



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**La señalización intracelular mediada por rictor/mTORC2 previene la apoptosis en
colonocitos y evita la destrucción de la barrera epitelial**

Tesis que presenta

M.C. Felipe Ángeles Castro Martínez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de tesis

Tutor interno: **Dr. Porfirio Nava Domínguez**

Tutor externo: **Dr. Oscar Medina Contreras**

México, Ciudad de México

Septiembre de 2021

Agradecimientos

A el Dr. Porfirio Nava Domínguez y el Dr. Oscar Medina Contreras por darme la oportunidad de formarme como investigador en sus laboratorios.

A mis asesores de tesis el Dr. Vianney Ortiz Navarrete, el Dr. Ricardo Valle Ríos, el Dr. Fanis Missirlis y el doctor Marcos Nahmad Bensusan por sus comentarios y consejos para enriquecer los proyectos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Carolina, Octavio, Fernando, Rocío Pérez y Rocío Encarnación por sus consejos y apoyo incondicional.

A la M.C. Aurora Candelario Martínez y a la Lic. Norma Trejo Estrada por su apoyo técnico y consejos de vida.

A mis amigos Noe, Luis, Jhon, Yudi, Ada Génesis, Robert, Ariana, Laura, Elim, Remberto y Eli porque siempre se tomaron el tiempo para escucharme y brindar por nuestros logros.

A mis compañeros y amigos del hospital Nelly, Tania, Laura, Gustavo, Miguel, Sarita, Betty, Yanen, Isela y Mayra por acompañarme en mi formación y siempre brindarme ese apoyo incondicional.

Al departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias por aceptarme al programa de doctorado.

A el apoyo otorgado por el fondo sectorial para la investigación y la educación a través del proyecto para ciencia básica del Conacyt (Proyecto No. A1-S-20887 a Porfirio Nava Domínguez) y por el apoyo otorgado por el CINVESTAV a través del proyecto SEP-Conacyt (Proyecto No.179 de Nicolás Villegas Sepúlveda y Porfirio Nava Domínguez).

Dedicatorias

A mi hermosa abuela Apolonia Francisco que ya no está para ver este logro.

A mi abuelo Felipe Martínez por ser mi ejemplo a seguir en esta vida.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y sacarme sonrisas todos los días.

A las personas de mi pueblo llamado Loma Bella porque desde que inicie mis estudios han sido la inspiración para seguir preparándome.

A Marycruz Flores por escucharme en todo momento y acompañarme en el camino del saber.

A mis maestros que en todo momento creyeron en mí y siempre me apoyaron para conseguir este logro.

ÍNDICE

Contenido

1. Resumen.....	7
2. Marco teórico.....	9
2.1. Mucosa intestinal.....	9
2.2. Barrera epitelial.....	10
2.2.1. Uniones intercelulares.....	11
2.2.2. Renovación del epitelio intestinal por proliferación y diferenciación.....	12
2.2.3. Muerte celular de las células epiteliales intestinales.....	13
2.3. Enfermedades inflamatorias intestinales.....	15
2.4. Señalización de Akt.....	15
2.4.1. Papel de Akt en la supervivencia celular.....	17
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivo general.....	19
6. Materiales y métodos.....	20
6.1. Experimentos con animales.....	20
6.2. Anticuerpos y reactivos.....	20
6.3. Inducción de colitis.....	20
6.4. Aislamiento de criptas.....	21
6.5. Análisis de apoptosis.....	21
6.6. Western Blot.....	21
6.7. Inmunofluorescencia.....	21
6.8. Permeabilidad intestinal.....	22
6.9. Puntaje histológico e inmunohistoquímica.....	22
6.10. Determinación de el puntaje del índice de la actividad de la enfermedad (DAI por sus siglas en inglés).....	23
6.11. Análisis estadístico.....	23
7. Resultados.....	24
7.1. La apoptosis de los colonocitos superficiales genera regiones permeables en la mucosa colónica durante colitis.....	24
7.2. La señalización de Rictor/mTORC2/Akt es disminuida en los colonocitos colícticos.....	27
7.3. La ablación de rictor inactiva la señalización de mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.....	31

7.4. La señalización de rictor/mTORC2 previene la apoptosis y anoikis en los colonocitos superficiales.	35
7.5. La señalización de rictor/mTORC2 regula negativamente la apoptosis e incrementa la proliferación en enteroides.	37
7.6. La señalización mTORC2/Rictor atenúa la inflamación colónica.	41
7.7. La señalización de rictor/mTORC2 afecta mínimamente el desarrollo/establecimiento de colitis.	45
8. Discusión.....	47
9. Conclusión	53
10. Bibliografía	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capas del tracto gastrointestinal.	9
Figura 2. Componentes de la mucosa intestinal.....	11
Figura 3. La unión estrecha funciona como una compuerta paracelular y una cerca de membrana. 12	
Figura 4. Vías de muerte celular.	14
Figura 5. Mecanismo molecular de la regulación de Akt.	16
Figura 6. Incremento de la permeabilidad y apoptosis en la mucosa intestinal en ratones tratados con DSS.	25
Figura 7. Detección de los sitios con alta permeabilidad en el colon de ratones control y colícticos utilizando dextrano fijable (F-dextrano).	27
Figura 8. La apoptosis y anoikis contribuyen activamente a la disfunción de la barrera epitelial en la mucosa colíctica.....	29
Figura 9. Señalización de rictor/mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.....	33
Figura 10. Generación del ratón KO de rictor en células epiteliales intestinales.....	34
Figura 11. La eliminación de rictor inactiva la señalización de mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.	37
Figura 12. La señalización de Rictor/mTORC2/Akt previene la apoptosis y anoikis en los colonocitos superficiales.	39
Figura 13. La señalización de rictor/mTORC2 regula negativamente la apoptosis e incrementa la proliferación en enteroides.....	41
Figura 14. La señalización de rictor/mTORC2 atenúa la inflamación en la mucosa colónica.	43
Figura 15. La señalización de rictor/mTORC2 atenúa la permeabilidad y muerte de las células epiteliales.	44
Figura 16. La señalización de rictor/mTORC2 afecta mínimamente el desarrollo/establecimiento de colitis.....	47
Figura 17. Mecanismo por el cual el eje rictor/mTORC2/Akt regula la muerte celular de los colonocitos durante colitis.....	52

1. Resumen

El deterioro de la barrera epitelial que se observa en diversos procesos patológicos del intestino como son las enfermedades inflamatorias intestinales, ha sido ampliamente estudiado, pero no completamente aclarado. Diversas señales intracelulares previenen la apoptosis en las células epiteliales intestinales. Aquí demostramos que, en los colonocitos, la señalización de rictor/mTORC2 es un estímulo importante para la supervivencia de dichas células. Mecanísticamente, el complejo mTORC2 activa a la proteína cinasa Akt que a su vez inhibe la apoptosis celular a través de una fosforilación en Bad, lo cual previene la formación de poros en la mitocondria y la posterior activación de la Caspasa 3. Sin embargo, durante procesos inflamatorios de la mucosa intestinal la señalización rictor/mTORC2 disminuye y la actividad de Akt es reducida. Como consecuencia, la caspasa 3 es activada en los colonocitos superficiales y estos entran en apoptosis/anoikis lo que conlleva a la ruptura de la barrera epitelial. En el presente trabajo se observó que al eliminar *Rictor* específicamente de en las células epiteliales intestinales usando un sistema Cre-Lox se interrumpe la señalización de mTORC2/Akt e incrementa la apoptosis/anoikis de los colonocitos superficiales sin que esto afecte la arquitectura de la cripta. Además, como era de esperarse la eliminación de rictor en los colonocitos incrementó la permeabilidad epitelial y disparó una respuesta inflamatoria leve en la mucosa colónica que sin embargo afectó mínimamente el desarrollo y establecimiento de la colitis. Los datos reportados aquí demostraron que existe un mecanismo previamente desconocido por el cual la señalización rictor/mTORC2 regula la apoptosis/anoikis en las células epiteliales intestinales durante colitis y clarifica su papel en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal.

ABSTRACT

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

2. Marco teórico

2.1. Mucosa intestinal

El tracto gastrointestinal está conformado por 4 capas: la mucosa, la submucosa, la muscularis propia y la serosa (**figura 1**). La mucosa intestinal es la capa más interna y está dividida en tres capas. La primera capa orientada hacia la luz intestinal está formada por las células epiteliales las cuales crean una barrera semipermeable que permite la absorción de nutrientes al mismo tiempo que inhibe el paso de sustancias tóxicas al interior del organismo. Este último proceso es esencial para ayudar a establecer la tolerancia de las células del sistema inmune residentes en el intestino hacia la microbiota. La segunda capa es la lámina propia, que consta de tejido conectivo subepitelial y ganglios linfáticos, en esta capa residen diversos linajes celulares como las células del sistema inmune innato y adaptativo. Por última se encuentra la capa de la mucosa muscular cuya función es poco conocida, pero se ha postulado que puede contribuir al plegamiento del epitelio y es por eso responsable de crear las proyecciones en forma de dedos o vellosidades (Rao & Wang, 2010).

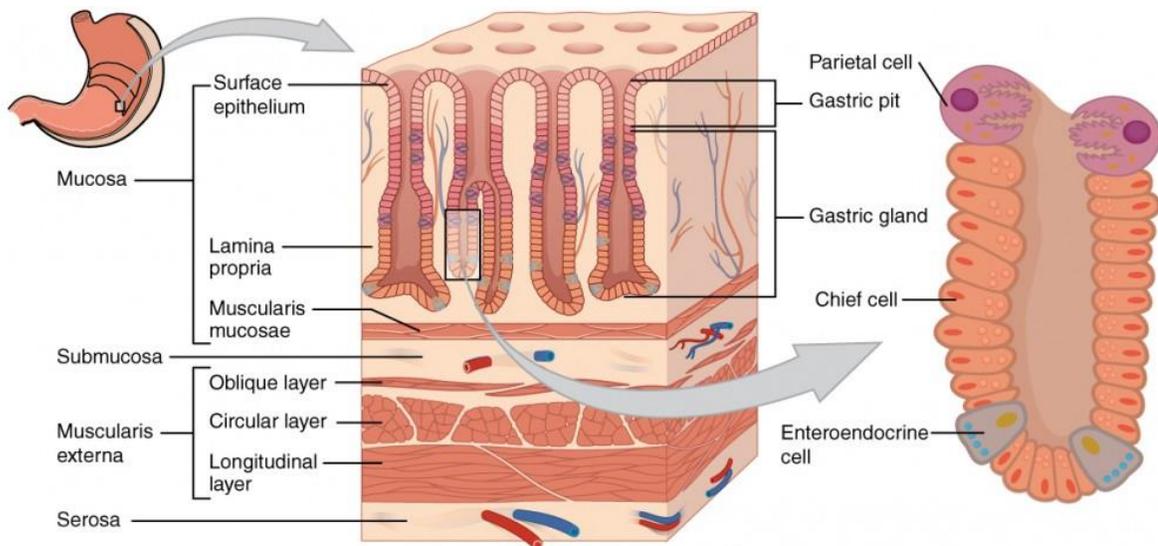


Figura 1. Capas del tracto gastrointestinal. El tracto gastrointestinal se conforma por la mucosa, submucosa, muscularis propia y la serosa.

2.2. Barrera epitelial

La barrera epitelial está compuesta por monocapa de células epiteliales que forman invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn a lo largo de todo el intestino y vellosidades en el intestino delgado y las uniones intercelulares que mantienen a las células unidas entre si (van der Flier & Clevers, 2009).

Diversas sustancias toxicas presentes en el lumen intestinal dañan a las células epiteliales y es por ello por lo que deben ser reemplazadas constantemente. Dicho proceso es posible gracias a que en la base de la cripta residen las células troncales que dan origen a los diferentes tipos de células epiteliales que conforman a la barrera epitelial y entre los que se encuentran los enterocitos, cuya función principal es la absorción de nutrientes, agua y electrolitos; las células caliciformes que secretan mucinas, las células enteroendócrinas que secretan hormonas y las células de Paneth que liberan factores antimicrobianos para proteger a las células troncales en la base de la cripta. Finalmente, están las células en penacho que juegan un papel clave en la defensa contra los helmintos, y las células M que son parte integral de la captación y eventual presentación de antígenos luminales al sistema inmunológico (Allaire et al., 2018).

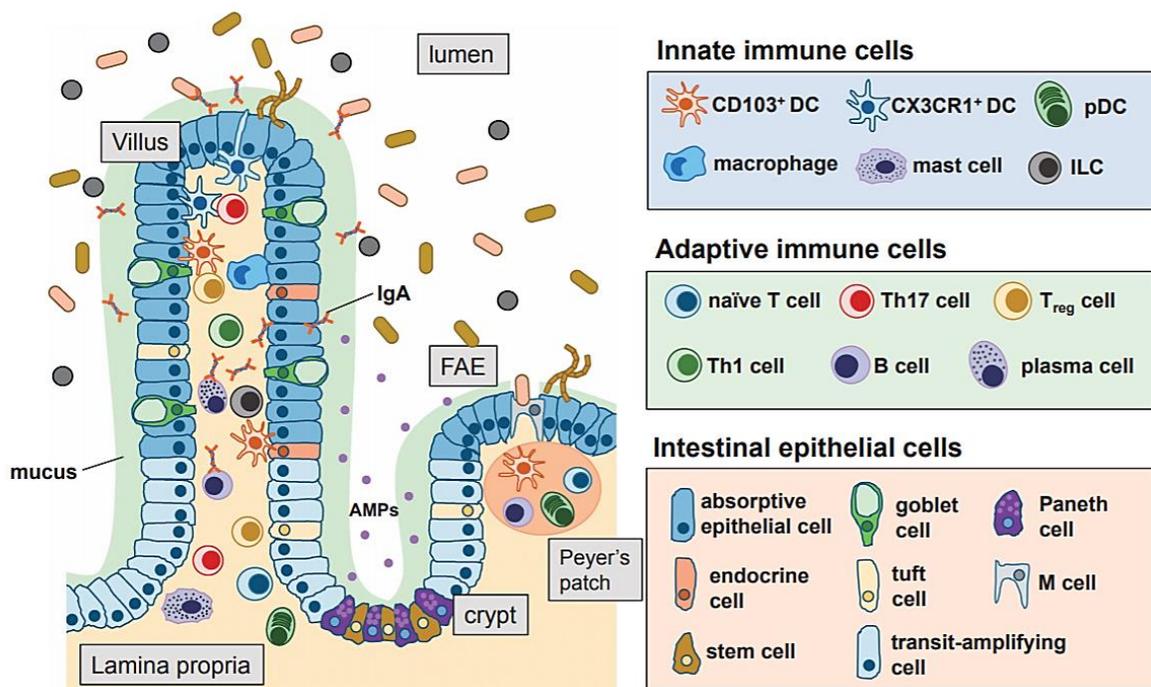


Figura 2. Componentes de la mucosa intestinal. La mucosa intestinal posee una capa de moco en el que se encuentran los componentes de la microbiota; una barrera epitelial compuesta por diferentes células epiteliales que poseen un linaje de absorción y secreción; y por células inmunes que residen en la lámina propia (Okumura & Takeda, 2016).

Para mantener la función de barrera del epitelio intestinal las uniones intercelulares y los diferentes procesos que mantienen constante el número de células que forman el epitelio intestinal (la proliferación, la diferenciación y la muerte celular) deben estar estrictamente regulados. Entre los factores que regulan estos procesos se encuentran la microbiota, las células del sistema inmune y diversas sustancias secretadas por las propias células epiteliales.

2.2.1. Uniones intercelulares

Las uniones intercelulares comprenden a las uniones estrechas (UE), adherentes y desmosomas. Las UE están formadas por un conjunto de proteínas periféricas e integrales que poseen dos funciones canónicas que se asemejan a las de una compuerta y una cerca (**figura 3**). La función de compuerta se refiere a la capacidad de las UE para regular el paso de iones, moléculas y agua a través de la vía paracelular. En cambio, la función de cerca se refiere a la capacidad de las UE para restringir el movimiento de lípidos y proteínas dentro de la membrana desde el dominio apical al basolateral y viceversa. Entre las proteínas de la UE más conocidas se incluyen a la ocludina, miembros de la familia de las claudinas, JAM 1-3, cingulina y proteínas enlazadoras de la familia ZO, que sirven para unir a las proteínas anteriores entre sí o al citoesqueleto de actina (González Mariscal 2009).

Las uniones adherentes (UA) mantienen la arquitectura del tejido y facilitan el movimiento celular durante el desarrollo y la renovación del tejido. La principal proteína integral de las UA en el intestino es la E-cadherina y esta se une a las cateninas en su cola citoplasmática lo cual le permite anclarse al citoesqueleto de actina. La E-cadherina establece la primera unión entre células epiteliales lo que posteriormente conlleva a un rearrreglo del citoesqueleto de actina para que se puedan formar las demás uniones intercelulares. Los desmosomas están formados por proteínas transmembranales de la familia de las cadherinas de tipo I, la desmocolina y la desmogleína. A diferencia de las UA, los desmosomas están vinculados a filamentos intermedios en lugar del citoesqueleto de actina (Harris & Tepass, 2010).

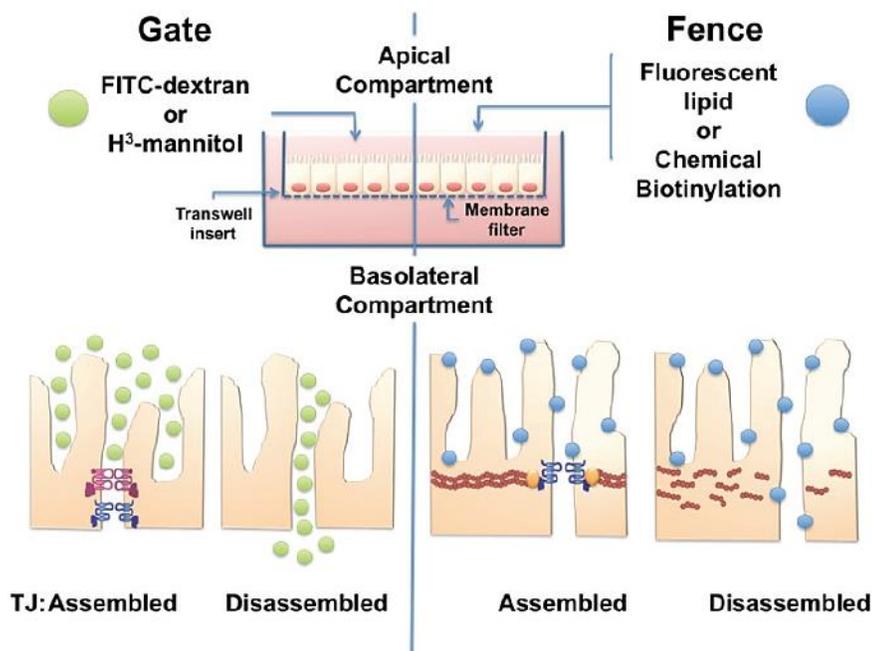


Figura 3. La unión estrecha funciona como una compuerta paracelular y una cerca de membrana. La función de compuerta de la unión estrecha se puede evaluar midiendo el paso de trazadores paracelulares desde el compartimento apical al basolateral, mientras que la función de cerca se determina evaluando la difusión libre en el plano de la membrana de lípidos incorporados y sondas químicas.

2.2.2. Renovación del epitelio intestinal por proliferación y diferenciación

En la base de la cripta intestinal residen las células troncales que se dividen de forma asimétrica. La progenie de dichas células genera una población de células epiteliales hiperproliferativa que se asienta en los brazos laterales de la base de la cripta y que se denomina células de amplificación en tránsito. Las células de amplificación en tránsito permanecen alrededor de 2 días en la base de la cripta donde se dividen entre 4 y 5 veces. Durante este proceso las células empiezan a migrar hacia la superficie de la cripta y son estimuladas por los diferentes microambientes que les permiten alcanzar un estado diferencial terminal (van der Flier & Clevers, 2009). La diferenciación y compromiso celular se adquiere gracias a la presencia de diversas señales exógenas que estimulan vías de señalización específicas, como son las vías de Wnt y Notch, las cuales son las encargadas de mantener la troncalidad celular y regular el compromiso celular (Crosnier et al., 2006); la vía Eph/ephrin implicada en la proliferación y

redistribución de las células que proliferan en la base de la cripta (Holmberg et al., 2006); y las vías PDGF y Hedgehog implicadas en el mantenimiento de la arquitectura de las criptas y vellosidades (Crosnier et al., 2006). Los estímulos para activar estas vías tienen múltiples orígenes entre los que se incluyen, las células de Paneth, de células del sistema inmune como las ILC3, fibroblastos subepiteliales y por cuerpos apoptóticos de las células epiteliales (Holmberg *et al.*, 2006; Allaire *et al.*, 2018; Zha *et al.*, 2019;).

2.2.3. Muerte celular de las células epiteliales intestinales

El epitelio intestinal experimenta una autorrenovación rápida y continua. Como consecuencia, la renovación de las células epiteliales y la muerte celular deben estar estrictamente reguladas porque un incremento en la muerte celular conduce inexorablemente al desarrollo de diversas patologías como el cáncer y las enfermedades inflamatorias intestinales (Ramachandran et al., 2000; Subramanian et al., 2020). Los diferentes tipos de muerte celular que afectan a las células epiteliales incluyen, formas no programadas como la necrosis y programadas como la apoptosis, necroptosis, piroptosis y autofagia (**figura 4**) (Negroni *et al.*, 2015). Cada uno con sus propias características y diferencias.

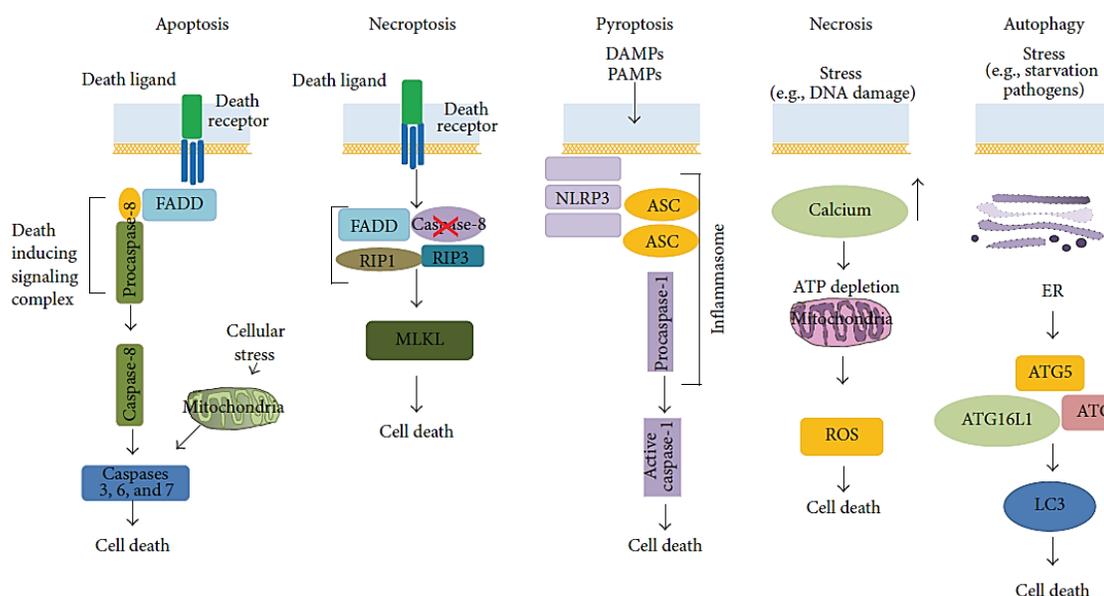


Figura 4. Vías de muerte celular. La apoptosis, necroptosis y piroptosis son formas programadas de muerte celular, mientras que la necrosis representa una muerte celular no regulada. La autofagia es una vía de supervivencia que, si es excesiva o descontrolada, promueve la muerte celular. Proteína asociada a Fas con un dominio de muerte (FADD); proteína 1 que interactúa con el receptor (RIP1); proteína que interactúa con el receptor (RIP3); similar al dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL); patrones moleculares asociados a daño (DAMP); patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); familia de receptores tipo nod, que contiene dominio pirina (NLRP) 3; proteína tipo mota asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa (ASC); genes relacionados con la autofagia (ATG); relacionados con la autofagia 16 tipo 1 (ATG16L1); cadena ligera 3 (LC3II); RE: retículo endoplásmico.

La necrosis es iniciada por una lesión celular a través de factores externos como isquemia-reperfusión, toxinas, infecciones virales y bacterianas y por citocinas proinflamatorias. Este proceso de muerte se caracteriza por una rápida degradación de la membrana celular, lo que resulta en la liberación de compuestos intracelulares en el extracelular y con la posterior activación del sistema inmunológico (Gibson, 2004; Negroni et al., 2015).

La apoptosis es un proceso que se basa en la activación de las caspasas y puede iniciarse por estímulos que incluyen el daño al ADN, deficiencia de nutrientes, estrés del retículo endoplásmico (RE), señales de desarrollo y ligación de receptores de muerte en la superficie celular. Se han descrito dos sitios de muerte de células epiteliales a lo largo del intestino: el primero tiene lugar en la cripta al nivel de las células madre y de tránsito temprano y el segundo en la superficie vellosidad o cripta, donde las células epiteliales, después de viajar desde la base de la cripta, se diferencian y luego mueren por anoikis. Este último tipo de muerte celular programada se da cuando las células epiteliales pierden las uniones intercelulares y se desprenden de la barrera epitelial (Negroni et al., 2015).

La necroptosis a diferencia de la apoptosis, está regulada negativamente por caspasas y dependiendo de la actividad quinasa de las proteínas que interactúan con el receptor (RIP). La necroptosis muestra características morfológicas similares a la necrosis, pero, al igual que la apoptosis, está estrictamente regulada por una plataforma multiproteica. Se caracteriza por una ruptura rápida de la membrana, lo que resulta en la liberación de compuestos intracelulares como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), la proteína del cuadro de grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), las proteínas de choque térmico, el ADN y el ARN (Negroni et al., 2015).

2.3. Enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un problema de salud a nivel mundial. Su prevalencia se ve incrementada en países europeos y de Norteamérica (Kaplan, 2015). En México estudios epidemiológicos muestran un incremento en la incidencia de nuevos casos (Bosques-Padilla et al., 2011; Yamamoto-Furusho et al., 2019). La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son las dos patologías más importantes entre las EII (Friedrich et al., 2019).

El desarrollo de las EII es multifactorial, pero se ha establecido que la disfunción de la barrera epitelial, las alteraciones en las vías de defensa del hospedero, las afectaciones en la regulación del sistema inmune local y las deficiencias en la reparación del tejido son factores claves que detonan la aparición y desarrollo de dichas patologías. Además, se ha mostrado que las interacciones entre la microbiota y el hospedero también juegan un papel esencial en dichos procesos (Friedrich et al., 2019). Los cambios mencionados anteriormente se han asociado a la presencia/enriquecimiento de diversas citocinas y factores de crecimiento que se secretan por distintas células que están presentes en la mucosa intestinal, tales como células sistema inmune, células epiteliales y fibroblastos (Andrews et al., 2018).

Las citocinas y factores de crecimiento liberados durante las EII modulan diversas vías de señalización como P38-MAPK, JNK-MAPK, PI3K/Akt, STAT1/3, STAT6 y NF- κ B implicadas en la regulación de la barrera epitelial al modular las uniones intracelulares, proliferación, diferenciación y muerte celular (Hernández-Trejo et al., 2016; Jia & Jiexiong, 2010; Serrano et al., 2019). Recientemente la vía de señalización PI3K/Akt ha tomado gran relevancia por estar implicada en la supervivencia de las células epiteliales durante las EII y el cáncer asociado a colitis (Khare et al., 2015).

2.4. Señalización de Akt

Akt o proteína cinasa B (PKB), es una serina/treonina cinasa que juega un papel importante en la regulación de una serie de procesos celulares como el crecimiento, el metabolismo y la supervivencia. Akt es activado por receptores tirosina cinasa (RTK) o receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que conducen a la activación de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K). La PI3K activa fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) y forma fosfatidilinositol (3,4,5) -

trifosfato (PIP3) que promueve el reclutamiento del Akt citosólico hacia la membrana celular a través de su dominio de plecstrina (PH). Esto permite que Akt sea fosforilada en la tirosina 308 (T308) y la serina 473 (S473) por PDK1 y mTORC2, respectivamente, lo que resulta en su activación completa. La terminación de la señal se logra mediante la fosfatasa PIP3 PTEN y las proteínas fosfatasas PP2A y PHLPP (Manning & Toker, 2017) (**Figura 5**).

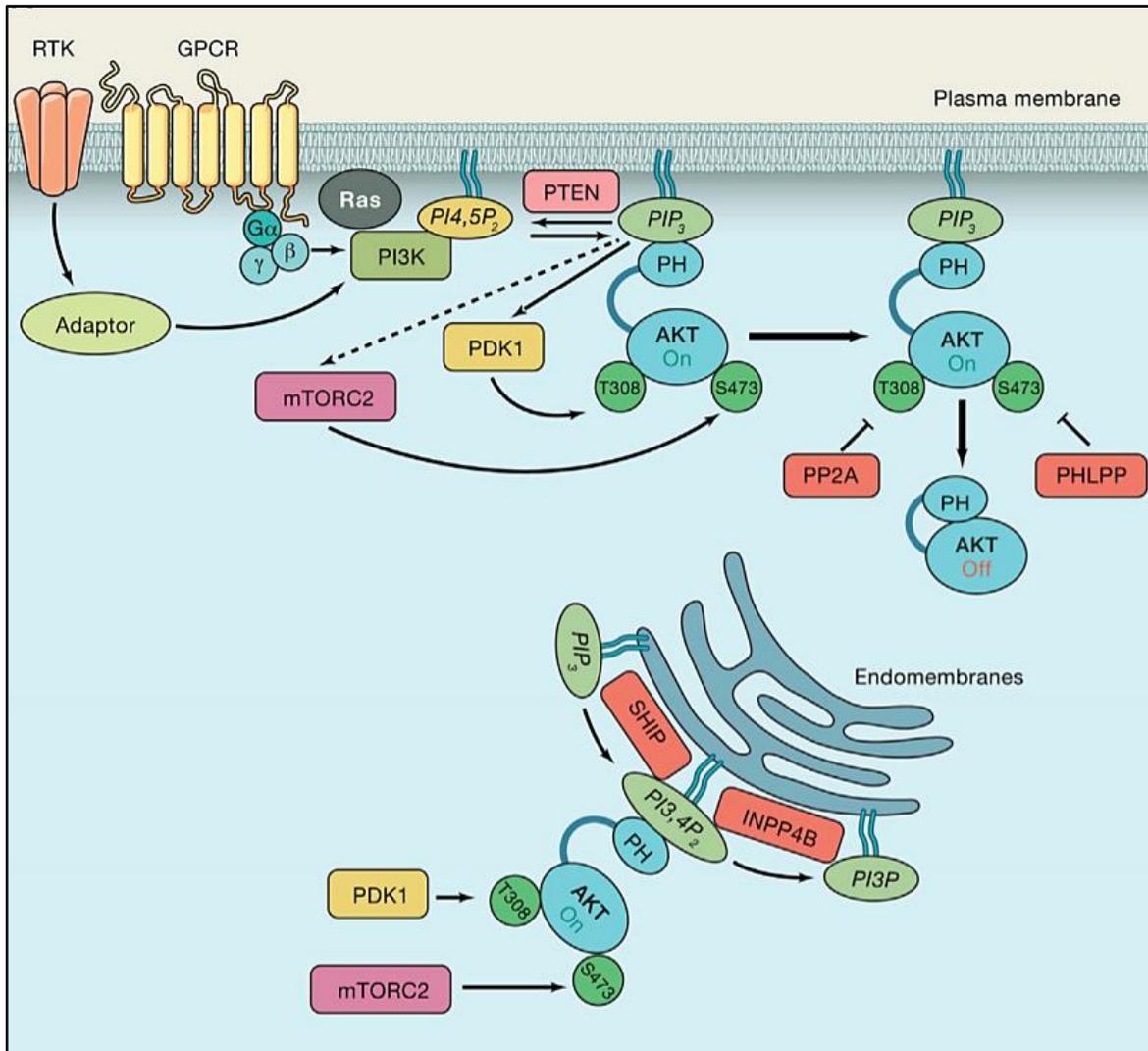


Figura 5. Mecanismo molecular de la regulación de Akt. La estimulación de RTK o GPCR conduce a la activación de PI3K, lo que lleva a la producción de PIP3 en la membrana plasmática. El AKT inactivo citosólico se recluta en la membrana y se acopla a PIP3 a través de su dominio de unión a PH. Esto conduce a la fosforilación de la T308 y S473 por PDK1 y mTORC2, respectivamente, lo que resulta en una activación completa. La

terminación de la señal se logra mediante la fosfatasa PIP3 PTEN y las proteínas fosfatasas PP2A y PHLPP. Es probable que exista una reserva de endomembrana separada de AKT activa que se activa a través del acoplamiento de PI3,4P₂ a través de la acción de la fosfatasa SHIP y termina con INPP4B.

2.4.1. Papel de Akt en la supervivencia celular

Akt está implicada en la supervivencia celular mediante la regulación positiva de CREB la cual regula la transcripción de genes antiapoptóticos; la regulación negativa de FOXOs encargado de la transcripción de genes proapoptóticos; la regulación positiva de mTORC1 implicado en la traducción de mensajeros proapoptóticos; y la regulación de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 como Bax, Bak, Bim y Bad (Downward, 2004; Zhang et al., 2011).

De los sistemas antiapoptóticos regulados por Akt, destaca el eje PI3K/Akt/Bad por su capacidad de modular la muerte celular programa mediada por caspasas. Cuando Akt se encuentra activa fosforila a Bad en el residuo de serina 136 impidiendo así la heterodimerización de Bad con la proteína Bcl-xL ubicada en la membrana mitocondrial. Esto es importante porque la unión de Bad con Bcl-xL promueve la formación de un poro en la membrana mitocondrial que favorece la liberación del citocromo c al citoplasma. Como es sabido, el citocromo c liberado interactúa con Apaf-1, dATP y caspasa-9 para formar el apoptosoma. Una vez activa la caspasa-9 puede continuar con el proceso apoptótico al estimular la actividad de caspasas efectoras como lo es la caspasa-3, un factor esencial en la denominada muerte celular programada (Datta et al., 1997; Downward, 2004).

Diversos estudios han evaluado el papel de Akt sobre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, pero poco se sabe acerca de su papel en la muerte celular de los colonocitos durante las EII (Gutiérrez-Martínez et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2016; Nava et al., 2010). Inhibidores del complejo mTORC2, el cual es un activador de Akt han sido implicado en la muerte de las células epiteliales en el cáncer gástrico, lo que sugiere fuertemente que la inhibición de la vía de Akt podría también estar involucrado en la muerte de los colonocitos durante el desarrollo de las EII (Bian et al., 2017). Además, se ha observado que la apoptosis y anoikis de las células epiteliales intestinales involucra la activación de la caspasa 3 por lo que lo que se sugiere que el eje PI3K/Akt/Bad podría estar jugando un papel importante en dichos procesos (Datta et al., 1997; Negroni et al., 2015).

3. Justificación

Las EII son problema de salud a nivel mundial y su incidencia en México se ha incrementado en los últimos años. Durante estas patologías la barrera epitelial es dañada por lo que diversas vías de supervivencia son activadas. Para mitigar la muerte de las células epiteliales diversas vías de señalización son activadas y una de ellas es la cinasa de supervivencia Akt.

Durante la colitis, la cinasa Akt ha sido implicada en el mantenimiento del epitelio intestinal tras modular procesos como la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la activación de Akt y, por lo tanto, previenen la muerte celular en colonocitos aún no se comprenden en su totalidad.

4. Hipótesis

La activación de Akt río abajo de mTORC2 en las células epiteliales de colon es esencial para inhibir la muerte celular de los colonocitos.

5. Objetivo general

Determinar la participación de mTORC2 en la activación de Akt durante la muerte celular de los colonocitos.

6. Materiales y métodos

6.1. Experimentos con animales

Todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV. Ratones C57BL/6J y *Rictor^{AIEC}* entre 6 y 8 semanas de edad fueron criados en el centro de investigación y de estudios avanzados (CINVESTAV). Los ratones C57BL/6J, B6. Cg-Tg (Vil1-cre)997Gum/J (Stock No:004586) y Ptpcr^b Thy1^a Rictor^{tm1.1Klg/SjmJ} (Stock No: 020649) fueron comprados a The Jackson Laboratory (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Los animales se alojaron en un ciclo estándar de día y noche, con libre acceso a alimentos y agua.

6.2. Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos y reactivos fueron utilizados como sugiere el fabricante. β -catenin (E-5) (sc-7963) y GSK-3 β (E-11) (sc-377213) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Akt1 (CST-2938), pPKC α/β (Thr638/641) (CST-9375), PKC α (CST-2056), proteína ribosomal S6 (CST-2317), proteína ribosomal pS6 (Ser235/236) (CST-4858), pAkt473 (Ser473) (CST-4060), p β -Catenin (Ser552) (CST-9566), pGSK-3 β (Ser9) (CST-9336), Caspasa 3 escindida (Asp175) (CST-9661), mTOR, raptor y rictor (D16H9; CST-9476) fueron obtenidos de Cell Signaling (Danvers, MA). El anticuerpo dirigido contra actina de ratón fue donado por el doctor Manuel Hernández (Departamento de biología celular, CINVESTAV). pBad (ser 136) (ab129192), PCNA PC10 (ab29) and Bad (ab62465) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP fueron comprados de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

6.3. Inducción de colitis

Los ratones recibieron DSS (Masa molecular de 40 kDa, Carbosynth, CA) al 2.5 % disueltos en agua de beber. Los ratones fueron sacrificados y el colon fue medido, pesado y procesado para histología. El colon fue procesado para inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) y western blot.

6.4. Aislamiento de criptas

La región del colon proximal fue identificada y un segmento entre 1-2 cm fue removido. El colon fue abierto haciendo un corte longitudinal, se enjuagó en PBS frío y se incubó en una solución de quelación de Ca^{2+} durante 30 minutos a temperatura ambiente (NaCl 966 mM, KCl 1,5 mM, HEPES 10 mM, Tris 10 mM, EDTANa o EGTANa 27 mM, sorbitol 45 mM, Sacarosa 28 mM y BSA al 0,1%). Después de la quelación, el tejido se agitó manualmente para liberar las criptas. Se retiró el tejido y se centrifugó la solución a 2000 rpm durante 2 minutos. Las criptas aisladas se lisaron en RIPA para Western Blot.

6.5. Análisis de apoptosis

La apoptosis se determinó por la presencia de caspasa 3 activa (Acasp-3). La presencia de Acasp-3 fue determinada usando un anticuerpo comercial contra la caspasa 3 escindida (CTS-9664) mediante IF e IHQ.

6.6. Western Blot

Las muestras de colon fueron colectadas en solución amortiguadora de RIPA (50 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0.5% de ácido desoxicólico, 0.1% de SDS, 50 mM de Tris, pH 8.0) y fueron homogenizados empleando un homogenizador Benchmark BeadBlaster (Benchmark Scientific; Sayreville, NJ). La concentración de proteína fue determinada empleando el ensayo de la proteína BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Se cargaron 25 μg de proteína en SDS PAGE desnaturizante para Western Blot.

6.7. Inmunofluorescencia

Las muestras de colon fueron criopreservados en O.C.T. (Sakura Finetekm Torrance, CA) y seccionados (20 μm). Después, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (20 min, temperatura ambiente (TA)), permeabilizadas con tritón X-100 al 0.1% (15 min, TA) y bloqueadas con BSA al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por una hora a TA. La incubación con el anticuerpo primario fue llevado a cabo a 4°C toda la noche y los anticuerpos secundarios fueron adicionados 1 hora a TA. Representativas imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LSM 510 (Zeiss, Jena, Germany) o con un Leica TCS SP8x (Wetzlar, Germany). Las

imágenes fueron analizadas con el programa Fiji-Image J 2.1.0./1.53c (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

6.8. Permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal fue evaluada como reportamos previamente (Castro-Martínez et al., 2021). El dextrano acoplado a Isotiocianato de fluoresceína de 4 kDa (FD4) y a isotiocianato de rodamina B de 10 kDa (RD10) se adquirieron de Sigma-Aldrich, St Louis, MO. Para ensayos de IF el dextrano fijable Alexa fluor 647 de 10 kDa (D22914; 4 µg/mL) fue adquirido de Invitrogen, CA. Después del tratamiento los ratones fueron sacrificados, el colon fue extraído y las heces fueron removidas. Un lazo en la región distal del colon fue hecho para generar un saco intestinal. El saco intestinal (4 cm) fue llenado por la región proximal con una solución que contenía 1 mg/mL de dextrano FITC/RITC o 4 µg/mL de dextrano Alexa Fluor 647 e inmediatamente fue sellado. El saco fue incubado en un tubo cónico con 10 mL de solución Hartmann protegido de la luz a 37°C con 5% de CO₂. Para medir el flujo pasivo del dextrano FITC/RITC, una muestra de 100 µL de la solución Hartmann fue colectado del tubo cónico a 0 y 60 min, posteriormente fue transferido a una placa de 96 pozos y la fluorescencia fue medida. Para evaluar la ubicación de los sitios de alta permeabilidad en el colon, el dextrano que se puede fijar se lavó suavemente del saco intestinal (transcurridos 30 min) y fueron congelados a -80°C. Las muestras fueron procesadas para IF utilizando el protocolo antes descrito.

6.9. Puntaje histológico e inmunohistoquímica

Las muestras de colon se enjuagaron minuciosamente y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) durante 12-24 horas y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de parafina (4 µm/sección), se desparafinaron y se procesaron para tinción con H&E e inmunohistoquímica utilizando técnicas estándar. Para la inmunohistoquímica, los portaobjetos se tiñeron utilizando un equipo automatizado (Ventana Benchmark GX, Roche Rotkreuz Suiza). Se resuspendió el anticuerpo primario contra la caspasa 3 escindida (CST-9664) a una dilución 1:2500 en una solución de leche desnatada al 1%. Para el revelado se utilizó el kit de detección de DAB universal UltraView (Ventana Medical Systems; Rotkreuz, Suiza). Por cada muestra se adquirieron y cuantificaron 10 campos (aumento de 40X) por portaobjetos usando un microscopio óptico BX53 Olympus equipado con células Sens Dimension Software

(Olympus Corporation; Tokio, Japón). El recuento y las mediciones en las regiones de interés (ROI) incluyeron todos los tonos de marrón, no se realizó ninguna discriminación entre la tinción citoplásmica, membranal y nuclear.

La puntuación histológica se realizó según lo informado. Brevemente, las muestras de colon se enjuagaron minuciosamente y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) durante 12-24 horas y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de parafina (4 μm /sección), se desparafinaron y se procesaron para tinción con H&E e inmunohistoquímica utilizando técnicas estándar. Se asignaron puntuaciones al daño epitelial colónico de la siguiente manera: 0 = normal; 1 = hiperproliferación, criptas irregulares y pérdida de células caliciformes; 2 = pérdida de criptas de leve a moderada (10 a 50%); 3 = pérdida grave de criptas (50 a 90%); 4 = pérdida completa de la cripta, epitelio superficial intacto; 5 = úlcera de tamaño pequeño a mediano (<10 anchos de cripta); 6 = úlcera grande (≥ 10 anchos de cripta). A la infiltración con células inflamatorias se les asignaron puntuaciones por separado para la mucosa (0 = normal, 1 = leve, 2 = modesta, 3 = grave), submucosa (0 = normal, 1 = leve a moderada, 2 = grave) y músculo / serosa (0 = normal, 1 = moderado a severo). Se agregaron puntuaciones para el daño epitelial y la infiltración de células inflamatorias, lo que resultó en un rango de puntuación total de 0-12.

6.10. Determinación de el puntaje del índice de la actividad de la enfermedad (DAI por sus siglas en inglés)

El DAI fue calculado siguiendo protocolos estándar. Todos los animales se evaluaron diariamente para determinar su peso corporal, sangre oculta, presencia de sangre macroscópica en las heces o sangrado rectal y consistencia de las heces. El DAI se calculó usando el porcentaje de peso perdido (0 = ninguno; 1 = 0-10%; 2 = 10-15%; 3 = 15-20%; 4 => 20%), hemorragia intestinal [0 = sin sangre; 2 = sangre oculta (hemocult +); 4 = sangrado rectal o sangre macroscópica] y consistencia de las heces (0 = heces normales, gránulos bien formados; 2 = heces blandas, pastosas y semiformadas; 4 = diarrea). DAI = (puntuación de pérdida de peso corporal) + (puntuación de hemorragia intestinal) + (puntuación de consistencia de las heces).

6.11. Análisis estadístico

Las especificaciones estadísticas que incluyen el tamaño de la muestra, las mediciones de precisión y las pruebas estadísticas se proporcionan en las leyendas de las figuras. Los valores considerados con diferencias estadísticamente significativas fueron de $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism v7.

7. Resultados

7.1. La apoptosis de los colonocitos superficiales genera regiones permeables en la mucosa colónica durante colitis.

Un defecto en la barrera intestinal incrementa la exposición de las células del sistema inmune al contenido luminal y promueve una respuesta inmunológica exacerbada durante la inflamación intestinal, una marca distintiva en los pacientes que cursan con EII (Laukoetter et al., 2008; Otto et al., 2001). Por lo tanto, evaluamos dicho proceso en la mucosa colónica de ratones C57BL/6J. Como se observa en la **figura 6A**, en el colon de los ratones a los que se les indujo colitis la permeabilidad paracelular del dextrano FITC-(4 kDa) y RITC-(10 kDa) incremento drásticamente, indicando una disfunción de la barrera epitelial. Mediante la tinción de Acasp-3 se determinó que existían focos apoptóticos en la mucosa inflamada, los cuales reflejaban sitios de microerosión y/o lesiones ulcerosas que podrían corresponder a sitios de alta permeabilidad intestinal (**Figura 6B**).

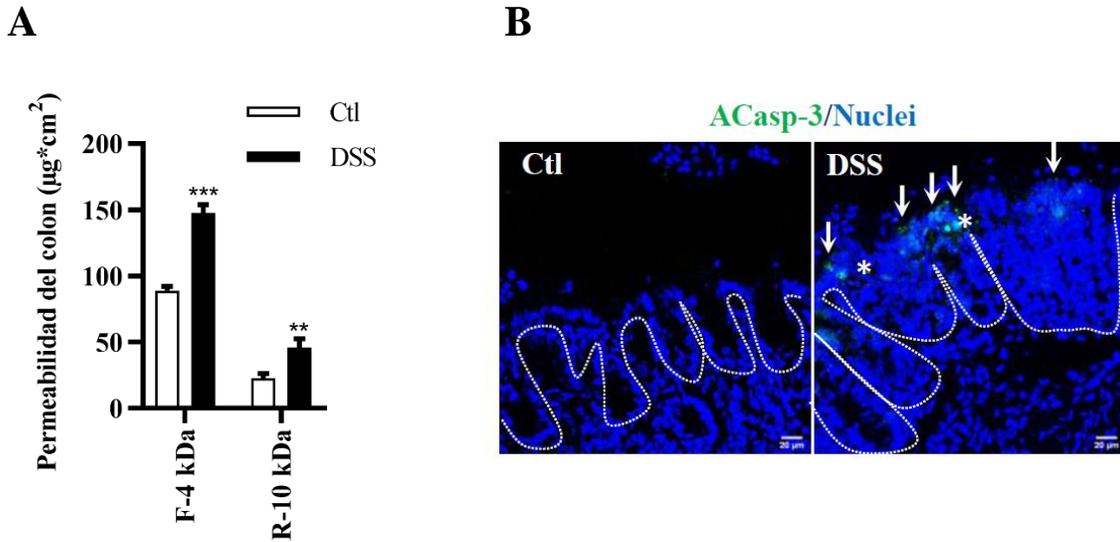


Figura 6. Incremento de la permeabilidad y apoptosis en la mucosa intestinal en ratones tratados con DSS.

A) Permeabilidad *ex vivo* en ratones de control (Ctl) y tratados con dextrano sulfato sódico (DSS). Los ratones C57BL/6J recibieron solo agua o DSS al 2,5% disuelto en agua potable durante 6 días. Los sacos colónicos se cargaron con una solución de isotiocianato-dextrano de fluoresceína con peso molecular de 4 kDa (FD-4) e isotiocianato-dextrano de rodamina B con peso molecular de 10 kDa (RD-10), y se midió el flujo neto de dextrano durante 60 minutos.

B) Apoptosis en la mucosa colónica de ratones colícticos. Los ratones C57BL/6J recibieron solo agua o DSS al 2,5% disuelto en agua potable durante 6 días. Las flechas blancas indican la presencia de caspasa 3 activa (ACasp-3; verde) en las células epiteliales que miran hacia la luz intestinal. Los asteriscos indican células no epiteliales ACasp-3⁺. Núcleos= azules. La línea discontinua marca la cripta.

Los valores de p se calcularon mediante un análisis de varianza bidireccional con la prueba post hoc de Sidak (A). Los datos muestran el error estándar de la media (SEM) (A). n=8 (A); n=6 (B). ** P <0,01, *** P <0,001. Escala de la barra= 20 µm (B). p= flujo paracelular de dextrano fijable (F-dextrano). T= flujo transcelular de F-dextrano.

Para analizar nuestra teoría y poder determinar fehacientemente en donde se localizan las regiones de alta permeabilidad en la mucosa colíctica se marcó el lumen de los sacos colónicos con un dextrano (F-dextrano) fluorescente ligado a una lisina fijable. Cuando F-dextrano entra en contacto con el PFA se conjuga con las biomoléculas circundantes del lumen intestinal y posteriormente pueden ser detectado a través de IF. En ratones control, el F-dextrano siempre se observó recubriendo la superficie apical de los enterocitos (lado luminal) y se detectó una difusión mínima debajo de esta capa (**Figura 7 (A-C), flechas blancas**). Contrario a lo anterior,

en ratones colíticos el flujo transcelular (espacio intracelular), permeabilidad paracelular (espacio intercelular) y la difusión del F-dextrano fueron claramente detectados (**Figura 7 (A-C), flechas blancas**).

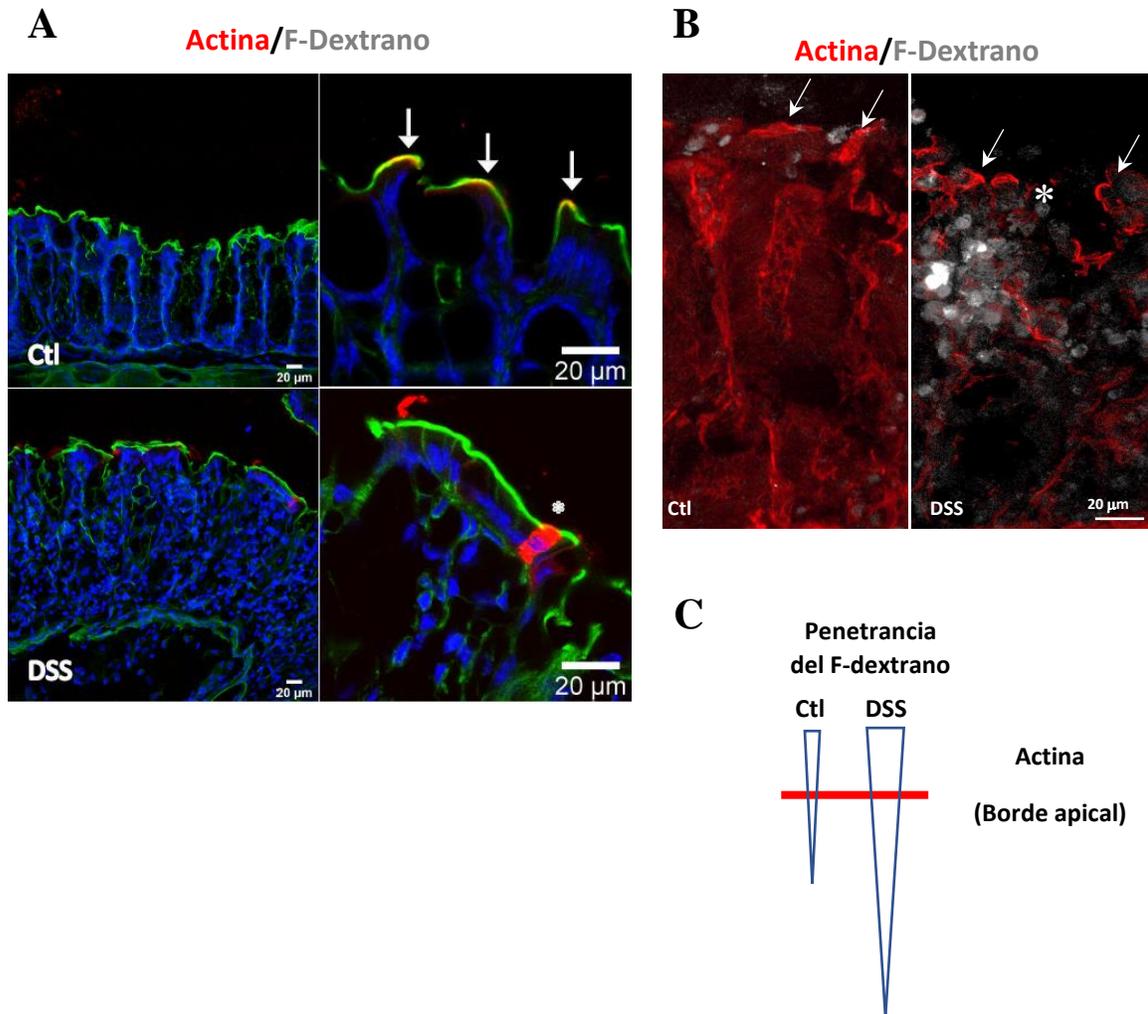


Figura 7. Detección de los sitios con alta permeabilidad en el colon de ratones control y colícticos utilizando dextrano fijable (F-dextrano).

A) Se prepararon sacos intestinales de ratones C57BL/6J tratados con agua o DSS al 2,5% durante 6 días. Los sacos se llenaron con una solución de 4 $\mu\text{g/ml}$ de dextrano Alexa Fluor 647 fijable, 10 kDa. El flujo paracelular pasivo del F-dextrano se detuvo después de 30 min. Se muestran F-dextrano (rojo), faloidina (verde) y núcleos (azul). Las flechas blancas indican la presencia del dextrano en la cara apical y los asteriscos indican el flujo del dextrano a través de la barrera epitelial. Barra de la escala=20 μm .

B) Inmunofluorescencia para actina (rojo) y F-dextrano (blanco) en secciones congeladas de ratones Ctl y colícticos. Las flechas marcan la actina en la superficie apical de las criptas colónicas. El asterisco marca una región con microerosiones, que representa un área con una clara discontinuidad de la actina apical. Esta región identifica una sección donde se pierde la continuidad de la barrera epitelial. Barra de la escala=20 μm .

C) Representación esquemática de la penetrancia del F-dextrano en la mucosa colónica. La superficie del colon está representada por una línea roja, que representa la actina en el borde apical.

Los resultados son la representación de un experimento independiente de una $n=6$

Las regiones de alta permeabilidad marcadas por el F-dextrano en el colon de ratones tratados con DSS correspondieron a áreas enriquecidas con CEIs apoptóticas (asterisco) y de colonocitos extruidos en la superficie de la cripta (anoikis; flecha) o zonas donde la continuidad de la barrera epitelial estaba comprometida (**Figura 8A, cuadrado**). Esto demostró que la apoptosis y la anoikis de los colonocitos comprometen la integridad de la barrera epitelial y, por lo tanto, el F-dextrano se filtra a la submucosa (**Figura 8A y 8E, flechas**). En conjunto, los resultados indican claramente que la apoptosis y la anoikis de los colonocitos superficiales interrumpe la continuidad de la barrera epitelial y aumenta la permeabilidad intestinal indiscriminada.

7.2. La señalización de Rictor/mTORC2/Akt es disminuida en los colonocitos colícticos

La señalización de Akt es bien conocida como una señal antiapoptótica (Downward, 2004). Para que Akt sea activada totalmente requiere ser fosforilada en dos fosfo-residuos, la serina 473 (pAKT⁴⁷³) el cual es blanco de mTORC2 y en la treonina 308 (pAkt³⁰⁸) el cual es fosforilada por PDK1 (Mora et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). Por lo tanto, decidimos evaluar ambos fosfo-residuos en la Akt presente en la mucosa colíctica de ratones tratados con DSS por 3 y 6 días, esto último se decidió con la finalidad de mimetizar diferentes grados de inflamación. Después de la inducción de colitis pAkt⁴⁷³ y pAkt³⁰⁸ rápidamente incrementaron indicando la

activación total de Akt. No hubo cambios en los niveles de Akt total (**Figura 9A**). Posteriormente, se evaluaron dos blancos de Akt activo, la fosforilación de β -catenina en la serina 552 (p β -cat⁵⁵²) (Fang et al., 2007; He et al., 2007) y la fosforilación de GSK3 β en la serina 9 (pGSK3 β ⁹) (Hermida et al., 2017). Los niveles de p β -cat⁵⁵² y pGSK3 β ⁹ se incrementaron en la mucosa colónica de ratones tratados con DSS por 6 días. No hubo cambios en los niveles totales de GSK3 β , pero los niveles de β -cat aumentaron después de 6 días de tratamiento con DSS (**Figura 9A**).

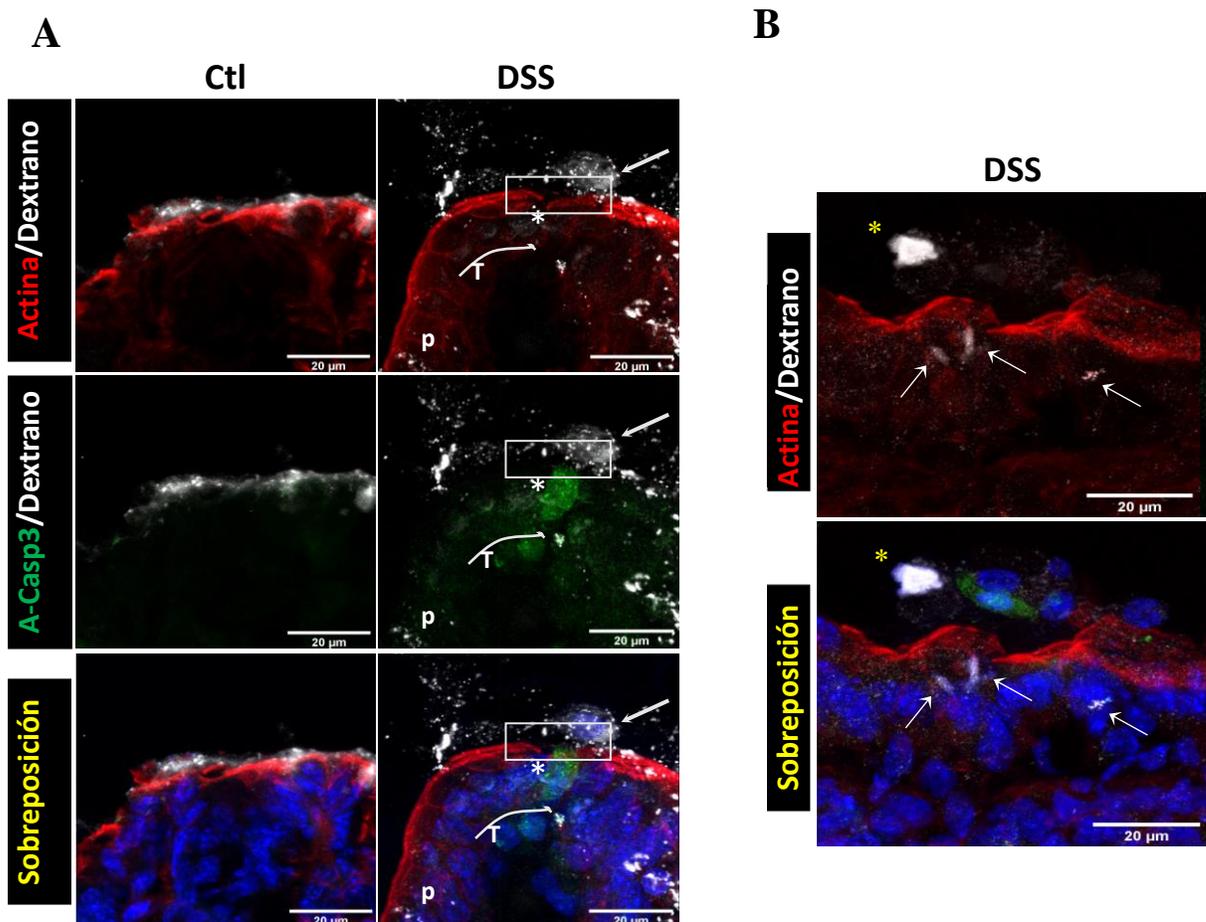


Figura 8. La apoptosis y anoikis contribuyen activamente a la disfunción de la barrera epitelial en la mucosa colítica.

A) Determinación de los focos apoptóticos de la mucosa de ratones control y colíticos. Se muestran F-dextrano (blanco), ACasp-3 (verde), faloidina (rojo) y núcleos (azul). El recuadro blanco identifica el área donde se pierde la continuidad epitelial. Las flechas marcan las células sometidas a anoikis. Los asteriscos marcan a las células apoptóticas/ACasp-3⁺ (verde). Se analizaron un total de 200 criptas de 6 ratones y se muestra una imagen representativa.

B) Inmunofluorescencia de ratones tratados con DSS. Se muestran F-dextrano (blanco), ACasp-3 (verde), faloidina (rojo) y núcleos (azul). Nota: Algunas células sometidas a anoikis son positivas para ACasp-3. Las flechas muestran áreas de flujo paracelular. Los asteriscos indican células desprendidas con dextrano citosólico.

Los resultados son la representación de un experimento independiente de una n=6. Escala de la barra= 20 μ m. p= flujo paracelular de F-dextrano. T= flujo transcelular de F-dextrano.

A continuación, se realizó una IF para determinar la localización de pGSK3 β ⁹ a lo largo del eje de la cripta y así evaluar indirectamente la activación de Akt en ratones control y colíticos. La tinción contra pGSK3 β ⁹ reveló que los ratones tratados con DSS incrementan la señalización de Akt en células epiteliales y células no epiteliales (**Figura 9B**). Sin embargo, la señal de pGSK3 β ⁹, cualitativamente fue más intensa en CEI y predominantemente en la superficie de los colonocitos, el mismo compartimento celular donde fue llevado la apoptosis celular (**Figura 9B**).

Una vez activado Akt fosforila a Bad (pBad¹³⁶) para inhibir el daño mitocondrial y la subsecuente activación de caspasa-3 (Datta et al., 1997). Por lo anterior, la pBad¹³⁶ y la Acasp-3 fueron evaluados en la mucosa colónica de ratones control y tratados con DSS. Después de 6 días de inducción de colitis la pBad¹³⁶ se reduce claramente y la Acasp-3 incrementa. No se detectaron cambios en los niveles totales de Bad (**Figura 9A**).

Debido a que nuestros resultados no fueron concluyentes, se realizó una evaluación similar pero ahora solo en criptas aisladas de colon (fracción enriquecida en colonocitos) recolectadas de ratones control y colíticos. Como se muestra en la **figura 9C**, pAkt⁴⁷³ y pAkt³⁰⁸ aumentaron de forma robusta en las criptas colónicas de ratones tratados con DSS durante 3 días. Sin embargo, se detectó una reducción significativa en pAkt⁴⁷³ en las criptas colónicas de ratones tratados con DSS durante 6 días en comparación con las criptas recolectadas de ratones tratados por 3 días. Por el contrario, los niveles de pAkt³⁰⁸ fueron similares en las criptas de ratones colíticos tratados

con DSS por 3 y 6 días. Los niveles de pAkt⁴⁷³ fueron similares en la mucosa colónica de ratones tratados con DSS por 3 y 6 días (**Figure 9A y figura 9C**) indicando que las fluctuaciones en pAkt⁴⁷³ fueron específicamente para los colonocitos. En estas muestras, los niveles de pGSK3β⁹ y pBad¹¹² aumentaron después de 3 días de tratamiento con DSS y fueron reducidos en el día 6. En contraste, los niveles de pβ-cat⁵⁵² permanecieron elevados durante el curso completo del experimento. No existieron cambios en ninguna condición de las proteínas totales de GSK3β, β-catenina y Bad (Figura 2C). Sin embargo, la Acasp-3 es incrementada en colonocitos después del tratamiento con DSS por 6 días (**Figura 9D**).

En colonocitos aislados, los niveles de pAkt⁴⁷³ se correlacionan con el estado de fosforilación de pGSK3β⁹ y pBad¹¹², y su presencia es inversamente proporcional al proceso apoptótico detectado en estas células (Guertin et al., 2006; Saxton & Sabatini, 2017). Por lo tanto, evaluamos la presencia de mTOR y rictor, los componentes centrales de mTORC2 el cual es el responsable de la fosforilación de Akt. Como se muestra en la **figura 9A y 9D**, mTOR no se altera en la mucosa colónica de ratones colíticos, aunque aumenta en las criptas colónicas de ratones tratados con DSS. La molécula Rictor aumentó en la mucosa colítica y mostró un efecto bifásico en criptas aisladas. La molécula aumentó claramente después de 3 días de tratamiento y después de 6 días su presencia disminuyó a niveles basales. A diferencia de rictor, la proteína asociada a la regulación de mTORC1 (Raptor), un componente principal de mTORC1, aumentó de manera constante en la mucosa y en las criptas colónicas de los ratones tratados con DSS.

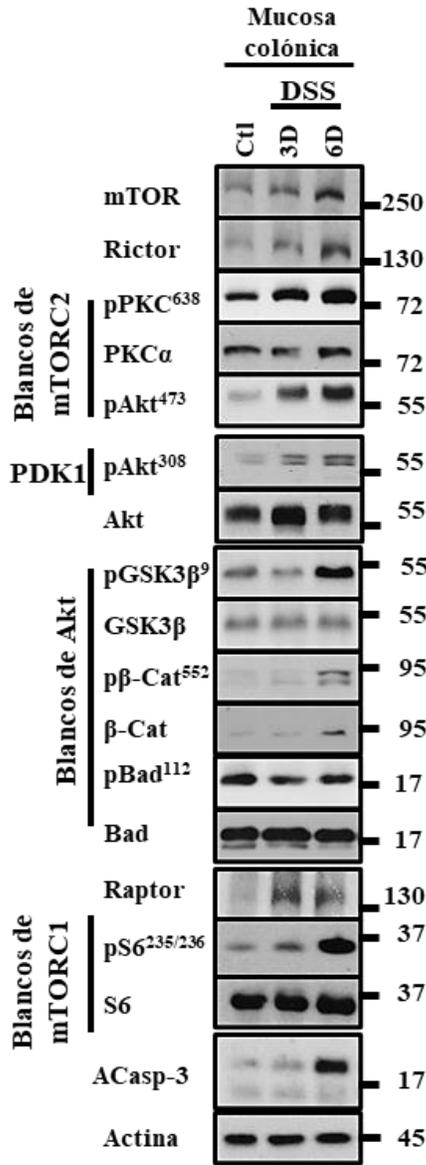
Para evaluar aún más la activación de mTORC2 y mTORC1, se evaluó la fosforilación de PKCα⁶³⁸ (pPKC⁶³⁸) y la proteína ribosómica S6 (pS6^{235/236}) (Guertin et al., 2006). Como se muestra en la **figura 9A**, después del tratamiento con DSS, pPKC⁶³⁸ aumentó de manera constante en la mucosa colítica pero, en criptas aisladas, pPKC⁶³⁸ mostró un efecto bifásico similar a lo observado para rictor y pAkt⁴⁷³, la proteína fosforilada aumentó después de 3 días de tratamiento con DSS y se redujo en el día 6 (**Figura 9D**). Por el contrario, el blanco río abajo de mTORC1, pS6^{235/236} aumentó constantemente en la mucosa colónica y en las criptas colónicas después del tratamiento con DSS (**Figura 9A y 9B**). Los niveles totales de PKC y S6 permanecieron constantes en todas las condiciones. En conjunto, estos resultados sugieren que la señalización antiapoptótica mediada por el eje rictor/mTORC2/Akt exhibe una activación

temporal en los colonocitos colícticos, pero en contraste, las vías de señalización de mTORC1 y PDK1 se activan de manera constante.

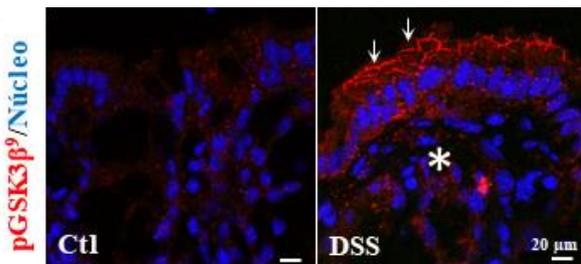
7.3. La ablación de rictor inactiva la señalización de mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.

La ausencia de inhibidores comerciales para rictor o componentes de mTORC2 limitan un análisis funcional completo de la señalización de mTORC2/Akt en poblaciones de células y/o tejidos específicos. Por lo tanto, para investigar si la señalización de mTORC2/Akt regula la supervivencia celular en los colonocitos, *Rictor* fue eliminado en las CEI. Para ello, se cruzaron ratones que tenían dos sitios FloxP flanqueando al gen *Rictor* con animales que expresaban la recombinasa Cre bajo el control del promotor de vilina (Vil1-cre)(el Marjou et al., 2004) (**Figura 10A**). La cepa parental y los ratones *Rictor*^{ΔIEC} mostraron niveles similares de rictor en toda la mucosa colónica total, pero rictor estuvo ausente en muestras de criptas colónicas purificadas (colonocitos) obtenidas de animales *Rictor*^{ΔIEC} (**Figura 10B y C**). Además, en IEC que carece de rictor, los niveles de proteína mTOR se mantuvieron estables mientras que los niveles de raptor incrementaron (**Figura 10C**).

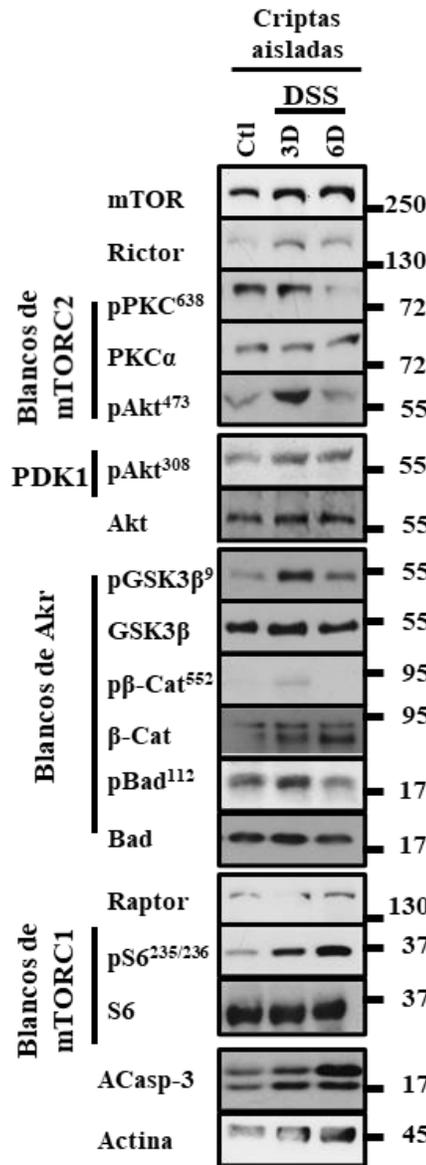
A



B



D



C

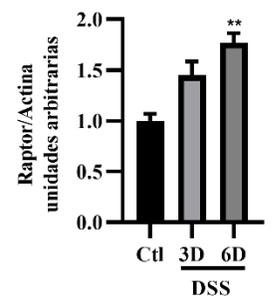
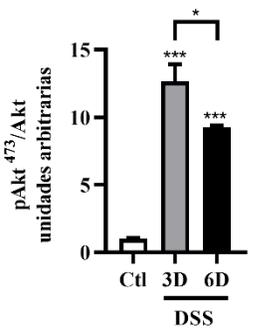
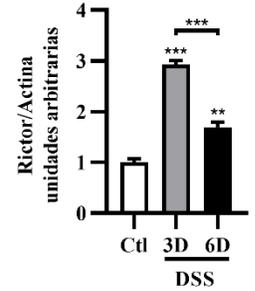
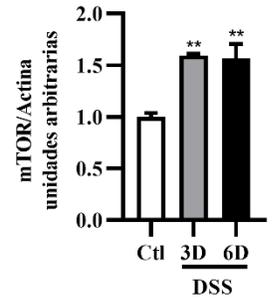
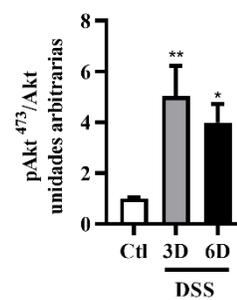


Figure 9. Señalización de rictor/mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.

A) Determinación por western blot de mTOR, rictor, proteína cinasa fosforilada C (pPKC)⁶³⁸, proteína cinasa C (PKC) α , Akt fosforilada (pAkt)⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, Akt, glucógeno sintasa cinasa fosforilada (pGSK)-3 β ⁹, glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3 β , β -catenina fosforilada (p β -Cat)⁵⁵², β -catenina (β -Cat), Bad fosforilada (pBad)¹³⁶, Bad, raptor, pS6^{235/236}, S6 y caspasa 3 activa (ACasp-3) en lisados de la mucosa colónica de animales tratados con dextrano sulfato sódico (DSS) y control (Ctl). El tratamiento con 2,5% de DSS se realizó durante 3 y 6 días. La actina fue empleada como control de carga.

B) Inmunofluorescencia de pGSK-3 β ⁹ (rojo) en criosecciones colónicas de ratones de control y colícticos. El tratamiento con DSS se realizó durante 6 días. Núcleos= azul. Las flechas marcan la célula epitelial de la superficie celular positivas para pGSK-3 β ⁹. El asterisco indica células no epiteliales positivas para pGSK-3 β ⁹.

C) El gráfico muestra los valores densitométricos para pAkt⁴⁷³/Akt. La actina fue empleada como control de carga.

D) Determinación por western blot de mTOR, rictor, pPKC⁶³⁸, PKC α , pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, Akt, pGSK-3 β ⁹, GSK-3 β , p β -Cat⁵⁵², β -Cat, pBad¹³⁶, Bad, raptor, pS6^{235/236}, S6 y ACasp-3 en lisados de criptas aisladas obtenidas de animales control y tratados con DSS. El tratamiento con 2,5% de DSS se realizó durante 3 y 6 días. Los gráficos mostrados muestran valores densitométricos para mTOR, rictor, pAkt⁴⁷³/Akt y raptor. La actina fue empleada como control de carga.

Los valores de p se calcularon utilizando un análisis de varianza de una sola vía con la prueba post hoc de Tukey (C, D). Los datos se muestran la SEM (C, D). n=6. * P <0,05, ** P <0,01 y *** P <0,001. Barra de escala= 20 μ m (B).

A continuación, se analizó el estado de fosforilación de pPKC⁶³⁸, pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, p β -cat⁵⁵², pGSK3 β ⁹, pBad¹³⁶ y pS6^{235/236} en criptas aisladas obtenidas de ratones Wt y Rictor ^{Δ IEC} inducidos a colitis durante 3 días. El tratamiento con DSS aumentó los niveles de pPKC⁶³⁸, pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, p β -cat⁵⁵², pGSK3 β ⁹, pBad¹³⁶ y pS6^{235/236} en colonocitos de ratones Wt. En los colonocitos que carecen de rictor, el tratamiento con DSS no logró estimular la fosforilación de pAkt⁴⁷³ y p β -cat⁵⁵², y la presencia de pAkt³⁰⁸, pGSK3 β ⁹, pBad¹³⁶ y pS6^{235/236} se redujo claramente (**Figura 11 A, B**). No se indujeron cambios en Akt, β -catenina, GSK3 β , Bad y S6 en colonocitos de ratones Wt y Rictor ^{Δ IEC} tratados con DSS (**Figura 11A**).

A

B6.Cg-Tg(Vil1-cre)997Gum/J STOCK *Ptprc^b Thy1^a Rictor^{tm1.1Klg}/SjmJ*

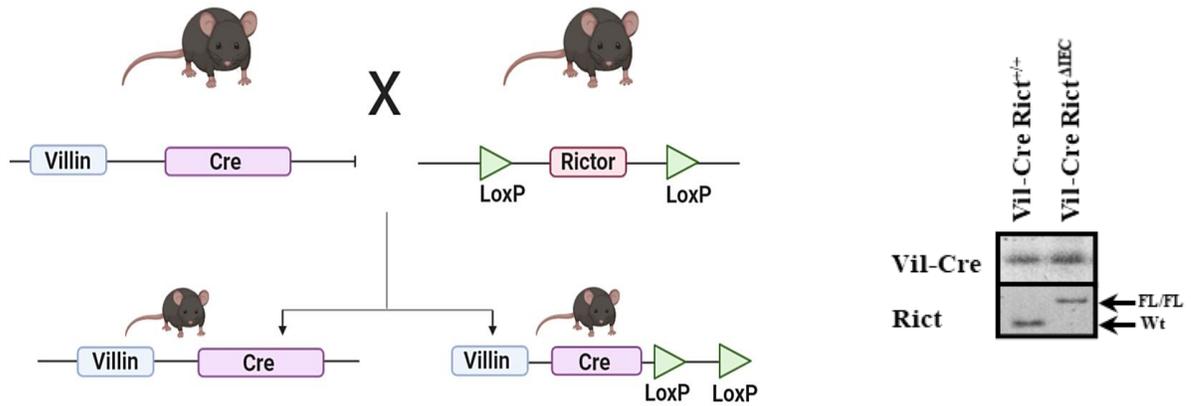
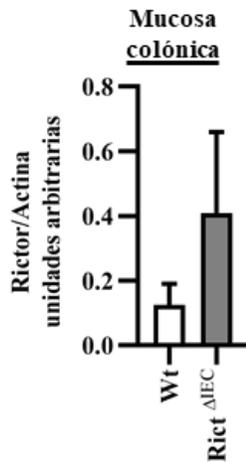
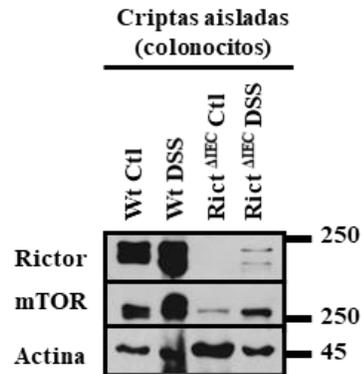
**B****C**

Figura 10. Generación del ratón KO de rictor en células epiteliales intestinales.

A) Representación esquemática de la delección específica de Rictor en células epiteliales intestinales (CEIs) utilizando ratones villin-Cre^{ER} y Rictor^{F/F}. Se muestra una imagen representativa de la genotipificación (PCR).

B) Análisis densitométrico del Western blot de Rictor en la mucosa colónica de ratones de tipo salvaje (Wt) o *Rictor^{ΔIEC}*.

C) Western blot de Rictor, raptor y mTOR en colonocitos (criptas aisladas) recolectados de ratones Wt o *Rictor^{ΔIEC}* tratados con agua sola [control (Ctl)] o dextrano sulfato sódico (DSS). Actina se utilizó como control de carga.

Los valores de p se calcularon mediante una t-test (B). Los datos se muestran como la SEM.

Es de destacar que, en la condición control, los niveles de pAkt³⁰⁸, pGSK3β⁹, pBad¹³⁶ y pS6^{235/236} estaban elevados en los colonocitos de ratones Rictor^{ΔIEC} en comparación con los colonocitos Wt. Sin embargo, los niveles de pAkt⁴⁷³ y pβ-cat⁵⁵² fueron comparables en los colonocitos de ambas cepas. Curiosamente, pPKC⁶³⁸ estaba ausente en los colonocitos deficientes en rictor y la PKC total se redujo en gran medida. Además, al exponer colonocitos a DSS, disminuyó aún más la PKC total y no se logró estimular la fosforilación de la molécula (**Figura 11A**). La tinción de inmunofluorescencia para pAkt⁴⁷³ reveló que se expresa a lo largo del eje de la cripta y está fuertemente enriquecido en colonocitos de superficie de ratones Wt. Sin embargo, después de la ablación con Rictor, pAkt⁴⁷³ se reduce en los colonocitos en general y especialmente en las células que miran hacia la luz intestinal (**Figura 11C**). Los resultados demuestran que la ablación de Rictor inactiva con éxito la señalización de mTORC2/Akt en colonocitos colícticos, pero en condiciones de control, la ausencia de la molécula regula al alza la señalización de pAkt³⁰⁸ y mTORC1.

7.4. La señalización de rictor/mTORC2 previene la apoptosis y anoikis en los colonocitos superficiales.

A continuación, se evaluó la apoptosis en la mucosa colónica de ratones Wt y Rictor^{ΔIEC}. Como se muestra por la presencia de ACasp-3, los colonocitos de los ratones Rictor^{ΔIEC} eran propensos a sufrir apoptosis en condiciones control y colícticas (**Figura 12A-C**). Curiosamente, el proceso apoptótico aumentó dramáticamente en colonocitos en la superficie de la cripta (**Figura 12D**) donde las CEIs entraron en apoptosis (asterisco) y anoikis (Flechas). Está bien establecido que Akt también regula la proliferación en las células epiteliales (Degan & Gelman, 2021; Yu & Cui, 2016) por lo que se evaluó la proliferación mediante la tinción de PCNA. Como se muestra en las **figuras 12E-F** en condiciones de control, PCNA se incrementó marginalmente en CEIs de ratones Rictor^{ΔIEC}. Sin embargo, el pequeño aumento no fue estadísticamente significativo. Además, después de la inducción de colitis, los niveles de PCNA se redujeron en un grado similar en ambas cepas (**figura 12G**), lo que sugiere un papel limitado del rictor en el proceso de proliferación de colonocitos colícticos.

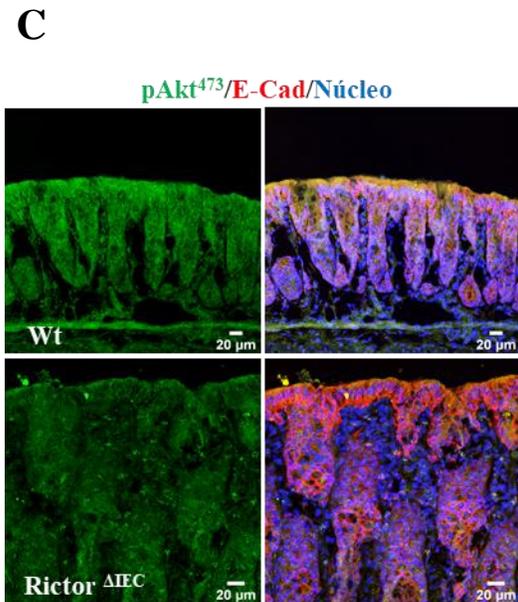
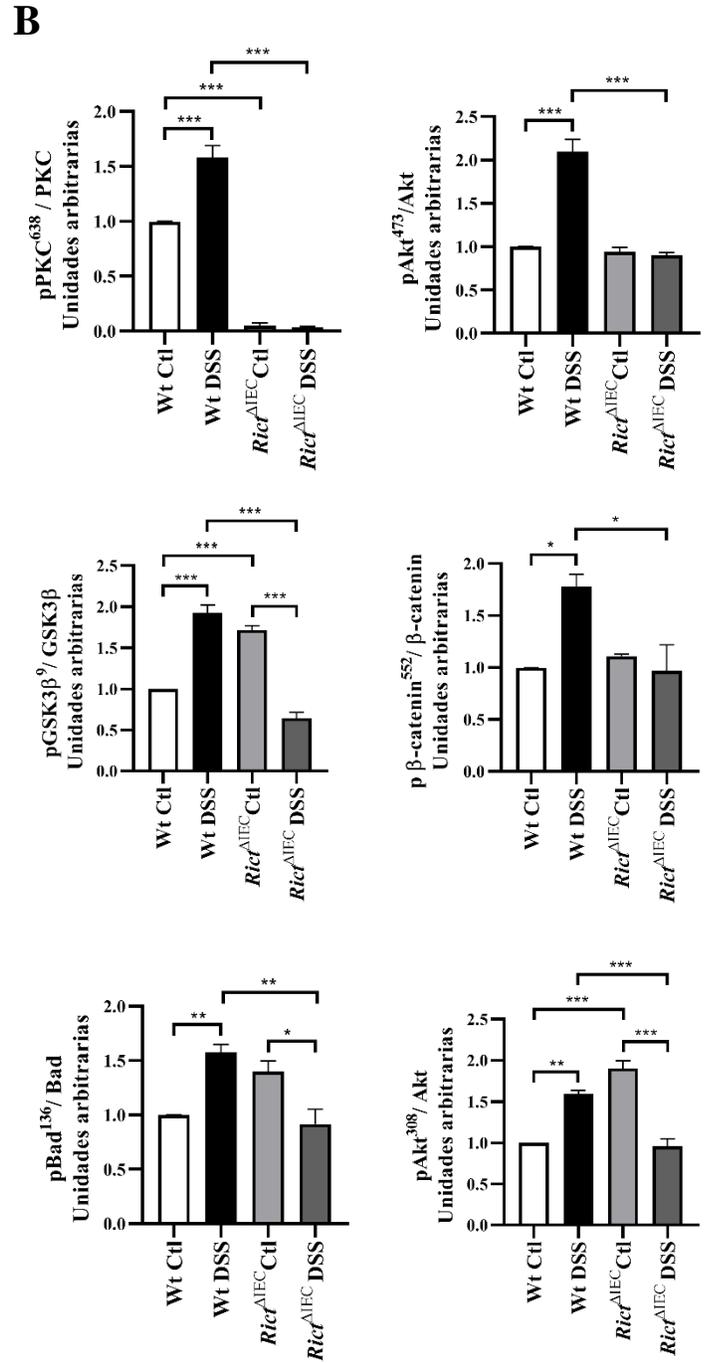
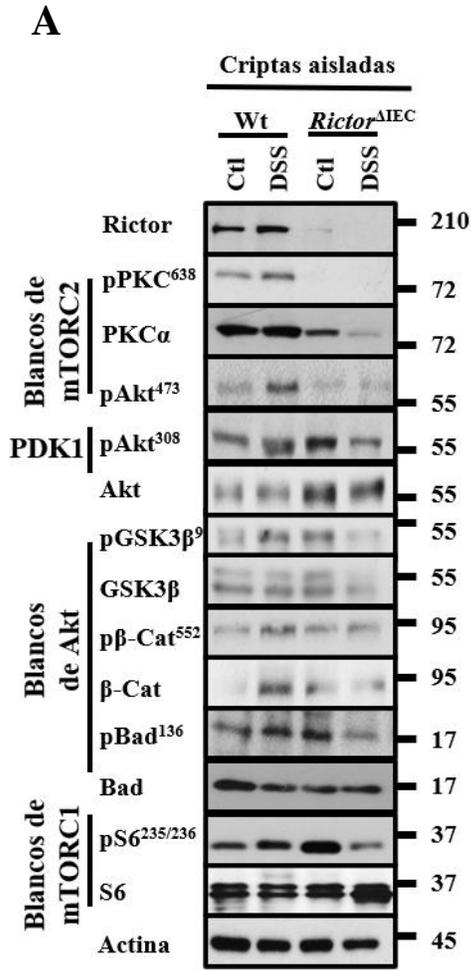


Figura 11. La eliminación de rictor inactiva la señalización de mTORC2/Akt en colonocitos colícticos.

A) Determinación por western blot de mTOR, rictor, pPKC⁶³⁸, PKC α , pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, Akt, pGSK-3 β ⁹, GSK-3 β , p β -Cat⁵⁵², β -Cat, pBad¹³⁶, Bad, raptor, pS6^{235/236}, S6 y ACasp-3 en criptas aisladas obtenidas de ratones Wt o *Rictor* ^{Δ IEC}. El tratamiento con DSS se realizó durante 3 días debido a que la señalización de rictor/mTORC2/Akt aumenta en los IEC de peso (**Figura 9D**). Se utilizaron como controles Rictor y actina.

B) Análisis densitométrico de pPKC⁶³⁸, pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, pGSK-3 β ⁹, p β - pBad¹³⁶ de la **figura A**. Los valores relativos se normalizaron con actina.

C) Inmunofluorescencia para pAkt⁴⁷³ en el colon de ratones Wt y *Rictor* ^{Δ IEC}. Se muestran pAkt⁴⁷³ (verde), E-cadherina (rojo)A y núcleos (azul)

Los valores de p se calcularon utilizando un análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey (B). Los datos se muestran como la SEM (A). n=6. * P <0,05, ** P <0,01 y *** P <0,001. Barra de escala= 20 μ m.

7.5. La señalización de rictor/mTORC2 regula negativamente la apoptosis e incrementa la proliferación en enteroides.

Para corroborar los hallazgos anteriores se evaluó la presencia de pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, pS6^{235/236}, PCNA y ACasp-3 en un modelo in vitro. Para tal fin, se cultivaron enteroides a partir de células madre intestinales recolectadas de Wt y *Rictor* ^{Δ IEC}. De manera similar a lo observado en las criptas colónicas aisladas, las CEIs que carecen de rictor mostraron niveles bajos de pAkt⁴⁷³, pero en contraste, pAkt³⁰⁸ y pS6^{235/236} estaban claramente aumentados (**Figura 13A**). No se detectaron cambios en los niveles totales de Akt y S6. En enteroides que carecen de rictor, ACasp-3 y PCNA estaban aumentados y debido a este fenotipo, los enteroides deficientes en rictor eran viables, aunque más pequeños (**Figura 13A-C**). La tinción por inmunofluorescencia reveló que en ausencia de rictor, la apoptosis era un proceso aleatorio que se producía en todo el enteroide (**Figura 13D**). Por tanto, en conjunto estos resultados sugieren fuertemente que la señalización de rictor/mTORC2 regula negativamente la apoptosis y la proliferación en enteroides.

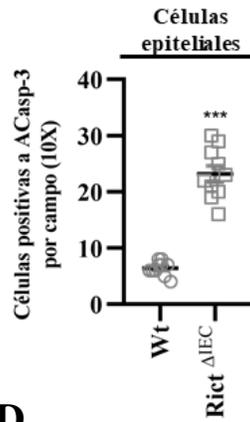
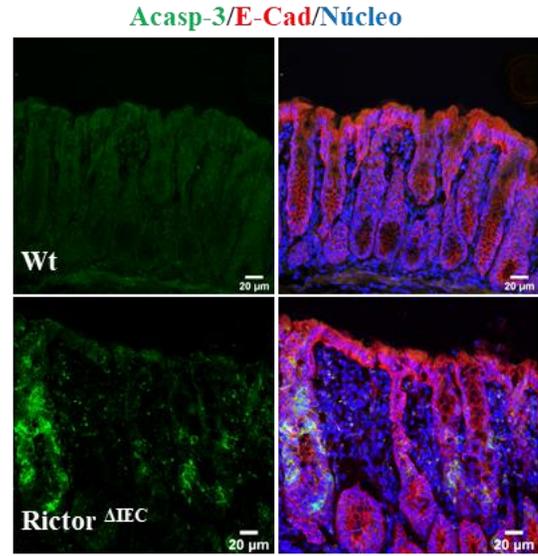
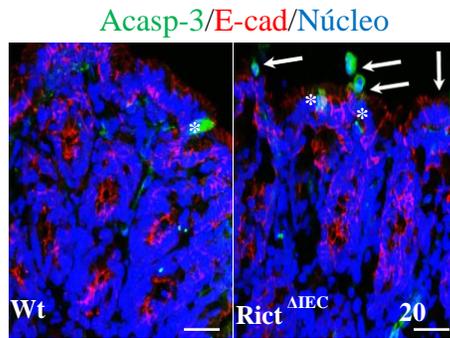
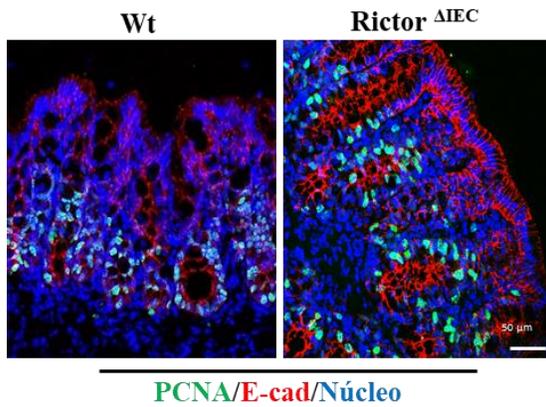
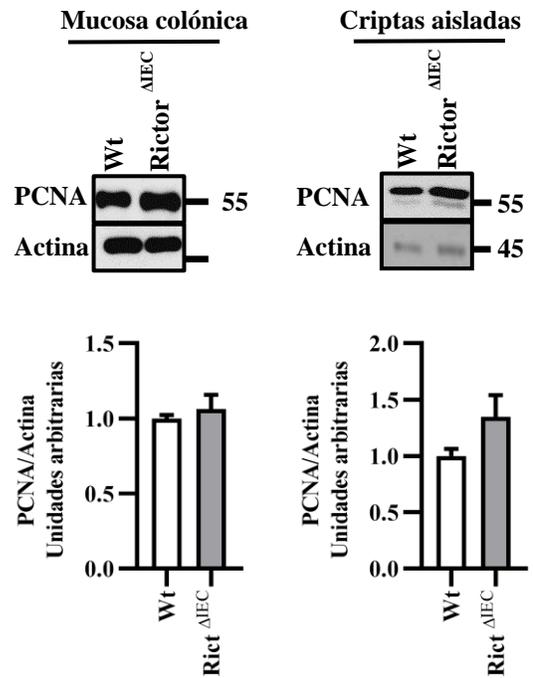
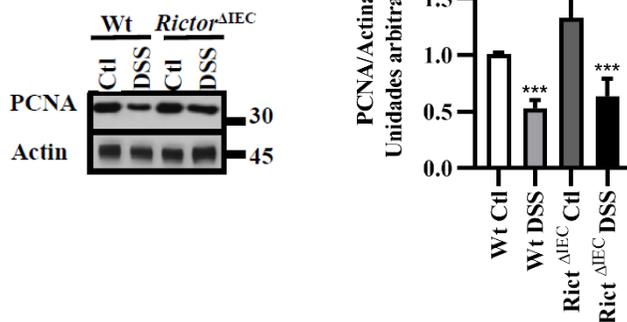
A**B****C****D****E****F****G**

Figura 12. La señalización de Rictor/mTORC2/Akt previene la apoptosis y anoikis en los colonocitos superficiales.

A) Se evaluaron células de caspasa 3 activa (ACasp-3) en la mucosa colónica de ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. El gráfico muestra el número de CEIs de ACasp-3 positivos por campo de gran aumento (10x).

B) Western blot de ACasp-3 en criptas colónicas aisladas de ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. El tratamiento con DSS se realizó durante 3 días. Se utilizó actina como control de carga.

C) Inmunofluorescencia para ACasp-3 en el colon de ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. ACasp-3 es verde; Ecadherin, rojo; y núcleos, azul.

D) Inmunofluorescencia de ACasp-3 en la mucosa colónica de ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. ACasp-3 es verde; E-cadherina, roja; y núcleos, azul. Los asteriscos indican colonocitos positivos para ACasp-3 que experimentan apoptosis. Las flechas blancas indican colonocitos ACasp-3⁺ sometidos a anoikis.

E) Inmunofluorescencia de antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en el colon de ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. PCNA es verde; E-cadherina, roja; y núcleos, azul.

F) Western blot de PCNA en la mucosa colónica y en criptas aisladas recogidas de ratones Wt o *Rictor^{ΔIEC}*. Se utilizó actina como control de carga (Ctl). El gráfico muestra los valores densitométricos de PCNA.

G) Western blot de PCNA en lisados celulares de ratones Wt o *Rictor^{ΔIEC}* de control y colíticos. El tratamiento con DSS se realizó durante 6 días. Se utilizó actina como control de carga. El gráfico muestra los valores densitométricos de PCNA.

Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de dos muestras de Kolmogorov-Smirnov (A), prueba t (E) y análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey. Los datos se muestran como la SEM. n=6. *** P <0,001. Escala = 20 μm (C-E).

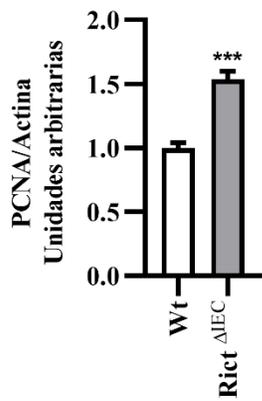
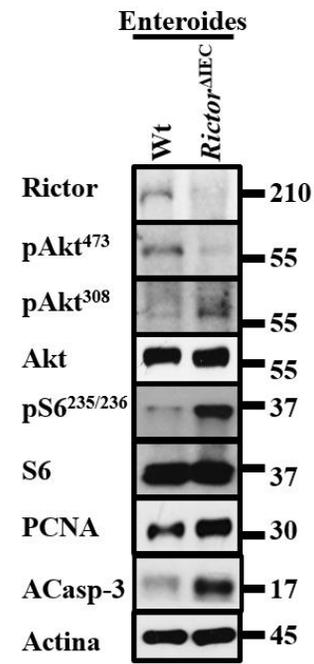
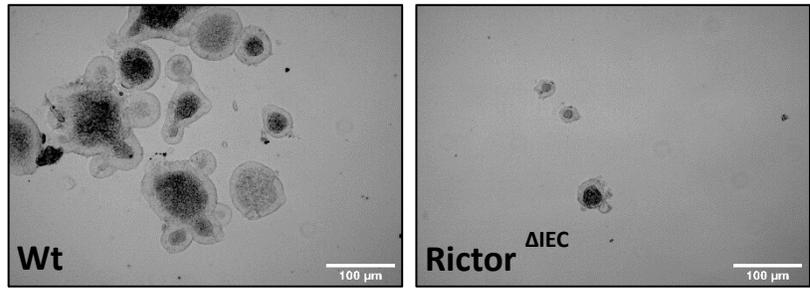
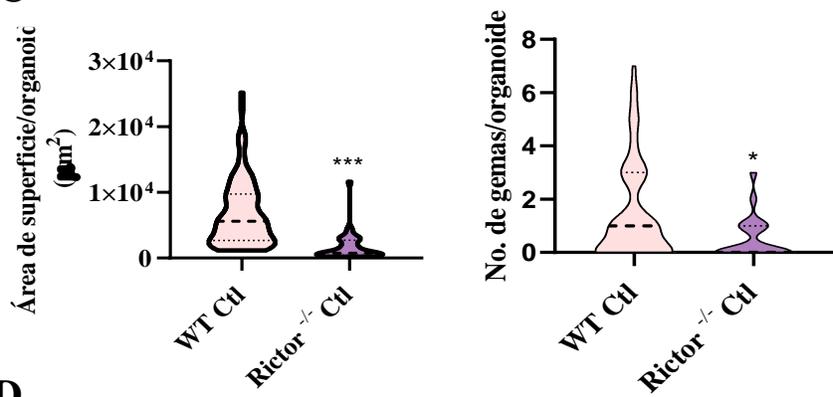
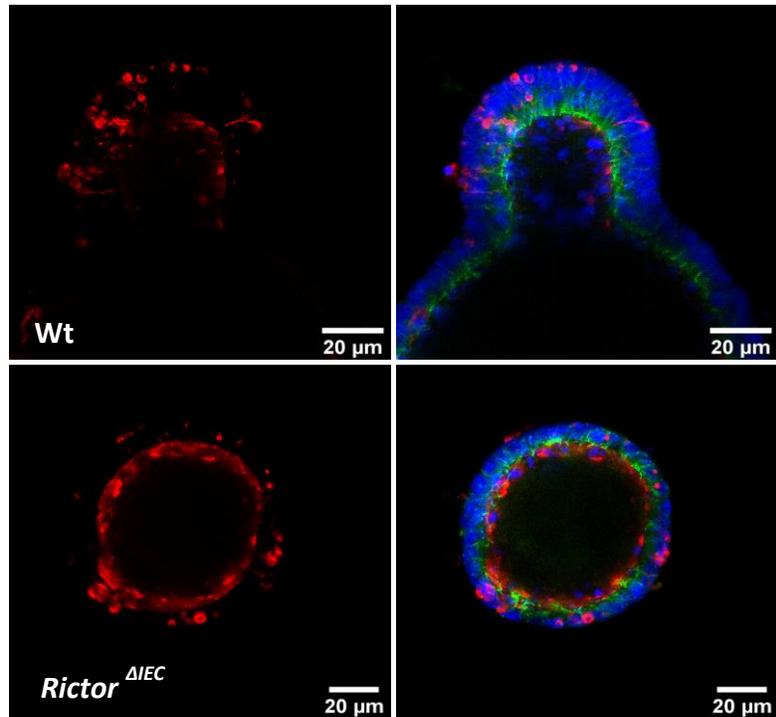
A**B****C****D**

Figura 13. La señalización de rictor/mTORC2 regula negativamente la apoptosis e incrementa la proliferación en enteroides.

A) Determinación por western blot de rictor, pAkt⁴⁷³, pAkt³⁰⁸, Akt, pS6^{235/236}, S6 y ACasp-3 en enteroides Wt o *Rictor*^{ΔIEC}. El gráfico muestra el análisis densitométrico de PCNA. Se utilizó actina como control de carga.

B) Micrografías de enteroides deficientes en Wt y Rictor cultivados durante 5 días.

C) Análisis del área y número de gemas en los organoides Wt o *Rictor*^{ΔIE}. Se analizaron al menos 60 organoides por condición de 3 experimentos independientes.

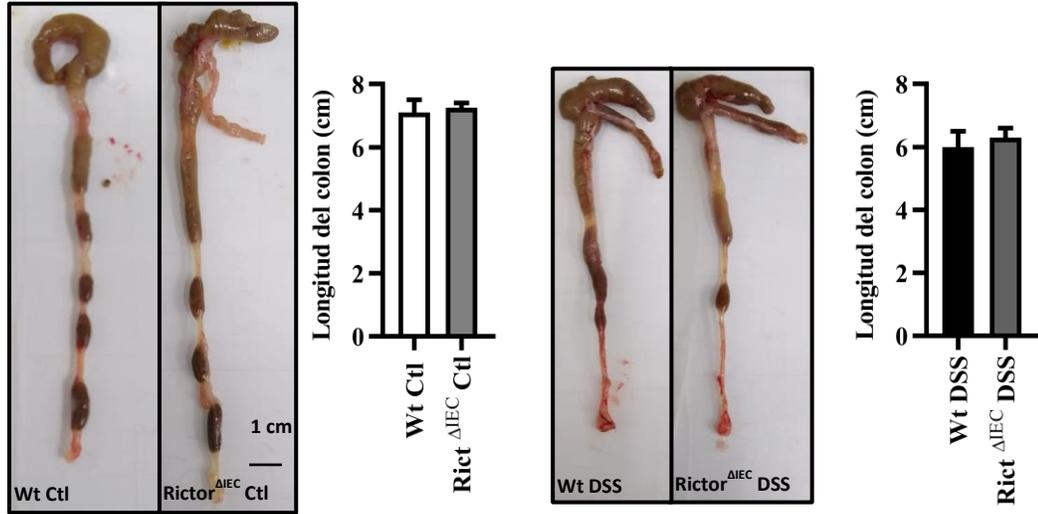
D) Inmunofluorescencia para ACasp-3 y Ecadherin (E-Cad) en enteroides Wt o deficientes Rictor. Se muestra ACasp-3 (rojo), E-cadherin (verde) y núcleos (azul). Se evaluaron muestras de al menos cuatro experimentos diferentes y se muestra una imagen representativa.

Los valores de p se calcularon utilizando la prueba t (A) o una prueba de Mann-Whitney (C). Los datos se muestran como la SEM. n=6. *** P <0,001. Escala = 100 μm (B), 20 μm (D).

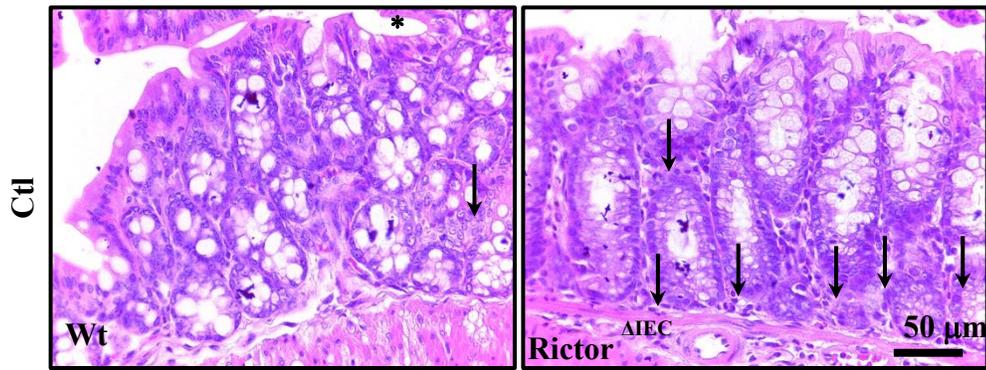
7.6. La señalización mTORC2/Rictor atenúa la inflamación colónica.

Para obtener información relevante sobre las implicaciones patofisiológicas de la pérdida de señalización de rictor/mTORC2 en las CEI, se evaluó a detalle la mucosa colónica de los ratones *Rictor*^{ΔIEC}. En la mucosa colónica de los ratones *Rictor*^{ΔIEC} no hubo cambios en la longitud del colon tanto en condiciones Ctl como DSS al compararse con el WT (**Figura 14A**). Además, se conservó la citoarquitectura de las criptas intestinales (**figura 14B**). Sin embargo, se detectó una infiltración de células inflamatorias que abarcó principalmente un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares en el colon de ratones *Rictor*^{ΔIEC} (**Figura 14B, Flechas**) que desencadenó un proceso inflamatorio leve como se muestra en la puntuación histológica (**Figura 14C y 14D**). Ni el infiltrado de células inflamatorias ni la puntuación histológica fueron estadísticamente significativos en condiciones Ctl.

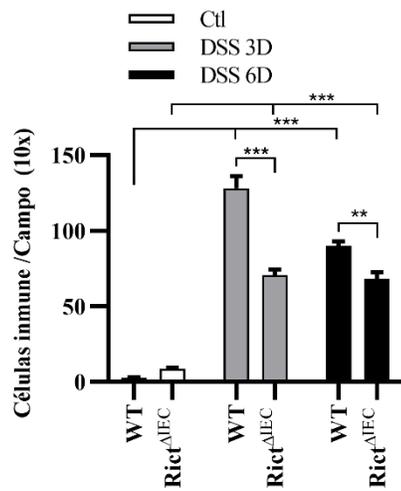
A



B



C



D

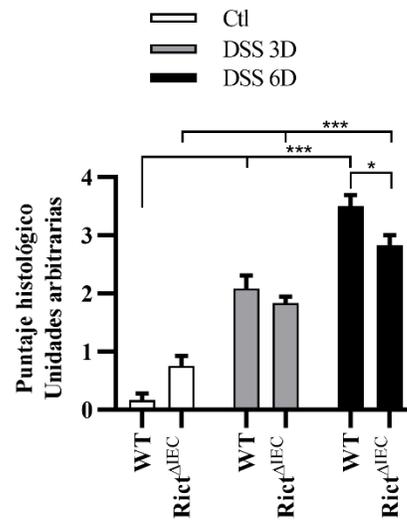


Figura 14. La señalización de rictor/mTORC2 atenúa la inflamación en la mucosa colónica.

A) Imagen representativa del colon extraído de ratones de tipo salvaje (Wt) y *Rictor^{ΔIE}* en condiciones de control (Ctl) y colíticas. El tratamiento con dextrano sulfato sódico (DSS) se realizó durante 3 días (3D). El gráfico muestra la longitud del colon en centímetros.

B) tinción con hematoxilina y eosina de la mucosa colónica de ratones de tipo salvaje (Wt) y *Rictor^{ΔIE}*. Las flechas negras marcan infiltrados de leucocitos polimorfonucleares. Los asteriscos indican las células epiteliales que recubren la luz intestinal.

C) Se cuantificó la infiltración de células inmunitarias en la mucosa colónica en ratones Wt o *Rictor^{ΔIE}* tratados con agua [control (Ctl)] o dextrano sulfato sódico al 2,5% (DSS) durante 3 y 6 días.

D) puntuación histológica del tejido colónico recogido de ratones Wt y *Rictor^{ΔIE}* tratados con agua (Ctl) o DSS al 2,5% durante 3 y 6 días. La puntuación de histología se expresa en unidades arbitrarias.

Los valores de p se calcularon utilizando un análisis de varianza de dos vías con la prueba post hoc de Sidak (C y D). Los datos se muestran como la SEM. n=6. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001. Escala = 50 μm (B).

Además, en la mucosa colónica de ratones *Rictor^{ΔIEC}* aumentó el número de CEIs (asteriscos) y células no epiteliales (flechas) ACasp-3⁺ (**figura 15A**). En consecuencia, la permeabilidad de FITC-Dextran aumentó en el colon de ratones *Rictor^{ΔIEC}* (**Figura 15B**). Sin embargo, el flujo de FITC-Dextran no se alteró después de 6 días de inducción de colitis, cuando la apoptosis aumentó en colonocitos Wt (**Figura 8**) y las diferencias en el flujo pasivo de FITC-Dextran entre ratones *Rictor^{ΔIEC}* y Wt desaparecieron (**Figura 15C**). Los resultados corroboran que la señalización rictor/mTORC2 regula la permeabilidad intestinal de moléculas pequeñas al prevenir la apoptosis en CEIs.

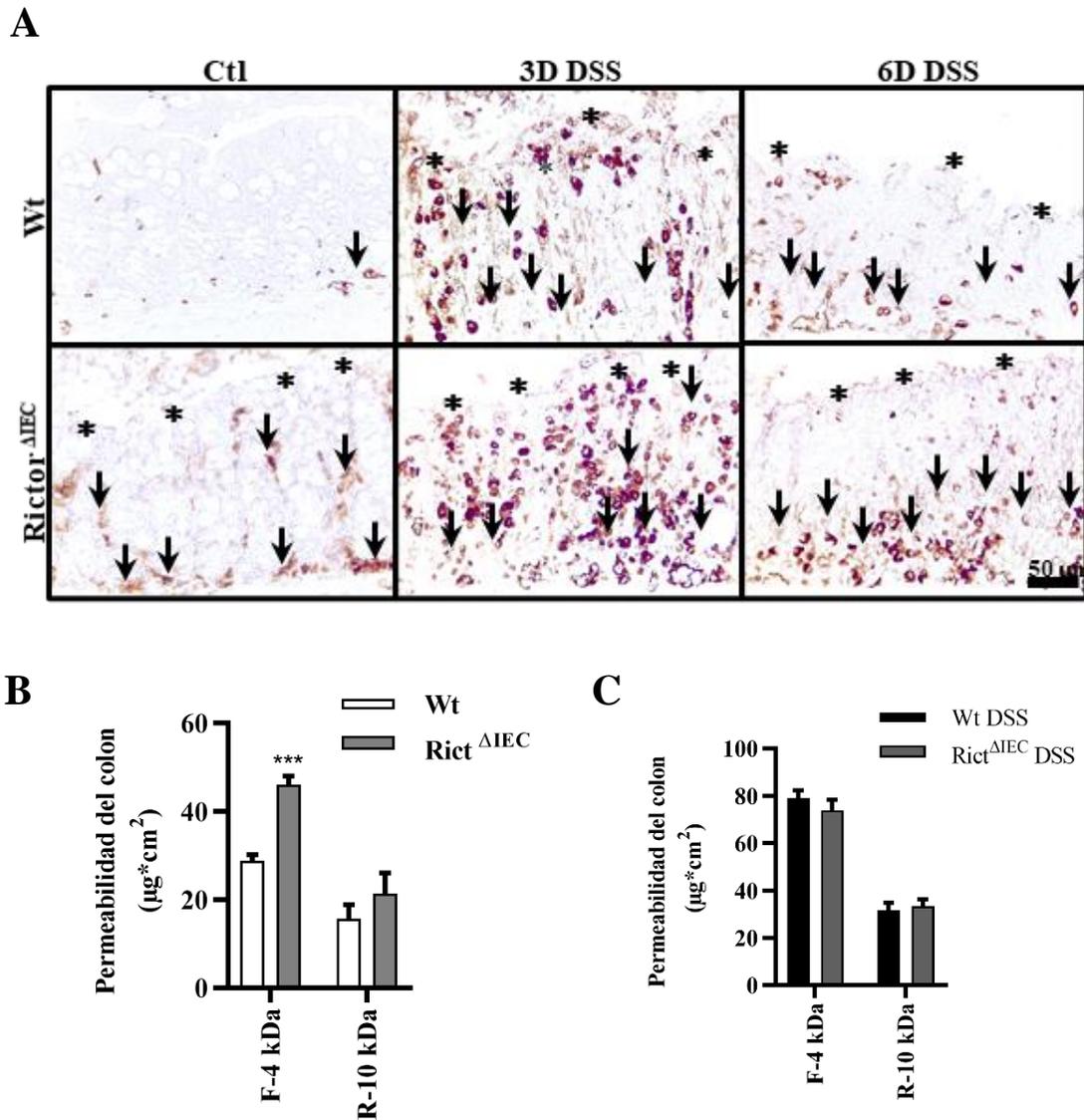


Figura 15. La señalización de rictor/mTORC2 atenúa la permeabilidad y muerte de las células epiteliales.

A) Se evaluó la caspasa 3 activa mediante inmunohistoquímica en secciones incluidas en parafina de la mucosa colónica de ratones Wt o *Rictor^{ΔIEC}*. El tratamiento con DSS se realizó durante 3 y 6 días. Las flechas negras indican grupos celulares que abarcan células no epiteliales. Los asteriscos marcan las células epiteliales intestinales apoptóticas en la superficie de la cripta.

B) Se evaluó la permeabilidad intestinal en el colon de ratones Wt o *Rictor^{ΔIEC}*. Los sacos colónicos se cargaron con una solución de isotiocianatodextrano de fluoresceína, peso molecular, 4 kDa (FD-4) e isotiocianatodextrano de rodamina B, peso molecular, 10 kDa (RD-10) y se midió el flujo neto de dextrano durante 60 minutos.

C) Permeabilidad intestinal en el colon de ratones Wt o *Rictor^{ΔIE}* tras la inducción de colitis. El tratamiento con DSS se realizó durante 6 días (6D). Los sacos se cargaron con isotiocianatodextrano de fluoresceína, peso molecular, 4 kDa (FD-4) e isotiocianatodextrano de rodamina B, peso molecular, 10 kDa (RD 10), y se midió el flujo neto de dextrano durante 60 minutos.

Los valores de p se calcularon utilizando un análisis de varianza de dos vías con la prueba post hoc de Sidak (B y C). Los datos se muestran como la SEM. n=6. *** P <0,001. Escala = 50 μm (A).

7.7. La señalización de rictor/mTORC2 afecta mínimamente el desarrollo/establecimiento de colitis.

Posteriormente, se analizó el desarrollo de la colitis inducida por DSS en ratones Wt y *Rictor^{ΔIEC}*. Como se esperaba, el tratamiento con DSS aumentó el índice de actividad de la enfermedad (DAI), la formación de úlceras, la apoptosis, la puntuación histológica, la infiltración de células inmunes (infiltrado de leucocitos polimorfonucleares) y dio como resultado un acortamiento de la longitud del colon en ambas cepas. Sin embargo, los ratones *Rictor^{ΔIEC}* mostraron un aumento estadísticamente significativo en el DAI a los 1 y 2 días de tratamiento con DSS y al día 3 el DAI fue similar entre ambas cepas (**Figura 16A**). Además, en el día 3 del tratamiento con DSS, el infiltrado de células inmunitarias en la mucosa colítica de los ratones Wt aumentó considerablemente, pero el número de esas células disminuyó ligeramente el día 6. En contraste, en la mucosa colítica de los ratones *Rictor^{ΔIEC}*, el infiltrado de células inmunitarias aumentó considerablemente después del tratamiento con DSS, pero el número de esas células fue similar durante todo el curso del tratamiento. El número de células que se infiltran en la mucosa colónica de los ratones colíticos *Rictor^{ΔIEC}* fue comparable al observado en los ratones Wt tratados con DSS durante 6 días (**Figura 14C**). Además, el número total de células ACasp-3⁺ siempre fue mayor en la mucosa colítica de los ratones *Rictor^{ΔIEC}* y el número de esas células disminuyó durante el transcurso del tratamiento (**Figura 15A y Figura 16B**). Debido a esos cambios mínimos, no se observaron diferencias en la histológica, la longitud del colon y en la extensión de la formación de úlceras entre ambas cepas en cualquier condición (**Figura 15A, D y figura 16C**). Así, tomados en conjunto, estos resultados indican que, al preservar la función de barrera epitelial, la señalización de rictor/mTORC2 atenúa la inflamación en la mucosa colónica, pero su pérdida afecta mínimamente el desarrollo/establecimiento de colitis.

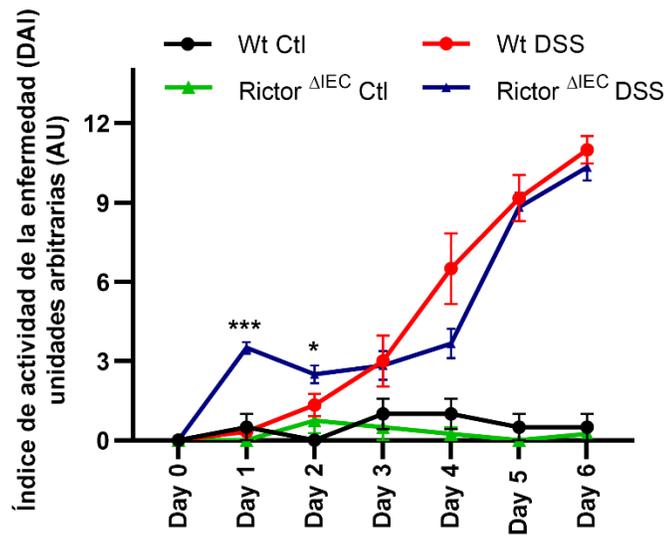
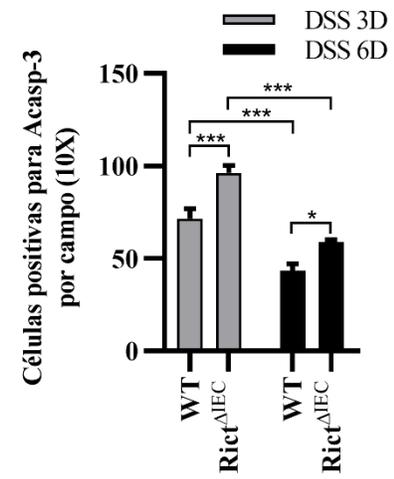
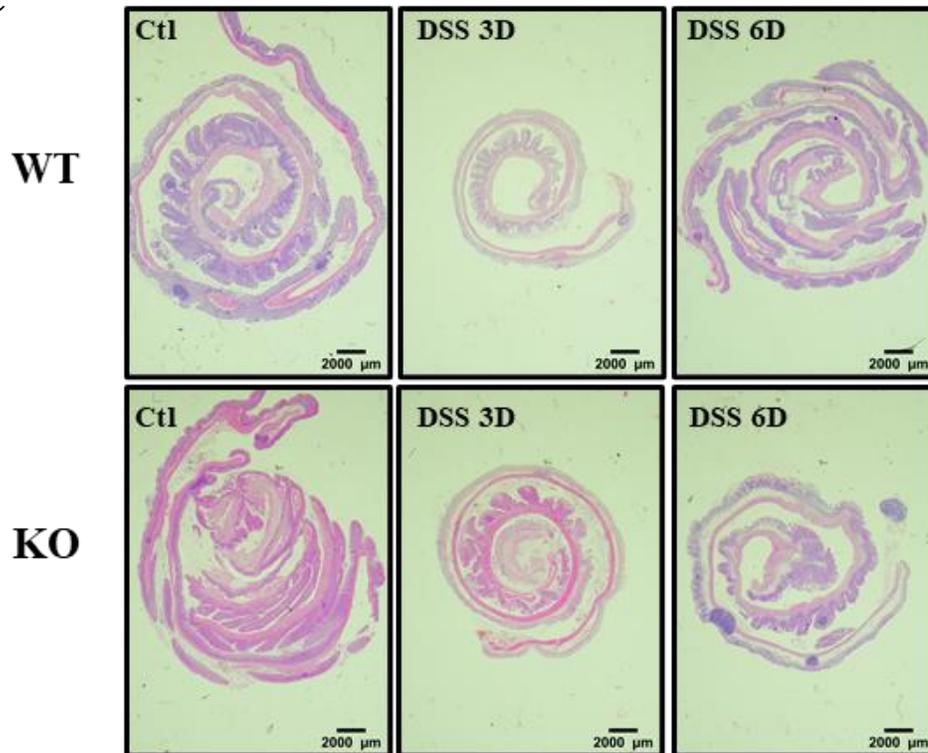
A**B****C**

Figura 16. La señalización de rictor/mTORC2 afecta mínimamente el desarrollo/establecimiento de colitis.

A) Índice de actividad de la enfermedad (DAI) de ratones Wt y *Rictor^{ΔIE}* tratados con agua (Ctl) o DSS al 2,5% durante 6 días. El índice de actividad de la enfermedad se expresa en unidades arbitrarias. Los datos se combinan de tres experimentos independientes.

B) Se detectó caspasa 3 activa (ACasp-3) mediante inmunohistoquímica en secciones incluidas en parafina de ratones Wt y *Rictor^{ΔIE}*. El tratamiento con DSS se realizó durante 3 y 6 días. El gráfico muestra el número de células epiteliales intestinales ACasp-3 positivas por campo de gran aumento (10).

C) Tinción representativa de hematoxilina y eosina de la mucosa colónica de ratones Wt y *Rictor^{ΔIE}* tratados con agua (Ctl) o DSS al 2,5% durante 3 y 6 días. Se muestran imágenes representativas. Los datos se combinan de tres experimentos independientes.

Los valores de p se calcularon utilizando un análisis de varianza de dos vías con la prueba post hoc de Sidak (A y B). Los datos se muestran como la SEM. n=6. *** P <0,001. Escala = 2000 μm (C).

8. Discusión

Los mecanismos que controlan la barrera epitelial en la mucosa colónica siguen sin comprenderse del todo. En el presente trabajo se demostró que los colonocitos que experimentan apoptosis/anoikis contribuyen a la disfunción de la barrera epitelial en el intestino inflamado. La inducción de apoptosis/anoikis en colonocitos de superficie probablemente dependen de la inactivación de la señalización de rictor/mTORC2 el cual es un papel previamente desconocido para rictor en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial (**Figura 17**). Es posible que rictor prevenga la apoptosis/anoikis en colonocitos a través de Akt, el cual fosforila el agonista asociado a BCL2 de la muerte celular (Bad) que inhibe el inicio de la apoptosis (Datta et al., 1997; Yang et al., 1995). La PKC también podría estar implicada en dicho proceso dado que se ha documentado que es capaz de fosforilar Bad (Bluwstein et al., 2013). Sin embargo, la ablación de rictor resultó en la eliminación de la señalización de PKC en condiciones control cuando la fosforilación de Bad aún estaba presente, cuestionando tal posibilidad. Esto sugiere que, en el epitelio intestinal la función de rictor/mTORC2/PKC está dirigida a controlar diferentes procesos celulares. Bad no fosforilado desencadena la liberación del citocromo c mitocondrial en el citosol que conlleva a la activación de caspasas proapoptóticas (Datta et al., 1997; Yang et al., 1995). Sin embargo, la ablación de Rictor no solo indujo la apoptosis, sino

que también estimuló la anoikis en los colonocitos de superficie y mejoró la proliferación de CEIs. Por lo tanto, rictor/mTORC2 puede participar en diferentes mecanismos que controlan la integridad de la barrera intestinal. De hecho, al limitar el desprendimiento y la proliferación de CEIs, la señalización de rictor/mTORC2 puede controlar el recambio de células epiteliales y/o la homeostasis epitelial. Varios mecanismos biológicos controlados por la vía rictor/mTORC2 podrían estar directamente involucrados en la regulación de esos procesos. Por ejemplo, los resultados presentados en este trabajo muestran que la delección de rictor reduce los niveles de proteína PKC. Por lo tanto, al modular el metabolismo de las proteínas en los CEIs, rictor/mTORC2 podría controlar esta red de señalización intracelular.

En este estudio, se destacaron dos eventos importantes: en colonocitos colícticos, la señalización de rictor/mTORC2 aumenta rápidamente la señalización de Akt; y en colonocitos podría inducirse la fosforilación de Akt 473 en ausencia de rictor/mTORC2, contradiciendo preceptos previos (Guertin et al., 2006; Saxton & Sabatini, 2017; Yu & Cui, 2016). Sin embargo, los datos están de acuerdo con diferentes propuestas que indican que la fosforilación de Akt en la serina 473 podría estar mediada por varias otras cinasas además de mTORC2, que incluye ILK (Persad et al., 2001), colina quinasa (Chua et al., 2009) y la propia Akt (Toker & Newton, 2000). De hecho, dado que se detectaron altos niveles de pAkt³⁰⁸ en colonocitos que carecen de rictor, el proceso de autofosforilación es una posibilidad plausible. Sin embargo, la fosforilación de Akt⁴⁷³ inducida por mTORC2 después de una respuesta aguda, no puede ser compensada por otras cinasas. En este contexto, esta fosforilación podría tener como objetivo generar una respuesta específica destinada a adaptar el epitelio colónico al estrés ambiental. Por lo tanto, la localización espacio-temporal de la señalización rictor/mTORC2 podría tener mayores implicaciones biológicas en el intestino, y la disponibilidad de la molécula podría afectar el resultado. De hecho, en ausencia de rictor, mTOR puede asociarse con raptor y favorecer la activación de mTORC1 generando un cambio de mTORC2 a mTORC1. En los colonocitos colícticos, dicho mecanismo podría ser responsable de la hiperactivación de mTORC1 previamente descrita (Gómez-Suárez et al., 2016; Guan et al., 2015; Gutiérrez-Martínez et al., 2019; Nava et al., 2010).

El mecanismo de retroalimentación positiva necesario para desencadenar la activación de mTORC1 río abajo de Akt podría ser proporcionado por pAkt³⁰⁸. De acuerdo con tal hipótesis,

se ha demostrado que, en las células epiteliales, pAkt³⁰⁸ retiene una actividad proteína cinasa completa (Vincent et al., 2011). Sin embargo, la respuesta limitada de la cinasa después de un estímulo agudo/fuerte, como el inducido por el tratamiento con DSS, sugiere fuertemente que la fosforilación mediada por mTORC2 mejora la actividad de la molécula. Sin embargo, dado que pAkt³⁰⁸ está reducido en colonocitos colíticos que carecen de rictor, no podemos obviar otras posibilidades, incluido un papel directo del rictor en el mantenimiento y/o estabilización de la maquinaria responsable de la fosforilación de Akt en treonina 308.

En estado basal, la apoptosis aleatoria fue detectado en CEIs que carecen de rictor, lo que indica que las señales desconocidas en el intestino dependen de la respuesta mediada por rictor/mTORC2 para prevenir la muerte celular. Las consecuencias biológicas de esas señales podrían ser diversas, incluida la regulación del recambio celular epitelial (Pellettieri & Alvarado, 2007). Por tanto, el aumento de la proliferación observado en los enteroides podría ser un mecanismo compensatorio desencadenado por el exceso de muerte celular. Identificar esas señales es importante para comprender la fisiopatología del epitelio intestinal.

Akt se activa por varios estímulos que inducen la producción de PIP3 a través del fosfatidilinositol 3-quinasa, y en cada condición, la señalización de Akt produce de alguna manera un resultado distintivo. Se han generado diferentes hipótesis con respecto a tales respuestas, y recientemente se ha propuesto que Akt puede integrar diferencialmente señales específicas mediante la fosforilación de distintos sustratos río abajo de sus activadores directos (Martinez Calejman et al., 2020). Los resultados aquí presentados apoyan tales conclusiones y demuestran que los sustratos sensibles a rictor/mTORC2/Akt incluyen β -catenina, GSK-3 β , Bad e indirectamente la vía mTORC1. Esos resultados concuerdan con trabajos publicados anteriormente que demuestran que la señalización de mTORC2/Akt se dirige a moléculas de señalización prosupervivencia y proproliferativa (Bian et al., 2017). Sin embargo, los hallazgos informados en este trabajo demuestran que la señalización de rictor/mTORC2 /Akt directa o indirectamente mejora la supervivencia de los colonocitos y reduce la proliferación de IEC. De hecho, los resultados anteriores que demuestran la compartimentación intracelular y/o la activación diferencial de Akt en las células que forman la cripta colónica apoyan esta suposición (Gómez-Suárez et al., 2016; Hernández-Trejo et al., 2016). En consecuencia, el papel de

riCTOR/mTORC2 en el mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal podría ser complejo y debe aclararse.

Los resultados también confirman informes anteriores que indican que la apoptosis aumenta la conductividad epitelial local (Bojarski et al., 2001; Heller et al., 2008) principalmente por alteraciones en la permeabilidad paracelular. Sin embargo, los hallazgos en este trabajo evidenciaron que también existe un aumento de la permeabilidad transcelular en los focos apoptóticos y que no es solo paracelular.

Esto último fue posible gracias al desarrollo de una nueva técnica para observar microerosiones en la barrera intestinal a través de inmunofluorescencia. Existen diversos protocolos publicados para estudiar indirectamente la permeabilidad intestinal durante la inflamación, como la medición de la resistencia eléctrica transepitelial en monocapas epiteliales y la cuantificación de sondas marcadas con fluoróforos hidrófobos en organoides intestinales, intestinos de ratón y sacos intestinales (Devraj et al., 2018; John et al., 2011; Mateer et al., 2016; Su et al., 2013). Pero, a pesar de demostrar que la captación de una sustancia aumenta o disminuye en la mucosa intestinal, dichos métodos se quedan limitados en el análisis de otros eventos importantes que contribuyen directamente a los cambios en la permeabilidad. Por ejemplo, al no identificar las áreas específicas donde la integridad del epitelio se ve comprometida, esos estudios limitan la comprensión de los mecanismos de transporte o las funciones biológicas responsables de afectar la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, complementar esos estudios con evaluaciones no cuantitativas específicas del sitio, como la que se describió aquí, permitió determinar la región exacta donde ocurre el flujo de sustancias en el epitelio dañado.

La nueva técnica descrita fue una combinación de dos técnicas descritas anteriormente, la preparación de sacos intestinales para evaluar la función de barrera de la mucosa *ex vivo* (Mateer et al., 2016) y el uso de trazadores fluorescentes fijables para analizar la permeabilidad vascular cerebral (Devraj et al., 2018). Es de destacar que las células sometidas a apoptosis/anoikis siempre incorporaron dextrano fijable, lo que hace que la técnica sea útil para identificar las áreas donde las membranas de las células plasmáticas de las células epiteliales están comprometidas. Durante anoikis, varias moléculas de unión celular se pierden o se redistribuyen, y la técnica también podría ser útil para identificar esas proteínas. Existe un protocolo similar que emplea endomicroscopía láser confocal *in vivo* para evaluar la presencia

de microerosiones y daño epitelial en el intestino en tiempo real. Esta técnica identifica la extrusión de células en la mucosa intestinal inflamada y no inflamada. Sin embargo, en ausencia de marcadores específicos para evaluar los mecanismos, el tipo de célula e incluso la maquinaria involucrada en la disrupción de la integridad epitelial, este protocolo es muy limitado (Poulsen et al., 1984). Además, con esta técnica no podemos medir el grado de perturbación epitelial, la integridad de la capa de gel mucoso o la presencia de cambios sutiles que pueden no ser evidentes. Por lo tanto, este nuevo protocolo es una opción más sólida para investigar la permeabilidad de la barrera epitelial en la mucosa intestinal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que nuestro método utiliza tejido fijo y por tanto las observaciones corresponden a tejido post mortem o biopsiado.

Sorprendentemente, a pesar del incremento de la permeabilidad intestinal en los ratones *Rictor*^{ΔIEC} nuestros resultados muestran que la permeabilidad a moléculas grandes todavía se encuentra restringida, como lo demostró la baja permeabilidad de RITC-dextrano (10 kDa) en la mucosa colítica, indicando que aún existe cierta selectividad en el epitelio inflamado. Los resultados también confirman que una barrera semipermeable en el intestino no puede explicar el desarrollo del proceso inflamatorio crónico, que conduce al daño de la mucosa en pacientes con EII. Pero podría jugar un papel importante en la aparición de la inflamación intestinal, incluso en el reclutamiento y establecimiento del infiltrado polimorfonuclear que desencadenan los síntomas agudos detectados durante la aparición de la colitis. Estos resultados podrían explicar por qué diversos modelos animales con una barrera intestinal semipermeable no desarrollan espontáneamente colitis (Laukoetter et al., 2007; Lechuga et al., 2020).

Finalmente, la ablación de *Rictor* en CEIs recapitula varias características biológicas y bioquímicas de los colonocitos colíticos (Gómez-Suárez et al., 2016; Gutiérrez-Martínez et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2016; Laukoetter et al., 2007; Nava et al., 2010), por lo que no se puede excluir la existencia de otras anomalías. Por tanto, *Rictor*^{ΔIEC} representa una nueva herramienta para investigar los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la colitis. Comprender el papel del rictor en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal ayudará a generar nuevas herramientas terapéuticas que podrían ser beneficiosas en el tratamiento de las EII.

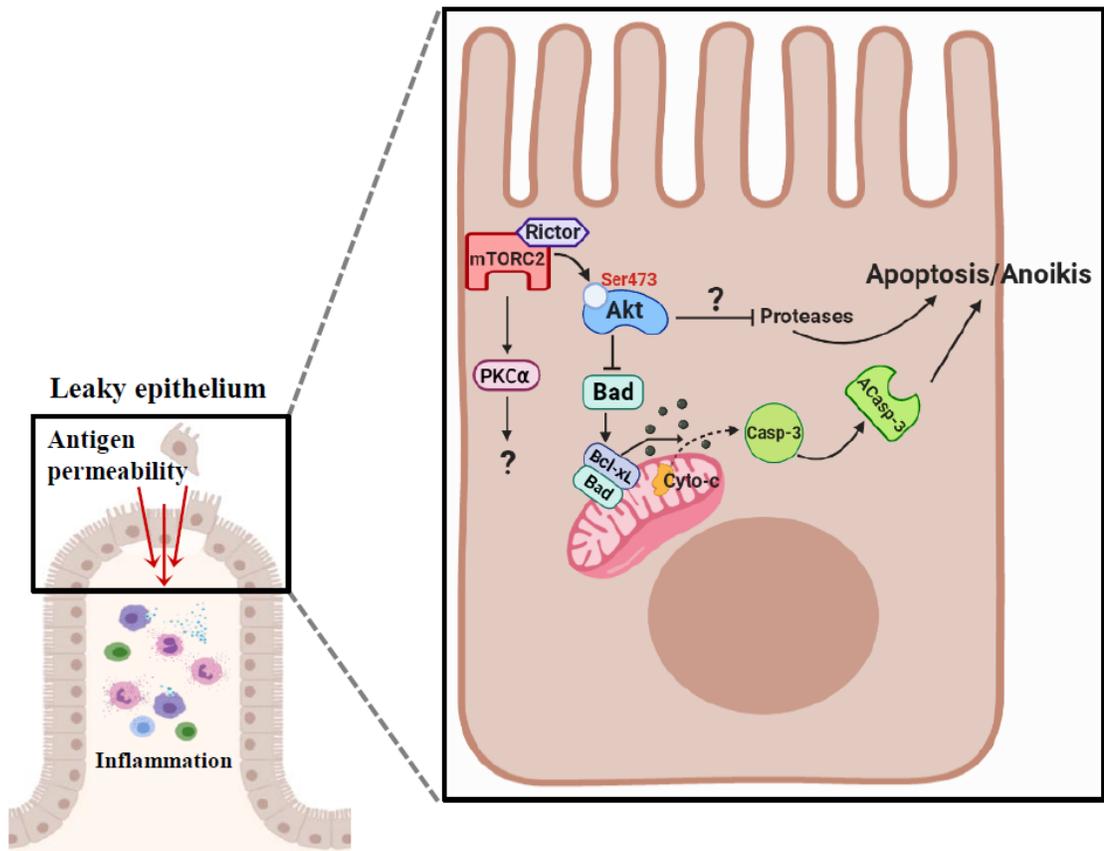


Figura 17. Mecanismo por el cual el eje rictor/mTORC2/Akt regula la muerte celular de los colonocitos durante colitis.

9. Conclusión

Los resultados del presente trabajo demostraron que el eje rictor/mTORC2/Akt es importante para prevenir la apoptosis/anoikis de los colonocitos superficiales en la cripta intestinal. La arquitectura de las criptas no fue afectada cuando el eje mTORC2/Akt se eliminó, pero esto desencadenó un incremento en la permeabilidad epitelial y una respuesta inflamatoria leve en la mucosa colónica. Esto último afectó mínimamente el desarrollo o establecimiento de la colitis. Los datos identificaron un mecanismo previamente desconocido por el cual la señalización rictor/mTORC2 regula la apoptosis/anoikis en las células epiteliales intestinales durante colitis y clarificó su papel en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal.

Sumado a esto, en este proyecto se desarrolló una técnica que proporciona un enfoque simple pero efectivo para visualizar y cuantificar microerosiones y muerte de células epiteliales (apoptosis/anoikis) en el intestino. Esto último podría ser una herramienta muy útil en modelos de enfermedad en los que la barrera epitelial intestinal está comprometida.

10. Bibliografía

- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677-696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Andrews, C., McLean, M. H., & Durum, S. K. (2018). Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Frontiers in Immunology*, 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01270>
- Bian, Y.-H., Xu, J., Zhao, W.-Y., Zhang, Z.-Z., Tu, L., Cao, H., & Zhang, Z.-G. (2017). Targeting mTORC2 component rictor inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer. *American Journal of Translational Research*, 9(9), 4317-4330.
- Bluwstein, A., Kumar, N., Léger, K., Traenkle, J., Oostrum, J. van, Rehrauer, H., Baudis, M., & Hottiger, M. O. (2013). PKC signaling prevents irradiation-induced apoptosis of primary human fibroblasts. *Cell Death & Disease*, 4(2), e498-e498. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.15>
- Bojarski, C., Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Mankertz, J., Schmitz, H., Wagner, S., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2001). Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *The Journal of Physiology*, 535(Pt 2), 541-552. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00541.x>
- Bosques-Padilla, F. J., Sandoval-García, E. R., Martínez-Vázquez, M. A., Garza-González, E., & Maldonado-Garza, H. J. (2011). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México*, 76(1), 34-38.
- Castro-Martínez, F., Encarnación-García, M. D. R., Candelario-Martínez, A., Medina-Contreras, O., Patiño-Lopez, G., Schnoor, M., & Nava, P. (2021). Evaluation and Quantification of Micro Epithelial Gaps in the Colonic Mucosa using Immunofluorescence Staining. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 172. <https://doi.org/10.3791/62204>

- Chua, B. T., Gallego-Ortega, D., de Molina, A. R., Ullrich, A., Lacal, J. C., & Downward, J. (2009). Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by Choline kinase in breast carcinoma cells. *Molecular Cancer*, 8(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-131>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, 7(5), 349-359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, 91(2), 231-241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5)
- Degan, S. E., & Gelman, I. H. (2021). Emerging Roles for AKT Isoform Preference in Cancer Progression Pathways. *Molecular Cancer Research: MCR*, 19(8), 1251-1257. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-1066>
- Devraj, K., Guérit, S., Macas, J., & Reiss, Y. (2018). An In Vivo Blood-brain Barrier Permeability Assay in Mice Using Fluorescently Labeled Tracers. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 132. <https://doi.org/10.3791/57038>
- Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(2), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.01.002>
- el Marjou, F., Janssen, K.-P., Chang, B. H.-J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., & Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 39(3), 186-193. <https://doi.org/10.1002/gene.20042>
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., & Lu, Z. (2007). Phosphorylation of β -Catenin by AKT Promotes β -Catenin Transcriptional Activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11221-11229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611871200>

- Friedrich, M., Pohin, M., & Powrie, F. (2019). Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*, 50(4), 992-1006. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.017>
- Gibson, P. R. (2004). Apoptosis or necrosis—Colonic epithelial cell survival. *Novartis Foundation Symposium*, 263, 133-145; discussion 145-150, 211-218.
- Gómez-Suárez, M., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Hernández-Trejo, J. A., Hernández-Ruiz, M., Suárez-Pérez, D., Candelario, A., Kamekura, R., Medina-Contreras, O., Schnoor, M., Ortiz-Navarrete, V., Villegas-Sepúlveda, N., Parkos, C., Nusrat, A., & Nava, P. (2016). 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell Death & Differentiation*, 23(6), 1060-1072. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.163>
- Guan, Y., Zhang, L., Li, X., Zhang, X., Liu, S., Gao, N., Li, L., Gao, G., Wei, G., Chen, Z., Zheng, Y., Ma, X., Siwko, S., Chen, J.-L., Liu, M., & Li, D. (2015). Repression of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Inhibits Intestinal Regeneration in Acute Inflammatory Bowel Disease Models. *The Journal of Immunology*, 195(1), 339-346. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303356>
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., & Sabatini, D. M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Developmental Cell*, 11(6), 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>
- Gutiérrez-Martínez, I. Z., Rubio, J. F., Piedra-Quintero, Z. L., Lopez-Mendez, O., Serrano, C., Reyes-Maldonado, E., Salinas-Lara, C., Betanzos, A., Shibayama, M., Silva-Olivares, A., Candelario-Martinez, A., Meraz-Ríos, M. A., Schnoor, M., Villegas-Sepúlveda, N., & Nava, P. (2019). MTORC1 Prevents Epithelial Damage During Inflammation and Inhibits Colitis-Associated Colorectal Cancer Development. *Translational Oncology*, 12(1), 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.08.016>

- Harris, T. J. C., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: From molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(7), 502-514. <https://doi.org/10.1038/nrm2927>
- He, X. C., Yin, T., Grindley, J. C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W. A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K. S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L. M., Barrett, T. A., Hood, L., Wu, H., & Li, L. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature Genetics*, *39*(2), 189-198. <https://doi.org/10.1038/ng1928>
- Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J., & Schulzke, J.-D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: Effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunology*, *1*(1), S58-S61. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.46>
- Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in Biological Regulation*, *65*, 5-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003>
- Hernández-Trejo, J. A., Suárez-Pérez, D., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Fernandez-Vargas, O. E., Serrano, C., Candelario-Martínez, A. A., Meraz-Ríos, M. A., Citalán-Madrid, A. F., Hernández-Ruíz, M., Reyes-Maldonado, E., Valle-Rios, R., Feintuch-Unger, J. H., Schnoor, M., Villegas-Sepúlveda, N., Medina-Contreras, O., & Nava, P. (2016). The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium. *Biochemical Journal*, *473*(21), 3805-3818. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160390>
- Holmberg, J., Genander, M., Halford, M. M., Annerén, C., Sondell, M., Chumley, M. J., Silvano, R. E., Henkemeyer, M., & Frisén, J. (2006). EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell*, *125*(6), 1151-1163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.030>
- Jia, W., & Jiexiong, F. (2010). Signaling Pathways Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, *4*(2), 105-117.

- John, L. J., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (2011). Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(5), 1255-1270. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3892>
- Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *12*(12), 720-727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Khare, V., Dammann, K., Asboth, M., Krnjic, A., Jambrich, M., & Gasche, C. (2015). Overexpression of PAK1 Promotes Cell Survival in Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-associated Cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(2), 287-296. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000281>
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(13), 3067-3076. <https://doi.org/10.1084/jem.20071416>
- Laukoetter, M. G., Nava, P., & Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, *14*(3), 401-407. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.401>
- Lechuga, S., Naydenov, N. G., Feygin, A., Cruise, M., Ervasti, J. M., & Ivanov, A. I. (2020). Loss of β -Cytoplasmic Actin in the Intestinal Epithelium Increases Gut Barrier Permeability in vivo and Exaggerates the Severity of Experimental Colitis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 1210. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588836>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, *169*(3), 381-405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Martinez Calejman, C., Trefely, S., Entwistle, S. W., Luciano, A., Jung, S. M., Hsiao, W., Torres, A., Hung, C. M., Li, H., Snyder, N. W., Villén, J., Wellen, K. E., & Guertin, D. A. (2020). mTORC2-AKT signaling to ATP-citrate lyase drives brown adipogenesis and de novo lipogenesis. *Nature Communications*, *11*(1), 575. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14430-w>

- Mateer, S. W., Cardona, J., Marks, E., Goggin, B. J., Hua, S., & Keely, S. (2016). Ex Vivo Intestinal Sacs to Assess Mucosal Permeability in Models of Gastrointestinal Disease. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 108, 53250. <https://doi.org/10.3791/53250>
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(2), 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.022>
- Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraff, K., Capaldo, C. T., Beeman, N., Addis, C., Gerner-Smidt, K., Neumaier, I., Skerra, A., Li, L., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2010). Interferon- γ Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging β -Catenin Signaling Pathways. *Immunity*, 32(3), 392-402. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.001>
- Negrini, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators of Inflammation*, 2015, 250762. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>
- Okumura, R., & Takeda, K. (2016). Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 92(9), 423-435. <https://doi.org/10.2183/pjab.92.423>
- Otto, H. F., Autschbach, F., Rohr, C., Schneider, A., Bach, A., Otto, H. F., & Inflamm, F. A. (2001). *Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions.*
- Pellettieri, J., & Alvarado, A. S. (2007). Cell Turnover and Adult Tissue Homeostasis: From Humans to Planarians. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 83-105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130244>
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., & Dedhar, S. (2001). Regulation of Protein Kinase B/Akt-Serine 473 Phosphorylation by Integrin-linked Kinase: CRITICAL ROLES FOR KINASE ACTIVITY AND AMINO ACIDS ARGinine 211 AND SERINE 343*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27462-27469. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102940200>

- Poulsen, S. S., Pedersen, N. T., & Jarnum, S. (1984). 'Microerosions' in Rectal Biopsies in Crohn's Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *19*(5), 607-612. <https://doi.org/10.1080/00365521.1984.12005779>
- Ramachandran, A., Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. (2000). Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *15*(2), 109-120. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02059.x>
- Rao, J. N., & Wang, J.-Y. (2010). Intestinal Architecture and Development. En *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*. Morgan & Claypool Life Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54098/>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5712), 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Serrano, C., Galán, S., Rubio, J. F., Candelario-Martínez, A., Montes-Gómez, A. E., Chánez-Paredes, S., Cedillo-Barrón, L., Schnoor, M., Meraz-Ríos, M. A., Villegas-Sepúlveda, N., Ortiz-Navarrete, V., & Nava, P. (2019). Compartmentalized Response of IL-6/STAT3 Signaling in the Colonic Mucosa Mediates Colitis Development. *The Journal of Immunology*, *202*(4), 1239-1249. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801060>
- Su, L., Nalle, S. C., Shen, L., Turner, E. S., Singh, G., Breskin, L. A., Khramtsova, E. A., Khramtsova, G., Tsai, P.-Y., Fu, Y.-X., Abraham, C., & Turner, J. R. (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*, *145*(2), 407-415. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.011>

- Subramanian, S., Geng, H., & Tan, X.-D. (2020). *Cell death of intestinal epithelial cells in intestinal diseases*. 17.
- Toker, A., & Newton, A. C. (2000). Akt/Protein Kinase B Is Regulated by Autophosphorylation at the Hypothetical PDK-2 Site*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8271-8274. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8271>
- van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71, 241-260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Vincent, E. E., Elder, D. J. E., Thomas, E. C., Phillips, L., Morgan, C., Pawade, J., Sohail, M., May, M. T., Hetzel, M. R., & Tavaré, J. M. (2011). Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 104(11), 1755-1761. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.132>
- Yamamoto-Furusho, J. K., Sarmiento-Aguilar, A., Toledo-Mauriño, J. J., Bozada-Gutiérrez, K. E., Bosques-Padilla, F. J., Martínez-Vázquez, M. A., Marroquín-Jiménez, V., García-Figueroa, R., Jaramillo-Buendía, C., Miranda-Cordero, R. M., Valenzuela-Pérez, J. A., Cortes-Aguilar, Y., Jacobo-Karam, J. S., Bermudez-Villegas, E. F., & Group, E. S. (2019). Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Mexico from a nationwide cohort study in a period of 15 years (2000–2017). *Medicine*, 98(27), e16291. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016291>
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell*, 80(2), 285-291. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90411-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90411-5)
- Yu, J. S. L., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143(17), 3050-3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>

Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(11), 1978-1986.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>