



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

UNIDAD ZACATENCO

**Departamento de Fisiología, Biofísica y
Neurociencias**

**“mTORC1 protege al epitelio intestinal durante
la inflamación y previene el desarrollo de cáncer
colorrectal asociado a colitis”**

T E S I S

Que presenta

**M. en C. ITZEL ZENIDEL GUTIÉRREZ
MARTÍNEZ**

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

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

**Director de la tesis:
Dr. Porfirio Nava Domínguez**

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



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



Investigación apoyada por el Instituto de bebidas para la salud y el bienestar de Coca Cola México a través del Premio de Investigación en Biomedicina “Dr. Rubén Lisker” (2da. edición, 2016).

Agradecimientos

Al CINVESTAV y al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias por aceptarme en el programa de Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Fisiología Celular y Molecular.

Un agradecimiento especial al Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño por su inestimable ayuda, orientación, apoyo y confianza. Gracias por sus acertados consejos que permitieron que esta tesis llegara a buen término.

Al Dr. José Antonio Hernández Trejo, por sus ideas, trabajo, discusión crítica y apoyo en la mejora y desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutorial, agradezco el tiempo y las sugerencias brindadas.

Al Biol. Raúl Bonilla Moreno por el apoyo técnico a lo largo de todo el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis amigos de vida por compartir mis alegrías y angustias. Gracias por su amor, comprensión, motivación y apoyo que hicieron que pudiera llegar hasta el final.

A los integrantes del laboratorio 41.

Dedicatorias

A mis padres.

Por darme raíces para crecer fuerte y alas para volar. **Mamá**, por tu apoyo incondicional y constante, por demostrarme siempre tu cariño y no dejarme caer cuando todo parecía complicado e imposible, es un orgullo y privilegio ser tu hija, te amo, gracias infinitas. **Papá** (q.e.p.d.), por el tiempo que estuviste a mi lado, compartiendo tus experiencias, conocimientos y consejos, por tu amor, gracias, y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, siento que estás conmigo siempre.

A Toñito

“Cuando me pregunten qué era lo que más me gustaba de la vida, yo responderé: tú”. Por ser mi cómplice, mi confidente, mi compañero, mi amigo, por ayudarme a crecer e inspirarme a ser mejor todos los días, por amarme, pero sobre todo por ser tan tú, mi corazón te pertenece. Te amo.

A mi familia

Por brindarme su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, otras locas. Abuelitos, tíos, tías, primas y primos, gracias por todos los momentos de felicidad que me han ayudado a no decaer y nunca rendirme, los amo infinitamente.

A mis Trejos

En el camino encuentras personas que te hacen sentir siempre en casa, que te brindan su amor, apoyo y comprensión desinteresadamente, gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Estructura y funciones del intestino	1
I.2 El epitelio intestinal y su auto-renovación	3
I.3 Células madre intestinales	5
I.4 Regulación de la homeostasis intestinal: Regeneración, plasticidad y protección de las células madre.	6
I.5 Enfermedades Inflamatorias Intestinales	9
I.6 Cáncer colorrectal asociado a colitis	15
I.7 Importancia de las citocinas en el cáncer colorrectal asociado a colitis	20
I.8 El IFN- γ promueve la activación de STAT1 y la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR	21
II. ANTECEDENTES	26
II.1 Planteamiento del problema	26
II.2 Hipótesis	27
II.3 Objetivo General	27

II.4 Objetivos particulares	27
III. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	28
III.1 Animales y cultivos celulares	28
III.2 Anticuerpos y reactivos	28
III.3 Tratamiento con las citocinas e inhibidores <i>in vitro</i>	29
III.4 Tratamiento con las citocinas <i>in vivo</i>	29
III.5 Modelo de colitis inducida por DSS y la administración <i>in vivo</i> de inhibidores	30
III.6 Evaluación de la proliferación y ensayo de TOP-Flash	30
III.7 Extracción de proteínas y Western blot	30
III.8 Inmunofluorescencia	31
III.9 Fraccionamiento celular	31
III.10 Tinción de Hematoxilina-Eosina	32
III.11 Aislamiento de criptas	32
III.12 Análisis estadístico	32
IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	33
IV.1 mTORC1 se activa en las CEIs durante la colitis	33
IV.2 El IFN- γ induce la activación de mTORC1 en las CEIs del colon	36
IV.3 mTORC1 disminuye la proliferación celular en la mucosa intestinal durante la inflamación.	38
IV.4 mTORC1 previene la muerte de las CEIs durante la colitis.	42
IV.5 mTORC1 reduce el daño del ADN en las CEIs durante la colitis.	46
IV.6 La inhibición de mTORC1 incrementa la formación de tumores en un modelo murino de carcinogénesis de colon inducida con AOM / DSS	53
V. DISCUSIÓN	56
VI. RESUMEN DE RESULTADOS	60

VII. CONCLUSIÓN	61
VIII. PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFÍA	63
APÉNDICES	92
Apéndice A: Modelo de colitis inducida con DSS	93
Apéndice B: Autofagia: mTOR-dependiente y mTOR-independiente	96
Apéndice C: Cloruro de Litio (LiCl): Mecanismo de acción	99
Apéndice D: DAI (Disease Activity Index).	101
ANEXOS	102
Anexo 1: “mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development”	103
Anexo 2: “pVHL supresses Akt/ β -catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3 ζ expression”	104
Anexo 3: “The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium”	105
Anexo 4: “14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells”	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización histológica del tracto intestinal.	2
Figura 2. Estructura y diferenciación celular en el colon y el intestino	4
Figura 3. Modelo de la patogénesis de las EIIs	12
Figura 4. El Sistema Inmunológico Intestinal	13
Figura 5. Importancia de las citocinas y las CEIs en las EIIs y el CAC	15
Figura 6. Principales causas de mortalidad 1950-2014	16
Figura 7. Modelo de la función de la inflamación en el desarrollo de CCRAC	19
Figura 8. Complejos mTORC1 y mTORC2	23
Figura 9. La vías de señalización de mTOR	24
Figura 10. mTORC1 se activa en las CEIs durante la colitis	34
Figura 11. El IFN- γ induce la activación de mTORC1 en las CEIs	36
Figura 12. mTORC1 disminuye la proliferación de las CEIs en la mucosa durante la colitis	39
Figura 13. La inhibición de mTORC1 incrementa los signos y la severidad de la colitis inducida con DSS en un modelo murino	43
Figura 14. La inhibición de mTORC1 agrava el daño epitelial durante la colitis	45
Figura 15. mTORC1 previene el daño al ADN en las CEIs durante la colitis	48
Figura 16. mTORC1 previene el daño al ADN inhibiendo la actividad co-transcripcional de β -catenina durante la colitis	51
Figura 17. La inhibición de mTORC1 potencia la transformación epitelial durante la colitis.	55
Figura del Apéndice A. Modelo de colitis experimental con dextrán sulfato de sodio (DSS)	94
Figura del Apéndice B. Etapas de la autofagia	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos fundamentales sobre las EIs	10
Tabla del Apéndice D. Puntuación para obtener el Índice de la Actividad de la Enfermedad (DAI)	101

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
AD	Aparato digestivo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOM	Azoximetano
CAC	Cáncer asociado a colitis
CCR	Cáncer colorrectal
CCRAC	Cáncer colorrectal asociado a colitis
CD/s	Célula/s dendrítica/s
CEI/s	Célula/s epitelial/es intestinal/es
CU	Colitis Ulcerosa
DSS	Dextrán sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EGF	Epidermal Growth Factor
EII/s	Enfermedad/es inflamatoria/s intestinal/es
IFN-γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
JAK2	Janus kinase 2
m/TOR	Mammalian / Target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
MHC	Major histocompatibility complex
MUC2	Mucina 2
PAM/s	Péptido/s antimicrobiano/s
PH	Pleckstrina
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

Abreviatura	Término
R	Receptor
REG4	Regenerating islet-derived protein 4
RSC	Rupturas de doble cadena
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSC	Rupturas de una sola cadena
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGI	Tracto gastrointestinal
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
UE/s	Unión/es estrecha/s
UI/s	Unión/es intercelular/es

RESUMEN

La monocapa de células que componen el epitelio intestinal está sellada entre sí a través de las uniones intercelulares (UIs), por lo que forman una barrera física de permeabilidad selectiva que separa el contenido luminal del tejido subyacente. Las propiedades de barrera del epitelio intestinal se mantienen porque se establece un equilibrio dinámico entre las células epiteliales intestinales (CEIs), la microbiota y las células del sistema inmunológico de la mucosa, a lo cual se denomina homeostasis intestinal. Las afectaciones de la homeostasis intestinal provocan el desarrollo de múltiples patologías, incluyendo a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Durante la colitis ulcerosa (CU), una de las EII más estudiadas, la proliferación de las CEIs disminuye mientras que la apoptosis aumenta. El mecanismo responsable de estos cambios se desconoce.

En este trabajo, demostramos que el IFN- γ , una citocina pro-inflamatoria que se encuentra elevada en la mucosa intestinal de pacientes con EII, contribuye a la inhibición de la proliferación de las CEIs al inducir la activación de mTORC1, a través de la vía de señalización PI3K / Akt. La activación de mTORC1 en respuesta al IFN- γ se detectó en las CEIs presentes a lo largo del eje de la cripta y en los macrófagos ubicados en la mucosa del colon. La inhibición de mTORC1 aumenta la proliferación celular y el daño al ADN en las CEIs. En los macrófagos, la inhibición de mTORC1 reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios. De modo que, la inhibición de mTORC1 aumenta la severidad de la colitis al potenciar el daño a la mucosa, incrementar la ulceración y la infiltración celular además de que disminuye la supervivencia de distintas estirpes celulares. Por último, en un modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis (CCRAC), la inhibición de mTORC1 estimula la formación de tumores. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que la activación de mTORC1 por el IFN- γ , previene el daño al epitelio intestinal y el desarrollo de cáncer durante la colitis.

ABSTRACT

Intestinal epithelial cells (IECs) glued together through intercellular junctions (IJs) form a selectively permeable barrier that separates luminal content from the underlying tissue. The maintenance of the intestinal epithelial barrier properties requires the establishment of a dynamic balance between IECs, the microbiota and the mucosal immune cells. Disruption of such balance contributes to the development of many diseases including inflammatory bowel disease (IBD). During colitis, epithelial cell proliferation decreases and cell death augments. The mechanism responsible for these changes remains unknown.

Here, we show that IFN- γ , a pro-inflammatory cytokine increased in the intestinal mucosa of patients with IBD, inhibits intestinal epithelial cells (IECs) proliferation by inducing the activation of mTORC1, through the PI3K / Akt signaling pathway. mTORC1 activation IFN- γ -induced was detected in the IECs present along the crypt axis and in the colonic macrophages. The inhibition of mTORC1 enhances cell proliferation and DNA damage in IECs. In macrophages, mTORC1 inhibition reduces the expression of pro-inflammatory markers. Thus, mTORC1 inhibition increases severity of DSS-induced colitis, enhances mucosal damage, augments ulceration and boosts cellular infiltration, which consequently decreases survival rate. Also, in a model of colorectal cancer associated to colitis (CCRAC), the inhibition of mTORC1 stimulates the formation of tumors. Therefore, our findings suggest that the activation of mTORC1 by IFN- γ prevents intestinal epithelial damage and cancer development during colitis.

I. Introducción

I.1 Estructura y funciones del intestino.

El aparato digestivo (AD) tiene tres funciones principales: la digestión de los alimentos, la absorción de nutrientes y la eliminación de residuos sólidos de alimentos. Los órganos del AD incluyen aquellos que conforman el tracto gastrointestinal (TGI) (por ejemplo, esófago, estómago e intestino delgado y grueso) y órganos accesorios (por ejemplo, hígado, vesícula biliar y páncreas) (**Kierszenbaum, 2008; Moog, 1981**).

El intestino está dividido anatómicamente en intestino delgado e intestino grueso. Forman una parte importante del TGI pues son el sitio principal de digestión y absorción de nutrientes ingeridos en la comida. El intestino delgado consta de tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, y el intestino grueso comprende el ciego con su apéndice vermiciforme, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, recto y ano. Histológicamente la pared intestinal se encuentra dividida en cuatro capas: 1) Mucosa, la cual se compone a su vez de epitelio cilíndrico simple con borde en cepillo, lamina propia y muscular de la mucosa; 2) Submucosa; 3) Muscular y 4) Serosa o adventicia o peritoneo (**Figura 1**) (**Helande y Fändriks, 2014; Kong et al., 2018; Moog, 1981**). La mucosa tiene como funciones principales absorber y transportar nutrientes, mantener los tejidos húmedos y proteger el cuerpo de patógenos y partículas extrañas. La submucosa es una matriz extracelular rica en colágeno, relativamente delgada, que sostiene a la mucosa y la une a la capa muscular. Esta última es responsable del movimiento intestinal como la peristalsis. La adventicia es una membrana de tejido liso que consta de dos capas de mesotelio, una membrana visceral y una capa parietal. La adventicia segrega un fluido seroso, por ello, también se le conoce como capa serosa (**Collins y Badireddy, 2019; Johansson et al., 2013**).

Por su función absorbiva, la mucosa intestinal presenta plegamientos que permiten ampliar su superficie de contacto y la absorción. Existen cuatro grados de plegamiento: a) Pliegues, llamados pliegues circulares, que son evaginaciones de la mucosa y parte de la submucosa; b) Vellosidad, protuberancia en forma de dedo exclusiva de la capa mucosa; c) Glándula o cripta de Lieberkühn, invaginación de la mucosa, que puede llegar a extenderse hasta la capa muscular; y d) Microvellosidad, evaginación del dominio apical del enterocito (Kierszenbaum, 2008; Kong *et al.*, 2018).

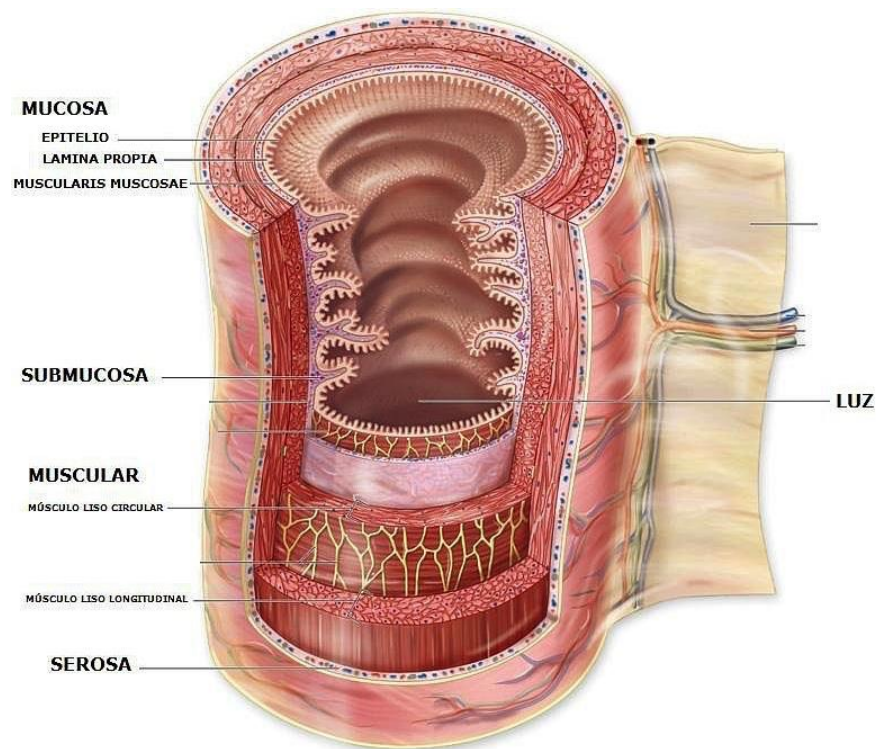


Figura 1. Organización histológica del tracto intestinal. La pared intestinal se encuentra dividida histológicamente en cuatro capas: 1) Mucosa, compuesta a su vez de epitelio cilíndrico simple con borde en cepillo, lamina propia y muscular de la mucosa; 2) Submucosa; 3) Muscular y 4) Serosa (tomada de Sepúlveda, 2015).

I.2 El epitelio intestinal y su auto-renovación.

El intestino está recubierto de un epitelio simple que funciona como una barrera semipermeable que impide el paso de patógenos pero que, en cambio, permite la absorción de nutrientes y agua (**Heath, 1996; Gehart y Clevers, 2019**). El epitelio intestinal está constituido por una monocapa de células epiteliales intestinales (CEIs), selladas entre sí por medio de uniones intercelulares (UIs) que incluyen a las uniones estrechas (UEs), las uniones adherentes y los desmosomas (**Laukoetter et al., 2008**). Las UIs son estructuras dinámicas que controlan la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal y regulan la homeostasis intestinal y los procesos biológicos como diferenciación, polaridad, morfología, proliferación y apoptosis (**Nava et al., 2013**).

El epitelio intestinal está organizado en millones de unidades cripta-vellosidad. Cada unidad consiste en una vellosidad rodeada por múltiples criptas. Las vellosidades más largas (mayores a 1 mm de longitud) se encuentran en el duodeno. La longitud de las vellosidades disminuye a lo largo del intestino delgado. Las vellosidades mejoran notablemente la capacidad de absorción del intestino debido a sus proyecciones en la luz intestinal, su gran área de superficie y su excelente conexión con el sistema circulatorio (**Gehart y Clevers, 2019**). Debido a su naturaleza y funciones el epitelio intestinal está expuesto a altos niveles de estrés mecánico, daño químico y otros peligros ambientales. Estas amenazas son importantes, ya que un epitelio roto podría conducir rápidamente a una infección sistémica y a la abrasión del tejido subyacente. Para minimizar la exposición del epitelio a un ambiente nocivo, la vida útil de las células maduras en el epitelio intestinal es muy corta (3 a 5 días) (**Darwich et al., 2014**).

El colon o intestino grueso, tiene una superficie epitelial plana interpuesta por criptas. Al ser una invaginación de la pared intestinal, la cripta se encuentra bien protegida de los peligros del proceso digestivo. En el fondo de la cripta, las células madre se dividen y dan origen a células progenitoras y a células de amplificación en tránsito que proliferan rápidamente y finalmente se convierten en CEIs maduras (**Figura 2**). Estas células son expulsadas de la cripta por la siguiente generación de células epiteliales y comienzan su

viaje hacia la punta de las vellosidades, donde eventualmente se someten a la apoptosis y se desprenden hacia la luz intestinal (Barker, 2014; Gehart y Clevers, 2019). Este sistema permite al intestino aislar células en proliferación activa y exponer solo las células postmitóticas por un corto tiempo a los peligros del tracto digestivo. De este modo, el intestino combina las ventajas de absorción de un epitelio simple de gran superficie con las ventajas protectoras de una barrera que se renueva constantemente (Gehart y Clevers, 2019).

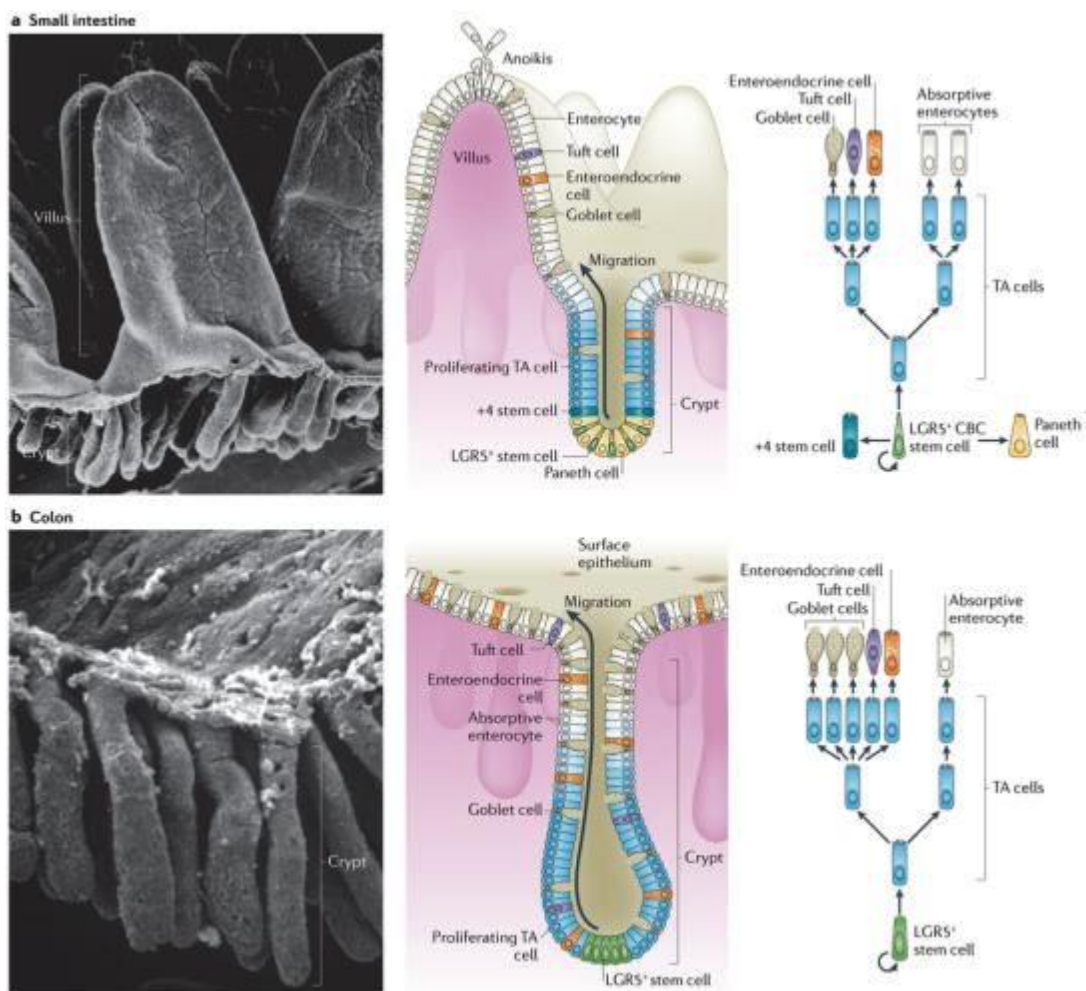


Figura 2. Estructura y diferenciación celular en el colon y el intestino. (a) En la imagen de la izquierda se observan vellos y criptas del intestino, por microscopía electrónica de barrido. En el esquema de centro se muestra a las CEIs originadas en el fondo de la cripta, por proliferación de las células troncales (LGR5⁺) y a medida que migran a la punta del vello se diferencian. Con colores y formas distintas se representan los

distintos linajes celulares cuyo proceso de diferenciación se representa en el esquema de la derecha. **(b)** Imágenes correspondientes al colon con descripción similar a las del **(a)** (tomada de **Barker, 2014**).

El epitelio intestinal comprende seis tipos diferentes de células maduras, que se separan en dos linajes: absorbente (enterocitos y células M) y secretor (células de Paneth, células de Goblet o caliciformes, enteroendócrinas y células Tuft). En el intestino grueso, las células de Paneth están ausentes y los enterocitos, por su ubicación, también se denominan colonocitos. Estos diferentes tipos de células cumplen funciones esenciales y especializadas que incluyen la absorción de nutrientes (enterocitos), secreción de moco (células Goblet), el control metabólico (células enteroendócrinas), la inmunidad innata (célula de Paneth) y la regulación inmunológica (células Tuft, células M). Por lo tanto, el sistema depende en gran medida del suministro continuo de todos los tipos de células en proporciones adecuadas. Por lo que son las células madre intestinales las encargadas de dirigir, alimentar y proteger el sistema de recambio intestinal (**Barker, 2014; Gehart y Clevers, 2019; Noah et al., 2013**).

I.3 Células madre intestinales.

Las células madre en el intestino se encuentran en la base de la cripta y son positivas para el marcador LGR5, el cual es altamente específico para esta estirpe celular (**Barker et al., 2007**). Las células madre intestinales LGR5⁺ son capaces de generar los múltiples linajes celulares que conforman el epitelio y pueden además auto-renovarse a largo plazo. Además de las células madre intestinales LGR5⁺, se han descrito las células +4, otra población también considerada como célula madre intestinal. El término "+4" describe su ubicación, ya que se encuentra justo encima de la célula de Paneth, entre la zona de las células madre (LGR5⁺) y la zona progenitora en la cripta (**Figura 2**). La retención del marcaje hace que este tipo celular, identificado originalmente por Chris Potten, también cumpla con el criterio de células madre quiescentes (**Potten et al., 1978**;

Potten et al., 2007). Sin embargo, la naturaleza y función de esta población no han sido totalmente demostradas debido a las limitaciones de la tecnología actual, y pese a las múltiples evidencias de su participación en la regeneración epitelial después de una lesión (**Breault et al., 2008; Montgomery et al., 2011; Powell et al., 2012; Sangiorgi y Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011**), la contribución de las células +4 a la homeostasis del tejido aún se discute. Por lo tanto, la célula +4 se considera una célula madre de reserva con una alta resistencia a la radiación, que rellena el conjunto de células madre (LGR5⁺) de ciclo continuo cuando es necesario (**Tetteh et al., 2015**).

I.4 Regulación de la homeostasis intestinal: Regeneración, plasticidad y protección de las células madre.

La repoblación del nicho de las células madre se ha atribuido a la movilización del grupo de las células +4 (**Takeda et al., 2011; Tian et al. 2011; Yan et al., 2012**). Por otro lado, varias publicaciones han demostrado que la misma función puede ser cumplida por una variedad de células que normalmente se considerarían ya comprometidas a una determinada estirpe (**Buczacki et al., 2013; Tian et al. 2011**). Adicionalmente, existen reportes en donde células secretoras totalmente diferenciadas como las células enteroendocrinas o las células Tuft, también parecen ser capaces de revertirse a la troncalidad (**Jadhav et al., 2017; Munoz et al., 2012; Yan et al., 2017**). Aunque estos estudios se centraron en la desdiferenciación de las células secretoras, la plasticidad en el epitelio intestinal no se limita al linaje secretor. Al usar los ratones *Alpi-CreERT2*, **Tetteh et al.** descubrieron que los progenitores comprometidos de la estirpe absortiva también tienen la capacidad de regresar al estado de troncalidad cuando las células madre LGR5⁺ se eliminan (**Tetteh et al., 2015**).

De manera que, es necesario investigar si las propiedades del microambiente del nicho intestinal proporcionan a las células diferenciadas la capacidad de reprogramarse, o si la plasticidad de las células epiteliales está limitada por un punto específico de no retorno.

Una primera pista para responder a esta pregunta proviene del campo de la epigenética (Clevers, 2013). Varios estudios que analizaron el panorama epigenético de las células madre intestinales, en comparación con las células epiteliales intestinales diferenciadas, llegaron a la conclusión de que se mantiene un estado permisivo de cromatina abierta durante todo el proceso de diferenciación (Gehart y Clevers, 2019). Este aspecto se descubrió al estudiarse de manera independiente los niveles de metilación del ADN (ácido desoxirribonucleico) (Kaaij *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015) y la modificación de las histonas (Kim *et al.* 2014; Jadhav *et al.* 2016). Por lo tanto, es posible que el estado de diferenciación de una célula puede determinarse completamente por su entorno. Como resultado, no sería sorprendente que incluso células epiteliales completamente diferenciadas pudieran revertirse al estado de troncalidad. Por lo que, la capacidad de las células maduras para desdiferenciarse es un importante sistema de respaldo que garantiza la integridad de muchos (si no todos) los tejidos epiteliales. Por ello, el hecho de que las células madre se dividan todos los días se antepone con la expectativa de que esta población se esfuerza por mantener la inactividad para reducir el riesgo de daño al ADN y las enfermedades resultantes (Gehart y Clevers, 2019). De hecho, parece precario que una célula con un potencial de expansión ilimitado replique su ADN repetidamente a menos de un milímetro de un entorno hostil, como lo es el proceso de digestión intestinal. Esta podría ser la razón por la cual la cripta se convirtió en un entorno altamente protector que soporta la proliferación y minimiza el daño a las células madre (Clevers, 2013; Gehart y Clevers, 2019).

Las propiedades espaciales de las criptas aseguran que las células madre no entren en contacto directo con el proceso digestivo. La cripta está conectada a la luz intestinal solo por una pequeña abertura (aproximadamente 6 μm), que limita la difusión. Por lo que, la estructura de la cripta protege a la población de células madre de los productos microbianos (por ejemplo, toxinas o butirato) en el colon (Kaiko *et al.*, 2016). También, las células en la cripta secretan un flujo constante de líquido que limpia la luz de la cripta y elimina los contaminantes (Henderson *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Trezise *et al.*, 1992). Además, la secreción de moco de las células caliciformes es mayor cerca de la abertura de la cripta (Johansson *et al.*, 2011), lo que crea una barrera física para la luz intestinal. Igualmente, se

ha descrito un subtipo especializado de célula caliciforme, la célula de Goblet centinela (**Birchenough et al., 2016**). Estas células residen en la entrada de la cripta en el colon y cuando detectan la invasión bacteriana (a través de los receptores tipo Toll), secretan la proteína mucina 2 (MUC2) y estimulan a las células caliciformes circundantes a hacer lo mismo. Por lo tanto, la corriente continua de fluido logra aislar a la cripta y su microentorno, de los patógenos y el proceso digestivo.

Dentro de la cripta, las células de Paneth, nutren y protegen a las células madre. En contraste con otros tipos de CEIs especializadas, las células de Paneth se mueven hacia abajo después de la diferenciación y se encuentran exclusivamente en la parte inferior de la cripta (**Figura 2**). Esta migración específica de las células de Paneth depende de la señalización de ephrinB2, ephrinB3 y PI3K (phosphoinositide 3-kinase), y se interrumpe cuando el gen *EphB3* se elimina (**Battle et al., 2002**) o la señalización de PI3K se inhibe (**Genander et al., 2009**). Las células de Paneth producen una amplia variedad de productos antimicrobianos como la lisozima, las α -defensinas y la fosfolipasa A2 (**Gassler et al., 2017**). Estas proteínas sirven de protección para las células madre intestinales. También, se excretan de forma constitutiva en la luz intestinal, mezclándose con el moco derivado de las células de Goblet y así, forman parte integral de la inmunidad innata de la mucosa a lo largo de todo el epitelio (**Allaire et al., 2018**). En la parte inferior de la cripta, las células de Paneth se alternan con las células madre, de modo que, cada célula madre está en contacto con al menos una célula de Paneth (**Figura 2**). Esta organización es necesaria porque las células de Paneth proporcionan ligandos esenciales (WNT y factor de crecimiento epidérmico [EGF]) y estímulos Notch para el mantenimiento de las células madre (**Sato et al., 2011**). Aunque el colon carece de células de Paneth, existe un tipo de célula secretora encontrada en la parte inferior de la cripta que cumple la misma función, identificada por medio del marcaje de la proteína de secreción gastrointestinal REG4 (regenerating family member 4) (**Sasaki et al., 2016**).

Además de estimular a las células madre con señales parácrinas, las células de Paneth también proporcionan nutrientes esenciales para las células madre intestinales. Recientemente, se demostró que las diferencias metabólicas entre las células madre y las

células de Paneth dependen en gran medida de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la glucólisis con lactato como producto final, respectivamente (**Rodriguez-Colman et al., 2017**). El lactato producido por las células de Paneth se usa posteriormente como sustrato para el metabolismo mitocondrial en las células madre. Esto es un hallazgo sorprendente, ya que el metabolismo oxidativo está estrechamente relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden provocar daños en el ADN. Sin embargo, la acumulación de mutaciones en el epitelio intestinal es lenta (aproximadamente 40 mutaciones nuevas por año) y similar a la de otros órganos mucho menos proliferativos como el hígado (**Blokzijl et al., 2016**). Además, en ensayos *in vitro*, se ha demostrado que el lactato elimina los radicales libres, por lo que se considera un fuerte antioxidante (**Groussard et al., 2000**). Por lo tanto, es posible que el lactato derivado de las células de Paneth no solo estimule la proliferación continua de las células madre, sino que también las proteja del estrés oxidativo.

En conjunto, el epitelio intestinal contribuye a un estado saludable del hospedero a través de la "segregación", es decir la separación de la microbiota y de las células del sistema inmunológico del intestino, y la "mediación", en otras palabras, la transmisión de señales entre la microbiota, el epitelio y las células del sistema inmunológico intestinales (**McGuckin et al., 2011; Muniz et al., 2012; Okumura y Takeda, 2017; Tennant et al., 2008**). Si las barreras intestinales funcionan mal o se rompen, permiten la entrada de proteínas de la dieta o microorganismos comensales o patógenos. En consecuencia, la homeostasis intestinal se altera, dando lugar a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (**Bain y Mowat, 2014; Pasparakis, 2009**).

I.5 Enfermedades inflamatorias intestinales.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo amplio de enfermedades caracterizadas por una inflamación severa recurrente que genera lesiones epiteliales (**Neurath, 2014**). Las principales formas clínicas de las EII son la enfermedad

de Crohn (EC), que puede afectar cualquier parte del tracto intestinal, y la colitis ulcerosa (CU), que se restringe al colon (**Tabla 1**) (**Baumgart y Sandborn, 2012; Danese y Fiocchi, 2011**).

	Enfermedad de Crohn	Colitis Ulcerosa
Incidencia	3.1 a 20.2 casos en 100,000 individuos por año	2.2 a(19.2 casos en 100,000 individuos por año
Factores de riesgo	Genético y ambiental (por ejemplo, fumar como factor de riesgo para formas agresivas de la enfermedad)	Genético y ambiental (fumar y la apendicectomía son factores protectores)
Inicio de la enfermedad	Usualmente entre 15 y 40 años	
Localización	La inflamación frecuentemente afecta el íleon distal y el colon	La inflamación afecta solo al colon (colitis distal o proctitis (55%), colitis del lado izquierdo (25%) y pancolitis (20%))
Patología	Inflamación intestinal discontinua e irregular con lesiones distribuidas aleatoriamente	Inflamación continua desde el recto hasta las partes proximales del colon
Histología	Inflamación transmural (todas las capas de la pared intestinal)	Inflamación superficial (mucosa y submucosa).
Síntomas	Diarrea, calambres abdominales, fiebre, anemia, pérdida de peso y fatiga	Diarrea (con sangre), calambres abdominales, anemia, pérdida de peso y fatiga
Manifestaciones inflamatorias extra-intestinales	Varios órganos y sistemas están afectados, por ejemplo, articulaciones, piel, hígado, ojos, boca y sangre (coagulación)	
Complicaciones	Estenosis, formación de abscesos, fístulas y cáncer de colon	Sangrado severo, megacolon tóxico, ruptura del intestino y cáncer de colon

Tabla 1. Datos fundamentales sobre las EIIs (tomada de **Neurath, 2014**).

La etiología precisa de las EII hasta ahora se desconoce e implica a factores genéticos y ambientales que combinados incrementan el riesgo de generar alteraciones en la barrera epitelial (**Baumgart y Sandborn, 2012; Danese y Fiocchi, 2011**). Esto permite la traslocación de antígenos lumenales (por ejemplo, antígenos bacterianos de la microbiota común) hacia el interior de la pared intestinal. En un hospedero genéticamente susceptible, la respuesta inmunológica aberrante y excesiva hacia estos antígenos, provoca el desarrollo de una inflamación subclínica o aguda de la mucosa. En los pacientes que no logran resolver la inflamación intestinal aguda, se desarrolla una inflamación intestinal crónica (**Neurath, 2014**) (**Figura 3**). La respuesta inflamatoria crónica frecuentemente produce lesiones epiteliales, como erosiones y ulceraciones, así como una disminución en la producción de las defensinas. Esto deriva en una mayor exposición de la microbiota al sistema inmunológico intestinal y a la amplificación de la respuesta inflamatoria, creando un círculo vicioso (**Simms *et al.*, 2008; Wehkamp *et al.*, 2005**).

En una EII activa la infiltración de células del sistema inmunológico innato (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas [CDs] y células T NK) y de células del sistema inmunológico adaptativo (linfocitos B y linfocitos T) estimula la liberación de mediadores inflamatorios como son: el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-1 β (IL-1 β), el interferón- γ (IFN- γ) y las citocinas de la vía interleucina-23-T_h17, que promueven la inflamación crónica del TGI (**Figura 4**) (**Abraham y Cho, 2009**). Además, el proceso inflamatorio genera la aparición de síntomas asociados, como la diarrea, y también puede promover la aparición de enfermedades extra-intestinales (por ejemplo, artralgia, artritis, caquexia), provocando efectos sistémicos en las EIIs (**Ruffolo *et al.*, 2010; Strober *et al.*, 2002**). Por lo que, las citocinas tienen un papel crucial en la patogenia de las formas progresivas y destructivas de las EIIs que se asocian con complicaciones como la estenosis intestinal, el sangrado rectal, la formación de abscesos y de fístulas y el desarrollo de cáncer asociado a colitis (CAC) (**Baumgart y Sandborn, 2012; Becker *et al.*, 2004; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2011**).

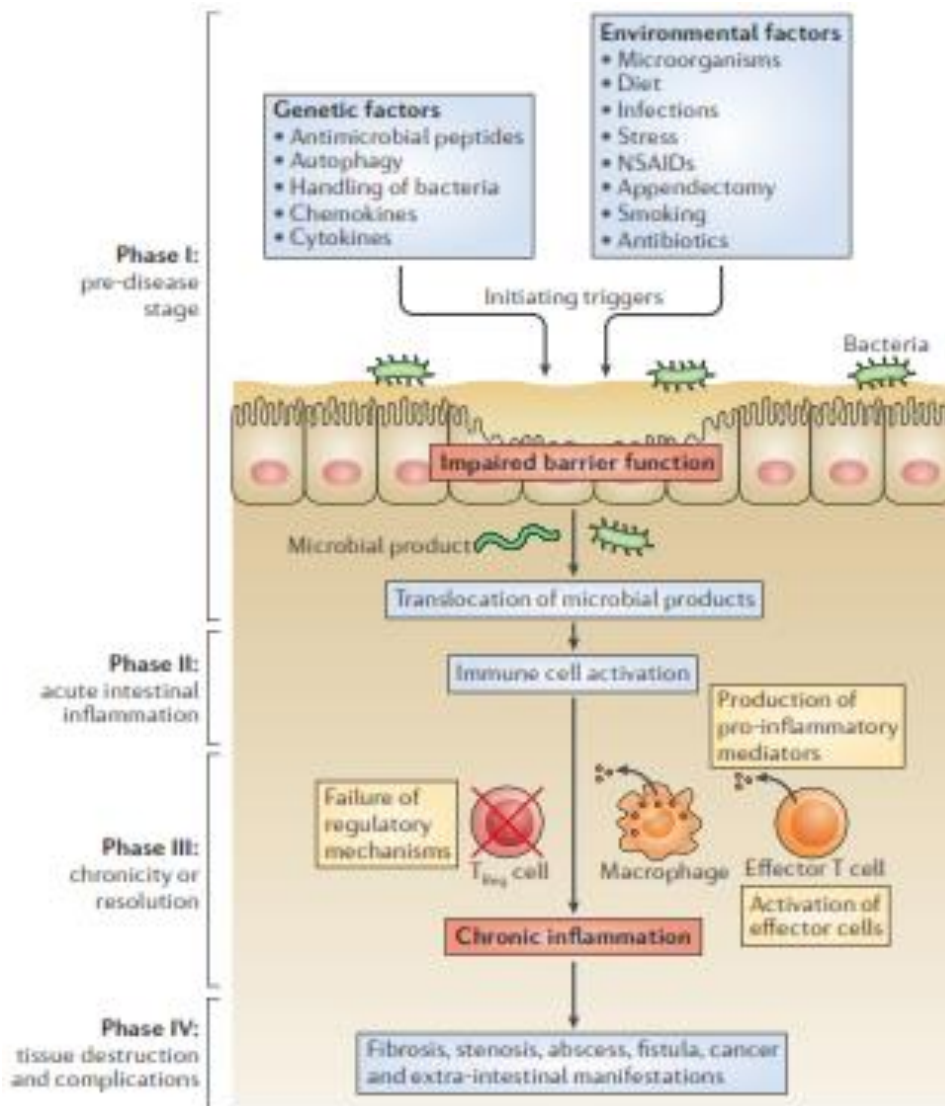


Figura 3. Modelo de la patogénesis de las EII. Los factores genéticos y ambientales provocan una alteración de la función de barrera del epitelio intestinal. En algunos pacientes el inicio de la enfermedad se puede manifestar con infecciones. El daño de la barrera epitelial permite la translocación de bacterias comensales y productos microbianos desde la luz intestinal hacia el interior de la mucosa, lo que conduce a la activación de las células del sistema inmunológico y la producción de citocinas. Si la inflamación aguda de la mucosa no puede resolverse mediante mecanismos anti-inflamatorios y la supresión de la respuesta inmunológica pro-inflamatoria, se desarrolla una inflamación intestinal crónica. A su vez, la inflamación crónica puede generar complicaciones de la enfermedad y también la destrucción del tejido, ambas situaciones impulsadas por las citocinas en la mucosa. NSAIDs, anti-inflamatorios no esteroideos; Célula T_{reg}, célula T reguladora (tomada de **Neurath, 2014**).

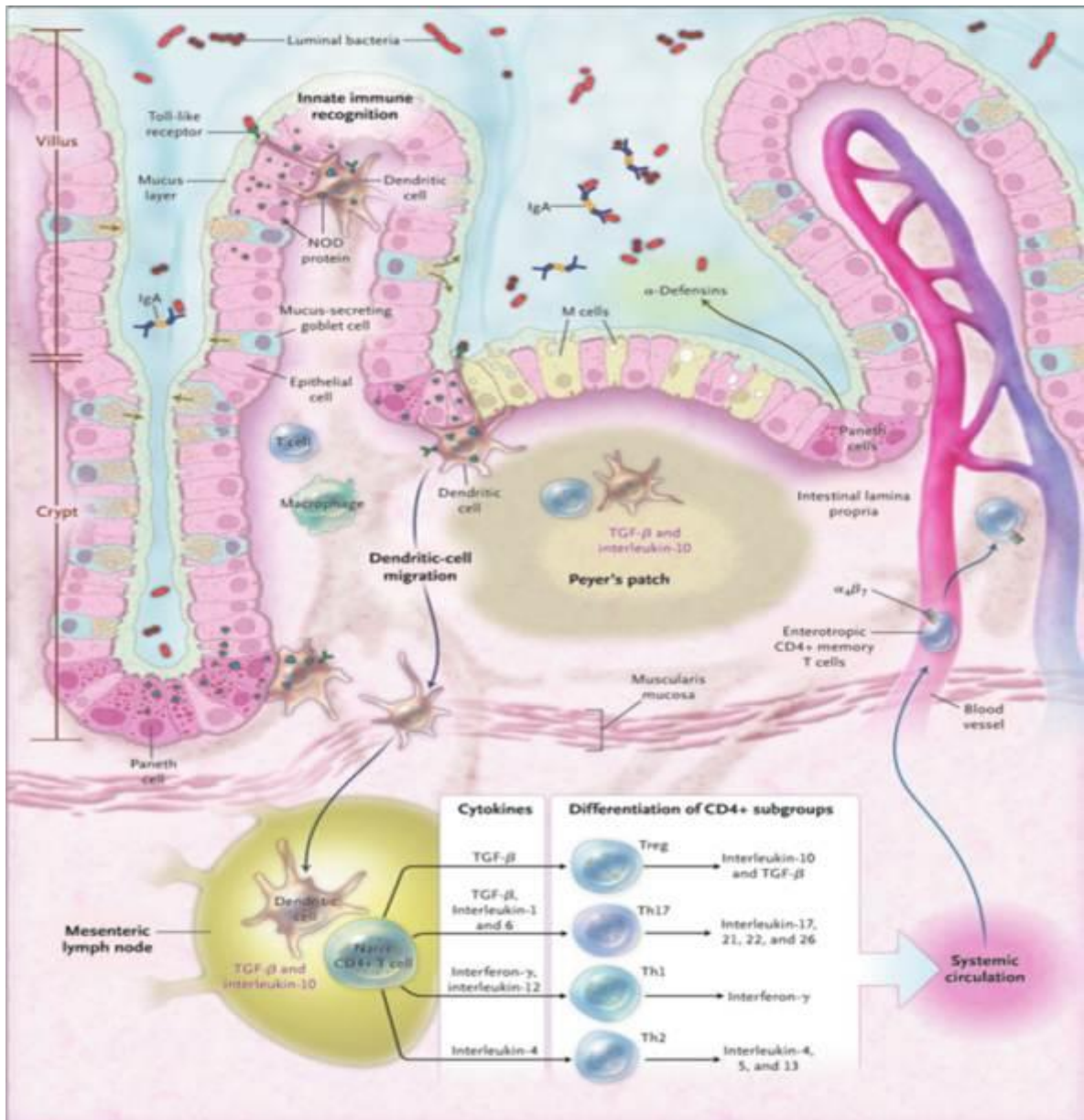


Figura 4. El Sistema Inmunológico Intestinal. Las células caliciformes secretan una capa de moco que limita la exposición de las CEIs a las bacterias. La secreción de PAMs por células Paneth y la producción de IgA proporcionan protección adicional contra la microbiota luminal. La captura de antígenos por las células epiteliales, las CDs y los macrófagos está mediada por receptores de reconocimiento de patrones tales como receptores tipo Toll y proteínas de dominio de oligonucleótido (NOD). Las CDs presentan los antígenos a las células T CD4+ naïve en los órganos linfoides secundarios (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos), donde factores como el fenotipo de las células presentadoras de antígeno y las citocinas del medio (TGF-β e IL-10) modulan la diferenciación de subgrupos de células T CD4+ (células T_{reg}, y células T_h [T_h1, T_h2 y T_h17]) y moléculas enterotrópicas (como α4β7) para inducir el retorno de los linfocitos a la circulación sistémica. Estas células T CD4+ activas viajan a la lámina propia intestinal, donde llevan a cabo sus funciones efectoras (tomada de **Abraham y Cho, 2009**).

Diversas citocinas pro-inflamatorias, como el IFN- γ y el TNF- α , alteran la función de la UE e inducen la apoptosis de las CEIs (**Madara y Stafford, 1989; Nava et al., 2010; Su et al., 2013**). Esto conduce a la pérdida de la función de barrera y agrava las erosiones y las úlceras epiteliales que aparecen en las EIIs. Por el contrario, otras citocinas, como la IL-22, favorecen la curación de la mucosa al inducir la supervivencia de las CEIs y la reparación de la barrera epitelial (**Pickert et al., 2009**). El equilibrio entre estos tipos de citocinas es crítico para reparar las ulceraciones presentes en la mucosa de los pacientes con colitis y para prevenir la proliferación descontrolada de las CEIs que puede conducir a CAC. El papel de las citocinas en el desarrollo de las EIIs es complejo (**Figura 5**) y se hizo más evidente cuando se descubrió que los ratones deficientes en, IL-2 o IL-10, desarrollan colitis espontánea (**Strober et al., 2002**). Además, la neutralización de citocinas pro-inflamatorias o la administración de citocinas anti-inflamatorias recombinantes coadyuvan en la prevención o el tratamiento de las EIIs (**Neurath et al., 1995; Powrie et al., 1994; Strober et al., 2002**). Por otro lado, a través de estudios genéticos, se identificaron diversos “locus” de susceptibilidad a las EIIs que contienen genes que codifican para proteínas involucradas en la señalización de receptores de citocinas y quimiocinas, y en las respuestas de los linfocitos T_h. Tal es el caso de las proteínas traductoras de señales y activadoras de la transcripción STAT1, STAT3 y STAT4, el receptor de quimiocinas CC 6 (CCR6), el ligando de quimiocinas CC 2 (CCL2), CCL13, el receptor de IL-12 (IL-12R), IL-23R, y la cinasa Janus 2 (JAK2). Otras investigaciones han identificado un “locus” de riesgo de EII que contiene genes que codifican para citocinas como la IL-2; la IL-21, el IFN- γ , la IL-10 y la IL-27, hecho que confirma una vez más la importancia de las citocinas en el control de la inflamación de la mucosa en las EIIs (**Jostins et al., 2012**).

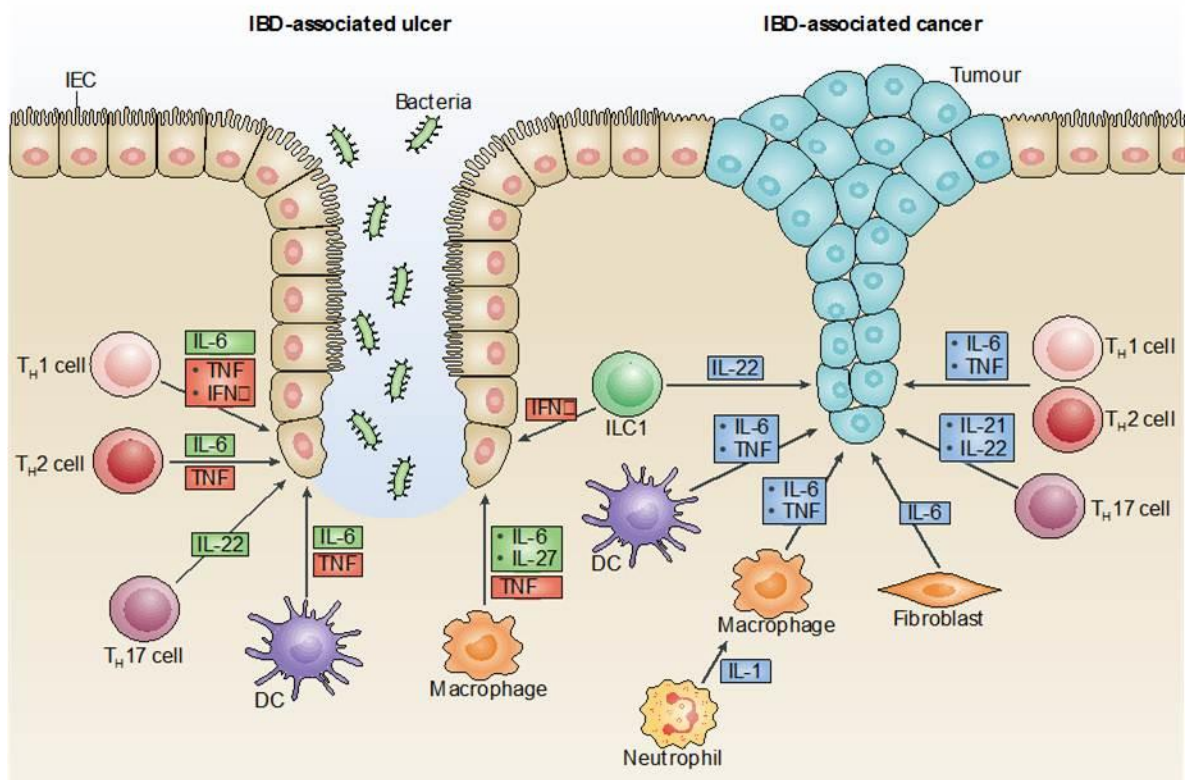


Figura 5. Importancia de las citocinas y las CEIs en las EII y el CAC. Las CEIs están expuestas a numerosas citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias durante la inflamación intestinal crónica en las EII. Estas citocinas son producidas por células en el microambiente local y por las CEIs en sí mismas. Las respuestas de citocinas locales tienen efectos importantes en la curación de la mucosa y el desarrollo de cáncer en los pacientes con EII. Se muestran las fuentes celulares de las citocinas clave y sus cascadas de señalización que regulan la supervivencia, la muerte celular y la proliferación de las CEIs. En el contexto de la curación de la mucosa en las úlceras (izquierda), los recuadros en verde indican los efectos benéficos de las citocinas, mientras que los recuadros en rojo resaltan los efectos patogénicos de las citocinas. En el CAC (derecha), los recuadros azules indican los efectos pro-tumorales de las citocinas. DC, célula dendrítica; IFN, interferón; IL, interleucina; ILC, célula linfocitoide innata; TNF, factor de necrosis tumoral (tomada de **Neurath, 2014**).

I.6 Cáncer colorrectal asociado a colitis.

Los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial desde hace varias décadas, representando uno de los mayores

retos para las economías y la salud pública (**Organización Mundial de la Salud, 2017; González-Gonzalez y Ángeles-Constantino, 2009**). México no ha sido la excepción, desde la década de 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte (**Kuri-Morales, 2011**), siendo en 1960 y 1970 el sexto motivo de mortalidad, y para 1990 ocupó la segunda posición hasta 2004 (**Figura 7**) (**Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015**).

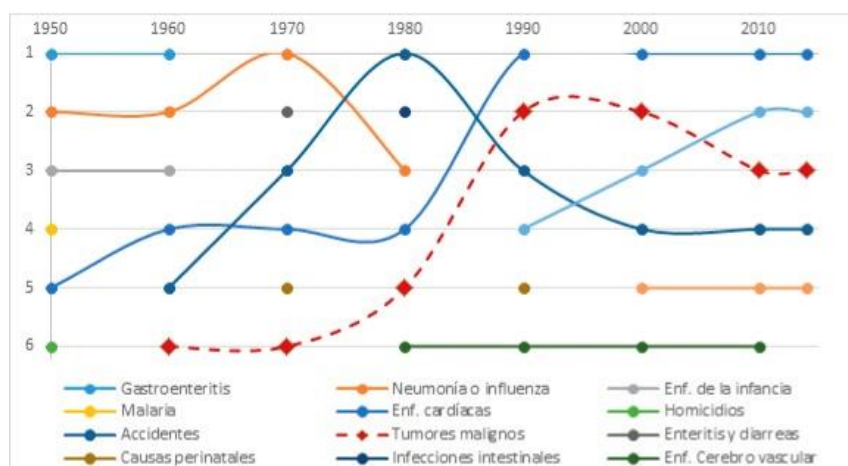


Figura 6. Principales causas de mortalidad 1950-2014. Fuente: Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), 2015.

Actualmente en México, seis mil quinientas personas mueren anualmente debido al CCR (Cáncer colorrectal), siendo esta enfermedad la cuarta causa de muerte entre la población adulta. Esta patología aumenta exponencialmente en México y el mundo debido a la adopción de malos hábitos dietéticos y costumbres perjudiciales. Cada año se diagnostican cerca de 15 mil casos nuevos, y se estima que esto incrementa cerca del 10% en los próximos años. En la última década el CCR ha avanzado hasta colocarse como el tercero más frecuente en este país (**Instituto Nacional de Salud Pública, 2015; Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018**).

El CCR puede afectar a cualquier tipo de persona; sin embargo, existen factores de riesgo que se deben tomar en cuenta como sobrepeso u obesidad, inactividad física, dieta

rica en carne roja y procesada, tabaquismo, alcoholismo, enfermedades específicas como la CU y la EC, antecedentes familiares como pólipos o cáncer, factores étnicos, diabetes Tipo 2 y la edad, ya que es mucho más común después de los 50 años (**Instituto Mexicano del Seguro Social, 2015; Instituto Nacional de Salud Pública, 2015**). El diagnóstico y tratamiento oportuno del CCR permite la curación en nueve de cada diez casos, con una tasa de supervivencia del 92 al 95% en los pacientes. Entre los síntomas más frecuentes se encuentran: anormalidades en las evacuaciones (presencia de sangre o moco), cólicos o dolor abdominal, debilidad y cansancio, sensación de necesidad de evacuar que persiste después de hacerlo y pérdida de peso inexplicable. Dado que esta enfermedad en un inicio es silenciosa y los síntomas aparecen generalmente en etapas avanzadas, se recomienda realizar pruebas de diagnóstico oportuno a partir de los 45 años en pacientes sin síntomas ni antecedentes familiares o personales de CCR (**Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013; Instituto Nacional de Salud Pública, 2015; Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2014**).

Los pacientes con inflamación crónica en el intestino debida a CU o EC tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR (**Bernstein et al., 2001; Canavan et al., 2006; Eaden et al., 2001; Ekblom et al., 1990; Freeman et al., 2008; Gyde et al., 1980; Weedon et al., 1973**). Se ha encontrado que la severidad y la duración de la inflamación crónica del intestino, así como el número de brotes y la proporción del intestino afectado, son algunos de los factores de riesgo que sugieren que una inflamación descontrolada puede conducir a la tumorigénesis en pacientes con EII (**Farmer y Brown, 1966; Gupta et al., 2007; Kvist et al., 1989; Macdougall 1964; Rutter et al., 2004**). Aunque, otros factores adicionales también pueden contribuir. Por ejemplo, la colangitis esclerosante primaria (CEP), una enfermedad inflamatoria crónica de los conductos biliares, es un factor de riesgo para el desarrollo de CCR en pacientes con EII (**Brentnall et al., 1996**). La complicación de la CU con la CEP aumenta cinco veces el riesgo de desarrollar displasia colónica, el precursor de CCR (**Brentnall et al., 1996**). El desarrollo de cáncer en pacientes con EII también está influenciado por factores genéticos; de hecho, se ha demostrado que el riesgo de desarrollar CAC se duplica en pacientes con antecedentes familiares de CCR (**Askling et al., 2001; Nuako et al., 1998**).

Un mecanismo por el cual la inflamación puede contribuir al desarrollo de CCR es la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que causan un daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos (**Kawanishi et al., 2006**). Esto ha sido observado en diversos estudios, por ejemplo, en el modelo murino de colitis inducida con DSS, la deficiencia del gen que codifica para la alquiladenina glicosilasa, una enzima que repara el ADN dañado por un proceso oxidativo, incrementó la probabilidad de desarrollo de cáncer colorrectal (CCR) (**Meira et al., 2008**). Además, se ha demostrado que al eliminar el gen que codifica para la oxoguanina-8 glicosilasa (OGG1), una enzima de reparación del ADN con daño oxidativo, también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar CCR en un modelo de colitis experimental (**Liao et al., 2008**). Estos hallazgos sugieren que la inflamación crónica del colon provoca el daño oxidativo al ADN, que, al involucrar genes clave en la regulación del crecimiento, puede resultar en neoplasia y desarrollo de cáncer (**Figura 6**).

Existen una serie de mecanismos celulares que previenen el daño al ADN, por ejemplo, la reparación del ADN por parte de las enzimas y los puntos de control, “checkpoints”, en el ciclo celular. Por lo tanto, se podría suponer que el desarrollo de cáncer es algo inusual en la vida de un individuo, desafortunadamente, ese no es el caso de los pacientes con EII. La inestabilidad genética es una característica que permite a las células pre-neoplásicas evadir a la maquinaria anti-carcinogénesis y adquirir las seis características distintivas de las células neoplásicas: proliferación celular auto-suficiente, resistencia a las señales que inhiben el crecimiento, evasión de la apoptosis, resistencia a la senescencia, angiogénesis sostenida e, invasión tisular y metástasis (**Hanahan y Weinberg, 2000**).

Se ha observado inestabilidad genética en CCR. Los principales tipos de inestabilidad genética detectados en CCR (esporádico y asociado a colitis) son: la inestabilidad del ADN microsatélite, un defecto en los genes que codifican para las enzimas que reparan errores en el ADN durante la replicación celular, y la inestabilidad cromosómica, que se caracteriza por un número anormal de cromosomas, contenido anormal de ADN o alteraciones cromosómicas, como deleciones, traslocaciones y amplificaciones (también conocidas como aneuploidía). Los estudios que han caracterizado

las anomalías en el cáncer colorrectal asociado a colitis (CCRAC) encontraron que aproximadamente el 85% de los tumores exhiben inestabilidad cromosómica y solo aproximadamente el 15% muestran inestabilidad en microsatélites, siendo muy pocos aquellos que presentan ambos tipos de inestabilidad genética (Rabinovitch *et al.*, 1999; van Dieren *et al.*, 2006; Willenbacher *et al.*, 1996).

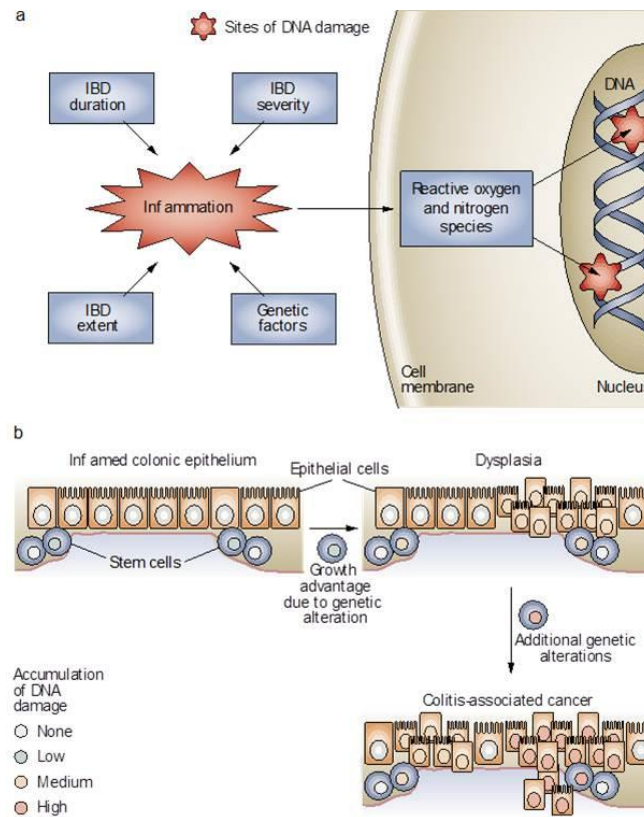


Figura 7. Modelo de la función de la inflamación en el desarrollo de CCRAC. (a) Factores de riesgo que contribuyen a una pobre resolución de la inflamación crónica intestinal: factores genéticos (poco caracterizados), duración y severidad de la EII, y proporción del intestino afectado por dicha condición. La inflamación provoca daño oxidativo al ADN, que da como resultado mutaciones, el número de estas se encuentra influenciado por la severidad de la inflamación. (b) Esquema que representa cómo la acumulación de las alteraciones genéticas promueve la displasia y el cáncer (tomada de Feagins *et al.*, 2008).

I.7 Importancia de las citocinas en el cáncer colorrectal asociado a colitis.

Los pacientes con EII tienen un mayor riesgo de desarrollar CCRAC. Los estudios en pacientes con CCRAC y en modelos murinos de CAC han demostrado que los neutrófilos, los fibroblastos, las CDs, los macrófagos y los linfocitos T activados están presentes en el tejido tumoral y parecen controlar el crecimiento del tumor a través de la producción de mediadores solubles, incluidas las citocinas (**Figura 4**) (**Becker et al., 2004; Bollrath et al., 2009; Garrett et al., 2009; Grivennikov et al., 2009; Neufert et al., 2013**). Las citocinas activan la proliferación, la expansión y la supervivencia de las células tumorales mediante la activación de moléculas de señalización intracelular, como STAT3 y NF- κ B (**Bollrath et al., 2009; Garrett et al., 2009; Greten et al., 2004; Grivennikov et al., 2009**).

La importancia funcional de las citocinas ha sido evidenciada en la carcinogénesis experimental. En modelos de colitis inducida experimentalmente y en pacientes con CCRAC se encontró que los neutrófilos producen la citocina pro-inflamatoria IL-1 β (**Wang et al., 2014**). También, se demostró que el bloqueo de la actividad de la IL-1 β reduce la carcinogénesis en ratones al alterar la secreción de IL-6 dependiente de macrófagos (**Wang et al., 2014**). Además, se detectó un nivel aumentado de TNF en modelos experimentales de CAC, y se encontró que el bloqueo de TNF suprime el crecimiento tumoral en el modelo de CAC inducido con azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) (**Popivanova et al., 2008**). Adicionalmente, se encontró que los linfocitos T aumentan la producción de IL-6 a través de la activación del NFATC2 (Nuclear Factor of Activated T Cells 2) en el CAC experimental (**Gerlach et al., 2012**). Utilizando el modelo anterior, se demostró que la IL-6 y el IL-6R soluble activan la proliferación de las células tumorales a través del factor de transcripción STAT3 (**Becker et al., 2004; Bollrath et al., 2009; Grivennikov et al., 2009**). Estudios recientes demostraron que la inhibición de la transducción de señales de IL-6 a través de anticuerpos específicos contra el IL-6R o las proteínas de fusión gp130-Fc inhiben el crecimiento de tumores. De manera similar, se ha encontrado que los anticuerpos específicos contra la IL-21 y la neutralización de la función de la IL-22

suprimen la tumorigénesis, destacando así el potencial clínico que tienen las estrategias de anti-citocinas para el tratamiento de las neoplasias asociadas a la colitis (**Huber *et al.*, 2012; Kirchberger *et al.*, 2013; Stolfi *et al.*, 2011**). Actualmente los agentes anti-citocinas no se consideran una terapia de referencia para los pacientes con CCRAC, y es necesario un mayor número de estudios clínicos para dilucidar el potencial que tiene el uso de los bloqueadores de citocinas en éstos pacientes.

I.8 El IFN- γ promueve la activación de STAT1 y la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR.

El IFN- γ (IFN tipo II) es una citocina secretada por los linfocitos CD4⁺ T_h1 que participa en la respuesta inmunológica celular pro-inflamatoria, y por lo tanto, en el establecimiento de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal durante el desarrollo de las EIIs (**Abraham y Cho, 2009; Breese *et al.*, 1993**). Al unirse el IFN- γ a su receptor, se forman homodímeros de dos factores de transcripción miembros de la familia STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), uno de ellos es STAT1. La activación de STAT1 promueve la respuesta pro-inflamatoria y favorece el reclutamiento de células inmunológicas al sitio de la inflamación, esto mejora el procesamiento y la presentación de antígenos por moléculas de clase I y II del MHC (Major Histocompatibility Complex). Además, induce genes que condifican para factores apoptóticos (**González-Navajas *et al.*, 2012; Yoshimura *et al.*, 2012**). El IFN- γ también activa la vía de la proteína PI3K. Esta cascada de señalización controla la activación de las cinasas Akt y mTOR (mammalian target of rapamycin), que a su vez promueven procesos como la sobrevivencia, la proliferación o la apoptosis (**Gómez-Suárez *et al.*, 2016; González-Navajas *et al.*, 2012**).

La cinasa de 3-fosfoinositol (PI3K) fosforila al grupo hidroxilo del anillo de inositol del fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP2), produciendo el fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) en la parte citosólica de la membrana plasmática, donde interactúa con proteínas que

tienen dominio de pleckstrina (PH), formando así microdominios de membrana específicos. En estas estructuras, las proteínas participantes interactúan induciendo la activación de vías de señalización diversas, como aquellas donde participan la cinasa de serinas y treoninas Akt, también conocida como proteína cinasa B (PKB) (**Song *et al.*, 2005**), y el blanco de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) (**Vézina *et al.*, 1975**). TOR está altamente conservado en el proceso evolutivo pues regula el crecimiento celular. La desregulación de TOR en los mamíferos (mTOR) se asocia al desarrollo de diversas enfermedades humanas como diabetes tipo 2, obesidad, cáncer y neurodegeneración (**Dazert y Hall, 2011; Laplante y Sabatini, 2012a; Menon y Manning, 2008**). mTOR forma parte de al menos dos complejos multiproteicos funcional y estructuralmente distintos, denominados mTORC1 y mTORC2, a este último también se le conoce como piruvato deshidrogenasa cinasa -2 (PDK2) (**Laplante y Sabatini, 2012a**). mTORC1 está compuesto por mTOR, raptor, mLST8, tti1, tel2 y sus reguladores PRAS40 y deptor. Participa en el crecimiento celular, pues promueve la síntesis de proteínas y lípidos. mTORC2 a su vez está formado por mTOR, rictor, mSin1, protor 1 / 2, mLST8, tti1, tel2 y su regulador deptor. mTORC2 controla la sobrevivencia y el crecimiento celular mediante la inducción de la lipogénesis, el catabolismo de la glucosa, la reorganización del citoesqueleto de actina y la apoptosis (**Figura 8**) (**Betz y Hall, 2013**).

mTORC1 y mTORC2 poseen diferencias importantes en las señales que integran y los sustratos que regulan (**Laplante y Sabatini, 2012a**) (**Figura 9**). mTORC1 se activa por aminoácidos a través de la acción de las Rag ATPasas (RagA, RagB, RagC y RagD), y promueve la síntesis de proteínas fosforilando a la cinasa S6K y favoreciendo la traducción del regulador 4E-BPI. Además es un inhibidor de la autofagia y la formación de los lisosomas (**Figura 9**). La actividad de mTORC1 se bloquea con la rapamicina. En comparación con mTORC1, el conocimiento que se tiene sobre la biología de mTORC2 es muy limitado. Se activa por factores de crecimiento mediante mecanismos que aún se desconocen. mTORC2 es insensible al tratamiento agudo con rapamicina, y regula la supervivencia celular, el metabolismo y la organización del citoesqueleto mediante la fosforilación de cinasas AGC, incluyendo Akt, SGK1 y PKC α (**Laplante y Sabatini, 2012b**).

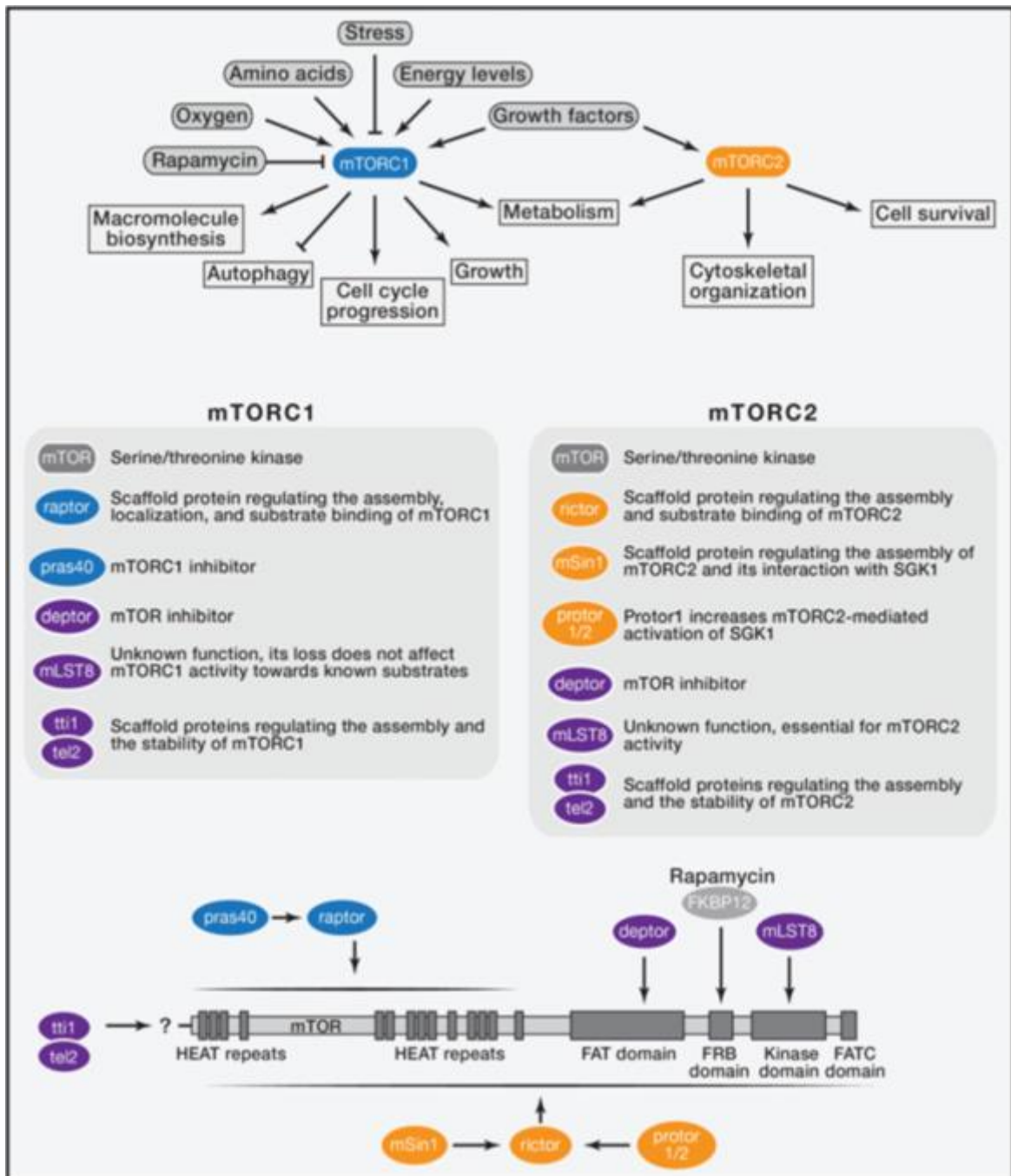


Figura 8. Complejos mTORC1 y mTORC2. La cinasa mTOR forma parte de dos complejos proteicos distintos denominados mTORC1 y mTORC2. mTORC1 se activa en presencia de aminoácidos, estrés, oxígeno, alto nivel de energía y factores de crecimiento y es muy sensible a la rapamicina. Promueve el crecimiento celular al inducir e inhibir los procesos anabólicos y catabólicos, respectivamente, y también favorece la progresión del ciclo celular. mTORC2 se activa con factores de crecimiento y regula la supervivencia, el metabolismo celular y la organización del citoesqueleto. mTORC2 es insensible a la rapamicina, pero una exposición crónica al fármaco puede alterar su estructura. El panel del medio describe

las funciones conocidas de los componentes proteicos que componen los complejos mTOR y el panel inferior representa esquemáticamente sus sitios de interacción (tomada de **Laplanche y Sabatini, 2012a**).

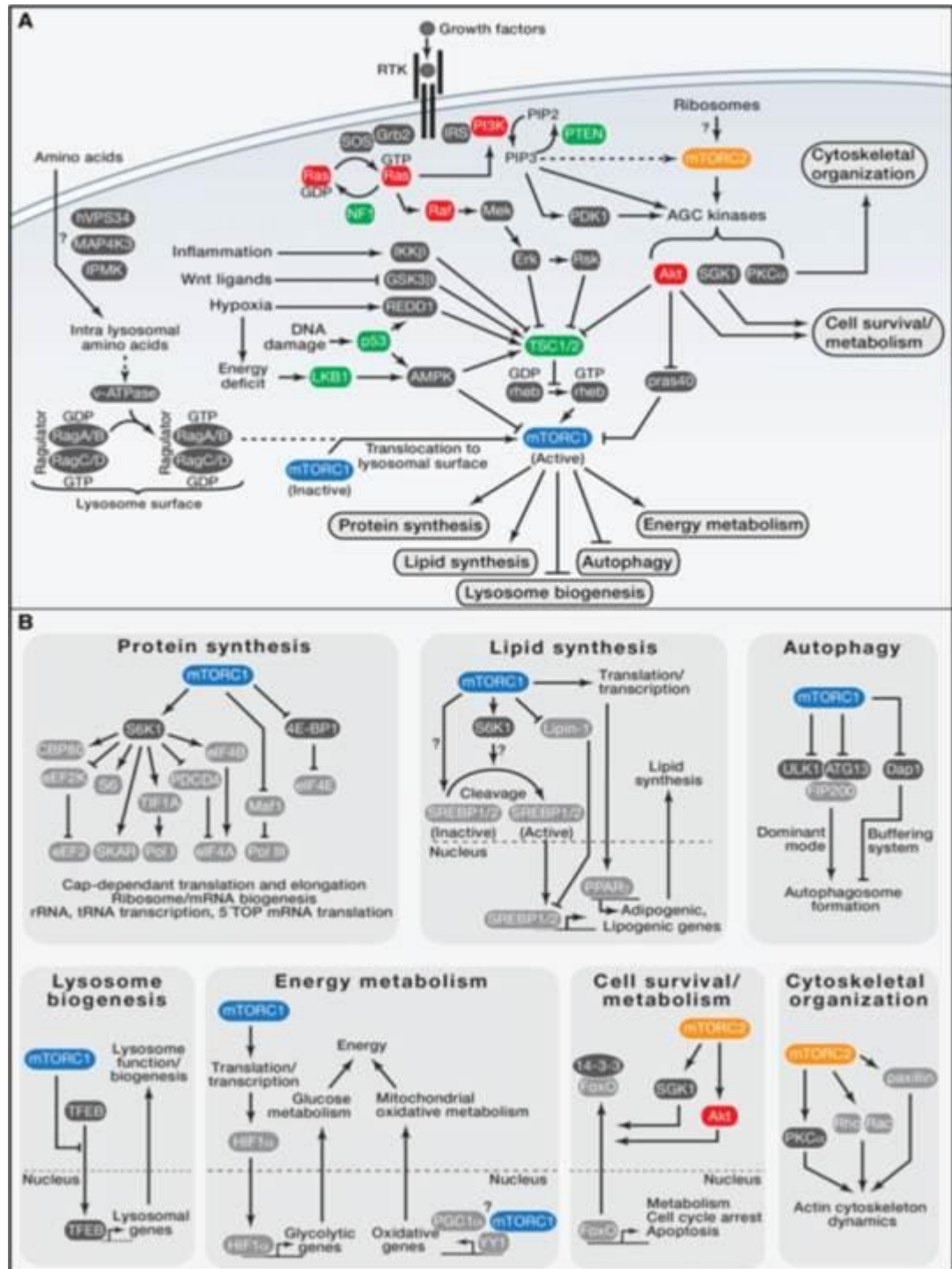


Figura 9. Las vías de señalización de mTOR. (A). La vía de señalización de mTORC1 y mTORC2. Cuando

mTORC1 está activo, promueve la síntesis de proteínas, la lipogénesis y el metabolismo energético e inhibe la autofagia y la biogénesis de los lisosomas. mTORC2 activo regula la organización del citoesqueleto, la supervivencia y el metabolismo celular. En esta figura, las proteínas representadas en rojo son oncogenes, y las que están en verde son supresoras de tumores. **(B)**. Blancos de mTORC1 y mTORC2. mTORC1 regula una gran cantidad de procesos biológicos mediante la fosforilación de varias proteínas. S6K1 y 4E-BP1 son, por mucho, los sustratos mejor caracterizados de mTORC1. mTORC2 regula la supervivencia y el metabolismo celular, así como al citoesqueleto mediante la fosforilación de muchas cinasas AGC incluyendo Akt, SGK1 y PKC- α (tomada de **Laplane y Sabatini, 2012a**).

II. Antecedentes

II.1 Planteamiento del problema

En las EII existe una disfunción de la barrera epitelial y un desequilibrio de los procesos que controlan el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Durante la colitis, numerosas vías de señalización relacionadas con el desarrollo y la progresión del CCR se han asociado con la inhibición de la proliferación celular (**Bollrath *et al.*, 2009; Nava *et al.*, 2014; Nava *et al.*, 2010**). De manera que, es importante identificar y comprender los mecanismos que controlan la proliferación y la muerte de las CEIs del colon en un contexto patológico. La ruptura de la barrera epitelial dependiente del IFN- γ se ha relacionado con una disminución de la proliferación mediada por la inactivación de β -catenina por la vía PI3K / Akt (**Capaldo *et al.*, 2012; Gómez-Suárez *et al.*, 2016; Koch y Nusrat, 2012; Nava *et al.*, 2014; Nava *et al.*, 2010**). Sin embargo, la función que desempeña mTORC1, un efector de Akt, en dicho proceso no ha sido evaluada correctamente. mTORC1 regula el metabolismo anabólico, crecimiento celular, proliferación y supervivencia, aumenta la síntesis de proteínas y lípidos e inhibe la autofagia (**Efeyan y Sabatini *et al.*, 2011; Cornu *et al.*, 2013**). La inactivación de mTORC1 provoca deficiencia de nucleótidos, promueve el estrés replicativo, el daño del ADN y la inestabilidad cromosómica, perturbando la homeostasis y la regeneración intestinal (**Bester *et al.*, 2011; Burrell *et al.*, 2013**). Por lo que, la activación de mTORC1 es indispensable para prevenir ciclos innecesarios de síntesis y degradación de componentes celulares. Además, mTORC1 se ha involucrado en el desarrollo de diversas patologías en el intestino, como la colitis y el CCR (**Brandt *et al.*, 2017; Francipane y Lagasse, 2014; Gulhati *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009**). Es por todo esto que es importante investigar los procesos biológicos en los cuales incide directamente la activación de mTORC1 durante la colitis y su papel en la progresión a CCRAC, los cuales como ya se mencionó han sido poco investigados.

II.2 Hipótesis

La activación de mTORC1 en células epiteliales intestinales protege al epitelio intestinal del daño ocasionado por la inflamación e inhibe el desarrollo de CCR.

II.3 Objetivo General

Estudiar si la activación de mTORC1 en las CEIs protege del daño epitelial causado por la colitis y previene el desarrollo de cáncer.

II.4 Objetivos Particulares

1. Estudiar la activación de mTORC1 en la mucosa de ratones C57BL/6J inducidos a colitis experimental con DSS.
2. Analizar la activación de mTORC1 en CEIs estimuladas con el IFN- γ .
3. Analizar la proliferación celular inducida por la inactivación de mTORC1 durante la inflamación intestinal.
4. Evaluar el daño al epitelio y al DNA ocasionado por la inactivación de mTORC1 por el LiCl durante la colitis.
5. Investigar el efecto de la inhibición de mTORC1 en el desarrollo de CCRAC.

III. Procedimientos Experimentales

III.1 Animales y cultivos celulares

Los ratones macho C57BL/6J (Jackson Laboratories) o Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 (ratones reporteros de β -catenina; Jackson Laboratories) de 6 a 8 semanas de edad (20 - 25 g) se mantuvieron en ciclos de día / noche estándar con acceso libre a alimentos y agua. Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV. Las líneas de macrófagos de ratón J774 y las CEIs humanas SW480 y RKO se obtuvieron de ATCC, se cultivaron de acuerdo con los protocolos proporcionados por el proveedor.

III.2 Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos contra GAPDH sc-322 (Santa Cruz biotechnology®), pSTAT1 Tyr701 # 9167, pS6 # 15967, pAkt Ser473 # 4060, pAkt Ser308 # 4056, Akt1 # 2967 y pGSK3 β # 5558 se obtuvieron de Cell Signaling Technology®. La p-Histona H3 ab32107 y el F4 / 80 ab6640 se obtuvieron de Abcam. Los anticuerpos conjugados Alexa se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific. AffiniPure de cabra y de conejo anti-peroxidasa de rábano (HRP) se obtuvieron de Jackson Immunoresearch y el 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) SC-3598 de Santa Cruz Biotechnology. El IFN- γ recombinante de ratón se adquirió de PeproTech y se disolvió en albúmina de suero de ratón al 0.002% (MSA; Sigma-Aldrich). Se usó a 2.5 μ g / kg de peso del animal. El IFN- γ recombinante de humano se obtuvo de Peprotech y se disolvió en albúmina de suero de bovino al 0.002% (BSA; Sigma-Aldrich). Se usó a 100 U / ml en ensayos *in vitro*. El LiCl (Sigma-Aldrich No. Cat. 203637) se administró a una concentración de 200 mg / kg del animal y 4 μ M *in vitro*. La rapamicina (Calbiochem) se administró a 2 mg / kg del animal y 20 mM *in vitro*. El AZD8055 se empleó a 3.75 mg / kg del animal y 0.8 nM en ensayos *in vitro*. El inhibidor Akt VIII se administró a 10 mg / kg en animales. El XAV939 se utilizó a 15 nM *in vitro*. La

doxorubicina (Pfizer) se usó a 3.45 μM en ensayos *in vitro*. El dextrán sulfato de sodio YD318041799 (Carbosynth, San Diego, CA) se disolvió al 3% en agua para beber.

III.3 Tratamiento con las citocinas e inhibidores *in vitro*

Las células RKO y SW480 se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . Para los ensayos *in vivo* las células se sembraron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. El ensayo se inició hasta que las células alcanzaron confluencia. La estimulación con el IFN- γ recombinante humano (100 U / ml) se realizó 12 horas después del último cambio de medio. Los inhibidores LiCl (4 μM), AZD8055 (0.8 nM) y rapamicina (20 mM) se adicionaron 30 minutos antes de la estimulación con el IFN- γ . La Doxorubicina (3.45 μM) se administró 30 minutos antes del tratamiento con el IFN- γ . Las células J774 se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . La estimulación con la mezcla de IFN- γ recombinante de ratón (250 μg / ml) / LPS (25 ng / μl) se realizó 12 horas después del último cambio de medio. Los inhibidores LiCl, AZD8055, rapamicina y XAV939 se añadieron 30 minutos antes del tratamiento con la mezcla IFN- γ / LPS. Al terminar los tratamientos, el medio se retiró y la monocapa se lavó con PBS s/ Ca^{2+} tres veces. A cada caja se le adicionó amortiguador de lisis RIPA y se conservó a -80°C para una posterior extracción de proteínas y ensayos de Western blot.

III.4 Tratamiento con las citocinas *in vivo*

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos. El IFN- γ (2.5 μg / kg) se disolvió en PBS / MSA (0.002%) y se administró por vía intraperitoneal (IP); los ratones control se inyectaron solamente con el vehículo. Dos horas después de la administración de la citocina, los ratones se sacrificaron y el colon se lisó y procesó para la inmunofluorescencia y el Western blot. Los segmentos de colon medio se guardaron a -80°C en amortiguador de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma) para la posterior extracción de las proteínas y los ensayos de Western blot. Los segmentos de colon distal se embebieron en Tissuetek y se depositaron en criomoldes. Se conservaron a -80°C para los ensayos futuros de localización de proteínas por inmunofluorescencia.

III.5 Modelo de colitis inducida por DSS y administración *in vivo* de inhibidores

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos. El DSS se disolvió al 3% en agua para beber. El LiCl (200 mg / kg) se disolvió en PBS, el Akt VIII (10 mg / kg), la rapamicina (2 mg / kg) y el AZD8055 (3.75 mg / kg) se disolvieron en DMSO. Los inhibidores se inyectaron vía IP diariamente los últimos 3 días de tratamiento con DSS. El grupo control recibió únicamente el vehículo. El modelo de colitis inducida por DSS se describió anteriormente (**Cooper *et al.*, 1993**). Después del tratamiento, los ratones se sacrificaron y el colon se procesó para la inmunofluorescencia y el análisis por Western blot. Los segmentos de colon medio se guardaron a -80°C en amortiguador de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma) para la posterior extracción de las proteínas y los ensayos de Western blot. Los segmentos de colon distal se embebieron en Tissuetek y se depositaron en criomoldes. Se conservaron a -80°C para los ensayos futuros de localización de proteínas por inmunofluorescencia.

III.6 Evaluación de la proliferación y ensayo de TOP-Flash

La proliferación se evaluó *in vivo* mediante la inyección IP de 100 μg de 5-etinil-2-desoxiuridina (EdU, Invitrogen). La incorporación de EdU se determinó con un Kit de Proliferación de Células Click-iT EdU (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La expresión del reportero de β -catenina TCF / LEF se realizó *in vitro* y su actividad se midió utilizando el Dual Luciferase Reporter system (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

III.7 Extracción de proteínas y Western blot.

Las muestras se colectaron en amortiguador de lisis RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, ácido desoxicólico al 0.5%, SDS al 0.1%, Tris 50 mM, pH 8.0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma), se sonicaron (Sonic Vibra Cell, amplitud de 40%) y se separaron por centrifugación (Eppendorff 5415R, 10 minutos a 12,000 rpm,

4°C). La concentración de proteína se determinó mediante BCA (Pierce). Las muestras se hirvieron en amortiguador de muestra SDS con ditiotreitól 50 mM (Sigma). Se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h con 2% peso / volumen de leche en polvo o BSA (Sigma) en amortiguador Tris (Sigma) que contiene Tween-20 al 0.1% (Sigma) (TBS-T) y se incubaron con anticuerpos primarios en amortiguador de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces por 15 minutos en TBS-T y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa disueltos en amortiguador de bloqueo. Al terminar la incubación, las membranas recibieron nuevamente 3 lavados de 15 minutos con TBS-T. Los complejos de anticuerpos se detectaron mediante una reacción de quimioluminiscencia usando placas fotográficas (Kodak).

III.8 Inmunofluorescencia.

Las secciones de tejido se fijaron con PFA al 4% (15 min; Sigma) y luego se permeabilizaron con metanol al 100% (20 min, - 20 ° C; Sigma). Las muestras se bloquearon con 2% peso / volumen de BSA (Sigma) durante 1 hora y se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. Después de la incubación con anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo durante 1 hora, los núcleos se tiñeron con yoduro de ToPro-3 (Molecular Probes) y los cubreobjetos se montaron en p-fenileno. Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal LSM 710 (Zeiss) con aceite Plan-NEOFLUAR 1003 / 1.3, 403 / 1.3 y 203 / 0.5 en seco, con software suministrado por el vendedor.

III.9 Fraccionamiento celular

Los extractos citosólicos y nucleares se obtuvieron con el kit de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER (Thermo Scientific), según el protocolo del fabricante.

III.10 Tinción de Hematoxilina-Eosina

Para realizar la tinción de Hematoxilina-Eosina se utilizó el colon completo, antes de iniciar la tinción el colon se abrió longitudinalmente y se enrolló con la mucosa hacia arriba formando una dona, se depositó en moldes y se fijó con paraformaldehído al 4% durante 5 días, posteriormente se embebió en parafina y se cortó utilizando un microtomo. Los cortes se desparafinaron e hidrataron. Los antígenos se expusieron mediante calentamiento en baño María con un amortiguador de ácido cítrico 0.01 M, pH 6, y el tejido se tiñó con hematoxilina y eosina de manera convencional.

III.11 Aislamiento de criptas

Se identificó el colon proximal y se eliminó un segmento de 1-2 cm. El colon proximal se abrió y posteriormente se lavó en PBS frío. El segmento de colon se incubó en una solución quelante de Ca^{2+} durante 30 minutos a temperatura ambiente (NaCl 966 mM, KCl 1.5 mM, HEPES 10 mM, Tris 10 mM, Na EDTA o Na EGTA 27 mM, sorbitol 45 mM, 28 mM sacarosa y BSA al 0.1%). Después de la quelación, el tejido se agitó manualmente para liberar las criptas. El tejido se retiró y la solución se centrifugó a 200 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lisó el sedimento en un amortiguador de radioinmunoprecipitación para ensayos de Western blot (**Bjerknes y Cheng; 1981**).

III. 12 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en Prism 6.0 (GraphPad Software). Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía, T de dos colas, Dunnett y Bonferroni, $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

IV. Análisis e interpretación de resultados

IV.1 mTORC1 se activa en las CEIs durante la colitis.

El IFN- γ y el TNF- α inducen la destrucción de la barrera epitelial durante la colitis al sobreactivar la vía de señalización de PI3K / Akt (El-Salhy *et al.*, 1997; Koch y Nusrat, 2012). Para investigar el mecanismo de destrucción de la barrera epitelial, se utilizó un modelo de colitis experimental inducida con DSS al 3% (ver **Apéndice A**) disuelto en agua potable en ratones C57BL/6J. El detergente provocó el aumento de pSTAT1 y la disminución del marcador de proliferación celular PCNA (**Figura 10A**) y de la captación del nucleótido EdU al DNA (**Figura 10B**), lo que demostró el desarrollo de un proceso inflamatorio y la reducción de la proliferación celular. La fosforilación de STAT1 en el intestino de los ratones tratados inició al tercer día de tratamiento, a diferencia de la activación de Akt (pAkt₃₀₈ y pAkt₄₇₃), que se observó desde el primer día. La activación de Akt correlacionó con la fosforilación de sus blancos: de la serina 9 de GSK3 β (pGSK3 β) y la de la serina 552 de β -catenina (p β -cat₅₅₂).

La activación de mTORC1 puede estudiarse monitoreando la fosforilación de uno de sus blancos, la proteína S6 (Liu *et al.*, 2009). S6 fosforilada (pS6) incrementó desde el primer día de tratamiento con DSS y se mantuvo así a lo largo del experimento. La cantidad de Akt y su activación (pAkt) aumentaron desde el segundo día de tratamiento (**Figura 10A y C**). Previamente se demostró que Akt se activa en las CEIs durante la colitis (Nava *et al.*, 2014). En seguida investigamos si el desarrollo de la colitis incluye la activación de mTORC1. Para alcanzar este objetivo, se compararon los niveles de pS6 en lisados celulares obtenidos a partir de las criptas colónicas aisladas de ratones control o con colitis. En la **figura 10D** se demuestra que pS6 aumentó significativamente en el colon de los ratones tratados con DSS respecto al de los animales control y si bien se ha reportado que lo hace a lo largo de todo el eje de la cripta (Guan *et al.*, 2015; Hernández-Trejo *et al.*,

2016), nosotros encontramos que pS6 también se fosforiló en las células de la base de la cripta (**Figura 10E**). Con estos resultados se demuestra que durante la colitis mTORC1 se activa en las CEIs del colon.

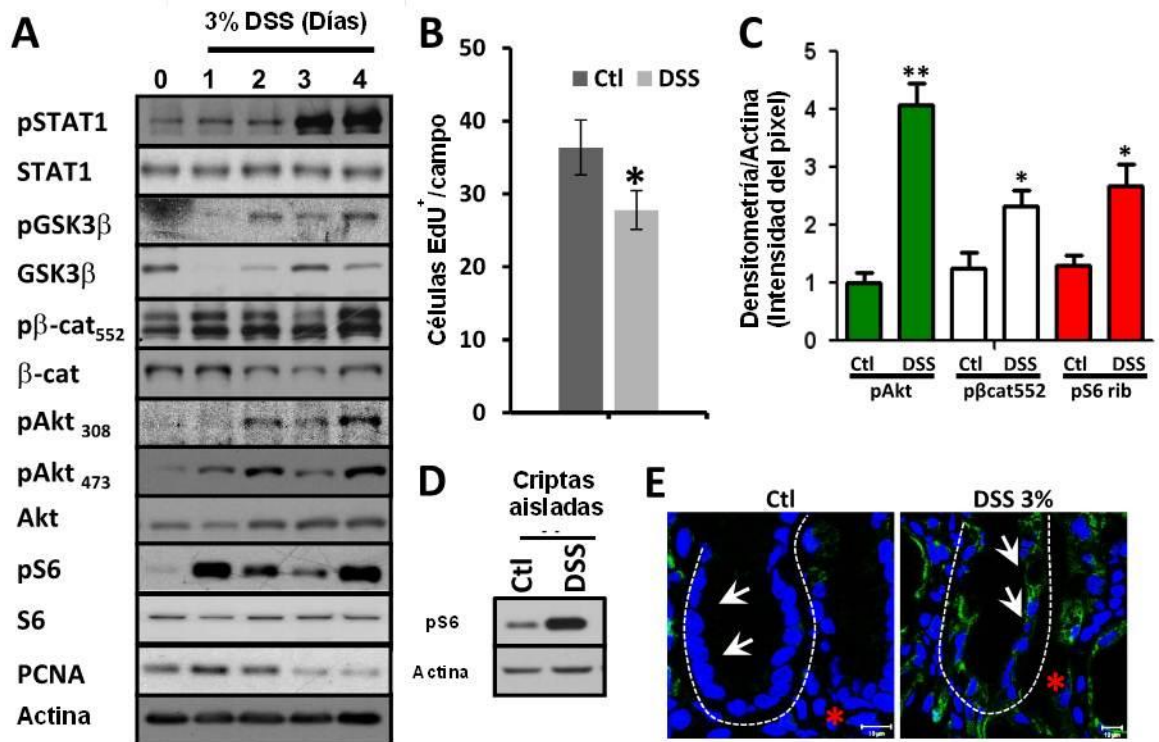


Figura 10. mTORC1 se activa en las CEIs durante la colitis. (A) Western blot de pSTAT1, STAT1, pGSK3 β , GSK3 β , p β -catenina552, β -catenina, pS6, S6, pAkt308, pAkt473, Akt y PCNA de tejido de colon homogeneizado y obtenido de ratones C57BL/6J tratados DSS. La inducción de la colitis se logró mediante la administración oral de DSS al 3% disuelto en agua potable. Los animales se sacrificaron de 1-6 días después de comenzar la administración. GAPDH se usó como control de carga. n = 10. (B) Se evaluó la incorporación de EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) en ratones con colitis. Los animales de 4 días de tratamiento con DSS recibieron una única inyección IP de EdU, el sacrificio se realizó 2 horas después. La cuantificación de la incorporación de EdU se llevó a cabo como se describió en los procedimientos experimentales. Los gráficos de barras representan el número de las células EdU positivas por campo. Los datos se expresan como media \pm SEM. n = 6. *P < 0.05. (C) Se realizó un análisis densitométrico de pAkt473, p β -catenina552 y pS6 en la mucosa de ratones con colitis. Los datos se expresan como media \pm SEM. n = 3. *P < 0.05, **P < 0.01. (D) Western blot de pS6 en criptas aisladas homogeneizadas obtenidas de ratones con colitis. Los ratones C57BL/6J se trataron con DSS al 3% disuelto en agua potable durante 4 días. GAPDH se usó como control de carga. n = 3. (E) Localización de pS6 (verde) en la mucosa del colon de ratones C57BL/6J tratados con DSS

durante 4 días. La línea discontinua marca el borde de la cripta. La flecha blanca marca la CEI positiva para pS6 y el asterisco rojo designa las células no epiteliales pS6-positivas. Núcleos = Azul. Barra = 10 μ m. n = 10.

IV.2 El IFN- γ induce la activación de mTORC1 en las CEIs del colon.

El IFN- γ induce la activación de la vía de señalización PI3K / Akt en la mucosa del colon de ratones C57BL/6J (Gómez-Suárez *et al.*, 2016; Hernández-Trejo *et al.*, 2016; Nava *et al.*, 2014). Por lo tanto, investigamos si la activación de mTORC1 en las CEIs era mediada por el IFN- γ . Para ello, cultivos celulares de las líneas epiteliales de colon, SW480 y RKO, se trataron con el IFN- γ durante 24 horas. En la **figura 11A**, se muestra que el tratamiento provocó el aumento de la fosforilación de Akt en la treonina 308 y la serina 473, así como el incremento de la fosforilación en la serina 235 / 236 de S6 en el lisado de ambas líneas celulares. No se observaron cambios en el nivel total de las proteínas Akt o S6. Posteriormente se evaluó la activación de mTORC1 en la mucosa de ratones C57BL/6J administrados vía IP con IFN- γ (2.5 μ g / kg). En la **figura 11B** se muestra que el IFN- γ activó a mTORC1 en casi todas las CEIs. En conjunto, estos resultados indican que el IFN- γ induce la activación de mTORC1 en las CEIs.

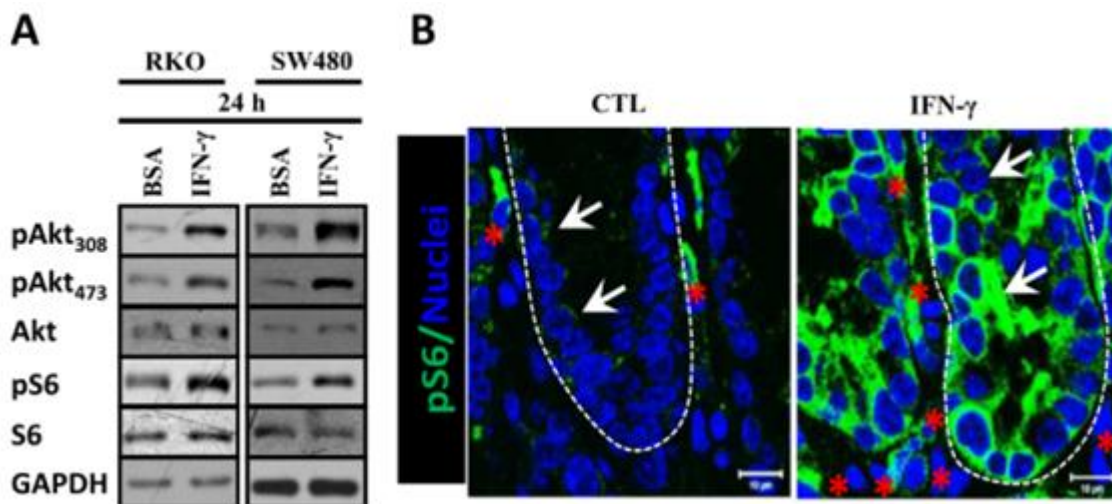


Figura 11. El IFN- γ induce la activación de mTORC1 en las CEIs. (A) Las proteínas pAkt 308, pAkt473, Akt, pS6 y S6 se analizaron en lisados de células RKO y SW480 tratadas con el IFN- γ . El tratamiento con el IFN- γ (100 U / ml) se llevó a cabo durante 24 horas. GAPDH se usó como control de carga. n = 10. (B) Localización de pS6 (verde) en la mucosa del colon de ratones C57BL/6J. La inyección IP de MSA (CTL) o IFN- γ se llevó a cabo 2 horas antes de que los animales fueran sacrificados. La línea discontinua marca el

borde de la cripta. Flecha blanca = CEI positiva para pS6. Asterisco rojo = célula no epitelial positiva a pS6.
Núcleos = Azul. Bar = 10 μ m. n = 6.

IV.3 mTORC1 disminuye la proliferación celular en la mucosa intestinal durante la inflamación.

El IFN- γ activa la vía de la PI3K, activando a las cinasas Akt y mTOR, que a su vez controlan procesos como la sobrevivencia, la proliferación o la apoptosis (**Gómez-Suárez et al., 2016; González-Navajas et al., 2012; Hernández-Trejo et al., 2016; Nava et al., 2014**). Por lo tanto, investigamos el papel de mTORC1 en la regulación de la proliferación durante la inflamación. Primero, se analizó este proceso en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular epitelial de colon, SW480 estimulada hasta por 24 horas con el IFN- γ . En la **figura 12A** se observa que el tratamiento con esta citocina inhibió la proliferación de las CEIs como lo mostró la reducción de los marcadores de proliferación pHis3 y PCNA, con respecto a lo que se observó en las monocapas control.

A continuación, se inhibió a mTORC1 empleando LiCl, AZD8055 o Rapamicina (**Chresta et al., 2010; Efeyan y Sabatini, 2011; Sini et al., 2010**) en las CEIs SW480 estimuladas con el IFN- γ . El LiCl se caracteriza por tener un espectro de acción amplio (ver **Apéndice B**) que resulta en la inhibición de Akt en las células estimuladas con citocinas (**Chung et al., 2014**), sin embargo, el AZD8055 inhibe a mTOR y la rapamicina específicamente a mTORC1 (**Chresta et al., 2010; Efeyan y Sabatini, 2011; Sini et al., 2010**). La estimulación con el IFN- γ en las células SW480 aumentó el nivel de pGSK3 β , pS6 y pAkt, haciendo evidente la activación de la vía de señalización PI3K / Akt / mTORC1 en las CEIs (**Figura 12B**). El tratamiento con LiCl incrementó el nivel de pGSK3 β pero disminuyó el de pS6 y pAkt. El AZD8055 redujo el nivel de pGSK3 β , pS6 y pAkt, mientras que la rapamicina únicamente inhibió la fosforilación de S6 sin prevenir la activación de Akt o la inhibición de GSK3 β (pGSK3 β) (**Figura 12B**). De esta forma, podemos sugerir que el IFN- γ activa a mTORC1 en las CEIs a través de la vía PI3K / Akt.

Por lo tanto, se investigó el efecto que tiene la inhibición de mTORC1 en la regulación de la proliferación de las CEIs de la mucosa de ratones tratados con DSS. Los ratones C57BL/6J con colitis recibieron una inyección de LiCl vía IP a partir del tercer día,

lo que agota el inositol libre e induce la autofagia dependiente e independiente de mTORC1 (Sarkar *et al.*, 2005). Dado el papel tan importante de mTORC1 en la regulación de la autofagia, cabe la posibilidad que durante la inflamación se estuviera induciendo este proceso (ver **Apéndice C**). Primero, se analizó la activación de la vía PI3K / Akt / mTORC1. Como se demostró anteriormente, la inflamación intestinal aumentó la fosforilación de Akt, S6 y GSK3 β . El LiCl previno la activación de Akt y S6, pero promovió la fosforilación de GSK3 β (**Figura 12C**), demostrando la eficacia del tratamiento (Yang *et al.*, 2011).

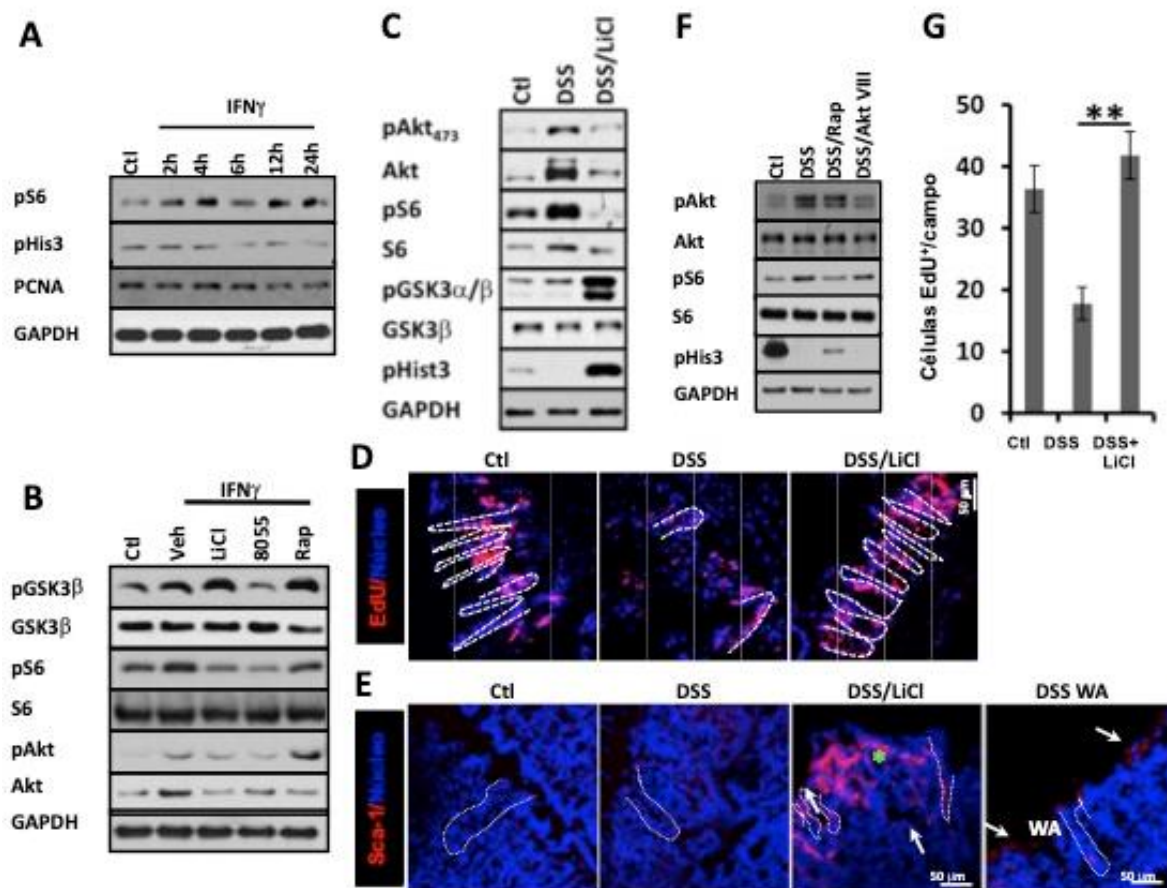


Figura 12. mTORC1 disminuye la proliferación de las CEIs en la mucosa durante la colitis. (A) Se evaluaron a las proteínas pS6, pHist3 y PCNA en células SW480 tratadas con el IFN- γ . La estimulación con la citocina se llevó a cabo durante un período de 0-24 h. GAPDH se utilizó como control de carga. n = 3. (B) Las proteínas pAkt, Akt, pS6, S6, pGSK3 β y GSK3 β se evaluaron en lisados celulares de células SW480 expuestas al IFN- γ . Se adicionó LiCl, AZD8055 y rapamicina 30 minutos antes de la estimulación con la citocina. GAPDH se utilizó como control de carga. n = 3. (C) Se evaluaron a las proteínas pAkt473, Akt, pS6, S6, pGSK3 β , GSK3 β y pHist3 del tejido homogeneizado de colon obtenido de animales control y de tratados

con DSS y DSS / LiCl. El tratamiento se llevó a cabo durante 5 días. Los animales tratados con DSS recibieron una inyección IP diaria de LiCl (200 mg / kg; **Hofmann et al., 2010**) a partir del tercer día. GAPDH se usó como control de carga. n = 5. **(D)** Incorporación de EdU (rojo) en la mucosa de ratones con colitis y ratones con colitis tratados con LiCl. Los animales tratados con DSS recibieron una inyección IP diaria de LiCl. El tratamiento se llevó a cabo durante 4 días. Núcleos = Azul. n = 3. Bar = 50 μ m. **(E)** Localización de Sca-1 (rojo) en la mucosa del colon de ratones C57BL/6J tratados con DSS o DSS / LiCl. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días y los animales recibieron una inyección diaria vía IP de LiCl durante los últimos 3 días. Flecha blanca = CEIs positivas para Sca-1. Asterisco verde = Células no epiteliales positivas para Sca-1. WA = área herida. Núcleos = Azul. Barra = 50 μ m. n = 3. **(F)** La presencia de las proteínas pAkt, Akt, pS6, S6 y pHist3 se evaluó en homogeneizados de colon obtenidos a partir de ratones de la cepa C57BL/6J inducidos a colitis. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días. La rapamicina (2 mg / kg) y el inhibidor Akt VIII (10 mg / kg) se administraron por vía IP durante los últimos 3 días antes de que los animales fueran sacrificados. GAPDH se utilizó como control de carga. n = 3. **(G)** Cuantificación de la incorporación de EdU en animales tratados con DSS y DSS / LiCl. La gráfica de barras representa el número de células EdU positivas por campo. Los datos se expresan como media \pm SEM. n = 3. **P < 0.01.

La Triciribina es un nucleósido tricíclico que inhibe la activación de Akt porque se une a su dominio de PH, bloqueando su reclutamiento a la membrana plasmática donde es activada por mTORC2 (pAkt₄₇₃) y PDK1 (pAkt₃₀₈) (**Karst et al., 2006; Yang et al., 2004**). La inhibición de Akt con Triciribina revierte parcialmente la pérdida de la proliferación celular provocada por el IFN- γ (**Nava et al., 2010**). Como se muestra en la **Figura 12C**, la activación de Akt (pAkt) durante la colitis también correlaciona con la pérdida del marcador de proliferación celular pHis3. El tratamiento con LiCl evitó que se activara Akt y también la desaparición de pHis3 (**Figura 12C**). Para corroborar que el LiCl evita la pérdida de la proliferación celular durante la colitis, se realizó un estudio de incorporación de EdU. Este análisis confirmó nuestra hipótesis, pues la administración de LiCl permite que la proliferación celular de las CEIs sea casi equiparable a condiciones no inflamatorias (**Figura 12D y G**). Estos resultados sugieren que el LiCl inhibe la activación de mTORC1 provocando un incremento en la proliferación celular de las CEIs.

Para constatar que el responsable del descenso en la proliferación de las CEIs de la mucosa de ratones durante la colitis era mTORC1 y no Akt, se utilizaron inhibidores específicos para cada una de las cinasas. Con este fin, los ratones C57BL/6J que fueron

inducidos a colitis durante 5 días con DSS recibieron una inyección diaria de rapamicina (inhibidor de mTORC1) o Akt VII (inhibidor de Akt) desde el tercer día de tratamiento. Como se muestra en la **figura 12F**, la inducción de colitis redujo los niveles de la proteína pHist3, sin embargo, se observó un incremento en la fosforilación de la molécula en muestras de mucosa de ratones con colitis inyectados con rapamicina. A diferencia de lo observado con LiCl (**Figura 12C**) y rapamicina (**Figura 12F**), la inhibición de Akt por Akt VIII no pudo revertir la reducción en la proliferación celular inducida por el tratamiento con DSS (**Figura 12F**). La disminución en las proteínas pS6 y pAkt demostró la eficacia de los tratamientos con rapamicina y Akt VII, respectivamente. No se notaron cambios en las proteínas S6 y Akt totales con ningún tratamiento. Por lo tanto, la inhibición de mTORC1 por LiCl o rapamicina en un modelo murino de colitis experimental estimula la proliferación celular.

Se sabe que para recuperar la homeostasis en un proceso inflamatorio crónico es necesario la regeneración y reparación del epitelio intestinal (**Simms *et al.*, 2008; Wehkamp *et al.*, 2005**). Es por ello, que se analizó este fenómeno utilizando un marcador específico para las células epiteliales nuevas localizadas en un tejido en reparación, el antígeno 1 de células madre (Sca-1) (**Yui *et al.*, 2017**). La detección de este marcador se realizó por medio de inmunofluorescencia. La proteína Sca-1 estuvo ausente tanto en las CEIs de la mucosa de los ratones control como en las de los ratones tratados con DSS (**Figura 12E**). No obstante, tal y como se imaginaba, la proteína Sca-1 se identificó en las CEIs ubicadas en las áreas ulceradas del colon de los animales tratados con DSS (**Figura 12E, DSS WA**). Sin embargo, la administración de LiCl a ratones con colitis aumentó la expresión del marcador de regeneración Sca-1 en la mucosa (**Figura 12E**). La presencia de la proteína Sca-1 se detectó tanto en las CEIs (flecha blanca) como en las células no epiteliales (asterisco verde) situadas en toda la mucosa de los ratones tratados con DSS y LiCl, y no solo alrededor de las áreas ulceradas, como se observó en los ratones tratados únicamente con DSS (**Figura 12E**). De esta forma, los hallazgos descritos anteriormente sugieren que la inhibición de mTORC1 por LiCl o rapamicina durante la inflamación estimula la proliferación celular y la generación de nuevas células en la mucosa del colon, independientemente de la integridad del epitelio (**Figura 12**).

IV.4 mTORC1 previene la muerte de las CEIs durante la colitis.

Después, evaluamos el efecto de la inhibición de mTORC1 en el desarrollo y la progresión de la inflamación intestinal. Nuevamente, se trataron los ratones de la cepa C57BL/6J con el protocolo descrito anteriormente de inducción de colitis y LiCl. La inyección de LiCl aceleró la pérdida de peso durante la colitis y la mortalidad ocasionada por la colitis a partir de los 6 días de tratamiento (**Figura 13A, flecha**). Al administrar el AZD8055 (inhibidor específico de mTOR) (**Chresta et al., 2010; Sini et al., 2010**), se observaron efectos similares a los obtenidos con LiCl, se incrementó la pérdida de peso y la mortalidad de los animales con inflamación intestinal (**Figura 13B**). También, se evaluó el índice de actividad de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés), que se cuantificó mediante la evaluación diaria de tres características: pérdida de peso, consistencia de heces y sangrado rectal (ver **Apéndice D**) (**Cooper et al., 1993; da Costa Gonçalves et al., 2013**). La administración de LiCl resultó en un DAI mayor en comparación con los ratones tratados solamente con DSS (**Figura 13C**). Por el contrario, se sabe que la inhibición de la cinasa Akt (inyección de Akt VII) resulta en una disminución de la severidad de la colitis en ratones tratados con DSS (**Gómez-Suárez et al., 2016**). Igualmente, el DAI de los ratones tratados con DSS / AZD8055 fue significativamente superior al observado en ratones que recibieron exclusivamente DSS (**Figura 13C**). Al analizar la longitud del colon de los ratones tratados con DSS, DSS / LiCl y DSS / AZD8055 se encontró que este parámetro no tuvo variaciones significativas, lo que indicó que la presencia de los inhibidores no afectó esta variable (**Figura 13D**). Pese a lo anterior, la evaluación macroscópica del colon de los animales muertos durante el tratamiento con DSS / LiCl evidenció el daño y la destrucción de este órgano casi en su totalidad (**Figura 13E**).

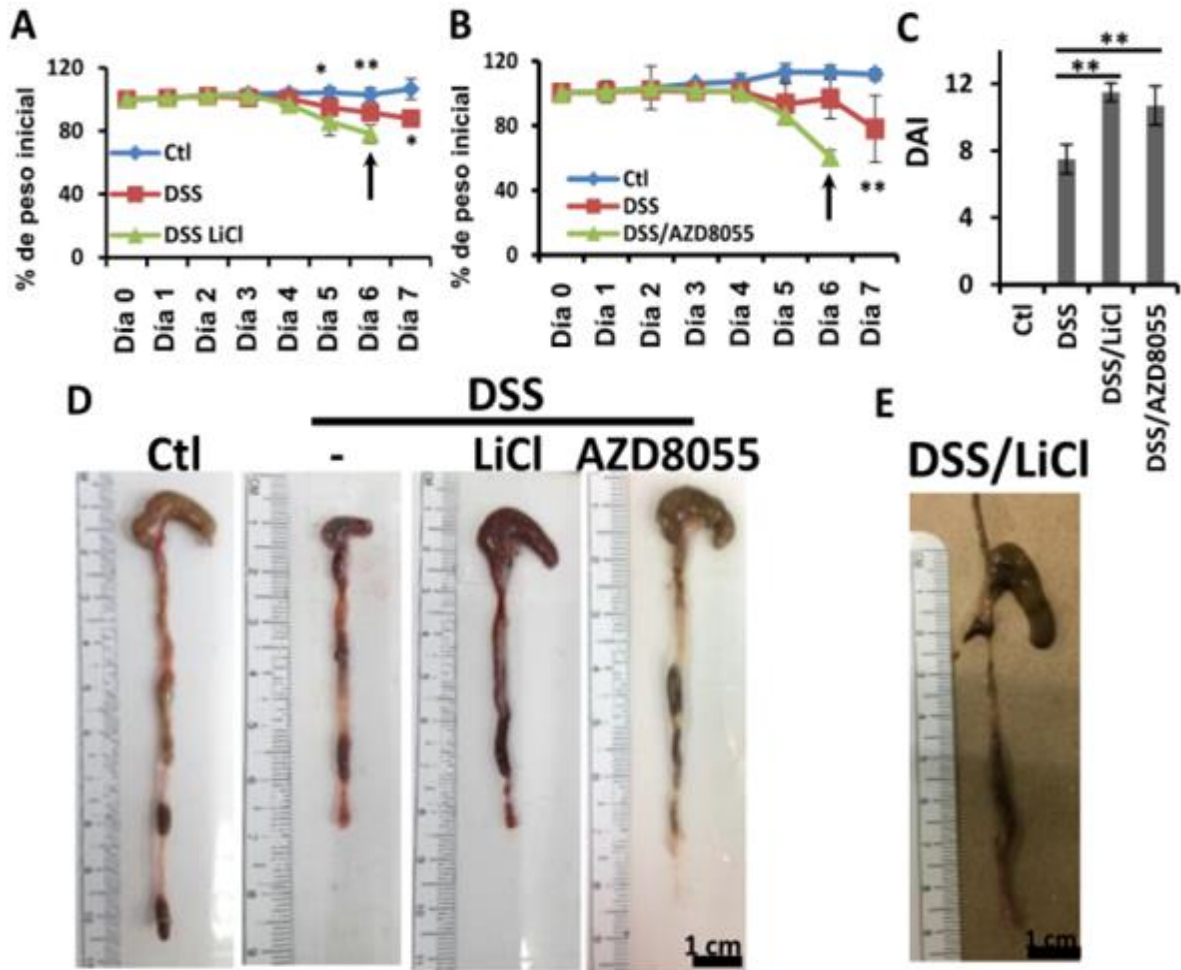


Figura 13. La inhibición de mTORC1 incrementa los signos y la severidad de la colitis inducida con DSS en un modelo murino. (A) Porcentaje de cambio de peso corporal en ratones control (Ctl, agua), y tratados con DSS o DSS / LiCl. La flecha indica la muerte del animal. Los resultados se expresan como media \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (B) Porcentaje de cambio de peso corporal en ratones control (Ctl, agua), y tratados con DSS o DSS / AZD8055 (3.75 mg / Kg) (Chresta et al., 2010). La flecha indica la muerte animal. Los resultados se expresan como media \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (C) Cambios en el DAI entre los diferentes tratamientos después de 5 días de tratamiento con DSS, DSS / LiCl y DSS / AZD8055 (3.75 mg / kg) se administraron los últimos 3 días. Los resultados se expresan como media \pm S.E. $n = 3$. ** $P < 0.01$. (D) Fotos representativas del colon de animales Ctl y tratados con DSS, DSS / LiCl y DSS / AZD8055 después de 5 días de tratamiento. $n = 3$. Barra = 1 cm. (E) Foto representativa del colon de uno de los ratones tratados con DSS / LiCl. La administración de LiCl se realizó por vía IP diariamente durante los últimos 3 días de tratamiento con el DSS. Barra = 1 cm.

Posteriormente, se realizó una revisión histológica de diferentes áreas de la mucosa intestinal de los ratones utilizados en los tratamientos descritos anteriormente. La evaluación histológica de las secciones de colon teñidas con hematoxilina-eosina mostró lesiones epiteliales en toda la mucosa y alteraciones de la estructura epitelial en ratones con colitis (**Figura 14A, asterisco**). También, en estos ratones se observaron úlceras (**punta de flecha**), edema y un alto grado de infiltración de neutrófilos y linfocitos en las áreas de la mucosa y la submucosa (**flechas**). La administración de LiCl en ratones tratados con DSS aumentó el deterioro de la mucosa y la aparición de las lesiones observadas en la mucosa de los ratones con colitis. De hecho, la pérdida de la citoarquitectura de la mucosa intestinal y el aumento en los restos y desechos celulares confirmaron la presencia de necroptosis, que se cuantificó denominándose como focos necróticos. El número de focos necróticos en la colitis aumentó con la administración de LiCl (**Figura 14B**).

Adicionalmente, se llevó a cabo una última evaluación del daño a la mucosa intestinal mediante un análisis histológico basado en cuatro parámetros: pérdida del epitelio, daño a la cripta, presencia de células de Goblet e infiltración de las células del sistema inmunológico. Se les asignó una puntuación basada en el grado de severidad de cada uno y se promedió. La combinación de todas estas alteraciones corroboraron que la administración de LiCl incrementó aún más el daño de la mucosa durante la colitis (**Figura 14C**). Similar a lo que observó con LiCl y lo reportado anteriormente (**Guan *et al.*, 2015**), la inhibición de mTOR por AZD8055 o mTORC1 por rapamicina incrementó el daño epitelial y la muerte celular en la mucosa de los animales con colitis (**Figura 14C**). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la activación de mTORC1 reduce el daño epitelial ocasionado por la colitis.

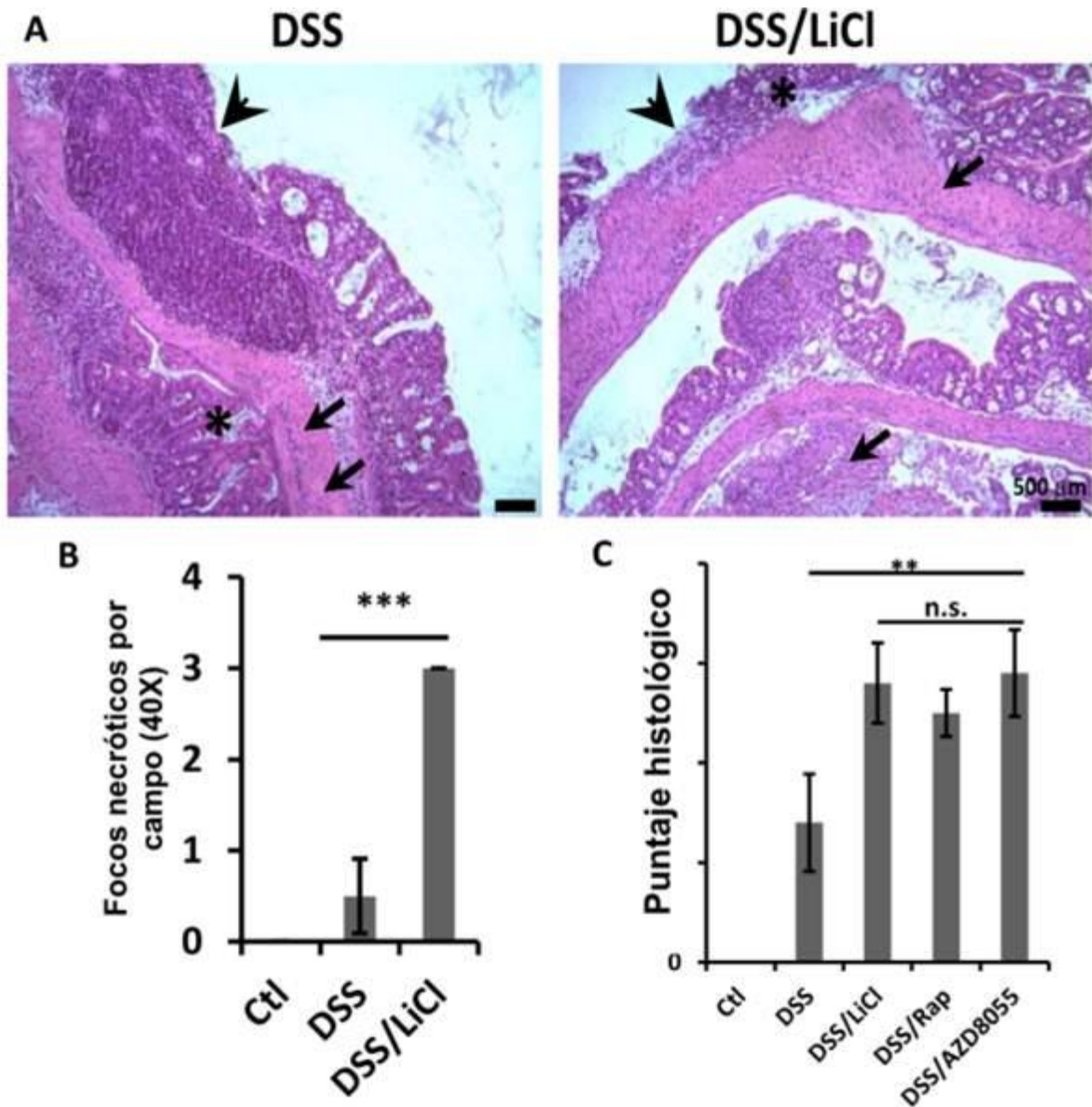


Figura 14. La inhibición de mTORC1 agrava el daño epitelial durante la colitis. (A) Tinción de hematoxilina-eosina en muestras de colon obtenidas de ratones tratados con DSS y DSS / LiCl. El tratamiento se llevó a cabo durante 5 días. Los animales recibieron una inyección IP de LiCl en los últimos 3 días. Asterisco = anomalías en la cripta intestinal. Flecha = infiltración de células del sistema inmunológico. Punta de flecha = Zona con ulceración. n = 6. Barra = 500 μm. (B) Efecto del LiCl en el desarrollo de necrosis en la mucosa del colon de ratones tratados con DSS. El tratamiento se llevó a cabo durante 5 días. La inyección IP de LiCl se llevó a cabo diariamente durante los últimos 3 días. Los resultados se expresan como media ± S.E. n = 3. ***P < 0.001. (C) Efecto del LiCl en el puntaje histológico durante la colitis inducida por DSS durante 5 días. La administración de LiCl se realizó por vía IP diariamente durante los últimos 3 días. Los resultados se expresan como media ± S.E. n = 3. **P < 0.01.

IV.5 mTORC1 reduce el daño del ADN en las CEIs durante la colitis.

El daño oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) puede causar daños importantes en la estructura del ADN, incluyendo rupturas de una sola cadena (RSC), rupturas de doble cadena (RDC), modificaciones de las bases nitrogenadas del ADN y la formación de lesiones apurínicas / apirimidínicas, que son muy tóxicas y mutagénicas (**Shiloh y Ziv, 2013**). En respuesta a éstos daños oxidativos al ADN, se activan los puntos de control del ciclo celular, se detiene el ciclo celular y se detiene la replicación del ADN, para así reparar los defectos en la estructura del ADN a través de vías de reparación por escisión, que es el sistema de reparación clave para los daños inducidos por estrés oxidativo en el ADN (**Davies, 2013**). La inactivación de mTORC1 promueve la inestabilidad cromosómica y su activación reduce el daño al ADN ocasionado por el estrés replicativo en un proceso de inflamación intestinal o CCRAC (**Brandt et al., 2017**). Por lo tanto, se evaluó esta posibilidad en nuestro modelo de inflamación.

Con este fin, primero se investigó la presencia de varios marcadores de daño al ADN en células SW480 estimuladas con el IFN- γ , en presencia o ausencia de los inhibidores de mTORC1. Como se muestra en la **figura 15A**, el tratamiento con el IFN- γ disminuyó el nivel de las proteínas pH2AX (γ -H2AX) y pp53, marcadores de las RDC (**Rogakou et al., 1998**), después de 8 horas de tratamiento. Pero, al estimular las monocapas con la citocina más los inhibidores de mTOR (AZD8055) y mTORC1 (LiCl, rapamicina), se observó un aumento en la fosforilación de H2AX (pH2AX) y de p53 (pp53). El nivel de pCHK1, otro marcador evaluado de daño en el ADN (**Sørensen y Syljuåsen, 2012**), no se vió afectado por alguno de los tratamientos (**Figura 15A**). La inmunofluorescencia demostró un enriquecimiento de pH2AX y pp53 en los núcleos de las células SW480 estimuladas con el IFN- γ más los inhibidores de mTORC1 (LiCl, rapamicina) (**Figura 15B**).

Para comprobar nuestra hipótesis, se analizó la presencia de los marcadores de daño al ADN en la mucosa del colon de ratones tratados con DSS y DSS / LiCl, de la forma descrita en experimentos anteriores. Como se muestra en la **figura 15C**, la colitis incrementó la fosforilación de H2AX y p53, mientras que la inactivación adicional de mTORC1 con LiCl aumentó aún más este efecto. Sin embargo, ni el tratamiento con DSS o DSS / LiCl afectó la fosforilación de CHK1 (pCHK1) (**Figura 15C**). Además, la inmunofluorescencia para pH2AX evidenció que el tratamiento con el LiCl redujo el daño del ADN en la mucosa del colon de ratones con colitis (**Figura 15D**). Cabe mencionar, que el daño en el ADN identificado en la mucosa intestinal de ratones tratados con DSS y DSS / LiCl se detectó tanto en células epiteliales como en no epiteliales, en la misma proporción. (**Figura 15B, flecha y punta de flecha**). Las RDC en las CEIs de los ratones con colitis observadas en la **Figura 15** (pH2AX y pp53) están generadas por las ROS (**Feagins et al., 2008; Kawanishi et al., 2006; Meira et al., 2008**) y nuestros resultados sugieren que la activación de mTORC1 previene tal proceso.

El daño en el ADN resulta en un deterioro de la función y el mantenimiento de las células (**Jackson y Bartek, 2009**). Las rupturas del ADN provocan la activación de vías de señalización encargadas de identificar lesiones y repararlas de manera eficiente, con la finalidad de prevenir la mutagénesis. Se ha demostrado que la acumulación de daño en el ADN, la reparación inadecuada de las roturas del mismo y la eliminación ineficaz de las células con el ADN dañado contribuyen a la oncogénesis (**Bartek et al., 2007; Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005**). Por lo tanto, los conocimientos sobre la sensibilidad de las células al daño en el ADN tienen en su mayoría implicaciones directas en la comprensión de las bases moleculares de la transformación celular. Diversos estudios han reportado que la vía de señalización Wnt / β -catenina, fundamental para la modulación de la determinación del destino celular, la proliferación y la apoptosis, puede inducir una respuesta al daño del ADN al regular varias proteínas, incluidas γ -H2AX, p16^{INK4a}, p53 y p21 (**Bowerman et al., 2005; Covey et al., 2010; Yousefi et al., 2016; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2013**).

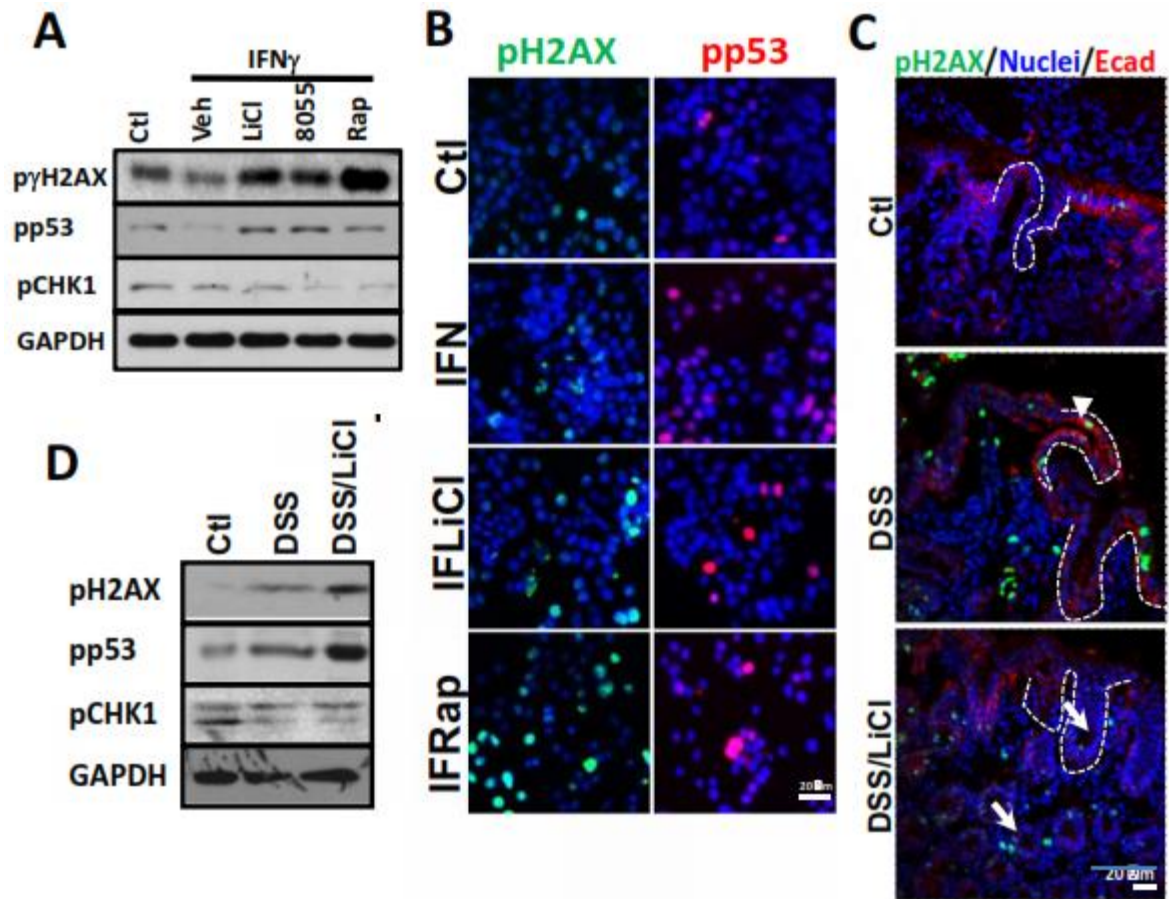


Figura 15. mTORC1 previene el daño al ADN en las CEIs durante la colitis. (A) Efecto de los inhibidores de mTORC1, LiCl y Rapamicina, y el inhibidor de mTOR, AZD8055, en la inducción de daño al ADN en las células SW480 tratadas con el IFN- γ . Se evaluaron los marcadores de daño al ADN, γ H2AX, pp53 y pCHK1. El tratamiento con el IFN- γ se realizó durante 8 horas. Los inhibidores empleados se añadieron 30 minutos antes del tratamiento con el IFN- γ . Se usó GAPDH como control de carga. n = 3 (B) Localización de p γ H2AX (verde) y pp53 (rojo) en células SW480 tratadas con el IFN- γ . Se adicionó el LiCl, el AZD8055 y la rapamicina 30 minutos antes iniciar el tratamiento con el IFN- γ . El tratamiento con la citocina se realizó durante 8 horas. Núcleos = Azul. Barra = 20 μ m. n = 3 (C) . Localización de p γ -H2AX (verde) en la mucosa del colon de ratones C57BL/6J inducidos a colitis. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días y el LiCl se administró vía IP durante los últimos 3 días. E-cadherina = rojo. p γ H2AX = Verde. Núcleos = Azul. Barra = 50 μ m. n = 3. (D) El LiCl promueve el daño del ADN en la mucosa de ratones con colitis. Se evaluaron las proteínas p γ H2AX, pp53 y pCHK1 mediante Western blot. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días. El LiCl se administró por vía IP una vez al día durante los últimos 3 días. Se usó GAPDH como control de carga. n = 3 (ver también **Rubio, 2018**).

La ausencia de β -catenina en las células epiteliales disminuye los niveles de γ H2AX, vinculando su transactivación con el aumento de las RDC (**Serebryanny et al., 2017**). El IFN- γ inhibe la actividad co-transcripcional de β -catenina en las CEIs (**Nava et al., 2014; Nava et al., 2010**). Por consiguiente, mTORC1 podría estar afectando la transactivación de β -catenina. Para corroborarlo, se analizó la presencia de EGFP en la mucosa intestinal de ratones LGR5-EGFP con colitis tratados con rapamicina. La transactivación de β -catenina (EGFP) incrementó después de la inhibición de mTORC1 (rapamicina) (**Figura 16A y B**). Este proceso se observó en al menos dos poblaciones celulares presentes en la mucosa intestinal de estos ratones (**Figura 16B, flechas y asterisco rojo**). El tratamiento con rapamicina aumentó la fosforilación de la Histona 3 (pHist3), correlacionando a la proliferación celular con la transactivación de β -catenina en las CEIs (colocalización de pHis3 con EGFP) (**Figura 16B y C, flechas**). En comparación con las CEIs, la expresión de EGFP fue mayor en las células no epiteliales. Pese a que las células no epiteliales siempre estuvieron ubicadas cerca de las epiteliales presentes en las criptas, nunca se observó presencia de pHist3 en ellas (**Figura 16B, asterisco rojo**).

Por lo tanto, se usó un plásmido reportero de luciferasa que contenía regiones de unión a TCF (TOP-Flash) para cuantificar la actividad co-transcripcional de β -catenina. Los ensayos de TOP-Flash en las células SW480 demostraron que la estimulación con el IFN- γ inhibió la actividad co-transcripcional de β -catenina. Sin embargo, la inhibición de mTORC1 por medio del empleo de rapamicina o LiCl revirtió el efecto causado por la citocina (**Figura 16D**). El tratamiento únicamente con rapamicina no afectó la actividad co-transcripcional de β -catenina, pero el uso de LiCl resultó en la potenciación de este proceso (**Figura 16D**), hecho que coincide con reportes anteriores (**Chen et al., 2000; Klein y Melton; 1996; Maher et al., 2009; Serebryanny et al., 2017**).

La actividad co-transcripcional de β -catenina aumenta cuando es desfosforilada en los residuos Ser37 y Thr41 de su extremo amino-terminal (**Staal et al., 2002**). Esta forma desfosforilada, transcripcionalmente activa de β -catenina se denomina “Active Beta Catenin” (ABC, por sus siglas en inglés) (**Staal et al., 2002**) y es un marcador de referencia de activación de la vía Wnt canónica. Pero sus niveles celulares también incrementan

cuando se activa la vía PI3K (**Persad et al., 2016**). Con base en lo anterior y en nuestros resultados previos, se analizó la presencia de la β -catenina activa (ABC) en la mucosa intestinal de ratones de la cepa C57BL/6J con colitis y tratados con LiCl diariamente desde el tercer día de enfermedad. Sorprendentemente, los tratamientos con DSS o DSS / LiCl no afectaron el nivel de la proteína o su distribución a lo largo del colon en comparación con los animales control (**Figura 16F y G**). Sin embargo, en la **figura 16E** se muestra que ABC se observó únicamente en la fracción nuclear de células de colon a las que se les inhibió mTORC1 por medio de LiCl durante la inflamación. En las muestras de citosol ABC y β -catenina total estuvieron presentes en todas las condiciones (**Figura 16E**). β -catenina total también fue detectada en la fracción nuclear de los animales control y su presencia incrementó después de la inducción de colitis, como se informó anteriormente (**Capaldo et al., 2013**). La administración de LiCl a ratones tratados con DSS aumentó aún más la acumulación de β -catenina en el compartimento nuclear (**Figura 16E**). Adicionalmente, estudios anteriores demostraron que el nivel de ABC en las células SW480 estimuladas con el IFN- γ aumenta al inhibirse a mTORC1 (**Nava et al., 2014**). Por lo tanto, podemos proponer que mTORC1 inhibe la actividad co-transcripcional de β -catenina.

Además, estos resultados también nos orientaron a pensar que la inhibición de la actividad co-transcripcional de β -catenina podría prevenir la generación de las RDC en las CEIs. Para evaluar esta hipótesis, se analizó la presencia de las RDC en las células RKO y SW480 tratadas con Doxorrubicina (Dox), un fármaco que provoca daño en el ADN (**Yang et al., 2014**), el IFN- γ y/o un inhibidor de mTOR / mTORC1. La estimulación con el IFN- γ disminuyó visiblemente la presencia p $H2AX$, mostrando nuevamente que la activación de mTORC1 inducida por la citocina redujo el daño al ADN ocasionado por la Dox (**Figura 16F**). Para corroborarlo, administramos inhibidores de mTOR (AZD8055) o mTORC1 (LiCl), que resultó en un aumento de las RDC en el ADN (p $H2AX$) y por lo tanto, se inhibió el efecto protector que brindaba la administración del IFN- γ (**Figura 16F**). También, la inhibición de mTORC1 por LiCl o AZD8055 resultó en una mayor presencia de β -catenina en las líneas celulares probadas, coincidiendo con los resultados descritos previamente (**Figura 16F**). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que mTORC1 inhibe la

actividad co-transcripcional de β -catenina durante la colitis para prevenir el daño al ADN de las CEIs.

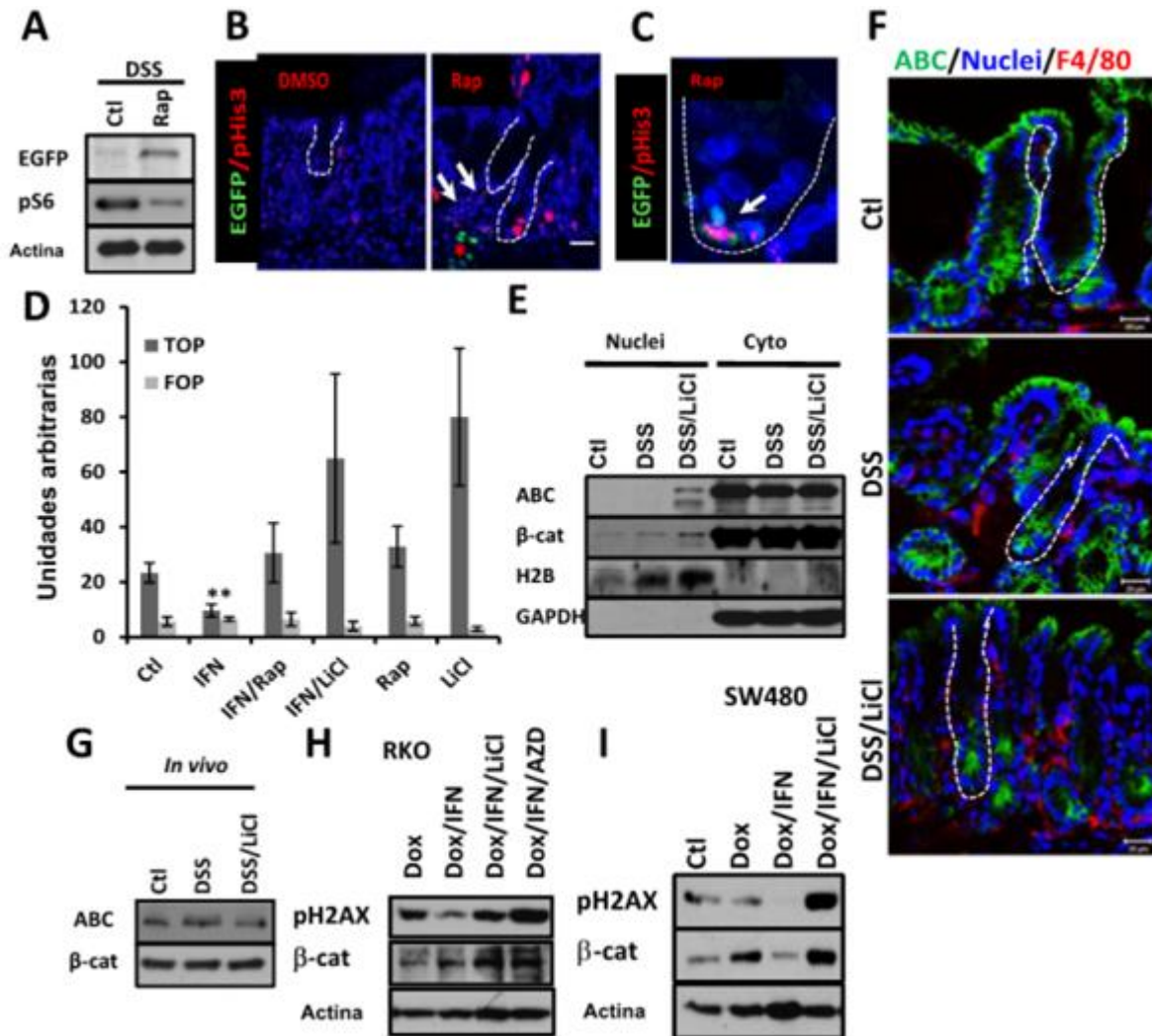


Figura 16. mTORC1 previene el daño al ADN inhibiendo la actividad co-transcripcional de β -catenina durante la colitis.

(A) Efecto de la rapamicina en la inducción de la expresión de EGFP en la mucosa intestinal de ratones LRG5-EGFP inducidos a colitis. EGFP y pS6 fueron evaluados por Western blot. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días. La rapamicina se administró por vía IP diariamente durante los últimos 3 días. La actina se utilizó como control de carga. $n = 3$. (B) (C) . Localización de pHis3 (rojo) y EGFP (verde) en la mucosa del colon de ratones LRG5-EGFP con colitis. El tratamiento con DSS se llevó a cabo durante 5 días y la rapamicina se administró vía IP durante los últimos 3 días. La línea de guión marca la base de la cripta. Flecha blanca = CEI doble positiva. Asterisco rojo = célula no epitelial GFP positiva. Núcleos = Azul. Barra = 20 μ m. $n = 3$. (D) La transactivación de β -catenina se evaluó *in vitro*

mediante el ensayo de TOP-Flash. Las células SW480 se trataron con el IFN- γ durante 18 h. LiCl, AZD8055 y rapamicina se agregaron en las últimas 6 h de tratamiento con el IFN- γ . Se utilizó FOP-Flash como control negativo. Los valores se normalizaron en CMV-renila. Las gráficas representan un solo experimento realizado por triplicado. Los datos se expresan como media \pm SEM. n = 2. **P < 0.01. **(E)** ABC y β -catenina total se analizaron en fracciones citosólicas y nucleares obtenidas de tejido de la mucosa de animales Ctl y tratados con DSS y DSS / LiCl. El DSS se administró en agua para beber durante 5 días. La administración de LiCl se realizó por vía IP durante 3 días a partir del tercer día de tratamiento con DSS. Histona 2B (H2B) = marcador nuclear. GAPDH = marcador citosólico. n = 3. **(F)** La inmunofluorescencia para ABC (verde) y F4 / 80 (rojo) se realizó en la mucosa intestinal de ratones Ctl (agua para beber) y tratados con DSS y DSS / LiCl. La administración de LiCl se realizó por vía IP diariamente durante los últimos 3 días. El DSS se administró en agua para beber durante 5 días. Núcleos = Azul. n = 3. Barra = 20 μ m. **(G)** ABC y β -catenina total fueron detectadas en la mucosa intestinal de ratones con colitis, la administración de LiCl se realizó por vía IP diariamente durante los últimos 3 días. El DSS se administró en agua para beber durante 5 días. n = 3. **(H)** pH2AX y β -catenina total se analizaron en lisados de las células RKO tratadas con Doxorubicina (3.5 μ M). El IFN- γ , el LiCl y el AZD8055 se agregaron 30 minutos antes del tratamiento con Dox. El tratamiento con Dox se llevó a cabo durante 12 h. La actina se utilizó como control de carga. n = 3. **(I)** Se analizaron pH2AX y β -catenina total en lisados de las células SW480 tratadas con Doxorubicina. Se añadieron IFN- γ y LiCl 15 minutos antes del tratamiento con Dox. El tratamiento con Dox se llevó a cabo durante 12 h. Se usó actina como control de carga. n = 3 (ver también **Rubio, 2018**).

IV.6 La inhibición de mTORC1 incrementa la formación de tumores en un modelo murino de carcinogénesis de colon inducida con AOM / DSS

El CAC es el subtipo de CCR que se asocia con la EII y la hiperactivación de β -catenina, es difícil de tratar y tiene una alta mortalidad (**Feagins et al., 2009**). Nuestros resultados sin embargo, mostraron que mTORC1 previno el daño en el ADN al bloquear la activación de β -catenina. Las células inmunológicas activadas durante la inflamación producen ROS e intermediarios reactivos de nitrógeno que inducen daño y mutaciones en el ADN, que favorecen el desarrollo de CAC (**Meira et al., 2008; Pereira et al., 2016; Zhang et al., 2013**). También, se sabe que las citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 (**Popivanova et al., 2008; Wang et al., 2009**), entre otras, pueden promover el desarrollo de tumores colorrectales y asociados a colitis. La mayoría de las citocinas promotoras de tumores son producidas por los macrófagos de la lámina propia y las CDs durante los primeros estadios de desarrollo del CAC (**Grivennikov et al., 2009**) o por las células T durante la progresión tumoral tardía (**Becker et al., 2004**). La mayoría de las citocinas promotoras de CAC y CCR activan a los receptores en las células epiteliales intestinales, que a su vez, activan a los factores de transcripción oncogénicos (NF- κ B y STAT3 son particularmente importantes) y otras vías de señalización oncogénicas, como la de Akt / mTOR (**Bollrath et al., 2009; Bromberg y Wang, 2009; Greten et al., 2004; Grivennikov et al., 2009**). Aunque la evidencia inicial para la promoción de tumores regulados por las citocinas provino de los estudios en un modelo murino de CAC, se podrían aplicar los mismos mecanismos al CCR esporádico (**Becker et al., 2004; Greten et al., 2004**). La administración oral de una solución de DSS a roedores se emplea ampliamente para mimetizar a las EIIs en humanos, ya que puede causar una reacción inflamatoria aguda y ulceración en todo el colon similar a la observada en pacientes con alguna EII (**Okayasu et al., 1990**). Además, la ingesta oral repetida de DSS por sí sola puede causar carcinoma de colon en una proporción de ratones cuando la ingestión tiene una duración de 7 días y se repite 9 veces (**Okayasu et al., 2002**). Estas observaciones sugieren que la respuesta inflamatoria sola puede causar carcinoma de colon. El AOM

también se usa con frecuencia para inducir tumores en el colon distal de roedores al causar la formación de la O6-metil-guanina (**Boivin *et al.*, 2003**). Una administración previa de AOM puede acelerar y aumentar la incidencia de carcinogénesis de colon inducida por DSS, como lo demuestra una alta incidencia de cáncer de colon (casi el 100%) después de 3 rondas posteriores de ingestión de DSS (**Okayasu *et al.*, 1996**).

Por lo tanto, se analizó el efecto de la inhibición de mTORC1 en la formación de tumores utilizando un modelo murino de carcinogénesis de colon asociado a colitis. El protocolo para el tratamiento se describe en la **figura 18A**. El análisis de la pérdida de peso demostró que los ratones tratados con AOM, DSS, AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl mostraron cambios de peso muy similares durante todo el curso del experimento (**Figura 18B**). Sin embargo, la formación de tumores solo se detectó en los animales tratados con AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl (**Figura 18C**). El número y el tamaño de los tumores en el colon aumentaron considerablemente cuando se inhibió a mTORC1 en el tratamiento AOM / DSS / LiCl en comparación con el AOM / DSS (**Figura 18D**). Este hallazgo no fue algo inesperado, ya que como se demostró en los resultados anteriores, la inhibición de mTORC1 por el LiCl aumentó la proliferación y el daño del ADN en las CEIs. En ambas condiciones, al realizar un análisis histológico, se observó un adenocarcinoma moderadamente diferenciado, caracterizado por la presencia de células epiteliales con núcleos ovoides y agrandados, y numerosos cuerpos mitóticos (**Figura 18E**). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la inhibición de mTORC1 durante la colitis contribuye al desarrollo de CCRAC.

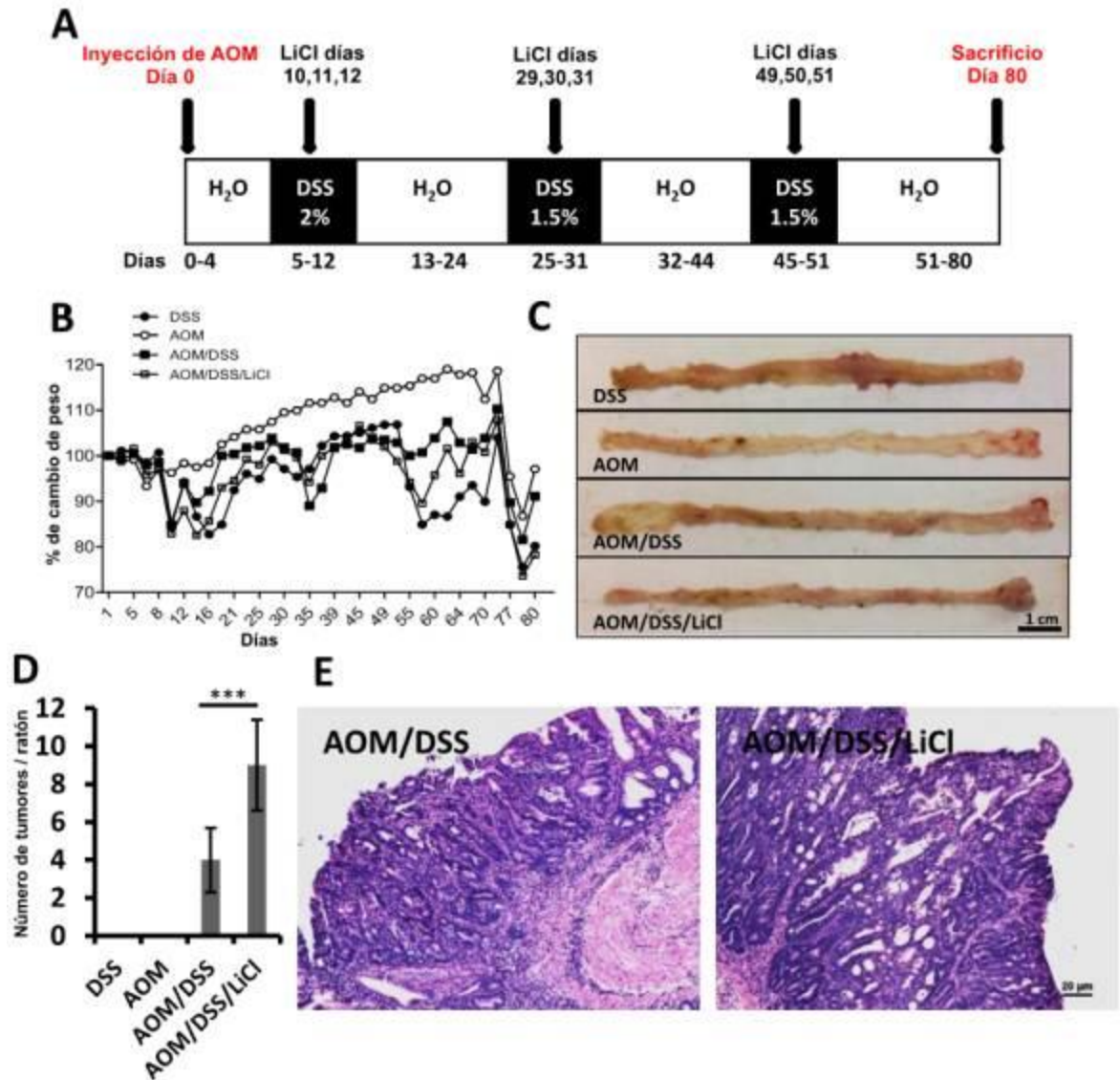


Figura 17. La inhibición de mTORC1 potencia la transformación epitelial durante la colitis. (A) Administración de AOM y DSS en un modelo de CCRAC. Descripción esquemática del tratamiento de ratones con AOM, DSS y LiCl. Después de la inyección inicial de AOM (12 mg / kg), se administró DSS en agua para beber, durante 7 días y se repitió 3 veces. Se administró LiCl diariamente durante los últimos 3 días de tratamiento con DSS. (B) Porcentaje de cambio de peso corporal en ratones tratados con DSS, AOM, AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl. Las gráficas representan un solo experimento realizado por duplicado. Los datos se expresan como media \pm SEM. n = 4. (C) Imagen representativa de fotos de colon de ratones tratados con DSS, AOM, AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl. n = 4. Barra = 1 cm. (D) Cuantificación de tumores presentes en la mucosa del colon de ratones tratados con DSS, AOM, AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl. Los resultados se expresan como media \pm S.E. n = 4. ***P < 0.001. (E) Tinción con hematoxilina y eosina de tumores localizados en el colon de ratones tratados con AOM / DSS y AOM / DSS / LiCl. n = 6. Barra = 20 μ m (ver también Rubio, 2018).

V. Discusión.

Las citocinas tienen un papel crucial en el direccionamiento y el control de la inflamación intestinal, las complicaciones locales (como el CCRAC) y las manifestaciones sistémicas y extra-intestinales en pacientes con EII (**Neurath, 2014**). Lo que sugiere que el bloqueo de las citocinas o las cascadas de señalización activadas por estas, seguirá siendo un campo de interés fundamental para el tratamiento de las EIIs. El IFN- γ desempeña una función importante en la alteración de la homeostasis intestinal durante la colitis, al contribuir en la ruptura de la barrera epitelial mediante el desensamble de las UEs, disminuyendo la tasa de migración de las CEIs, aumentando la apoptosis y suprimiendo la proliferación celular mediada por β -catenina (**Capaldo et al., 2013; Gunzel et al., 2006; Nava et al., 2014; Nava et al., 2010; Tong et al., 2005**).

En este trabajo de investigación, mostramos que la maquinaria molecular implicada en la inhibición de la proliferación de las CEIs involucra la activación de mTORC1, un efector de Akt. Utilizando complementariamente modelos *in vivo* e *in vitro*, demostramos que el IFN- γ estimula la señalización que activa a mTORC1 en las CEIs durante la inflamación. La activación de mTORC1 en la colitis disminuye la proliferación de las CEIs. Mientras que, su inhibición con LiCl o rapamicina favoreció este proceso, traducándose en un aumento del marcador de proliferación celular pHis3. La administración de LiCl estimuló la incorporación de EdU y la generación de nuevas CEIs. La inactivación de mTORC1 por MCRS1 o la delección de Rheb producen un incremento en la muerte de las células epiteliales debido a un incremento del daño en el ADN (**Brandt et al., 2017; Guan et al., 2015**). En este trabajo, evidenciamos también que la inhibición farmacológica de mTORC1 acrecentó el nivel de daño al ADN. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan al menos dos mecanismos que contribuyen directamente a esos hallazgos: 1. La activación de mTORC1 previene directamente el daño del ADN en las CEIs al inducir la activación de la maquinaria de reparación de las RDC (**Hasty et al., 2013**) y 2. mTORC1 inhibe la proliferación de células troncales y, por lo tanto, reduce el daño del ADN. De tal forma que, la activación de mTORC1 durante la colitis podría desempeñar un papel clave en el progreso correcto del ciclo celular, participando en los puntos de control de daños en el

ADN. Además, se sabe que la activación de la autofagia acelera la división de las células troncales y la hiperproliferación (**Asano *et al.*, 2017**), por lo que, mTORC1 podría proteger el nicho de las células troncales intestinales inhibiendo a la autofagia (**Liu *et al.*, 2010**). La activación de mTORC1 podría ser parte de un mecanismo destinado a reducir la proliferación de las CEIs que han acumulado demasiado daño en el ADN, ocasionado por la liberación de ROS durante la inflamación (**Coussens y Werb, 2002**). Dicho sistema, podría ser fundamental en la regulación de la proliferación de las células troncales del epitelio intestinal, en especial de las que presentan un alto grado de daño en el ADN durante el proceso inflamatorio. La investigación de la función completa de mTORC1 durante la inflamación crónica intestinal sería de gran importancia para comprender los mecanismos moleculares que intervienen en la transición y desarrollo del CCRAC.

Durante la colitis, el tratamiento con LiCl tuvo una mayor efectividad en la inducción de la proliferación celular en las CEIs que la rapamicina. De esta forma se podría especular que la activación de la proliferación de las CEIs puede ser inducida por la autofagia dependiente e independiente de mTORC1 (**Sarkar *et al.*, 2005**). Sin embargo, debido a que el LiCl regula diversas vías de señalización implicadas en la activación de la proliferación de las células epiteliales, por ejemplo, la inactivación de GSK3 β (**Freeman y Freeman, 2006; Raup-Konsavage *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2011**), no podemos descartar la existencia de otro mecanismo. De hecho, la regulación de la proliferación por ABC en las células epiteliales y el daño al ADN mostrados en los resultados previos, apoyan firmemente ésta última posibilidad. El LiCl es un inhibidor de amplio espectro dirigido a varias de las vías de señalización que se activaron con el IFN- γ . De tal forma que, podría representar una herramienta de gran utilidad en el estudio de los mecanismos activados por el IFN- γ para el mantenimiento de la homeostasis intestinal durante la inflamación. La inhibición de la proliferación celular durante la colitis conduce a la ruptura de la barrera epitelial y a la formación de úlceras (**Bollrath *et al.*, 2009**). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que también podría representar un mecanismo de adaptación destinado a proteger a las CEIs de sufrir daños mayores. En particular, de las células troncales del epitelio intestinal, donde un desequilibrio en la regulación de la proliferación celular podría repercutir en la regeneración epitelial, o promover la transformación celular y la

carcinogénesis, eventos que se han observado durante la EII (**Pereira *et al.*, 2016; Vonica *et al.*, 2000**). No obstante, la naturaleza y la función del mecanismo propuesto necesitan ser investigados; aunque, nuestros resultados también sugieren que la transactivación de β -catenina en las CEIs y en los macrófagos podría desempeñar un papel importante. β -catenina promueve la proliferación de las CEIs (**Dorfman *et al.*, 2015; van der Flier y Clevers, 2009**) y, en ausencia de E-cadherina (conocido inhibidor de β -catenina), promueve necrosis y anoikis en las CEIs durante la colitis (**Fouquet *et al.*, 2005**). Dicho proceso podría estar directamente relacionado con la hiperproliferación inducida por β -catenina.

No obstante, trabajos previos han implicado a β -catenina en la regulación de la estabilidad del genoma (**Aoki *et al.*, 2007; Dose *et al.*, 2014**) y en la respuesta al daño del ADN (**Chandra *et al.*, 2015; Priolli *et al.*, 2013; Tavana *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011**). Además, estudios recientes han demostrado que el aumento en la traslocación de β -catenina al núcleo sensibiliza a las células a las lesiones en el ADN, sugiriendo que la interacción del complejo nuclear α / β -catenina con las proteínas de reparación del ADN durante la activación de la vía Wnt, puede ayudar a mantener la estabilidad genómica y facilitar el reconocimiento del daño al ADN y el reclutamiento de complejos proteicos de reparación en los sitios dañados (**Serebryanny *et al.*, 2017**). Por lo que, el aumento de β -catenina nuclear en la colitis podría también desempeñar un papel benéfico, ya que la activación de la vía Wnt contribuye en la estimulación de las vías de reparación del daño al ADN ocasionado por las ROS liberadas durante el proceso inflamatorio.

Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la transactivación de β -catenina después de la inhibición de mTORC1 también pueda estimular la producción de factores solubles en las CEIs, que a su vez estimularán el reclutamiento de macrófagos M2 (IL-6⁺) en el epitelio inflamado como se describió anteriormente (**Zhang *et al.*, 2013**). mTORC1 es necesario para la inducción de un fenotipo pro-inflamatorio en macrófagos (**Weichhart *et al.*, 2008**), por lo tanto, resulta fácil comprender por qué la administración de rapamicina y LiCl también podría dar lugar a la generación de un entorno anti-

inflamatorio mediado por macrófagos tipo M2. Los macrófagos M2 presentes en la mucosa del colon generan un microambiente ideal que estimula el desarrollo de CCR (**Zhang et al., 2013**). De acuerdo con lo anterior, la activación de la vía Wnt / β -catenina en macrófagos (observado en la inhibición de mTORC1), favorece a los macrófagos activados alternativamente y a su vez, mTORC1 regula positivamente la señalización de IL6 / STAT3, una vía de señalización asociada con Wnt / β -catenina en el desarrollo del cáncer (**Brandt et al., 2017; Guan et al., 2015**). Por lo tanto, la inhibición de mTORC1 podría favorecer la desregulación de las vías de señalización convergentes, potenciando el daño epitelial y el ambiente pro-inflamatorio que contribuye finalmente al desarrollo de cáncer.

Es necesario ampliar la investigación del mecanismo por el cual mTORC1 inhibe la proliferación de las CEIs. Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición de la autofagia afecta el proceso de regeneración celular en el intestino (**Asano et al., 2017**). La activación de mTORC1 por el IFN- γ podría participar en la regulación de dicho proceso. El LiCl es un inductor de la autofagia dependiente e independiente de mTOR (**Sarkar et al., 2005**) y además, se ha observado que estimula la regeneración celular durante los periodos de recuperación posteriores a un tratamiento con DSS para la inducción de colitis aguda (**Raup-Konsavage et al., 2006**). Por lo tanto, la activación de mTORC1, efector de la vía de señalización de PI3K / Akt, podría ser fundamental en la inhibición de la autofagia y la proliferación celular en la inflamación intestinal. Sin embargo, la inhibición de la transactivación de β -catenina y su efecto en la regulación de mediadores solubles conocidos por promover la proliferación y la respuesta anti-inflamatoria (como la IL-10) (**Zhang et al., 2013**) son interrogantes que deben ser estudiadas. mTORC1 podría formar parte de un sistema que previene la proliferación descontrolada, en especial, de las células troncales del epitelio intestinal, donde podría estar evitando el daño al ADN o su acumulación, para prevenir el desarrollo de cáncer durante la colitis.

VI. Resumen de resultados.

- ✓ mTORC1 se activa en las CEIs durante la colitis.
- ✓ El LiCl inhibe la activación de mTORC1.
- ✓ El LiCl incrementa la proliferación celular a través de la inhibición de mTORC1 durante la colitis.
- ✓ mTORC1 detiene la acumulación de daño al ADN en las CEIs durante la colitis.
- ✓ mTORC1 inhibe la actividad co-transcripcional de β -catenina durante la colitis.
- ✓ mTORC1 previene el daño epitelial ocasionado por la colitis.
- ✓ mTORC1 se activa en macrófagos residentes de la mucosa durante la colitis.
- ✓ La inhibición de mTORC1 durante la colitis favorece la inducción de un fenotipo pro-inflamatorio de macrófagos.
- ✓ mTORC1 previene la tumorigénesis en un modelo de CCRAC.

VII. Conclusión.

mTORC1 es activado por el IFN- γ en la mucosa del colon durante la inflamación y modula la proliferación celular, protege del daño epitelial, estimula un ambiente pro-inflamatorio y previene el desarrollo de CCR en un modelo de colitis inducida por DSS.

VIII. Perspectivas.

- Investigar el mecanismo por el cual mTORC1 inhibe la proliferación celular de las CEIs durante la colitis.
- Estudiar la inhibición de la transactivación de β -catenina y su efecto en la regulación de mediadores solubles conocidos por promover la proliferación y la respuesta anti-inflamatoria (como la IL-10) durante la colitis.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of medicine*, 361(21), 2066–2078. doi: 10.1056/NEJMra0804647

Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends in Immunology*, 39, 677–696. doi: 10.1016/j.it.2018.12.008

Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., ... Taketo, M. M. (2007). Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene*, 26, 3511–3520. doi: 10.1038/sj.onc.1210141

Asano, J., Sato, T., Ichinose, S., Kajita, M., Onai, N., Shimizu, S., & Ohteki, T. (2017). Intrinsic autophagy is required for the maintenance of intestinal stem cells and for irradiation-induced intestinal regeneration. *Cell Reports*, 20(5), 1050–1060. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.019

Askling, J., Dickman, P. W., Karlén, P., Broström, O., Lapidus, A., Löfberg, R., & Ekblom, A. (2001). Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 120, 1356–1362. doi: 10.1053/gast.2001.24052

Babbin, B. A., Laukoetter, M. G., Nava, P., Koch, S., Lee, W. Y., Capaldo, C. T., ... Nusrat, A. (2008). Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(7), 5035–5044. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.5035

Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, 260(1), 102–117. doi: 10.1111/imr.12192

Balendran, A., Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M. & Alessi, D. R. (2000). A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *The Journal of biological chemistry*, 275(27), 20806–13. doi: 10.1074/jbc.M000421200

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M. M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196

Barker N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19-3. doi: 10.1038/nrm3721

Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., ... Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 111(2), 251–263. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01015-2

Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet* 380(9853), 1590–1605. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9

Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., ... Neurath, M. F. (2004). TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*, 21(4), 491–501. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.020

Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E., & Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91(4), 854–862. doi: 10.1002/1097-0142(20010215)91:4<854::aid-cncr1073>3.0.co;2-z

Betz, C., & Hall, M. N. (2013). Where is mTOR and what is it doing there?. *The Journal of cell biology*, 203(4), 563–574. doi: 10.1083/jcb.201306041

Birchenough, G. M., Nyström, E. E., Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6293), 1535–1542. doi: 10.1126/science.aaf7419

Bjerknes, M., & Cheng, H. (1981). Methods for the isolation of intact epithelium from the mouse intestine. *The Anatomical Record*, 199(4), 565–574. doi: 10.1002/ar.1091990412

Blokzijl, F., de Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., Sasaki, N., ... van Boxtel, R. (2016). Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*, 538(7624),

260–264. doi: 10.1038/nature19768

Boivin, G. P., Washington, K., Yang, K., Ward, J. M., Pretlow, T. P., Russell, R., ... Coffey, R. J. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology*, *124*(3), 762–777. doi: 10.1053/gast.2003.50094

Bollrath, J., & Greten, F. R. (2009). IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports*, *10*(12), 1314–1319. doi: 10.1038/embor.2009.243

Bollrath, J., Pheesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., ... Greten, F. R. (2009). gp130-Mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, *15*(2), 91–102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.002

Bowerman B. (2005). Oxidative stress and cancer: a β -catenin convergence. *Science*, *308*(5725), 1119–1120. doi: 10.1126/science.1113356

Brandt, M., Grazioso, T. P., Fawal, M. A., Tummala, K. S., Torres-Ruiz, R., Rodriguez-Perales, S., ... Djouder, N. (2017). mTORC1 inactivation promotes colitis-induced colorectal cancer but protects from APC loss-dependent tumorigenesis. *Cell Metabolism*, *27*(1), 118-135.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2017.11.006

Breault, D. T., Min, I. M., Carlone, D. L., Farilla, L. G., Ambruzs, D. M., Henderson, D. E., ... Hole, N. (2008). Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10420–10425. doi: 10.1073/pnas.0804800105

Brentnall, T. A., Haggitt, R. C., Rabinovitch, P. S., Kimmey, M. B., Bronner, M. P., Levine, D. S., ... Rubin, C. E. (1996). Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, *110*(2), 331–338. doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8566577

Bromberg, J., & Wang, T. C. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the

link. *Cancer cell*, 15(2), 79–80. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.009

Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M. & Nusrat, A. (2003). Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis- independent mechanisms. *Journal of Immunology*, 171(11), 6164-72. doi: 10.1038/nature11965

Buczacki, S. J., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R. & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 495(7439), 65–69. doi: 10.1038/nature11965

Canavan, C., Abrams, K. R., & Mayberry, J. (2006). Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23(8), 1097–1104. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x ^[L]_{SEP}

Capaldo, C. T., Beeman, N., Hilgarth, R. S., Nava, P., Louis, N. A., Naschberger, E., ... Nusrat, A. (2012). IFN- γ and TNF- α -induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of β -catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunology*, 5(6), 681–690. doi: 10.1038/mi.2012.41

Capaldo, C. T., & **Nusrat**, A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(4), 864–871. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.027

Carracedo, A., & **Pandolfi**, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, 27(41), 5527-41. doi: 10.1038/onc.2008.247.

Chalecka-Franaszek, E., & **Chuang**, D. M. (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8745–8750. doi: 10.1073/pnas.96.15.8745

Chami, B., Yeung, A. W., van Vreden, C., King, N. J., & Bao, S. (2014). The role of CXCR3 in DSS-induced colitis. *PloS one*, 9(7), e101622. doi: 10.1371/journal.pone.0101622

Chandra, A., Lin, T., Zhu, J., Tong, W., Huo, Y., Jia, H., ... Qin, L. (2015). PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *The Journal of biological chemistry*, 290(1), 157–167. doi: 10.1074/jbc.M114.608158

Chen, R. H., Ding, W. V. & McCormick, F. (2000). Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition and activation of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), 17894-9. doi: 10.1074/jbc.M905336199

Chresta, C. M., Davies, B. R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S. E., ... Pass, M. (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Research*, 70(1), 288–298. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1751

Chung, E. J., Sohn, Y. H., Kwon, S. H., Jung, S. A., & Lee, J. H. (2014). Lithium chloride inhibits TGF- β 1-induced myofibroblast transdifferentiation via PI3K/Akt pathway in cultured fibroblasts from Tenon's capsule of the human eye. *Biotechnology Letters*, 36(6), 1217–1224. doi: 10.1007/s10529-014-1487-4

Clevers H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274-84. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.

Collins, J. T., & Badireddy, M. (2019). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>

Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation*, 69(2), 238–249.

Cornu, M., Albert, V., & Hall, M. N. (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(1), 53–62. doi: 10.1016/j.gde.2012.12.005

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. doi: 10.1038/nature01322


Covey, T. M., Edes, K., Coombs, G. S., Virshup, D. M., & Fitzpatrick, F. A. (2010). Alkylation of the tumor suppressor PTEN activates Akt and β -catenin signaling: a mechanism linking inflammation and oxidative stress with cancer. *PloS one*, 5(10), e13545. doi: 10.1371/journal.pone.0013545

Criollo, A., Vicencio, J. M., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Lavandero, S., & Kroemer, G. (2007). The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy*, 3(4), 350–353. doi: 10.4161/auto.4077

Cruet-Hennequart, S., Prendergast, A. M., Shaw, G., Barry, F. P., & Carty, M. P. (2012). Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. *The International Journal of hematology*, 96(5), 649–656. doi: 10.1007/s12185-012-1196-5

da Costa Gonçalves, F., Schneider, N. F., Mello, H., Pandolfi, E., Meurer, L., Cirne-Lima, E., & da Rosa Paz, A. H. (2013). Characterization of Acute Murine Dextran Sodium Sulfate (DSS) Colitis: Severity of Inflammation is Dependent on the DSS Molecular Weight and Concentration. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41(1), 1142.

Darwich, A. S., Aslam, U., Ashcroft, D. M., & Rostami-Hodjegan, A. (2014). Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(12), 2016–2022. doi: 10.1124/dmd.114.058404

Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *The New England Journal of medicine*, 365(18), 1713–1725. doi: 10.1056/NEJMra1102942. 

Danese, S., Colombel, J. F., Peyrin-Biroulet, L., Rutgeerts, P., & Reinisch, W. (2013). Review article: the role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis — past, present and future. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 37(9), 855–866. doi: 10.1111/apt.12284

Davies K. J. (2013). Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects, Elsevier.

Dazert, E., & Hall, M. N. (2011). mTOR signaling in disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(6), 744–755. doi: 10.1016/j.ceb.2011.09.003

Dieleman, L. A., Palmen, M. J., Akol, H., Bloemena, E., Peña, A. S., Meuwissen, S. G., & Van Rees, E. P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is

characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and experimental immunology*, 114(3), 385–391. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00728.x

Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P., & Elson, C. O. (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*, 107(6), 1643–1652. doi: 10.1016/0016-5085(94)90803-6

Dorfman, T., Pollak, Y., Sohotnik, R., Coran, A. G., Bejar, J., & Sukhotnik, I. (2015). Enhanced intestinal epithelial cell proliferation in diabetic rats correlates with β -catenin accumulation. *The Journal of endocrinology*, 226(3), 135-43. doi: 10.1530/JOE-14-0725

Dose, M., Emmanuel, A. O., Chaumeil, J., Zhang, J., Sun, T., Germar, K., ... Gounari, F. (2014). β -Catenin induces T-cell transformation by promoting genomic instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(1), 391-396. doi: 10.1073/pnas.1315752111

Eaden, J. A., Abrams, K. R., & Mayberry, J. F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48(4), 526–535. doi: 10.1136/gut.48.4.526

Efeyan, A., & **Sabatini**, D. M. (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 169–176. doi: 10.1016/j.ceb.2009.10.007

Ek bom, A., Helmickm, C., Zack, M., & Adami, H. O. (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *The New England Journal of medicine*, 323(18), 1228–1233. doi: 10.1056/NEJM199011013231802

El-Salhy, M., Danielsson, A., Stenling, R., & Grimelius, L. (1997). Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *The Journal of internal medicine*, 242(5), 413-419. doi: 10.1046/j.1365-2796.1997.00237.x

Etxebarria, A., Terrones, O., Yamaguchi, H., Landajuela, A., Landeta, O., Antonsson, B., ... Basañez, G. (2009). Endophilin B1/Bif-1 stimulates BAX activation independently from its capacity to produce large scale membrane morphological rearrangements. *The Journal of biological chemistry*, 284(7), 4200–4212. doi: 10.1074/jbc.M808050200

Fang, P., Hwa, V., & Rosenfeld, R. G. (2006). Interferon-gamma-induced dephosphorylation of STAT3 and apoptosis are dependent on the mTOR pathway. *Experimental Cell Research*, 312(8), 1229-39. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.12.011

Farmer, R. G., & Brown, C. H. (1966). Ulcerative proctitis: course and prognosis. *Gastroenterology*, 51(2), 219–223.

Feagins, L. A., Souza, R. F., & Spechler, S. J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6(5), 297–305. doi: 10.1038/nrgastro.2009.44.

Fougeray, S., Mami, I., Bertho, G., Beaune, P., Thervet, E., & Pallet, N. (2012). Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate IFN-gamma-induced autophagy. *The Journal of immunology*, 189(6), 2954–2964. doi: 10.4049/jimmunol.1201214

Fouquet, S., Lugo-Martinez, V. H., Faussat, A. M., Renaud, F., Cardot, P., Chambaz, ... Thenet, S. (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(41), 43061–43069. doi: 10.1074/jbc.M405095200

Francipane, M. G., & Lagasse, E. (2014). mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget*, 5(1), 49–66. doi: 10.18632/oncotarget.1548

Freeman H. J. (2008). Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 14(12), 1810–1811. doi: 10.3748/wjg.14.1810

Freeman, M. P., & Freeman, S. A. (2006). Lithium: clinical considerations in internal medicine. *The American Journal of medicine*, 119(6), 478-481. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.11.003

Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2009). Endotoxin and interferon-gamma inhibit translation in skeletal muscle cells by stimulating nitric oxide synthase activity. *Shock (Augusta, Ga.)*, 32(4), 416–426. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181a034d2

Fukata, M., Michelsen, K. S., Eri, R., Thomas, L. S., Hu, B., Lukasek, K., ... Abreu, M. T. (2005).

Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5), G1055–G1065. doi: 10.1152/ajpgi.00328.2004

Garrett, W. S., Punit, S., Gallini, C. A., Michaud, M., Zhang, D., Sigrist, K. S., ... Glimcher, L. H. (2009). Colitis-associated colorectal cancer driven by T-bet deficiency in dendritic cells. *Cancer cell*, 16(3), 208–219. doi: 10.1016/j.ccr.2009.07.015

Gassler N. (2017). Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 8(4), 150–160. doi: 10.4291/wjgp.v8.i4.150

Gehart, H., & Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 19-34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y

Genander, M., Halford, M. M., Xu, N. J., Eriksson, M., Yu, Z., Qiu, Z., ... Frisén, J. (2009). Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and tumor suppression. *Cell*, 139(4), 679–692. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.048

Gerlach, K., Daniel, C., Lehr, H. A., Nikolaev, A., Gerlach, T., Atreya, R., ... Weigmann, B. (2012). Transcription factor NFATc2 controls the emergence of colon cancer associated with IL-6-dependent colitis. *Cancer Research*, 72(17), 4340–4350. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4155

Gómez-Suárez, M., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Hernández-Trejo, J. A., Hernández-Ruiz, M., Suárez-Pérez, D., Candelario, A., ... Nava, P. (2016). 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell death and differentiation*, 23(6), 1060–1072. doi: 10.1038/cdd.2015.163

González-Gonzalez, N., & Ángeles-Constantino, M. (2009). Apuntes para repensar la “teoría de la transición epidemio- lógica” y su importancia para el diseño de políticas públicas. *Espacios Públicos*, 12(25), 151-162.

González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(3), 729-756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018

González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews. Immunology*, *12*(2), 125–135. doi: 10.1038/nri3133

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., ... Karin, M. (2004). IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, *118*(3), 285–296. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.013

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., ... Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, *15*(2), 103–113. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001

Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J., & Delamarche, A. (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *The Journal of applied physiology*, *89*(1), 169–175. doi: 10.1152/jap.2000.89.1.169

Grun, D., Lyubimova, A., Kester, L., Wiebrands, K., Basak, O., Sasaki, N., ... van Oudenaarden, A. (2015). Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature*, *525*(7568), 251–255. doi: 10.1038/nature14966

Guan, J. L., Simon, A. K., Prescott, M., Menendez, J. A., Liu, F., Wang, F., ... Zhang, J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy*, *9*(6), 830–849. doi: 10.4161/auto.24132

Guan, Y., Zhang, L., Li, X., Zhang, X., Liu, S., Gao, N., ... Li, D. (2015). Repression of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Inhibits Intestinal Regeneration in Acute Inflammatory Bowel Disease Models. *The Journal of immunology*, *195*(1), 339–346. doi: 10.4049/jimmunol.1303356

Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2009). The pharmacology of mTOR inhibition. *Science Signaling*, *2*(67), pe24. doi: 10.1126/scisignal.267pe24

Gulhati, P., Cai, Q., Li, J., Liu, J., Rychahou, P. G., Qiu, S., ... Evers, B. M. (2009). Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(23), 7207–7216. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1249

Günzel, D., Florian, P., Richter, J. F., Troeger, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., & Gitter, A. H. (2006). Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *The American Journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 290(6), R1496–R1507. doi: 10.1152/ajpregu.00470.2005

Gupta, R. B., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Hossain, S., Matula, S., Kornbluth, A., ... Ullman, T. (2007). Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*, 133(4), 1099–1341. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.001

SEP

Gyde, S. N., Prior, P., Macartney, J. C., Thompson, H., Waterhouse, J. A., & Allan, R. N. (1980). Malignancy in Crohn's disease. *Gut*, 21(12), 1024–1029. doi: 10.1136/gut.21.12.1024

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, 34(2), 237–46. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.016

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hasty, P., Sharp, Z. D., Curiel, T. J., & Campisi, J. (2013). mTORC1 and p53: clash of the gods?. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(1), 20–25. doi: 10.4161/cc.22912

Heath J. P. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. *Cell biology international*, 20(2), 139–146. doi: 10.1006/cbir.1996.0018

Heitman, J., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905–909. doi: 10.1126/science.1715094

Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract-revisited. *The Scandinavian Journal of gastroenterology*, 49 (6), 681–689. doi: 10.3109/00365521.2014.898326

Henderson, P., van Limbergen, J. E., Schwarze, J., & Wilson, D. C. (2011). Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(1), 382-95. doi: 10.1002/ibd.21379

Hermiston, M. L., & Gordon, J. I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*, *270*(5239), 1203–1207. doi: 10.1126/science.270.5239.1203

Hernández-Trejo, J. A., Suárez-Pérez, D. L., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Fernandez-Vargas, O. E., Serrano, C., Candelario-Martínez, A. A., .. Nava, P. (2016). The proinflammatory cytokines IFN γ /TNF α increased Chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium. *The Biochemical Journal*, *473*(21), 3805-3818. doi: 10.1042/BCJ20160390

Herrlinger, K. R., Witthoef, T., Raedler, A., Bokemeyer, B., Krummenerl, T., Schulzke, J. D., ... Stange, E. F. (2006). Randomized, double blind controlled trial of subcutaneous recombinant human interleukin-11 versus prednisolone in active Crohn's disease. *The American Journal of gastroenterology*, *101*(4), 793–797. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00356.x

Hofmann, C., Dunger, N., Schölmerich, J., Falk, W., & Obermeier, F. (2010). Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*, *16*(11), 1850-1858. doi: 10.1002/ibd.21294.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L. A., Huber, F. J., Bosurgi, L., Hu, B., ... Flavell, R. A. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*, *491*(7423), 259–263. doi: 10.1038/nature11535

Hueber, W., Sands, B. E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P. D., ... Secukinumab in Crohn's Disease Study Group (2012). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, *61*(12), 1693–1700. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301668

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2013). *PREVENIMSS, Estrategia fundamental para prevenir, detectar y promover el diagnóstico oportuno del cáncer*. Recuperado mayo 10, 2019 de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201302/012>

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). *Cáncer de Colon y Recto*. Recuperado junio 1, 2019 de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-colon>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015). *Encuesta Intercensal 2015*. Recuperado Mayo 10, 2019 de <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/enchogares/especiales/intercensal/>

Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). *Infografía desarrollada entre los institutos nacionales de Cancerología (INCan) y de Salud Pública (INSP)*. Recuperado Junio 1, 2019 de <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. (2014). *PREVENISSSTE*. Recuperado Mayo 25, 2019 de <https://prevenissstecercadeti.wordpress.com/prevenissste/>

Iwamoto, M., Koji, T., Makiyama, K., Kobayashi, N., & Nakane, P. K. (1996). Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *The Journal of pathology*, *180*(2), 152-159. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199610)180:2<152::AID-PATH649>3.0.CO;2-Y

Jadhav, U., Nalapareddy, K., Saxena, M., O'Neill, N. K., Pinello, L., Yuan, G. C., ... Shivdasani, R. A. (2016). Acquired Tissue-Specific Promoter Bivalency Is a Basis for PRC2 Necessity in Adult Cells. *Cell*, *165*(6), 1389–1400. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.031

Jadhav, U., Saxena, M., O'Neill, N. K., Saadatpour, A., Yuan, G. C., Herbert, Z., ... Shivdasani, R. A. (2017). Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell stem cell*, *21*(1), 65–77.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.05.001

Jimenez-Sanchez, M., Thomson, F., Zavodszky, E., & Rubinsztein, D. C. (2012). Autophagy and polyglutamine diseases. *Progress in neurobiology*, *97*(2), 67–82. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.013

Johansson, M. E., Larsson, J. M., & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial

interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*(Suppl 1), 4659–4665. doi: 10.1073/pnas.1006451107

Johansson, M. E., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *10*(6), 352–361. doi: 10.1038/nrgastro.2013.35

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., ... Cho, J. H. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, *491*(7422), 119–124. doi: 10.1038/nature11582

Kaaij, L. T., van de Wetering, M., Fang, F., Decato, B., Molaro, A., van de Werken, H. J., ... Ketting, R. F. (2013). DNA methylation dynamics during intestinal stem cell differentiation reveals enhancers driving gene expression in the villus. *Genome biology*, *14*(5), R50. doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r50

Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., ... Stappenbeck, T. S. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell*, *165*(7), 1708–1720. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.018

Karst, A. M., Dai, D. L., Cheng, J. Q., & Li, G. (2006). Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival. *Cancer Research* *66*(18), 9221–9226. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3633

Kaur, S., Sassano, A., Joseph, A. M., Majchrzak-Kita, B., Eklund, E. A., Verma, A., ... Platanias, L. C. (2008). Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(10), 7316–7323. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7316

Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S., & Ma, N. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*, *387*(4), 365–372. doi: 10.1515/BC.2006.049

Kierszenbaum A. L. (2008). *Histología y Biología celular: Introducción a la Anatomía Patológica*. Elsevier Mosby. Segunda Edición. Madrid, España. 688 págs.

Kiesler, P., Fuss, I. J., & Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, *1*(2), 154–170. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006

Kim, T. H., Li, F., Ferreiro-Neira, I., Ho, L. L., Luyten, A., Nalapareddy, K., ... Shivdasani, R. A. (2014). Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. *Nature*, *506*(7489), 511–515. doi: 10.1038/nature12903

Kirchberger, S., Royston, D. J., Boulard, O., Thornton, E., Franchini, F., Szabady, R. L., ... Powrie, F. (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *The Journal of experimental medicine*, *210*(5), 917–931. doi: 10.1084/jem.20122308

Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5497), 1717–1721. doi: 10.1126/science.290.5497.1717

Koch, S. & Nusrat, A. (2012). The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *The Annual Review of Pathology*, *7*, 35-60. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-120905

Kong, S., Zhang, Y. H., & Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed research international*, *2018*, 2819154. doi: 10.1155/2018/2819154

Krieglstein, C. F., Cerwinka, W. H., Sprague, A. G., Laroux, F. S., Grisham, M. B., Kotliansky, V. E., ... de Fougères, A. R. (2002). Collagen-binding integrin $\alpha 1\beta 1$ regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *The Journal of clinical investigation*, *110*(12), 1773–1782. doi: 10.1172/JCI15256

Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, *73*(3), 585–596. doi: 10.1016/0092-8674(93)90144-f

Kuri-Morales P. (2011). La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios. *Gaceta Médica de México*, 147, 451-454.

Kvist, N., Jacobsen, O., Kvist, H. K., Nørgaard, P., Ockelmann, H. H., Schou, G., & Jarnum, S. (1989). Malignancy in ulcerative colitis. *The Scandinavian Journal of gastroenterology*, 24(4), 497–506. doi: 10.3109/00365528909093080

Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017

Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(2), 10.1101/cshperspect.a011593 a011593. doi: 10.1101/cshperspect.a011593

Laukoetter, M. G., Nava, P., & Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 14(3), 401–407. doi: 10.3748/wjg.14.401

Liao, J., Seril, D. N., Lu, G. G., Zhang, M., Toyokuni, S., Yang, A. L., & Yang, G. Y. (2008). Increased susceptibility of chronic ulcerative colitis-induced carcinoma development in DNA repair enzyme Ogg1 deficient mice. *Molecular Carcinogenesis*, 47(8), 638–646. doi: 10.1002/mc.20427

Liu, J., Walker, N. M., Cook, M. T., Ootani, A., & Clarke, L. L. (2012). Functional Cftr in crypt epithelium of organotypic enteroid cultures from murine small intestine. *American journal of physiology. Cell physiology*, 302(10), C1492–C1503. doi: 10.1152/ajpcell.00392.2011

Liu, Q., Thoreen, C., Wang, J., Sabatini, D., & Gray, N. S. (2009). mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug discovery today. Therapeutic strategies*, 6(2), 47–55. doi: 10.1016/j.ddstr.2009.12.001

Macdougall I. P. (1964). The cancer risk in ulcerative colitis. *Lancet*, 284(7361), 655–658. doi: 10.1016/S0140-6736(64)92474-2

Madara, J. L., & Stafford, J. (1989). Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *The Journal of clinical investigation*, 83(2), 724–727. doi: 10.1172/JCI113938

- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. (2007).** Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741–752. doi: 10.1038/nrm2239
- Maloy, K., & Powrie, F. (2011).** Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306. doi: 10.1038/nature10208
- Manning B. D. (2004).** Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *The Journal of cell biology*, 167(3), 399–403. doi: 10.1083/jcb.200408161
- McGuckin, M. A., Eri, R. D., Das, I., Lourie, R., & Florin, T. H. (2011).** Intestinal secretory cell ER stress and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 1081-5. doi: 10.1042/BST0391081
- Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C. W., Pang, B., Borenshtein, D., ... Samson, L. D. (2008).** DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(7), 2516–2525. doi: 10.1172/JCI35073
- Menon, S., & Manning, B. D. (2008).** Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2(0 2), S43–S51. doi: 10.1038/onc.2009.352
- Metcalf, D. J., García-Arencibia, M., Hochfeld, W. E., & Rubinsztein, D. C. (2012).** Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration. *Experimental neurology*, 238(1), 22–28. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.11.003
- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E., Henderson, D. E., ... Breault, D. T. (2011).** Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 179–184. doi: 10.1073/pnas.1013004108
- Moog F. (1981).** The lining of the small intestine. *Scientific American*, 245(5), 154–158. doi: 10.1038/scientificamerican1181-154
- Motoi, Y., Shimada, K., Ishiguro, K., & Hattori, N. (2014).** Lithium and autophagy. *ACS chemical neuroscience*, 5(6), 434–442. doi: 10.1021/cn500056q

Muniz, L. R., Knosp, C., & Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in immunology*, *3*, 310. doi: 10.3389/fimmu.2012.00310

Muñoz, J., Stange, D. E., Schepers, A. G., van de Wetering, M., Koo, B. K., Itzkovitz, S., ... Clevers, H. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *The EMBO journal*, *31*(14), 3079–3091. doi: 10.1038/emboj.2012.166

Musch, E., Andus, T., Kruis, W., Raedler, A., Spehlmann, M., Schreiber, S., ... Engelberg Feurle, G. (2005). Interferon- β -1a for the treatment^[SEP] of steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *3*(6), 581–586.

Musch, M. W., Clarke, L. L., Mamah, D., Gawenis, L. R., Zhang, Z., Ellsworth, W., ... Barrett, T. A. (2002). T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *The Journal of clinical investigation*, *110*(11), 1739–1747. doi: 10.1172/JCI15695

Nava, P., Kamekura, R., & Nusrat, A. (2013). Cleavage of transmembrane junction proteins and their role in regulating epithelial homeostasis. *Tissue Barriers*, *1*(2), e24783. doi: 10.4161/tisb.24783

Nava, P., Kamekura, R., Quirós, M., Medina-Contreras, O., Hamilton, R. W., Kolegraff, K. N., ... Nusrat, A. (2014). IFN γ -induced suppression of β -catenin signaling: evidence for roles of Akt and 14.3.3 ζ . *Molecular Biology of the Cell*, *25*(19), 2894–2904. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0512

Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraff, K., Capaldo, C. T., ... Nusrat, A. (2010). Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity*, *32*(3), 392–402. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.001

Neufert, C., Becker, C., Türeci, Ö., Waldner, M. J., Backert, I., Floh, K., ... Neurath, M. F. (2013). Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *The Journal of clinical investigation*, *123*(4), 1428–1443. doi: 10.1172/JCI63748

Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stüber, E., & Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *The Journal of experimental medicine*, *182*(5), 1281–1290. doi: 10.1084/jem.182.5.1281

Neurath, M. F., & Travis, S. P. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut*, *61*(11), 1619–1635. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302830

Nguyen, H., Ramana, C. V., Bayes, J. & Stark, G. R. (2001). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *The Journal of biological chemistry*, *276*(36), 33361–33368. doi: 10.1074/jbc.M105070200

Noah, T. K., Donahue, B., & Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research*, *317*(19), 2702–2710. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006

Nuako, K. W., Ahlquist, D. A., Mahoney, D. W., Schaid, D. J., Siems, D. M. & Lindor, N. M. (1998). Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*, *115*(5), 1079–1083. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70077-0

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, *98*(3), 694–702. doi: 10.1016/0016-5085(90)90290-h

SEP

Okayasu, I., Ohkusa, T., Kajiura, K., Kanno, J., & Sakamoto, S. (1996). Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut*, *39*(1), 87–92. doi: 10.1136/gut.39.1.87

Okayasu, I., Yamada, M., Mikami, T., Yoshida, T., Kanno, J., & Ohkusa, T. (2002). Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium- induced colitis model. *The Journal of gastroenterology and hepatology*, *17*(10), 1078–1083. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02853.x

Okumura, R., & Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, *49*(5), e338. doi: 10.1038/emm.2017.20

Organización Mundial de la Salud. (2017). *Cáncer*. Recuperado Mayo 25, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Park, C. H., Lee, B. H., Ahn, S. G., Yoon, J. H., & Oh, S. H. (2013) Serine 9 and tyrosine 216 phosphorylation of GSK-3 β differentially regulates autophagy in acquired cadmium resistance. *Toxicological Sciences*, *135*(2), 380–389. doi: 10.1093/toxsci/kft158

Pasparakis M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, *9*(11), 778-788. doi: 10.1038/nri2655

Patel, K. K., & Stappenbeck, T. S. (2013). Autophagy and intestinal homeostasis. *Annual review of physiology*, *75*, 241–262. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183658

Pereira, C., Coelho, R., Grácio, D., Dias, C., Silva, M., Peixoto, A., ... Magro, F. (2016). DNA damage and oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *10*(11), 1316–1323. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw088

Persad, A., Venkateswaran, G., Hao, L., Garcia, M. E., Yoon, J., Sidhu, J., & Persad, S. (2016). Active β -catenin is regulated by the PTEN/PI3 kinase pathway: a role for protein phosphatase PP2A. *Genes & cancer*, *7*(11-12), 368–382. doi: 10.18632/genesandcancer.128

Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V. Jr., Colombel, J. F., & Sandborn, W. J. (2011). Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(1), 471–478. doi: 10.1002/ibd.21417

Phiel, C. J., & Klein, P. S. (2001). Molecular targets of lithium action. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *41*, 789–813. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.789

Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., ... Becker, C. (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of experimental medicine*, *206*(7), 1465–1472. doi: 10.1084/jem.20082683

- Popivanova, B. K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., ... Mukaida, N. (2008).** Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of clinical investigation*, *118*(2), 560–570. doi: 10.1172/JCI32453
- Potten, C. S., Hume, W. J., Reid, P., & Cairns, J. (1978).** The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, *15* (3), 899–906. doi: 10.1016/0092-8674(78)90274-x
- Potten, C. S., Owen, G., & Booth, D. (2002).** Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *The Journal of cell science*, *115*, (Pt 11), 2381–2388.
- Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., ... Coffey, R. J. (2012).** The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, *149*(1), 146–158. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.042
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., & Coffman, R. L. (1994).** Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity*, *1*(7), 553–562.
- Priolli, D. G., Canello, T. P., Lopes, C. O., Valdivia, J. C., Martinez, N. P., Açari, D. P., ... Ribeiro, M. L. (2013).** Oxidative DNA damage and beta-catenin expression in colorectal cancer evolution. *The International Journal of colorectal disease*, *28*(5), 713-22. doi: 10.1007/s00384-013-1688-7
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., & Stappenbeck, T. S. (2005).** Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(1), 99–104. doi: 10.1073/pnas.0405979102
- Rabinovitch, P. S., Dziadon, S., Brentnall, T. A., Emond, M. J., Crispin, D. A., Haggitt, R. C., & Bronner, M. P. (1999).** Pancolonial chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Research*, *59*(20), 5148–5153.

Raup-Konsavage, W. M., Cooper, T. K., & Yochum, G. S. (2016). A Role for MYC in Lithium-Stimulated Repair of the Colonic Epithelium After DSS-Induced Damage in Mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(2), 410-422. doi: 10.1007/s10620-015-3852-0

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., ... Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 90(4), 1383-435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009

Reinisch, W., Hommes, D. W., Van Assche, G., Colombel, J. F., Gendre, J. P., Oldenburg, B., ... Pearce, T. (2006). A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut*, 55(8), 1138-1144. doi: 10.1136/gut.2005.079434

Rodriguez-Colman M. J., Schewe, M., Meerlo, M., Stigter, E., Gerrits, J., Pras-Raves, M., ... Burgering, B. M. (2017). Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature*, 543(7645), 424-427. doi: 10.1038/nature21673

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858-5868. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858

Rubio Ramírez José Fernando (2018). Daño al DNA en un modelo de colitis ulcerativa en ratones C57BL/6J. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Ciudad de México.

Ruffolo, C., Scarpa, M., Faggian, D., Basso, D., D'Incà, R., Plebani, M., ... Angriman, I. (2010). Subclinical intestinal inflammation in patients with Crohn's disease following bowel resection: a smoldering fire. *The Journal of gastrointestinal surgery*, 14(1), 24-31. doi: 10.1007/s11605-009-1070-9

Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., ... Forbes, A. (2004). Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 126(2), 451-459. doi: 10.1053/j.gastro.2003.11.010

Ryves, W. J., & Harwood, A. J. (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 720–725. doi: 10.1006/bbrc.2000.4169

Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature genetics*, 40(7), 915–920. doi: 10.1038/ng.165

Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., & Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*, 282(8), 5641–5652. doi: 10.1074/jbc.M609532200

Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., ... Rubinsztein, D. C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology*, 170(7), 1101–1111. doi: 10.1083/jcb.200504035

Sarkar, S., & Rubinsztein, D. C. (2006). Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy*, 2(2), 132–134. doi: 10.4161/auto.2387

Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S. I., Fumagalli, A., Lyubimova, A., ... Clevers, H. (2016). Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(37), E5399–E5407. doi: 10.1073/pnas.1607327113

Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., ... Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415–418. doi: 10.1038/nature09637

Sepúlveda Saavedra Julio. (2015). TEXTO ATLAS DE HISTOLOGIA BIOLOGIA CELULAR Y TISULAR. VitalSource e-Book: McGraw-Hill, 2da Edición.

Serebryanny, L. A., Yemelyanov, A., Gottardi, C. J., & de Lanerolle, P. (2017). Nuclear α -catenin mediates the DNA damage response via β -catenin and nuclear actin. *Journal of cell science*, 130(10), 1717–1729. doi: 10.1242/jcs.199893

Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(4), 197–210. doi: 10.1038/nrm3546

Shimada, K., Motoi, Y., Ishiguro, K., Kambe, T., Matsumoto, S. E., Itaya, M., ... Hattori, N. (2012). Long-term oral lithium treatment attenuates motor disturbance in tauopathy model mice: implications of autophagy promotion. *Neurobiology of disease*, *46*(1), 101–108. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.050

Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V., & Radford-Smith, G. L. (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, *57*(7), 903–910. doi: 10.1136/gut.2007.142588

Sini, P., James, D., Chresta, C., & Guichard, S. (2010). Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy*, *6*(4), 553–554. doi: 10.4161/auto.6.4.11671

Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*, *9*(1), 59–71. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x

Sørensen, C. S., & Syljuåsen, R. G. (2012). Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic acids research*, *40*(2), 477–486. doi: 10.1093/nar/gkr697

Staal, F. J., van Noort, M., Strous, G. J., & Clevers, H. C. (2002). Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO reports*, *3*(1), 63–68. doi: 10.1093/embo-reports/kvf002

Stolfi, C., Rizzo, A., Franzè, E., Rotondi, A., Fantini, M. C., Sarra, M., ... Monteleone, G. (2011). Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer. *The Journal of experimental medicine*, *208*(11), 2279–2290. doi: 10.1084/jem.20111106

Strober, W., Fuss, I. J., & Blumberg, R. S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *The Annual Review of Immunology* 20, 495–549. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816

Su, L., Nalle, S. C., Shen, L., Turner, E. S., Singh, G., Breskin, L. A., ... Turner, J. R. (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*, 145(2), 407–415. doi: 10.1053/j.gastro.2013.04.011

Tabernero, J., Rojo, F., Calvo, E., Burris, H., Judson, I., Hazell, K., ... Baselga, J. (2008). Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *The Journal of clinical oncology*, 26(10), 1603-1610. doi: 10.1200/JCO.2007.14.5482

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6061), 1420–1424. doi: 10.1126/science.1213214

Tavana, O., Puebla-Osorio, N., Kim, J., Sang, M., Jang, S., & Zhu, C. (2013). Ku70 functions in addition to nonhomologous end joining in pancreatic β -cells: a connection to β -catenin regulation. *Diabetes*, 62(7), 2429–2438. doi: 10.2337/db12-1218

Tennant, S. M., Hartland, E. L., Phumoonna, T., Lyras, D., Rood, J. I., Robins-Browne, R. M., & van Driel, I. R. (2008). Influence of gastric acid on susceptibility to infection with ingested bacterial pathogens. *Infection and immunity*, 76(2), 639–645. doi: 10.1128/IAI.01138-07

Tetteh, P. W., Farin, H. F., & Clevers, H. (2015). Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 100–108. doi: 10.1016/j.tcb.2014.09.003

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–259. doi: 10.1038/nature10408

Tilg, H., Ulmer H., Kaser A., & Weiss, G.^[1]_{SEP}(2002). Role of IL-10 for induction of anemia during

inflammation. *The Journal of immunology*, *169*(4), 2204–2209. doi: 10.4049/jimmunol.169.4.2204

Tong, Q., Vassilieva, E. V., Ivanov, A. I., Wang, Z., Brown, G. T., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2005). Interferon-gamma inhibits T84 epithelial cell migration by redirecting transcytosis of beta1 integrin from the migrating leading edge. *The Journal of immunology*, *175*(6), 4030–4038. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.4030

Trezise, A. E., Romano, P. R., Gill, D. R., Hyde, S. C., Sepúlveda, F. V., Buchwald, M., & Higgins, C. F. (1992). The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *The EMBO journal*, *11*(12), 4291–4303.

Turner J. R. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American journal of pathology*, *169*(6), 1901–1909. doi: 10.2353/ajpath.2006.060681

van der Flier, L., & **Clevers, H.** (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, *71*, 241-270. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145

van Dieren, J. M., Wink, J. C., Vissers, K. J., van Marion, R., Hoogmans, M. M., Dinjens, W. N., ... van Dekken, H. (2006). Chromosomal and microsatellite instability of adenocarcinomas and dysplastic lesions (DALM) in ulcerative colitis. *Diagnostic Molecular Pathology*, *15*(4), 216–222. doi: 10.1097/01.pdm.0000213470.92925.18^[1]_{SEP}

van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J., Hommes, D. W., Bij, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N., & Woody, J. (1995). Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*, *109*(1), 129–135. doi: 10.1016/0016-5085(95)90277-5

van Es, J. H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., ... Clevers, H. (2012). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature cell biology*, *14*(10), 1099–1104. doi: 10.1038/ncb2581

- Vézina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975).** Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics*, 28(10), 721–726. doi: 10.7164/antibiotics.28.721
- Vonica, A., Weng, W., Gumbiner, B. M., & Venuti, J. M. (2000).** TCF is the nuclear effector of the beta-catenin signal that patterns the sea urchin animal-vegetal axis. *Developmental Biology*, 17(2), 230-243. doi: 10.1006/dbio.1999.9551
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L., & Zhang, X. (2009).** NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & molecular immunology*, 6(5), 327–334. doi:10.1038/cmi.2009.43
- Wang, Y., Wang, K., Han, G. C., Wang, R. X., Xiao, H., Hou, C. M., ... Chen, G. J. (2014).** Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal Immunology*, 7(5), 1106-1115. doi: 10.1038/mi.2013.126
- Weedon, D. D., Shorter, R. G., Ilstrup, D. M., Huizenga, K. A., & Taylor, W. F. (1973).** Crohn's disease and cancer. *The New England Journal of medicine*, 289(21), 1099–1103. doi: 10.1056/NEJM197311222892101
- Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., ... Bevins, C. L. (2005).** Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18129–18134. doi: 10.1073/pnas.0505256102
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008).** JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*, 30(6), 678–688. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.001
- Willenbacher, R. F., Aust, D. E., Chang, C. G., Zelman, S. J., Ferrell, L. D., Moore, D. H., 2nd, & Waldman, F. M. (1999).** Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *The American journal of pathology*, 154(6), 1825–1830. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65438-7
- Xu, M., Yu, Q., Subrahmanyam, R., Difilippantonio, M. J., Ried, T., & Sen, J. M. (2008).** Beta-

catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo. *Molecular and cellular biology*, 28(5), 1713–1723. doi: 10.1128/MCB.01360-07

Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, 1845(1), 84–89. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002

Yang, L., Dan, H. C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X. M., Feldman, R. I., ... Cheng, J. Q. (2004). Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Research*, 64(13), 4394-4399. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0343

Yang, J., Takahashi, Y., Cheng, E., Liu, J., Terranova, P. F., Zhao, B., ... Li, B. (2010). GSK-3 β promotes cell survival by modulating Bif-1-dependent autophagy and cell death. *Journal of cell science*, 123(Pt 6), 861–870. doi: 10.1242/jcs.060475

Yang, Y., Wang, H., Wang, S., Xu, M., Liu, M., Liao, M., ... Luo, J. (2012). GSK3 β signaling is involved in ultraviolet B-induced activation of autophagy in epidermal cells. *International journal of oncology*, 41(5), 1782–1788. doi: 10.3892/ijo.2012.1620

Yang, Y., Yang, J., Liu, R., Li, H., Luo, X., & Yang, G. (2011). Accumulation of beta-catenin by lithium chloride in porcine myoblast cultures accelerates cell differentiation. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2043-2049. doi: 10.1007/s11033-010-0328-3

Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., ... Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 466–471. doi: 10.1073/pnas.1118857109

Yan, K. S., Gevaert, O., Zheng, G., Anchang, B., Probert, C. S., Larkin, K. A., ... Kuo, C. J. (2017). Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell stem cell*, 21(1), 78–90.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.06.014

Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T., & Yasukawa, H. (2012). SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 3, 20. doi: 10.3389/fimmu.2012.00020

Yousefi, B. M., Rahmati, M. Y., & Ahmadi, Y. (2016). The roles of p53R2 in cancer progression [SEP]based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21. *Life Sciences*, 99(1-2), 14–17. doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.063

Yu, D. H., Gadkari, M., Zhou, Q., Yu, S., Gao, N., Guan, Y., ... Shen, L. (2015). Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. *Genome biology*, 16, 211. doi: 10.1186/s13059-015-0763-5

Yui, S., Azzolin, L., Maimets, M., Pedersen, M. T., Fordham, R. P., Hansen, S. L., ... Jensen, K. B. (2018). YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. *Cell stem cell*, 22(1), 35–49.e7. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.001

Zhang, D., Pan, Y., Zhang, C., Yan, B. X., Yu, S. S., Wu, D. L., ... Zhang, L. H. (2013). Wnt/ β -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 374(1–2) 13–20. doi: 10.1007/s11010-012-1498-1

Zhang, D. Y., Wang, H. J., & Tan, Y. Z. (2011). Wnt/ β -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway. *PloS one*, 6(6), e21397. doi: 10.1371/journal.pone.0021397

Zhang, Y. J., Dai, Q., Sun, D. F., Xiong, H., Tian, X. Q., Gao, F. H., ... Fang, J. Y. (2009). mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 16(9), 2617–2628. doi: 10.1245/s10434-009-0555-9

Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M., & Sjölander, A. (2013). Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *The European Journal of cancer*, 49(15), 3320–3334. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.005

APÉNDICES

Apéndice A: Modelo de colitis inducida con DSS.

La interrupción de la barrera epitelial intestinal y, por lo tanto, la entrada de bacterias o antígenos bacterianos del lumen al interior de la mucosa se ha establecido como un mecanismo de enfermedad en la enterocolitis. En la década de 1990 **Hermiston y Gordonon**, fueron de los primeros investigadores en evidenciar la importancia de un epitelio intacto en la prevención de la inflamación de la mucosa. Pues, una barrera epitelial defectuosa será una entrada accesible para los microorganismos comensales, favoreciendo el establecimiento del proceso inflamatorio (**Hermiston y Gordonon, 1995**).

Un fenómeno similar ocurre en la colitis por DSS. El DSS es un polisacárido sulfatado directamente tóxico para el epitelio del colón, al dañar a las células epiteliales y provocar una respuesta inmunológica que altera la función de barrera en el epitelio de todo el colon (**Figura del Apéndice A**). Por lo tanto, la administración de DSS a ratones en su agua de bebida durante un periodo corto da como resultado la inducción de una inflamación aguda totalmente reproducible, limitada al colon y caracterizada por erosiones / úlceras, pérdida de criptas e infiltración de granulocitos (**Okayasu et al., 1990; Cooper et al., 1993**). Es importante destacar que ésta inflamación se desarrolla en ausencia de células T, mediadores de la inmunidad adaptativa (**Dieleman et al., 1994; Krieglstein et al., 2002**), esto indica que las citocinas efectoras producidas por las células del sistema inmunológico innato son suficientes para causar la inflamación. Sobre esta base, la colitis por DSS se ha convertido en un modelo útil para el estudio de los mecanismos inmunológicos innatos involucrados en el desarrollo de la inflamación intestinal. De hecho, varios estudios han resaltado los papeles críticos que desempeñan las células innatas, como los macrófagos y los neutrófilos, en la inflamación de la mucosa (**Dieleman et al., 1994; Dieleman et al., 1998; Krieglstein et al., 2002; Fukata et al., 2005; Pull et al., 2005; Chami et al., 2014**). Esto ha llevado a comprender que los neutrófilos son de gran importancia para incrementar el daño tisular, y que los macrófagos son fuentes importantes de citocinas pro-inflamatorias, así como de citocinas que regulan la función barrera del epitelio intestinal y la proliferación celular.

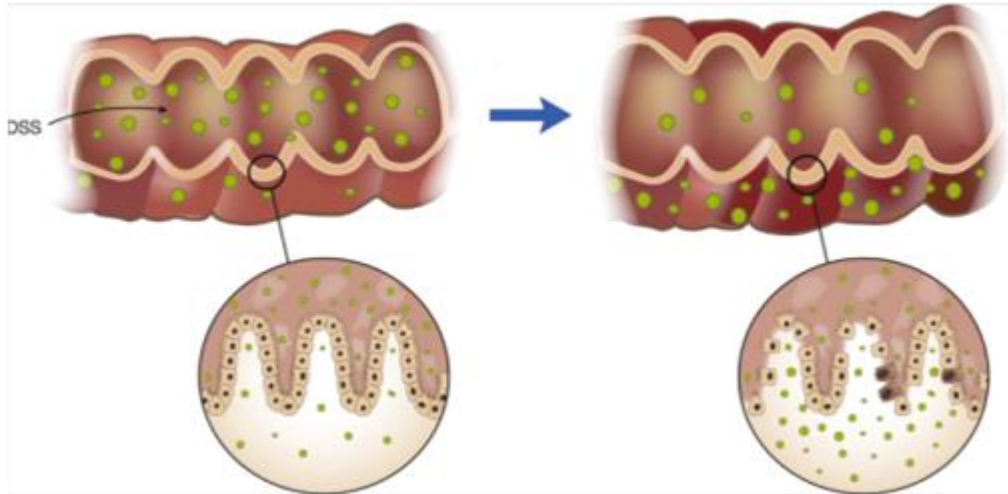


Figura del Apéndice A. Modelo de colitis experimental con dextrán sulfato de sodio (DSS). La colitis por DSS es esencialmente una colitis debida a la pérdida de la función de la barrera epitelial y la entrada de los microorganismos lumbinales o sus productos en la lámina propia. Dicha entrada da como resultado la estimulación de elementos linfoides innatos y adaptativos y la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. Además, da lugar a la afluencia de células con potencial citotóxico como los neutrófilos y los macrófagos inflamatorios.

A pesar de que la colitis por DSS es causada principalmente por la interrupción del epitelio y la activación de macrófagos y neutrófilos en la ausencia de la inmunidad adaptativa, se debe tener siempre en consideración que las respuestas de las células T pueden agravar la respuesta inflamatoria cuando la inmunidad tanto innata como adaptativa están intactas. Se observó una respuesta T_H1 polarizada en la colitis aguda, mientras que se encontró una respuesta T_H1 / T_H2 mixta en una forma crónica de colitis por DSS, lograda por ciclos repetidos de administración de DSS (**Dieleman *et al.*, 1998**). En consecuencia, las células T producen citocinas efectoras que favorecen a los altos niveles de $TNF-\alpha$ e IL-6 producidos por los macrófagos en ambas formas de colitis por DSS. La colitis inducida por DSS ha contribuido en el estudio de muchos de los atributos de la inflamación intestinal. Sin embargo, no se debe suponer que este modelo es un imitador preciso de la EII humana, ya que es poco probable que el daño masivo de las células epiteliales y la invasión generalizada de la lámina propia por parte de los microorganismos sea un mecanismo primario de la enfermedad humana. Ésta diferencia entre la colitis por DSS y la EII humana también se refleja en el hecho de que la colitis crónica por DSS se caracteriza por una

respuesta de citocinas pro-inflamatorias mixtas de las células T, mientras que la EII humana crónica se caracteriza por respuestas de las células T polarizadas. Particularmente en el estudio de los defectos primarios de las células epiteliales como un mecanismo de iniciación de la EII humana, la colitis por DSS debe usarse con precaución, ya que causa una lesión más extendida e indiscriminada de lo que probablemente ocurra en la enfermedad humana (**Kiesler *et al.*, 2015**).

Apéndice B: Autofagia: mTOR-dependiente y mTOR-independiente.

Las dos principales rutas para la eliminación y el reciclaje de proteínas y organelos en las células eucariotas ocurren mediante mecanismos que involucran la ubiquitinación y al proteosoma o la autofagia y el lisosoma. Los proteosomas degradan predominantemente las proteínas nucleares y citosólicas de vida corta y tamaño pequeño (menos a 50 kDa). La degradación de la mayor parte de las proteínas de vida-media larga y organelos está mediada por la macroautofagia, generalmente conocida como autofagia (**Klionsky y Emr, 2000**). La palabra autofagia se deriva de las raíces griegas “auto” (uno mismo) y “phagos” (comer) y se refiere a los procesos celulares catabólicos en los que determinado material celular se transporta a los lisosomas para su degradación o reciclaje. Christian de Duve, galardonado con el Premio Nobel por su trabajo en lisosomas, empleó por primera vez el término autofagia en 1963. Utilizó la palabra para describir el fenómeno asociado con vesículas de una o dos membranas con contenido citoplasmático, incluidos los organelos, en distintas etapas de digestión (**Ravikumar et al., 2010**).

La autofagia es un proceso celular altamente conservado mediante el cual los componentes citoplasmáticos son secuestrados en autofagosomas y se fusionan con los lisosomas para su degradación (**Guan et al., 2013**). Consta de cuatro etapas: iniciación, elongación, maduración y fusión (**Figura de Apéndice B**). Este proceso inicia mediante la formación de una estructura membranal en forma de copa (el fagóforo) en el citoplasma. El fagóforo acumula proteínas que permiten que la membrana se alargue y forme una estructura de doble membrana llamada autofagosoma. Una parte del citoplasma está encerrada en el autofagosoma junto a los componentes celulares que se degradarán. Los autofagosomas son transportados por los microtúbulos hacia la región perinuclear de la célula (donde los lisosomas están agrupados) para aumentar la probabilidad de la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Después de la fusión con los lisosomas, el contenido del autolisosoma es degradado por las hidrolasas lisosómicas ácidas o es reciclado. La H⁺-ATPasa vacuolar (también llamada V-ATPasa) es una bomba de protones que reside en la membrana lisosomal y permite la acidificación del contenido autolisosómico. La

acidificación es crucial para la activación de las enzimas lisosomales, como las catepsinas u otras hidrolasas ácidas, que son responsables de la proteólisis de los componentes en el autofagolisosoma (Metcalf *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2013; Motoi *et al.*, 2014).

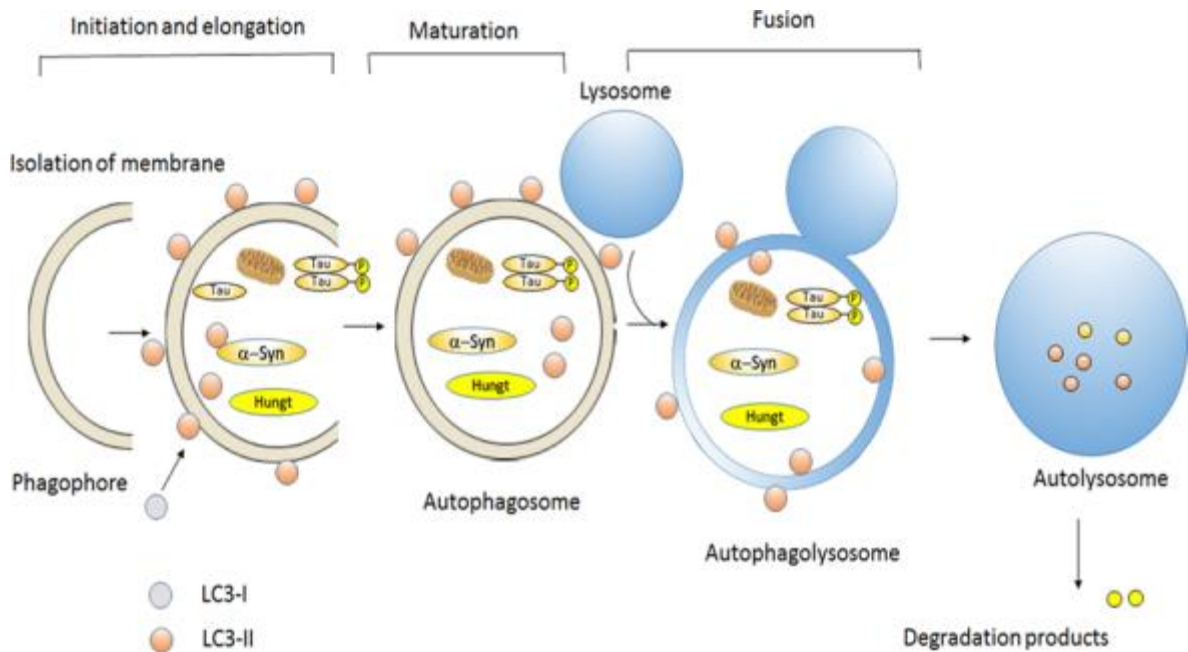


Figura del Apéndice B. Etapas de la autofagia. Una porción del citoplasma, incluyendo los organelos, es encerrada por una membrana de aislamiento. Al elongarse ésta membrana, la proteína LC3 se escinde en su extremo carboxilo-terminal para formar LC3-I citosólica. Esta proteína se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II, ayudando al cierre de la membrana para formar el autofosoma. Los autofosomas finalmente se fusionan con los lisosomas. Después, la hidrolasa lisosomal degrada los sustratos contenidos en los autofagolisosomas (Tomada de Motoi *et al.*, 2014).

La autofagia se activa bajo condiciones de inanición o privación de los nutrientes, con la finalidad de catabolizar sustratos celulares, y generar energía. Al ser la encargada del reciclaje, la autofagia es crucial para mantener la homeostasis celular y regular procesos celulares fundamentales, como la muerte celular, la proliferación celular, la inflamación y numerosas funciones innatas y adaptativas del sistema inmunológico. Por ello, las perturbaciones en la autofagia se han asociado con numerosas enfermedades y procesos patológicos, que incluyen neurodegeneración, cáncer, envejecimiento, infecciones,

inflamación cardiovascular y enfermedades autoinmunes, como la EII. La relación entre la autofagia y la patogénesis de las enfermedades es un área de intensa investigación. Su estudio se complica porque la autofagia puede ser protectora o dañina, dependiendo del contexto biológico (**Guan *et al.*, 2013; Patel y Stappenbeck, 2012**).

La formación del autofagosoma está regulada por muchas señales que se dividen en dos grandes categorías: mTOR-dependiente y mTOR-independiente. mTOR es un supresor de la autofagia "clásica", que actúa bloqueando la actividad del complejo ULK1. La actividad de mTOR depende de varias señales ascendentes que incluyen el estado de energía y el estado de los nutrientes de la célula y factores de crecimiento (**Laplante y Sabatini, 2012a; Laplante y Sabatini, 2012b**). Las vías que actúan independientemente de mTOR incluyen a la cinasa AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), la enzima activada por estrés JNK1 (Jun N-terminal kinase 1), proteínas solo-BH3 (Bcl-2 homólogas 3, miembros de la familia Bcl-2 que comparten solo el "dominio BH3"), el receptor de inositol IP₃R (1,4,5-trisphosphate receptor), Erk 1 / 2 y Calcio (**Criollo *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008**). La autofagia también puede ser inducida farmacológicamente al inhibir a sus reguladores negativos como mTOR, mediante la rapamicina o bien por inductores de la autofagia independientes de mTOR tales como la trehalosa (**Sarkar *et al.*, 2007; Guertin^[L]_{SEPI} y Sabatini, 2009**).

Apéndice C: Cloruro de Litio (LiCl): Mecanismo de acción.

El litio se ha usado clínicamente para tratar trastornos bipolares durante más de medio siglo, y se han descrito sus diversas propiedades neuroprotectoras y neurotróficas. **Sarkar et al.** reportaron, por primera vez, que la autofagia inducida por litio mejora la degradación de la mutante de Huntingtina mediante una vía independiente de mTOR en las células precursoras neuronales y las no neuronales (**Sarkar et al., 2007**). Desde entonces, se ha descrito la regulación de la autofagia por el litio en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, como la enfermedad de Huntington (ED), la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad priónica y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Sin embargo, la vía de señalización para explicar la regulación de la autofagia dependiente del litio no ha sido descrita de manera consistente. Además, el litio no regula positivamente la autofagia en todas las condiciones patológicas. En un trastorno como la isquemia cerebral o la EA, se ha demostrado que el litio la regula negativamente (**Motoi et al., 2014; Ravikumar et al., 2010; Shimada et al., 2012**).

El litio también induce la autofagia mTOR-independiente a través de la inhibición de la inositol monofosfatasa (IM-Pase) (**Phiel y Klein, 2001; Sarkar y Rubinsztein, 2006**). El litio afecta esta vía al inhibir a la IMPasa, lo que lleva a una reducción del inositol libre, que a su vez disminuye el nivel de mio-inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) (**Motoi et al., 2014**). El aumento del nivel de inositol o IP₃, así como la estimulación de su receptor (IP₃R) inhiben a la autofagia, y el litio es capaz de revertir este efecto (**Criollo et al., 2007; Sarkar et al., 2005**).

Por otro lado, el litio es un inhibidor directo (**Ryves y Harwood, 2001**) e indirecto (**Chalecka-Franasze y Chuang, 1999**) de la cinasa GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β), que tiene una amplia gama de funciones celulares como la regulación de procesos como la muerte celular, el ciclo celular y la carcinogénesis, entre otras. La actividad de GSK3 β está regulada positivamente por la fosforilación en el residuo de Tyr²¹⁶, y por el contrario, la fosforilación en la Ser⁹ inhibe su actividad. GSK3 β Tyr²¹⁶ (forma activa) regula negativamente la autofagia (**Yang et al., 2012; Park et al., 2013**). Por lo tanto, la

inhibición de GSK3 β por LiCl promueve la autofagia, al disminuir su forma activa y promover su forma inactiva (GSK3 β fosforilada en la Ser⁹), esto tiene como consecuencia un incremento de Bif-1 (bax interacting factor 1) que favorece la interacción con el complejo Beclina-1-VPS34, resultando en la inducción de la autofagia (**Etxebarria *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010**).

Apéndice D: DAI (Disease Activity Index).

Score	Weight loss	Stool consistency	Bleeding
0	none	normal	no bleeding
1	1-5%	-	-
2	5-10%	loose stools	slight bleeding
3	10-15%	-	-
4	more than 15%	watery diarrhea	gross bleeding

Tabla del Apéndice D. Puntuación para obtener el Índice de la Actividad de la Enfermedad (DAI). El puntaje final se obtiene promediando el valor de cada uno de los tres parámetros: Pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado rectal. Al evaluar cada parámetro se asigna un puntuación que va de 0 a 4 en el caso de la pérdida de peso y de 0, 2 o 4 en el caso de la consistencia de las heces y el sangrado rectal, según aumente la severidad del daño observado en cada uno. Se recomienda realizar ésta valoración diariamente durante el tratamiento con DSS, para un mayor control y reporte de la actividad de la enfermedad. (Tomado de **da Costa Gonçalves *et al.*, 2013**).

ANEXOS

Anexo 1: “mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development”

mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development



I.Z. Gutiérrez-Martínez^{*,1}, J.F. Rubio^{*,1},
Z.L. Piedra-Quintero^{†,1}, O. Lopez-Mendez^{*},
C. Serrano^{*}, E. Reyes-Maldonado[‡],
C. Salinas-Lara[§], A. Betanzos[¶], M. Shibayama[¶],
A. Silva-Olivares[¶], A. Candelario-Martínez^{*},
M.A. Meraz-Ríos[¶], M. Schnoor[¶],
N. Villegas-Sepúlveda[¶] and P. Nava^{*}

^{*}Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Cinvestav, Zacatenco, Mexico City, Mexico, C.P. 07360; [†]Department of Molecular Biomedicine, Cinvestav, Zacatenco, Mexico City, Mexico, C.P. 07360; [‡]Department of Morphology, National School of Biological Sciences, National Polytechnic, Mexico City, Mexico, C.P. 11340; [§]Histology and Pathology Unit, Surgery and Medicine School, FES Iztacala, UNAM, Tlalnequantepec, Mexico, C.P. 54090; [¶]Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Cinvestav, Zacatenco, Mexico City, Mexico, C.P. 07360

Abstract

Epithelial cells lining the intestinal mucosa constitute a selective-semipermeable barrier acting as first line of defense in the organism. The number of those cells remains constant during physiological conditions, but disruption of epithelial cell homeostasis has been observed in several pathologies. During colitis, epithelial cell proliferation decreases and cell death augments. The mechanism responsible for these changes remains unknown. Here, we show that the pro-inflammatory cytokine IFN γ contributes to the inhibition of epithelial cell proliferation in intestinal epithelial cells (IECs) by inducing the activation of mTORC1. Activation of mTORC1 in response to IFN γ was detected in IECs present along the crypt axis and in colonic macrophages. mTORC1 inhibition enhances cell proliferation, increases DNA damage in IEC. In macrophages, mTORC1 inhibition strongly reduces the expression of pro-inflammatory markers. As a consequence, mTORC1 inhibition exacerbated disease activity, increased mucosal damage, enhanced ulceration, augmented cell infiltration, decreased survival and stimulated tumor formation in a model of colorectal cancer CRC associated to colitis. Thus, our findings suggest that mTORC1 signaling downstream of IFN γ prevents epithelial DNA damage and cancer development during colitis.

Translational Oncology (2019) 12, 24–35

Introduction

Intestinal epithelial cells (IEC) form a selective barrier that separates luminal contents from the underlying tissue, thus maintaining a functional barrier requires the number of IEC to remain constant. Therefore, a perfect balance between proliferating and dying cells is essential for maintaining epithelial homeostasis and proper function of the intestinal epithelium. Disruption of IEC homeostasis actively contributes to development and establishment of several pathologies, including inflammatory bowel diseases (IBD) and colorectal cancer [1].

Address all correspondence to: Porfirio Nava or Carolina Serrano, Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Cinvestav Zacatenco, Av. Instituto Politécnico Nacional #2508, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico City, Mexico, 07360. E-mail: pnava@fisio.cinvestav.mx, serrano.cisg@gmail.com

[†]These authors contributed equally to this work.

Received 24 July 2018; Revised 27 August 2018; Accepted 27 August 2018

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1936-5233

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

Anexo 2: “pVHL supresses Akt/ β -catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3 ζ expression”

Biochemical Journal (2017) 474 2679–2689
DOI: 10.1042/BCJ20161097



Research Article

pVHL suppresses Akt/ β -catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3 ζ expression

Azucena Castañeda^{1,*}, Carolina Serrano^{1,*}, José Antonio Hernández-Trejo^{1,*}, Itzel Zenidel Gutiérrez-Martínez¹, Wilber Montejó-López¹, Mauricio Gómez-Suárez¹, Marcela Hernández-Ruiz², Abigail Betanzos³, Aurora Candelario-Martínez¹, Hector Romo-Parra⁴, José Antonio Arias-Montaña¹, Michael Schnoor², Marco Antonio Meraz Ríos², María Eugenia Gutierrez-Castillo⁵, Irma Alicia Martínez-Dávila¹, Nicolás Villegas-Sepúlveda², Daniel Martínez-Fong¹ and Porfirio Nava¹

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN. Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México DF. C.P. 07360, Mexico; ²Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, IPN. Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México DF. C.P. 07360, Mexico; ³Departamento de Infectómica y patógenesis molecular del CINVESTAV, IPN. Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México DF. C.P. 07360, Mexico; ⁴Universidad Anahuac, Facultad de Psicología, Av. Universidad Anáhuac 46, Lomas Anáhuac, 52786 Naucalpan de Juárez, Mexico; and ⁵Departamento de Biociencias e Ingeniería, CIEMAD-IPN, 30 de Junio de 1520 s/n, La Laguna Ticoman, México DF. C.P. 07340, Mexico

Correspondence: Porfirio Nava (pnava@fisio.cinvestav.mx)

The mechanisms controlling degradation of cytosolic β -catenin are important for regulating β -catenin co-transcriptional activity. Loss of von Hippel-Lindau protein (pVHL) has been shown to stabilize β -catenin, increasing β -catenin transactivation and β -catenin-mediated cell proliferation. However, the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt in the regulation of β -catenin signaling downstream from pVHL has never been addressed. Here, we report that hyperactivation of PI3K/Akt in cells lacking pVHL contributes to the stabilization and nuclear accumulation of active β -catenin. PI3K/Akt hyperactivation is facilitated by the up-regulation of 14-3-3 ζ and the down-regulation of 14-3-3 ϵ , 14-3-3 η and 14-3-3 θ . Up-regulation of 14-3-3 ζ in response to pVHL is important for the recruitment of PI3K to the cell membrane and for stabilization of soluble β -catenin. In contrast, 14-3-3 ϵ and 14-3-3 η enhanced PI3K/Akt signaling by inhibiting PI3K and PDK1, respectively. Thus, our results demonstrated that 14-3-3 family members enhance PI3K/Akt/ β -catenin signaling in order to increase proliferation. Inhibition of Akt activation and/or 14-3-3 function strongly reduces β -catenin signaling and decreases cell proliferation. Thus, inhibition of Akt and 14-3-3 function efficiently reduces cell proliferation in 786-0 cells characterized by hyperactivation of β -catenin signaling due to pVHL loss.

Introduction

β -Catenin, a major component of adherens junctions, links the actin cytoskeleton with the transmembrane molecule E-cadherin (E-cad). In addition, β -catenin is a co-transcription factor that regulates the expression of several genes implicated in proliferation, differentiation and cell fate [1]. Free soluble β -catenin at the cytosol interacts with TCF (T-cell factor) and lymphoid enhancer factor transcription factors; such interaction enhances β -catenin co-transcriptional activity and β -catenin-mediated cell proliferation [2,3]. Therefore, high levels of cytosolic β -catenin often result in hyperactivation of TCF/ β -catenin signaling and consequently cancer development. Thus, reducing cytosolic free β -catenin levels to inhibit β -catenin-mediated transcription has been proposed as a therapy for cancer treatment [4].

Cytoplasmic β -catenin levels are regulated by the 'destruction complex' formed by the tumor suppressors Axin, adenomatous polyposis coli, casein kinase 1 (CK1), glycogen synthase kinase 3 (GSK3) and the E3-ubiquitin ligase β -TrCP (β -transducing repeat-containing protein). Amino-terminal phosphorylation of β -catenin by CK1 and GSK3 results in its ubiquitination and degradation via the proteasome [5]. However, in cancer cell lines with hyperactivation of β -catenin signaling, failure to

*These authors contributed equally to this work.

Received: 4 January 2017
Revised: 16 June 2017
Accepted: 28 June 2017

Accepted Manuscript online:
30 June 2017
Version of Record published:
27 July 2017

Anexo 3: “The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium”

Biochemical Journal (2016) 473 3805–3818
DOI: 10.1042/BCJ20160390



Research Article

The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium

José Antonio Hernández-Trejo^{1,*}, Dimelza Suárez-Pérez^{2,*}, Itzel Zenidel Gutiérrez-Martínez^{1,*}, Omar Eduardo Fernández-Vargas¹, Carolina Serrano¹, Aurora Antonia Candelario-Martínez¹, Marco Antonio Meraz-Ríos³, Alí Francisco Citalán-Madrid³, Marcela Hernández-Ruiz³, Elba Reyes-Maldonado², Ricardo Valle-Ríos^{4,5}, Jacobo H. Feintuch-Unger⁶, Michael Schnoor³, Nicolás Villegas-Sepúlveda³, Oscar Medina-Contreras⁵ and Porfirio Nava¹

¹Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Cinvestav Zacatenco, Av. Instituto Politécnico Nacional #2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico; ²Department of Morphology, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 Mexico City, Mexico; ³Department of Molecular Biomedicine, Cinvestav Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico; ⁴Research Division, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico; ⁵Immunology and Proteomics Laboratory, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez #162, Col. Doctores, 06720 Mexico City, Mexico; and ⁶General Hospital I Ticomán, 07330 Mexico City, Mexico

Correspondence: Porfirio Nava (pnava@fisioc.cinvestav.mx) or Oscar Medina-Contreras (omedina@himfg.edu.mx)

The gastrointestinal tract is the largest hormone-producing organ in the body due to a specialized cell population called enteroendocrine cells (EECs). The number of EECs increases in the mucosa of inflammatory bowel disease patients; however, the mechanisms responsible for these changes remain unknown. Here, we show that the pro-inflammatory cytokines interferon γ (IFN γ) and tumor necrosis factor α (TNF α) or dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis increase the number of EECs producing chromogranin A (CgA) in the colonic mucosa of C57BL/6J mice. CgA-positive cells were non-proliferating cells enriched with inactive phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) and autophagy markers. Moreover, inhibition of Akt and autophagy prevented the increase in CgA-positive cells after IFN γ /TNF α treatment. Similarly, we observed that CgA-positive cells in the colonic mucosa of patients with colitis expressed Akt and autophagy markers. These findings suggest that Akt signaling and autophagy control differentiation of the intestinal EEC lineage during inflammation.

Introduction

The intestinal epithelium acts as a barrier that separates luminal contents from the underlying tissue. Therefore, the presence of a mechanism that allows the intestinal epithelium sensing the luminal contents is necessary for its proper function. The enteroendocrine cells (EECs), the main components of the enteroendocrine system, are the transducers that perform that task. The enteroendocrine system in the human gastrointestinal tract is formed by at least 15 subtypes of EEC, which comprise only 1% of the terminally differentiated intestinal cells, but produce several hormones with major roles in homeostasis, food intake, intestinal motility and innate immunity [1–3]. The shape of the EECs allows them to act as luminal sensors that can release biological mediators in the basolateral side of the epithelium, so they can diffuse as far as the brain. Thus, the autocrine, paracrine, neurocrine and endocrine effect of EEC peptides in response to luminal content, such as nutrients and gut microbiota, are important in the maintenance of intestinal homeostasis [4,5]. To fulfill these functions, EECs are scattered as single cells throughout the crypt axis of the intestinal tract.

*These authors contributed equally to this work.

Received: 27 April 2016

Revised: 1 August 2016

Accepted: 18 August 2016

Accepted Manuscript online:

18 August 2016

Version of Record published:

27 October 2016

Anexo 4: “14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells”



Cell Death and Differentiation (2016) 23, 1060–1072
© 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1350-9047/16
www.nature.com/cdd

14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells

M Gómez-Suárez^{1,7}, IZ Gutiérrez-Martínez^{1,7}, JA Hernández-Trejo^{1,7}, M Hernández-Ruiz², D Suárez-Pérez^{3,4}, A Candelario¹, R Kamekura⁵, O Medina-Contreras⁶, M Schnoor², V Ortiz-Navarrete², N Villegas-Sepúlveda², C Parkos⁵, A Nusrat⁵ and P Nava^{*1}

Akt activation has been associated with proliferation, differentiation, survival and death of epithelial cells. Phosphorylation of Thr308 of Akt by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) is critical for optimal stimulation of its kinase activity. However, the mechanism(s) regulating this process remain elusive. Here, we report that 14-3-3 proteins control Akt Thr308 phosphorylation during intestinal inflammation. Mechanistically, we found that IFN γ and TNF α treatment induce degradation of the PDK1 inhibitor, 14-3-3 η , in intestinal epithelial cells. This mechanism requires association of 14-3-3 ζ with raptor in a process that triggers autophagy and leads to 14-3-3 η degradation. Notably, inhibition of 14-3-3 function by the chemical inhibitor BV02 induces uncontrolled Akt activation, nuclear Akt accumulation and ultimately intestinal epithelial cell death. Our results suggest that 14-3-3 proteins control Akt activation and regulate its biological functions, thereby providing a new mechanistic link between cell survival and apoptosis of intestinal epithelial cells during inflammation.

Cell Death and Differentiation (2016) 23, 1060–1072; doi:10.1038/cdd.2015.163; published online 5 February 2016

Mucosal cytokines alter epithelial homeostasis during inflammatory bowel diseases (IBD) by triggering several signaling pathways. Previously, we have reported that IFN γ activates or inhibits epithelial cell proliferation by modulating β -catenin signaling pathway downstream of Akt¹ in a mechanism that relies in the presence and phosphorylation of the scaffolding protein 14-3-3 ζ .² The 14-3-3 family of adaptor proteins consists of seven members that associate with its client proteins mostly through phospho-serine/threonine motifs phosphorylated by serine/threonine kinases such as the AGC kinase Akt/PKB.³ Each 14-3-3 protein can interact with several targets and can also form homo or heterodimers with other family members in order to regulate biological processes, such as proliferation, differentiation and apoptosis.^{3,4} Therefore, 14-3-3 proteins are likely an important part of the machinery that regulates intestinal epithelial cell (IEC) homeostasis during physiological and pathological conditions.

Akt proteins (also known as PKB) are serine-threonine kinases that regulate cell survival, proliferation, metabolism and migration.⁵ Akt family encompasses three highly conserved proteins: Akt1, Akt2 and Akt3 that are the primary downstream mediators of PI3K.⁶ All three Akt isoforms possess a pleckstrin homology (PH) domain at the N-terminal region, followed by a central kinase domain and a C-terminal

regulatory domain.⁶ Full Akt activation requires direct interaction of its PH domain with PtdIns(3,4,5)P₃ that is mainly enriched at microdomains of the plasma membrane.⁶ At the plasma membrane, Akt is phosphorylated in two key residues, Threonine (Thr)308 (activation loop) and Serine (Ser)473 (C-terminal extension). Phosphorylation of Akt at Thr308 is mediated by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), a serine/threonine kinase that phosphorylates several AGC kinase family members, including p70S6 kinase, p90S6 kinase and Akt.⁷ PDK1 activation requires auto-phosphorylation of the residue Ser241 and is regulated by its association with several proteins including: HSP90,⁸ RSK2⁹ and 14-3-3 family members.¹⁰ By contrast, the phosphorylation of Akt at Ser473 is mediated mainly by mTORC2,¹¹ but can also be achieved by other kinases, including integrin-linked kinase (ILK),¹² protein kinase C (PKC ϵ)¹³ and by auto-phosphorylation.¹⁴ Phosphorylation of Thr308 has been proposed to be a critical regulatory event for Akt activation.¹⁵ Once activated, Akt phosphorylates numerous substrates throughout the cell to regulate multiple cellular events and processes such as proliferation, differentiation and cell survival.

Deregulation of Akt kinases is frequently observed in human diseases such as cancer and diabetes,⁶ and our previous results have shown that Akt1 affects cell proliferation and

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, DF CP07360, México; ²Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, DF CP07360, México; ³Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, México, DF, México; ⁴PROINMED, FES Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios #1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México; ⁵Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, 48109 MI, USA and ⁶Laboratorio de Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México ‘Federico Gómez’, México, DF 06720, México

*Corresponding author: P. Nava, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, DF CP07360, México. Tel: +52 5557473800; Fax: +404 727 3321; E-mail: pnava@fisioc.cinvestav.mx

⁷These authors contributed equally to this work.

GS-M, GM-IZ, HT-JA, HR-M, C-A, K-R, MC-O and N-P performed experimental procedures, data interpretation and prepared images. SP-D and N-P performed immunofluorescences. GM-IZ, HT-JA, HR-M and N-P performed animal procedures. S-M, VS-N, ON-V, P-C, N-A and N-P supervised research and project planning, data interpretation and preparation of the manuscript.

Abbreviations: GSK3, glycogen synthase kinase 3; Lef, lymphoid enhancer factor; NLS, nuclear localization signal; Tcf, T-cell factor; IEC, intestinal epithelial cell; IFN γ , interferon gamma; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1; TNF α , tumor necrosis factor alpha; PH, Plekstrin homology; CQ, chloroquine

Received 10.6.15; revised 14.11.15; accepted 24.11.15; Edited by RA Knight; published online 05.2.16