veces con PBS al 1X por 10 minutos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes para detectar a la β -catenina y p β -catenina S552 y demás proteínas. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS al 1X y después se marcaron los núcleos al incubar durante 10 minutos con TO-PRO3 (1:1000 en PBS1X) (Molecular Probes, Grand Island, NY, USA). Al término de este tiempo se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS 1X y las secciones de tejido se montaron con VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, Ca). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal LSM710 (Zeiss, Jena, Alemania), se usaron los objetivos de aceite Plan-NEOFLUAR 1003/1.3 y 403/1.3 y el objetivo seco 203/0.5, las imágenes se editaron con el programa provisto por el vendedor (ZEN lite, Zeiss; Jena, Alemania).

V.10. Fraccionamiento celular.

Las células SW480 se lisaron con el amortiguador isotónico A (Hepes 40 mM pH=7.4, 120 ml KCl, EGTA 2 mM, glicerol al 0.4%, 10 mM b-glicerol fosfato, NP-40 al 0.4% y se adicionaron inhibidores de proteasas), la concentración final del detergente utilizado fue 0.2% (aproximadamente 0.3 ml del amortiguador A para las células crecidas en placas de 15 cm), las células se mantuvieron con el amortiguador en ligera rotación por 30 min a 4 °C. Los núcleos se separaron por centrifugación a 1,000 x g por 5 min, el sobrenadante se centrifugo después a 10,000 x g por 10 min para obtener la fracción citosólica. La pastilla obtenida de los núcleos se lavó suavemente

con NP-40 al 0.1% y con amortiguador A sin detergente, posteriormente se centrifugo a 1,000 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante. La fracción nuclear se re-suspendió en el amortiguador B (Tris-HCl 10 mM a pH=7.4, KCl 1.5 mM, Triton X-100 0.5%; Deoxicolato 0.5%, MgCl₂ 2.5 mM, LiCl 0.2 M en relación 1:2 v/v y se le adiciono inhibidores de proteasas), las fracciones se pusieron en rotación 1 hora a 4 °C, el extracto se separó por centrifugación a 2,000 x g por 5 min. Posteriormente el extracto se centrifugo a 10,000 x g por 10 min para obtener la fracción perinuclear (PNF). La pastilla que contiene a los núcleos se re-suspendió en un amortiguador que contenía sucrosa a 0.34 M y fue separada por centrifugación a 2,000 x g por 10 min. Los núcleos se disolvieron en urea 8 M, se sonicaron para obtener la fracción nuclear (cNF), y se clarifico por centrifugación a 10,000 x g por 10 min.

V.11. Detección de Akt activa en los núcleos de las CEI de ratón.

Para aislar los núcleos de colon de ratón, el colon se extrajo rápidamente y a partir de este se obtuvo la mucosa separándola del resto del tejido, consiguiendo con esto una capa de CEI, esta capa se homogenizo en una proporción 1:10 con 10 golpes en amortiguador "A" (Amortiguador de fosfatos 10 mM pH= 7.0, MgCl₂ 3 mM, Sacarosa 0.32 M). El homogenado se centrifugó a 3000 rpm por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y la pastilla se resuspendió suavemente en 60 ml de amortiguador "B" (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, KH₂PO₄ 4 mM, MgCl₂ 3mM, sacarosa 1.16 M). De la suspensión anterior se colocaron 10 ml sobre 1.5 ml de un colchón se sacarosa 2 M en amortiguador B. El colchón se centrifugó a 33,000 rpm durante 100 min a 4°C en un rotor SW 40-Ti. Después de la centrifugación los núcleos se recuperaron removiendo la parte superior del colchón sin re-suspender la pastilla nuclear. Los núcleos se lavaron 2 veces con PBS. Para comprobar la integridad de los núcleos se observaron al microscopio de campo claro.

V.11. Estadística.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una cola con la prueba de Dunnett o la prueba de T Student's con doble cola (GraphPad Software; La Jolla, CA). $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VI. Resultados.

VI.1. La vía de señalización de Akt es activada en CEI de los ratones con colitis.

Los mecanismos que controlan la activación de Akt durante los procesos inflamatorios intestinales no se conocen a fondo. Primeramente se analizó si tres elementos de la vía Akt (pAkt 308, pGSK3 β S9 y p β -catenina S552) se encuentran activos en la mucosa de ratones nativos con colitis inducida con DSS (**Perse y Cerar, 2012**). Como se muestra en la **figura 10A**, la forma activa de Akt (pAkt treonina 308) aumenta en la mucosa de los animales con colitis, en comparación con los animales control. Además, en la **figura 10A** se observa que aumenta la fosforilación de los sustratos de Akt, GSK3 β fosforilada en la serina 9 (**Joep y col., 2007**) y la β -catenina fosforilada en la serina 552 (**Fang y col., 2007**), sin que cambie la cantidad total de estas proteínas (**Fig. 10A**). La activación de Akt ocurre en las células epiteliales que se encuentran a lo largo de todo el eje cripta – superficie, en los ratones control (**Figura 10B**). Sin embargo, Akt se encuentra más activa en las células epiteliales intestinales de los ratones con colitis (**Figura 10B**). Es decir la vía de Akt se activa en los animales con colitis.

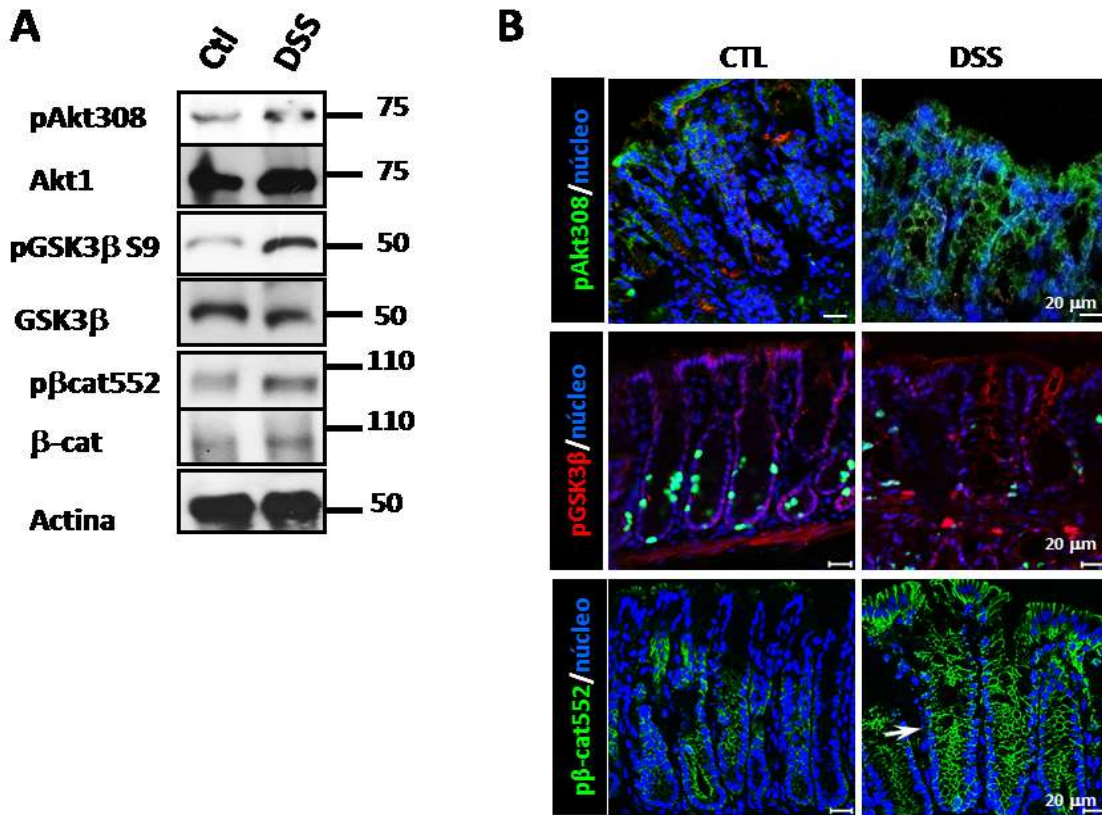


Figura 10. La vía de señalización de Akt se activa en las células epiteliales durante la colitis. (A) La cantidad de pAkt308, Akt1, pGSK3β, GSK3β, pβ-cat552, y de la β-catenina, se analizó por inmunodetección en membranas de nitrocelulosa en la mucosa de animales control y animales tratados con colitis inducida por DSS. La actina se usó como control de carga. (B) La distribución de la E-cadherina (rojo), pAkt308 (verde), pGSK3β (rojo), EdU (verde) y pβ-cat552 (verde) se investigó en la mucosa de los ratones control y con colitis usando inmunofluorescencia indirecta. Núcleos en azul. n=3.

La activación de Akt en el epitelio intestinal durante la inflamación puede reducir la proliferación. Para investigar esta posibilidad se evaluó el índice de actividad de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés), que valora los distintos grados o signos de la colitis (Cooper y col., 1993). Además se analizó la cantidad del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés) y la histona H3 fosforilada (pHist3), en lisados de mucosa de colon obtenidos de los animales control o tratados con DSS. Observamos que existe una disminución gradual en la proliferación celular conforme aumenta el nivel de colitis (DAI) (Figura 11A) y como consecuencia se

acorta la longitud del colon (**Figura 11B**). Cuando comparamos la presencia de Akt activa (Akt Ser473 y Akt Tre308) con los marcadores de proliferación, detectamos que Akt está más fosforilada durante la inflamación y que no existe correlación alguna entre la activación de la molécula y la presencia de PCNA y pHist3. Esto demuestra que la activación de Akt reduce la proliferación celular durante colitis (**Figura 11A vs 11C y 11D**). Sin embargo, llama la atención que los niveles de pAkt308 y pAkt473 tengan un comportamiento distinto (**figura 11D**). Así, mientras la pAkt473 aumenta desde el primer día y se mantiene elevada durante el curso del experimento, pAkt308 oscila (**Figura 11D**). Sin embargo, la cantidad de Akt total varía muy poco durante el curso del experimento (**Fig. 11C**). Estos resultados sugieren que la fosforilación de Akt en la Tre308 y en la Ser473 es regulada de manera distinta durante los procesos inflamatorios. Para confirmar estos hallazgos, se analizó el estatus de la fosforilación de Akt en la Tre 308 y en la Ser 473, en los lisados de las células SW480 expuestas al IFN- γ por 1-12 hrs. Los resultados revelaron que la fosforilación de Akt en la serina 473 y en la treonina 308 aumentan a partir de una hora y permanecen elevadas hasta las 12 horas después de la exposición a las citocinas (**Figura 11E**). Sin embargo, al igual que se observa en el ratón, la fosforilación en la Ser 473 y en la Tre 308 siguen una cinética distinta (**Figura 11F**), sin que se modifique Akt total (**Figura 11E**).

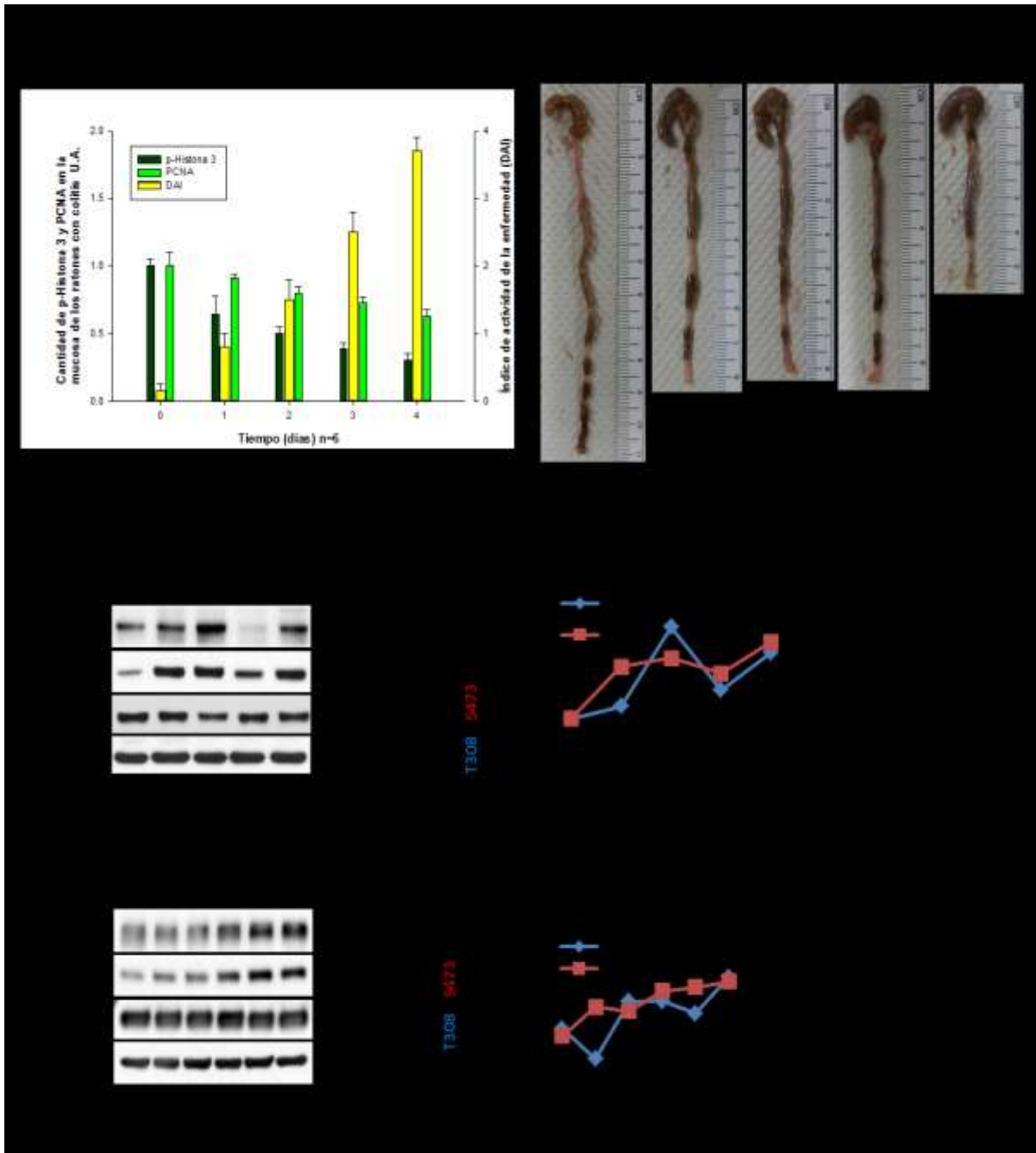


Figura 11. La inflamación inducida por el DSS disminuye la proliferación celular y la longitud del colon. (A) Efecto de la inflamación inducida por el DSS utilizando marcadores de proliferación celular (PCNA, pHistona3), y el índice de actividad de la enfermedad (DAI). Los ratones se trataron con DSS al 3%, disuelto en agua durante de 1 a 4 días. Los valores relativos para PCNA y pHistona3 se obtuvieron de los análisis densitométricos normalizados contra actina. El índice DAI se analizó como se había reportado previamente (**Cooper y col., 1993**). n=6. (B) Imágenes representativas de tejido del colon obtenido de los animales control, y con colitis, tratados durante los mismos tiempos y

condiciones que en (A). n=6. (C) La fosforilación de Akt en la serina 473 y la treonina 308 junto con la cantidad total de Akt se analizó en la mucosa de animales control y tratados con DSS por 1-4 días. El nivel de actina se usó como control de carga. (D) El análisis densitométrico de los resultados obtenidos al cuantificar la inmunodetección tanto de pAkt473, como de pAkt308 se presenta como un gráfico de líneas (n= 4). (E) Los niveles de las fosfoformas de Akt, pAkt473 y pAkt308 junto con los niveles de panAkt se analizaron en células SW480 tratadas con IFN- γ por 1-4 días. La actina se usó como control de carga. (F) El análisis densitométrico realizado a pAkt473 y pAkt308 de las células SW480 tratadas con las citocinas se presenta como un gráfico de líneas (n= 3).

En conjunto, todos estos resultados confirman que la fosforilación de Akt en la serina 473 y en la treonina 308 es importante para la activación de la cinasa durante la inflamación y que ambos residuos se regulan diferencialmente durante la colitis.

Además de la fosforilación de la Ser473 y la Tre308, la activación de Akt puede involucrar la Tre450 (Shaw y col., 2006) y la Ser246 (Li y col., 2006). Por lo tanto se analizó estos residuos en las muestras de los animales con colitis. Como se muestra en la **figura 12**, el patrón de expresión de pAkt450 y pAkt246 disminuye durante la inflamación (**Figura 12A**). Además, como se observó en los ratones, en el modelo *in vivo*, el tratamiento con las citocinas induce un incremento en el nivel de pAkt450 en función del tiempo, a la vez que disminuye pAkt246 (**Figura 12B**). En conjunto estos resultados sugieren que la fosforilación en la Ser246 y Tre 450 de Akt no confieren estabilidad a Akt durante periodos de inflamación.

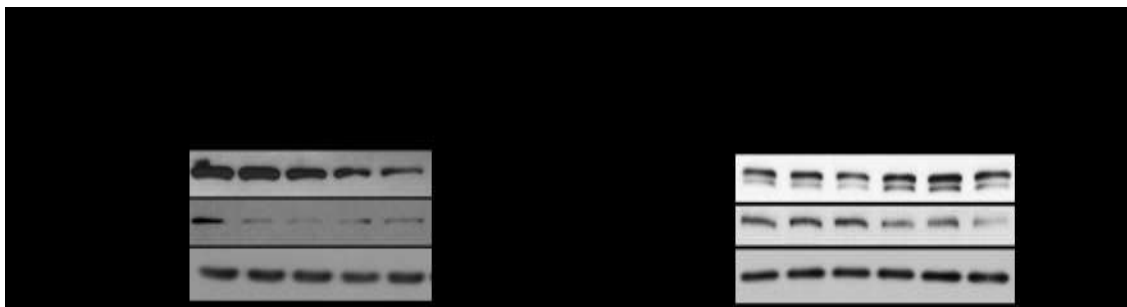


Figura 12. El nivel de Akt fosforilada en los residuos de Ser 246 y Tre 450 disminuye durante la inflamación intestinal. Efecto del proceso inflamatorio sobre el nivel de fosforilación de los residuos Ser246 y Tre450 de Akt, analizados por western blot tanto *in vivo* (A), así como *in vitro* (B). Los ratones de la cepa C57BL/6J se trataron con DSS disuelto en agua al 3% durante 1 a 4 días. Las células SW480 se trataron con IFN- γ (100 U/ml). La actina se utilizó como control de carga.

VI.2. Durante la colitis, la proteína 14-3-3 η regula la fosforilación de la Tre308 de Akt en las CEI.

En seguida se investigó qué mecanismo induce la activación de Akt en el residuo Tre308, en el epitelio intestinal durante la inflamación. Esta fosforilación la realiza PDK1, quien además fosforila a otros sustratos como las cinasas p70S6 y P90S6 (**Mora y col., 2004**). Se ha observado que PDK1 se auto-fosforila en la serina 241 lo que aumenta su actividad de cinasa (**Casamayor y col., 1999**). De manera que se investigó si aumenta esta fosforilación en la mucosa de los ratones tratados con DSS. Interesantemente el proceso inflamatorio disparado por el DSS aumento la fosforilación específica de PDK1 en la Ser241, pero no su cantidad total (**Figura 13A**). Por otro lado, las proteínas 14-3-3 se asocian a PDK1 e inhiben su activación (**Sato y col., 2002**). Por lo tanto, el siguiente paso fue investigar cuál miembro de la familia de las 14-3-3 inhibe a PDK1. Para ello se transfectaron los cADN de distintos miembros de estas proteínas en las células epiteliales SW480. 14-3-3 η y θ , inhiben la autofosforilación de PDK1 (**figura 13B**), pero no 14-3-3 β , ϵ o ζ . En seguida se midió la cantidad de 14-3-3 η en la mucosa de los ratones con colitis. Como se muestra en la **figura 13C**, el contenido de 14-3-3 η en la mucosa de los ratones con colitis es menor que en los animales control, mientras que la cantidad de 14-3-3 θ , aumenta con respecto al control. Sin embargo, no se detectaron cambios en la cantidad de 14-3-3 ϵ o ζ (**Figura 13C**). Aún más, el análisis densitométrico realizado a las películas obtenidas en los ensayos de inmunodetección para pPDK1 y 14-3-3 η corroboró que la cantidad de 14-3-3 η disminuye en la mucosa de animales con colitis, mientras la cantidad de pPDK1 Ser241 aumenta (**Figura 13D**), como era de esperarse. No se detectaron cambios en la cantidad de 14-3-3 ζ o ϵ (**Figura 13D**). Por otro lado, por inmunofluorescencia se observó que 14-3-3 η y pPDK1 están presentes a lo largo de todo el eje superficie-cripta de los animales control (**Figura 13E**). Sin embargo, mientras 14-3-3 η se enriquece en la base de la cripta, PDK1 se expresa principalmente en el tercio superior de las criptas de colon (**Figura 13E**). En correspondencia a lo observado en los ensayos de inmunodetección, los animales con colitis expresaban menos 14-3-3 η y más pPDK1 que los controles (**Figura 13E**).

En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de 14-3-3 η favorece un incremento de la actividad de PDK1 durante inflamaci3n en las CEI.

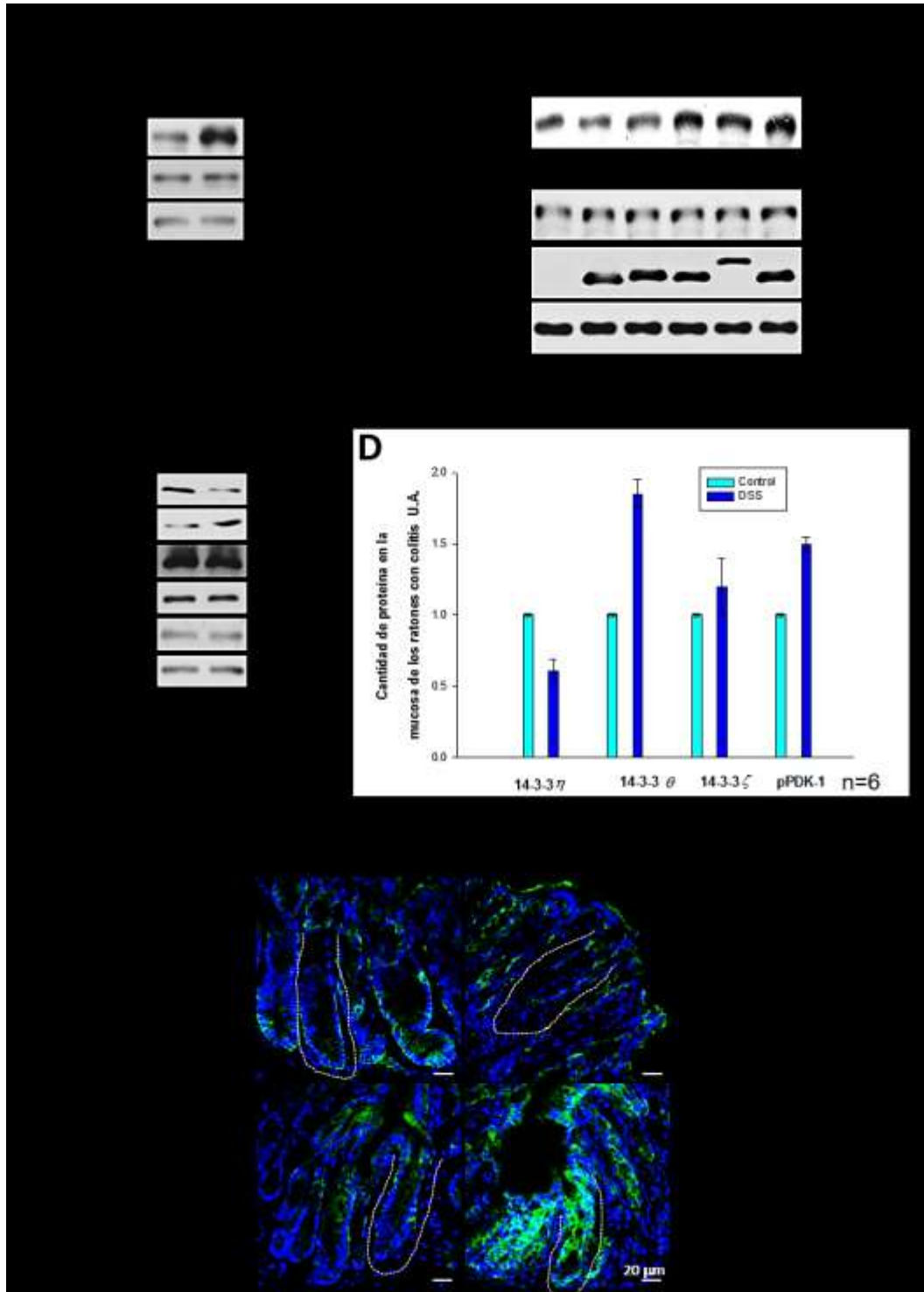


Figura 13. El nivel de 14-3-3 η disminuye durante los procesos inflamatorios.

(A) La cantidad de la forma activa de PDK1 (pPDK1 S241) y PDK1 se analizó a través de la inmunodetección en nitrocelulosa en muestras de la mucosa de ratones expuestos a DSS por 4 días. La actina total se usó como control de carga. (B) La cantidad de pPDK1 Ser241 y PDK1 se determinó en extractos proteicos de células SW480 transfectadas con plásmidos que codifican para 14-3-3 η , 14-3-3 θ , 14-3-3 β , 14-3-3 ϵ o 14-3-3 ζ . Los valores densitométricos obtenidos aparecen como números en la parte baja de la inmunodetección. Las proteínas se marcaron con la bandera Flag. La actina se usó como control de carga. * marca una banda inespecífica obtenida con el anticuerpo anti Oct-A. (C) La cantidad de 14-3-3 η , 14-3-3 ζ y 14-3-3 ϵ se analizó en mucosas obtenidas de ratones control y tratados con DSS. La actina se usó como control de carga. El gráfico en (D) corresponde a los valores densitométricos relativos que se obtuvieron para pPDK1, 14-3-3 η , 14-3-3 ζ en las muestras de los ratones con colitis. Estos valores se normalizaron con respecto al control de carga (n=6). *p<0.005;**p<0.001. (E) La localización de pPDK1 (Verde) y 14-3-3 η (Verde) se investigó por inmunofluorescencia indirecta en la mucosa de los animales control y con colitis. Las imágenes mostradas son representativas de los resultados obtenidos. Núcleos en azul. El plano de la cripta está marcado por la línea discontinua.

VI.3. 14-3-3 ζ fosforilada induce la degradación de 14-3-3 η y regula la fosforilación de Akt308.

En seguida se investigó el mecanismo que lleva a la degradación de la proteína 14-3-3 η en la mucosa de los ratones con colitis. Las proteínas en las células eucariotas se degradan por el sistema de ubiquitina-proteosoma y por autofagia. La primera vía degrada a la mayoría de las proteínas celulares de bajo peso molecular y la segunda ruta es responsable de la degradación de agregados proteicos y organelos presentes en la célula (**Lilienbaum y col., 2013**). Por lo tanto, primero se investigó si la degradación de la proteína 14-3-3 η , que inducen las citocinas proinflamatorias, se bloquea con inhibidores del proteosoma o de la autofagia. Para ello se trató a las células SW480 con la mezcla usual de IFN- γ y TNF- α durante 12 horas y les medimos la cantidad de 14-3-3 η por inmunodetección. Como era de esperarse, la degradación inducida por las citocinas se bloquea con cloroquina (CQ) o con MG132, inhibidores del lisosoma o del proteosoma respectivamente (**Figura 14A y B**).

La presencia de LC3-II y XIAP se usó como control de que los tratamientos para inhibir al lisosoma o al proteosoma funcionaron (**Figura 14A**). En contraste a lo observado con CQ y MG132, la inhibición de las proteasas de cisteína, usando ALLN, no tiene efecto alguno en la degradación de 14-3-3 η (**Figura 14A**). En conjunto, estos resultados sugieren que 14-3-3 η se degrada por proteosomas y autofagia en las CEI estimuladas con las citocinas proinflamatorias.

Las citocinas proinflamatorias promueven la autofagia de diversas proteínas (**Assani y col., 2014, Fougeray y col., 2012**), mediante la activación de la cinasa Akt. Este resultado sugiere que la activación de Akt induce la degradación de 14-3-3 η mediada por autofagia durante la inflamación.

Por consiguiente se investigó la autofagia en la mucosa de los ratones con colitis mediante la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II por inmunodetección (**Klionsky y col., 2012; Mizushima y Yoshimori, 2007**). LC3-II aumenta en los lisados de ratones tratados con DSS en comparación con los ratones control (**Figura 14C**). Además, LC3-II y el marcador de autofagosomas P62, se acumulan en las vesículas presentes en las CEI (Flecha blanca) y en las células localizadas en la lámina propia (Estrella roja, en el ratón control, **figura 14D**). El número de células positivas a ambos marcadores en los dos tipos celulares aumenta en la mucosa de los ratones con colitis (**Figuras 14D y 14E**). En seguida se analizó la inducción de la autofagia en las células SW480 expuestas a las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α por 1 a 24 horas. Como puede verse en la **figura 14F**, LC3-II aumenta en las células tratadas con las citocinas y la detección de autofagosomas con naranja de acridina confirmó que las citocinas inducen autofagia en las CEI (**Figura 14 G**).

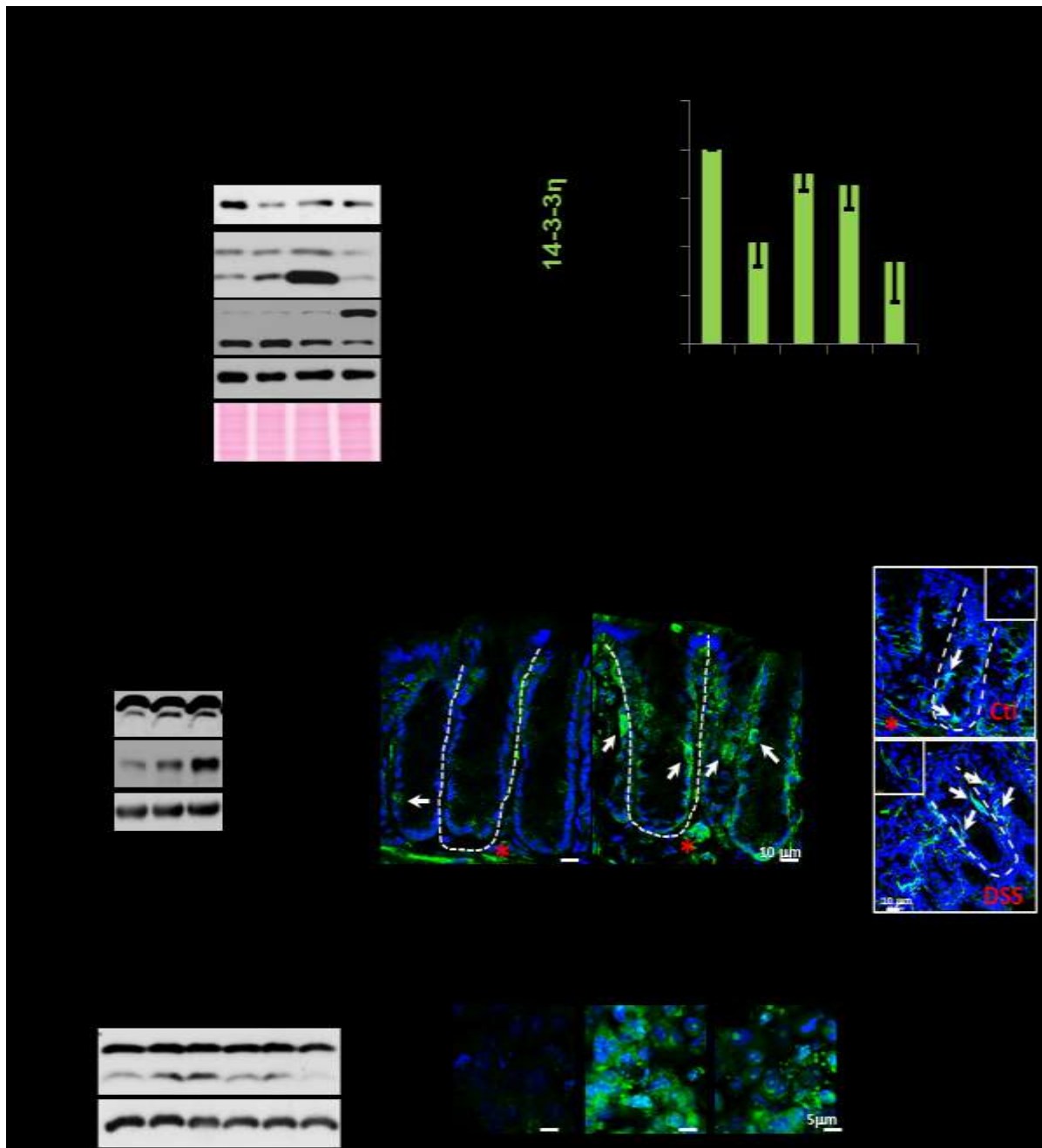


Figura 14. Las citocinas pro-inflamatorias inducen la degradación lisosomal y proteosomal de la proteína 14-3-3η. (A) La presencia de las proteínas 14-3-3η, XIAP y LC3-I/LC3-II se analizó en lisados totales de las células SW480 tratadas con las citocinas pro-inflamatorias IFN-γ/TNF-α o con las citocinas pro-inflamatorias más los inhibidores de proteosoma (MG132) o de lisosoma (Cloroquina (CQ)). (B) Análisis densitométrico de los ensayos de inmunodetección, n=3. La actina se usó como control de carga. (C) La presencia de LC3-I y LC3-II se investigó en lisados de los animales tratados con DSS por 1-4 días. La actina se usó como control de carga. (D) La localización de LC3-II (Verde)

y (E) p62 (verde) se analizó por inmunofluorescencia en cortes de la mucosa de los ratones control y expuestos al DSS. Los ratones recibieron agua potable o agua con DSS al 3% durante 4 días. Las células epiteliales positivas se marcaron con flechas blancas. Las células de la lámina propia positivas se marcaron con una estrella roja. El eje de la cripta se dibujó con una línea blanca discontinua. Los núcleos se marcaron en azul. Barra. (F) El nivel de LC3-I y LC3-II se analizó en las células SW480 tratadas con las citocinas. La actina se usó como control de carga. (G) La naranja de acridina (verde) se usó para analizar la presencia de autofagosomas. Núcleos en azul.

Entonces, se analizó si la degradación de 14-3-3 η y el aumento de PDK-1, se presenta en la mucosa de ratones con colitis cuyo proceso de autofagia se inhibió con CQ. Como se muestra en la **figura 15**, 14-3-3 η , disminuyó en la mucosa de los ratones tratados con DSS, al mismo tiempo que aumentó la pPDK-1. Se observó también que el tratamiento con CQ previene este efecto. No se observaron cambios en PDK-1 total (**Figura 15B**). En conjunto, estos resultados sugieren que la autofagia inducida por las citocinas pro-inflamatorias, conduce a la activación de PDK-1 en la mucosa de los animales con colitis.

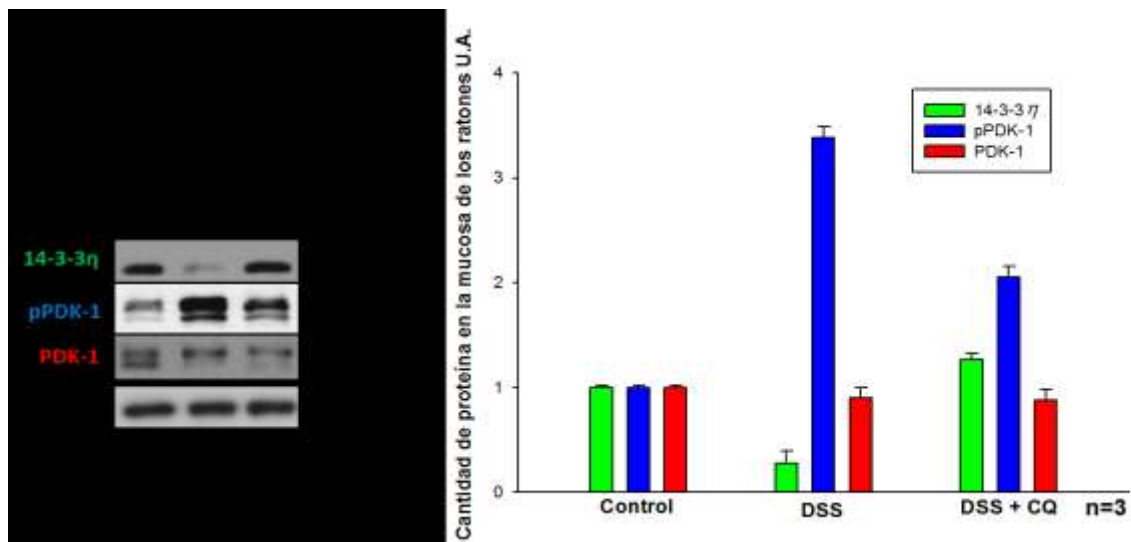


Figura 15. Durante la colitis se induce la degradación de 14-3-3 η y aumenta el nivel de pPDK-1 activa. (A) La cantidad de 14-3-3 η , pPDK-1 y PDK-1 total se analizó en lisados de colon de ratón, tratados con DSS al 3% por 4 días. Los ratones se inyectaron diariamente con el vehículo (DMSO) o con cloroquina (CQ; 40mg/kg). (B) Análisis densitométrico de los ensayos de Wb, n=3. La actina se usó como control de carga.

En seguida se estudió cómo se induce la disminución de 14-3-3 η por autofagia durante los periodos inflamatorios en las CEI. Se sabe que la proteína 14-3-3 ζ se asocia a la proteína raptor inhibiendo la función del complejo mTORC1 y disparando la autofagia (Gwinn y col., 2008; Pozuelo-Rubio y col., 2012). Por esta razón, usando inmunoprecipitación, investigamos si las citocinas pro-inflamatorias inducen la asociación de 14-3-3 ζ con raptor en las células SW480. La **figura 16A**, muestra que raptor co-precipita con 14-3-3 ζ en las CEI en condiciones basales, pero la cantidad de raptor co-precipitado aumenta con el tratamiento con IFN- γ /TNF- α , pero no así con el IFN- γ solo (**Figura 16A**). Además, las citocinas también aumentan la fosforilación de las proteínas 14-3-3 ζ en la serina 58, en las células expuestas a las citocinas (**Figura 16B**), proceso relacionado con la formación de monómeros de estas proteínas. Estos resultados sugieren que 14-3-3 ζ monomérica (p14-3-3 ζ S58) y dimérica (14-3-3 ζ) coexisten durante la inflamación (**Figura 16B**).

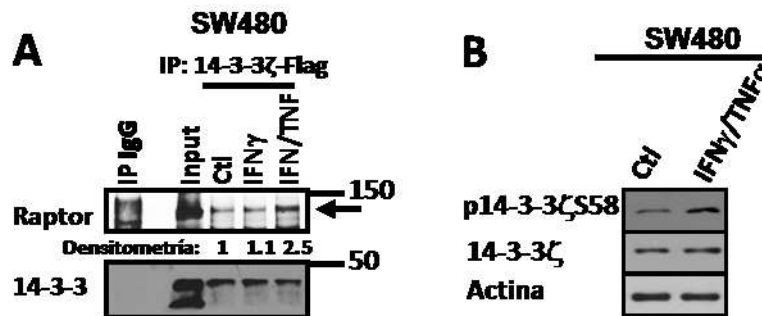


Figura 16. Las citocinas pro-inflamatorias promueven la asociación entre raptor y 14-3-3 ζ y aumentan la fosforilación de 14-3-3 ζ en la serina 58. (A) La asociación de raptor con 14-3-3 ζ -Flag se analizó por ensayos de co-inmunoprecipitación. La 14-3-3 ζ -Flag sobre-expresada en las células SW480 se inmunoprecipitó de lisados obtenidos de células control y tratadas con IFN- γ o la mezcla de IFN- γ /TNF- α por 6 horas. La IgG dirigida contra GFP fue usada como control (IgG). Los inmunoprecipitados se revelaron contra raptor y 14-3-3 ζ . Los valores del análisis densitométrico para raptor se muestran en la figura. (B) El efecto de las citocinas pro-inflamatorias en la fosforilación de 14-3-3 ζ en la serina 58 se analizó en muestras de la mucosa de los ratones que fueron inyectados vía intraperitoneal con la mezcla de citocinas IFN- γ y TNF- α o con albumina sérica de ratón (MSA) (Ctl).

Para investigar si la forma monomérica de 14-3-3 ζ induce la autofagia en las CEI, se sobre-expresó 14-3-3 ζ nativa, monomérica (14-3-3 ζ S58D), o dimérica (14-3-3 ζ S58A) (**Woodcock y col., 2003**), y se analizó el efecto en la acumulación de LC3-II en los autofagosomas (**Kabeya y col., 2004**). La **figura 17A**, muestra que la presencia de 14-3-3 ζ S58D pero no de 14-3-3 ζ nativa ni de 14-3-3 ζ S58A promueve la acumulación de LC3-II en los autofagosomas. Notablemente, la mezcla de IFN- γ /TNF- α por 12 horas induce la acumulación de LC3-II cuando las CEI expresan a la 14-3-3 ζ nativa (**Figura 17A**). Esto demuestra que el monómero de 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ S58D) induce la conversión de LC3-I a LC3-II y por ende autofagia en las CEI. En seguida se evaluó el efecto de sobre-expresar a las mutantes 14-3-3 ζ S58D y 14-3-3 ζ S58A, sobre el nivel de la proteína 14-3-3 η y en la activación de PDK1. Como se muestra en la **figura 17B**, las concentraciones crecientes de 14-3-3 ζ S58D resultan en la disminución del nivel de 14-3-3 η y en el aumento del nivel de PDK1 activa. No se observaron cambios en PDK1 ni en el nivel de 14-3-3 ζ total (**Figura 17B**). En contraste, 14-3-3 ζ S58A no modifica el contenido celular de 14-3-3 η , PDK1 o 14-3-3 ζ , en las células SW480, pero si bloquea la fosforilación de PDK1 al aumentar su concentración (**Figura 17C**).

Puesto que 14-3-3 ζ y 14-3-3 ζ S58D inducen la autofagia, cabe preguntarse si también activan Akt en las CEI estimuladas con el IFN- γ o con la mezcla de IFN- γ /TNF- α . La **figura 17D** muestra que 14-3-3 ζ nativa y 14-3-3 ζ S58D incrementan la fosforilación de Akt en los residuos Thr308 y Ser473 (**Figuras 17D y E**), mientras que la expresión de 14-3-3 ζ S58A la disminuye. En estas condiciones no cambian Akt1 total ni 14-3-3 ζ endógena (**Figura 17D**). Aún más, 14-3-3 ζ nativa y 14-3-3 ζ S58D activan a Akt río abajo de las citocinas, ya que la fosforilación de la β -catenina en el residuo Ser552 aumenta en las células transfectadas con 14-3-3 ζ nativa y con la mutante 14-3-3 ζ S58D, en comparación a las células control que expresan el vector vacío (**Figura 17E**). En contraste, 14-3-3 ζ S58A reduce la fosforilación de la β -catenina en el residuo Ser552 (β -catenina S552) (**Figura 17E**). No se observaron cambios en la cantidad de la β -catenina total.

El complejo mTORC1 es el inhibidor principal de la autofagia. Para corroborar que la inhibición de este complejo es responsable del incremento en la fosforilación de Akt

en el residuo Thr308 durante la inflamación, se analizó esta fosforilación en lisados de las células SW480 tratadas con BSA, IFN- γ , IFN- γ más rapamicina o con IFN- γ más el inhibidor AktVIII. Como se muestra en la **figura 17F**, el IFN- γ induce el aumento de pAkt308, que es fortalecido con el tratamiento de rapamicina. Pero la inhibición de Akt con Aktinh VIII, previene el incremento pAkt308 inducido por el IFN- γ . La inhibición de la fosforilación de Akt (pAkt308) por el inhibidor AktVIII y de pS6 por rapamicina, demostraron la eficiencia y especificidad de los tratamientos (**Figura 17F**). En conjunto, estos resultados demuestran que el monómero de 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ S58D) inhibe al complejo mTORC1 induciendo la degradación de 14-3-3 η por autofagia, promoviendo de esta forma la activación de Akt.



Figura 17. La forma monomérica de 14-3-3 ζ induce la degradación de 14-3-3 η y estimula la fosforilación de Akt durante la inflamación intestinal. (A) La formación de autofagosomas se

analizó en las células SW480 transfectadas con 14-3-3ζ nativa, 14-3-3ζ S58D, 14-3-3ζ S58A y 14-3-3ζ nativa más el IFN-γ. Las proteínas 14-3-3 se detectaron a través de la marca de Flag (rojo), que se encuentra localizada en su carboxilo terminal. LC3 se marcó en color verde. Los núcleos se pueden observar en azul. Barra=10 μm. (B) Las proteínas 14-3-3η, pPDK1, PDK1, 14-3-3ζ y la marca Flag se detectaron en los lisados de las células SW480 que expresan concentraciones crecientes de 14-3-3 S58D. El rojo de Poceau fue usado como control de carga. (C) El efecto que ejercen concentraciones crecientes de 14-3-3ζS58A en la fosforilación y presencia de PDK1 y 14-3-3η se analizó en las células SW480. El rojo de Ponceau se usó como control de carga. (D) Las proteínas pAkt308, Akt1 y 14-3-3ζ, se detectaron en los lisados de células SW480 transfectadas con 200ng de 14-3-3ζ WT, 14-3-3ζ S58D o 14-3-3ζ S58A. Las células se trataron con IFN-γ por 18 horas. La actina se usó como control de carga. La flecha indica en donde se encuentra la 14-3-3ζ exógena y la estrella equivale a 14-3-3ζ endógena. (E) Las proteínas β-catenina, pβ-catenina S552, pAkt T308 y S473, 14-3-3ζ se detectaron en los lisados de las células SW480 que expresaban 14-3-3ζ, 14-3-3ζS58D o 14-3-3ζS58A. Después de 12 horas post-transfección, las células se trataron con la mezcla de IFN-γ/TNF-α por espacio de 24 horas. La actina se usó como control de carga. (F) El estudio del efecto de la rapamicina (200nM) y del inhibidor de Akt (Akt VIII, 2.12μM) en la fosforilación y presencia de las proteínas pAkt308 y pS6, se analizó en las células SW480 tratadas con IFN-γ por 12 horas. La actina se usó como control de carga.

Ya que la inhibición del complejo mTORC1 es crucial para el disparo de la autofagia, analizamos si juega algún papel en la disminución de 14-3-3η. Para ello transfectamos a las CEI con una mutante de raptor que no puede unirse a las proteínas 14-3-3 y que fue reportada anteriormente (**Gwinn** y col., **2008**). Las células SW480 control o que expresan la mutante de raptor que no se une a 14-3-3ζ, se trataron con la citocinas IFN-γ/TNF-α. Como se muestra en la **figura 18A**, las citocinas inducen la acumulación de ATG5, ATG5 es una ligasa de ubiquitina E3, necesaria para activar el proceso de autofagia al ser requerida para la elongación de los autofagosomas, es activada por ATG7 y forma un complejo con ATG12 y ATG16L1. Este complejo es necesario para la conjugación de PE en LC3-I para generar LC3-II (**Codogno** y Meijer, **2006**). Además de la acumulación de ATG5, se reduce la cantidad de 14-3-3η y aumenta pAkt308 de manera similar a cuando se expresan a la mutante 14-3-3ζS58D. Las citocinas no modifican la cantidad de la proteína raptor pero 14-3-3ζS58D induce un pequeño aumento (**Figura 18A**). Sin embargo, los cambios en ATG5, 14-3-3η y pAkt308 inducidos por las citocinas y por

la mutante 14-3-3 ζ S58D, se previenen cuando las CEI expresan a la mutante de raptor incapaz de asociarse con 14-3-3 ζ (**Figura 18A**).

Un aumento de la proteína raptor se detectó en las células que expresan a la mutante de raptor, corroborando la presencia de raptor endógena (**Figura 18A**). No se observaron cambios en la cantidad de Akt1 total en cualquiera de las condiciones (**Figura 18A**). En conjunto, estos resultados sugieren que las citocinas inducen la asociación de 14-3-3 ζ fosforilada (p14-3-3 ζ S58) con raptor y la consecuente inhibición de la actividad del complejo mTORC1, lo que es necesario para que Akt se fosforee en la treonina 308 en las CEI.

Lo siguiente que se analizó fue la cantidad de 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58 en la mucosa de los ratones expuestos al DSS en función del tiempo. Los análisis densitométricos revelaron que 14-3-3 ζ , se incrementa transitoriamente al primer y segundo día posterior a la administración del DSS y después del tercer día regresa al nivel basal (**Figuras 18B y 18C**). En contraste, p14-3-3 ζ S58 oscila desde el 1er día hasta el 3er día, pero existe un claro incremento al 4º día (**Figuras 18B y 18C**). No se observaron cambios en 14-3-3 σ (**Figura 18D**). Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo pan-14-3-3 sugieren que probablemente la cantidad de otros miembros de la familia de las proteínas 14-3-3 disminuye durante la inflamación (**Figura 18B**). 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58 se localizan a lo largo del eje de la cripta en los ratones control como se había reportado previamente (**Nava y col., 2014**). Sin embargo, después del tratamiento con el DSS, 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58 se enriquecieron en las CEI localizadas en la base de la cripta (**Figura 18C**, flechas blancas). Estos resultados sugieren que 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58, regulan diferencialmente la fosforilación de Akt en las CEI durante los periodos de inflamación.

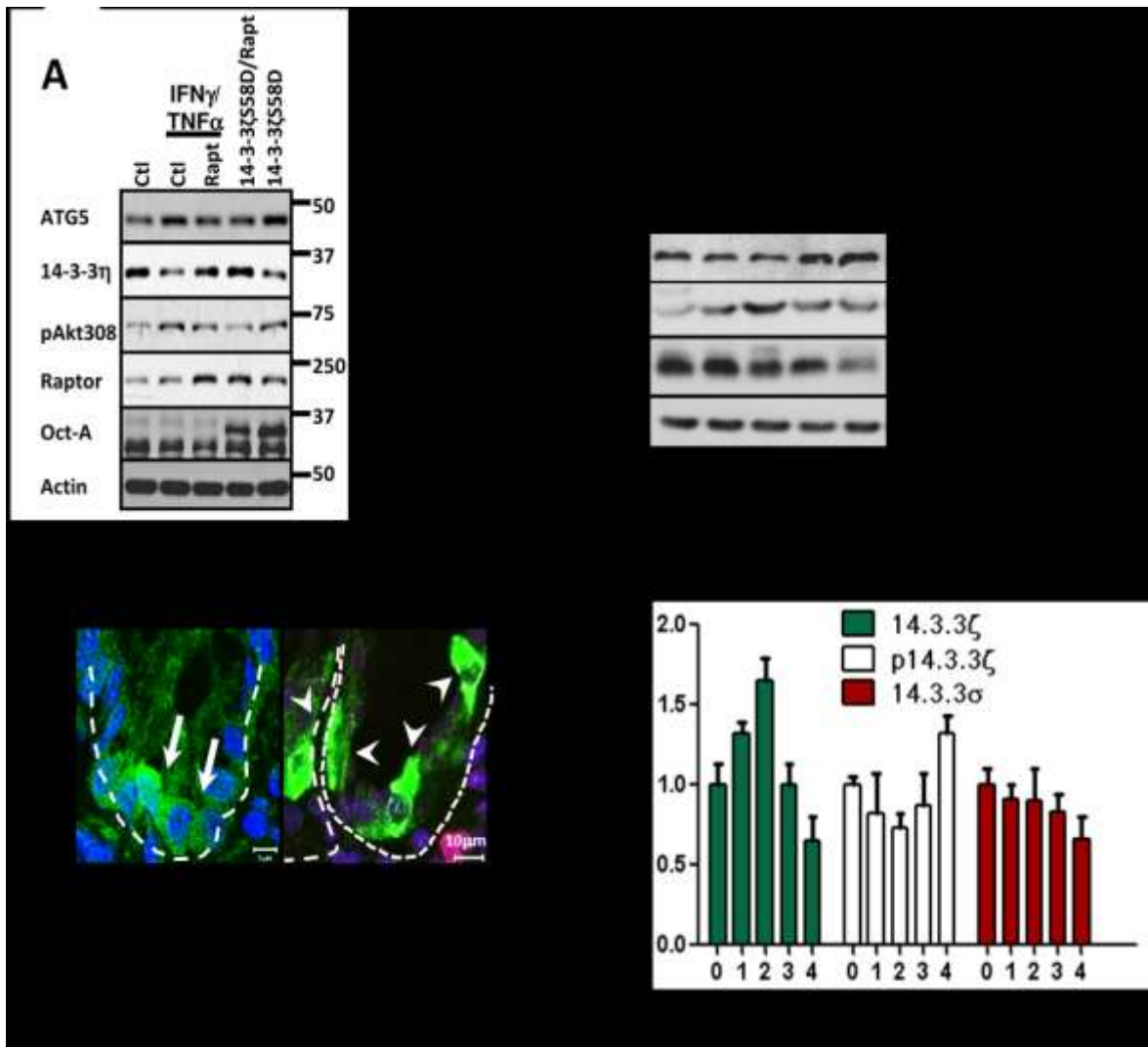


Figura 18. 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58 aumentan en la mucosa de ratones con colitis y regulan la activación de Akt al controlar autofagia. (A) Las proteínas ATG5, 14-3-3 η , pAkt, raptor y la marca Flag se detectaron en lisados celulares de las células SW480 las cuales expresaban 14-3-3 ζ o p14-3-3 ζ más raptor S792A. Después de 12 horas post-transfección, las células fueron tratadas con la mezcla de IFN- γ y TNF- α durante 24 horas. La actina se usó como control de carga. (B) Las proteínas 14-3-3 ζ , p14-3-3 ζ y pan 14-3-3 se analizaron los lisados de la mucosa de colon de los ratones de la cepa C57BL/6J tratados con DSS al 3% por 3 días. La actina se usó como control de carga. (C) La distribución de 14-3-3 ζ y de p14-3-3 ζ S58 se analizó por inmunofluorescencia en la mucosa de los ratones con colitis. Las proteínas 14-3-3 ζ y p14-3-3 ζ S58, se tiñeron en verde. Las células altamente enriquecidas se marcaron con una flecha (14-3-3 ζ) y con una cabeza de flecha (p14-3-3 ζ S58). La línea discontinua demarca la forma de la cripta. Los núcleos se marcaron en azul. (D). Las proteínas 14-3-3 ζ , p14-3-3 ζ S58 y 14-3-3 σ se analizaron en la mucosa de los ratones tratados con DSS al 3% de 1 a 4 días. El análisis densitométrico se muestra en la figura. n=6.

VI.4. La inhibición química de las proteínas 14-3-3 incrementa la muerte celular durante la inflamación.

El incremento en la apoptosis (**Figura 19**) y la reducción de la proliferación celular en los epitelios intestinales es una característica de la colitis en los ratones (**Figuras 11A y 18A**), ambos procesos son mediados por las citocinas pro-inflamatorias (**Figura 19D**).

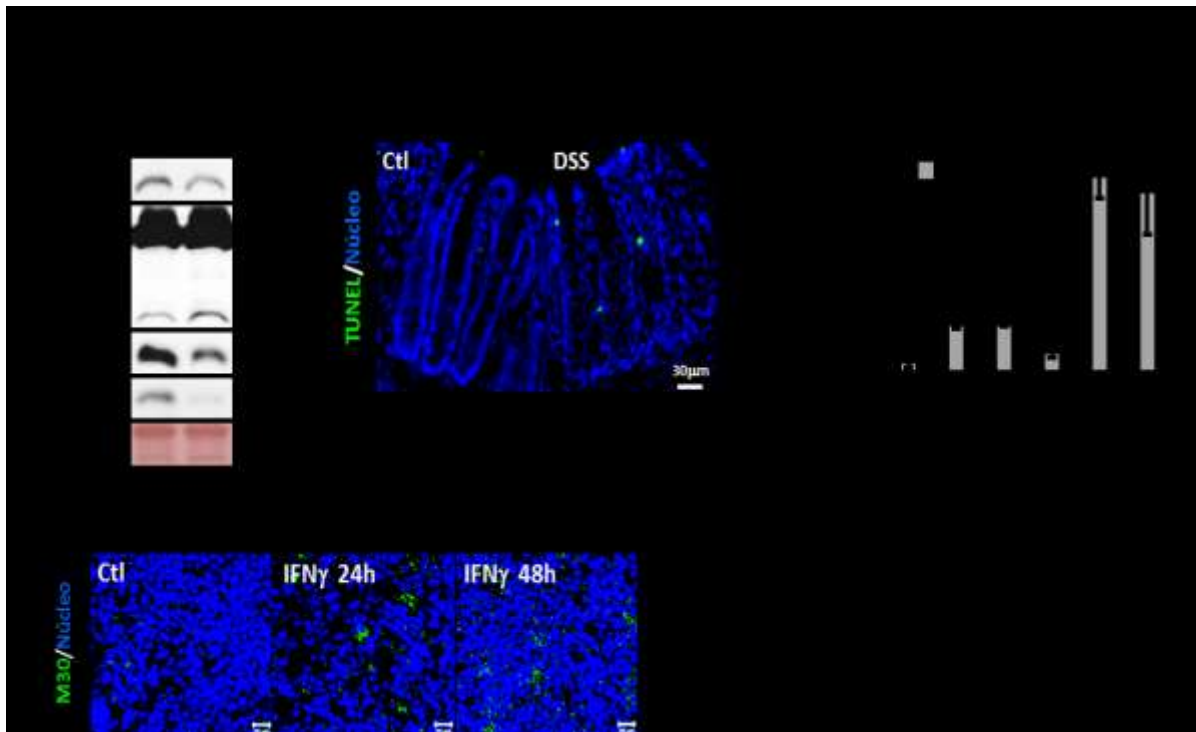


Figura 19. La inflamación intestinal incrementa la apoptosis en las CEI. (A) La presencia de capasa-3, PCNA y pHis3 se analizó en la mucosa de los ratones control y tratados con el DSS. Los ratones de la cepa C57BL/6J se trataron con DSS al 3% disuelto en agua por espacio de 4 días. En la figura se muestra una exposición corta y una prolongada del ensayo de inmunodetección de la capasa-3. El rojo de Ponceau se usó como control de carga. (B) Ensayo de apoptosis en la mucosa de colon de ratones control y tratados con DSS por tinción de Tunel (Verde). Los ratones de la cepa C57BL/6J se trataron con DSS al 3% disuelto en agua por espacio de 1 a 4 días. Los núcleos se marcaron en azul. Barra= 30 μm. (C) La gráfica muestra los valores relativos del análisis densitométrico para el corte de PARP y caspasa 3 que se observa en la mucosa de ratones tratados con DSS. Los ratones de la cepa C57BL/6J recibieron DSS al 3% en agua por espacio de 1 a 5 días. (D) Ensayo de apoptosis realizado en las células SW480 tratadas con 100U/ml de IFN-γ, la tinción por M30 marca a las células apoptóticas (Verde). Los núcleos se marcaron en azul.

Nuestros resultados muestran que las proteínas 14-3-3 controlan la actividad de Akt durante la inflamación. Por ello, investigamos cual es el efecto de la inhibición de 14-3-3 con el inhibidor genérico BV02 durante la colitis inducida con el DSS. No observamos diferencias en el curso de la enfermedad en los animales tratados con el DSS o con el DSS más el inhibidor BV02. Sin embargo, el colon de los ratones tratados con DSS es mucho más corto que el colon de los animales control, y los ratones tratados con el DSS más BV02 disminuyó aún más (**Figura 20A**). Debido a que Akt provee señales anti-apoptóticas en una amplia variedad de tejidos (**Brazil y col., 2004**), se investigó por inmunodetección la fosforilación de Akt1, en la mucosa de estos animales. Como se observa en la **figura 20B**, pAkt308 y pAkt473 aumentan en la mucosa de animales con colitis, efecto que se exagera cuando se inhibe a las proteínas 14-3-3, sin que se modifique Akt1 (**Figura 20B**).

Si las citocinas pro-inflamatorias inducen la fosforilación y activación de Akt en los ratones con colitis, cabe esperar que las células SW480 se presenten cambios similares. Como se muestra en la **figura 20C**, el IFN- γ incrementó la cantidad de pAkt473 y pAkt308 a las 48 h post-tratamiento, sin que se afecte la cantidad total de Akt1 con el inhibidor de las 14-3-3. Sin embargo, es evidente que en las células tratadas con la citocina más el inhibidor BV02, el aumento de pAkt308 es aún mayor sin que existan cambios en pAkt473, ni en el nivel de Akt1 total (**Figura 20C**). Es importante mencionar que en las células tratadas solo con el inhibidor BV02, se observó un aumento considerable en la fosforilación de Akt en la treonina 308 (**Figura 20C**). Resultados similares fueron obtenidos en otro modelo de células de colon, las células RKO (**Datos no mostrados**). En conjunto estos resultados sugieren que las proteínas 14-3-3 son importantes en la modulación de actividad de Akt en las CEI durante la inflamación.

Dado que la inhibición de las proteínas 14-3-3 induce la hiperactivación de Akt, decidimos investigar cual es el papel de las 14-3-3 en la inflamación evaluando el efecto del BV02 en la proliferación y la apoptosis de los ratones con colitis. Como se muestra en la **figura 20D**, la inflamación lleva a una disminución en la proliferación celular, detectada a través de la histona-3 fosforilada y la proteína PCNA, además

lleva al aumento de la apoptosis, según se detecta por el corte de la proteína PARP y de la caspasa-3. Sorprendentemente, ambos efectos se incrementan en la mucosa de los animales tratados con el DSS y el inhibidor BV02, lo que sugiere que la hiperactivación de Akt mediada por la inhibición de las 14-3-3 contribuye a la inhibición de la proliferación y al aumento de la muerte de las células epiteliales intestinales (**Figura 20E**).

El papel que tiene la inhibición de las 14-3-3 en la inducción de la apoptosis, también se analizó en las células SW480 tratadas con las citocinas proinflamatorias por 36 horas. Como era de esperarse el tratamiento con el IFN- γ incrementa la apoptosis, como lo muestra el aumento del corte de PARP y por la Caspasa-3 activa (**Figura 20E**), además, también disminuye la proliferación celular, como lo muestra la reducción en la cantidad de la histona-3 fosforilada (**Figura 20E**). Cabe hacer notar, que el BV02 por si solo aumenta la apoptosis y disminuye la proliferación celular (**Figura 20E**). Sin embargo la mezcla del IFN γ más BV02 induce un aumento más pronunciado del corte de PARP y en la presencia de la Caspasa-3 activa. Además se observa que la mezcla también tiene un efecto aditivo en la reducción en el nivel de histona-3 fosforilada (**Figura 20E**). Resultados similares se obtuvieron en las células RKO (**Datos no mostrados**). En conjunto estos resultados sugieren que la hiperactivación de Akt como consecuencia de la inhibición química de las proteínas 14-3-3 inhibe la proliferación celular y promueve la muerte celular.

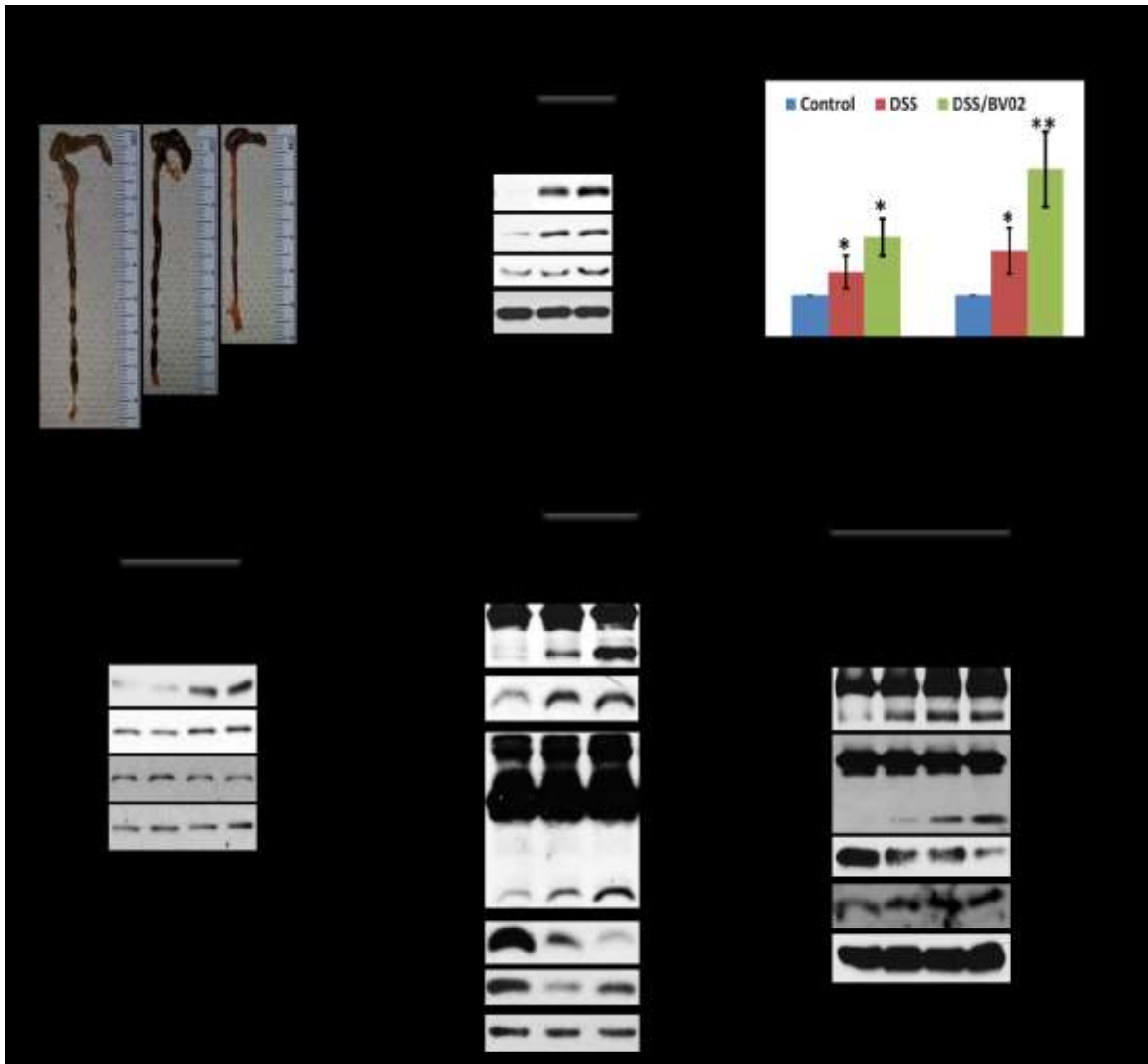


Figura 20. La inhibición de las proteínas 14-3-3 incrementa la activación de Akt y dispara la apoptosis durante la inflamación. (A) Imágenes representativas del colon de los animales control y expuestos al DSS o DSS/BV02. (B) pAkt308, pAkt473 y Akt1 se analizaron en la mucosa de los animales tratados con el DSS y DSS/BV02 durante 4 días. 10 mg/kg de BV02 se administraron diariamente vía el peritoneo. La actina se usó como control de carga. La gráfica representa el análisis densitométrico de los datos obtenidos para pAkt308 y pAkt473 que se normalizaron con respecto a actina. n=7 (C) pAkt308, pAkt473 y Akt1 se analizó en los lisados celulares de las células SW480 tratadas con el IFN- γ , BV02 (5 μ M) o IFN- γ /BV02. El tiempo de tratamiento fue de 36 h. La actina se usó como control de carga. n=3. El corte de PARP y la presencia de caspasa-3 activa junto con la identificación de los marcadores de proliferación PCNA y pHist3 se analizaron a través de inmunodetección en la mucosa de los animales tratados durante 4 días con DSS y DSS/BV02 (D) y en células expuestas a IFN- γ , BV02 o IFN- γ /BV02 (E).

VI.5. La activación de Akt induce apoptosis en CEI durante inflamación.

Después se investigó el papel de Akt en el aumento de la muerte celular en la mucosa de los animales con colitis inducida por el DSS (**Figura 21**). Para ello se formaron 3 grupos de ratones: el primer grupo se mantuvo con agua normal y se le administró con DMSO (Vehículo), el segundo recibió 3% de DSS y con 10mg/Kg de peso de Aktin VIII un inhibidor de la proteína Akt, y el tercer grupo recibió 3% de DSS junto con el vehículo. Como lo muestra la **figura 21A**, los resultados mostraron que los ratones tratados con el DSS y Aktin VIII se mantuvieron con menos daño que los ratones tratados con el DSS y DMSO durante el tiempo que duró el experimento, de acuerdo al índice DAI. Además, el colon de los ratones que recibieron DSS/Aktin VIII se encontraba menos dañado y era más largo que el de los ratones con DSS/DMSO (**Figura 21B**). El ensayo de inmunodetección realizado contra pAkt308 demuestra que el Aktin VIII inhibe a Akt (**Figura 21B**).

Las citocinas pro-inflamatorias inducen la acumulación de Akt activa en el núcleo (**Nava y col., 2014**), donde promueven la progresión del ciclo celular o la apoptosis (**Maddika y col., 2008**). Por lo tanto, se esperaría que durante la inflamación, Akt nuclear induce la apoptosis en las CEI. Para probar esta hipótesis, lo primero que se investigó fue si pAkt308 y pAkt473 aumentan en el núcleo de las células de la mucosa de los ratones con colitis. La inflamación, producida por el DSS, induce la acumulación de Akt activa en el núcleo de las CEI (**Figuras 21C, D y E**). Esto se acompaña de la reducción en la proliferación celular, como lo muestra la incorporación de EdU (**Figura 21C**) y la expresión de PCNA (**Figura 21F**), además del aumento en el corte de caspasa-3 (**Figura 21G**). Sin embargo, la inhibición de Akt con el inhibidor Aktin VIII, en los ratones tratados con DSS, incrementa la presencia de PCNA (**Figura 21F**) y disminuye el corte de la caspasa-3 (**Figura 21G**).

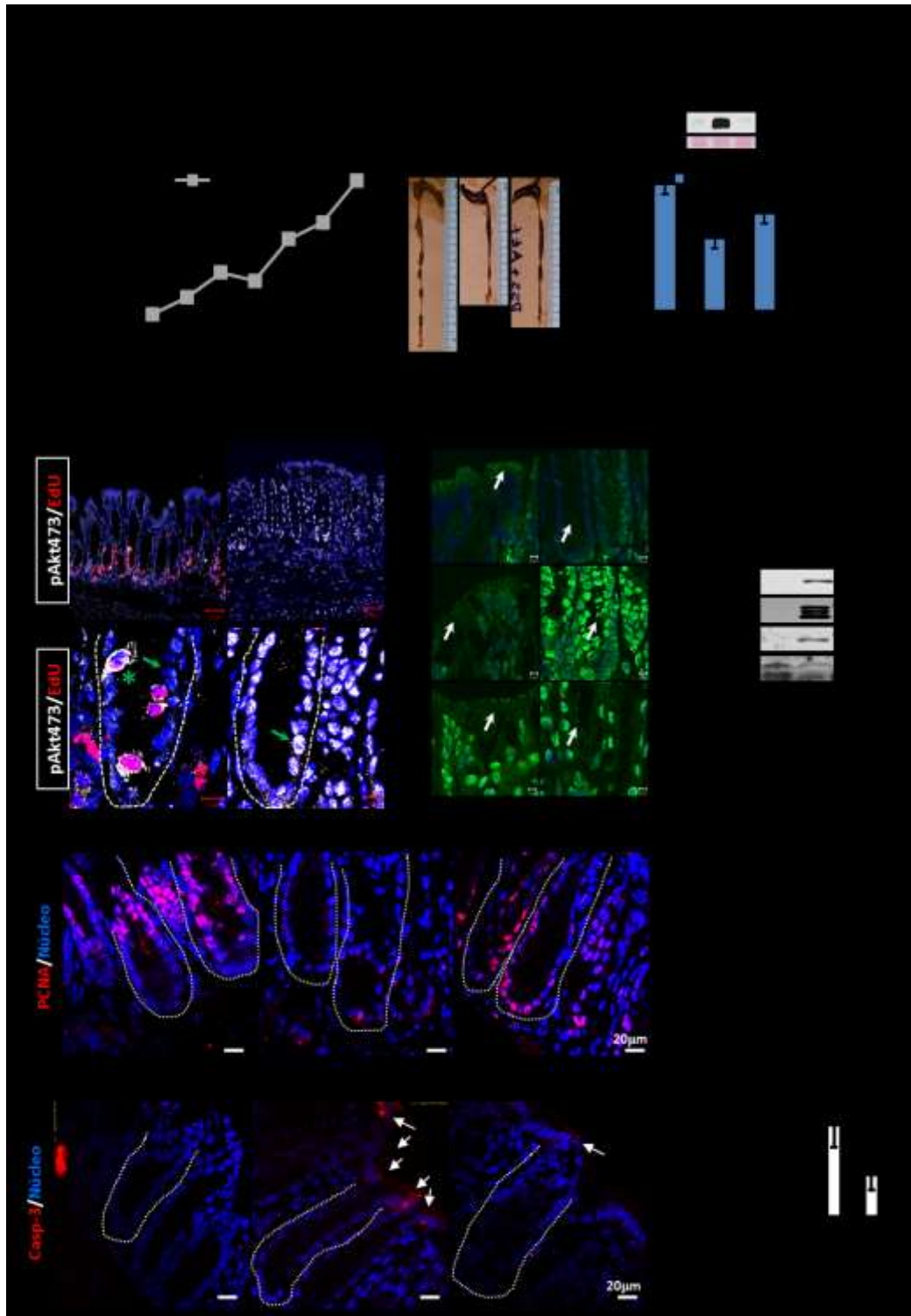


Figura 21. La inhibición de Akt en el modelo de colitis inducida reduce la muerte de las CEI. En (A), el grado de enfermedad de los animales se calculó usando los datos clínicos de los animales tratados con DSS más DMSO (●) y con DSS más el inhibidor de Akt denominado Akt VIII (◆). * $P < 0.05$.

(B) Imágenes representativas del colon de los ratones que fueron expuestos a agua normal en presencia de DSS/DMSO o DSS/Aktin VIII. La cuantificación se muestra en el gráfico. El inhibidor Aktin VIII, se administró todos los días por la vía intraperitoneal a una concentración de 10 mg/kg. El nivel de pAkt308 se analizó en los lisados obtenidos de la mucosa de los ratones control y tratados con el DSS/DMSO o DSS/Aktin VIII. n=5. (C) Akt fosforilada en la serina 473 (pAkt473, en blanco) se analizó por inmunofluorescencia en los ratones expuestos al DSS por 4 días. pAkt473 se observó en el citosol de las células en proliferación (asterisco verde) y en el núcleo de las células que no proliferan (flecha verde). La incorporación de EdU se marcó en rojo. Los núcleos se marcaron en azul. (D) pAkt308 (Verde) se analizó por inmunofluorescencia en las muestras de los ratones expuestos al DSS por 2 y 4 días. pAkt308 se puede observar en la membrana (Flecha blanca) y en el núcleo. Los núcleos aparecen en azul. (E) La presencia de pAkt 473, pAkt308, y Akt1 fue analizada en fracciones nucleares de las CEI obtenidas del ratón expuestas al DSS por 4 días. La cantidad de pAkt473, pAkt308 y Akt1 se enriqueció en las fracciones nucleares de los ratones con colitis. La histona 3 se usó como marcador de la fracción nuclear. (F) La proliferación nuclear se analizó en la mucosa de los ratones control y en los ratones tratados con DSS/DMSO o DSS/Akt VIII, al marcar a la proteína PCNA (Rojo). El contorno de las criptas se marcó con una línea discontinua. Los ratones de la cepa C57BL/6J recibieron el DSS al 3% en agua por 4 días. Los ratones se inyectaron diariamente vía intraperitoneal con 10 mg/Kg de peso del inhibidor de Akt, Akt VIII. Los núcleos se marcaron en azul. La cuantificación se muestra en la gráfica. **p<0.05; **p<0.001. (G) La inmunofluorescencia contra la caspasa activa (rojo) se realizó en crio-cortes obtenidos del tejido derivado de los ratones tratados con agua, DSS/DMSO y DSS/Aktin VIII. Las células positivas para caspasa 3 se marcaron con flechas blancas. El eje de la cripta se marcó con una línea punteada. Barra=20µm. La cuantificación de las células positivas para casapa-3 se muestra en la gráfica. * P<0.05. n=3

Para evaluar la contribución de Akt en la inducción de la apoptosis por las citocinas, las células SW480 fueron tratadas con el IFN- γ y con el IFN- γ más el inhibidor Akt VIII por 24 horas. Según se observa en la **figura 22A**, el tratamiento con el IFN- γ aumenta el corte de caspasa-3 y PARP. En cambio en las células tratadas con el IFN- γ más el inhibidor de Akt se revierte parcialmente este proceso, demostrando que la activación de Akt induce la apoptosis en las CEI durante la inflamación (**Figura 22A**). De acuerdo con el papel de Akt-1 como promotor de la sobrevivencia celular, se pudo observar que la sola inhibición de Akt-1 en las CEI resulta en el aumento del corte de caspasa-3 y de PARP (**Figura 22A**). La disminución en la fosforilación de

Akt en los residuos de treonina 308 y serina 473, en las monocapas tratadas con el inhibidor, demuestra la eficiencia del tratamiento (**Figura 22A**). Dado que estos resultados sugieren que Akt puede tener un papel antiapoptótico y proapoptótico se decidió investigar si Akt nuclear es efectivamente la responsable de inducir la muerte de las CEI durante la inflamación. Para ello se analizó la inducción de la apoptosis en las células SW480 que expresan cantidades crecientes de una Akt1 de humano que está marcada con una bandera de HA, este método ya se usó para inducir la localización nuclear de Akt-1 (**Nava y col., 2014**). Para investigar la inducción de apoptosis por el IFN- γ en las células antes mencionadas, se analizó el corte de PARP, en células que fueron tratadas por 18 horas con la citocina o con el acarreador. Como se observa en la **figura 22B**, las células SW480 que se trataron únicamente con BSA, el corte de PARP fue observado únicamente cuando las células SW480 expresaban concentraciones altas de Akt-1. Sin embargo, las células SW480 expuestas al IFN- γ , y a la sobre-expresión de Akt-1, se induce apoptosis aún en bajas concentraciones (**Figura 22B**). Para demostrar que la inducción de la apoptosis celular era consecuencia de la acumulación de Akt-1 en el núcleo y no de la transfección de la misma. Lo siguiente que se hizo fue analizar el aumento de la muerte celular por el IFN γ cuando las células epiteliales expresaban una mutante de Akt-1, denominada Akt-1 myr (Akt miristoilada), que está activa constitutivamente porque permanece anclada a la membrana todo el tiempo. Como puede verse en la **figura 22C**, el IFN- γ aumenta el corte de PARP, pero este efecto es prevenido parcialmente cuando las células SW480 expresan Akt-1 myr, sugiriendo que la translocación al compartimiento nuclear de Akt es importante para inducir la apoptosis durante inflamación (**Figura 22C**). Al observar previamente que el tratamiento con el inhibidor BV02 aumenta la muerte de las CEI durante colitis (**Figura 20D**), lo siguiente que se analizó fue la distribución celular de Akt activa en condiciones control, durante el tratamiento con el DSS y con el DSS mas BV02. Como puede observarse en la **figura 22D**, se detectaron altos niveles de Akt-1, pAkt308 y pAkt473 en extractos nucleares obtenidos a partir de la mucosa de ratones con colitis, en comparación a los ratones sanos. El incremento fue aún mayor cuando

a los animales tratados con DSS se les inyectó el inhibidor BV02 (**Figura 22D**). En conjunto estos resultados sugieren que la acumulación de Akt-1 en el núcleo durante la inflamación induce la apoptosis de las CEI.

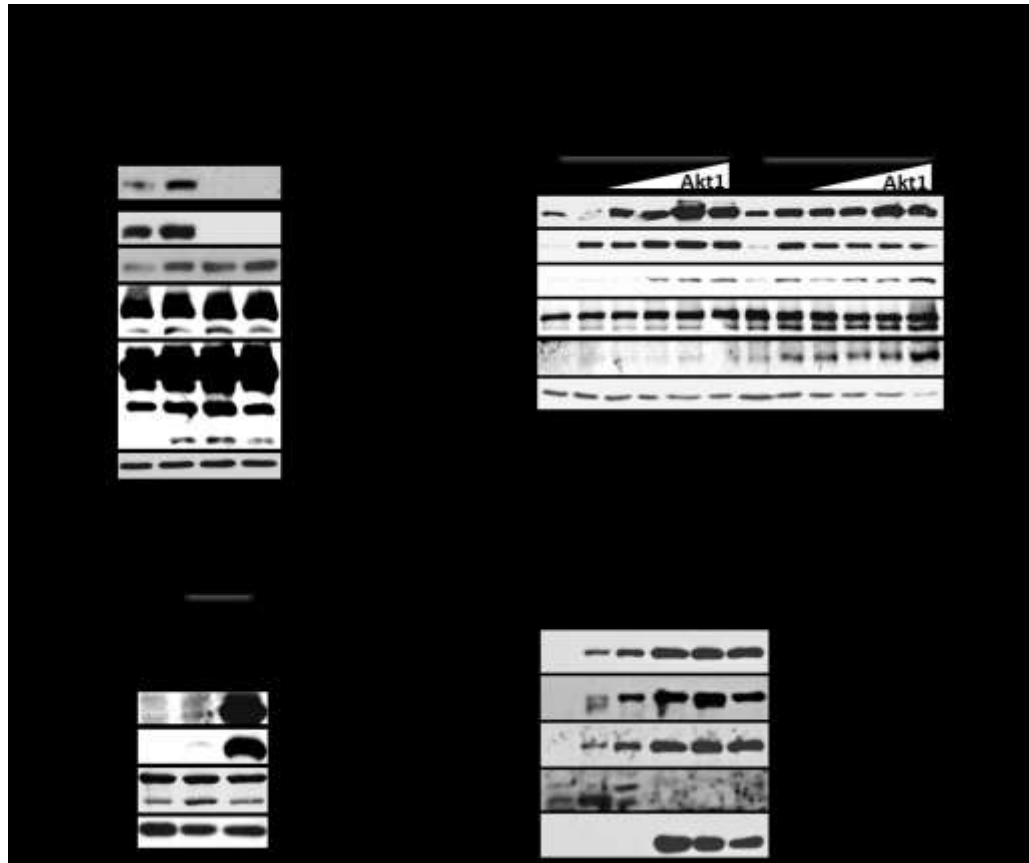


Figura 22. Akt se acumula en el núcleo de las CEI e induce la muerte celular durante la inflamación intestinal. (A) La presencia de pAkt308, pAkt473 y Akt1 junto con PARP cortado y Caspasa-3 activa se investigó en los lisados de las células SW480 tratadas con IFN- γ , con el inhibidor Aktin VIII (2.12 μ M) o con IFN- γ /Aktin VIII. El tratamiento se realizó por 36 h. La actina se usó como control de carga. n=3. (B) La presencia de pAkt308 y Akt-1 junto con PARP cortado y caspasa-3 activa se investigó en los lisados celulares de las células SW480 tratadas con IFN- γ que expresan concentraciones crecientes de Akt-1 de humano marcada con HA. El tratamiento se realizó por un tiempo de 18 h. La actina se usó como control de carga. n=3. (C) Se analizó la presencia de pAkt308, Akt-1 y el corte de PARP en las células SW480 que expresan Akt-1 miristoilado (Akt1-myr), que fueron expuestas al IFN- γ por 36 horas. La actina se usó como control de carga. (D) Se analizó el nivel de pAkt473, pAkt308 y Akt-1, en fracciones nucleares y citosólicas de CEI obtenidas de los ratones control y expuestos al DSS por 4 días. En ambos casos se les inyectó diariamente vía intraperitoneal

el inhibidor BV02 a una concentración de 10mg/kg de peso. La histona-3 fue usada como marcador de la fracción nuclear y GAPDH fue usada como marcador de la fracción citosólica, n=3.

Las diferentes actividades a la cuales se asocia a Akt, como la supervivencia y la modulación de la apoptosis, se pueden explicar por su localización subcelular. Por ejemplo, en una célula normal, Akt se transloca a la membrana plasmática para fosforilarse y activarse. Una vez activada, Akt se disocia de la membrana plasmática y se desplaza tanto al citoplasma como al núcleo (**Calleja y col., 2007**), donde fosforila diversos sustratos, y promueve la supervivencia y la progresión el ciclo celular (**Maddika y col., 2008**). Por esta razón con base en nuestros resultados, nosotros especulamos que la proteína 14-3-3 η podría ser parte de un mecanismo que inhibe la actividad de PDK-1, con el fin de prevenir la activación de Akt, la subsecuente acumulación de esta en el núcleo, previniendo de esta manera la muerte de las CEI. Por lo tanto, lo siguiente que se analizó fue la presencia de PDK-1 fosforilada y la inducción de la apoptosis después del tratamiento con las citocinas pro-inflamatorias en las células SW480 control, o en aquellas que además expresan concentraciones crecientes de 14-3-3 η . Para este fin las CEI transfectadas con el vector vacío o con concentraciones crecientes del cADN que codifica para 14-3-3 η , se trataron con la mezcla de IFN- γ /TNF- α por 24 horas. Posteriormente se analizó por Wb la cantidad de PDK-1, pPDK-1, 14-3-3 ζ , 14-3-3 η , el corte de caspasa-3 y PARP. Como se muestra en la **figura 23A**, el corte de caspasa-3 y PARP se detectó en las CEI control tratadas con las citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, este efecto se previene en las células que expresan a 14-3-3 η . Además, se pudo observar que la fosforilación de PDK-1 aumentó en las células control expuestas a las citocinas. Este efecto fue prevenido también en las células expuestas a las citocinas pro-inflamatorias que expresan a 14-3-3 η . La sobre-expresión de 14-3-3 η no afectó la cantidad de 14-3-3 ζ o de PDK-1 total (**Figura 23A**). Por último, se analizó el papel de PDK-1 sobre la localización sub-celular de Akt. Para este fin, las células SW480 que sobre-expresan un constructo de Akt (Akt-GFP), se les trató con las citocinas pro-inflamatorias o con las citocinas más el inhibidor de PDK-1 (GSK23334470). Como puede observarse en la **figura 23B**, el tratamiento con las citocinas induce la

acumulación de Akt-1 en el núcleo en las CEI. Sin embargo, este efecto se previene cuando a las células se les trata con el inhibidor GSK23334470. Aún más, la inhibición de PDK-1 o la sobre-expresión de 14-3-3 η reducen de manera similar la muerte celular inducida por las citocinas (**Figura 23C**) y previenen el corte de caspasa-3 producido por la exposición a la mezcla IFN γ /TNF α (**Figura 23D**). En conjunto, estos resultados muestran que la degradación de 14-3-3 η por autofagia, permite que PDK-1 activa fosforile a la treonina 308 de Akt, activandola, a su vez Akt activa se acumula en el núcleo donde la induce la muerte de las CEI por apoptosis (**Figura 24**).

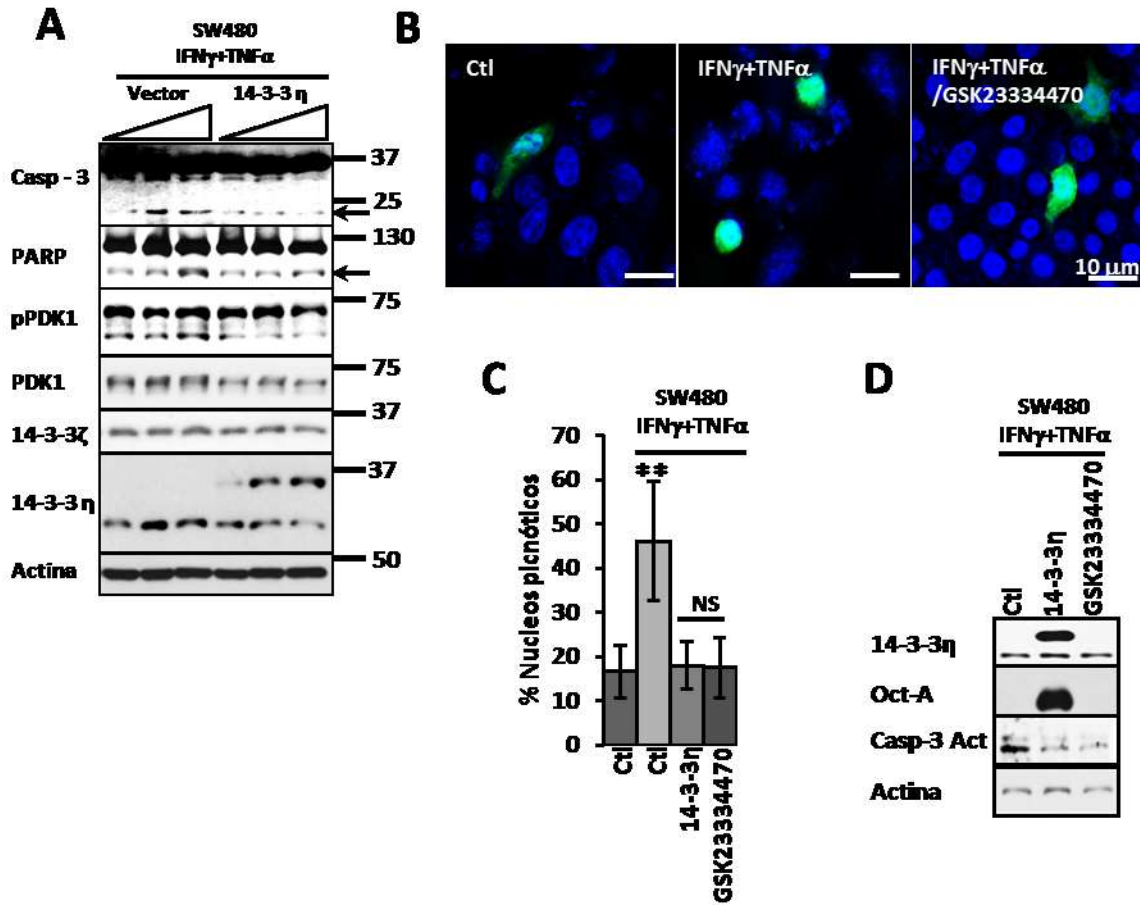
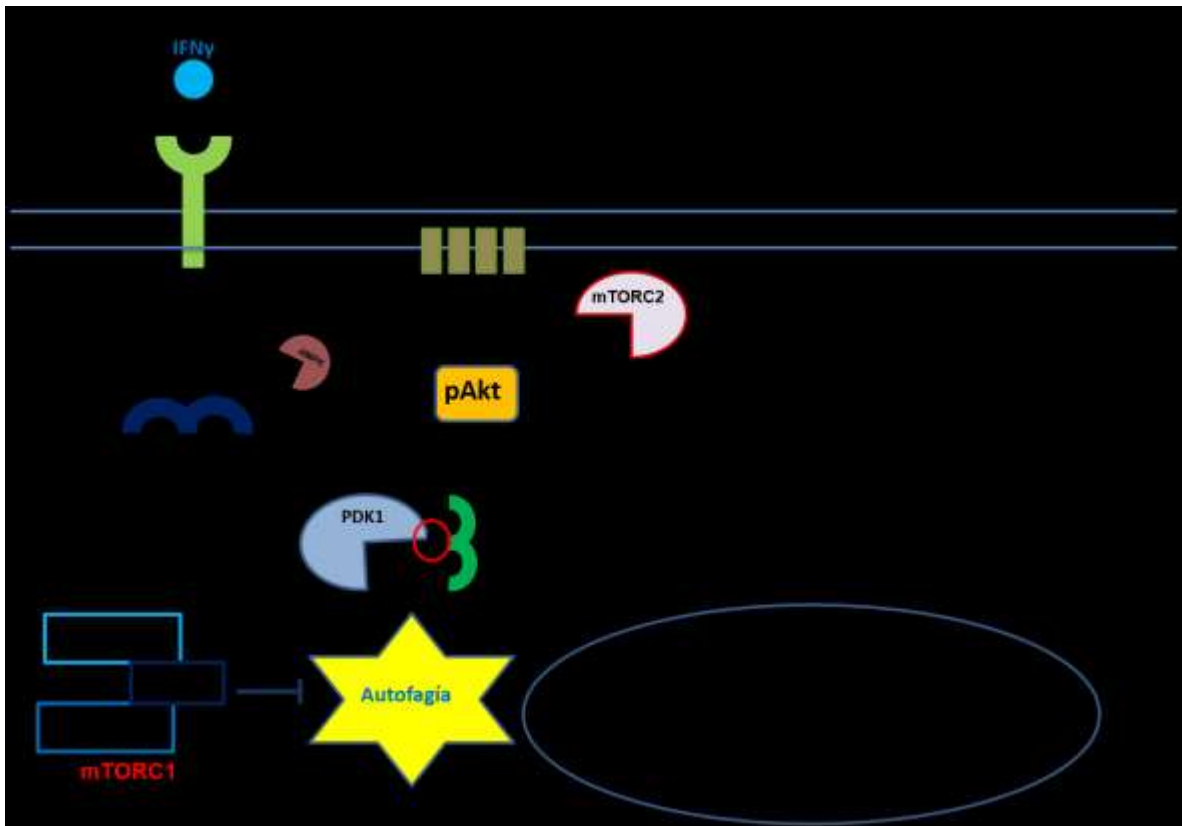


Figura 23. La sobre-expresión de 14-3-3 η reduce la muerte celular durante la inflamación. (A) La cantidad de caspasa-3 activa y PARP cortado se analizó en las células SW480 transfectadas con concentraciones crecientes de 14-3-3 η . Las células se expusieron a una mezcla de IFN- γ y TNF- α por

24h. La actina se usó como control de carga. (B) Las células SW480 transfectadas con Akt1-GFP se expusieron a las citocinas por 24 h, en la presencia o ausencia del inhibidor de PDK-1 (GSK23334470, 50 μ M). El inhibidor se adicionó 30 min antes del tratamiento con las citocinas. Los núcleos se tiñeron en azul con DAPI. Barra= 10 μ m. La muerte celular inducida por el tratamiento con la mezcla IFN- γ /TNF- α se analizó en células SW480 a través de (C) la picnósis nuclear y (D) el corte de caspasa-3. Las células SW480 se transfectaron con 14-3-3 η (2 μ g) o fueron tratadas con el inhibidor de PDK-1 (GSK23334470, 50 μ M; 30 min antes del tratamiento con las citocinas). (D) La cantidad de la proteína 14-3-3 η y la presencia de la bandera Oct-A (Flag) se analizaron por western blot. La actina se usó como control de carga. **P<0.001, n=3.



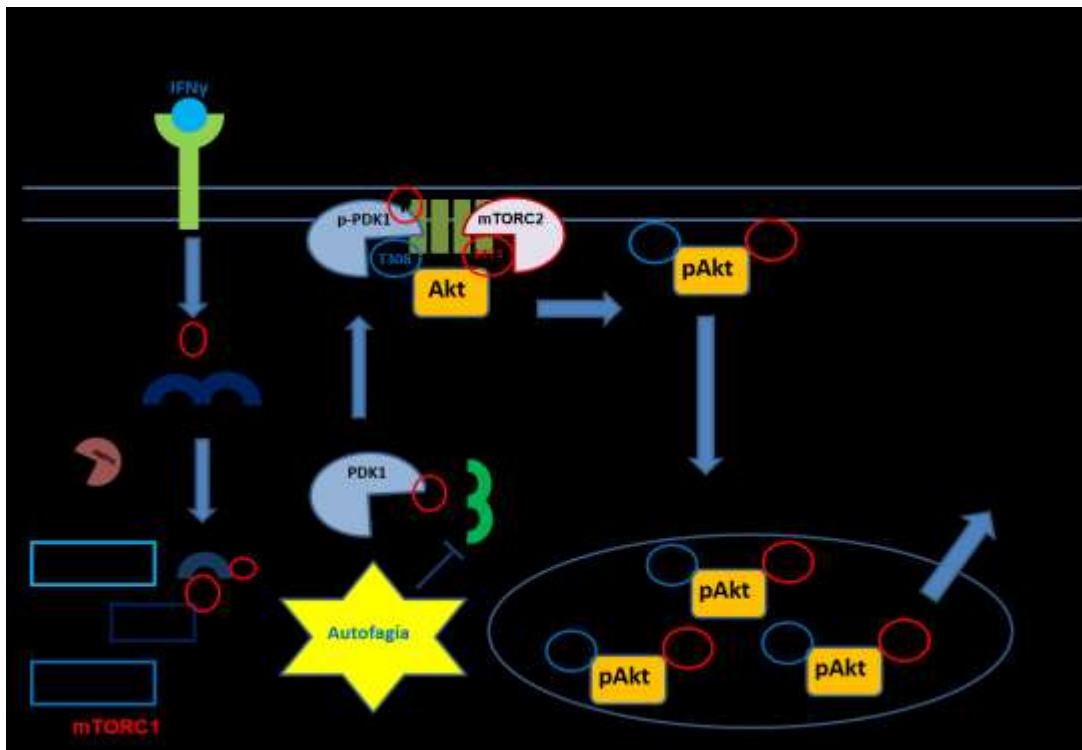
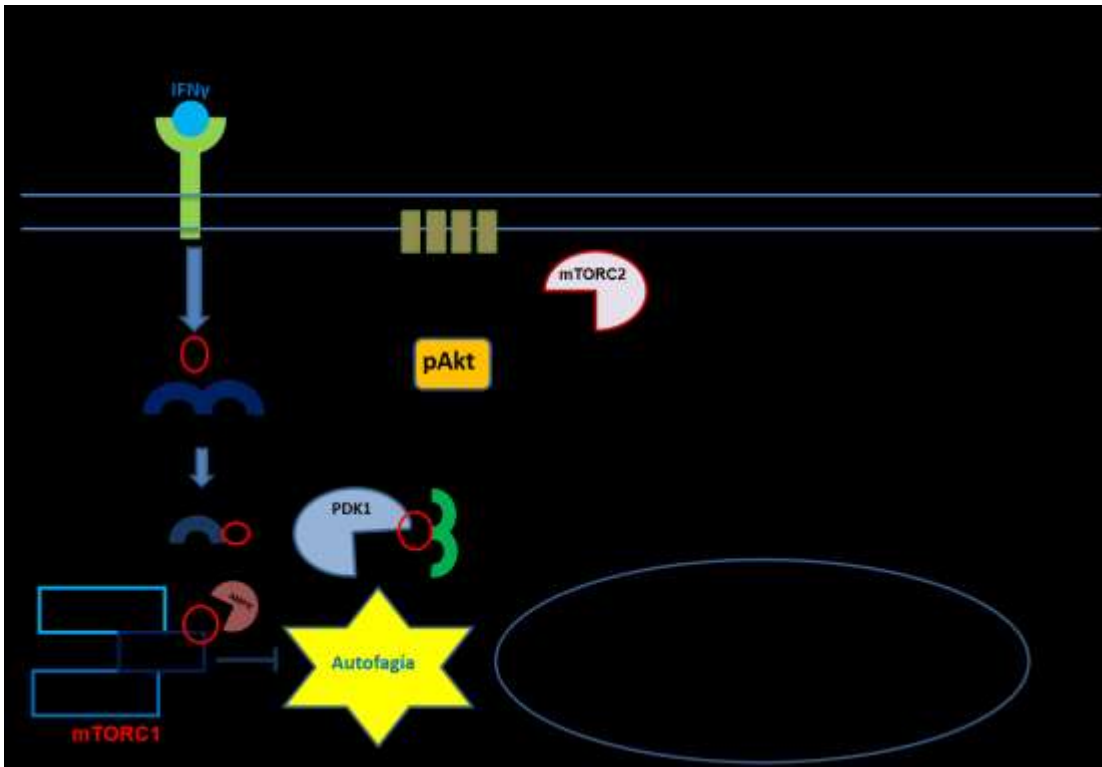


Figura 24. Modelo hipotético de la activación de Akt en las CEI por el IFN- γ .

(A) En condiciones normales, sin inflamación en las CEI del colon, la proteína 14-3-3 η inhibe la actividad de PDK1, impidiendo la activación de Akt y el disparo de la autofagia. (B) En periodos de inflamación intestinal la unión del IFN- γ con su receptor promueve la generación de los monómeros de la proteína 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58), así como la activación de la cinasa AMPK, APMK a su vez fosforila a raptor proteína que forma parte del complejo mTORC1, lo que permite que el monómero de 14-3-3 ζ se una a raptor secuestrándolo en el citosol e inhibiendo la formación del complejo mTORC1. (C) La inactivación del complejo mTORC1 dispara la autofagia y lleva a la degradación a 14-3-3 η . Como consecuencia PDK1 se activa. El proceso final de estos eventos es la fosforilación de Akt en la treonina 308 y su activación total, fosforilando a una amplia variedad de sustratos. Los resultados también muestran que la estimulación continua del sistema, debido al constante aumento en la producción de citocinas en la mucosa inflamada, promueva la hiper-activación de Akt, donde Akt activa se acumula en el núcleo induciendo para el ciclo celular y promueve la muerte de las CEI por apoptosis.

VII. Discusión.

El incremento de las citocinas pro-inflamatorias en las EII perturba la homeostasis del epitelio intestinal, de tal manera que promueve la muerte de las CEI. En consecuencia, la barrera epitelial se compromete y entran patógenos al intersticio.

La síntesis de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y TNF- α , son mediadores críticos que contribuyen activamente a este proceso ya que promueven el desensamble de las uniones intercelulares afectando diversos procesos biológicos en las CIE, como la disminución de la migración y la proliferación, así como el aumento en la muerte celular (**Nava y col., 2010 y 2014; Günzel y col., 2006; Tong y col., 2005**), a través de la activación de vías de señalización de Akt, NOs y JAK/STAT (**Nava y col., 2010; Nguyen y col., 2001; Frost y col., 2009**). Sin embargo, los mecanismos de control de estas vías de señalización no se conocen a profundidad. En esta tesis, demostramos que estas citocinas pro-inflamatorias incrementan la muerte de las CIE durante el proceso inflamatorio al sobre-estimular a la vía de señalización de Akt, donde Akt se acumula en el núcleo inhibiendo la proliferación e induciendo la muerte de las células por apoptosis.

Usando modelos *in vivo* e *in vitro*, observamos que en las CEI las citocinas pro-inflamatorias el IFN- γ y el TNF- α promueven la activación de Akt a través de su fosforilación en los residuos de Tre 308 y de Ser 473. Sin embargo, con ambos modelos pudimos observar que durante periodos inflamatorios aumenta la activación de Akt en un patrón complejo que, sorprendentemente sugiere que la fosforilación en la Ser 473 se regula de una manera distinta a la Tre 308, porque mientras la fosforilación en la Ser 473 aumenta desde el primer día y se mantiene elevada hasta los 4 días del experimento, la fosforilación en el residuo Tre 308 oscila durante el curso del experimento en los animales expuestos al DSS. En un modelo *in vivo* se obtuvo un resultado similar se obtuvo en las células SW480 incubadas con el IFN- γ (**Figura 11D y F**). Por lo tanto, observamos que la fosforilación en la Tre 308 de Akt es el factor en la activación de Akt durante la inflamación.

La activación de Akt también se asocia con su marcaje hacia degradación, ya que una vez que Akt se fosforila en el residuo 473 y cumple su función en la células, como aumentar la proliferación e inhibir la apoptosis de las células (**Carnero y Paramillo., 2014**), Akt activa se poliubiquitina en el residuo 48, lo que resulta en su degradación por el proteosoma (**Wu y col., 2011**). Esto explica la oscilación de Akt activa en las CEI de los animales tratados con el DSS, ya que en el día 2, Akt está activa totalmente y una vez que cumple su función se va a degradación por el proteosoma disminuyendo su cantidad hasta casi desaparecer en el día 3, sintetizándose nuevamente al cuarto día. La fosforilación del residuo 308 es esencial en la activación de Akt en las CEI durante la inflamación y, por ello, nos enfocamos en entender este proceso.

Se ha descrito que las isoformas 14-3-3 η y θ se asocian a PDK-1 y la inhiben en las células de riñón embrionario humano (HEK 293T), esto reduce la fosforilación de Akt en el residuo 308 (**Sato y col. 2002**). Por esta razón, analizamos si alguna de estas isoformas de las proteínas 14-3-3 podría estar regulando la actividad de PDK1 en las CEI durante la inflamación intestinal. La expresión de distintos miembros de la familia de las 14-3-3 nos permitió demostrar que 14-3-3 η y θ , inhiben la activación de PDK1, pero no así 14-3-3 β , ϵ o ζ , sin que cambie la cantidad de PDK-1 total en las células SW480 (**Figura 13B**). Sin embargo, 14-3-3 η disminuye y 14-3-3 θ aumenta en los animales con colitis experimental, a la vez que aumenta la activación de PDK1, es decir, la proteína 14-3-3 η normalmente evita la activación de PDK1 e impide así, la sobre activación de Akt en las CEI, y el aumento de la proliferación o la muerte celulares (**Figura 13D**). El aumento de la cantidad de la proteína 14-3-3 θ , en la colitis puede deberse a la estabilización y consecuente activación de PDK1 durante la inflamación. Así, la participación de 14-3-3 θ permite la regulación de Akt, y la reparación y mantenimiento de la barrera epitelial y del control del ciclo celular (**Figura 13D**) (**Yang y col., 2006**).

Nuestros hallazgos demuestran que 14-3-3 η se degrada por autofagia, proceso en el que es crucial la activación de Akt, como parte de un mecanismo de retro-alimentación que se ejerce entre los complejos mTORC1 y mTORC2 (**Chen y col.,**

2010; Wan y col., 2007). La autofagia se induce en condiciones de estrés, como lo es durante la exposición de las CEI a las citocinas pro-inflamatorias, y es regulada por las proteínas 14-3-3, al asociarse la proteína 14-3-3 ζ con raptor que forma parte del complejo mTORC1, el principal regulador de la autofagia, impidiendo la formación de este complejo y disparando el proceso de la autofagia (**Pozuelo-Rubio, y col 2012**).

Nuestros resultados elucidan una parte del mecanismo en las CEI durante la colitis, el cual involucra la asociación de la forma monomérica de 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58) con la proteína raptor. La fosforilación del residuo 58 de las proteínas 14-3-3 las monomeriza e impide la asociación de estas con sus proteínas blanco (**Dubois y col., 1997**).

Sin embargo, la sobre-expresión de una mutante de 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ S58D), promovió la acumulación del marcador de autofagia LC3-II en las células SW480, esto indica que el monómero de 14-3-3 ζ no solo interactúa con raptor, su proteína blanco, sino que además induce por si sola el proceso de la autofagia, poniendo en así en evidencia un nuevo mecanismo de control, basado en su capacidad de interactuar con sus blancos en sus estados monoméricos y diméricos en las CEI (**Figura 17A**).

Específicamente, nuestro modelo (**Figura 17**) predice que la estimulación con las citocinas pro-inflamatorias promueve la asociación de la forma monomérica de 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58) con raptor. Este proceso resulta en el secuestro de raptor en el citosol y en la inactivación del complejo mTORC1, como ha sido reportado en otras condiciones (**Gwinn y col., 2008**). La inactivación del complejo mTORC1 dispara la autofagia y lleva a degradación a 14-3-3 η . Como consecuencia PDK1 no puede interactuar con su represor, se autofosforila y se activa (**Figura 17**) (**Sato y col., 2002**). El proceso final de estos eventos es la fosforilación de Akt en la Tre 308 y su activación total (**Sarbasov y col., 2005; Balendran y col., 2000**). Akt activa ahora puede actuar sobre diversos sustratos entre los que se encuentran las proteínas TSC, encargadas de inhibir a la autofagia (**Degtyarev y col., 2008, Wang y col.,**

2012), mediada por el complejo mTORC1 (**Manning y col., 2002, Inoki y col., 2002**). En este trabajo se identifica a la maquinaria implicada en el proceso de retroalimentación que controla no solo la activación de Akt, sino también la del complejo mTORC1 durante la inflamación intestinal, donde las citocinas pro-inflamatorias el IFN- γ y el TNF- α promueven la generación de los monómeros de la proteína 14-3-3 ζ (p14-3-3 ζ S58) los cuales se asocian con raptor, impidiendo la formación del complejo mTORC1 y disparando la autofagia como se ha descrito anteriormente.

La autofagia inducida por la citocinas ha sido observada en otras patologías, incluyendo la arteriosclerosis (**Jia y col., 2006**), la miopatía (**Keller y col., 2011**) y la artritis (**Lin y col., 2013**), donde ha sido directamente vinculada a la presencia de las citocinas IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, contrariamente a otros reportes (**Tsujimoto y Shimizu, 2005; Scott y col., 2007**), el incremento en la autofagia observada en nuestro modelo no parece ser letal, y de hecho, parece tener una función de supervivencia puesto que es claro que una de sus funciones es la de activar la vía anti-apoptótica de Akt (**Brazil y col., 2004**). No obstante, nuestros resultados también muestran que la estimulación continúa del sistema, debido al enriquecimiento de las citocinas en la mucosa inflamada (**Alex y col., 2009; Rogler y Andus, 1998**), puede resultar en el aumento exagerado de la degradación de 14-3-3 η , lo que hiper-activa a PDK1 y la de su sustrato, Akt. La acumulación de esta en el núcleo, a la larga promueve la muerte celular.

Con base en esta hipótesis, se puede inferir que, durante la inflamación, la acumulación de las citocinas el IFN- γ y el TNF- α en la mucosa intestinal promueve la fosforilación o inhibición de diversas proteínas que forman parte de varias vías de señalización que regulan la síntesis y degradación, tránsito y localización de proteínas, como Akt o la β -catenina entre otras, así como el tránsito o localización de las mismas (**Maddika y col., 2008; Nava y col., 2014**). En condiciones de inflamación, esto determina la sobrevivencia o la muerte de la célula afectada, como sucede en otros sistemas (**Maddika y col., 2008**).

La degradación de proteínas tiene una doble función, controlar el contenido celular de las proteínas y reciclar aminoácidos. Nuestros resultados y los de otros grupos, sugieren que la síntesis de proteínas es un evento crítico para el funcionamiento celular durante los procesos inflamatorios (**Nava y col., 2010 y 2014; Capaldo y col., 2012, Siggins y col., 1985**). Nosotros demostramos que las proteínas 14-3-3 impiden la hiper-activación de Akt, su acumulación en el núcleo y la apoptosis de las CEI, hecho que pone en evidencia la necesidad de investigar su papel durante la inflamación.

Finalmente, con esta tesis demostramos que la regulación de diferentes vías de señalización por las proteínas 14-3-3 configuran un escenario complejo, donde los monómeros, homodímeros y heterómeros, de estas moléculas, regulan procesos celulares cruciales y pueden ser blanco de nuevas terapias que ayuden a controlar no solo las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), sino que también otras, como el cáncer. Los resultados aquí descritos muestran un mecanismo de control de Akt: su inactivación por las proteínas 14-3-3, con el fin de controlar la proliferación y la apoptosis de las CEI durante la inflamación.

VIII. Conclusiones.

- 1) La fosforilación de Akt en la serina 473 y en la treonina 308 se regulan diferencialmente durante la inflamación.
- 2) La inflamación intestinal provoca la degradación de 14-3-3 η , lo que favorece el incremento de la actividad de PDK-1.
- 3) El monómero de 14-3-3 ζ se une a raptor e inhibe la función del complejo mTORC1.
- 4) La inhibición de mTORC1 induce la degradación de 14-3-3 η por autofagia.
- 5) Las proteínas 14-3-3 regulan la activación y localización de Akt en las CEI.
- 6) La inflamación intestinal induce la hiper-activación de Akt y promueve su acumulación en el núcleo, donde Akt inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las CEI.

IX. Bibliografía

Adams R.B, Planchon S.M, Roche JK. (1993). IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol*. Vol. 150(6):2356-63.

Aggarwal B, Vilcek J, Eds. (1991). Tumor necrosis factors: structure, function and mechanism. Marcel Dekker Publishers, New York. Anderson.

Alex, P., Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. Vol. 15(3): p. 341-52.

Assani, K., Tazi MF, Amer AO, Kopp BT, (2014). IFN-gamma stimulates autophagy-mediated clearance of Burkholderia cenocepacia in human cystic fibrosis macrophages. *PLoS One*. Vol. 9(5): p. e96681.

Balendran, A., Biondi RM, Cheung PC, Casamayor A, Deak M, Alessi DR. (2000). A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C zeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J Biol Chem*,. 275(27): p. 20806-13.

Baumgart, D. C. y Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*. Vol. 380: 1590–1605.

Bazzoni F. y Beutler B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. Vol. 334:1717–25.

Beaurepaire C, Smyth D, McKay DM (2009). Interferon-c regulation of intestinal epithelial permeability. *J Interf Cytok Res*. Vol.29: 133–143.

Bergelson JM. (2009). Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. *Cell Host Microbe*. Vol.5:517–521.

Beyaert R. y Fiers W. (1994). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* Vol. 340:9–16.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. (1997). Cellular responses to interferon-γ. *Annu Rev Immunol*. Vol. 15: 749-95.

Bogdan C. y Schleicher U. (2006). Production of interferon-γ by myeloid cells- fact or fancy. *Trends in immunology*. Vol. 27: 282-9.

Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J. (2006). On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci.* Vol. 63(4):505-14.

Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Podle J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* Vol. 87:545-64.

Brazil, D.P., Z.Z. Yang, y B.A. Hemmings (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* Vol. 29(5):233-42.

Bröer S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* Vol. 88(1):249-86.

Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. (2003). Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis independent mechanisms. *J Immunol.* Vol. 1; 171(11):6164-72.

Bruewer M, Samarin S, Nusrat A. (2006). Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci.* Vol. 1072:242-52.

Calleja, V., Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings BA, Downward J, Parker PJ, Larijani B. (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* Vol. 5(4): p. e95.

Capaldo C.T., Nusrat A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1788:864– 871.

Capaldo, C.T., N Beeman, RS Hilgarth, P Nava, NA Louis, E Naschberger, M Stürzl, CA Parkos y A Nusrat (2012). IFN-gamma and TNF-alpha-induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of beta-catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunol.* Vol. 5: 681-90.

Casamayor, A., N.A. Morrice, and D.R. Alessi (1999). Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J.* Vol. 342 (Pt 2): p. 287-92.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975). An endotoxin- induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 72:3666-70.

Carnero A y Paramio JM. (2014). The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Front Oncol.* Vol. 4:252.

Chen, X.G., Liu F, Song XF, Wang ZH, Dong ZQ, Hu ZQ, Lan RZ, Guan W, Zhou TG, Xu XM, Lei H, Ye ZQ, Peng EJ, Du LH, Zhuang QY. (2010). Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Mol Carcinog.* Vol. 49(6): p. 603-10.

Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L., Contreras, R.G.L. (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annual Review of Physiology.* 60: 161-177.

Claude P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* Vol. 39(2-3):219-32.

Clayburgh, D.R., Rosen S, Witkowski ED, Wang F, Blair S, Dudek S, Garcia JG, Alverdy JC, Turner JR. (2004). A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability. *J. Biol. Chem.* 279: 55506–55513.

Cross, D.A., Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* Vol. 378(6559): p. 785-9.

Codogno P y Meijer AJ. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol.* 2006 Oct;8(10):1045-7.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* Vol. 69:238–249.

Danese, S. & Fiocchi, C. Ulcerative colitis. (2011). *New Engl. J. Med.* Vol. 365:1713–1725.

Darnay BG, Aggarwal BB. (2000). Signal transduction by tumor necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann Rheum Dis* Vol.

Day, M. L., Zhao, X, Vallorosi, C. J., Putzi, M., Powell, C. T., Lin, C., and Day, K. C. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 9656–9664.

Degtyarev, M., De Mazière A, Orr C, Lin J, Lee BB, Tien JY, Prior WW, van Dijk S, Wu H, Gray DC, Davis DP, Stern HM, Murray LJ, Hoeflich KP, Klumperman J, Friedman LS, Lin K. (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol.* Vol. 183(1): p. 101-16.

Delcomenne, M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 95(19): p. 11211-6.

De Maeyer, E. (1984). The interferon system and the immune system. In *Interferons and the Immune System*, ed. J. Vilcek, E. De Maeyer, pp. 1-6. Amsterdam: Elsevier.

DeSesso, J M, Jacobson, C F. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 39, 209-228.

Dharmani, P., Srivastava, V., Kisson-Singh, V. y Chadee, K. (2009). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J. Innate Immun.* Vol. 1(2):123-35

Diamond, J. M. 1977. Twenty-first Bowditch Lecture: the epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20:10.

Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-12.

Downward, J. (2004). PI3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* Vol. 15(2): p. 177-82.

Dubois T, Howell S, Amess B, Kerai P, Learmonth M, Madrazo J, Chaudhri M, Rittinger K, Scarabel M, Soneji Y, Aitken A. (1997). Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 protein: role in coordinating signal transduction pathways. *J Protein Chem.* Vol. 16(5):513-22.

Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. (1981). Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature.* Vol. 294:718–22.

Fais S, Capobianchi MR, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F. (1994). Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res.* Vol. 14:235-8.

Fang, D., Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* Vol. 282(15): p. 11221-9.

Farquhar, M.G. y Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *Journal of Cell Biology.* Vol. 17: 375-412

Ferraris R.P. y Diamond J. (1997). Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev.* Vol. 77:257-302.

Fougeray, S., Mami I, Bertho G, Beaune P, Thervet E, Pallet N. (2012). Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate IFN-gamma-induced autophagy. *J Immunol.* Vol. 189(6): p. 2954-64.

Frost, R.A., G.J. Nystrom, y C.H. Lang. (2009). Endotoxin and interferon-gamma inhibit translation in skeletal muscle cells by stimulating nitric oxide synthase activity. *Shock*. Vol. 32(4): p. 416-26.

Gardino, A.K. Smerdon SJ, Yaffe MB. (2006) Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin. Cancer Biol.* Vol. 16:173–182.

Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D., y Fromm, M. (2000). Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single- cell apoptosis. *FASEB J.* Vol.14:1749–1753.

Gill SR, Pop M, y Deboy R. T. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. Vol. 312:1355–9.

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* Vol. 65:475-502.

González-Mariscal L, Lechuga, S. y Garay E. (2007). Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 42:1-57.

Gottardi, C J Wong, E y Gumbiner, B M. (2001). E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting β -Catenin Signaling in an Adhesion-independent Manner. *J Cell Biol.* Vol. 153(5):1049-60.

Green K.J., Getsios S., Troyanovsky S., Godsel LM. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Vol. 2(2):a000125.

Günzel, D., Florian P, Richter JF, Troeger H, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH. (2006). Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(6): p. R1496-507.

Groschwitz, K. Hogan R, Simon P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology.* Vol. 124:3-20.

Gwinn, D.M, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* Vol. 30(2): p. 214-26.

Harris, T. J. & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: From molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 11: 502–514.

Heremans, H., Billiau, A., Colombatti, A., Hilders, J., DeSomer, P. (1978). Interferon treatment of NZB mice: accelerated progression of autoimmune disease. *Infect. Immun.* 21: 925-30.

Inoki, K., Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* Vol. 4(9): p. 648-57.

Jacob, C. O., Van der Meide, P. H., McDevitt, H. O. (1987). In vivo treatment of (NZB x NZW) F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J. Exp. Med.* Vol. 166: 798-803.

Jia, G., Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. (2006). Insulin-like growth factor-1 and α -alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol Cell Biol.* Vol. 84(5): p. 448-54.

Jones, B. A., y Gores, G. J. (1997). Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273(6), G1174-G1188.

Jope, R.S., C.J. Yuskaitis, and E. Beurel. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res.* Vol. 32(4-5): p. 577-95.

Kaiser G.C. y Polk D.B. (1997). Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology.* Vol.112:1231–1240.

Kabeya, Y., Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci.* Vol. 117(Pt 13): 2805-12.

Kang W, Kudsk KA. (2007). Is there evidence that the gut contributes to mucosal immunity in humans? *J Paren Enteral Nutr.* Vol. 31:246-258.

Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T. (2004). Protein kinase C β 11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem.* Vol. 279(46): p. 47720-5.

Keller CW, Fokken C, Turville SG, Lunemann A, Schmidt J. (2011). TNF α induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry.* Vol. 286(5): 39703980.

Kelly P, Bajaj-Elliott M, Katubulushi M, Zulu I, Poulosom R, Feldman RA, Bevins CL, Dhaliwal W. (2006). Reduced gene expression of intestinal alpha-defensins predicts diarrhea in a cohort of African adults. *J Infect Dis*; 193: 1464-1470

King D. (2008). Study guide: Histology of the gastrointestinal system.

Klionsky, D.J. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. Vol. 8(4): p. 445-544.

Kunzelmann K. y Mall M. (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*. Vol. 82:245-89.

Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol*. Vol. 22:85-9.

Laukoetter, M.G, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbin BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*. Vol. 204(13): p. 3067-76.

Lee CS y Kaestner KH. (2004). Clinical endocrinology and metabolism. Development of gut endocrine cells. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Vol. 18(4):453-62.

Levine, B. y Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*. Vol. 6, 463-477.

Li, X., Lu Y, Jin W, Liang K, Mills GB, Fan Z. (2006). Autophosphorylation of Akt at threonine 72 and serine 246. A potential mechanism of regulation of Akt kinase activity. *J Biol Chem*. Vol. 281(19):13837-43.

Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. Vol. 4(1): p. 1-26.

Lin, N.Y, Beyer C, Giessl A, Kireva T, Scholtysek C, Uderhardt S, Munoz LE, Dees C, Distler A, Wirtz S, Krönke G, Spencer B, Distler O, Schett G, Distler JH. (2013). Autophagy regulates TNFalpha-mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis*. Vol. 72(5): p. 761-8.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. Vol. 104:487-501.

Mace, O. J. Tehan, B. Marshall, F. (2015). Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharma Res Per.* Vol. 3 :(4).

Maddika, S, Ande SR, Wiechec E, Hansen LL, Wesselborg S, Los M. (2008). Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Sci.* Vol. 121(Pt 7): p. 979-88.

Malin E. V. Johansson, Henrik Sjövall y Gunnar C. Hansson. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* Vol. 10:352-361.

Moldoveanu C., Diculescu M., Fierbinteanu Braticevici C. (2015). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom. J. Intern Med.* Vol. 53 (2): 118–127.

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M. (2000). Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci.* Vol. 113:2085-90.

Manning, B.D., Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell.* Vol. 10(1): p. 151-62.

Matsuoka, K. y Kanai, T. (2014). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in immunopathology.* Vol. 37: 47–55.

Meng, W. y Takeichi, M. Adherens (2009). *Junction: Molecular architecture and regulation.* Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1, a002899. 25.

Mease P. (2002). Tumor necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis.* Vol. 61:298–304

Mestecky, J., Lamm, M. E., Ogra, P. L., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J. R., y Mayer, L. (Eds.). (2005). *Mucosal immunology.* Academic Press.

MacDonald TT, Hutchings P, ChoyMY, Murch S, Cooke A. (1990). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol.* Vol. 81:301-5.

McEver, R. P. (1991). Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb. Haem.* Vol. 65: 223-228.

McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P. & Florin, T.H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* Vol. 9: 265–278.

Miller, J. R., y Moon, R. T. (1996) *Genes Dev.* 10, 2527–2539

Mizushima, N. y T. Yoshimori. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* Vol. 3(6): p. 542-5.

Mizushima N, Yoshimori T y Ohsumi Y (2011).The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Vol. 27:107-32.

Mora, A., Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* Vol. 15(2):161-70.

Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A. (2005). Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci.* Vol. 62: 1297-1307

Muller AJ, Hoffmann C, Galle M, Van Den Broeke A, Heikenwalder M, Falter L, Misselwitz B, Kremer M, Beyaert R, Hardt WD. (2009). The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe.* Vol. 6:125–136.

Muslin, A.J., J.W. Tanner, P.M. Allen, y A.S. Shaw. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell.* Vol. 84: 889 – 897.

Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A. (2010). Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity.* Vol. 32(3):392-402.

Nava, P., Ryuta Kamekura, Miguel Quirós, Oscar Medina-Contreras, Ross W. Hamilton, Keli N. Kolegraff, Stefan Kocha, Aurora Candelario, Hector Romo-Parra, Oskar Laura, Roland S. Hilgartha, Timothy L. Denninga, Charles A. Parkos, and Asma Nusrat (2014). IFN- γ induced suppression of beta-catenin signaling: evidence for roles of Akt and 14-3-3zeta. *Mol Biol Cell.* Vol. 25(19): p. 2894-904.

Nelson, W.J. (1994). Regulation of cell adhesion and development of epithelial cell surface polarity. *Current Topics of Membranes.* 41: 123- 142

Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR. (2001). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon- gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem.* Vol. 276:33361–33368.

O'Hara JR, Buret AG. (2008). Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci.* Vol 13:7008–7021.

Orlinick JR. y Chao MV. (1998). TNF-related ligands and their receptors. *Cell Signal.* Vol. 10:543–551.

Peeters M., Geypens B., Claus D., Nevens H., Ghooos Y., Verbeke G. (1997) Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology.* Vol. 113:802-7.

Perse, M. y A. Cerar. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* Vol. 2012: p. 718617.

Peifer, M. (1997) *Science* 275, 1752–1753.

Pestka S, Krause C, Walter M. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* Vol. 202: 8-32.

Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V. Jr., Colombel, J. F. y Sandborn, W. J. (2011). Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.* Vol. 17:471–478

Podolsky DK. Mucosal immunity and inflammation. (1999). V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol Gas- trointest Liver Physiol.* Vol. 277:G495-9.

Potten CS, Booth C, Pritchard DM. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* Vol. 78: 219–243

Pozuelo-Rubio , M. , K.M. Geraghty , B.H. Wong , N.T. Wood , D.G. Campbell , N. Morrice , and C. Mackintosh.(2004). 14-3-3-affi nity purifi cation of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and traffi cking. *Biochem. J.* Vol.379: 395 – 408.

Pozuelo-Rubio, M. (2012). 14-3-3 Proteins are Regulators of Autophagy. *Cells.* Vol.1(4): p. 754-73.

Radtke F., Clevers H., Riccio O. (2006). From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med.* Vol. 6(3):275-289.

Reed, K. y Wickham R. (2009). Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro

Rogler, G. y T. Andus, (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg.* Vol. 22(4): p. 382-9.

Rouiller, C. (2013). The liver: morphology, biochemistry, physiology. Academic Press.

Ruemmele y F.M., Gurbindo C., Mansour A.M., Marchand R., Levy E., Seidman E.G. (1998) Effects of interferon gamma on growth, apoptosis, and MHC class II expression of immature rat intestinal crypt (IEC-6) cells. *J Cell Physiol.* Vol. 176:120–126.

Sarbassov, D.D., Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* Vol. 307(5712):1098-101.

Sato, S., N. Fujita y T. Tsuruo. (2002). Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *J Biol Chem.* Vol. 277(42): p. 39360-7.

Sen GC. (2001). Viruses and Interferons. *Annu Rev Microbiol.* Vol. 55: 255-81.

Schauber J, Rieger D, Weiler F, Wehkamp J, Eck M, Fellermann K, Scheppach W, Gallo RL, y Stange EF. (2006). Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Vol. 18: 615-62.

Shaw, J. y L.A. Kirshenbaum, (2006). Prime time for JNK-mediated Akt reactivation in hypoxia-reoxygenation. *Circ Res.* Vol. 98(1): p. 7-9.

Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* Vol. 112(Pt 1):137–146.

Scott, R.C., G. Juhasz, y T.P. Neufeld. (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol.* Vol. 17(1): p. 1-11.

Siggins, K.W., J.M. Tinsley, y A. Morris (1985). Role of protein synthesis in induction of interferon-gamma by mitogens in human lymphocytes. *Eur J Immunol.* Vol. 15(11): p. 1079-83.

Snapper, C. M. y Paul, W. E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-I reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* Vol. 236: 944- 47

Steinberg, G.R. y Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* Vol. 89: 1025-1078.

Strunk, R. C., Cole, F. S., Perlmutter, D. H., Colten, H. R. (1985). Gamma interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and in murine fibroblasts transfected with human C2 and factor B genes. 1. Biol. Chem. 260: 15280-85.

Suzuki T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell Mol Life Sci. Vol.70: 631–659.

Trinchieri, G. y Perussia, B. (1985). Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. Immunol. Vol. 6: 131-36.

Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. (1990). Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. J Exp Med. Vol. 172:1019– 1023.

Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. Biochem J. Vol. 429: 419–433.

Thornberry NA. y Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. Science Vol. 281:1312–1316.

Tsujimoto, Y. y S. Shimizu. (2005). Another way to die: autophagic programmed cell death. Cell Death Differ. Vol. 12 Suppl 2: p. 1528-34.

Tong, Q., Vassilieva EV, Ivanov AI, Wang Z, Brown GT, Parkos CA, Nusrat A. (2005). Interferon-gamma inhibits T84 epithelial cell migration by redirecting transcytosis of beta1 integrin from the migrating leading edge. J Immunol. Vol. 175(6): p. 4030-8.

Uzé G, Monneron D. (2007). IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. Biochimie. Vol. 89: 729-34.

Van Itallie CM, Anderson JM. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. Annu Rev Physiol; 68:403-29.

van Meer G y Simons K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. EMBO J. Vol. 5(7):1455-64.

Vilcek, J., Gray, P. W., Rinderknecht, E., Sevastopoulos, C. G. (1985). Interferon gamma: a lymphokine for all seasons. Lymphokines 11: 1-32.

Vilcek J. y Lee TH. (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem. Vol. 266: 7313–7316.

Wan, X., Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. (2007). Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. Vol. 26(13):1932-40.

Wang F, Graham WV, Wang YM, Witkowski ED, Schwarz BT. (2005) Interferon- γ and tumor necrosis factor- α synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol*. Vol.166: 409–419.

Wang, R.C., Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. (2012). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*. Vol. 338(6109): 956-9.

Wilker, E.W., Grant RA, Artim SC, Yaffe MB (2005). A structural basis for 14-3-3 σ functional specificity. *J. Biol. Chem*. Vol.280:18891–18898.

Woodcock JM, Murphy J, Stomski FC, Berndt MC y Lopez AF (2003). The dimeric versus monomeric status of 14-3-3 zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer Interface. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278 36323–36327.

Wu YT, Ouyang W, Lazorchak AS, Liu D, Shen HM, Su B. (2011). mTOR complex 2 targets Akt for proteasomal degradation via phosphorylation at the hydrophobic motif. *J Biol Chem*. Vol. 286(16):14190-8.

Wullschleger S, Loewith, R, Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. Vol. 124, 471-484.

Wheelock E. F. (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*. Vol. 149:310–1.

Xavier, R J y Podolsky, D K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. Vol. 448: 427-34.

Yang H, Wen YY, Zhao R, Lin YL, Fournier K, Yang HY, Qiu Y, Diaz J, Laronga C, Lee MH. (2006). DNA Damage –Induced Protein 14-3-3 σ Inhibits Protein Kinase B/Akt Activation and Suppresses Akt-Activated Cancer. *Cancer Res*. Vol. 66:3096-3105.

Youakim A. y Ahdieh M. (1999). Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol*. Vol. 276(5 Pt 1):G1279-88.

Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, González DE, Quan C, Tom J. (2002). A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in *in vitro* models of intestinal disease. *Gastroenterology*. Vol. 123:163-72.