



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

UNIDAD ZACATENCO

**Departamento de Fisiología, Biofísica y
Neurociencias**

**“Análisis de las células secretoras del
epitelio intestinal en un modelo de colitis
experimental”**

T E S I S

Que presenta

JOSE ANTONIO HERNANDEZ TREJO

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

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

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

Ciudad de México, México

Octubre, 2019

Este 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. Porfirio Nava Domínguez.

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

Agradecimientos

Agradezco a las personas que contribuyeron de manera directa o indirecta para que realizara este trabajo:

Al *Dr. Gerardo Contreras* por sus consejos, por ser la única persona que escuchó y siempre me hizo ver el lado positivo de las cosas y me enseñó a ser un científico más allá de un laboratorio. Gracias por brindarme su sabiduría.

Al *Dr. Nicolás Villegas* por esas charlas que me permitieron entender tantas cosas, por permitirme ser su alumno y compartirme un poco de su magnífica visión de la ciencia.

Al *Dr. Oscar Medina* por haber revisado la tesis y el apoyo con el manuscrito. Por sus comentarios y siempre ser tan amable con Itzel y conmigo.

Al *Dr. Marcos Nahmad* por aceptar ser mi tutor.

A todos mis profesores, especialmente al *Dr. Gerardo Contreras*, la *Dra. Lorenza González*, el *Dr. Marcelino Crejido* el *Dr. Antonio Arias*, el *Dr. Nicolás Villegas*, la *Dra. Refugio García*, el *Dr. Jorge Quevedo*, el *Dr. Saúl Villa* y la *Dra. Liora Shoshani* y a los integrantes de sus laboratorios que siempre tuvieron las puertas abiertas para mí y que de forma directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mi maestra, la Bióloga *Samia Fattel Fazenda* porque desde mi llegada al Cinvestav ella me instruyó en la investigación y aún después de su partida sigue haciéndolo. Gracias por tu cariño y gran inteligencia para diseñar experimentos. Gracias por todo.

A *María de Lourdes Alarcón Mortera* y *Dolores Martín Tapia* por todas las veces que acudí a ustedes por consejos y apoyo técnico y siempre ayudarme. Gracias por enseñarme a cortar tejido de forma magistral. Ojalá que cada laboratorio tuviera la fortuna de tener gente como ustedes.

Al Biólogo *Raúl Bonilla Moreno* por su apoyo técnico, pero especialmente por haber tenido la paciencia para enseñarme biología molecular. Nunca olvidaré tu amabilidad y humanidad.

A *Leticia Alemán Lazarini* por ayudarme a operar el microscopio confocal y donde tomamos algunas fotos hermosas para éste y otros proyectos.

A la M. en C. *Erika Rosales Cruz* por su asistencia técnica, gentileza y paciencia para enseñarme a utilizar el Microscopio LSM5... innumerables veces.

Al Laboratorio de la *Dra. Lorenza Gonzales Mariscal* que fue el lugar al que siempre acudí en busca de ayuda y consejo. Gracias a todos mis amigos, ustedes fueron como hermanos de laboratorio. *Misa, Helios, Gaby, Mario, Arturin, Miguel, Mike*. Por supuesto, gracias a la Dra. por ser la inspiración para que trabajara en este departamento.

A mis compañeros. *Mauricio*, por compartir tantos desvelos con *Itzel* y conmigo; por nunca abandonarnos y enseñarnos todas las técnicas, llegamos a ser el mejor equipo sin duda. Gracias por enseñarnos a ser independientes. A *Azu, Caro, Juan Carlos, Omar, Diego, Sandrita, Memo y Normita* quienes hicieron que la carga fuera menor y mucho más divertida. A mi gran amiga *Dim*, gracias por enseñarme a enfocarme y ser la mejor compañera de oficina.

A mis compañeros de generación *Itzel, Misa, Elvia, Javis, Wilber y Helios*.

A mis grandes amigos *Misa y Clau*. No encontraré forma de agradecerles por recibirnos a *Itzel* y a mí tantas noches y madrugadas con comida y algo de beber. Por escucharnos, animarnos y reemplazar nuestros problemas, frustraciones y preocupaciones por muchas risas y alegrar nuestras almas.

A *Godz, Blond y Malik*, los mejores amigos que alguien puede desear, por apoyarme en cada una de mis ocurrencias y nunca dejarme caer solo. Por siempre estar al pendiente de mí e impulsarme y nunca haber perdido la fe en mí.

A Jacobo, por cambiar mi manera de ver al mundo.

A mis padres y hermanas, a quienes les debo todo.

A *Itzel y Gaby*

A Dios y la Virgen, por supuesto.

Dedicatorias

Dedico con profundo cariño este trabajo a las siguientes personas:

A mis hermanas, por ser el mejor ejemplo y el mayor apoyo. Por rescatarme. Por siempre marcar la pauta e innovar. Por escuchar cuanta locura se me ocurrió y apoyarme a pesar de ello... No me alcanzará la vida para pagarles, pero esto va para ustedes.

A mis padres quienes me enseñaron a vivir con valor, ética y honestidad. Que nunca dejaron de creer en mí y siempre me animaron a continuar. Por darme todo el amor y comprensión que un niño puede desear y necesitar. Por ser mis superhéroes. Por heredarme los genes necesarios y brindarme el ambiente idóneo para convertirme en científico. Por cierto, gracias por el juego de química y el microscopio...

A Itzel. No sé qué hice para merecerlo y qué hizo que nos encontráramos, pero afortunadamente sucedió y conocí a la mejor compañera, amiga, novia y científica. Nunca olvidaré nuestros años como estudiantes porque definitivamente fueron increíbles a tu lado, y pudimos crear cosas maravillosas...

Y, sin duda, volvería a pasarlo junto a ti. Para ti cariño.

A mis entrañables amigos Godz, Malik, Blond, y Mari que siempre van conmigo.

A ti, porque me diste la esperanza para continuar.

Índice General

Agradecimientos	IV
Dedicatorias	VI
Índice General	VII
Índice de Tablas	X
Índice de Figuras	X
Abreviaturas	XI
Resumen	XII
Abstract	XII
1. Introducción	1
1.1 El intestino	2
1.2 Características histológicas del intestino	3
1.2.1 La capa mucosa	3
1.2.2 La capa submucosa	4
1.2.3 La capa muscular	4
1.2.4 La capa serosa	4
1.3 Organización estructural del intestino	4
1.3.1 Las criptas de Lieberkühn	5
1.3.2 Las vellosidades del intestino delgado	5
1.4 El epitelio intestinal	6
1.4.1 Los enterocitos	8
1.4.2 Las células de Goblet	9
1.4.3 Las células Tuft	9
1.4.4 Las células enteroendócrinas	9
1.4.4.1 Las células enterocromafines	11
1.4.4.2 Las células L	12
1.4.4.3 Las células D	12
1.5 La homeostasis del epitelio intestinal	12
1.6 La especialización de las células del epitelio intestinal	14
1.7 Las enfermedades inflamatorias intestinales	15
1.7.1 Patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales	16
1.7.2 Las citocinas en las enfermedades inflamatorias intestinales	18
1.8 La vía de señalización PI3K/Akt	20
1.9 La autofagia	22
2. Objetivos	24
2.1 Justificación	25
2.2 Hipótesis	25
2.3 Objetivo general	25
2.4 Objetivos particulares	25

3. Materiales y métodos	26
3.1 Materiales	27
3.1.1 Anticuerpos	27
3.1.2 Biológicos	28
3.1.3 Equipo	28
3.1.4 Reactivos	28
3.1.5 Inhibidores	28
3.1.6 Citocinas	28
3.1.7 Soluciones	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Acondicionamiento de los ratones	30
3.2.2 Modelo de enfermedad inflamatoria intestinal	30
3.2.3 Inyección de inhibidores a ratones	30
3.2.4 Inyección de citocinas a ratones	31
3.2.5 Índice de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal	31
3.2.6 Cuantificación de células del epitelio intestinal	31
3.2.7 Ensayo de captación de Dextrán por las células epiteliales intestinales	31
3.2.8 Mantenimiento y subcultivo de células Caco2	32
3.2.9 Curva temporal de células Caco 2 estimuladas con citocinas	32
3.2.10 Tratamiento de células Caco2 con citocinas e inhibidores	32
3.2.11 Westernblot	32
3.2.12 Inmunofluorescencia	33
4. Resultados	34
4.1 El número de células CgA ⁺ aumenta en la inflamación intestinal.	35
4.2 El IFN γ y el TNF α incrementan el número de células CgA ⁺ en el epitelio intestinal.	37
4.3 Las células CgA ⁺ inducidas con IFN γ y TNF α son post mitóticas.	40
4.4 Las células CgA ⁺ inducidas con las citocinas capturan antígenos de la luz intestinal.	41
4.5 La mezcla de IFN γ /TNF α activa la vía de señalización PI3K/Akt en el colon de los ratones.	42
4.6 La mezcla de IFN γ /TNF α activa la autofagia en el colon de los ratones.	44
4.7 Las células Caco2 expresan y procesan CgA.	46
4.8 IFN γ /TNF α incrementan el nivel de CgA y activan la autofagia y la vía PI3K/Akt en las células Caco2.	47
4.9 IFN γ /TNF α incrementan la expresión de CgA en las células Caco2 a través de un mecanismo dependiente de la autofagia y de la activación de Akt.	49
4.10 Las células CgA ⁺ expresan el marcador p62 y pPTEN.	50
4.11 La inhibición de la autofagia y la vía de señalización PI3K/Akt evita el incremento de las células CgA ⁺ en la colitis.	50
4.12 Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS	51
4.13 Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS de forma dependiente de la autofagia.	53
4.14 Las citocinas IFN γ /TNF α incrementan el número de células Tuft en el epitelio intestinal.	55
4.15 La autofagia necesaria para la reparación del epitelio intestinal en la colitis.	57

5. Discusión, conclusión y perspectivas	59
5.1 Discusión	60
5.1.1 Las células CgA ⁺ en la inflamación intestinal.	60
5.1.2 La reprogramación de las células enteroendócrinas por el IFN γ y el TNF α .	61
5.1.3 La regulación de CgA en el epitelio intestinal.	62
5.1.4 IFN γ y el TNF α regulan el eje PI3K/Akt/mTORC1 y la autofagia en las células CgA ⁺ .	62
5.1.5 Las células Tuft en la colitis regulada por IFN γ y TNF α .	64
5.1.6 La autofagia, el regulador maestro de la homeostasis intestinal.	64
5.2 Resumen de hallazgos	66
5.3 Conclusión	66
5.4 Perspectivas	66
6. Referencias	68
7. Anexos	81
7.1 Anexo I	82
7.2 Anexo II	83
7.3 Anexo III	84

Índice de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones.	27
---	----

Índice de Figuras

Figura 1. Histología del intestino	3
Figura 2. Micrografía electrónica de las estructuras intestinales	6
Figura 3. El epitelio intestinal	7
Figura 4. Los linajes celulares del epitelio del intestino grueso	8
Figura 5. Distribución de las células enteroendócrinas en el intestino grueso	11
Figura 6. La auto renovación epitelial del intestino grueso	13
Figura 7. Genes que controlan la diferenciación de los linajes celulares del epitelio intestinal	15
Figura 8. Patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales	17
Figura 9. Citocinas liberadas en las enfermedades inflamatorias intestinales	19
Figura 10. La vía de señalización PI3K/Akt	21
Figura 11. Mecanismo general de la autofagia	23
Figura 12. Morfología de las células que expresan CgA	36
Figura 13. El número de células CgA ⁺ incrementa en la colitis inducida con DSS	37
Figura 14. La mezcla de IFN γ y TNF α incrementan el nivel de CgA en el colon	38
Figura 15. El IFN γ y TNF α incrementan el número de células CgA ⁺ en el epitelio del colon	39
Figura 16. Los componentes del inflammasoma NLRP3 incrementan en la colitis inducida con DSS	40
Figura 17. Las células enterocromafines no expresan pHis3	41
Figura 18. Las células CgA ⁺ capturan antígenos de la luz intestinal	42
Figura 19. IFN γ /TNF α activan la vía de señalización PI3K/Akt/ β -catenina en el colon de los ratones	43
Figura 20. IFN γ /TNF α activan mTORC1 y la autofagia en el colon de los ratones	45
Figura 21. Las células Caco2 expresan y procesan CgA	47
Figura 22. IFN γ /TNF α incrementan el nivel de CgA y activan la autofagia y la vía PI3K/Akt en las células Caco2	48
Figura 23. IFN γ /TNF α incrementan la expresión de CgA en las células Caco2 a través de un mecanismo dependiente de la autofagia y de Akt	49
Figura 24. Las células CgA ⁺ son positivas para p62 y pPTEN	50
Figura 25. La inhibición de la autofagia y la vía de señalización PI3K/Akt evita el incremento de las células CgA ⁺ en la colitis	51
Figura 26. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS	52
Figura 27. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS de forma dependiente de la autofagia	54
Figura 28. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS	56
Figura 29. La autofagia es necesaria para la reparación del epitelio intestinal en la colitis	58
Figura 30. Generación y función de las células CgA ⁺ y Tuft en la colitis	67

Abreviaturas

5-HT: Serotonina
Atoh: Homólogo de Atonal
CAT(s): Célula(s) de amplificación en tránsito
CD(s): Célula(s) dendrítica(s)
CD1(s): Célula(s) Delta
CEC(s): Célula(s) enterocromafine(s)
CEE(s): Célula(s) enteroendócrina(s)
CEI(s): Célula(s) epiteliale(s) intestinale(s)
CgA: Cromogranina A
CK2: Caseína cinasa 2
CL(s): Célula(s) L
CNK(s): Célula(s) asesina(s) natural(es)
CTC(s): Célula(s) troncal(es) columnar(es)
CTh(s): Célula(s) T helper
CTreg(s): Célula(s) T reguladora(s)
CU: Colitis ulcerativa
DLL: Ligando tipo Delta
DSS: Dextrán Sulfato de sodio
EC: Enfermedad de Crohn
EII(s): Enfermedad(es) inflamatoria(s) intestinal(es)
GLP: Péptido tipo Glucagón
Hes: Hairy and Enhancer of Split
IAE: Índice de actividad de la enfermedad
IFN γ : Interferón gamma
IL: Interleucina
ILC(s): Célula(s) linfoide(s) innata(s)
LIR(s): Región(es) de interacción con LC3
mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2: Mammalian target of rapamycin complex 2
Ngn3: Neurogenina 3
RTK: Receptor tirosin cinasa
PAS: Sitio de ensamble del fagóforo
PEF: Fosfatidiletanolamina
PH: Plecstrina
PI3K: Cinasa del fosfatidil inositol- 3-Fosfato
PIP2: Fosfatidil inositol bifosfato
PIP3: Fosfatidil inositol trifosfato
PYY: Péptido YY
Ser: Serina
SP: Sustancia P
Thr: Treonina
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

La destrucción del epitelio intestinal en las enfermedades inflamatorias intestinales se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales que desequilibran la proliferación y la muerte de las células epiteliales (Maloy *et al*, 2011; Zhang y Li, 2014; Neurath, 2014). Las células secretoras se encargan del mantenimiento de la homeostasis epitelial en condiciones de salud (Shroyer *et al*, 2007). Sin embargo, no se entiende ni su función ni su regulación en las enfermedades inflamatorias intestinales. En esta investigación se muestra que el número de células CgA⁺ y Tuft son reguladas por las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α en la colitis inducida con DSS. Las citocinas activaron la vía PI3K/Akt y la autofagia dependiente de mTORC1 en el colon de los ratones. En conjunto, estas vías incrementaron la expresión de Cromogranina A y la población las células positivas a este marcador. La inhibición de la autofagia disminuyó la presencia de las células CgA⁺ y Tuft aumentando la severidad de la colitis. Estos resultados sugieren que la autofagia participa en la reparación epitelial durante la inflamación intestinal a través de la modulación de las poblaciones de células secretoras.

Abstract

Intestinal epithelial disruption during inflammatory bowel diseases encompasses several genetic and environmental factors affecting intestinal proliferation and apoptosis (Maloy *et al*, 2011; Zhang y Li, 2014; Neurath, 2014). Secretory lineage is involved on epithelial homeostasis (Shroyer *et al*, 2007) but its function and regulation are not well understood during IBD. Here, is shown that CgA⁺ cells and Tuft are controlled by proinflammatory cytokines IFN γ and TNF α during DSS-mediated colitis. Cytokines activated PI3K/Akt signaling axis and mTORC1-dependent autophagy on mice's colonic mucosa. Together, autophagy and Akt activation increased Chromogranin A synthesis and population positive to this marker. Autophagy inhibition decreased Tuft and CgA⁺ lineages increasing colitis severity. Together, these results suggest a role of autophagy in epithelial repair during colitis through secretory lineage modulation.

1. Introducción

1.1 El intestino

El intestino es un tubo que se extiende desde el estómago hasta el ano y se encarga de absorber los nutrientes, el agua y los iones que el cuerpo necesita (van der Flier and Clevers, 2009; Kiela *et al*, 2016) y combina sus desechos con los generados en otros órganos y los excreta. El intestino es el órgano endócrino más grande del cuerpo (Ahlman y Nilsson; 2001) y el sitio donde se establece la tolerancia inmunológica a los nutrientes y los antígenos inofensivos (Chistiakov *et al*, 2014; Mowat, 2018). Para su estudio, se divide en dos grandes regiones: el intestino delgado y el intestino grueso.

El intestino delgado culmina la transformación de los nutrientes en unidades simples y los absorbe (Kiela *et al*, 2016). Se divide, a su vez, en el duodeno, yeyuno e íleon (Collins y Badireddy, 2019). El duodeno recibe al quimo proveniente del estómago y lo mezcla con las enzimas pancreáticas y sales biliares para terminar su digestión (Kong *et al*, 2018; Collins y Badireddy, 2019). El yeyuno se encarga de absorber los nutrientes simples; es decir, carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos. Para ello cuenta con pliegues circulares recubiertos de microvellosidades que incrementan su superficie de absorción hasta 600 veces (Kiela *et al*, 2016; Kong *et al*, 2018; Collins y Badireddy, 2019). El íleon es el fragmento final del intestino delgado. Absorbe los nutrientes que superan la capacidad del yeyuno (Collins y Badireddy, 2019), especialmente la Vitamina B12 (Kiela *et al*, 2016) y las sales biliares (Kumar *et al*, 2004; Ross *et al*, 2007; Kierszenbaum *et al*, 2007; Kong *et al*, 2018; Collins y Badireddy, 2019).

El intestino grueso se encarga de absorber el agua y las vitaminas de las heces, así como compactarlas (Kiela *et al*, 2016; Kahai, 2018; Azzouz y Sharma, 2018). Está conformado por el ciego, apéndice, colon, recto y termina en el ano (Kahai, 2018). El ciego es el encargado de recibir el material de difícil digestión y culminarla. También absorbe los electrolitos, principalmente Na⁺ y K⁺ (Kiela *et al*, 2016). La función del apéndice vermiforme es desconocida, pero se ha relacionado con actividades linfáticas, endócrinas, de regulación del sistema inmunológico (Zahid, 2004) y de la biota circundante (Guinane *et al*, 2013) así como digestivas en los lactantes. El colon es la región más larga del intestino grueso. Reabsorbe el agua de los desechos y los compacta. Es el sitio donde las bacterias comensales tienen

contacto con las heces y algunos de sus metabolitos, como las vitaminas, son absorbidos (Kumar, 2004; Ross *et al*, 2007; Kierszenbaum *et al*, 2007).

1.2 Características histológicas del intestino

El intestino se compone por la capa mucosa, la submucosa, la capa muscular y la serosa (Figura 1; Kumar *et al*, 2004; Ross *et al*, 2007; Kierszenbaum *et al*, 2007; Rao y Wang, 2010).

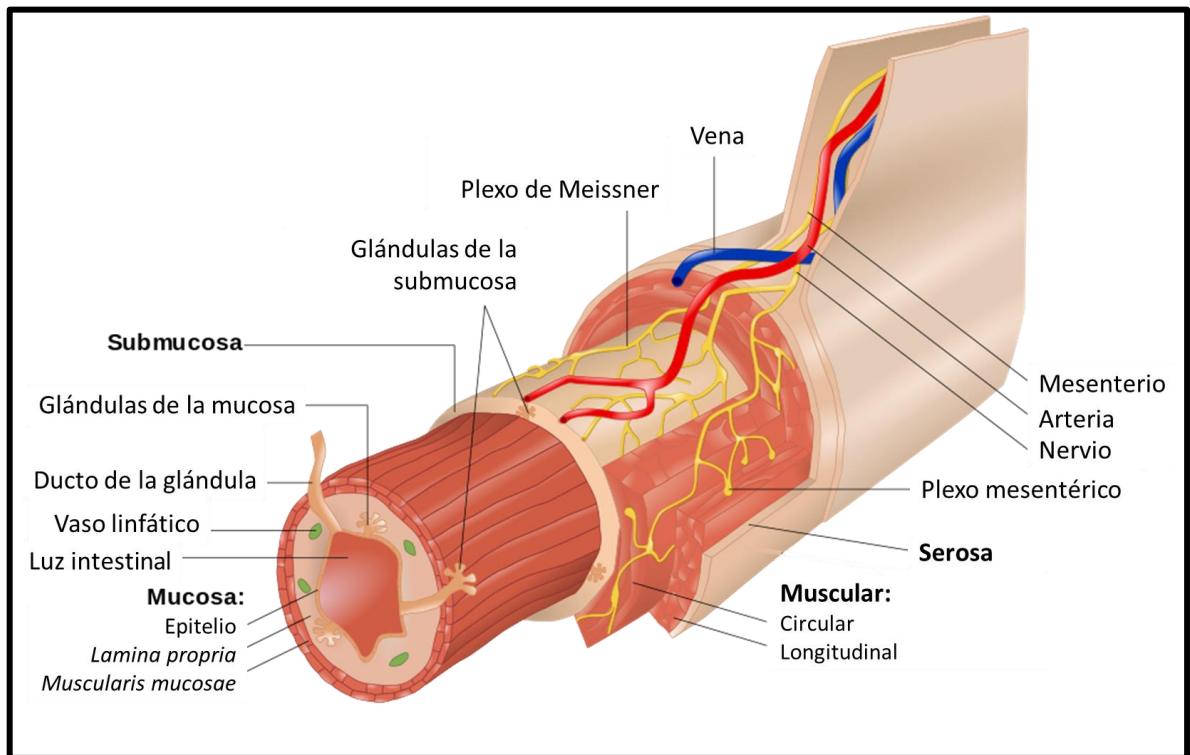


Figura 1. Histología del intestino. El intestino está compuesto por la mucosa, la submucosa, la capa muscular y la serosa. Tomado y modificado de Betts *et al*, 2019.

1.2.1 La capa mucosa

La mucosa se compone de un epitelio columnar simple que descansa sobre una capa de tejido conjuntivo denominada *Lamina propria* que soporta al epitelio (Rao y Wang, 2010). El epitelio es semipermeable, separa el medio externo del interior del organismo y absorbe los nutrientes (Jankowski *et al*, 1994). La mucosa está delimitada por una capa delgada de músculo liso llamado *Muscularis mucosae* que mantiene a toda la capa en un estado de

“agitación suave” que promueve el contacto del epitelio con el contenido luminal (Young *et al*, 2013).

1.2.2 La capa submucosa

La submucosa es la encargada de “alimentar” a las capas circundantes y drenar sus desechos pues contiene a los vasos sanguíneos y a los vasos linfáticos (Rao y Wang, 2010). Además, es el sitio donde se encuentran el plexo nervioso de la submucosa, o plexo de Meissner encargado de sensar el lumen intestinal, regular el flujo de sangre y las secreciones epiteliales (Nezami y Srinivasan, 2010). Todos estos componentes se encuentran embebidos en tejido conectivo.

1.2.3 La capa muscular

La túnica muscular está compuesta por dos capas de tejido muscular. La interna envuelve al intestino circularmente y permite su constricción. Las fibras externas recubren al intestino longitudinalmente originando el movimiento de “relajación y elongación”. Ambas capas están adheridas por una red de nervios que coordinan ambos movimientos y favorecen el flujo del contenido luminal en dirección proximal-distal (Azzouz y Sharma, 2018).

1.2.4 La capa serosa

La serosa es una capa de epitelio plano simple también llamado mesotelio que recubre al intestino en su cara externa, está soportado por una capa delgada de tejido conjuntivo que contiene vasos sanguíneos y nervios. El mesotelio secreta un líquido lubricante que disminuye la fricción entre las vísceras (Collins y Badireddy, 2019).

1.3 Organización estructural del intestino

La superficie intestinal consiste de la repetición seriada de su unidad funcional: el eje criptavillosidad en el intestino delgado y la cripta en el intestino grueso. Estas estructuras otorgan las propiedades necesarias para que el intestino lleve a cabo sus funciones (Barker, 2014).

1.3.1 Las criptas de Lieberkühn

Las glándulas intestinales también conocidas como criptas de Lieberkühn son el resultado de la invaginación del epitelio hacia la *Lamina propria* de la mucosa (**Figura 2a**). En estas estructuras se lleva a cabo la auto renovación del epitelio intestinal pues en el fondo se encuentran las células troncales columnares CTC (Clevers, 2013; Barker, 2014; Gehart y Clevers, 2018).

En el intestino delgado la superficie luminal de las criptas se proyecta hacia la luz para la formación de vellosidades. En el intestino grueso esto no sucede y las criptas se unen entre sí a través de una superficie luminal plana (**Figura 2a**; Barker, 2014, Gehart y Clevers, 2018).

1.3.2 Las vellosidades del intestino delgado

La capa mucosa y la submucosa del intestino delgado se proyectan simultáneamente hacia la luz intestinal para formar vellosidades digitiformes (**Figura 2b**) que aumentan la superficie de absorción intestinal (Barker, 2014) hasta 30 veces (Kiela *et al*, 2016), y cuya base está rodeada por al menos seis criptas (Barker, 2014). El intestino grueso no requiere de una gran superficie de absorción para captar el agua y los iones; por lo tanto, carece de vellosidades (Clevers, 2013; Barker, 2014).

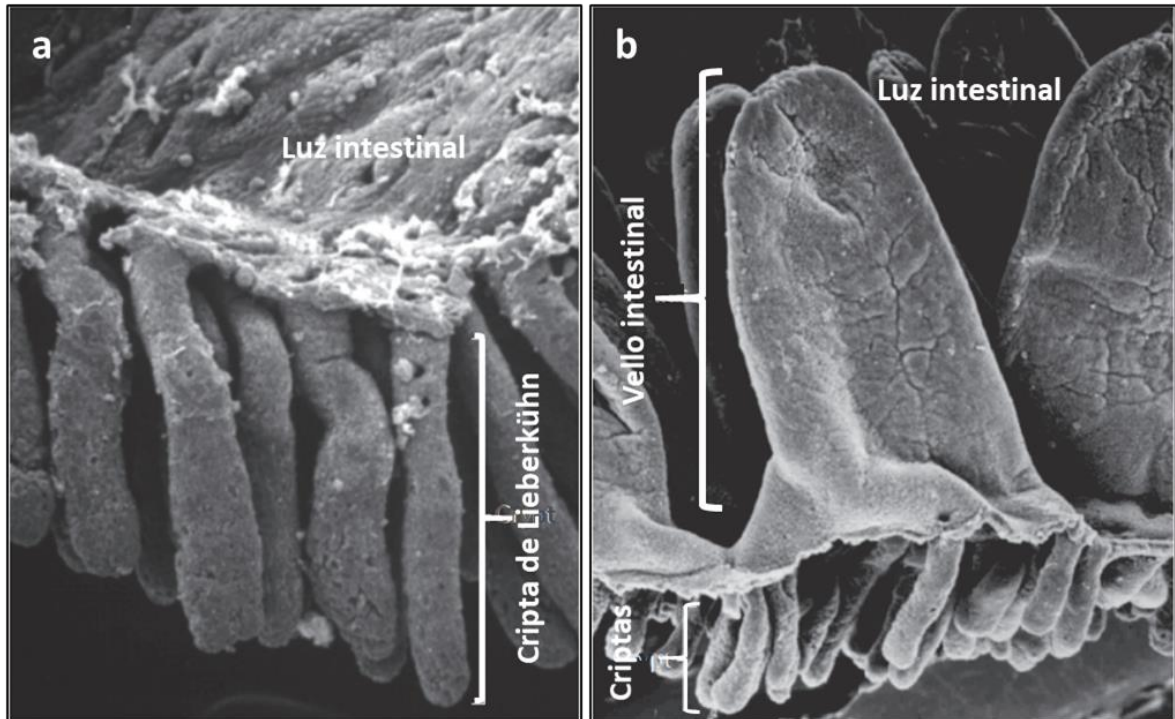


Figura 2. Micrografía electrónica de las estructuras intestinales. a) En el intestino grueso las criptas de Lieberkühn se unen entre sí por una superficie luminal plana. **b)** El intestino delgado cuenta con vellosidades digitiformes rodeadas por, al menos, seis criptas de Lieberkühn. Tomada y modificada de Barker, 2014.

1.4 El epitelio intestinal

El epitelio intestinal es una monocapa de células que conforman una barrera física y bioquímica que regula el movimiento de moléculas y partículas de la luz intestinal al interior del organismo (**Figura 3**; Groschwitz *et al*, 2009; Peterson *et al*, 2014). Las células que componen a la barrera intestinal son del tipo epitelial columnar (Kong *et al*, 2018). Su membrana plasmática se considera polarizada porque poseen una región apical y una basolateral con características moleculares distintas. De acuerdo con el segmento del intestino, tienen un borde en cepillo en la cara apical para aumentar la superficie de absorción (Schneeberger *et al*, 2018). El espacio entre las células epiteliales debe mantenerse sellado para que la barrera intestinal sea funcional. Las uniones intercelulares son los puntos de contacto entre las células y son responsables de sellar el espacio intercelular. Estos puntos de contacto están integrados por las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas (Groschwitz *et al*, 2009; Turner, 2009; Schneeberger *et al*, 2018).

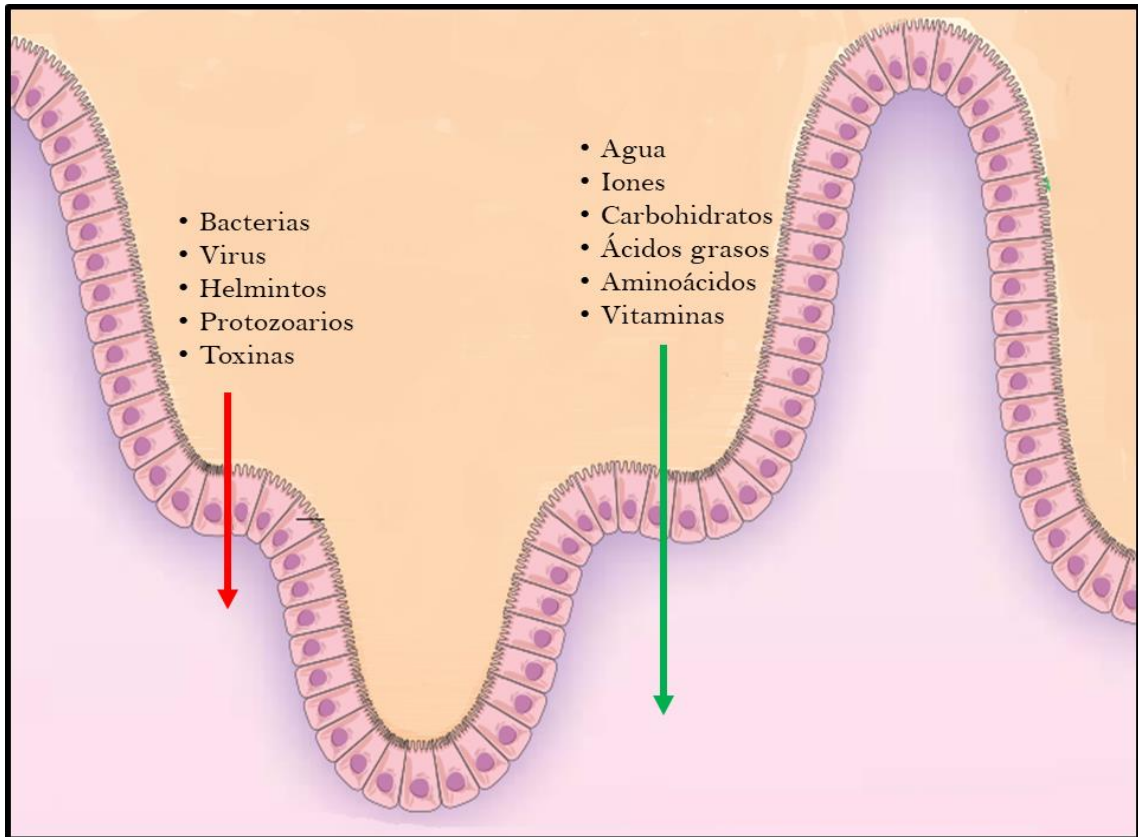


Figura 3. El epitelio intestinal. El epitelio es monocapa que funciona como una barrera semipermeable que permite el paso de agua, iones y nutrientes y mantiene fuera del cuerpo a microorganismos y moléculas dañinas. Tomado y modificado de Maynard *et al*, 2012.

Como se muestra en la **Figura 4**, el epitelio del intestino grueso está compuesto por diversas estirpes celulares que pertenecen al linaje de absorción o al secretor. El primer grupo está representado únicamente por los enterocitos mientras al segundo grupo lo conforman las células de Goblet, las Tuft y las enteroendócrinas (CEE) (Gerbe, 2012; Clevers, 2013).

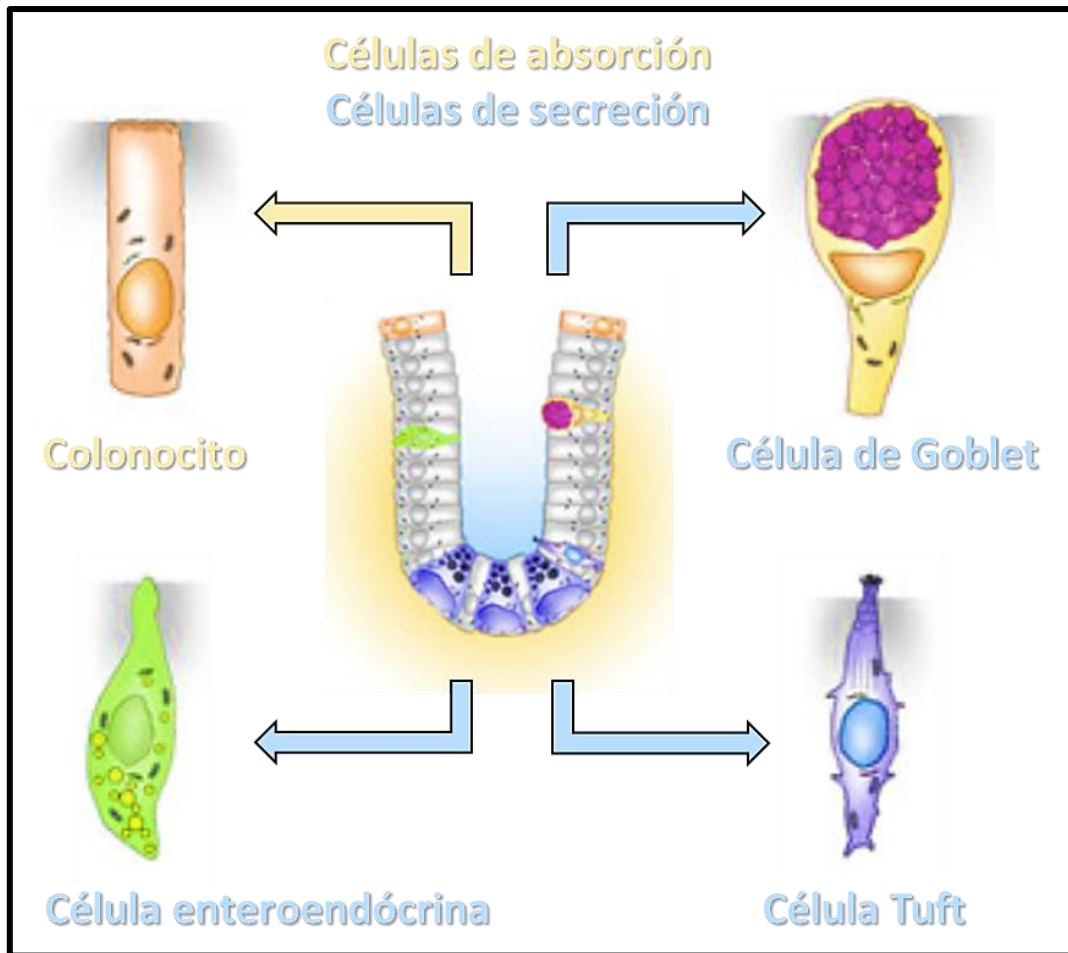


Figura 4. Los linajes celulares del epitelio del intestino grueso. En el fondo de la cripta se encuentran las células troncales columnares (CTCs) que dan lugar a los colonocitos, las células Tuft, las Goblet y las enteroendócrinas. En rojo se presentan las células que pertenecen al linaje secretor y en verde al linaje de absorción. Tomado y modificado de Gerbe, 2012.

1.4.1 Los enterocitos

Los enterocitos son el linaje celular más abundante en el epitelio intestinal pues comprenden hasta el 90% del total de células (Umar, 2010; Noah *et al*, 2011); por lo tanto, son el principal componente de la barrera epitelial. En el intestino grueso se conocen como colonocitos (Noah *et al*, 2011). Estas células son responsables del transporte transcelular de iones, agua, nutrientes y vitaminas al interior del organismo (Miron y Cristea, 2012), y lo hacen mediante fagocitosis o pinocitosis (Takashima *et al*, 2013). Morfológicamente los enterocitos son células epiteliales cilíndricas simples (Kong *et al*, 2018). Su núcleo es basal ovalado y tiene vellosidades apicales “en cepillo” que aumentan su superficie de absorción (Noah *et al*, 2011).

1.4.2 Las células de Goblet

Las células de Goblet o caliciformes por su forma de cáliz tienen un núcleo basal y ovalado, y un polo apical con grandes cantidades de gránulos de secreción. En la membrana apical contiene micro vellosidades (Freeman, 1962; Kim y Ho, 2010). Sintetizan y secretan glicoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas, principalmente MUC2. Este “moco” recubre la superficie luminal del epitelio y, debido a su alta densidad, evita la colonización del epitelio por microorganismos y lo protege del daño químico y mecánico generado por el contenido luminal y la motilidad intestinal (Specian y Oliver, 1991; Noah *et al*, 2011; Gerbe, 2012). La cantidad de células caliciformes del intestino incrementa en dirección proximal-distal. Se estima componen del 10 al 15% del epitelio del intestino delgado y pueden alcanzar hasta el 50% en el colon (Noah *et al*, 2011). Se ha observado que estas células capturan antígenos de la luz intestinal y los entregan a las células dendríticas presentadoras de antígenos (CD) (McDole *et al*, 2012). Además, son capaces de producir y secretar citocinas y quimiocinas que regulan al sistema inmune y estimulan la división de las células troncales del epitelio (Knoop KA y Newberry, 2018).

1.4.3 Las células Tuft

Las células Tuft sólo representan el 0.4% de la población total del epitelio intestinal (Gerbe *et al*, 2012). Su morfología resalta del resto de los linajes pues parecen enterocitos alargados y ovalados dotados de un “penacho” de microvellosidades en su membrana apical conectado a un sistema túbulo-vesicular (Gerbe *et al*, 2016). Se ha demostrado que la invasión intestinal por helmintos estimula a estas células a producir y secretar IL-25 (Von Moltke *et al*, 2016). Esto ocasiona que las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) de la mucosa secreten IL-4 e IL-13. Estas citocinas estimulan a las células troncales para amplificar el linaje de Goblet y a las mismas Tuft. (Von Moltke *et al*, 2016; Howitt *et al*, 2016; Schneider *et al*, 2018).

1.4.4 Las células enteroendócrinas

Las células enteroendócrinas (CEEs) son las responsables de producir, almacenar y secretar hormonas (Sternini *et al*, 2008; Worthington *et al*, 2018). Esta estirpe comprende menos del 1% de la población total del epitelio intestinal e incrementa su frecuencia a medida que se avanza hacia la porción distal (**Figura 5**; Sternini *et al*, 2008; Worthington *et al*, 2018). A

pesar de ello, el intestino es el órgano endocrino más grande del cuerpo (Ahlman *et al*, 2001). Las células enteroendócrinas pueden ser abiertas o cerradas; es decir, que proyectan sus micro vellosidades hacia la luz intestinal o que carecen ellas. Las células abiertas responden a moléculas o iones presentes en el lumen intestinal; las cerradas responden indirectamente a través de mensajes químicos (Sternini *et al*, 2008; Gunawardene *et al*, 2011; Latorre *et al* 2016).

Debido a que las células enteroendócrinas poseen vesículas de secreción cargadas con distintas sustancias se creó un sistema de clasificación basado en su contenido (Gribble y Reimann, 2015). En el colon podemos encontrar a las células enterocromafines (CECs), a las Delta (CDIs) y L (CLs) (Sternini *et al*, 2008; Gunawardene *et al*, 2011; Worthington *et al*, 2018). Sin embargo, podría sólo existir un tipo de célula enteroendócrina con la plasticidad para expresar distintas hormonas dependiendo su “edad” y posición en el epitelio como lo demuestra el estudio del seguimiento en tiempo real de la diferenciación de las células positivas a Neurogenina 3 (Ngn3) (Gehart *et al*; 2019).

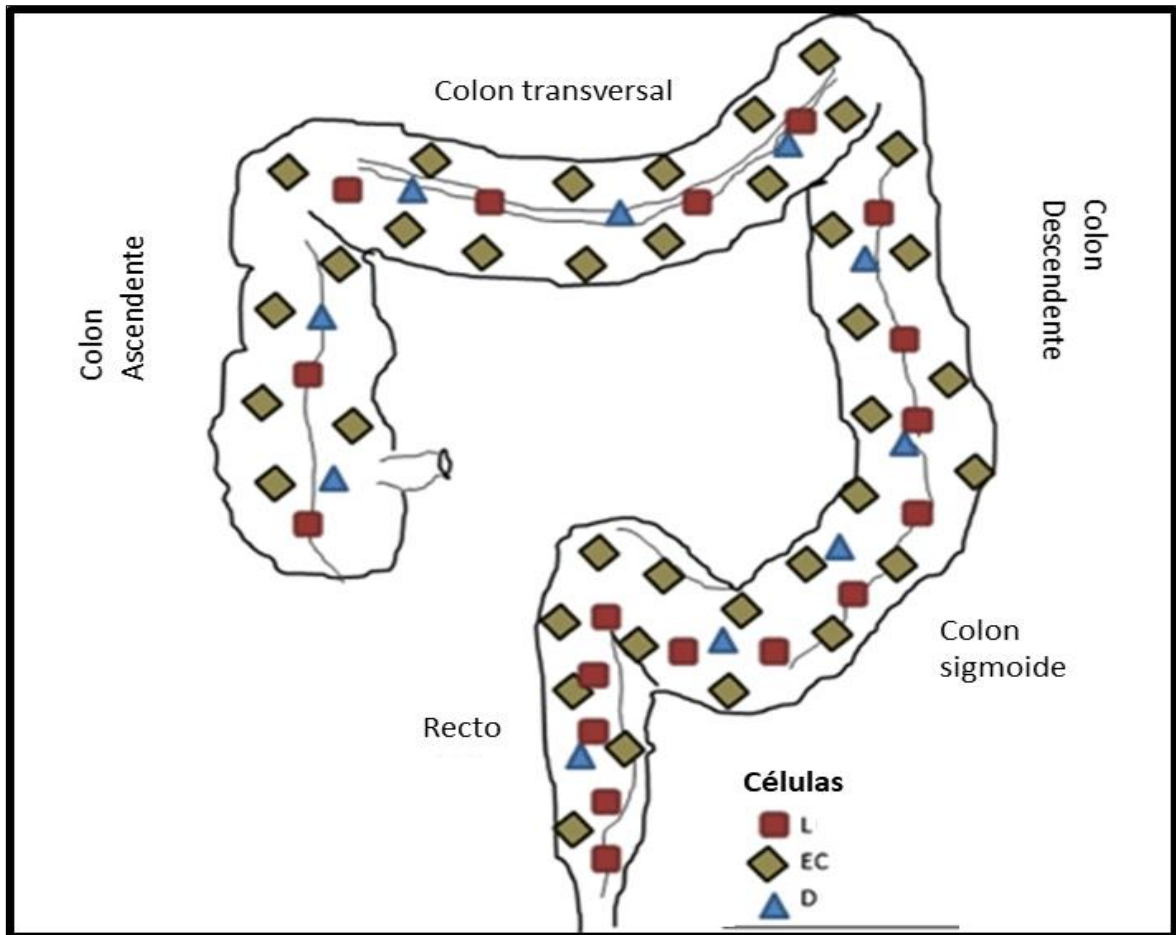


Figura 5. Distribución de las células enteroendócrinas en el intestino grueso. Las células enterocromafines (ECs) son las más abundantes en el intestino grueso. Las células L incrementan en dirección proximal distal y las células Delta (D) son las menos frecuentes. Tomado y modificado de Gunawardene *et al*, 2011.

1.4.4.1 Las células enterocromafines

Son la clase más abundante de células enteroendócrinas pues, de acuerdo a la región del colon, representan entre el 45 y 75% de esta población en el intestino grueso (Gunawardene *et al*, 2011). Se ubican principalmente en el tercio inferior de la cripta intestinal. Sus gránulos están compuestos de Cromogranina A (CgA), sinaptofisina y serotonina (5-HT). Su principal secreción es la serotonina que controla el apetito y la motilidad intestinal (Sternini *et al*, 2008; Gunawardene *et al*, 2011; Coates *et al*, 2004; Worthington *et al*, 2018). Las células enterocromafines poseen una forma de neurona: son triangulares, piramidales o ahusadas y tienen proyecciones polares de su citoplasma similares a dendritas. Estas células también contienen grandes cantidades de vesículas de secreción en todo su citoplasma, y un núcleo redondo u ovalado (Kuramoto *et al*, 2007; Gunawardene *et al*, 2011).

1.4.4.2 Células L

Tienen forma de botella o frasco, y poseen una proyección del citoplasma hacia el *lumen* intestinal con grandes cantidades de micro vellosidades (Gunawardene *et al*, 2011). Constituyen el 14% de las CEE en el intestino grueso y pueden encontrarse en cualquier región de la cripta intestinal, pero son más frecuentes en la base. Sus gránulos poseen somatostatina, CgA, péptido YY (PYY), GLP-1, GLP-2, oxintomodulina y glicentina (Gunawardene *et al*, 2011). Secretan PYY y oxintomodulina para inhibir el hambre, vaciado estomacal y motilidad intestinal; GLP-1 para promover la liberación de insulina en el páncreas; además de GLP-2 y glicentina para estimular la proliferación de los enterocitos y prevenir la apoptosis (Gunawardene *et al*, 2011; Coate *et al*, 2004).

1.4.4.3 Las células D

Las células Delta constituyen menos del 3% de células enteroendócrinas en el colon. Las células D son ahusadas. Poseen una extensión apical del citoplasma larga y una corta en la región basal (Gunawardene *et al*, 2011). Sus gránulos poseen sinaptofisina y somatostatina. Secretan somatostatina para estimular el peristaltismo, además funciona como inhibidora de la secreción de protones en el estómago y de la insulina en el páncreas (Gunawardene *et al*, 2011; Coate *et al*, 2014).

1.5 La homeostasis del epitelio intestinal

El epitelio intestinal debe mantenerse intacto para realizar sus funciones correctamente; es decir, debe encontrarse en un estado de homeostasis (Maloy y Powrie, 2011). Para lograrlo, debe existir un delicado equilibrio entre la proliferación, la diferenciación (van der Flier y Clevers, 2009) y la muerte celular (Negróni *et al*, 2015), a través de un proceso denominado auto renovación del epitelio intestinal (Barker, 2014). Cuando este mecanismo falla se pierde la homeostasis y se desarrollan patologías como las enfermedades inflamatorias intestinales (Maloy y Powrie, 2011; Okumura y Takeda, 2017; Kim y Cheon, 2017).

La renovación del epitelio intestinal inicia en la base de la cripta, donde se encuentra el nicho de las células troncales columnares (CTCs) (Yen y Wright, 2006) que expresan genes de las vías de señalización WNT y Notch (Muñoz *et al*, 2012) mientras que, inversamente, presentan inhibición de la vía BMP (Kosinski *et al*, 2007). Esto permite que las CTCs tengan

la capacidad de dividirse. El microambiente que rodea, y controla, a este nicho de células es gobernado por las citocinas secretadas por los fibroblastos (Powell *et al*, 1999) y el músculo liso de la mucosa (Kosinski *et al*, 2007).

Las CTCs se dividen cada 24 horas originando: a) células troncales, que mantienen al nicho pluripotencial, y b) células de amplificación en tránsito o CAT (Yen *et al*, 2006; Barker, 2014). Estas últimas se dividen de 4-5 veces más (**Figura 6a**) mientras se comprometen con alguno de los linajes del epitelio (**Figura 6b**; Van der Flier and Clevers, 2009; Barker, 2014; Gerbe *et al*, 2016). Las células del tercio superior de la cripta se encuentran diferenciadas y llevan a cabo las funciones descritas en el apartado anterior. Al alcanzar la superficie de la cripta entran en un proceso de muerte celular programada y descamación denominada anoikis (**Figura 6a**; Dufour *et al*, 2004).

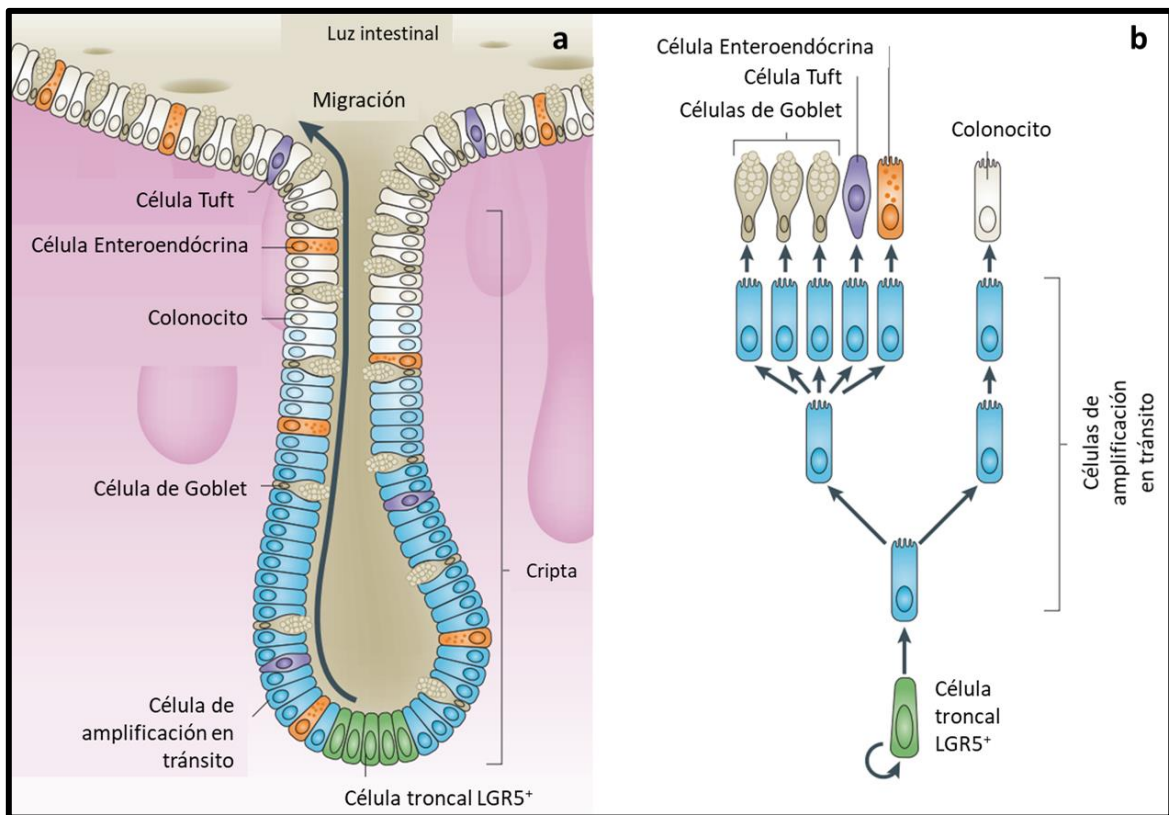


Figura 6. La auto renovación epitelial del intestino grueso. a) Las células troncales de la base de la cripta intestinal se dividen y originan a las células de amplificación en tránsito en el tercio inferior de la cripta. **b)** Posteriormente, las células AT se diferencian en cada uno de los linajes del epitelio: enterocitos, células enteroendócrinas, Tuft y de Goblet. El proceso de recambio celular tarda entre 5 y 7 días en el colon. Tomado y modificado de Barker, 2014.

1.6 La especialización de las células del epitelio intestinal

Cuando el receptor Notch de una CAT se asocia con su ligando, presente en las células adyacentes (van der Flier and Clevers, 2009), su dominio intracelular se corta y viaja al núcleo. Ahí actúa como cofactor de transcripción de los genes de la familia Hairy and enhancer Split (Hes) principalmente de Hes1 (Tamura *et al*, 1995; Philpott and Winton, 2014). La expresión de esta proteína inhibe la transcripción de Atoh1/Math1 ocasionando que la célula se convierta en un enterocito (Shroyer *et al*, 2007; Philpott and Winton, 2014). Cuando una célula se desensibiliza a la señalización de Notch no hay transcripción de Hes y Math1 se expresa. Entonces la célula se compromete con el linaje secretor. Se sospecha que esto se debe a la retroalimentación negativa originada por la fuerte expresión de Delta-like ligand 1 Dll1 (Philpott y Winton, 2014). Una vez que la célula forma parte de la estirpe secretora puede convertirse en una célula enteroendócrina, al expresar Ngn3, Pdx1, Beta2, Pax4 y Pax6; una Tuft, si expresa Pou2f (Gerbe y Jay, 2016); o una Goblet, expresando Gfi1, Spdef y Klf4 (Shroyer *et al*, 2005). **Figura 7.**

La diferenciación de una célula de amplificación en tránsito en alguno de los linajes intestinales se considera un proceso meramente estocástico; sin embargo, existen evidencias de que el microambiente generado por la interacción entre el epitelio y su entorno es el que dicta el destino celular.

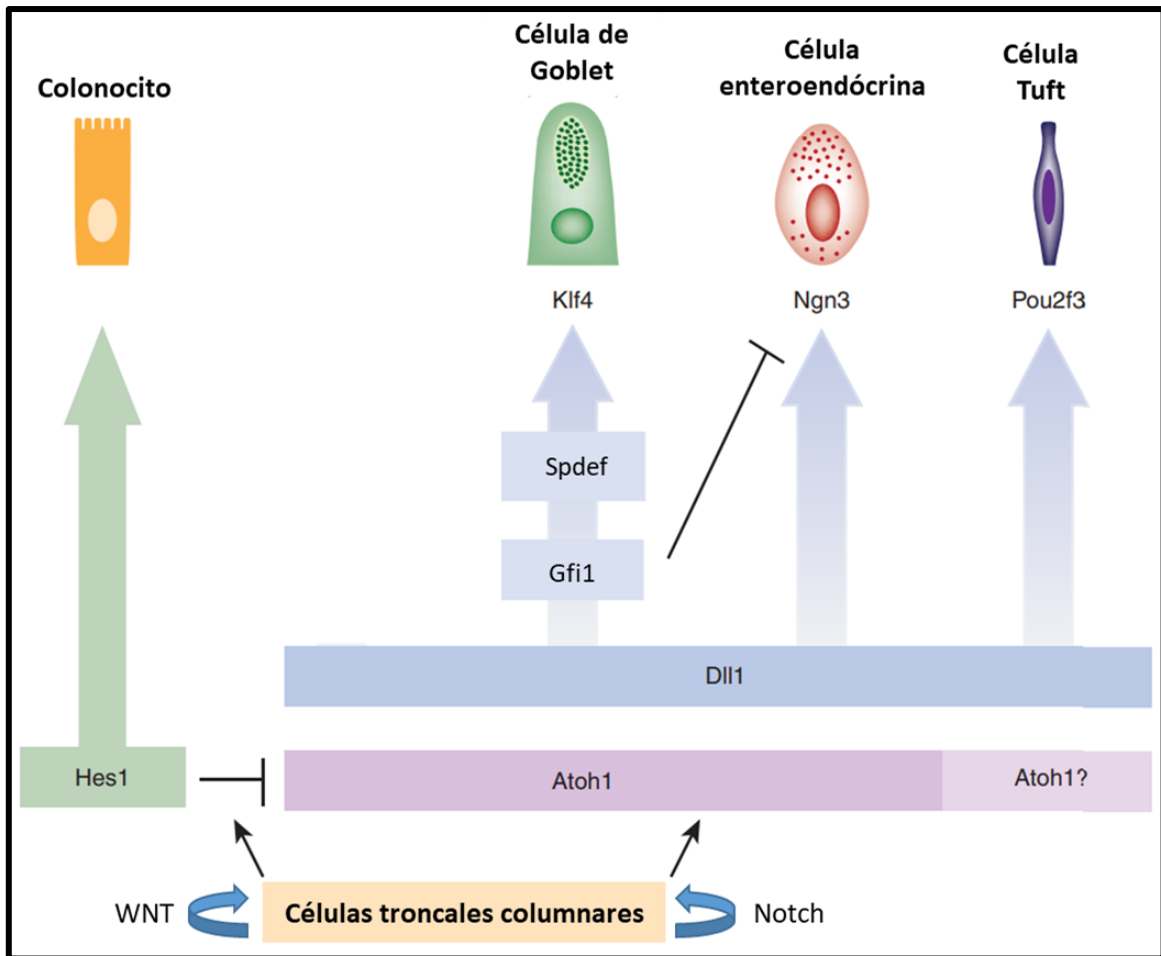


Figura 7. Genes que controlan la diferenciación de los linajes celulares del epitelio intestinal. La activación de Notch provoca la expresión de Hes1 y las células troncales columnares (CTCs) se diferencian en enterocitos. Cuando se apaga la vía Notch se bloquea Hes1 y se expresa Atoh1/Math1 comprometiendo a la célula con el linaje secretor. Dll1 es un marcador de células progenitoras secretoras Gfi1 inhibe la expresión de Ngn3 y permite la diferenciación de las células de Goblet y Paneth que al final expresan Klf4 y Sox9 respectivamente. La maduración de las células enteroendócrinas requiere de Ngn3 y las células Tuft de Pou2f3. El mantenimiento de la línea troncal se debe a la activación de los genes relacionados con las vías WNT y Notch. Tomado y modificado de Gerbe, 2016.

1.7 Las enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo de padecimientos idiopáticos (Ko y Auyeung *et al*, 2014) que afecta al 0.4 % de la población europea y americana (Beaugerie y Itzkowitz, 2015) siendo la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) las manifestaciones más comunes (Rubin *et al*, 2012). Su principal característica es la inflamación intestinal crónica recidiva (Loddo y Romano, 2015).

La inflamación se limita al intestino grueso en la colitis ulcerativa. Empieza en el recto y se expande uniformemente y en sentido proximal. Frecuentemente alcanza la región apéndice-cecal. En contraste, la enfermedad de Crohn afecta a cualquier parte del tubo digestivo, principalmente el íleon y la región perianal. Las lesiones no son continuas y comúnmente se observa estenosis, aparición de abscesos y fistulas. Histológicamente la colitis ulcerosa provoca una inflamación que se limita a la mucosa y submucosa intestinal. En la enfermedad de Crohn la submucosa se adelgaza, hay inflamación transmural, fisuras, ulceraciones y granulomas no caseosos (Khor *et al*, 2011).

El síntoma característico de estas enfermedades es la diarrea mucosa y sanguinolenta acompañada de dolor abdominal (Kim y Cheon, 2017). A mediano plazo puede complicarse con infecciones bacterianas severas (Sonnenberg, 2008) y anemia (Rogler y Vavricka, 2014) que abaten la calidad de vida de los pacientes. Se ha demostrado que el microambiente inflamatorio generado durante el curso de las EII representa, entre otros factores, un riesgo importante para el desarrollo de cáncer asociado a colitis (Triantafillidis *et al*, 2009; Beaugerie *et al*, 2015; Axelrad *et al*, 2016) siendo las principales manifestaciones de esta patología el cáncer colorrectal, el adenocarcinoma de intestino delgado, el linfoma intestinal, el cáncer anal y el colangiocarcinoma (Beaugerie *et al*, 2015).

1.7.1 Patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales

La etiología de estos trastornos no se entiende por completo; sin embargo, todos presentan la disrupción del epitelio intestinal (Maloy *et al*, 2011) asociada a la combinación de factores genéticos y ambientales (Zhang y Li, 2014; Neurath, 2014). Respecto a los factores genéticos se han encontrado mutaciones en genes relacionados a la producción de péptidos antimicrobianos, a la autofagia, citocinas y quimiocinas. Los factores ambientales con mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad son la microbiota, la dieta, infecciones, el estrés, el uso de antiinflamatorios no esteroideos, la apendicetomía, fumar y los antibióticos (Neurath, 2014).

La combinación de los factores genéticos y ambientales inicia la disrupción del epitelio intestinal. Entonces, los antígenos de la luz intestinal se translocan al tejido. La respuesta

aberrante y exagerada del sistema inmune causa un proceso inflamatorio agudo y subclínico. Cuando este proceso no se resuelve, se establece una inflamación crónica (**Figura 8**; Neurath, 2014).

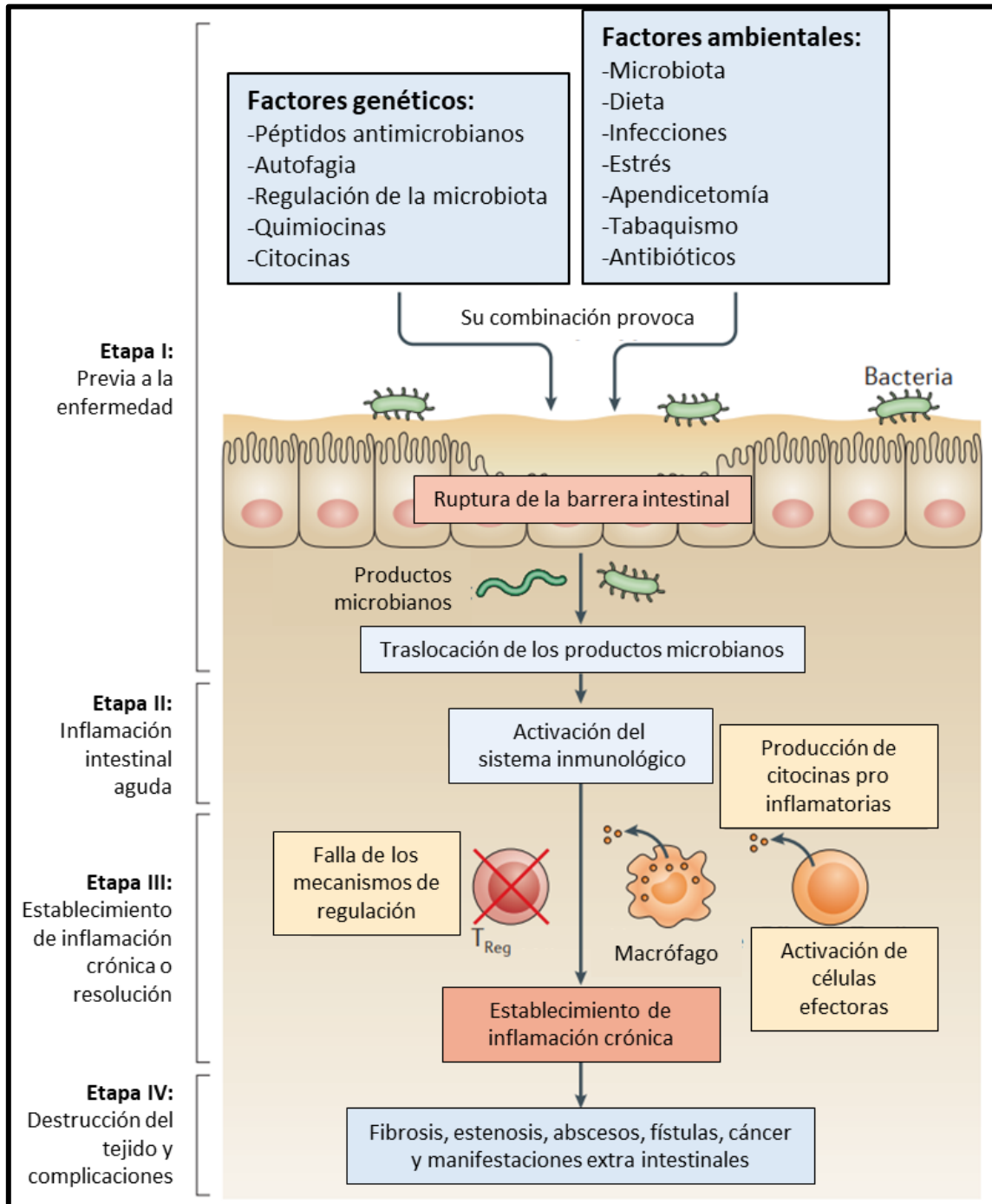


Figura 8. Patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales. En la etapa I, la combinación de factores genéticos y ambientales ocasiona la ruptura de la barrera intestinal y la traslación de productos microbianos. En la etapa II se activa el sistema inmunológico para lidiar con los agentes extraños y se resuelve en la etapa III o se convierte en una inflamación crónica que, en la etapa IV, manifiesta todas sus complicaciones. Tomado y modificado de Neurath, 2014.

1.7.2 Las citocinas en las enfermedades inflamatorias intestinales

Mientras gran parte de los genes relacionados al desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales han sido descubiertos por medio de los estudios de asociación del genoma o GWAS (Khor *et al*, 2011; Van Limbergen, 2014); la importancia y función de las citocinas se ha investigado mediante su depleción o bloqueo con anticuerpos en pacientes y modelos animales (Neurath 2014). En la **Figura 9** se resumen las principales citocinas liberadas durante la inflamación intestinal, su fuente y su impacto en la enfermedad.

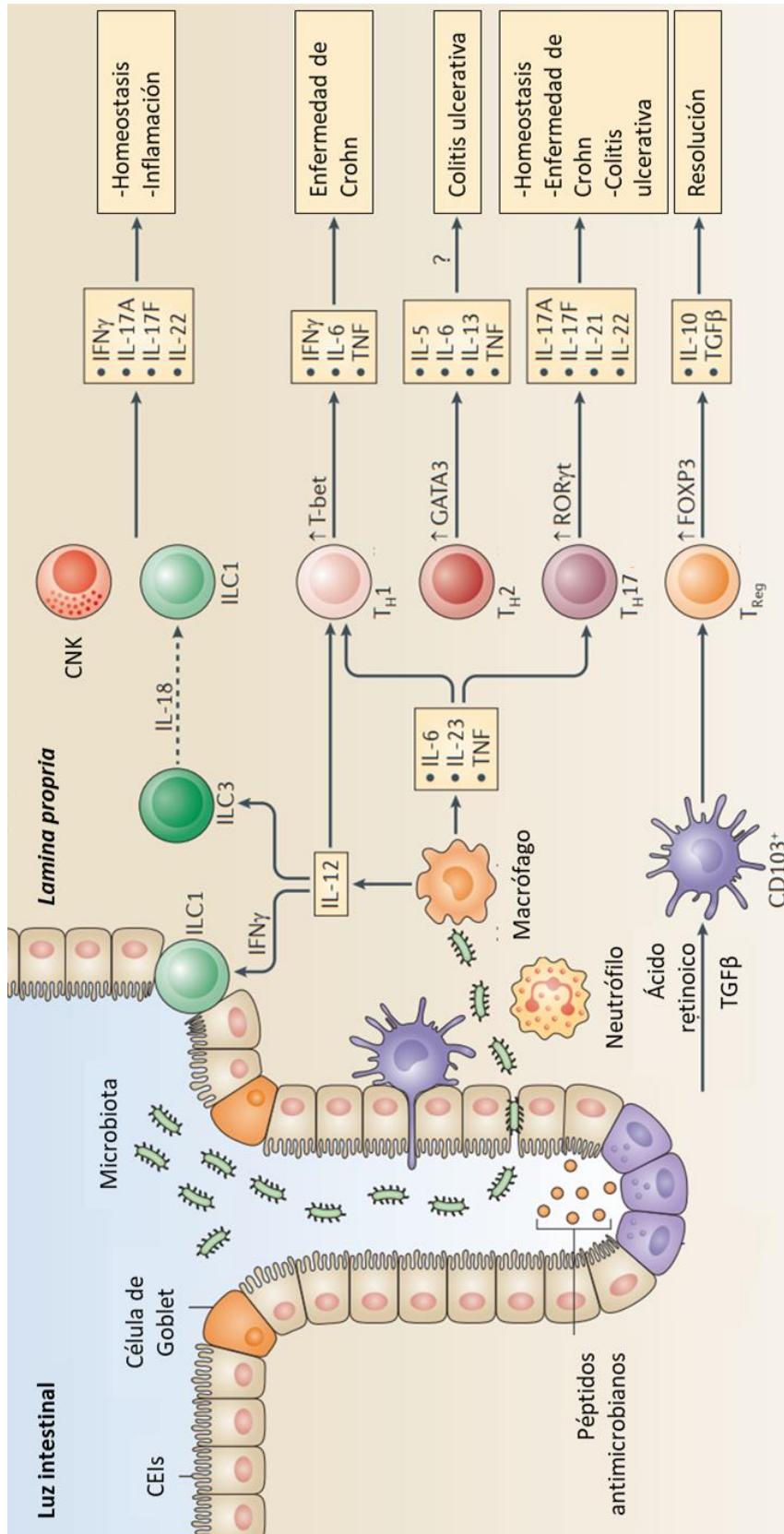


Figura 9. Citocinas liberadas en las enfermedades inflamatorias intestinales. En pacientes con EII y en modelos de colitis experimental se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias son producidas por las células dendríticas (CD), neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (CNK), células epiteliales (CEI), células linfoides innatas (ILC), células T efectoras de la mucosa (T helper 1 (TH1), TH2 y TH17) y las células T reguladoras (TReg). Los factores de transcripción clave y las citocinas producidos por los subconjuntos de células T helper en la mucosa afectada por la EII se muestran. Tomado y modificado de Neurath, 2014.

1.8 La vía de señalización PI3K/Akt

La unión de un receptor tirosin cinasa (RTK) con su ligando ocasiona su dimerización y autofosforilación. El RTK activa a PI3K. Esta cinasa convierte el fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) membranal en PIP3 (Vivanco y Sawyers, 2002). La concentración de PIP3 membranal es regulada por la fosfatasa PTEN que lo transforma en PIP2. La fosforilación de PTEN inactiva a esta enzima y provoca el aumento en la concentración de PIP3 membranal y la consecuente unión de las proteínas con dominio de Plecstrina (PH) a los parches membranales ricos en esa molécula. La cinasa de serinas y treoninas Akt es una de estas proteínas y al anclarse a la membrana mTORC2 (PDK2) la fosforila en la serina 473. Esta modificación cambia la conformación de la molécula exponiendo su dominio catalítico y aumentando su actividad diez veces (Sarvasov *et al*, 2005). Finalmente, PDK1, otra molécula con dominio PH, fosforila a Akt en la treonina 308 e incrementa aún más su actividad catalítica (Vivanco y Sawyers, 2002) (**Figura 10**). Estos cambios provocan que Akt fosforile a sus blancos y a través de ellos controle procesos celulares indispensables como:

- La sobrevivencia, a través de la fosforilación de FoxO1.
- La proliferación celular, por la fosforilación de β -catenina además de p27 y PRAS40-TSC1/2 que inhiben a mTORC1.
- La progresión del ciclo celular, a través de GSK3 β .
- El metabolismo de la glucosa y aminoácidos, por medio de AS160 y PRAS40-TSC1/2 que inhiben a mTORC1.
- El crecimiento celular, gracias a PRAS40 y TSC1/2, que inhiben a mTORC1.
- La autofagia, por Beclina, PRAS40 y TSC1/2, que inhiben a mTORC1.

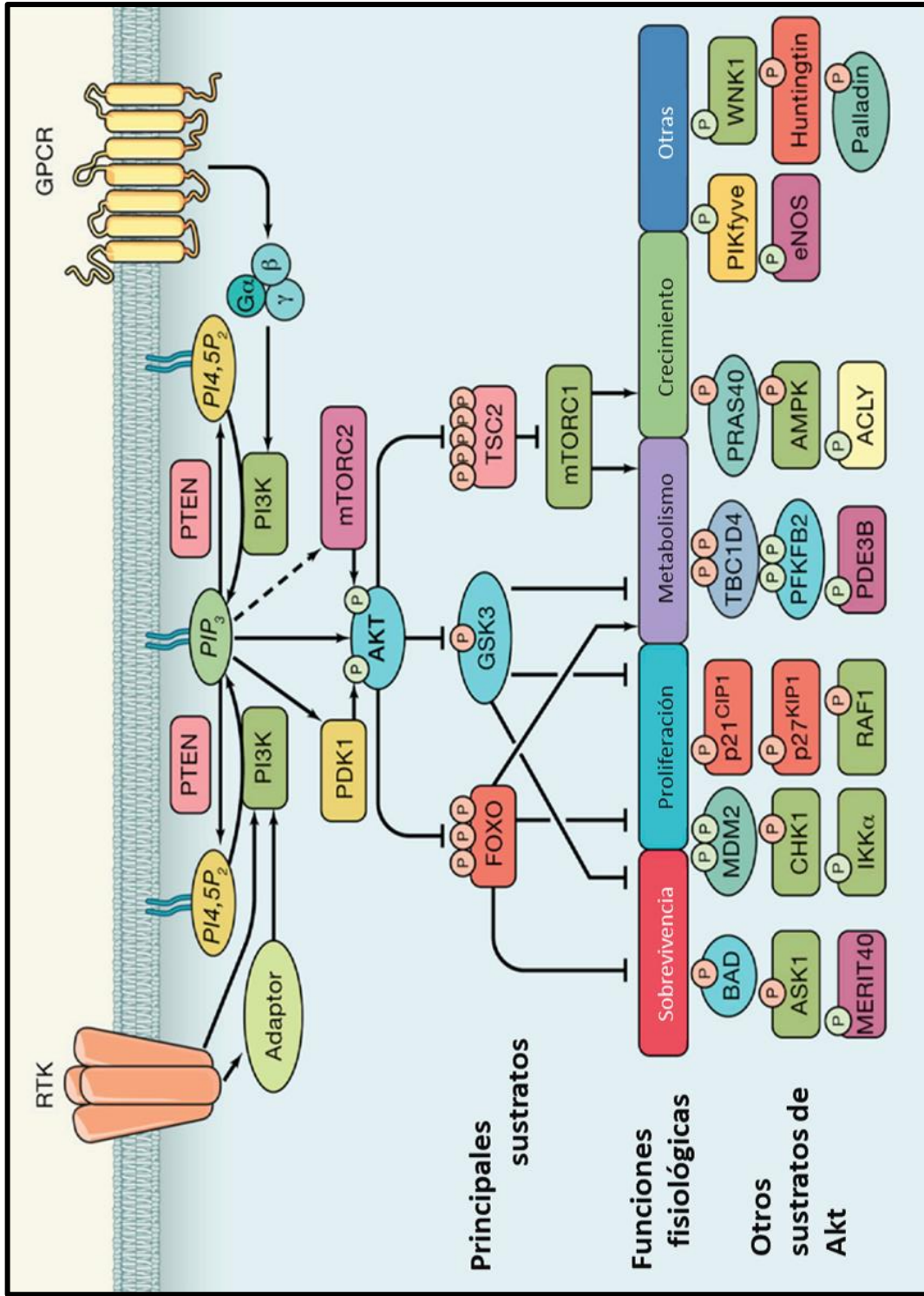


Figura 10. La vía de señalización PI3K/Akt. PI3K convierte el PIP₂ en PIP₃ y permite la activación de Akt por PDK1 y PDK2 (mTORC2). La cinasa Akt controla diversos procesos celulares a través de sus blancos de fosforilación. Tomado y modificado de Manning y Toker, 2017

1.9 La autofagia

La autofagia es el proceso de digestión lisosomal que sufren proteínas y organelos intracelulares marcados. Su función es proveer nutrientes para la realización de funciones vitales. Este mecanismo se dispara en respuesta a distintas formas de estrés celular como la falta de nutrientes, la ausencia de factores de crecimiento, infecciones e hipoxia entre otras. Además, es considerado un sistema de protección pues se encarga de eliminar el material citosólico potencialmente dañino para la célula como mitocondrias dañadas o proteínas agregadas. Por lo tanto, un proceso de autofagia ineficaz puede originar desordenes neurodegenerativos, cáncer, susceptibilidad a infecciones y diabetes (Dikic y Elazar, 2018). Recientemente se ha observado que el proceso de autofagia es específico para cada uno de los componentes a degradar pues los receptores a autofagia reconocen distintas moléculas y son activados con una señalización distinta (Deng *et al*; 2017).

La autofagia es un proceso que tiene distintas etapas: Iniciación, nucleación del fagóforo, secuestro de la carga y elongación, sellado del autofagosoma, maduración y fusión con lisosomas y digestión del contenido (**Figura 11**). En cada fase participan distintas proteínas que pueden ser utilizadas como marcadores específicos de las distintas etapas de la autofagia. Los marcadores más comunes son:

-LC3. Forma parte de la familia ATG. Cuando el fagóforo está en expansión, LC3 es conjugado con la fosfatidiletanolamina de la membrana para funcionar como un sitio de anclaje para los elementos a reciclar.

-Atg5. Forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L que, a través de ATG3, aumenta la conjugación de la familia ATG8 (LC3) con la fosfatidiletanolamina del fagóforo durante su elongación.

-p62. Junto a LC3 funciona como un sitio de anclaje para los elementos que se reciclan.

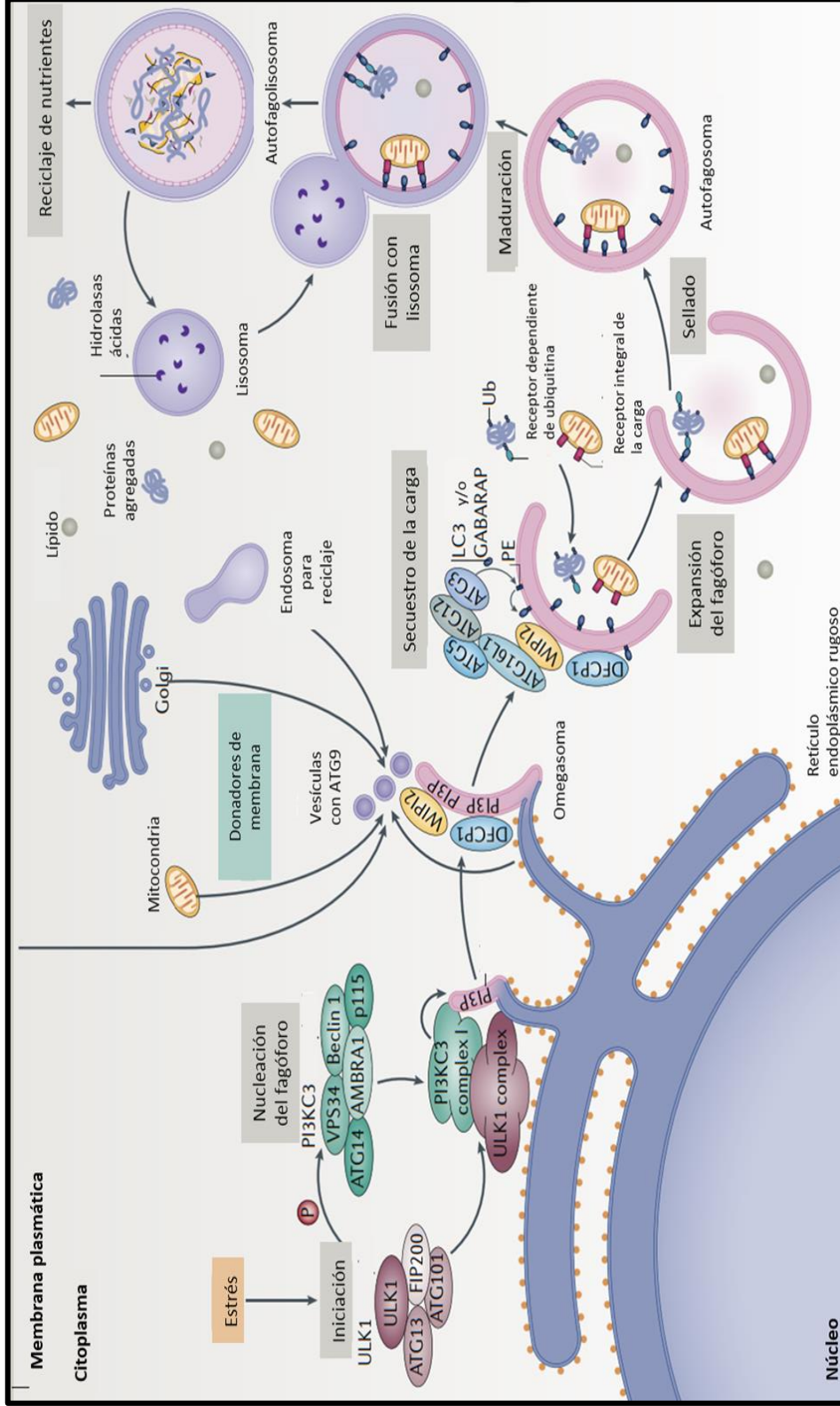


Figura 11. Mecanismo general de la autofagia. La autofagia es activada por un estímulo de estrés provocando que el complejo ULK1 sea llevado a la membrana del retículo endoplásmico donde activa a PI3KC3 para que aumente la concentración de PI3P. Esto recluta a DFCP1 y WIP1 que atraen al complejo ATG12-ATG5-ATG16L y, a través de ATG3, aumenta la conjugación de la LC3 con la fosfatidiletanolamina del fagóforo (LC3 → LC3II). LC3II atrae a componentes con cardiolipina, ceramida o una región de interacción con LC3. Además de LC3, existen otras moléculas de anclaje de la carga como p62. La membrana plasmática, mitocondria, endosomas de reciclaje y el complejo de Golgi donan material membranal liberando vesículas con ATG9 para elongar el fagóforo. ATG4 limita su expansión y se obtiene una vesícula llamada autofagosoma que es transportado a la región donde se encuentran los lisosomas. El autofagosoma y el lisosoma se fusionan y las enzimas lisosomales degradan su contenido. Los componentes obtenidos llegan al citoplasma a través de los transportadores lisosomales. El lisosoma se renueva mediante un proceso llamado reformación autofágica del lisosoma. Tomado y adaptado de Dikic y Elazar, 2018.

2. Objetivos

2.1 Justificación

La disrupción del epitelio intestinal en las enfermedades inflamatorias intestinales se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales que, entre otros efectos, incrementan la concentración de citocinas proinflamatorias como el IFN γ y el TNF α que alteran la proliferación y la muerte de las células epiteliales y provocan la pérdida de la homeostasis intestinal (Maloy *et al*, 2011; Zhang y Li, 2014; Neurath, 2014). Las células secretoras participan en el mantenimiento de la homeostasis epitelial (Shroyer *et al*, 2007); sin embargo, no se entiende su función ni su regulación en las enfermedades inflamatorias intestinales.

2.2 Hipótesis

Las células Tuft y CgA⁺ del epitelio del colon incrementan durante la inflamación intestinal a través de un mecanismo controlado por las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α .

2.3 Objetivo general

Estudiar la generación las células Tuft y CgA⁺ del epitelio del colon en la colitis regulada por las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α .

2.4 Objetivos particulares

1. Estudiar los cambios en la frecuencia de las células CgA⁺ y Tuft durante la inflamación intestinal.
2. Investigar si IFN γ y el TNF α afectan al número de células CgA⁺ y Tuft en el epitelio del colon
3. Identificar las vías de señalización involucradas en el incremento de las células CgA⁺ y Tuft del epitelio del colon en la inflamación.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para westernblot e inmunofluorescencia, así como las diluciones a las que se usaron se agrupan en la **Tabla 1**.

Marca	Anticuerpo	Dilución WB/IF
Abcam	p-Histone H3 (Ser10) ab32107	1:3000/1:500
Cell signaling	Akt1 #2967	1:2000/-
	Atg5 #12994	1:1500/1:500
	Caspasa 1	1:1000/-
	NLRP3	1:2000/-
	p62 #76955	-/1:500
	pAkt (Thr308) #4056	1:2000/-
	pAkt (Ser473) #4060	1:2000/-
	p β catenina (Ser552) #9566	1:1500/-
	pGSK3 β #5558	1:1500/-
	pP70S6K #92065	1:2000/-
	pS6 #15967	1:3000
Genentex	Cromogranina A GTX61391	1:1000/1:500
Jackson Immunoresearch	AffiniPure contra IgG de cabra, ratón y conejo anti-peroxidasa de rabano (HRP).	1:10000/-
Millipore	LC3 I-II	1:1000/1:500
Santa cruz	β -catenina c-ter sc-7199	1:2000/1:1000
	Cromogranina A sc-1488	1:1000/1:750
	DAPI sc-3598	-/1:2500
	GAPDH sc32233	1:10000/-
	p14-3-3 ζ (Ser58)	1:1500/1:750
	PTEN sc-7964	1:1000/-
	pPTEN (Ser380/Thr382/383) sc-101789	1:1000/1:500
Thermo Fisher Scientific	Alexa Fluor 488, 555 y 647	-/1:2000

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones.

3.1.2 Biológicos

- R ratones de la cepa C57BL/6J macho de 6 a 8 semanas de edad. Proporcionados por el CICUAL del Cinvestav Zacatenco.
- Células epiteliales Caco-2 de adenocarcinoma de colon de humano. Donación del Dr. Michael Schnoor Departamento de Biomedicina molecular. Cinvestav Zacatenco.
- Células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Donación del Dr. José Segovia Vila. Departamento de Fisiología, biofísica y neurociencias. Cinvestav Zacatenco.

3.1.3 Equipo

- Crióstato CM1860 (Leica, Nussloch, Germany).
- Kit mini-PROTEAN Tetra para electroforesis Bio-rad 1658035FC.
- Microscopio confocal Ziess LSM510.
- Microscopio de epifluorescencia Zeiss.

3.1.4 Reactivos

- 4,6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) Santa Cruz sc-3598.
- Dextran-fluoresceína 10 kDa Thermo Scientific Cat. No. D22911.
- Dextran sulfato de sodio (DSS) de 40-50 kDa. Affymetrix 9011-18-1.
- Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril. Sigma-Aldrich D2650.
- Kit de detección de proteínas BCA Thermo Scientific Cat. No.23225.

3.1.5 Inhibidores

- Inhibidor AZD8186 donado por Astra Zeneca.
- Inhibidor AktVIII. Calbiochem. Cat. 124018.
- Cloroquina Sigma-Aldrich C6628.
- Cicloheximida.

3.1.6 Citocinas

- Interferón gamma recombinante murino. PEPROTECH 315-05.
- Factor de necrosis tumoral alfa recombinante murino. PEPROTECH 315-01A.
- Interleucina-1 β recombinante murina. PEPROTECH 211-11B.
- Interferón gamma recombinante de humano PEPROTECH 300-02.
- Factor de necrosis tumoral alfa recombinante de humano. PEPROTECH.300-01A.

3.1.7 Soluciones

- Formalina neutra 10%. Sigma–Aldrich HT501128.
- Geles de acrilamida. Gel de separación (10% de acrilamida): 25% de Tris-HCl pH 8.8 1.5M/SDS 4%; 30% DE acrilamida 30%; 0.1% de persulfato de amonio y 0.01% de TEMED. Gel concentrador (5% de acrilamida): 25% de Tris-HCl pH 8.8 1 M/SDS 4%; 30% de acrilamida 30%; 0.1% de persulfato de amonio y 0.01% de TEMED.
- PBS. Sigma–Aldrich P5493.
- Regulador de lisis (RIPA): 50mM Tris-HCl pH 7.4 (Bio-rad); 150 mM NaCl; 2mM EDTA; 1% NP-40; 0.1% SDS en agua bidestilada. Se suplementó con una tableta de inhibidores de proteasas (Complete Roche cat. 11697498001) por cada 50 ml de solución y con inhibidores de fosfatasa 2 y 3 (Sigma cat. P5726 y P00044) al 1% v/v.
- Regulador de corrimiento para electroforesis: Tris 25mM (Bio-rad); glicina 192mM (Bio-rad); persulfato de amonio 0.1% p/v (Bio-rad); TEMED 0.01% v/v (Bio-rad). Disuelto en agua destilada. pH 8.3.
- Regulador de muestra NuPage. Life Technologies. Suplementado con beta-mercaptoetanol 5% v/v.
- Regulador de transferencia para electroforesis: Tris 25mM (Bio-rad); glicina 192mM (Bio-rad); SDS 0.1% p/v. MetOH 20% v/v. Disuelto en agua destilada.
- Solución de permeabilización para inmunofluorescencia: Triton x-100 0.25% en PBS.
- Solución de bloqueo para Westernblot: Leche en polvo sin grasa disuelta al 2% en TTBS.
- Solución de bloqueo para inmunofluorescencia: BSA 2% (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) en solución de permeabilización.
- TTBS: NaCl 150mM, Tris-HCl pH7.4 10mM; Tween-20 0.1% v/v en agua destilada.

3.2 Métodos

3.2.1 Acondicionamiento de los ratones

Para el tratamiento con citosinas, los ratones fueron recibidos en jaulas con camas de aserrín. Tuvieron acceso libre al agua y alimento durante el experimento. El ensayo se inició inmediato a su recepción.

Para el modelo de enfermedad inflamatoria intestinal, los ratones fueron alojados en jaulas con camas de aserrín que no fueron cambiadas. Las camas fueron mezcladas después de siete días y los ratones separados aleatoriamente en los grupos experimentales. Los ratones tuvieron acceso libre al agua y alimento durante el curso del ensayo y se mantuvieron en ciclos de luz/obscuridad de doce horas.

3.2.2 Modelo de enfermedad inflamatoria intestinal

Los ratones recibieron DSS al 3% disuelto en el agua de beber durante 3 días. El grupo control bebió el agua sin DSS. Los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂. El intestino grueso fue extraído y disecado. El colon medio se recibió en 500 µL de RIPA. El colon distal se cortó transversalmente y fue lavado con PBS. Luego se rellenó con O.C.T. para enrollarlo en sentido proximal-distal y embeberlo en un criomolde previamente llenado con el mismo compuesto. Las muestras se congelaron a -20°C durante una hora y se guardaron a -80°C hasta su uso. Los ratones que fueron tratados con inhibidores bebieron DSS durante 6 días, iniciando la administración de las drogas a partir del cuarto día.

3.2.3 Inyección de inhibidores a ratones

Los ratones que bebieron DSS recibieron una inyección intraperitoneal diaria a partir del cuarto día con AZD8186 (5 mg/kg) o AktVIII (2.5 mg/kg) disueltos en 100 µl de DMSO; o cloroquina (40mg/kg) disueltos en 100 µl de agua inyectable. Los ratones fueron sacrificados el sexto día, tres horas después de recibir la última inyección. El grupo control recibió la misma cantidad de inyecciones con 100 µl de DMSO. Los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂. El intestino grueso fue extraído y disecado. El colon medio se recibió en 500 µL de RIPA. El colon distal se cortó transversalmente y fue lavado con PBS. Luego se rellenó con O.C.T. para enrollarlo en sentido proximal-distal y embeberlo en un criomolde

previamente llenado con el mismo compuesto. Las muestras se congelaron a -20°C durante una hora y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.2.4 Inyección de citocinas a ratones

Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal con las citocinas murinas disueltas en 100 μl de BSA (0.002% en agua inyectable): $\text{IFN}\gamma$ (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), $\text{TNF}\alpha$ (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), $\text{IL-1}\beta$ (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o la mezcla de $\text{IFN}\gamma$ / $\text{TNF}\alpha$. Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO_2 después de 2 horas. El colon medio se disecó y se recibió en 500 μL de RIPA analizarlo por western blot. La parte distal se procesó para inmunofluorescencia. Se cortó transversalmente y fue lavada con PBS. Luego se rellenó con O.C.T. para enrollarla en sentido proximal-distal y embeberla en un criomolde previamente llenado con el mismo compuesto. Las muestras se congelaron a -20°C durante una hora y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.2.5 Índice de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal

Los ratones recibieron DSS al 3% disuelto en el agua de beber durante 6 días. A partir del cuarto día recibieron una inyección intraperitoneal con DMSO o Cloroquina. El índice de actividad de la enfermedad (IAE) se calculó puntuando del 1 al 4 la pérdida de peso, longitud del colon, la consistencia de las heces y la presencia de sangre en ellas. Luego de determinar cada parámetro por separado, se promediaron los cuatro. Se realizó un análisis estadístico de tres experimentos independientes.

3.2.6 Cuantificación de células del epitelio intestinal

Se identificaron las glándulas intestinales y se contaron las células del eje de la cripta que fueron positivas a cada uno de los marcadores. Se analizaron, al menos, cien criptas. Los resultados se expresaron en número de células por cripta.

3.2.7 Ensayo de captación de Dextrán por las células epiteliales intestinales

Los ratones recibieron 1 mg de Dextrán de 10 kDa disuelto en 300 μL de PBS por vía rectal. Los animales fueron sacrificados después de 45 minutos. El colon fue extraído por completo y procesado para ser analizado por inmunofluorescencia.

3.2.8 Mantenimiento y subcultivo de células Caco2

Para cosechar las células se retiró el medio nutritivo y la monocapa se lavó con PBS. A continuación, se adicionó el volumen de Tripsina necesario para cubrir la monocapa y se incubó a 37°C el tiempo suficiente para que las células se disgregaran. La tripsina se inactivó con un volumen del medio nutritivo suplementado. Las células requeridas se sembraron en una caja de Petri o una botella nueva y se incubaron en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

3.2.9 Curva temporal de células Caco 2 estimuladas con citocinas

Las células Caco2 fueron sembradas hasta alcanzar la confluencia. En ese momento el medio se cambió por medio nuevo sin suplementar y la monocapa fue estimulada con IFN γ (200 U/ml)/TNF α (100 ng/ml) durante 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Al término del experimento se retiró el medio de la monocapa y se lavó con PBS. Se adicionó RIPA y se congeló a -20°C.

3.2.10 Tratamiento de células Caco2 con citocinas e inhibidores

Las células Caco2 fueron sembradas hasta alcanzar la confluencia. En ese momento el medio se cambió por medio nuevo sin suplementar conteniendo AZD8186 (500nM); AktVIII (4 μ M); Cloroquina (250 μ M) ó Cicloheximida (100 mg/ml). Luego de 15 minutos se estimuló con IFN γ (200 U/ml)/TNF α (100 ng/ml) durante nueve horas. Al término del experimento se retiró el medio de la monocapa y se lavó con PBS. Se adicionó RIPA y se congeló a -20°C.

3.2.11 Westernblot

La muestra se descongeló y a partir de ese momento se trabajó en frío. El tejido fue lisado con el homogeneizador y luego se sonicó por 15 segundos a una amplitud de 40%. Las células fueron sonicadas con 5 pulsos a una amplitud de 40 %. El lisado fue centrifugado a 12000 rpm durante diez minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó usando el kit BCA siguiendo las instrucciones del fabricante. El sobrenadante fue mezclado con regulador NuPage en una proporción 3:1 y esta mezcla calentada a 90°C durante 10 minutos.

Se cargaron 20 µg de proteína en los pozos de los geles de acrilamida (10%). La electroforesis se realizó usando regulador de corrida y fijando el voltaje en 120 V hasta que el frente de corrimiento abandonó el gel. El contenido del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm fijando la corriente en 0.45 amperes y usando regulador de transferencia. Al finalizar, la membrana se lavó con agua destilada y se tiñó con rojo de ponceau durante 15 minutos para corroborar la presencia de proteínas. La membrana fue lavada con TTBS y se incubó con solución de bloqueo durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación suave. Luego se incubó con el anticuerpo primario (disuelto en solución de bloqueo) toda la noche, a 4 °C y en agitación suave. Al siguiente día la membrana fue lavada en tres ocasiones con TTBS y se incubó una hora con el anticuerpo secundario (en solución de bloqueo). Fue lavada tres veces más con TTBS y se añadió el sustrato químico luminiscente necesario para cubrirla. La señal fue detectada en placas fotográficas.

3.2.12 Inmunofluorescencia

Se obtuvieron rebanadas de 20 µm del colon usando el criostato a una temperatura de -20 °C. Se montaron en un portaobjetos previamente gelatinizado y se guardaron a -80 °C hasta su tinción.

Las laminillas con los cortes fueron lavadas con PBS y fijadas con formalina neutra al 10 % durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Luego se lavaron con PBS y fueron permeabilizadas una hora con Tritón x-100 (0.25 % en PBS). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:1000 en solución de bloqueo) toda la noche, a 4 °C, sin agitación. A la mañana siguiente, las laminillas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:1000 en BSA al 2 %) y DAPI (dilución 1:2500 en BSA al 2 %) durante una hora, a temperatura ambiente y aisladas de la luz. Luego se lavaron con PBS tres veces y se montó un cubreobjetos con resina.

4. Resultados

4.1 El número de células CgA⁺ aumenta en la inflamación intestinal

La homeostasis del epitelio intestinal se pierde en las EIIs (Maloy *et al*, 2011). Se sabe que el proceso de diferenciación es crucial para mantener al epitelio intacto (Shroyer *et al*, 2007); sin embargo, se ha estudiado muy poco en estas enfermedades. Por lo tanto, lo primero que se investigó fue si la colitis inducida con DSS aumenta a una población específica de células epiteliales secretoras en el colon.

Cromogranina A se considera un marcador genérico para las células enteroendócrinas de todo el cuerpo, pero en el colon, las células enterocromafines son las únicas productoras de esta proteína (Engelstoft *et al* 2015). Sirve como el iniciador de la agregación de los gránulos de secreción de las células CgA⁺ y como precursor de hormonas (D'Amico *et al*; 2014). En esta investigación se utilizaron dos anticuerpos que reconocen a esta molécula en su extremo C-Ter (sc-1488) y N-Ter (GTX61391) obteniendo resultados muy similares con ambos (**Figuras 12a y 12b**). Esta molécula se observó en el citoplasma de las células epiteliales en un patrón puntiforme homogéneo, sugiriendo su localización en vesículas. Las células positivas a este marcador fueron ahusadas con proyecciones polares de su citoplasma que asemejan dendritas (**Figuras 12a y 12b**). También se detectaron células con una forma piramidal o triangular, sin las astas polares (**Figura 12c**). Esto se observó principalmente en el tejido de ratones tratados con DSS o con las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α .

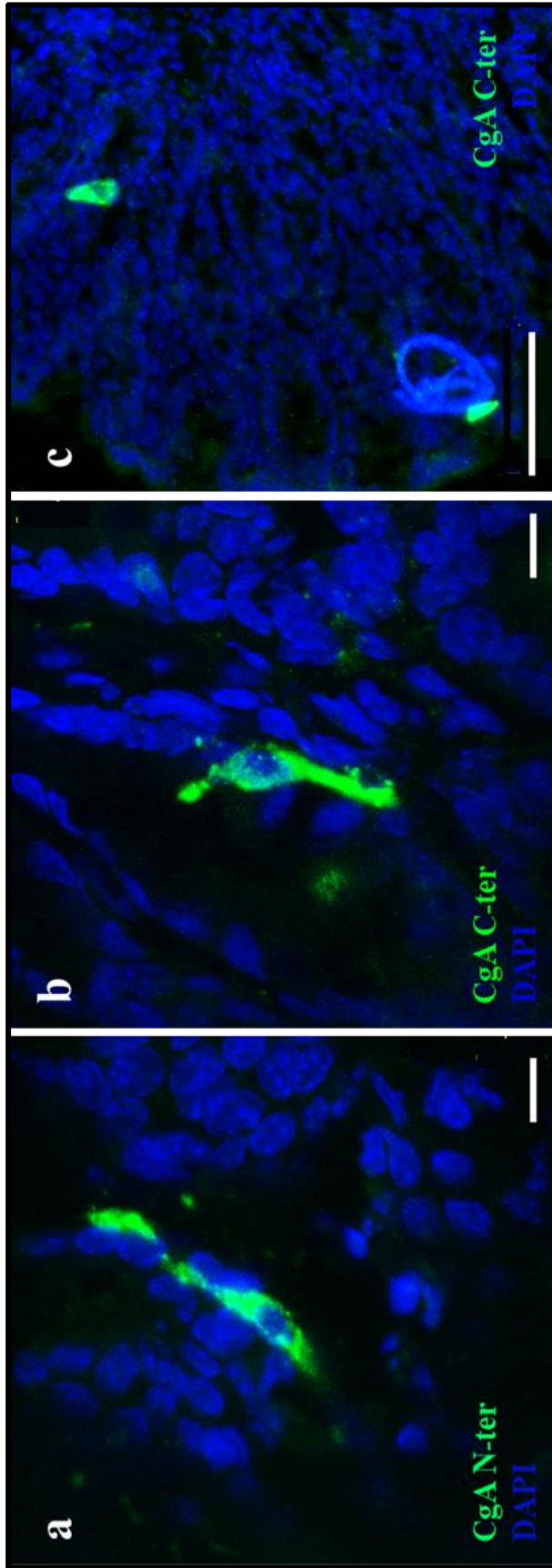


Figura 12. Morfología de las células que expresan CgA. Imagen representativa de las células que expresan CgA en el epitelio del colon de ratones C57BL/6J. Tomada en un microscopio confocal ZEISS LSM 500 con el objetivo **a)** y **b)** 40x y **c)** 20x. Azul: DAPI; verde: CgA. Barra= **a)** y **b)** 10µm, **c)** 100 µm.

En promedio, en condiciones basales, se encontraron 0.8 células CgA⁺ por cripta intestinal. La administración de DSS ocasionó que la frecuencia se elevara hasta una media de 2.15, es decir, el proceso inflamatorio aumentó a más del doble el número de células enteroendócrinas en el epitelio del colon de los ratones (**Figura 13**).

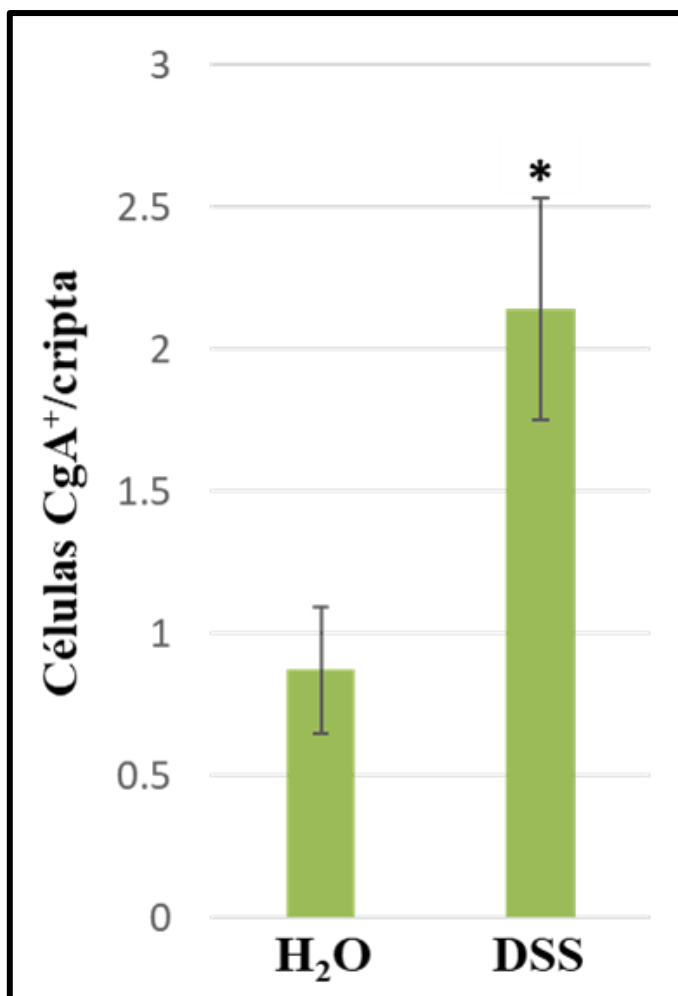


Figura 13. El número de células CgA⁺ incrementa en la colitis inducida con DSS. Cuantificación de células CgA⁺ en el epitelio del colon de ratones C57BL/6J que bebieron agua o DSS 3% durante 3 días. Resultados derivados de 3 experimentos independientes. Se grafica el promedio ± una desviación estándar. *= diferencia significativa, p<0.005.

4.2 El IFN γ y el TNF α incrementan el número de células CgA⁺ en el epitelio intestinal

En las EIIs y en la colitis por administración de DSS, las citocinas proinflamatorias IFN γ y el TNF α aumentan notoriamente (Nava *et al*, 2010; Strober y Fuss, 2011; Neurath, 2014), lo que sugiere que son las responsables del incremento de las células CgA⁺ observado. Para investigar esta posibilidad se inyectó intraperitonealmente IFN γ , TNF α o la mezcla de IFN γ

y el TNF α a un grupo de ratones. Después de dos horas, se disecó el colon y se procesó para inmunofluorescencia y westernblot. La mezcla de IFN γ y el TNF α aumentó la cantidad de cromogranina A en el colon de los ratones tratados mientras las citocinas por separado la disminuyeron (**Figura 14**). En la **Figura 15b** se muestra que el número de células CgA⁺ (en verde) aumentó en el epitelio de los ratones tratados con la mezcla de citocinas respecto a los que recibieron la inyección con BSA (**Figura 15a**). Las citocinas por separado no provocaron cambios estadísticamente significativos (**Figuras 15c y 15d**).

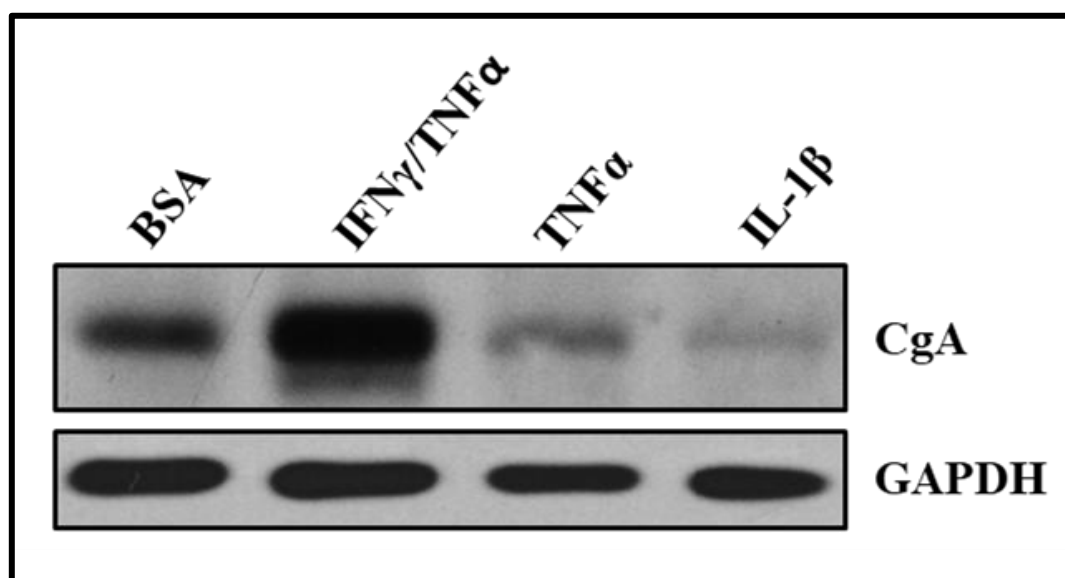


Figura 14. La mezcla de IFN γ y TNF α incrementan el nivel de CgA en el colon. Westernblot para CgA en el colon de ratones C57BL/6J que recibieron una inyección intraperitoneal con BSA, TNF α , la mezcla IFN γ /TNF α o IL-1 β y después de dos horas fueron sacrificados. GAPDH fue utilizado como control de carga.

En la colitis experimental se liberan grandes cantidades de IL-1 β (Bauer, 2010) que resulta del incremento de los componentes del inflammasoma NLRP3 como lo muestran el aumento en la densidad de la banda de NLRP3 y de la fracción activa de Caspasa 1 de 20 kDa (**Figura 16**). Por lo tanto, se investigó si la alta concentración de IL-1 β incrementa el número de células CgA⁺ en el epitelio intestinal. Sorprendentemente, la inyección con esta Interleucina tuvo el efecto contrario pues disminuyó el nivel de CgA en el colon de los ratones (**Figura 14**) reflejándose en una tendencia a la baja del número de células que la expresan (**Figura 15c**). Los resultados anteriores demuestran que la mezcla de IFN γ y TNF α incrementa el número de células CgA⁺ en el epitelio del colon de los ratones.

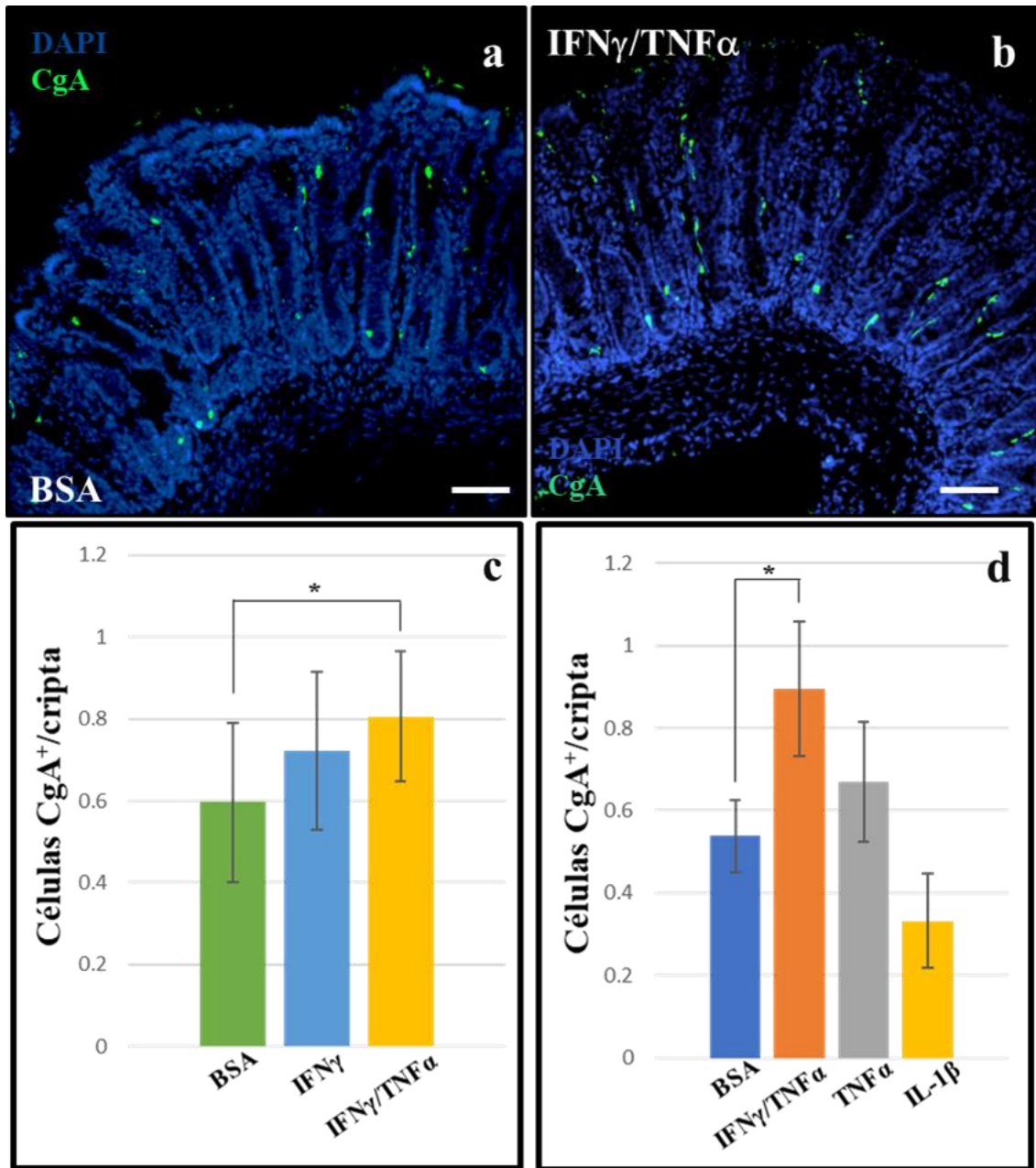


Figura 15. El IFN γ y TNF α incrementan el número de células CgA⁺ en el epitelio del colon. Inmunofluorescencia de la proteína CgA en colon de ratones C57BL/6J que recibieron una inyección intraperitoneal con **a)** BSA o **b)** la mezcla IFN γ y TNF α y que fueron sacrificados después de dos horas. Azul: DAPI; verde: CgA. Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 40x. Barra=10 μ m. Cuantificación de células CgA⁺ en las criptas intestinales de ratones C57BL/6J que fueron inyectados con **c)** BSA, IFN γ o la mezcla IFN γ /TNF α o **d)** MSA, TNF α , la mezcla IFN γ /TNF α o IL-1 β y sacrificados después de dos horas. Resultados derivados de 3 experimentos independientes. Se grafica el promedio \pm una desviación estándar. *= diferencia significativa, $p < 0.05$.

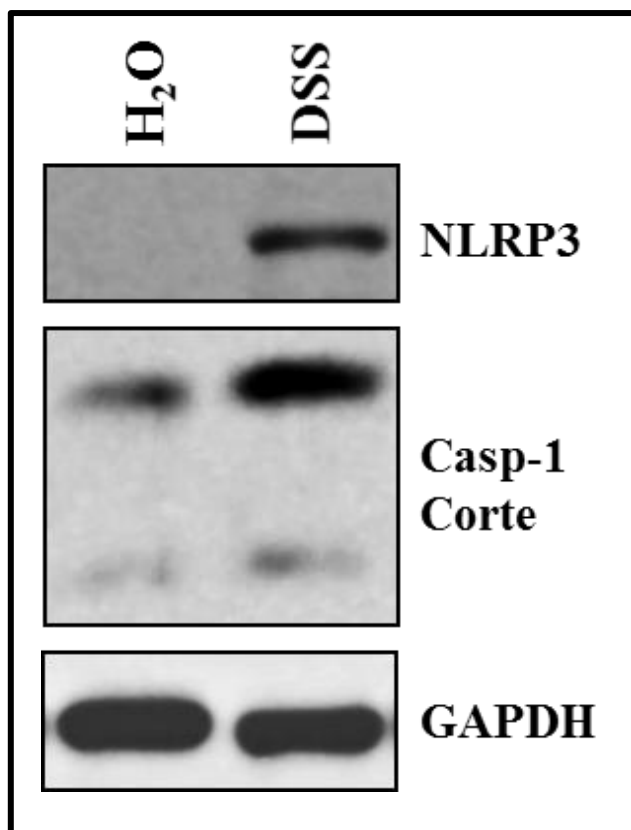


Figura 16. Los componentes del inflammasoma NLRP3 incrementan en la colitis inducida con DSS. Westernblot de NLRP3 y Caspasa 1 en el colon de ratones C57BL/6J que bebieron agua o DSS 3% durante 3 días. La banda de Casp-1 de 45 kDa corresponde a la proteína completa y la de 20 kDa a la fracción activa. GAPDH fue usado como control de carga.

4.3 Las células CgA⁺ inducidas con IFN γ y TNF α son post mitóticas

El aumento del número de células que expresan CgA se detectó desde las dos horas de tratamiento con las citocinas proinflamatorias. Por la rapidez con la que aparecieron se investigó si se trataba de células en división o post mitóticas mediante una inmunofluorescencia para pHis3. Las células que expresaron CgA fueron negativas para el marcador de proliferación (pHis3) en el colon de los ratones que recibieron citocinas (**Figura 17b**) y en los que no (**Figura 17a**). Esto quiere decir que todas las células que expresan CgA se encuentran fuera de la fase G2/M del ciclo celular.

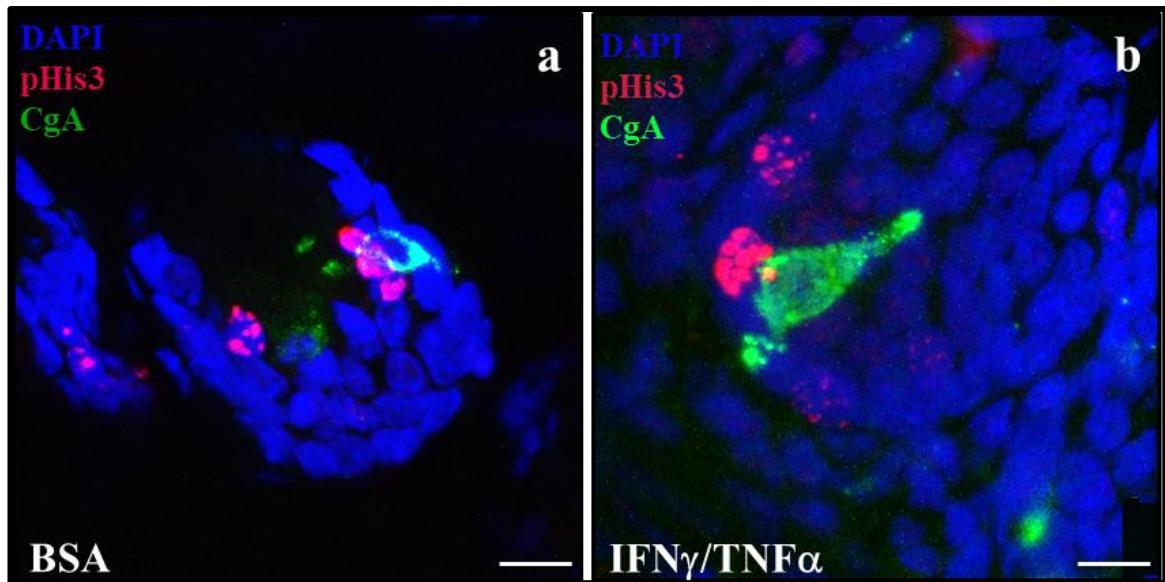


Figura 17. Las células CgA⁺ no expresan pHis3. Co-localización de CgA con pHis3 en colon de ratones C57BL6J que recibieron una inyección intraperitoneal con a) BSA o b) la mezcla IFN γ y TNF α . Azul: DAPI; verde: CgA; rojo: pHis3. Imágenes representativas tomada en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 60x. Barra=10 μ m.

4.4 Las células CgA⁺ inducidas con las citocinas capturan antígenos de la luz intestinal

Para investigar si las células productoras de CgA detectadas después del tratamiento con las citocinas eran funcionales, se evaluó su capacidad de capturar antígenos, proceso que controla la producción y la secreción de sus productos (Bugunovic *et al*, 2007; Nagate *et al*, 2014). Las células CgA⁺ (en rojo) resultaron positivas para el marcaje en verde (Dextrán 10 kDa) tanto en el colon de ratones que fueron inyectados con BSA (**Figura 18a**), como en aquellos que recibieron la mezcla IFN γ y TNF α (**Figura 18b**). Estos resultados demuestran que las células productoras de CgA, inducidas con las citocinas, son funcionales y pueden capturar antígenos de hasta 10 kDa de peso molecular.

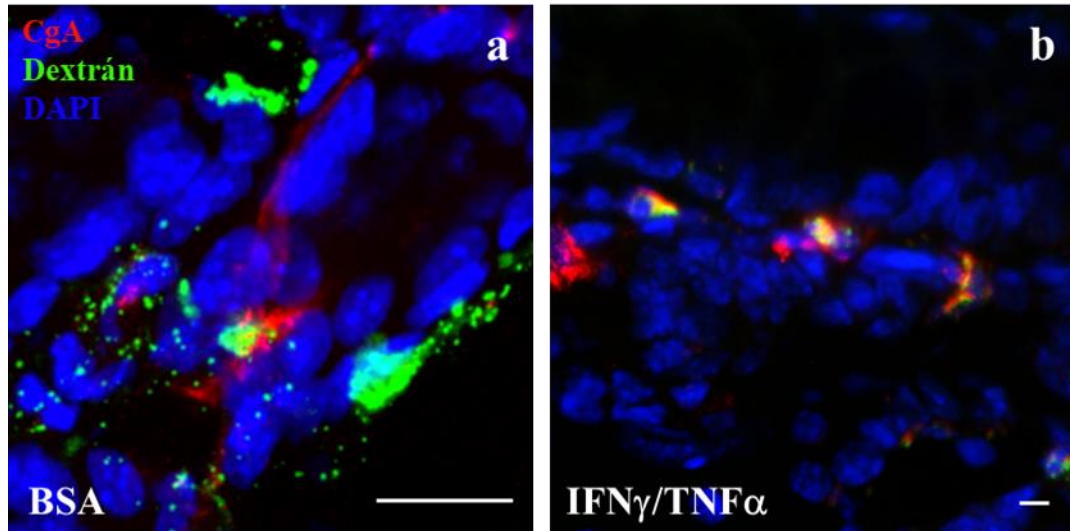


Figura 18. Las células CgA⁺ capturan antígenos de la luz intestinal. Colocalización de CgA con Dextrán de 10 kDa en colon de ratones C57BL6J que recibieron una inyección intraperitoneal con a) BSA o b) la mezcla IFN γ y TNF α . Azul: DAPI; verde: Dextran 10 kDa; rojo: CgA. Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 60x. Barra=10 μ m.

4.5 La mezcla de IFN γ /TNF α activa la vía de señalización PI3K/Akt en el colon de los ratones

A continuación, se investigó el mecanismo molecular que la mezcla de IFN γ /TNF α dispara para aumentar el número de células CgA⁺ en el epitelio del colon. Se sabe que la vía de señalización PI3K/Akt controla el proceso de diferenciación de las células musculares (Gardner et al, 2012) e inmunológicas (Limón *et al*, 2012) y que las células diferenciadas del epitelio intestinal poseen una mayor concentración de Akt activo respecto a las que no lo están (Dufour *et al*, 2004). Por lo tanto, se investigó si la inyección intraperitoneal de las citocinas activa esta vía de señalización en el colon de los ratones.

PTEN es el “interruptor” de la vía PI3K y, cuando es fosforilado, la vía de señalización se dispara. En la **Figura 19** se observa que las citocinas incrementaron significativamente la fosforilación de esta proteína sin afectar su cantidad total. Akt es una molécula efectora de la vía y se activa por la fosforilación de su treonina 308 y serina 473. Nótese cómo la inyección de citocinas incrementó la señal de pAkt308 y pAkt473 sin afectar su cantidad total. Para corroborar que la vía PI3K se activó, se buscó si la fosforilación de los blancos de Akt GSK3 β y β -catenina aumenta. El tratamiento con citocinas incrementó a pGSK3 β y p β -catenina (**Figura 19**). El nivel total de ésta última aumentó pues se sabe que la fosforilación de su

serina 552 la estabiliza y alarga su vida media. Estos resultados muestran que las citocinas IFN γ /TNF α activan la vía de señalización PI3K/Akt en el colon de los ratones.

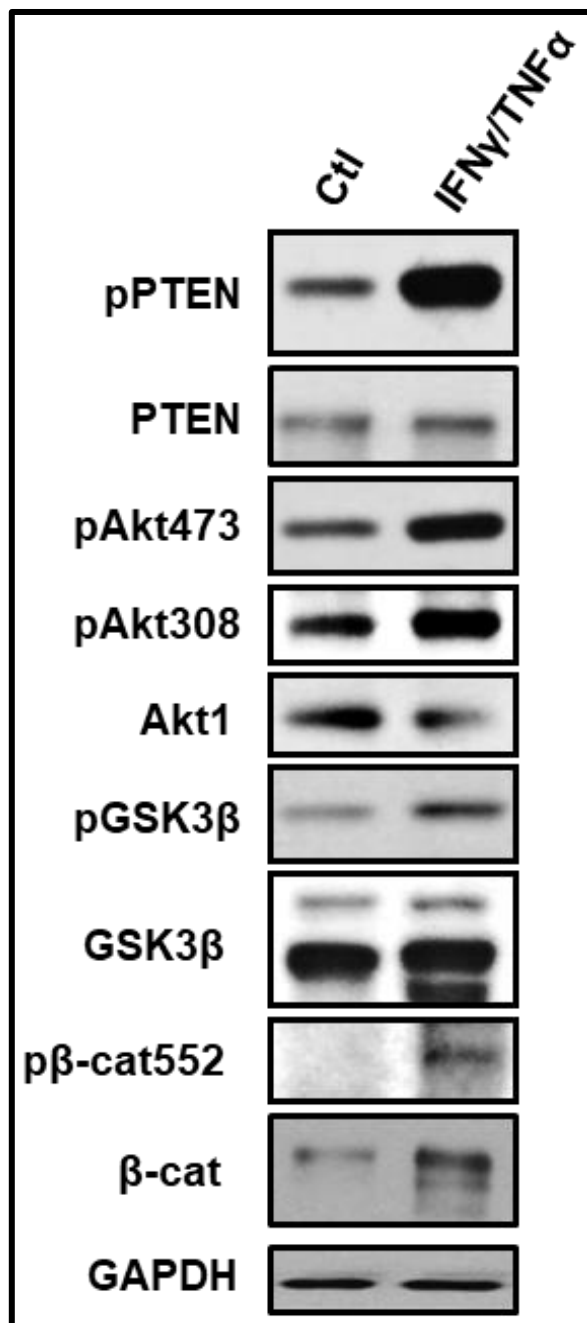


Figura 19. IFN γ /TNF α activan la vía de señalización PI3K/Akt/ β -catenina en el colon de los ratones. Westernblot de pPTEN, pAkt, pGSK3 β , p β -catenina y sus formas totales en el colon de ratones C57BL/6J que recibieron una inyección de BSA o IFN γ /TNF α y que fueron sacrificados después de dos horas. GAPDH fue usado como control de carga.

4.6 La mezcla de IFN γ /TNF α activa la autofagia en el colon de los ratones

Nuestro grupo de trabajo reportó con anterioridad que el DSS y el IFN γ disparan el proceso de autofagia dependiente de mTORC1 en las células epiteliales (Gómez-Suarez *et al*, 2016). Por lo tanto, se investigó si la mezcla de citocinas provocaba un fenómeno similar en el colon de los ratones. En la **Figura 20** se observa que las citocinas incrementaron la fosforilación de 14.3.3 ζ y con ello su estabilidad y su nivel total en el colon de los ratones. De acuerdo con nuestra publicación anterior, esto debió provocar la inhibición de la actividad de mTORC1. Sorpresivamente, los niveles de fosforilación de P70S6K (blanco directo de mTORC1) y pS6 (blanco de P70S6K) incrementaron drásticamente. A pesar de ello, los marcadores de autofagia Atg5 y LC3-II aumentaron discretamente. Estos resultados sugieren que las citocinas activan de manera paralela la autofagia dependiente de mTORC1 y a mTORC1 en el colon de los ratones.

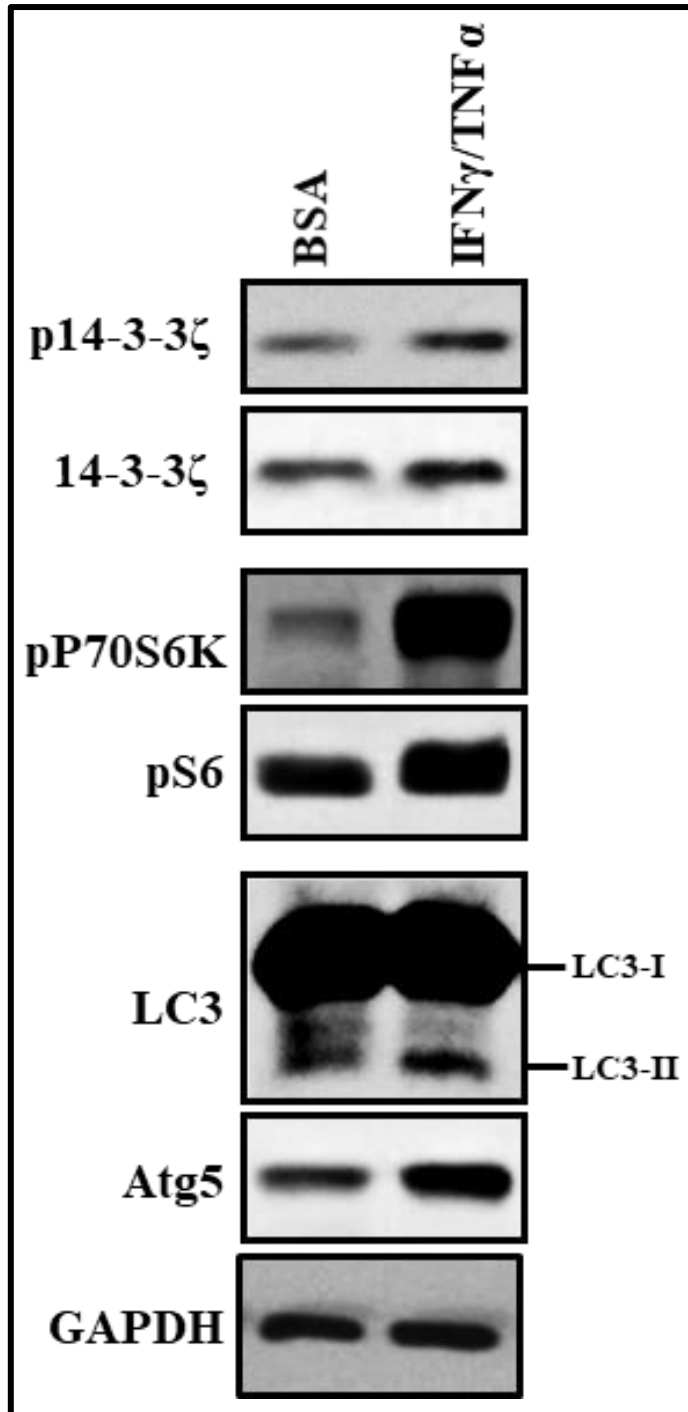


Figura 20. IFN γ /TNF α activan mTORC1 y la autofagia en el colon de los ratones. Westernblot de p14.3.3, pP70S6K, pPS6, LC3I-II y Atg5 en el colon de ratones C57BL/6J que recibieron una inyección de BSA o IFN γ /TNF α y que fueron sacrificados después de dos horas. GAPDH fue usado como control de carga.

4.7 Las células Caco2 expresan y procesan CgA

Las citocinas IFN γ /TNF α incrementaron la frecuencia de las células CgA⁺ en el epitelio del colon de los ratones C57BL/6J y, además, activaron el eje de señalización PI3K/Akt/mTORC1/ β -catenina y la autofagia dependiente de mTORC1 en el tejido. Por lo tanto, se investigó la asociación de estos elementos en la modificación del número de las células productoras de CgA.

El primer reto fue conseguir una línea celular de colon que expresara cromogranina A. Como no había reportes de alguna línea con estas características, se investigó si las Caco2 lo hacían; se eligieron porque derivan de colon humano y tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* (Jumarie y Malo, 1991). Las células fueron lisadas nueve días después de alcanzar la confluencia, tiempo suficiente para que alcanzaran una diferenciación espontánea (Ferruzza *et al*, 2012). El lisado fue analizado por Westernblot, usando a las células de neuroblastoma SH-SY5Y como control de expresión de CgA (Ou *et al*, 1998). Se utilizaron dos anticuerpos para detectar a CgA. El primero contra su región N-ter y el segundo contra la región C-ter. En ambos casos se detectó la presencia de bandas de 70-75 kDa, características de CgA nativa y de 45-60 kDa correspondientes a la molécula madura (D'amico *et al*, 2014). Esta molécula es el precursor de diversas hormonas y es necesario que sea procesada enzimáticamente para generar los péptidos bioactivos de bajo peso molecular (D'amico *et al*, 2014). En las células SH-SY5Y se detectó una banda de aproximadamente 28 kDa y otra de 30 kDa mientras en las células Caco2 se aprecian bandas de 28, 35, 37 y 45 kDa. Estos resultados comprueban que las células Caco2 expresan CgA y tienen la maquinaria enzimática necesaria para generar sus productos bioactivos (**Figuras 21a y 21b**).

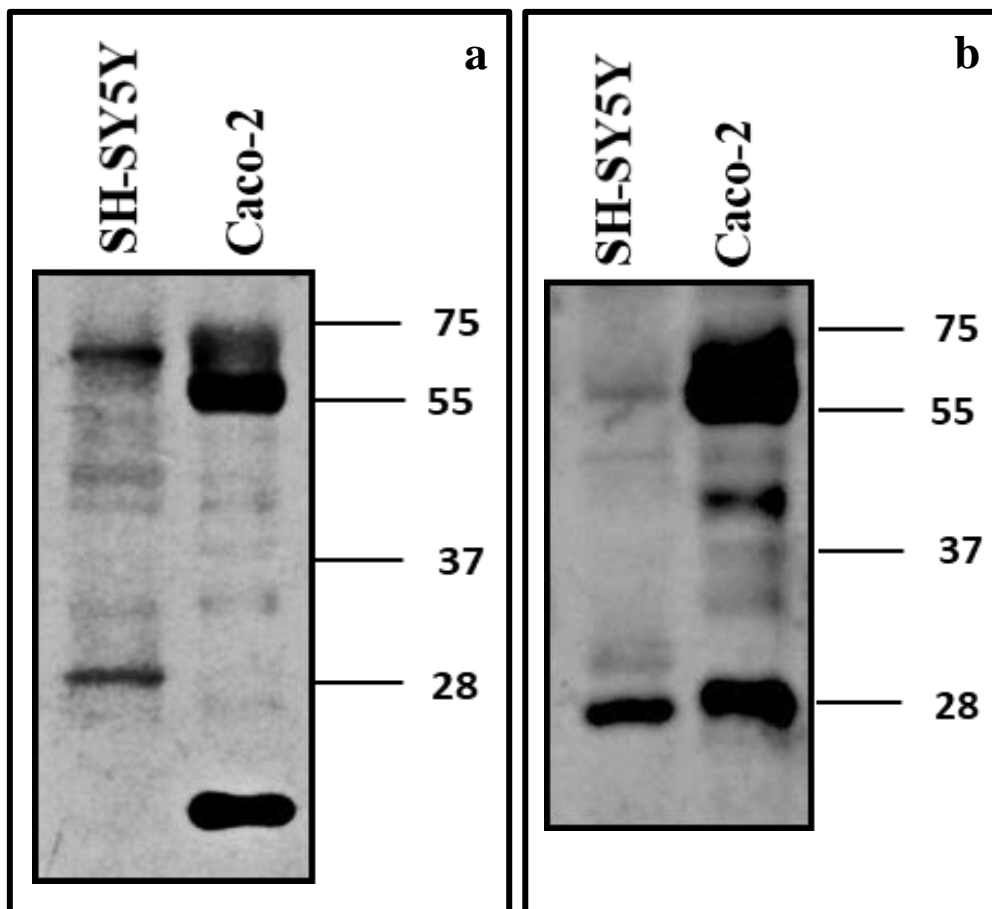


Figura 21. Las células Caco2 expresan y procesan CgA. Análisis de la expresión de CgA en el lisado de un cultivo confluyente de células SHSY5y y de células Caco2 mantenidas durante 9 días después de alcanzar la confluencia. Los anticuerpos utilizados reconocen la región **a)** N-ter y **b)** C-ter de CgA. La banda de 70 kDa corresponde a la forma nativa de la proteína; las de 45-60 kDa a la forma madura y; las bandas de peso molecular menor a 48 kDa corresponden a las formas procesadas proteolíticamente. GAPDH fue usado como control de carga.

4.8 IFN γ /TNF α incrementan el nivel de CgA y activan la autofagia y la vía PI3K/Akt en las células Caco2

A continuación, se investigó si la mezcla de IFN γ /TNF α aumenta el contenido de CgA en las células Caco2. Para ello, se estimularon con las citocinas a distintos lapsos. En la **Figura 22** se muestra que las citocinas aumentaron el nivel de CgA desde las 6 horas, alcanzando un pico máximo a las 9 para disminuir a partir de las 24 horas. Luego se analizó si el aumento de CgA correlaciona con la activación de la vía PI3K/Akt. La fosforilación de PTEN aumentó desde las 3 horas hasta un máximo a las 9 y se mantuvo así hasta las 24 horas. pAkt aumentó a partir de las 6 horas con un pico a las 9 y su disminución a partir de las 12. Después se

analizó la activación de la autofagia. p14.3.3 ζ incrementó desde las 3 horas y se mantuvo así. El componente del autofagosoma, Atg5, también aumentó desde las 3 horas, alcanzó su pico a las 6 y se mantuvo ligeramente elevado hasta las 24. La banda de LC3-I aumentó desde las 6 horas y alcanzó su nivel máximo a las 9 mientras LC3-II aumentó abruptamente a partir de las 6 horas y bajo gradualmente sugiriendo el flujo de la autofagia (**Figura 22**). Estos resultados demuestran que las citocinas IFN γ /TNF α incrementan el nivel de CgA en las células Caco2 y esto correlaciona con la activación de la autofagia y de la señalización de la vía PI3K/Akt.

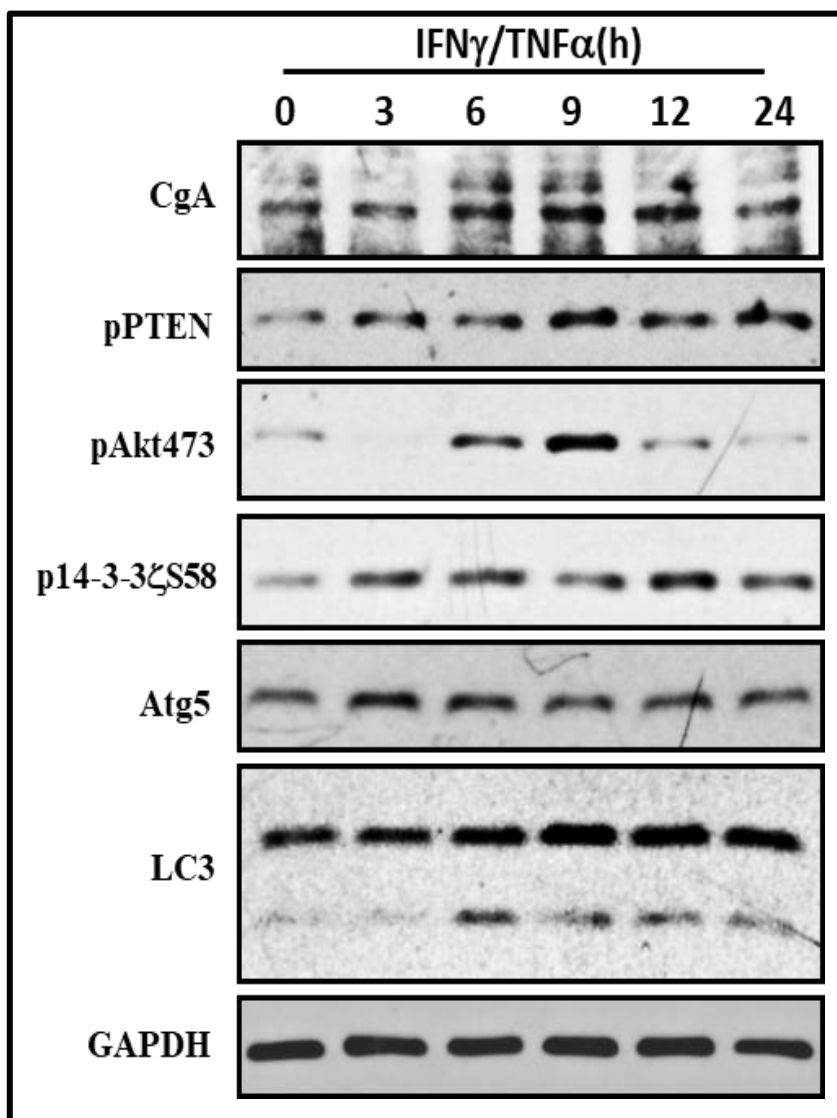


Figura 22. IFN γ /TNF α incrementan el nivel de CgA y activan la autofagia y la vía PI3K/Akt en las células Caco2. Análisis de los niveles de CgA, pPTEN, pAkt473, p14.3.3, Atg5 y LC3 I-II por Westernblot en células Caco2 que fueron estimuladas con IFN γ /TNF α durante 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. GAPDH fue usado como control de carga.

4.9 IFN γ /TNF α incrementan la expresión de CgA en las células Caco2 a través de un mecanismo dependiente de la autofagia y de la activación de Akt

La mezcla de citocinas incrementó el nivel de CgA y se investigó si esto se debe a un aumento en la expresión o en la estabilidad de la molécula. Para ello, las células se estimularon con IFN γ /TNF α durante 9 horas en presencia de cicloheximida. Las citocinas incrementaron el nivel de CgA 1.2 veces, pero esto se evitó con el inhibidor de la síntesis de proteínas comprobando que el IFN γ y el TNF α provocan la expresión *de novo* de la molécula (**Figura 23**). A continuación, se estudió la relación que guardan la vía PI3K/Akt y la autofagia con la expresión de CgA (**Figura 23**). La estimulación de las células con IFN γ /TNF α aumentó 1.2 veces el nivel de CgA, pero con la inhibición de PI3K (AZD8186) sólo se incrementó 0.7 veces y con la inhibición de la actividad de Akt (AktVIII) aumentó 0.5 veces. La inhibición de la autofagia con cloroquina abatió completamente la expresión de CgA y la activación de Akt. Estos resultados indican que IFN γ /TNF α estimulan la síntesis *de novo* de CgA en las células epiteliales a través de un mecanismo dependiente de la autofagia y de la actividad de Akt.

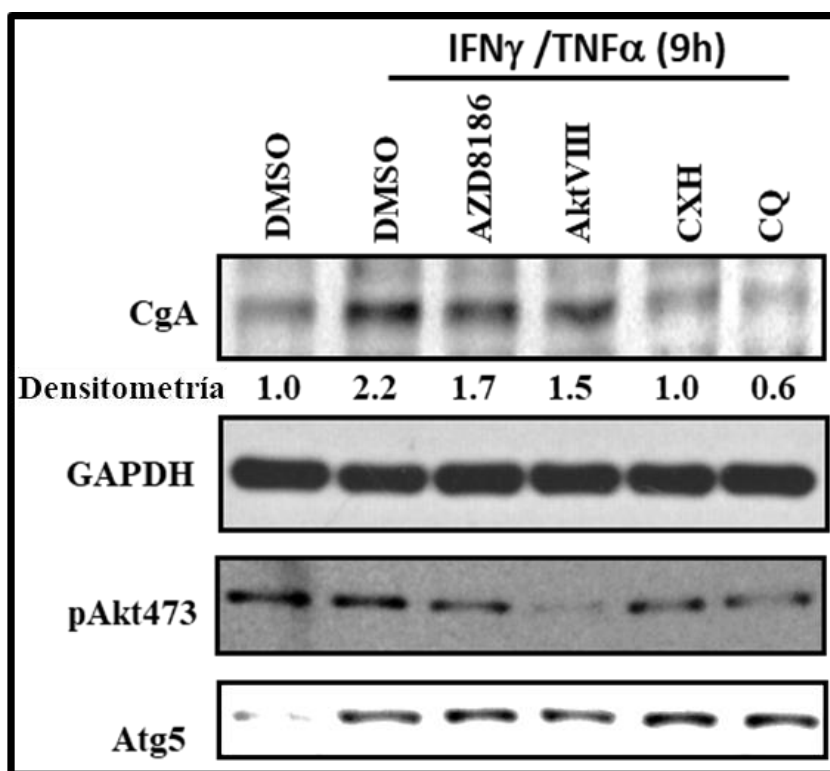


Figura 23. IFN γ /TNF α incrementan la expresión de CgA en las células Caco2 y depende de la autofagia y de Akt. Análisis de los niveles de CgA, pAkt473 y Atg5 por Westernblot en células Caco2 estimuladas con IFN γ /TNF α durante nueve horas en presencia de DMSO, AZD8186, AktVIII, cloroquina y cicloheximida. GAPDH fue usado como control de carga.

4.10 Las células CgA⁺ expresan el marcador p62 y pPTEN

Como la expresión de CgA correlacionó con la activación de la autofagia y de la vía PI3K/Akt, se analizó la expresión de p62 y pPTEN en las células CgA⁺. En todos los casos estas células fueron positivas para el marcador de la activación de la vía PI3K/Akt (**Figura 24a**) que se localizó principalmente en el núcleo de las células. El marcador de autofagia también co-localizó con CgA y se observó en gránulos que sugieren la presencia de autofagosomas (**Figura 24b**). Estos resultados comprueban que las células CgA⁺ requieren de la autofagia y de la vía PI3K/Akt para producir Cromogranina A.

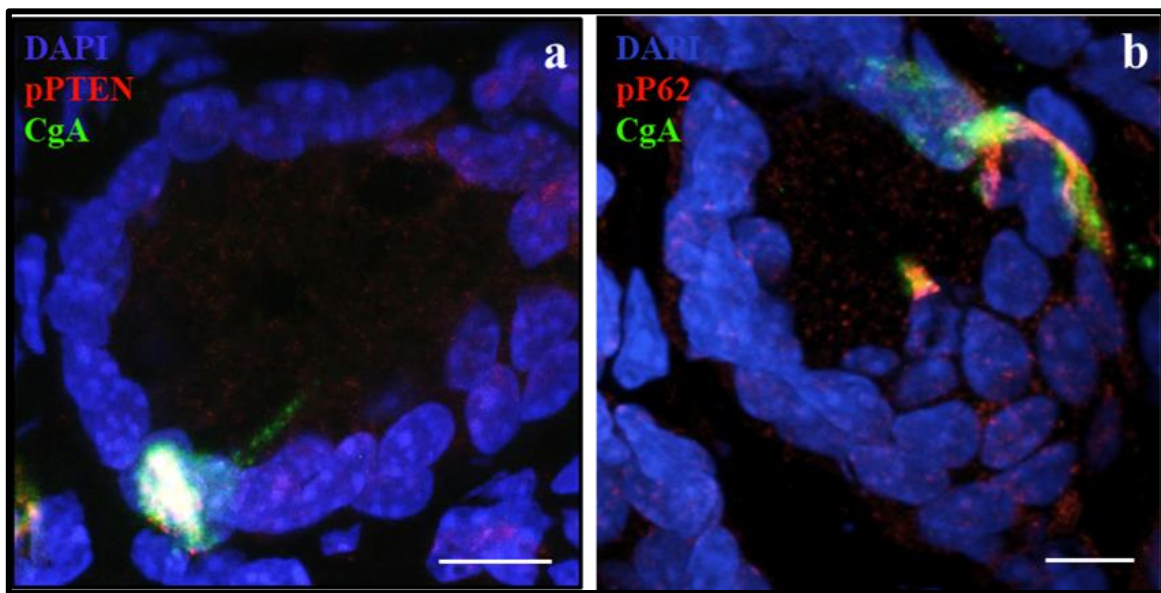


Figura 24. Las células CgA⁺ son positivas para p62 y pPTEN. Co-localización de **a)** pPTEN y **b)** p62 con CgA en el colon de ratones C57BL/6J. Azul: DAPI; verde: CgA; rojo **a)** p62, **b)** pPTEN. Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 60x. Barra=10µm.

4.11 La inhibición de la autofagia y la vía de señalización PI3K/Akt evita el incremento de las células CgA⁺ en la colitis

Para corroborar si la autofagia y la activación de Akt regulan el número de células productoras de CgA en el epitelio intestinal se indujo colitis en los ratones en presencia y ausencia de los inhibidores de ambos procesos. En la **Figura 25** se muestra que la inflamación duplica el número de células CgA⁺, efecto que se evita con la inhibición de PI3K (AZD8186), Akt (AktVIII) y la autofagia (Cloroquina). Estos resultados confirman que la vía de señalización PI3K/Akt y el proceso de autofagia son indispensables para la producción

de CgA y el aumento del número de células que expresan este marcador en la colitis mediada por IFN γ /TNF α .

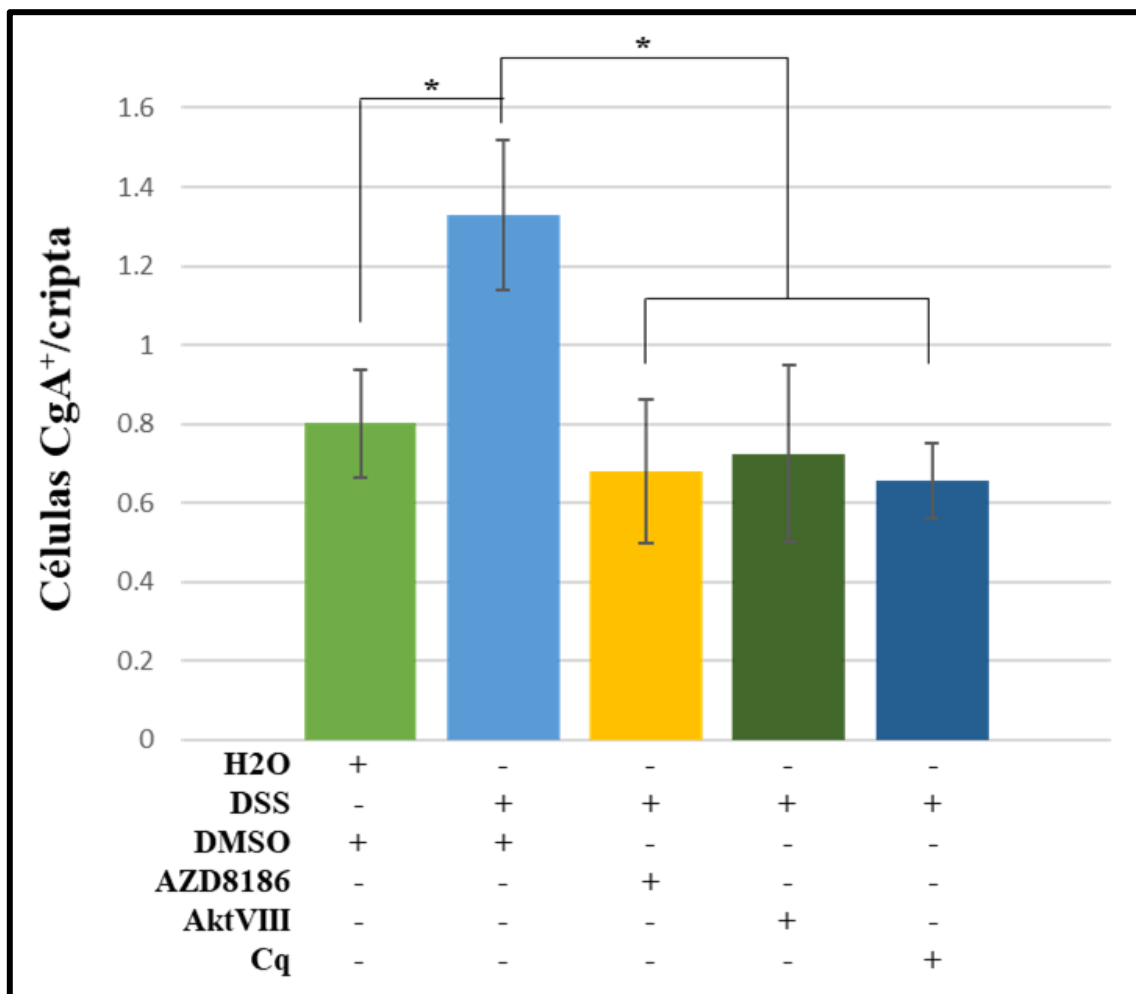


Figura 25. La inhibición de la autofagia y la vía de señalización PI3K/Akt evita el incremento de las células CgA⁺ en la colitis. Cuantificación de células CgA⁺ en el epitelio del colon de ratones C57BL/6J que bebieron agua o DSS 3% durante 3 días y que además recibieron una inyección diaria con DMSO, AZD8186, AktVIII y Cloroquina. Resultados derivados de 3 experimentos independientes. Se grafica el promedio \pm una desviación estándar.
 *= diferencia significativa, $p < 0.05$.

4.12 Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS

Como el proceso inflamatorio aumentó la población de células CgA⁺ se investigó si tiene un efecto similar sobre otros linajes del colon, como las células Tuft. Se utilizó la cinasa DCAMKL1, también conocida como DCLK1, para detectar a esta población (Gerbe y Jay, 2006). En las **Figuras 26a y 26b** se muestra que la cantidad de células Tuft (en verde) aumentaron en el colon de ratones que recibieron DSS al 3% durante tres días respecto a los

que sólo bebieron agua. En la **Figura 26c** se muestra que la diferencia es estadísticamente significativa.

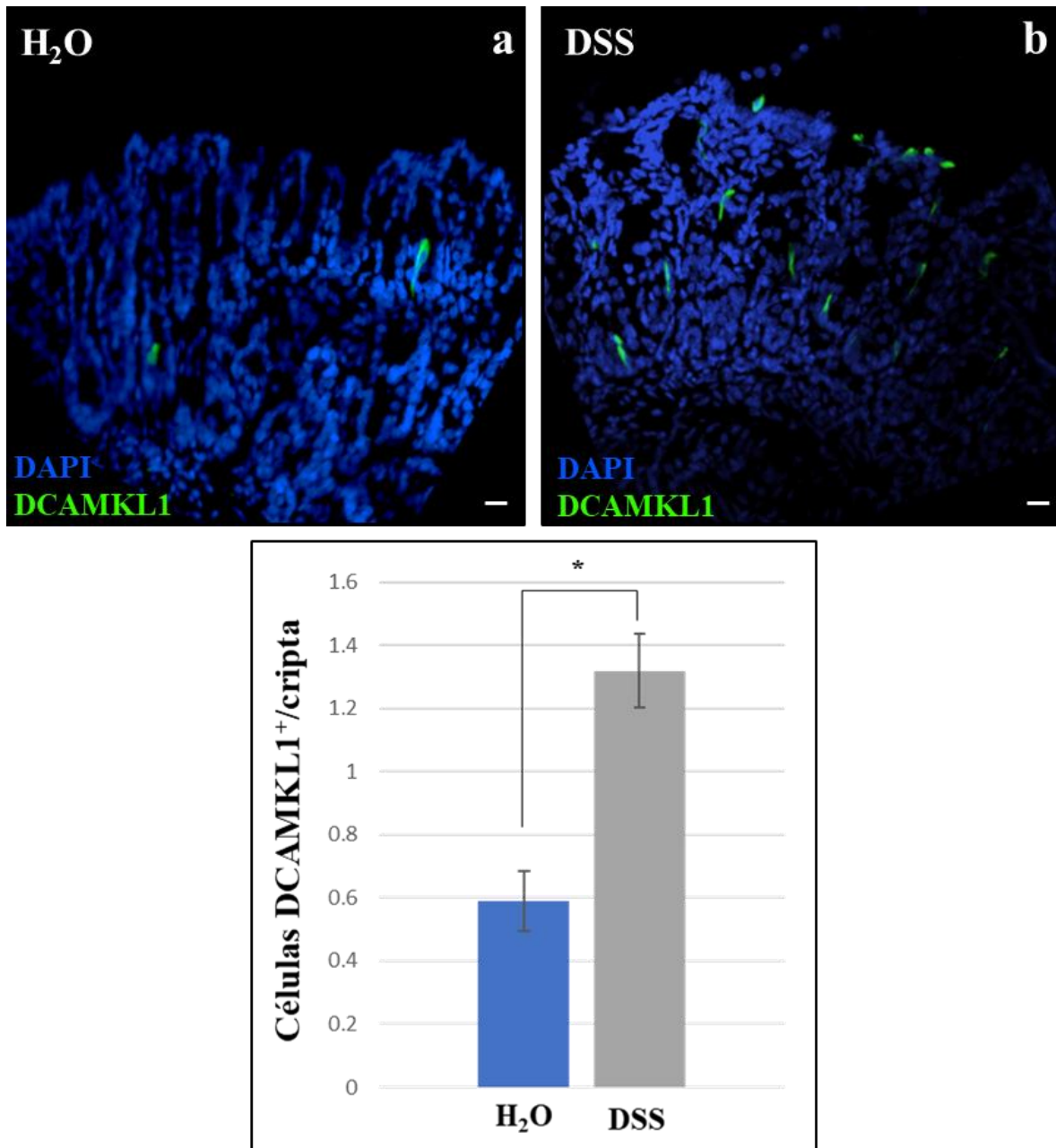


Figura 26. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS. Análisis de la expresión de DCAMKL1 en el colon de ratones C57BL/6J que bebieron **a)** agua o **b)** DSS 3% durante tres días. Azul: DAPI; verde: DCAMKL1. Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 10x. Barra=10µm. **c)** Cuantificación de células DCAMKL1⁺ en el epitelio del colon de ratones C57BL/6J que bebieron agua o DSS 3% durante 3 días. Resultados derivados de 3 experimentos independientes. Se grafica el promedio ± una desviación estándar. *= diferencia significativa, $p < 0.005$.

4.13 Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS de forma dependiente de la autofagia

La autofagia resultó ser un proceso indispensable para el aumento de las células CgA⁺ en la colitis, por lo que fue necesario averiguar si también lo es para las células Tuft. La inflamación intestinal por administración de DSS incrementó el número de estas células (en verde) en el colon de los ratones respecto a los que sólo bebieron agua (**Figuras 27a y 27b**). La administración de cloroquina evitó dicho incremento en el epitelio intestinal de los ratones con colitis (**Figura 27c**). De hecho, no se detectaron más allá de su cantidad basal. La importancia de la autofagia para la detección de las células Tuft se corroboró administrando únicamente cloroquina a los ratones durante tres días. Como se muestra en la **Figura 27d**, este tratamiento abatió la detección de células Tuft en el epitelio del colon de los ratones. Estos resultados prueban que la autofagia es indispensable para la generación de las células Tuft.

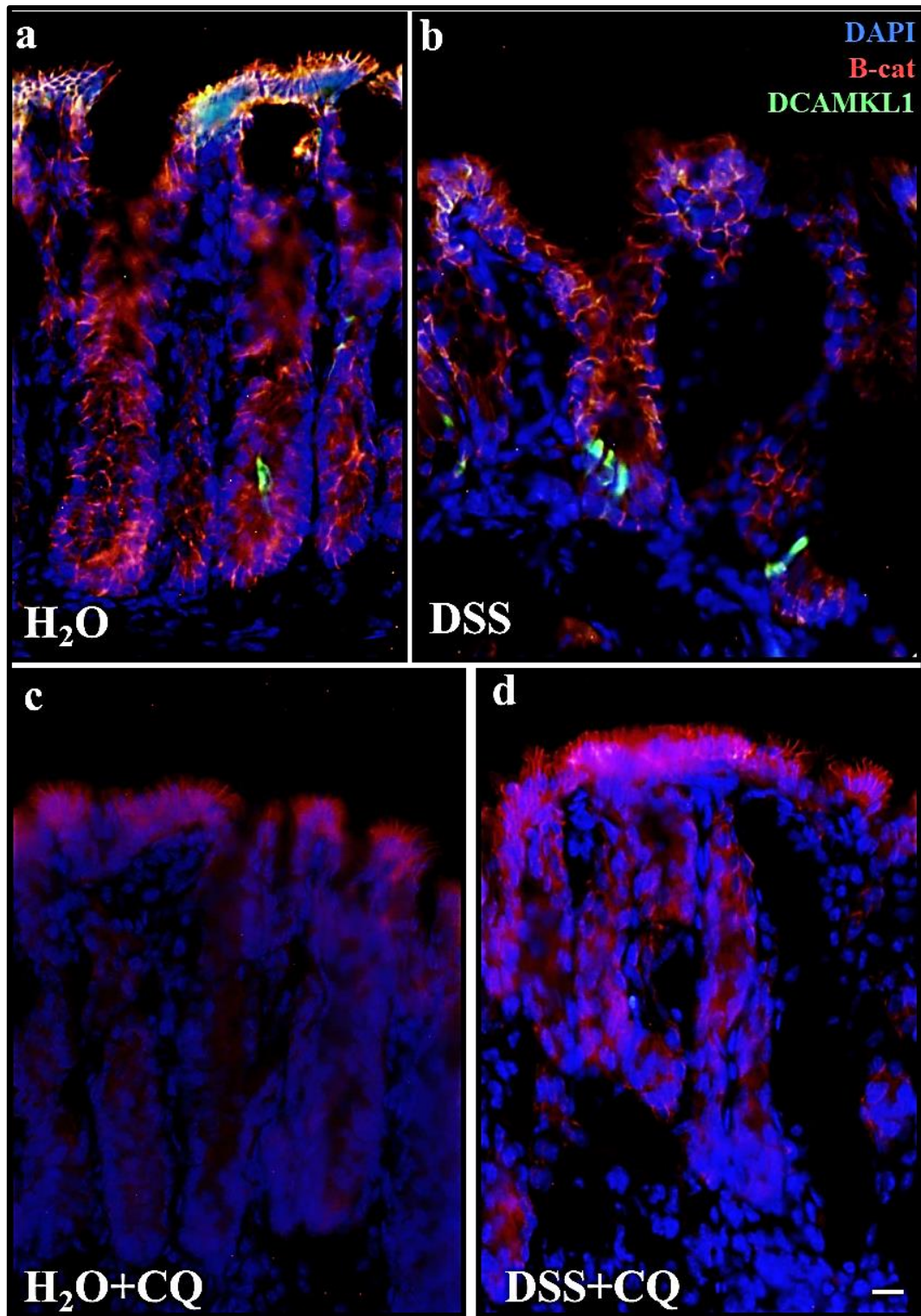


Figura 27. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS de forma dependiente de la autofagia. Análisis de la expresión de DCAMKL1 en el colon de ratones C57BL/6J que bebieron durante tres días **a)** agua o **b)** DSS 3% y recibieron una inyección diaria con SS; o que bebieron **c)** agua y **d)** DSS 3% durante tres días y además recibieron una inyección diaria de cloroquina. Azul: DAPI; verde: DCAMKL1; rojo: β-catenina. Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 10x. Barra=10μm.

4.14 Las citocinas IFN γ /TNF α incrementan el número de células Tuft en el epitelio intestinal

A continuación, se investigó si las citocinas IFN γ y TNF α participan en la generación de las células Tuft. En las **Figuras 28a, 28b y 28c** se observa que las citocinas aumentan hasta cuatro veces la presencia de las células DCAMKL⁺ (en verde) en el epitelio de los ratones después de dos horas de tratamiento. En conjunto estos resultados indican que las citocinas IFN γ y TNF α incrementan el número de células Tuft durante la colitis mediante un mecanismo que requiere de la autofagia.

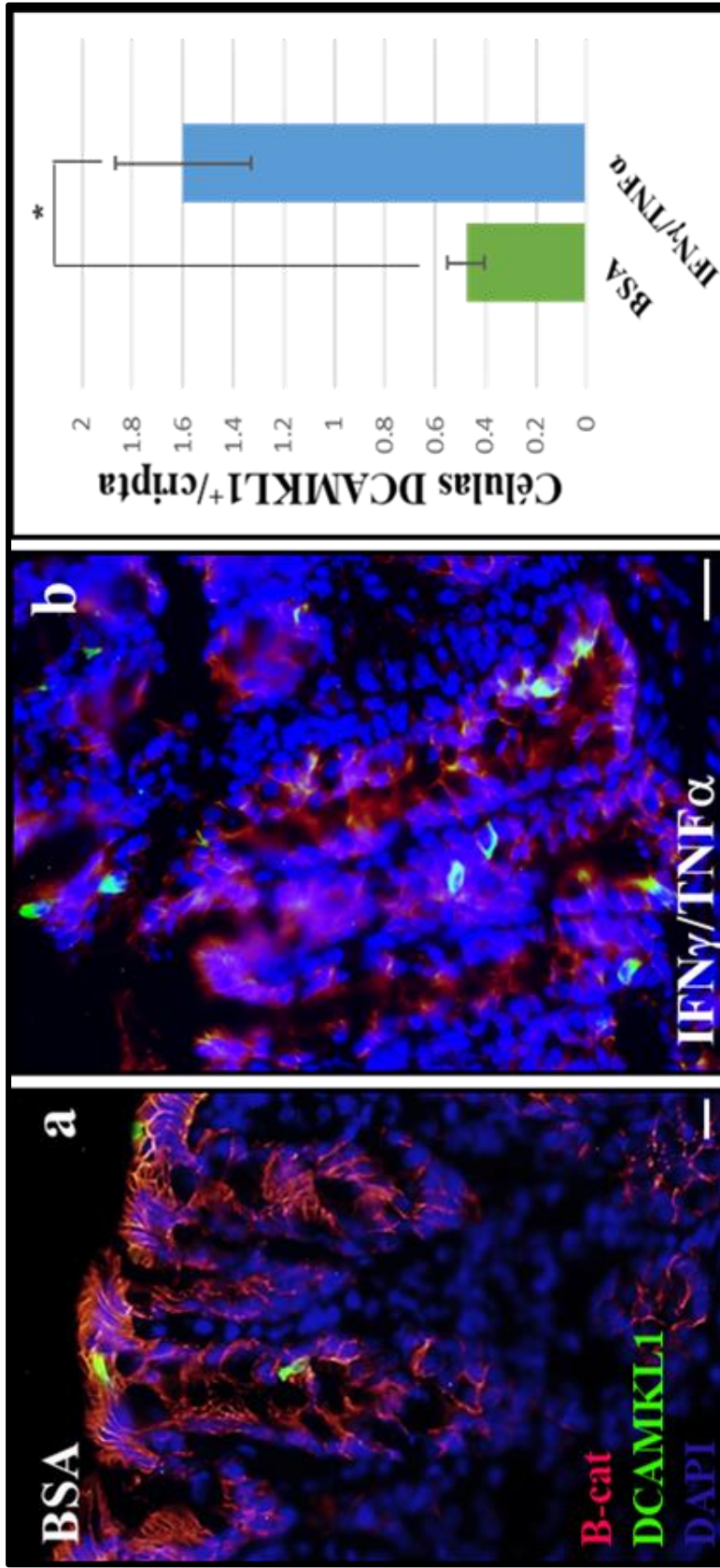


Figura 28. Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS. Análisis de la expresión de DCAMKL1 en el colon de ratones

C57BL/6J que recibieron una inyección con a) BSA o b) la mezcla de IFN γ y TNF α . Imágenes representativas tomadas en un microscopio ZEISS LSM 500 con el objetivo 10x. Azul: DAPI; verde: DCAMKL1; rojo: β -catenina. Barra=10 μ m. c) Cuantificación de células DCAMKL1⁺ en el epitelio del colon de ratones C57BL/6J que bebieron agua o DSS 3% durante 3 días. Resultados derivados de 3 experimentos independientes. Se grafica el promedio \pm una desviación estándar. * = diferencia significativa, $p < 0.05$.

4.15 La autofagia necesaria para la reparación del epitelio intestinal en la colitis

Si bien la autofagia es indispensable para la generación de las células CgA⁺ y Tuft, no se comprende el impacto que esto tiene sobre el epitelio intestinal. Para investigarlo, se desarrolló colitis en los ratones durante tres días y, a partir del cuarto, recibieron una inyección intraperitoneal con DMSO o Cloroquina, el inhibidor de la autofagia que abatió la presencia de las dos poblaciones en el epitelio intestinal. Luego se analizó el daño que el colon presentaba en ambas situaciones mediante el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE), que es un valor que representa la severidad de la colitis. La **Figura 29** es una imagen representativa del colon de los ratones tratados. Aquellos que solo bebieron agua y recibieron tres inyecciones con DMSO mostraron un colon con una longitud aproximada de 9 cm. La pared intestinal fue traslúcida y ligeramente rosada. El ciego presentó un color café claro y textura suave. Las heces de color café oscuro fueron suaves y bien formadas (**Figura 29a**). El colon de los ratones que desarrollaron colitis se acortó hasta dos centímetros y presentó una gran fragilidad a la manipulación. Su pared se mantuvo traslúcida pero la tonalidad rosácea se tornó café. El ciego mullido adoptó un color café oscuro. Las heces perdieron consistencia y se combinaron con sangre (**Figura 29b**). El colon de los animales con colitis y que recibieron cloroquina se acortó hasta 1 cm. Su pared se mantuvo traslúcida. El ciego se observó congestionado, con un color marrón y una consistencia laxa. Las heces fueron diarreicas y se combinaron con sangre (**Figura 29c**). En la **Figura 29d** se muestra el IAE en los distintos tratamientos. Los ratones control alcanzaron una puntuación de cero. La colitis elevó el índice a un promedio de tres y la inhibición de la autofagia lo elevó un 25% más, es decir, hasta un promedio de 4, agravando la enfermedad. Estos resultados indican que la autofagia es esencial para la reparación del epitelio intestinal durante la colitis.



Figura 29. La autofagia es necesaria para la reparación del epitelio intestinal en la colitis. Imágenes representativas de la morfología del colon de ratones C57BL/6J que **a)** bebieron agua o **b)** DSS 3% tres días en **b)** ausencia y **c)** presencia de cloroquina. **d)** Índice de actividad de la enfermedad de los ratones en las mismas condiciones.

5. Discusión, conclusión y perspectivas

5.1 Discusión

5.1.1 Las células CgA⁺ en la inflamación intestinal

La disrupción del epitelio intestinal en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales que desequilibran la proliferación y la muerte de las células epiteliales (Maloy *et al*, 2011; Zhang y Li, 2014; Neurath, 2014). Aunque las células secretoras intervienen en el mantenimiento de la homeostasis epitelial (Shroyer *et al*, 2007) no se entiende su participación en el desarrollo de las EII. En este trabajo se demostró que las células que expresan cromogranina A incrementan en el modelo murino de EII inducido con DSS. Estos resultados coinciden con los hallazgos en el tejido de pacientes con CU y EC (Bishop *et al*, 1997; El-Salhy *et al*, 1997; Kidd *et al*, 2009; Massironi *et al*, 2016) y en modelos de EII (Oshima *et al*, 1999; Sikander, 2015). Esto sugiere que las células CgA⁺ tienen relación con i) la patogenia de la colitis, ii) la reparación del epitelio o iii) con ambas. Abordando la primera posibilidad, las células CgA⁺ son las principales productoras de IL17c en el epitelio intestinal que recluta a los linfocitos T_H17 hacia la mucosa intestinal (Friedrich *et al*, 2015). En las EII su presencia es masiva y se consideran un elemento clave en la patogenia de estos padecimientos (Galvéz, 2014). Las células CgA⁺ también pueden secretar serotonina (5-HT) (Khan y Ghia, 2010; Linan-Rico *et al*, 2016) y se ha observado que su disminución en la mucosa previene el desarrollo de la inflamación intestinal (Khan *et al*, 2006; Ghia *et al*, 2009; Margolis *et al*, 2011) mientras su aumento la agrava (Linden *et al*, 2005; Oshima *et al*, 1999; Bischoff *et al*, 2009; Haub *et al*, 2010; Stavely *et al*, 2018). No se ha descrito un mecanismo que explique estos fenómenos, pero hay reportes que indican que la serotonina (5-Hidroxitriptamina) promueve la proliferación (Stefulj *et al*, 2001), el reclutamiento (Boehme *et al*, 2004; Müller *et al*, 2009) y la activación (Laberge *et al*, 1996) de las células del sistema inmunológico. Además, 5-HT activa la liberación de IL1 β (Ghia *et al*, 2009), otra citocina implicada en el desarrollo de las EII. Por lo tanto, es posible que exista un eje serotonina/IL17c/sistema inmunológico responsable del daño al epitelio intestinal en la colitis (**Figura 30**). La hiperplasia de las células CgA⁺ en la colitis no debe asociarse únicamente a efectos negativos, pues también producen sustancia P (SP) (Heitz *et al*, 1976), estimulante de la producción de Dilp3 por la *mucosa muscularis* para la proliferación de las células troncales y su diferenciación en enterocitos (Amcheslavsky *et al*, 2014). Esto representaría un mecanismo

que intenta contrarrestar la destrucción del epitelio intestinal y conservar la barrera (**Figura 30**). Hay reportes que apoyan esta teoría pues en los primeros días de la colitis inducida con DSS la proliferación disminuye, pero después cinco a siete días se recupera (Renes *et al*, 2002; Nava *et al*, 2010). Además, ya se ha propuesto a la SP como promotora de la regeneración en las EIIs (Gross y Pothoulakis, 2007) y supresora de la colitis experimental (Margolis y Gershon, 2009).

5.1.2 La reprogramación de las células enteroendócrinas por el IFN γ y el TNF α

Los modelos actuales de diferenciación del epitelio intestinal (Gehart y Clevers, 2018) enlistan los genes que participan en este proceso, pero no incorporan las señales detrás de su expresión. En este estudio se reporta la regulación positiva de la población de células productoras de Cromogranina A por IFN γ y TNF α , las citocinas proinflamatorias que más incrementan en el modelo de colitis por DSS (Nava *et al*, 2010; Strober y Fuss, 2011; Neurath, 2014) y que desregulan la homeostasis intestinal en las EIIs (Nava *et al*, 2010; Gómez-Suárez *et al*, 2016). Las citocinas duplicaron el número de células CgA⁺ en tan solo dos horas y estas fueron post-mitóticas y funcionales. Es difícil pensar que el incremento de estas células sea producto de un proceso de diferenciación pues se sabe que al menos toma doce horas (Gehart *et al*, 2019). A pesar de que CgA se considera un marcador genérico de células enteroendócrinas (CEEs) en todo el cuerpo, en el colon se expresa casi exclusivamente en células enterocromafines (CEs) (Engelstoft *et al* 2015; Gehart *et al*, 2019); por lo tanto, el incremento de las células conteniendo CgA podría deberse a la reprogramación de los distintos subtipos de CEEs hacia la expresión de dicha molécula. Esto es posible porque las diferentes clases de CEEs poseen una gran plasticidad para producir diversas hormonas dependiendo de su microambiente (Svendsen *et al*, 2015; Svendsen *et al*, 2016; Worthington *et al*, 2018; Gehart *et al*, 2019). Las citocinas también podrían estimular a las CEEs inmaduras (Neurog3⁺) para incrementar su expresión de CgA, pues se ha observado que lo hacen en concentraciones muy bajas (**Figura 30**; Gehart *et al*, 2019). Esto explicaría por qué algunas de las células CgA⁺ detectadas presentaron una morfología atípica; es decir, sin las características astas polares. Esta idea concuerda con los resultados que Suárez-Pérez presentó en su Tesis de maestría donde reportó que las citocinas aumentan la

expresión de CgA principalmente en el tercio inferior de la cripta intestinal (Suárez -Pérez, 2016), región que alberga a las CEEs inmaduras (Schonhoff *et al*, 2004).

5.1.3 La regulación de CgA en el epitelio intestinal en la colitis

Más que un aumento en la diferenciación o maduración celular, el incremento de la detección de células CgA⁺ podría ser provocado por cambios en la regulación de esta molécula. De hecho, IFN γ y TNF α aumentaron el nivel tisular de CgA desde las dos horas debido a su síntesis *de novo*, como se demostró en las CEIs Caco2. Mientras la proteína aumentó a las dos horas *in vivo*; *in vitro* lo hace hasta las seis horas, lo que sugiere que CgA es una molécula tan importante en el intestino que existe mRNA preformado y listo para traducirse en dos horas, como sucede con algunas proteínas de choque térmico (Petersen y Mitchell, 1981; Currie y Tanguay, 1991; Doberentz *et al*, 2017) o bien, su sistema de regulación le permite una rápida transcripción y traducción como sucede con HSP70 (**Figura 30**; Currie y Tanguay, 1991). Otra posibilidad para aumentar la cantidad de células conteniendo CgA puede ser la disminución de su secreción, ya que las las CEEs expulsan sus hormonas en vesículas compuestas por CgA en respuesta a su despolarización y a la movilización Ca²⁺ (Bellono *et al*, 2017). Sin embargo, se ha reportado que las secreciones de las CEEs y la misma CgA aumentan en la circulación sistémica en la colitis mediada por IFN γ y TNF α (Bishop *et al*, 1987; El-Salhy *et al*, 1997; Oshima *et al*, 1999; Kidd *et al*, 2008; Sikander, 2015; Massironi *et al*, 2016), lo que hace poco probable esta alternativa. Otra alteración que podría incrementar la detección de CgA en el epitelio es que las citocinas induzcan cambios en la molécula. CgA es una proteína muy versátil y así como forma parte de las vesículas de secreción, es el zimógeno de distintas hormonas de bajo peso molecular (D'amico *et al*, 2014). Por lo tanto, las citocinas podrían aumentar el procesamiento de la proteína y con ello su reconocimiento por los anticuerpos.

5.1.4 IFN γ y el TNF α regulan el eje PI3K/Akt/mTORC1 y la autofagia en las células CgA⁺

En esta investigación se comprueba que la activación Akt y la autofagia regulan dos procesos íntimamente ligados: i) la producción de CgA y ii) el incremento del número de las células con este marcador en el epitelio intestinal (**Figura 30**). La inhibición de PI3K y de Akt disminuyó parcialmente la producción de CgA en las células epiteliales. Sin embargo, la

cloroquina la redujo por completo, así como a la activación de Akt, lo que sugiere que la activación de esta cinasa y la autofagia participan complementariamente en la regulación de la expresión de CgA. La vía PI3K/Akt se activa en las células CgA⁺ por la fosforilación inhibitoria de PTEN como se demostró por inmunofluorescencia. Es probable que CK2 realice esta fosforilación, pues se activa en la colitis mediada por IFN γ y TNF α (Torres y Pulido, 2001; Koch, 2012). Por otro lado, aunque mTORC1 se activa usualmente a través de la vía PI3K/Akt, está inactivo en las células CgA⁺ (Suárez-Pérez, 2016), indicando que la autofagia en estas células es dependiente de mTORC1 y que, además, hay un mecanismo que inhibe a este complejo a pesar de la activación de la vía PI3K/Akt. Nuestro grupo de trabajo describió que este mecanismo depende de IFN γ que induce la fosforilación de 14.3.3 ζ para que, a su vez, secuestre a Raptor, llevándolo a degradación y previniendo el ensamble de mTORC1 (Gómez-Suárez *et al*, 2016). En apoyo a la participación de este mecanismo se observó que el aumento de la producción de CgA y el número de células CgA⁺, *in vitro* e *in vivo*, estuvo acompañado de p14.3.3. Además, las células CgA⁺ son positivas para esta molécula y no para los marcadores de mTORC1 activo (Suárez-Pérez, 2016).

La activación de Akt en las células CgA⁺ podría controlar su mecanismo de secreción pues se ha demostrado que al inhibirla disminuye la liberación de sus productos (Lim *et al*, 2009). Además, Akt se encuentra activa en las células epiteliales intestinales diferenciadas (Dufour *et al*, 2004) y es indispensable para la diferenciación de células neuroendócrinas en otros tejidos (Ciarlo *et al*, 2012). Por lo tanto, es posible que las citocinas la activen para aumentar la maduración de los progenitores de las células enteroendócrinas y para el mantenimiento de este linaje. Akt también podría activarse para regular la expresión de CgA y otras moléculas a través de β -catenina pues algunos productos de estas células están controlados por la vía Wnt (Yi *et al*, 2008). En la colitis (Gómez-Suárez *et al*, 2016) y con la inyección de citocinas aumenta la fosforilación 14.3.3 ζ , GSK3 β , y β -catenina que promueven la actividad co-transcripcional de esta última. Esto sugiere que β -catenina podría estar implicada en estos procesos; sin embargo, es necesario desarrollar nuevas investigaciones en torno a ello (**Figura 30**).

La autofagia podría activarse en las células CgA⁺ para obtener los aminoácidos necesarios para la síntesis grandes cantidades de proteínas de secreción. Por otro lado, también podría controlar la maduración de las células CgA⁺ pues se ha reportado que lo hace en *Drosophila* a través del sistema Slit/Rab (Nagy *et al*, 2017). Además, la desregulación de este proceso provoca una respuesta inmune aberrante contra el microbiota intestinal (Lassen y Xavier, 2018) como sucede al inicio de las EIIs (Neurath, 2014).

5.1.5 Las células Tuft en la colitis regulada por IFN γ y TNF α

Las células Tuft aumentan en la colitis inducida con DSS. Su presencia se relaciona con la protección del epitelio (Qu *et al*, 2015; Steele *et al*, 2016) porque promueven la regeneración de la barrera intestinal (Westphalen, 2014; Chandrakesan *et al*, 2016) a través de la proliferación de las células troncales en la inflamación intestinal (**Figura 30**; Yi *et al*, 2018).

Las citocinas IFN γ y TNF α incrementaron la población de células Tuft en el epitelio intestinal de una manera muy similar a como lo hicieron con las productoras de CgA. La inhibición de la autofagia con la cloroquina tuvo un efecto incluso más severo sobre esta población. Esto sugiere que ambos linajes son regulados de forma parecida por la autofagia y no se descarta que Akt también esté involucrada en el control de las células Tuft. Tampoco se descarta una comunicación entre ambas estirpes que permita que la hiperplasia de una población aumente a la otra, como sucede entre las células Tuft y las células de Goblet (Gerbe *et al*, 2016; Howitt *et al*, 2016; von Moltke *et al*, 2016). Sin embargo, es necesario realizar más estudios respecto a la regulación molecular de la población de células Tuft en el epitelio intestinal.

5.1.6 La autofagia, el regulador maestro de la homeostasis intestinal

Aquí se demostró que la autofagia es esencial para la generación de las células Tuft y las CgA⁺, lo que sugiere que es el “regulador maestro” del linaje secretor en el epitelio intestinal. La inhibición de la autofagia provocó que la colitis de los ratones se agravara, acompañada de la disminución del número de células Tuft y CgA⁺, por lo que estas células y la autofagia podrían ser relevantes en el proceso de reparación durante la inflamación intestinal (**Figura 30**). Esta idea es posible pues se ha demostrado que el bloqueo de la autofagia reduce el

número de células troncales por la excesiva concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando un incorrecto proceso de regeneración (Asano *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018). Se requieren más investigaciones para dilucidar el mecanismo por el que las células secretoras y la autofagia participan en el proceso de reparación del epitelio intestinal.

5.2 Resumen de hallazgos

1. La colitis provoca la hiperplasia de células Tuft y CgA⁺ en el epitelio intestinal.
2. Las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α incrementan la producción de CgA en el colon.
3. Las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α incrementan la cantidad de células Tuft y CgA⁺ en el epitelio intestinal.
4. Las células CgA⁺ inducidas con las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α son post mitóticas y pueden capturar antígenos del lumen intestinal.
5. La inhibición de la vía PI3K/Akt previene el incremento de las células CgA⁺ en la colitis.
6. La inhibición de la autofagia previene el incremento de las células Tuft y CgA⁺ en la colitis.
7. La inhibición de la autofagia aumenta la severidad de la colitis.
8. Las células Caco2 producen y procesan CgA.

5.3 Conclusión

Las células CgA⁺ y Tuft incrementan en la colitis mediada por las citocinas IFN γ y TNF α a través de un mecanismo que requiere de la autofagia (Figura 30).

5.4 Perspectivas

1. Investigar si β -catenina regula la expresión de CgA en las células intestinales.
2. Investigar si las células Tuft y CgA⁺ participan en la regeneración del epitelio intestinal en la colitis.

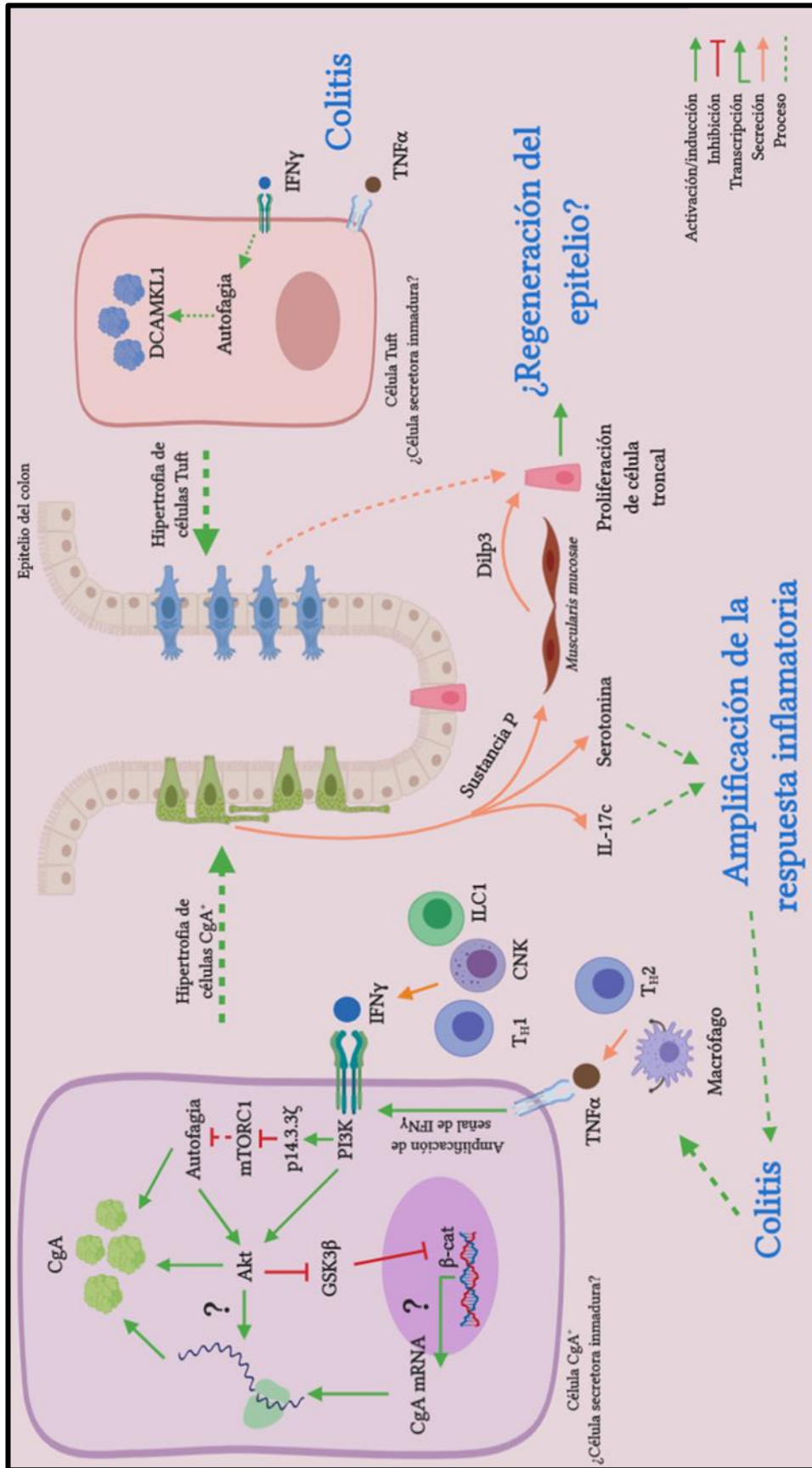


Figura 30. Generación y función de las células CgA⁺ y Tuft en la colitis.

6. Referencias

1. Ahlman, H. & Nilsson, O. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of oncology: official journal of the european society for medical oncology*. 12 Suppl 2:S63-8.
2. Amcheslavsky, A., Song, W., Li, Q., Nie, Y., Bragatto, I., Ferrandon, D., Perrimon, N., ... Ip, Y. T. (2014). Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell reports*, 9(1), 32-39. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.052.
3. 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.
4. Axelrad, J., Bernheim, O., Colombel, J.F... New York Crohn's and Colitis Organization. (2016). Risk of new or recurrent cancer in patients with inflammatory bowel disease and previous cancer exposed to immunosuppressive and antitumor necrosis factor agents. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 1: 58–64. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.037.
5. Azzouz, L.L. & Sharma, S. Physiology, Large Intestine. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>.
6. Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration, *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15(1):19-33. doi: 10.1038/nrm3721.
7. Bauer, C., DUEWELL, P., Mayer, C., Lehr, H.A., Fitzgerald, K.A., Dauer, M... Schnurr, M. (200). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*, 59(9):1192-9. doi: 10.1136/gut.2009.197822.
8. Beaugerie, L. & Itzkowitz, S.H. (2015). Cancers complicating inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 9;372(15):1441-52. doi: 10.1056/NEJMra1403718.
9. Belai, A., Boulos, P. B., Robson, T., & Burnstock, G. (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*, 40(6), 767-74.
10. Bellono, N. W., Bayrer, J. R., Leitch, D. B., Castro, J., Zhang, C., O'Donnell, T. A., Brierley, S. M., Ingraham, H. A., ... Julius, D. (2017). Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, 170(1), 185-198.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.034.
11. Betts, J.G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson & J. E. (2019). Layers of the Alimentary Canal. Recuperado de <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/23-1-overview-of-the-digestive-system/>.
12. Bischoff, S.C., Mailer, R., Pabst, O., Weier, G., Sedlik, W., Li, Z., ..., Gerson, M.D. (2009). Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *American*

- journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2009; 296: G685–G695. doi: 10.1152/ajpgi.90685.2008.
13. Bishop A., Pietroletti R., Taat C., Brummelkamp W. & Polak J. (1987) Increased populations of endocrine cells in Crohn's ileitis. *Virchows Arch A* 410:391–396.
 14. Boehme, S.A., Lio, F.M., Sikora, L., Pandit, T.S., Lavrador, K., Rao, S.P., Sriramarao, P. (2004). Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. *The Journal of Immunology*, 173: 3599-3603. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3599>.
 15. Bogunovic, M., Davé, S.H., Tilstra, J.S., Chang, D.T., Harpaz, N., Xiong, H., Mayer, L. F., ... Plevy, S. E. (2007). Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292(6), G1770-83. doi: 10.1152/ajpgi.00249.2006.
 16. Castañeda, A., Serrano C., Hernández-Trejo, J.A., Gutiérrez-Martínez, I.Z., Montejó-López, W., Gómez-Suárez, M., ..., Nava, P. (2017). pVHL suppresses Akt/beta-catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3zeta expression. *Biochemical Journal*, 1:2679–2689. doi: 10.1042/BCJ20161097.
 17. Chandrakesan, P., May, R., Weygant, N., Qu, D. Berry, W.L., Sureban, S. M., & Houchen, C.W. (2016). Intestinal tuft cells regulate the ATM mediated DNA Damage response via Dclk1 dependent mechanism for crypt restitution following radiation injury. *Scientific reports*, 6:37667. doi: <https://doi.org/10.1038/srep37667>.
 18. Chen, R., Lai, U. H., Zhu, L., Singh, A., Ahmed, M. & Forsyth, N. R. (2018). Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 132. doi:10.3389/fcell.2018.00132
 19. Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A. & Orekhov, A. N. (2015). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in microbiology*, 5, 781. doi:10.3389/fmicb.2014.00781.
 20. Ciarlo, M., Benelli, R., Barbieri, O., Minghelli, S., Barboro, P., Balbi, C., & Ferrari, N. (2012). Regulation of neuroendocrine differentiation by AKT/hnRNPK/AR/ β -catenin signaling in prostate cancer cells. *International journal of cancer*, 131(3):582-90. doi: 10.1002/ijc.26402.
 21. Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2):274-84. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.
 22. Coates M. D., Mahoney C. R., Linden D. R., Sampson J. E., Chen J., Blaszyk H., ..., Moses, P.L. (2004). Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 1657–1664. 10.1053/j.gastro.2004.03.01
 23. Collins JT, Badireddy M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. [Updated 2019 Jan 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>.

24. Currie, R.W & Tanguay, R.M. (1991). Analysis of RNA for transcripts for catalase and SP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochemistry and cell biology*. 69(5-6);375-82. doi: 10.1139/o91-057.
25. D'amico, M. A., Ghinassi, B., Izzicupo, P., Manzoli, L., & Di Baldassarre, A. (2014). Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocrine connections*, 3(2), R45-54. doi:10.1530/EC-14-0027.
26. Deng, Z., Purtell, K., Lachance, V., Wold, M.S., Chen, S. & Yue Z. Autophagy Receptors and Neurodegenerative Diseases. *Trends in cell biology*. 27(7):491-504. doi: 10.1016/j.tcb.2017.01.001.
27. Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 19(6):349-364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.
28. Doberentz, E., Genneper, L., Wagner, R. & Madea, B. (2017). Expression times for hsp27 and hsp70 as an indicator of thermal stress during death due to fire. *International journal of legal medicine*, 131(6):1707-1718. doi: 10.1007/s00414-017-1566-x.
29. Dufour, G., Demers, M.J., Gagné, D., Dydensborg, A.B., Teller, I.C., Bouchard, V... Vachon, P.H. (2004). Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 279(42):44113-22. DOI: 10.1074/jbc.M405323200.
30. El-Salhy M., Danielsson A., Stenling R. & Grimelius L. (1997) Colonic endocrine cells in Inflammatory Bowel Disease. *J Intern Med* 242(5):413–419.
31. El-Salhy, M., Solomon, T., Hausken, T., Gilja, O.H. & Hatlebakk, J.G. Gastrointestinal neuroendocrine peptides/amines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*; 23(28): 5068-5085. doi: 10.3748/wjg.v23.i28.5068.
32. Engelstoft, M.S., Lund, M.L., Grunddal, K.V., Egerod K.L., Osborne-Lawrence, S., Poulsen, S.S., ..., Schwartz T. W. (2015). Research Resource: A Chromogranin A Reporter for Serotonin and Histamine Secreting Enteroendocrine Cells. *Molecular Endocrinology*, 29 (11), 1658–1671, doi: <https://doi.org/10.1210/me.2015-1106>.
33. Ferruzza, S., Rossi, C., Scarino, M.L. & Sambury, Y. A protocol for differentiation of human Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicology in vitro*. 26(8),1252-5. doi: 10.1016/j.tiv.2012.01.008.
34. Freeman, J.A. (1962). Fine structure of the goblet cell mucous secretory process. *The Anatomical record*. 144:341-57.
35. Friedrich, M., Diegelmann, J., Schaubert, J., Auernhammer, C.J. & Brand, S. (2014). Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunology*. 8(4):943-58. doi: 10.1038/mi.2014.124.

36. Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN inflammation*, 2014, 928461. doi:10.1155/2014/928461.
37. Gardner, S., Anguiano, M., & Rotwein, P. (2012). Defining Akt actions in muscle differentiation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 303(12), C1292-300. doi: 10.1152/ajpcell.00259.2012
38. Gehart, H. & Clevers, H. (2018). 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.
39. Gehart H., van Es, J., Hamer, K., Beumer, J., Kretzschmar, K., Dekkers, J., Rios, A., & Clevers, H. (2019). Identification of Enteroendocrine Regulators by Real-Time Single-Cell Differentiation Mapping. *Cell*, 176(5):1158-1173.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.029.
40. Gerbe, F., Legraverend, C., & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 69(17), 2907-17.
41. Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V... Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*. 529(7585):226-30. doi: 10.1038/nature16527.
42. Gerbe, F. & Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal immunology*, 9(6):1353-1359. doi: 10.1038/mi.2016.68.
43. Ghia, J.E., Li, N., Wang, H., Collins, M., Deng, Y., El-Sharkawy, R.T., ..., Khan, W.I. (2009). Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*, 137:1649–60. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.041.
44. 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), 1060-72. doi: 10.1038/cdd.2015.163.
45. Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), 3-20; quiz 21-2.
46. Gross, K.J. & Pothoulakis, C. (2007). Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 13(7):918-32.
47. Guinane, C. M., Tadrous, A., Fouhy, F., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B., ... Ross, R. P. (2013). Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *mBio*, 4(1), e00366-12. doi:10.1128/mBio.00366-12.
48. Gunawardene, A. R., Corfe, B. M., & Staton, C. A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International journal of experimental pathology*, 92(4), 219-31. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x.

49. Gutiérrez-Martínez, I. Z., Rubio, J. F., Piedra-Quintero, Z. L., Lopez-Mendez, O., Serrano, C., Reyes-Maldonado, E., Salinas-Lara... Nava, P. (2018). mTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer *Development. Translational oncology*, 12(1), 24-35.
50. Haub, S., Ritze, Y., Bergheim, I., Pabst, O., Gershon, M. D. & Bischoff, S. C. (2010). Enhancement of intestinal inflammation in mice lacking interleukin 10 by deletion of the serotonin reuptake transporter. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7), 826-34, e229. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01479.x.
51. Heitz, P., Polak, J.M., Timson, D.M. & Pearse, A.G. (1976). Enterochromaffin cells as the endocrine source of gastrointestinal substance P. *Histochemistry*, 49(4):343-7.
52. Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D., ... Garrett, W. S. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6279), 1329-33. doi: 10.1126/science.aaf1648.
53. Jankowski, J. A., Goodlad, R. A., & Wright, N. A. (1994). Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. *Gut*, 35(1 Suppl), S1-4.
54. Jumarie, C. & Malo, C. (1991). Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of cellular physiology*, 149(1):24-33. DOI: 10.1002/jcp.1041490105.
55. Kahai P, Lobo, S.. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. [Updated 2019 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470577/>.
56. Khan, W. I., & Ghia, J. E. (2010). Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clinical and experimental immunology*, 161(1), 19-27. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04150.x.
57. Khan, W.I., Motomura, Y., Wang, H., El-Sharkawy, R.T., Vrdu, E.F., Verma-Gandhu, M., ..., Collins, S.M. (2006). Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 291:G803–11. DOI: 10.1152/ajpgi.00069.2006.
58. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-17. doi:10.1038/nature10209.
59. Kidd, M., Gustafsson, B. I., Drozdov, I. & Modlin, I. M. (2008). IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 21(4), 439-50. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01210.x.
60. Kiela, P. R. & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*, 30(2), 145-59.

61. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune network*, 17(1), 25-40. doi: 10.4110/in.2017.17.1.25.
62. Kim, Y. S. & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 319-30. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
63. Knoop, K.A. & Newberry, R.D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*. 11(6):1551-1557. doi: 10.1038/s41385-018-0039-y.
64. Ko, J.K. & Auyeung, K.K. (2014). Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Current pharmaceutical design*. 20(7):1082-96.
65. Koch, S., Capaldo, C. T., Hilgarth, R. S., Fournier, B., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2012). Protein kinase CK2 is a critical regulator of epithelial homeostasis in chronic intestinal inflammation. *Mucosal immunology*, 6(1), 136-45.
66. 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.
67. Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., ..., Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15418-23. doi: 10.1073/pnas.0707210104.
68. Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. & Mitchel, R. (2004). *Patología humana (8va Ed.)*. Elsevier Saunders.
69. Kuramoto, H., Kadowaki, M., Sakamoto, H., Yuasa, K., Todo, A. & Shirai, R. Distinct morphology of serotonin-containing enterochromaffin (EC) cells in the rat distal colon. *Archives of histology and cytology*. 70(4):235-41.
70. Laberge, S., Cruikshank, W.W., Beer, D.J. & Center, D.M. (1996). Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*, 156(1):310-5.
71. Lassen, K. G., & Xavier, R. J. (2018). Mechanisms and function of autophagy in intestinal disease. *Autophagy*, 14(2), 216-220. doi: 10.1080/15548627.2017.1389358.
72. Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R. & Greenwood-Van Meerveld, B. (2015). Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 28(5), 620-30. doi: 10.1111/nmo.12754.
73. Lim, G. E., Huang, G. J., Flora, N., LeRoith, D., Rhodes, C. J. & Brubaker, P. L. (2009). Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology*, 150(2), 580-91. doi: 10.1210/en.2008-0726.

74. Limon, J. J., & Fruman, D. A. (2012). Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Frontiers in immunology*, 3, 228. doi:10.3389/fimmu.2012.00228.
75. Linan-Rico, A., Ochoa-Cortes, F., Beyder, A., Soghomonyan, S., Zuleta-Alarcon, A., Coppola, V. & Christofi, F. L. (2016). Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. *Frontiers in neuroscience*, 10, 564. doi:10.3389/fnins.2016.00564.
76. Linden, D.R., Foley, K.F., McQuoid, C., Simpson, J., Sharkey, K.A. & Mawe, G.M. (2005). Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17:565–74. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2005.00673.x.
77. Loddo, I. & Romano, C. (2015). Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 6, 551. doi:10.3389/fimmu.2015.00551.
78. Maloy, K.J. & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351):298-306. doi: 10.1038/nature10208.
79. Manning, B. D. & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 169(3), 381–405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001
80. Margolis, K. G., & Gershon, M. D. (2007). Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology*, 25(6):503-11. doi: 10.1097/MOG.0b013e328331b69e.
81. Margolis, K. G., & Gershon, M. D. (2016). Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends in neurosciences*, 39(9), 614-624. doi: 10.1016/j.tins.2016.06.007.
82. Massironi, S., Zilli, A., Cavalcoli, F., Conte, D. & Peracchi, M. (2016). Chromogranin A and other enteroendocrine markers in inflammatory bowel disease. *Neuropeptides*. 58:127-34. doi: 10.1016/j.npep.2016.01.002.
83. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231-41. doi: 10.1038/nature11551.
84. McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D., ..., Miller, M. J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483(7389), 345-9. doi:10.1038/nature10863.
85. Miron, N. & Cristea, V. (2012). Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical and experimental immunology*, 167(3), 405-12. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x.
86. Moran, G. W., Leslie, F. C., Levison, S. E., Worthington, J. & McLaughlin, J. T. (2008). Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders?. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 1(1), 51-60. doi: 10.1177/1756283X08093943.

87. Mowat, A.M. (2018). To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance. *Nature reviews. Immunology*, 18(6):405-415. doi: 10.1038/s41577-018-0002-x.
88. 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), 3079-91. doi:10.1038/emboj.2012.166.
89. Nagatake, T., Fujita, H., Minato, N. & Hamazaki, Y. (2014). Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS one*, 9(6), e90638. doi:10.1371/journal.pone.0090638.
90. Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraf, 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.
91. Negroni, A. Cucchiara, S. & Stronati, L. (2015) "Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis," *Mediators of Inflammation*, , Article ID 250762, 10 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>.
92. Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature reviews immunology*, 14, 329-342. doi: <https://doi.org/10.1038/nri3661>.
93. Nezami, B. G., & Srinivasan, S. (2010). Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 358-65.
94. Noah, T. K., Donahue, B. & Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research*, 317(19), 2702-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006.
95. Okumura, R. & Takeda, K. (2018). Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and regeneration*, 38, 5. doi:10.1186/s41232-018-0063-z.
96. Oshima, S., Fujimura, M. & Fukimiya, M. (1999). Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochemistry and cell biology*, 112(4):257-63.
97. Ou, X.M., Partoens, P.M., Wang, J.M., Walker, J.H., Danks, K., Vaughan, P.F. & De Potter, W.P. (1998). The storage of noradrenaline, neuropeptide Y and chromogranins in and stoichiometric release from large dense cored vesicles of the undifferentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *International journal of molecular medicine*. 1(1):105-12.
98. Petersen, N. S. & Mitchell, H. K. (1981). Recovery of protein synthesis after heat shock: Prior heat. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 78,3,1708-1711.
99. Peterson. L.W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*. 14(3):141-53. doi: 10.1038/nri3608.

100. Philpott, A. & Winton, D. J. (2014). Lineage selection and plasticity in the intestinal crypt. *Current opinion in cell biology*, 31, 39-45. doi: 10.1016/j.ceb.2014.07.002.
101. Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I. & West, A.B. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American journal of physiology*. 277(1):C1-9. doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.C1.
102. Punctart, A., Vogt, M., Widmer, H.R., Hoppeler, H. & Billeter, R. (1996). Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta physiologica scandinavica*. 157(4):411-7. doi: 10.1046/j.1365-201X.1996.512270000.x.
103. Qu, D., Weygant, N., May, R., Chandrakesan, P., Madhoun, M., Ali, N., ..., Houchen, C. W. (2015). Ablation of Doublecortin-Like Kinase 1 in the Colonic Epithelium Exacerbates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PloS one*, 10(8), e0134212. doi:10.1371/journal.pone.0134212
104. Rao, J. & Wang, J.Y. (2010). *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*, Morgan & Claypool Life Sciences.
105. Renes, I.B., Verburg, M., Van Nispen, D.J., Taminiau, J.A., Buller, H.A., Dekker, J. & Einerhand, A.W. (2002). Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *International journal of colorectal disease*, 17:317–326.
106. Rogler, G. & Vavricka, S. (2015). Anemia in inflammatory bowel disease: an under-estimated problem?. *Frontiers in medicine*, 1, 58. doi:10.3389/fmed.2014.00058
107. Ross, M. & Pawlina, W. (2007). *Histología: texto y atlas a color con biología celular y molecular (5ª ed.)*. Panamericana.
108. Rubin, D.T., Uluscu, O. & Sederman, R. Response to biologic therapy in Crohn's disease is improved with early treatment: an analysis of health claims data. *IBD*, 18(12):2225-31. doi: 10.1002/ibd.22925.
109. Schneeberger, K., Roth, S., Nieuwenhuis, E. & Middendorp, S. (2018). Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. *Disease models & mechanisms*, 11(2), dmm031088. doi:10.1242/dmm.031088.
110. Schneider, C., O'Leary, C.E., von Moltke, J., Liang, H.E., Ang, Q.Y., Turnbaugh, P.J., ..., Locksley, R.M. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell*, 174(2):271-284.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.014.
111. Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M. & Leiter, A.B. (2004). Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Developmental biology*, 270:443–54. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.03.013.

112. Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., Wang, V.Y., Antalffy, B., Henning, S.J. & Zoghbi, H.Y. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology*, 132(7):2478-88. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.047.
113. Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J., Bellen, H. J. & Zoghbi, H. Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes & development*, 19(20), 2412-7. doi: 10.1101/gad.1353905.
114. Sikander, A., Sinha, S.K., Prasad, K.K. & Rana, S.V. (2015). Association of serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) with microscopic colitis and ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, 60(4):887-94. doi: 10.1007/s10620-014-3482-y.
115. Sonnenberg, A. (2008). Seasonal variation of enteric infections and inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 14(7):955-9. doi: 10.1002/ibd.20408.
116. Specian, R.D. & Oliver, M.G. (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *The American journal of physiology*. 260(2 Pt 1):C183-93.
117. Stavely, R., Fraser, S., Sharma, S., Rahman, A.A., Stojanovska, V., Sakkal, S. & Nurgali, K. (2018). The Onset and Progression of Chronic Colitis Parallels Increased Mucosal Serotonin Release via Enterochromaffin Cell Hyperplasia and Downregulation of the Serotonin Reuptake Transporter. *Inflammatory bowel diseases*, 24(5):1021-1034. doi: 10.1093/ibd/izy016.
118. Steele, S. P., Melchor, S. J. & Petri, W. A. (2016). Tuft Cells: New Players in Colitis. *Trends in molecular medicine*, 22(11), 921-924. doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.005.
119. Stefulj, J., Cicin-Sain, L., Schauenstein, K. & Jernej, B. (2001). Serotonin and immune response: effect of the amine on in vitro proliferation of rat lymphocytes. *Neuroimmunomodulation*, 9(2):103-8.
120. Sternini, C., Anselmi, L., & Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 15(1), 73-8. doi: 10.1097/MED.0b013e3282f43a73.
121. Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1756-1767. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.016.
122. Suárez-Pérez, D. (2016). Celulas enteroendócrinas...Tesis info pedir a doc
123. Svendsen, B., & Holst, J.J. (2016). Regulation of gut hormone secretion. Studies using isolated perfused intestines. *Peptides*, 77:47-53. doi: 10.1016/j.peptides.2015.08.001.
124. Svendsen, B., Pedersen, J., Albrechtsen, N.J., Hartmann, B., Toräng, S., Rehfeld, J.F., Poulsen, S.S. & Holst, J.J. (2015). An analysis of cosecretion and

- coexpression of gut hormones from male rat proximal and distal small intestine. *Endocrinology*, 2015 Mar;156(3):847-57. doi: 10.1210/en.2014-1710.
125. Takashima, S., Gold, D. & Hartenstein, V. (2012). Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. *Development genes and evolution*, 223(1-2), 85-102. doi: 10.1007/s00427-012-0422-8.
 126. Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. & Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Current biology : CB*. 1;5(12):1416-23.
 127. Torres, J. & Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry*. 276(2):993-8. doi: 10.1074/jbc.M009134200.
 128. Triantafyllidis, J.K., Nasioulas, G. & Kosmidis, P.A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer research*,29(7):2727-37.
 129. Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 9(11):799-809. doi: 10.1038/nri2653.
 130. Umar, S. (2010). Intestinal stem cells. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 340-8. doi: 10.1007/s11894-010-0130-3
 131. van der Flier, L.G. & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Reviews Physiology*, 2009;71:241-60. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
 132. Van Limbergen, J., Radford-Smith, G. & Satsangi, J Advances in IBD genetics. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(6):372-85. doi: 10.1038/nrgastro.2014.27.
 133. Vivanco, I. & Sawyers, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(7):489-501. DOI: 10.1038/nrc839.
 134. von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2015). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221-5. doi: 10.1038/nature16161.
 135. Westphalen, C. B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D. J., Nuber, A. H., ..., Wang, T. C. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *The Journal of clinical investigation*, 124(3), 1283-95. doi: 10.1172/JCI73434.
 136. Worthington, J.J., Reimann, F. & Gribble, F.M. (2018). Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal immunology*. 1(1):3-20. doi: 10.1038/mi.2017.73.
 137. Yen, T.H. & Wright, N.A. (2006). The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem cell reviews*. 2(3):203-12.

138. Yi, F., Sun, J., Lim, G.E., Fantus, I.G., Brubaker, P.L. & Jin, T. (2008). Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*, 149(5):2341-51. doi: 10.1210/en.2007-1142.
139. Yu, Li., Chen, Y. & Tooze, S. A. (2018) Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, 14:2, 207-215, DOI: 10.1080/15548627.2017.1378838.
140. Zahid, A. (2004). The vermiform appendix: not a useless organ. *Journal of the College of Physicians and Surgeons—Pakistan*, 14(4):256-8.
141. Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 20(1), 91-9. doi: 10.3748/wjg.v20.i1.91.

7. Anexos

7.1 Anexo I

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@fisio.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.

7.2 Anexo II



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, Tlahepantla, 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@fisio.cinvestav.mx

⁷These authors contributed equally to this work.

CS.M., CM.J., HT.J., HR.M., C.A., V.R., MC.O. and N.R. performed experimental procedures, data interpretation and prepared images. SP.D. and N.R. performed

7.3 Anexo III

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 Gutiérrez-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 patogénesis 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.

