

Samaniego Burneo Fabiana.pdf

Resumen de fuentes

3%

SIMILITUD GENERAL

1	www.coursehero.com INTERNET	<1%
2	histologiaunaj-es.webnode.es INTERNET	<1%
3	www.researchgate.net INTERNET	<1%
4	hdl.handle.net INTERNET	<1%
5	www.slideshare.net INTERNET	<1%
6	eprints.ucm.es INTERNET	<1%
7	sedici.unlp.edu.ar INTERNET	<1%
8	eprints.uanl.mx INTERNET	<1%
9	es.slideshare.net INTERNET	<1%
10	revistas.inia.es INTERNET	<1%
11	uvadoc.uva.es INTERNET	<1%
12	www.redalyc.org INTERNET	<1%
13	P. Sánchez Angulo, L. Meseguer Olmo, A.B. Meseguer Henarejos, F. Cragolini. "Cerámica 55S como sustrato para la regeneración de defectos óseos, e...	<1%
14	ddd.uab.cat INTERNET	<1%
15	idus.us.es INTERNET	<1%

16	jcs.biologists.org INTERNET	<1%
17	www.ufrsdv.u-bordeaux2.fr INTERNET	<1%
18	www.jove.com INTERNET	<1%
19	www.scribd.com INTERNET	<1%
20	Verónica Parra Vega. "Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza", Universitat Politecnica de V... CONTENIDO PUBLICADO DE CROSSREF	<1%
21	dspace.ceu.es INTERNET	<1%
22	link.springer.com INTERNET	<1%
23	repositoriodigital.uns.edu.ar INTERNET	<1%
24	tdx.cat INTERNET	<1%
25	O.J. Caleb, P.V. Mahajan, Fahad A. Al-Said, Umezuruike Linus Opara. "Transpiration rate and quality of pomegranate arils as affected by storage conditio... CROSSREF	<1%
26	academic.oup.com INTERNET	<1%
27	bdigital.unal.edu.co INTERNET	<1%
28	digital.csic.es INTERNET	<1%
29	fjfsdata01prod.blob.core.windows.net INTERNET	<1%
30	hzi.openrepository.com INTERNET	<1%
31	lup.lub.lu.se INTERNET	<1%
32	repositorio.uam.es INTERNET	<1%
33	www.umebir.com INTERNET	<1%

Se excluyeron los depósitos de búsqueda:

- Trabajos entregados

Excluido del Informe de Similitud:

- Bibliografía
- Citas
- Coincidencias menores (10 palabras o menos)

Se excluyeron las fuentes:

- Ninguno



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**"Efecto de la deficiencia de cortactina en las uniones
intercelulares del páncreas"**

T E S I S

Que presenta:

QFB. FABIANA JUDITH SAMANIEGO BURNEO

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Directores de la tesis:

**Dra. Abigail Betanzos Fernández
Dr. Michael Schnoor**

Ciudad de México

Julio, 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la **Dra. Abigail Betanzos Fernández** por permitirme ser parte de su proyecto, por toda la paciencia que me tuvo durante mi estadía, por ayudarme a crecer tanto en lo profesional como en lo personal, gracias por todos sus animos, y por ser la mejor tutora, con el corazón mas grande que pude haber conocido.

A mi co-tutor el **Dr. Michael Schnoor** por la colaboración en el proyecto, los consejos y todo el conocimiento ofrecido

A mi asesor el **Dr. Victor Tsutsumi** por todo el apoyo, asesoramiento y sugerencias para el proyecto

A mi asesora **Dra. Patricia Talamás** por los consejos y observaciones hacia el proyecto

A mi asesora **Dra. Norma Velázquez** por sus observaciones para el proyecto

Al laboratorio del Dr. Schnoor por todo el apoyo para el desarrollo del proyecto

Al **Dra. Guillermina García** por el apoyo y la enseñanza.

A la auxiliar **QFB. Silvia Galindo** del laboratorio del Dr. Victor Tsutsumi por su apoyo

A la auxiliar **Lulú** por haberme apoyado siempre en el transcurso de mi proyecto.

A mis compañeros y amigos **Anaís, Edgar, Melisa, Dxinguella, Mitzi y Diana** por todas sus enseñanzas, conocimientos brindados y por el apoyo que me dieron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado durante la maestría

DEDICATORIA

A mi padre Dios y la virgencita por darme la fuerza e iluminarme durante toda mi formación.

A mi compañero de vida Santiago por su amor incondicional, su apoyo constante y comprensión durante todo este tiempo de formación personal y académica.

A mis queridos padres Judith y Renato por todo el amor que siempre me han tenido, por haber confiado siempre en mí y apoyarme en cada decisión que he tomado. Por su ejemplo de humildad, honradez, perseverancia y gratitud.

A mis hermanos Renato, Santiago, Juan Pablo, José Elias y María Judith por estar siempre conmigo apoyándome, creer en mí y por ser mi ejemplo.

A mis dos pequeños sobrinos Nicolás, Joaquín y Samuel.

A mis queridas amigas que conocí en México Anaís, Dxiñeguela, Mitzi, Diana y Melisa por su apoyo durante la maestría, fueron las mejores amigas que pude encontrar.

¹² Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el laboratorio 3 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular de CINVESTAV-IPN.

ÍNDICE

1.	<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	1
2.	<i>RESUMEN</i>	2
3.	<i>ABSTRACT</i>	4
4.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	5
4.1	Características del epitelio	5
4.2	Uniones intercelulares (UIC)	5
4.2.1	Uniones estrechas (UE)	6
4.2.2	Uniones adherentes (UA)	7
4.2.3	Uniones comunicantes (UC)	8
4.2.4	Desmosomas (Dsm)	8
4.3	Cortactina	9
4.3.1	Domínios de cortactina	10
4.3.2	Alteraciones de la cortactina por patógenos	12
4.4	Páncreas	14
4.4.1	Parte exócrina	16
4.4.2	Parte endócrina	17
5.	<i>ANTECEDENTES</i>	19
6.	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	27
7.	<i>HIPÓTESIS</i>	27
8.	<i>OBJETIVOS</i>	28
8.1	OBJETIVO GENERAL	28
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
9.	<i>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</i>	29
10.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	30
10.1	Cultivo de células epiteliales:	30
10.2	Cultivo bacteriano:	30
10.3	Cuantificación de bacterias:	31
10.4	Animales:	31
10.5	Extracción de páncreas:	31
10.6	Análisis histológico:	31
10.7	Silenciamiento de cortactina en células BxPc-3:	32
10.8	Lisado de tejido y células:	33
10.9	Ensayos tipo western blot:	33
10.10	Inmunofluorescencia indirecta:	34
10.11	Mediciones de resistencia eléctrica transepitelial (RET)	35
10.12	Infección de las células BxPC-3 con <i>H. pylori</i> :	35
10.13	Análisis de glucosa en sangre.	35

10.14 Análisis estadístico:	35
<i>11. RESULTADOS</i>	36
11.1 La deficiencia de cortactina no produce cambios morfológicos en el páncreas de ratones	36
11.2 La falta de cortactina produce una disminución de la expresión y localización de la actina en el páncreas de ratones	38
11.3 La deficiencia de cortactina afecta la localización de las proteínas de las UICs del páncreas de ratones	42
11.4 La deficiencia de cortactina no afecta los niveles de glucosa sérica en ratones	51
11.5 El silenciamiento de cortactina produce un aumento de la permeabilidad de células de ducto pancreático	52
11.6 La disminución de cortactina afecta la expresión y localización de proteínas de las UICs en células de ducto pancreático	54
11.7 La disminución de cortactina hace más susceptibles a las células de ducto pancreático a la infección con <i>H. pylori</i>	62
<i>12. DISCUSIÓN</i>	65
<i>13. CONCLUSIONES</i>	73
<i>14. PERSPECTIVAS</i>	74
<i>15. BIBLIOGRAFÍA</i>	75

1. LISTA DE ABREVIATURAS

BxPC-3	Células de adenocarcinoma de ducto pancreático
Cy5	Cianina
Dsm	Desmosomas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IF	Inmunofluorescencia
KO	Knockout
MLC	Myosin light chain
PBS	Buffer de fosfatos
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
ROCK1	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
UA	Uniones adherentes
UE	Uniones estrechas
UICs	Uniones intercelulares
WB	Western blot
WT	Wild type
ZO	Zonula ocludens

1

2. RESUMEN

La cortactina es una proteína multifacética de unión a actina que participa en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera intestinal. La permeabilidad epitelial del colon de ratones KO de cortactina está incrementada; además la expresión y localización de las proteínas de las uniones intercelulares (UICs) está alterada. Sin embargo, se desconoce si la ausencia de cortactina también causa daño en otros epitelios como el del páncreas. ¹⁰ Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la deficiencia de cortactina en las proteínas de las UICs, así como en la permeabilidad epitelial de una línea celular derivada de ductos pancreáticos (BxPC-3) silenciada en cortactina. Los resultados del análisis histológico revelaron que la morfología del páncreas de los ratones KO luce aparentemente normal, comparada con los animales control. Sin embargo, ensayos de inmunofluorescencia del tejido pancreático mostraron que la deficiencia de cortactina provocó una disminución de la actina filamentososa y de algunas proteínas de las uniones intercelulares (UICs) como ocludina, ZO-1 y E-cadherina. Además, estas proteínas se redistribuyeron de los bordes celulares hacia el citosol, en ausencia de cortactina. En cambio, solo se detectó una ligera disminución de la claudina-1, con una localización similar en los tejidos KO y wild-type. Por otra parte, para investigar el efecto de la cortactina sobre la permeabilidad del epitelio pancreático, se utilizaron células BxPC-3 silenciadas en cortactina utilizando shRNAs. Estas células desarrollaron 45% menos resistencia eléctrica transepitelial (RET) que las células control. En congruencia, se encontró una reducida expresión de ocludina, claudina-1, ZO-1, E-cadherina y actina. Además, la presencia de estas proteínas en los bordes celulares disminuyó significativamente y se redistribuyeron al citoplasma. Estos cambios moleculares, podrían hacer al páncreas más susceptible a la infección de patógenos como es el caso de *Helicobacter pylori*. Esta bacteria que se ha detectado en el páncreas disminuyó la RET de células deficientes en cortactina.

En conclusión, nuestros resultados demostraron que, en el páncreas la cortactina también participa en la regulación de una adecuada arquitectura de las UICs y en

la permeabilidad epitelial. Por lo tanto, la cortactina parece ser un regulador crítico de la homeostasis epitelial en varios órganos.

3. ABSTRACT

Cortactin is a multifaceted actin-binding protein consisting of several domains that allow for interactions with other proteins, thus enabling cortactin to fulfill essential roles in diverse actin-related cellular processes including adhesion and migration. Moreover, homeostasis of the intestinal epithelial barrier is regulated by cortactin since in cortactin-KO mice colon epithelial permeability is increased and expression and localization of intercellular junction (ICJ) proteins is altered. However, it remains unknown whether absence of cortactin also causes damage in other epithelia such as in the pancreas. ¹⁹ Therefore, the aim of this work was to analyze the effect of cortactin deficiency on pancreatic ICJ proteins, as well as on epithelial permeability of a cortactin-depleted ductal pancreatic cell line (BxPC-3). Histologically, the pancreas of KO-mice looks apparently normal compared with those from wild-type animals. However, western blot and immunofluorescence analyses of pancreatic tissues revealed that cortactin-deficiency provoked a decrease of filamentous actin, and reduced expression of the ICJ proteins occludin, ZO-1 and E-cadherin. Moreover, these proteins relocated from cellular borders to the cytosol in the absence of cortactin. By contrast, only a slight decrease of claudin-1 was detected, with similar location in WT and KO tissues. To investigate the effect of cortactin on pancreatic epithelial permeability, cortactin-depleted BxPC-3 (Cttn-KD) cells were generated using shRNA and their transepithelial electrical resistance (TEER) was monitored. Cttn-KD cells exhibited 45% lower TEER than control cells. Accordingly, ICJ proteins were also less expressed and mis-localized. These molecular changes could make the pancreas more susceptible to pathogen infection, e.g. *Helicobacter pylori*. This bacterium detected in pancreas, diminished TEER of Cttn-KD cells. In conclusion, our results demonstrate that in the pancreas cortactin also participates in the regulation of proper ICJ architecture and epithelial permeability. Thus, cortactin seems to be a critical regulator of epithelial homeostasis in different organs.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Características del epitelio

El epitelio está compuesto por células adyacentes que revisten todas las superficies de los órganos del cuerpo y recubren las cavidades internas cerradas. Además, las glándulas se encuentran formadas por epitelio. También se ha descrito que hay células epiteliales especializadas que funcionan como receptores sensoriales (Geneser, 2001; Ross and Pawlina, 2007).

El epitelio presenta varias funciones, por un lado, en la superficie libre protege contra el estrés mecánico y el ingreso de microorganismos. En las superficies internas su función es de absorción o de secreción y, en otros sitios funciona como barrera de defensa (Ross and Pawlina, 2007).

Las células epiteliales presentan tres características: 1) se adhieren entre sí a través de uniones intercelulares (UICs); 2) a través de sus membranas basales, se unen al tejido conectivo subyacente; 3) poseen regiones con funciones diferentes (apical, lateral y basal) (Sepúlveda, 2012).

4.2 Uniones intercelulares (UIC)

Las UIC de los epitelios están organizadas en estructuras llamadas uniones estrechas (UE), uniones adherentes (UA), uniones comunicantes (UC) y desmosomas (Dsm) (Glick, A. B., & Yuspa, 2005) (Figura 1).

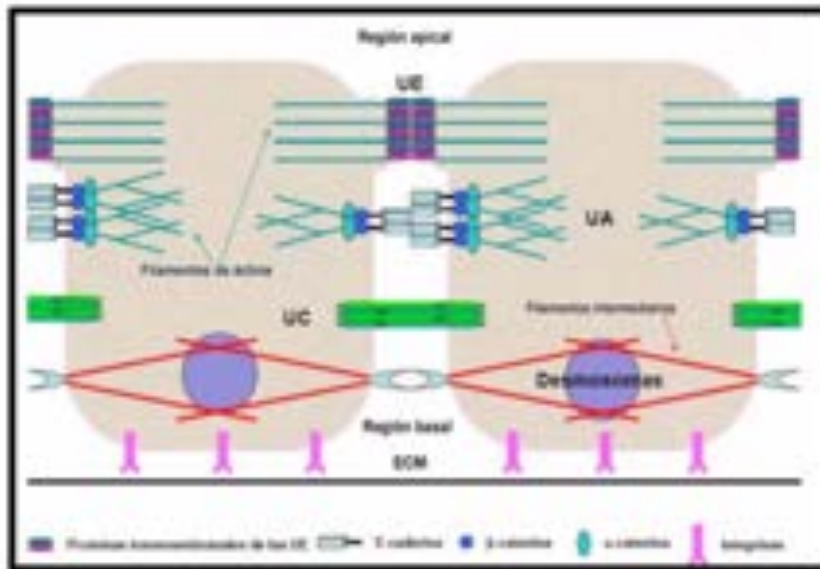


Figura 1. Esquema de las UIC. Representación de dos células epiteliales donde se muestra la posición de las uniones estrechas (UE), uniones adherentes (UA) y desmosomas, con sus proteínas correspondientes. Modificada de (Glick, A. B., & Yuasa, 2005).

4.2.1 Uniones estrechas (UE)

Se encuentran en el límite entre los dominios apical y lateral de las células epiteliales (Giepmans and van Uzendoorn, 2009). Están formadas por un complejo de proteínas que establecen y mantienen la polaridad de las células. Las proteínas transmembranales que las constituyen son: claudinas, ocludina, tricelulina, JAMs (moléculas de adhesión de la unión, por sus siglas en inglés), y CAR (receptor del adenovirus Coxsackie, por sus siglas en inglés), entre otras. En la parte citoplasmática están las proteínas ZO-1 (zonula occludens 1, por sus siglas en inglés), ZO-2 y ZO-3, MUPP1 (proteína 1 con multidominios PDZs, por sus siglas en inglés) y cingulina, que conectan a las proteínas transmembranales con el citoesqueleto. La integridad de las UE se mantiene mediante un complejo regulador, que incluye a PKCa (fosfoquinasa C atípica, por sus siglas en inglés), Cdc42, Rac1, cortactina, Par3 y Par6 (Tegtmeyer and Backert, 2017) (Figura 2).

6

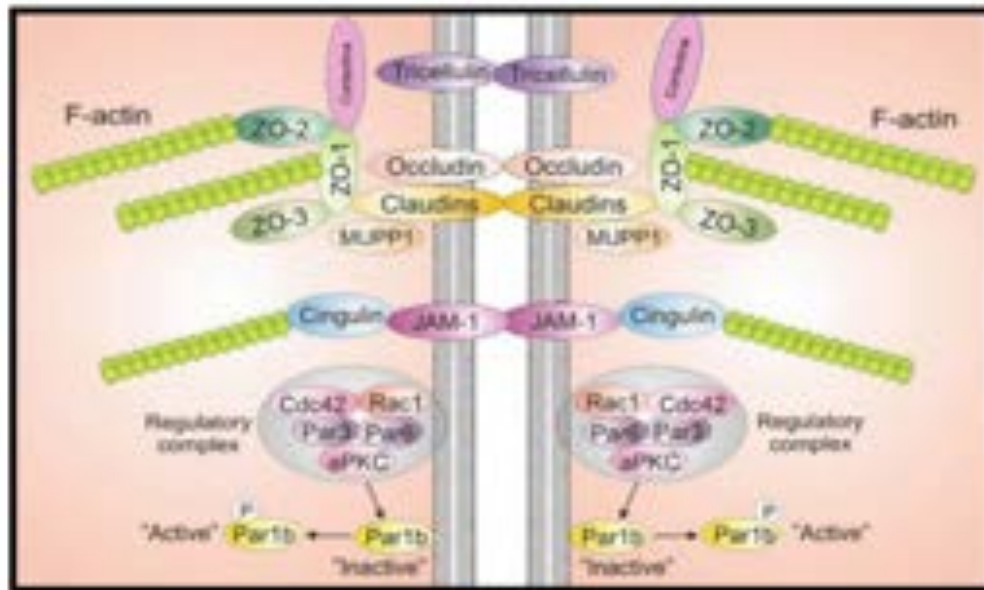


Figura 2. Componentes de la UE. Proteínas transmembranales, citoplasmáticas y del citoesqueleto encargadas del mantenimiento de las UE. Tomado de (Tegtmeyer and Backert, 2017)

4.2.2 Uniones adherentes (UA):

Se encuentran en la membrana lateral, por debajo de la UE y permite la unión de filamentos de actina entre células vecinas (Giepmans and van IJzendoorn, 2009). Las proteínas transmembranales de las UA incluyen a la E-cadherina y a las nectinas. Las interacciones homotípicas dependientes de calcio entre cadherinas en el espacio extracelular, conducen a fuertes interacciones célula-célula; aunque las cadherinas también cumplen un papel importante como supresoras del crecimiento, carcinogénesis y trans migración de leucocitos (Giepmans and van IJzendoorn, 2009; Tegtmeyer and Backert, 2017). E-cadherina puede interactuar con las proteínas citoplasmáticas β -catenina y p120-catenina. El complejo E-cadherina- β -catenina está conectado al citoesqueleto de actina a través de α -catenina, EPLIN (proteína epitelial perdida en neoplasmas, por sus siglas en inglés) y vinculina (Tegtmeyer and Backert, 2017). La cortactina también regula al citoesqueleto en este tipo de uniones (Tegtmeyer and Backert, 2017). Por otra parte, la nectina se une a la afadina, contribuyendo a las funciones de las UA mediadas por E-cadherina en células epiteliales (Figura 3) (Tegtmeyer and Backert, 2017).

7

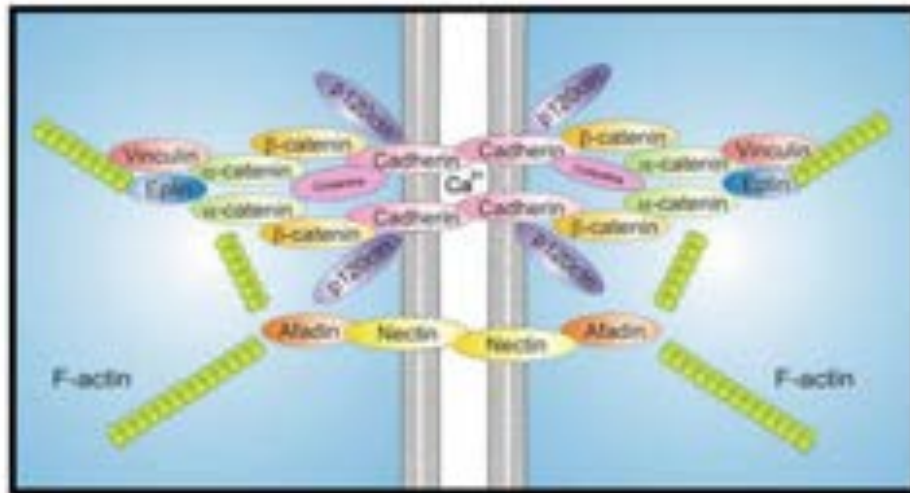


Figura 3. Estructura de las UA. Proteínas transmembranales, citoplasmáticas y del citoesqueleto encargadas del mantenimiento de las UA. Tomado de (Tegtmeyer and Becker, 2017).

4.2.3 Uniones comunicantes (UC)

Se encuentran principalmente en la membrana lateral de las células epiteliales, por debajo de las UE y permiten el paso de iones y pequeñas moléculas (<1 kDa), a través de canales que atraviesan la membrana de célula a célula. Estas uniones son importantes para la transducción de señales. Los canales llamados conexones, están formados por 6 proteínas integrales llamadas conexinas y son los que median el paso de los iones y segundos mensajeros (Giepmans and van Uzendoom, 2009).

4.2.4 Desmosomas (Dsm)

Se encuentran también en la membrana lateral, por debajo de las UE y son los encargados de unir los filamentos intermedios entre las células vecinas. También son importantes para la integridad del tejido debido a su fuerte adherencia, y aunque resisten la depleción de calcio pueden ser regulados por la PKC, cuando se requiere una remodelación dinámica de la adhesión célula-célula (Garrod and Chidgey, 2008).

8

4.3 Cortactina

La cortactina se describió como una proteína de 80-85 kDa, sustrato de la cinasa Src, con unión a actina y que se acumula en estructuras localizadas en la corteza celular, de ahí su nombre (Wu *et al.*, 1991). Se colocan en estructuras ricas en actina como los lamelipodios, "ruffles" e invadopodios (Chhabra, E. S., & Higgs, 2007; Schnoor *et al.*, 2017).

La cortactina es una proteína con multidominios, gracias a los cuales se asocia a diversos complejos, cumpliendo un papel esencial en diversos procesos celulares basados en actina, como: migración de células epiteliales o fibroblastos (Lua and Low, 2004), invasión (Lua and Low, 2005), dinámica celular (Yamaguchi and Condeelis, 2007), formación de podosomas (Head *et al.*, 2003), adhesión celular a través de las UE y UA (Katsube *et al.*, 1998; Tilghman and Hoover, 2002), guía del axón (Knoll B, 2004), morfogénesis y diferenciación neuronal (Martínez *et al.*, 2003), tráfico vesicular, endocitosis y exocitosis (McNiven *et al.*, 2000), y metástasis de células tumorales (Tondravi *et al.*, 2001) (Figura 4). Muchos de estos procesos son regulados por modificaciones postraduccionales en la cortactina como fosforilaciones, acetilaciones y ubiquitinación (Lua and Low, 2005).

Algunos de las proteínas a las que se une la cortactina incluyen: actina, dinamina 2, reguladores de GTPasas como BPGAP1 una proteína activadora de la Rho GTPasa y Fgd1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina), proteínas andamio (CD2AP, CortBP1, ZO-1 y WIP) y factores de promoción de la nucleación de actina (Arp2/3 y N-WASP) (Du *et al.*, 1998; Katsube *et al.*, 1998; McNiven *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2003; Lua and Low, 2004). Además, cortactina participa en la formación y estabilización de las uniones intercelulares, al interactuar a través de su dominio SH3 con proteínas de las UE como ZO-1 (Katsube *et al.*, 1998). También se ha reportado que cortactina participa en la biogénesis de las UA y es importante para la estabilidad de E-cadherina (Helwani *et al.*, 2004). Asimismo se une a β -catenina y a la proteína de unión a actina, vinculina, siendo la fosforilación de la cortactina un mecanismo regulador de estas asociaciones (Sroka *et al.*, 2016).

La cortactina también es un regulador esencial de la secreción de metaloproteinasas, las cuales degradan la matriz extracelular (MEC), favoreciendo la invasión de los tejidos. En este evento, es particularmente importante la

formación de invadopodios por parte de las células cancerosas, en procesos de metástasis (Clark et al., 2007)

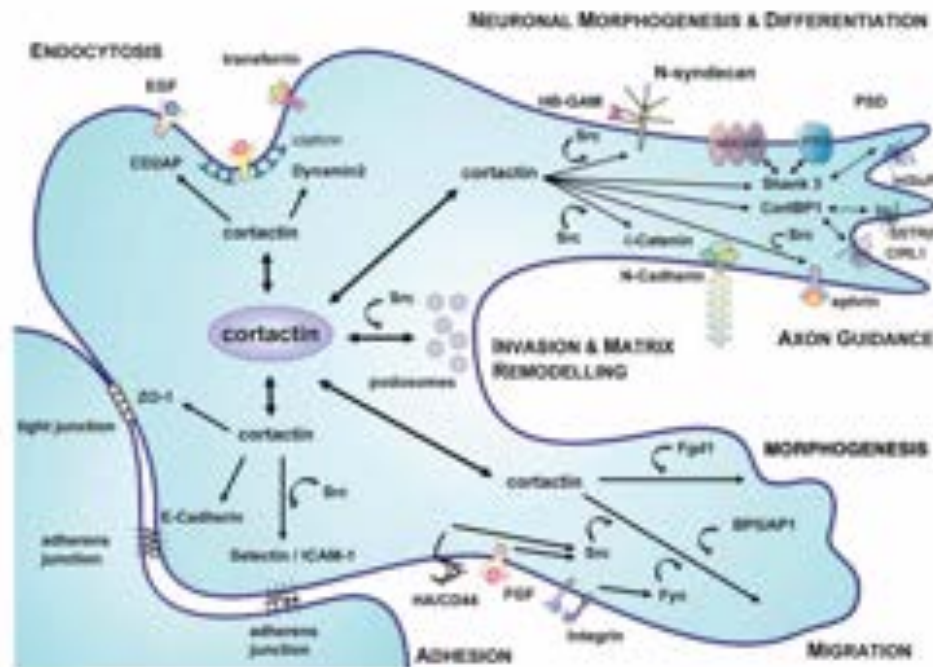


Figura 4. La cortactina regula varios procesos en la dinámica de una célula. Interacciones modulares de la actina que permiten su asociación con múltiples complejos para regular la organización de la actina y las funciones celulares en una célula modelo típica. Estas funciones incluyen la formación de podosomas, la adhesión celular a través de la formación de UE y UA, la morfogénesis y diferenciación neuronal, la guía del axón, la migración y morfogénesis de fibroblastos y células epiteliales, así como la endocitosis. Algunos de estos procesos pueden ser regulados por el estado de fosforilación de la cortactina, mediado por las cinasas de tirosina Src o Fyn, mientras que este requerimiento no se ha establecido todavía en otras vías. PSD: densidad post-sináptica; IPR3: receptor inositol trifosfato 3; SSTR2: receptor transmembranal tipo 2 de somatostatina; C1RL1: receptores independientes de calcio para el receptor CL1 de latrotoxina/lactotoxina; NMDAR: receptor al N-metil-D-aspartato; mGlu: receptores metabotrópicos a glutamato; EGF: factor de crecimiento epidermal; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; Fgd1: displasia facioyugal 1; CD2AP: proteína asociada a CD2; CorBP1: proteína de unión a cortactina 1; ZO-1: zonula ocludens 1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; HB-GAM: molécula asociada al crecimiento y de unión a heparina; HA/CD44: hialuronan/CD44 (receptor a hialuronan). Tomado de (Luo and Low, 2005).

4.3.1. Dominios de cortactina

La cortactina consta de un dominio ácido N-terminal (NTA), seguido por 6.5 repeticiones en tándem de 37 aa, un dominio α -helicoidal donde escinde la

calpaina, una región rica en prolina (PRR), un segmento enriquecido en residuos de serina, tirosina y treonina susceptibles de fosforilación y, en su extremo C-terminal contiene un dominio SH3 que interactúa con varios efectores del citoesqueleto de actina o proteínas de andamio que contienen secuencias ricas en prolina (Figura 5) (Daly, 2004; Lua and Low, 2005; Ammer and Weed, 2009; Schnoor et al., 2017).

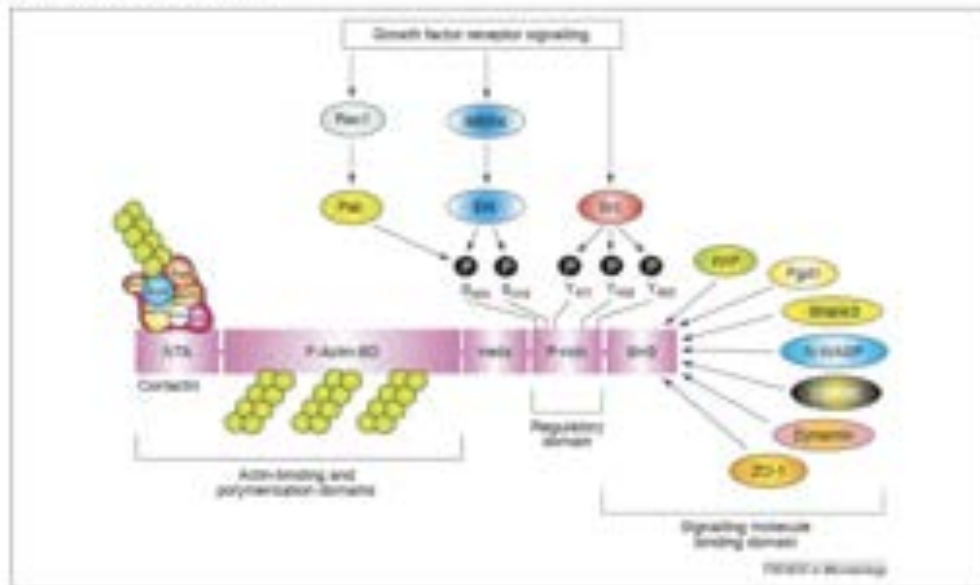


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de cortactina y las proteínas con las que interactúa. El papel central de la cortactina en la traducción de señales celulares es evidente por sus múltiples compañeros de unión. El dominio ácido N-terminal (NTA) puede activar directamente al complejo Arp2/3. El dominio de unión a F-actina se requiere para la activación de Arp2/3 y para la localización de la cortactina en el citoesqueleto cortical de actina. La región rica en prolina contiene sitios de fosforilación de serina y tirosina y se piensa que funciona como una bisagra molecular que determina los cambios de conformación de la cortactina. El dominio SH3 interactúa con varias proteínas involucradas en la polimerización de actina, la adhesión célula-célula y en la dinámica de la membrana. Diferentes cascadas de transducciones de señales regulan la función de cortactina en respuesta a estímulos, como los factores de crecimiento. Esta regulación parece involucrar la fosforilación de residuos específicos de serina y tirosina en el dominio rico en prolina, por las enzimas Pak/Erk o Src, respectivamente. Tomado de (Selbach and Backert, 2005).

El dominio NTA de la cortactina posee una región conservada de 20-22 aa que contiene los residuos DDW, y es la responsable de la interacción con la subunidad Arp3, lo que activa y estabiliza al complejo Arp2/3 (Weed et al., 2000; Higgs HN, 2001). Además, el dominio SH3 de cortactina se une a N-WASP y sinergiza la



asociación con el complejo Arp2/3. Esta interacción además está regulada por las cinasas Erk y Src y constituye un nuevo mecanismo de acción de la cortactina en la dinámica de la actina (Martinez *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha reportado que la proteína WIP que interactúa con WASP, también se une al dominio SH3 de la cortactina (Kinley *et al.*, 2003).

Varias cinasas, principalmente serina y tirosina cinasas, pueden inducir directa o indirectamente la fosforilación de cortactina (Luo and Low, 2005). Los residuos Y421 e Y470, susceptibles a la fosforilación por Src, están implicados en los procesos celulares de migración, invasión y protrusión (Schnoor *et al.*, 2017). También se ha descrito que la fosforilación por Erk en los residuos S405 y S418, está relacionada con la estabilización y activación de cortactina (Schnoor *et al.*, 2017). Además, esta fosforilación facilita la unión del dominio SH3 a N-WASP, para que se active N-WASP, mientras que la fosforilación por Src de la cortactina termina la activación de N-WASP (Martinez-Quiles *et al.*, 2004). Asimismo, se ha reportado que la acetilación de lisinas conservadas (K87, K124, K161, K198, K235, K272 y K304) afecta la unión de la cortactina con la F-actina (Zhang *et al.*, 2007).

4.3.2 Alteraciones de la cortactina por patógenos

Los patógenos han desarrollado diversas estrategias para atacar, interactuar y manipular las UICs, con la finalidad de desestabilizar o cruzar las barreras epiteliales y causar infección. Los protozoarios, bacterias y virus acceden a los componentes moleculares de estas uniones ya sea directamente, a menudo aprovechando las alteraciones fisiológicas en la polaridad epitelial, o indirectamente, mediante el suministro de factores moleculares que desestabilizan la integridad de las uniones. De manera que es fundamental revelar las interacciones moleculares entre los patógenos con los componentes de las UICs, no solo para dilucidar los mecanismos de invasión, sino también para desentrañar las propiedades fisiológicas fundamentales de las barreras epiteliales, a nivel celular y tisular (Nikitas and Cossart, 2012). En este sentido, se ha determinado que los microorganismos se aprovechan de las proteínas integrales, corticales y de asociación con el citoesqueleto, como la cortactina, para dañar los contactos célula-célula (Selbach and Backert, 2005; Navarro *et al.*, 2013).

4.3.2.1 Protozoarios

- ***Cryptosporidium parvum***: Es un parásito protozoario intracelular causante de la gastroenteritis en humanos (Rodríguez *et al.*, 2010). Durante la invasión de *C. parvum*, la cortactina se fosforila en residuos de tirosina, lo que induce la polimerización de la actina en el sitio de unión del parásito con la célula huésped, favoreciendo así su entrada (Chen *et al.*, 2003).

4.3.2.2 Bacterias

- ***Shigella flexneri***: Es una bacteria Gram-negativa causante de la disentería en humanos, al invadir las células epiteliales del colon. La invasión por *Shigella* induce el reclutamiento de la cortactina en la membrana plasmática, de una manera dependiente de su fosforilación en residuos de tirosina, provocando la formación de filamentos de actina por debajo de la membrana y promoviendo así la captación bacteriana (Dehio *et al.*, 1995; Bougnères *et al.*, 2004).
- ***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**: esta bacteria Gram-negativa causante de la diarrea infantil especialmente en países en desarrollo, tiene la capacidad de adherirse a las células intestinales e inyectar a través de su sistema de secreción tipo III, el receptor de intimina translocado (Tir). Una vez dentro, Tir interactúa con varias proteínas como cortactina, para activar la maquinaria de polimerización de actina y se dé la formación de pedestales (Cantarelli *et al.*, 2006).
- ***Helicobacter pylori***: esta bacteria Gram-negativa y microaerófila, produce gastritis crónica y enfermedades gástricas severas (Enroth *et al.*, 1999; Amieva, M. R., & El-Omar, 2008). *H. pylori*, a través de su sistema de secreción tipo IV, transloca a la toxina CagA hacia el citosol de las células gástricas. Una vez dentro, la toxina sufre fosforilación en el residuo Y927 e inactiva a la cinasa Src, por un mecanismo que involucra tanto su desfosforilación en el residuo Y418 como una fosforilación en el aminoácido

Y527 (Selbach *et al.*, 2003). La fosforilación de Y527 produce una conformación cerrada y catalíticamente inactiva (Hunter, 1987; Hubbard, 1999). La inactivación de Src da como resultado la desfosforilación de cortactina, y ésta a su vez es capaz de inducir un reordenamiento del citoesqueleto de actina en las células epiteliales gástricas (Figura 6), produciéndose el fenotipo colibrí característico de las células infectadas con *H. pylori* (Selbach *et al.*, 2003).

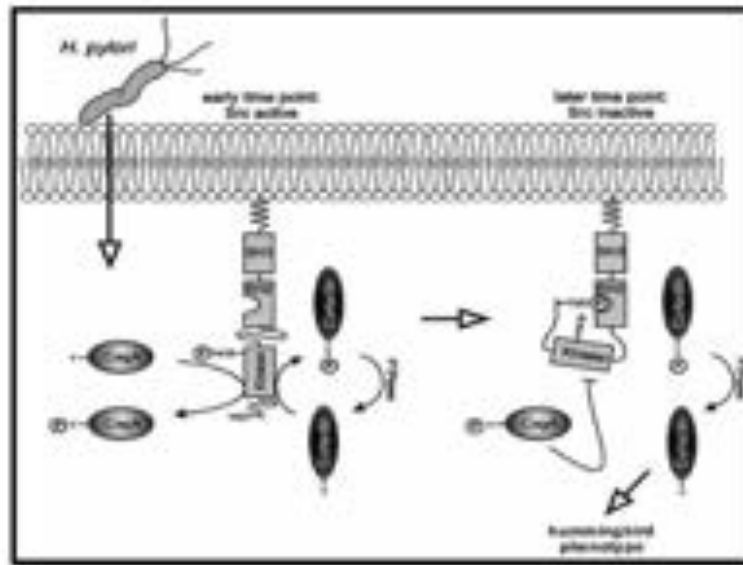


Figura 6. Esquema de la señalización inducida por CagA de *H. pylori* en células gástricas. *H. pylori* transloca a la citotoxina CagA hacia el citoplasma de las células gástricas, mediante un proceso dependiente del sistema de secreción tipo IV. En el citoplasma epitelial, Src fosforila a CagA en residuos de tirosina y también a cortactina. Posteriormente, CagA fosforilada en tirosina, inactiva a c-Src por un mecanismo que involucra la fosforilación del residuo Y527 y la desfosforilación de Y418. La inactivación de Src previene la posterior fosforilación de CagA y conduce a la desfosforilación de cortactina. La cortactina desfosforilada promueve la nucleación de actina e induce reordenamientos característicos del citoesqueleto de actina, que conducen al denominado fenotipo del colibrí. Tomado de (Selbach *et al.*, 2003).

4.4 Páncreas

Una de las vías de entrada de los patógenos al cuerpo es la vía gastrointestinal. A partir de la invasión de este epitelio, los microorganismos pueden colonizar otros órganos (Ribet and Cossart, 2015). Conjuntamente, la microbiota intestinal constituye un socio esencial en la salud, aunque su presencia también puede

inducir procesos patológicos altamente indeseados en el huésped (Holmes *et al.*, 2011; Marchesi *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2017). Quizás el ejemplo más estudiado de trastornos gastrointestinales inducidos por la microbiota es el carcinoma gástrico mediado por *H. pylori* (Correa and Houghton, 2007). Aunque su efecto patogénico no se ha delimitado solo al estómago, ya que se ha detectado la presencia de esta bacteria en el páncreas; no obstante, las implicaciones funcionales de esta infección aún requieren de estudios exhaustivos (Testerman and Morris, 2014). Por si fuera poco, en los últimos años varios estudios han presentado evidencia tangencial que sugiere un posible papel de los microbios en la patogénesis de enfermedades pancreáticas, siendo en muchos casos afectadas las UICs (Zambirinis *et al.*, 2014).

El páncreas es un tejido epitelial perteneciente al tipo glandular. Este órgano tiene una forma alargada y está constituido por 3 partes: cabeza, cuerpo y cola (Figura 7a). La cabeza se encuentra en el asa del duodeno, al salir del estómago, y está unida al duodeno por tejido conectivo; el cuerpo de ubicación central, cruza la línea media del organismo humano; y la cola está localizada cerca del hilo del bazo (Ross and Pawlina, 2007; Longnecker, 2014). Esta glándula posee funciones tanto exócrinas, como endócrinas.

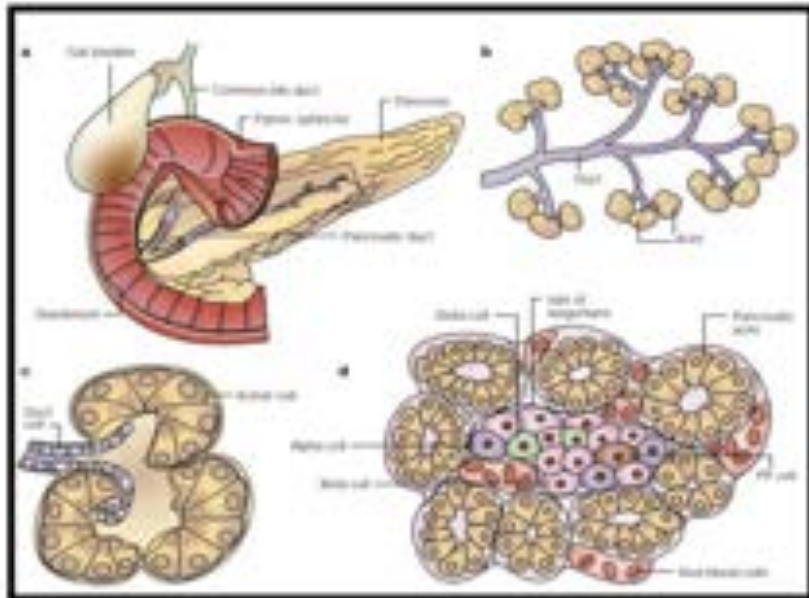


Figura 7. Esquema representativo del páncreas. a) Anatomía general del páncreas. b) Porción exócrina. c) Acino. d) Isiote pancreático incrustado en el tejido exócrino. Tomado de (Bardeesy and DePinho, 2002).

4.4.1 Parte exócrina

El páncreas exócrino contiene acinos que secretan jugo pancreático hacia el duodeno, a través del conducto pancreático (Figura 7b-c). El jugo pancreático contiene varias enzimas, algunas de las cuales se sintetizan de forma inactiva (Hammer and McPhee, 2010). Las enzimas solo se activan cuando llegan a luz del intestino delgado y son esenciales para la digestión en el intestino (Young and Heath, 2001; Ross and Pawlina, 2007).

Las enzimas pancreáticas secretadas por el páncreas exócrino son:

- Endopeptidasas (tripsinógeno y quimiotripsinógeno) y exopeptidasas (procarboxipeptidasa y proaminopeptidasa): rompen enlaces peptídicos internos (endopeptidasas) o enlaces de aminoácidos en los extremos carboxi- o amino-terminal (exopeptidasas) (Ross and Pawlina, 2007).

- Enzimas amilolíticas (α -amilasa): digieren los carbohidratos al romper los enlaces glucosídicos de los polímeros de la glucosa (Ross and Pawlina, 2007).
- Lipasas: rompen los lípidos al romper los enlaces éster de los triacilglicérols, para liberar ácidos grasos (Ross and Pawlina, 2007).
- Enzimas nucleolíticas (desoxirribonucleasa y ribonucleasa): digieren los ácidos nucleicos y dejan libres sus mononucleótidos (Ross and Pawlina, 2007).

La secreción exocrina del páncreas se encuentra regulada por un control hormonal y nervioso. El duodeno secreta dos hormonas que son reguladores principales del páncreas, la secretina y la colecistocinina (CCK) (Ross and Pawlina, 2007). La secretina estimula a las células de los conductos excretores para que produzcan una concentración elevada de bicarbonato (HCO_3^-) y un contenido bajo de enzimas. En tanto que la CCK, determina la secreción de proenzimas de las células acinosas (Ross and Pawlina, 2007). El páncreas también es regulado por **nervación autónoma: las fibras nerviosas simpáticas median la regulación del flujo sanguíneo del páncreas y, las fibras parasimpáticas incrementan la actividad de los acinos pancreáticos y de los centros acinares** (Ross and Pawlina, 2007).

4.4.2 Parte endócrina

El páncreas endócrino está formado por los islotes de Langerhans, los cuales están muy vascularizados y se encuentran a lo largo de **todo el órgano, formando agrupaciones celulares de tamaño variable**. Los islotes constituyen del 1-2% total del páncreas (Figura 7d) (Ross and Pawlina, 2007; Hammer and McPhee, 2010).

El páncreas endócrino contiene 5 tipos celulares secretores de hormonas y son:

- Células beta (β): forman el 70% de las células insulares y son las encargadas de secretar insulina. Poseen gránulos de secreción de un tamaño de 300 nm de diámetro, con un centro denso poliédrico y una matriz pálida (Ross and Pawlina, 2007).

- Células alfa (α): constituyen cerca del 15-20% de las células insulares, son las encargadas de secretar glucagón y tienen gránulos de secreción de un tamaño de 250 nm de diámetro (Ross and Pawlina, 2007).
- Células delta (δ): forman entre el 5-10% del tejido endócrino pancreático y se encuentran en la periferia de los islotes; secretan somatostatina y contienen gránulos de secreción que miden entre 300-350 nm (Ross and Pawlina, 2007).
- Células épsilon (ϵ): hacen que el estómago produzca y libere la hormona grelina, que es la que induce la sensación de hambre (Ross and Pawlina, 2007).
- Células PP: son encargadas de secretar el polipéptido pancreático (PP), que controla y regula la secreción exócrina del páncreas; estimula las principales células gástricas e inhibe la secreción de bilis y la motilidad intestinal, así como la secreción de enzimas pancreáticas (Ross and Pawlina, 2007).

5. ANTECEDENTES

La presencia de cortactina en el páncreas se ha descrito previamente en ratas, donde se ha localizado apicalmente en las células acinares, co-localizando con actina (Figura 8). Estos resultados se confirmaron en acinos aislados, observando más claramente la localización de cortactina en la membrana apical y en la parte apical de la membrana lateral de las células, donde se encuentran las UICs. En este caso, la actina también presentó el mismo patrón de distribución, aunque la tinción fue más prominente (Singh and McNiven, 2008).

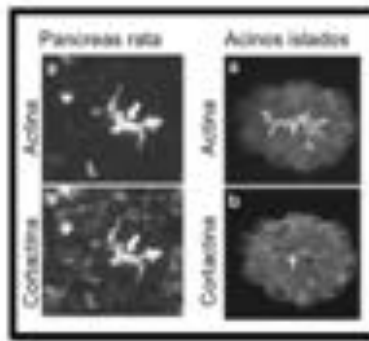


Figura 8. Localización de cortactina en páncreas y acinos aislados. Cortes congelados de páncreas o de acinos aislados de ratas, se procesaron por inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos anti-cortactina y anti-actina. Las preparaciones se observaron por microscopía confocal. Tomado de (Singh and McNiven, 2008).

Asimismo, se ha descrito la expresión diferencial de cortactina en diferentes líneas celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos (BxPC-3, PANC-1, MiaPaCa-2, SU.86.86, L3.6pl, AsPC-1, Capan-1, Capan-2, Panc89 y PT45), mediante ensayos de western blot (Figura 9) (Chen *et al.*, 2019).

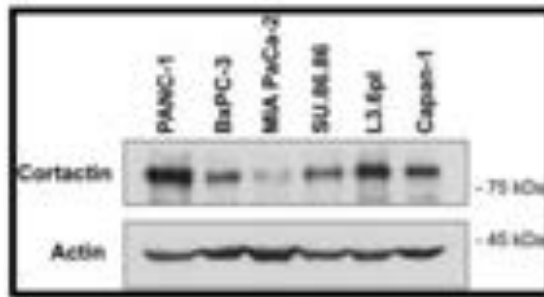


Figura 9. Expresión de cortactina en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático. Las células se lisaron y se procesaron para ensayos de western blot, empleando los anticuerpos anti-cortactina y anti-actina. Tomado de (Chen *et al.*, 2019).

Además, cortactina se expresó en los contactos célula-célula y en los lamelipodios de las líneas celulares BxPC3 y PANC-1 (Figura 10) (Chen *et al.*, 2019; Stock *et al.*, 2019).

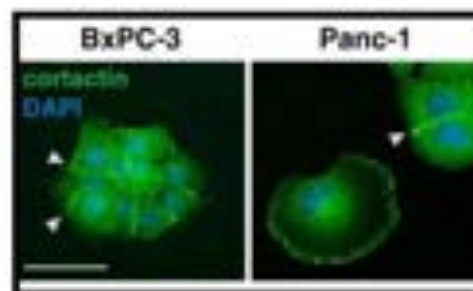


Figura 10. Localización de cortactina en las células BxPC-3 y Panc-1. Líneas celulares derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático se procesaron para inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-cortactina. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Cabeza de flecha: localización de cortactina en las UICs. Barra = 50 μ m. Tomado de (Stock *et al.*, 2019).

Por otra parte, se determinó que la cortactina es funcionalmente activa en estas células, ya que cuando las células Panc-1 se cultivaron en medio sin suero por 24 h y después se estimularon con suero fetal de ternera (FCS) al 10% por 1 h, se observó redistribución de la cortactina en "ruffles" de la membrana, co-localizando

con actina (Figura 11). Además, mediante ensayos de "herida" se observó que las células Panc-1 y BxPC3 deficientes en cortactina, disminuyeron significativamente (30–50%) su capacidad de migración, en comparación con las células control. Estos resultados demostraron que la cortactina promueve la polimerización de la actina y participa en la migración celular (Stock et al., 2019).

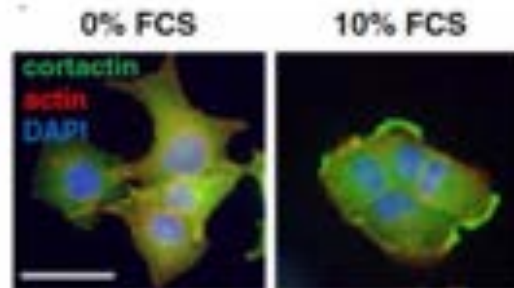


Figura 11. Activación de cortactina en células Panc-1. Las células se cultivaron en medio sin FCS por 24 h y después se incubaron por 1 h con FCS al 10%. Posteriormente, las células se procesaron para inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-cortactina y anti-actina. Los núcleos se contrañieron con DAPI. Barra = 50 μ m. Tomado de (Stock et al., 2019)

La participación de cortactina en el desarrollo del cáncer se ha demostrado en muestras de pacientes con adenocarcinoma pancreático. A través de ensayos de inmunohistoquímica y empleando anticuerpos contra cortactina, se observó que en tumores pobremente diferenciados había una sobreexpresión de la cortactina, mientras que en los bien diferenciados la expresión fue significativamente menor. (Tsai et al., 2013). Estos resultados se confirmaron en otro estudio, donde inmunohistoquímicamente se observó una expresión más alta de cortactina y de fosforilación en el residuo Tyr-421 en los tejidos metastásicos derivados de adenocarcinomas pancreáticos, comparada con la observada en el tumor primario (Figura 12). Además, en las líneas celulares Panc-1 and BxPC-3, el silenciamiento de cortactina disminuyó la migración e invasión, pero no afectó la proliferación celular (Stock et al., 2019). En conclusión, se puede señalar que la sobreexpresión de cortactina implica menor diferenciación tumoral, estado avanzado de cáncer y una proporción de supervivencia más corta en adenocarcinomas pancreáticos.

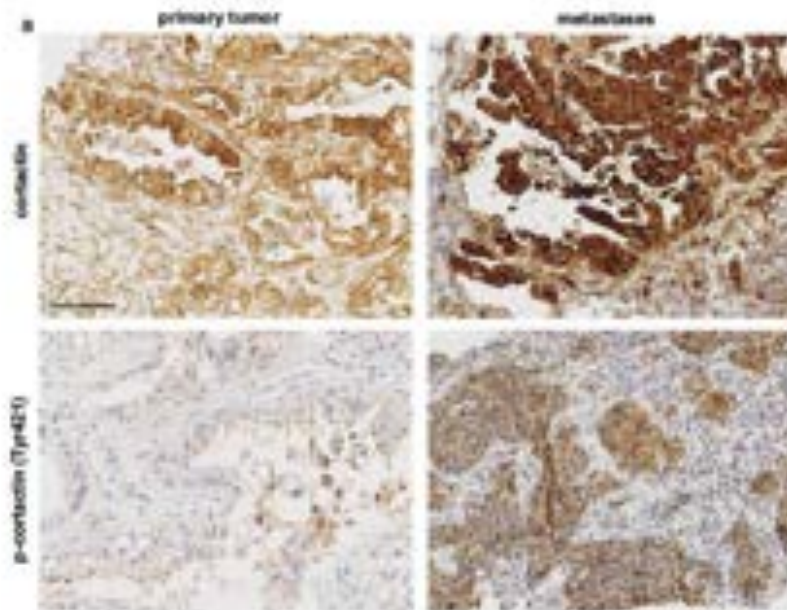


Figura 12. Expresión de cortactina en pacientes con adenocarcinomas pancreáticos. Muestras histológicas de tumor primario y tejido metastásico, se procesaron para inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-cortactina y anti-cortactina fosforilada en Tyr-421. Tomado de (Stock et al., 2019)

La cortactina también juega un papel crucial en la homeostasis del intestino, ya que su ausencia en ratones KO, incrementó la permeabilidad epitelial en un 24.8% con respecto a los animales WT (Figura 13a). En correspondencia, algunas moléculas de las UICs, responsables de regular la permeabilidad, se vieron afectadas por la carencia de cortactina. La expresión de las proteínas de la UE, ZO-1 and claudin-1, disminuyó significativamente en ratones KO. En tanto, que la claudina-2, proteína formadora de poros, incrementó en el colon de estos animales (Figura 13b). Por su parte las proteínas de la UA, E-cadherina y β -catenina, así como la actina, mostraron los mismos niveles de expresión en animales WT y KO (Citalán-Madrid et al., 2017). Los estudios de inmunofluorescencia confirmaron que ZO-1 y claudina-1 disminuyeron en los contactos celulares, mientras que hubo un aumento de claudina-2 (Figura 13c).

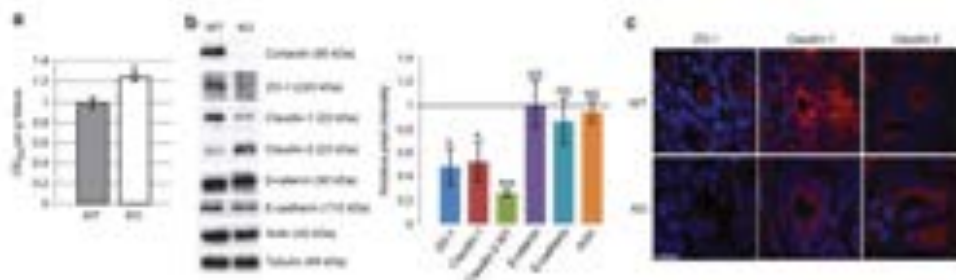


Figura 13. Efecto de la ausencia de cortactina en la permeabilidad y en la expresión de las proteínas de las UICs del epitelio intestinal de ratones. a) La permeabilidad epitelial del colorante azul de Evan se expresó como la absorción del colorante por gramo de tejido proveniente de ratones WT y KO. b) Lisados de proteínas obtenidas del colon de ratones WT y KO y procesados para ensayos de western blot, con los anticuerpos indicados a la derecha. En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico de las proteínas indicadas, con respecto al control de carga (tubulina) obtenido de tres experimentos independientes. c) Inmunofluorescencia del colon de ratones WT y KO donde se emplearon los anticuerpos marcados. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. Barra = 50 µm. Tomado de (Citalán-Madrid et al., 2017)

Además, estos resultados fueron ratificados en células depletadas en cortactina. En células epiteliales Caco-2 derivadas de cáncer colorectal, se observó una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Figura 14) y de la cantidad de las proteínas de UICs, ZO-1, ocludina, claudina-1 y E-cadherina, cuando la cortactina fue silenciada (Figura 15a). La localización de estas proteínas en los bordes celulares también disminuyó y el patrón que presentaron fue discontinuo (Figura 15b). Esto puede deberse al incremento de ROCK1, la fosforilación de MLC (por sus siglas en inglés de myosin light chain) y a la contracción del citoesqueleto de actina en las células deficientes de cortactina. Así, el incremento de la fuerza de contracción podría causar la desestabilización de las UICs y el aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal (Citalán-Madrid et al., 2017).

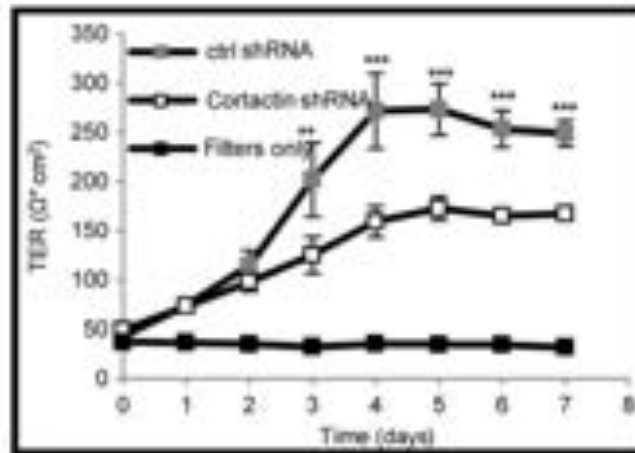


Figura 14. Permeabilidad de las células Caco-2 silenciadas en cortactina. La TER de las células epiteliales control (ctrl shRNA) y disminuidas en cortactina (cortactin shRNA) se monitoreó durante 7 días. Tomado de (Citalán-Madrid et al., 2017).

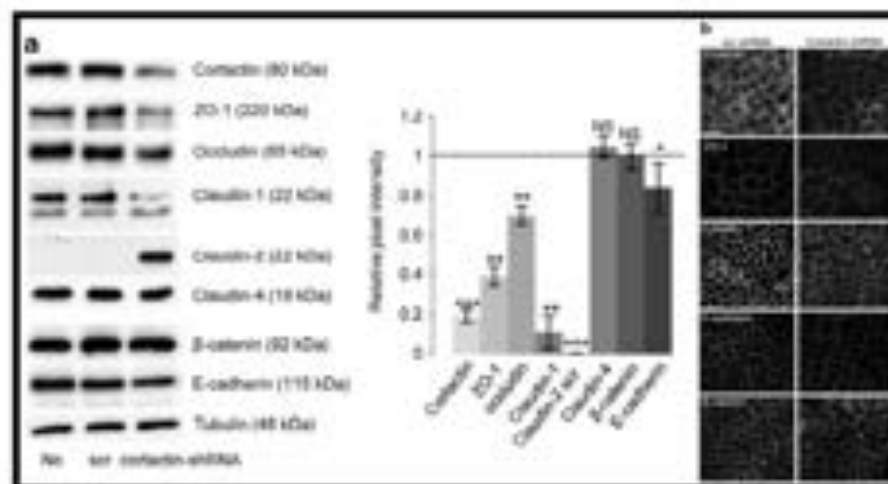


Figura 15. Expresión y localización de proteínas de las UICs en células Caco-2. Células Caco-2 fueron silenciadas en cortactina (cortactin-shRNA) y comparadas con células control (scr y no). **a)** Lisados de células epiteliales analizados por western blot. El panel derecho muestra el análisis densitométrico de las proteínas, normalizado con respecto al control de carga (tubulina). **b)** Inmunofluorescencia de las células intestinales empleando los anticuerpos señalados. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. Barra = 20 μ m. Tomado de (Citalán-Madrid et al., 2017).

En el intestino, se ha observado que la cortactina es clave durante el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Ratones KO de cortactina, fueron más susceptibles a desarrollar colitis producida con dextrán sulfato de sodio y mostraron un daño

severo en el colon, así como la formación de edema. Además, en pacientes con enfermedades inflamatorias del colon, se ha observado una disminución de los niveles de cortactina, principalmente en la zona de los contactos intercelulares, así como pérdida de la co-localización con ZO-1 (Figura 16) (Citalán-Madrid et al., 2017).

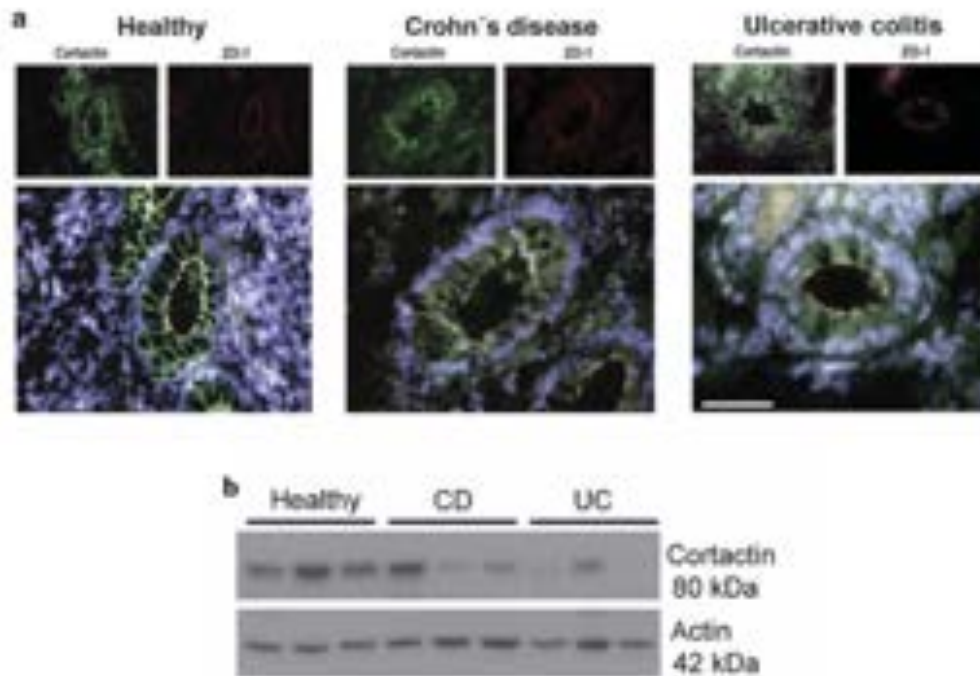


Figura 16. Disminución de cortactina en el colon de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales. a) Inmunofluorescencias de cortactina (verde) y ZO-1 (rojo) de criptas de individuos sanos (healthy), con enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerativa (UC). Barra = 50 μ m. b) Análisis de western blot del nivel de cortactina en lisados del colon provenientes de pacientes sanos, con CD y UC. El control de carga fue actina. Tomado de (Citalán-Madrid et al., 2017).

La cortactina no sólo es crucial para la barrera epitelial, pues también en el endotelio se ha reportado que la deficiencia de cortactina produce un aumento de la permeabilidad. Además, la presencia de cortactina es necesaria para una óptima extravasación de neutrófilos (Schnoor et al., 2011).

Todos estos hallazgos indican que la cortactina es un regulador maestro de la integridad de las barreras epiteliales y endotelios, como se ha descrito para el

25

intestino. Por lo tanto, cabe esperar que participe activamente en la homeostasis de otro tipo de epitelios como el epitelio glandular del páncreas.

6. JUSTIFICACIÓN

Las uniones intercelulares del epitelio pancreático son cruciales para las funciones secretoras de esta glándula. Dentro de las proteínas que regulan las funciones de las uniones se encuentra la cortactina.

En el intestino, la ausencia de cortactina causa una disfunción de la barrera epitelial, modulando cambios del citoesqueleto y proteínas de las UICs. Sin embargo, poco se sabe de su expresión en el páncreas, cómo participa en la permeabilidad epitelial y cómo ésta se modula por agentes patógenos. Aunque los mecanismos elucidados en otros tejidos, contribuirían a entender el efecto de la cortactina en el páncreas.

7. HIPÓTESIS

En el páncreas, la cortactina modula el citoesqueleto de actina y proteínas de las UICs, participando así en la homeostasis de la barrera epitelial.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la deficiencia de cortactina en el páncreas sobre la actina y las proteínas de las UICs, así como en la barrera epitelial de células ductales.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto de la deficiencia de cortactina sobre la morfología del páncreas de ratones KO en cortactina.
2. Analizar si la deficiencia de cortactina afecta la expresión y localización de actina y de las proteínas de las UICs de ratones KO en cortactina.
3. Investigar si el silenciamiento de cortactina afecta la permeabilidad de células ductales pancreáticas.
4. Determinar la expresión y localización de actina y de las proteínas de las UICs de células ductales silenciadas en cortactina.
5. Examinar el efecto de la infección con *H.pylori* sobre la permeabilidad de células ductales silenciadas en cortactina.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

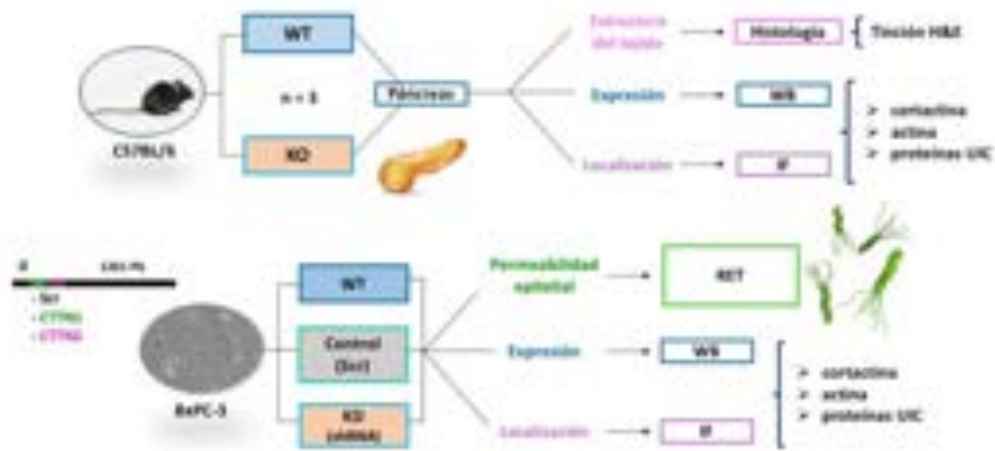


Figura 17. Representación esquemática de la estrategia experimental. En la primera parte de este trabajo se emplearon ratones de la cepa C57BL/6, a los cuales se les extrajo el páncreas. Este órgano se procesó para funciones histológicas con hematoxilina y eosina (H&E), ensayos de western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF). En la segunda parte de la tesis, se emplearon células BxPC-3 silenciadas en cortactina (KD) y como control se usaron células transfectadas con una secuencia desordenada de cortactina (Scr) o sin transfectar (WT). Estas células se sometieron a ensayos de resistencia eléctrica transepitelial (RET), WB e IF. Adicionalmente, las células BxPC-3 se infectaron con *H. pylori* y se midió su RET.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia y western blot. Las concentraciones utilizadas están descritas en la metodología.

Anticuerpos	Marca/País
Conejo anti-cortactina	Thermo-Fisher, E.U.A
Conejo anti-ZO-1	Invitrogen, E.U.A
Conejo anti- claudina 1	Thermo-Fisher, E.U.A
Conejo anti- ocludina	Thermo-Fisher, E.U.A
Conejo anti- E-cadherina	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-GAPDH	Thermo-Fisher, E.U.A
Conejo anti- actina	Thermo-Fisher, E.U.A
Ratón anti-cortactina	Milipore, E.U.A
Cabra anti-conejo-HRP	Santa Cruz, E.U.A
Cabra anti-ratón-HRP	Santa Cruz, E.U.A

Tabla 2. Reactivos utilizados en los experimentos del presente trabajo.

Reactivos	Marca/País
Anestésico general de uso veterinario xilazina y ketamina	PISA, México
Buffer salino de fosfatos 1X, PBS	Sigma-Aldrich, E.U.A
Detergente no iónico, NP-40	Sigma-Aldrich, E.U.A
Detergente no iónico Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, E.U.A
Detergente no iónico Tween® 20	Sigma-Aldrich, E.U.A
Dextrano sulfato de sodio, DSS	Sigma-Aldrich, E.U.A
Glicerol	Sigma-Aldrich, E.U.A
Poliéterimida	Sigma-Aldrich, E.U.A
Medio RPMI 1640	Biowest, E.U.A
Suero fetal Bovino (SFB)	Biowest, E.U.A
Dihidrocloreuro de puromicina	Sigma-Aldrich, E.U.A
Substrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico/Femto	T. Scientific, E.U.A

10.1 Cultivo de células epiteliales: las células humanas derivadas de un adenocarcinoma ductal pancreático BxPC-3 se cultivaron y crecieron en medio RPMI-1640, suplementado con 0.25 µg/ml de anfotericina B, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina y 10% de suero fetal bovino (SFB).

Las células embrionarias derivadas de riñón humano HEK293 se crecieron en medio DMEM, suplementado con 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina, 1x de aminoácidos no esenciales y 10% de SFB.

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%.

10.2 Cultivo bacteriano: la cepa de referencia ATCC 26695 de *H. pylori* se creció en medio base Casman, suplementado con 5% de sangre desfibrinada de camero

envejecida. Las bacterias se incubaron a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂. Adicionalmente, las bacterias se almacenaron en caldo Brucella al 28%, suplementado con 10% de SFB y 50% de glicerol, y se mantuvieron a -70°C.

10.3 Cuantificación de bacterias: un inóculo de bacterias crecidas durante 48 h en agar Casman, se resuspendió en medio RPMI-1640 sin suero y posteriormente se llevo a cabo una dilución 1:100 en 1 ml de medio Müeller Hinton. La absorbancia de esta solución se midió por espectrofotometría a $\lambda=540$ nm. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se cuantificaron con la fórmula $UFC = Abs / 8 \cdot 10^{-10}$.

10.4 Animales: se emplearon ratones hembras y machos de 6-8 semanas de vida de la cepa C57BL/6, tipo silvestres (WT) y knockout (KO) deficientes en cortactina. Los animales KO de cortactina se generaron mediante el sistema Cre-LoxP para eliminar el exón 7 (Schnoor *et al.*, 2011). Los ratones KO mostraron un fenotipo y comportamiento normal. Los ratones se alojaron en el bioterio del Cinvestav, en condiciones específicas libres de patógenos y se les suministró agua y alimento *ad libitum*. El Comité de Cuidado y Uso de Animales de Cinvestav (México) aprobó todos los experimentos llevados a cabo con los animales.

10.5 Extracción de páncreas: los ratones WT y KO se anestesiaron intraperitonealmente con 125 mg/kg de ketamina (Sanofi) y 12.5 mg/kg de xilazina (Phoenix Scientific) y se sacrificaron por dislocación cervical. Seguidamente se realizó una laparotomía para extraer el páncreas, el cuál se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 138 mM, KCl 3 mM, NaHPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM). El tejido fue preservado con Tissue-Tek® para su procesamiento por inmunofluorescencia, embebido en parafina para su análisis histológico y en congelación a -70°C para su estudio mediante ensayos de western blot.

10.6 Análisis histológico: el páncreas se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS y se incluyó en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 5-10 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las muestras se

observaron a través de un microscopio de luz (Axiolab, Zeiss) y el área de los islotes de Langerhans y ductos se cuantificaron con el programa ImageJ.

10.7 Silenciamiento de cortactina en células BxPc-3: para la generación de células depletadas en cortactina, se empleó la técnica de ARNs de horquilla corta (shRNA: short hairpin RNA, por sus siglas en inglés). Las secuencias específicas del gen de cortactina fueron: Secuencia cortactina-1: aagctgagggagaatgctttt, oligo sentido: 5'-ccggaagctgagggagaatgcttttctcgagaaagacattctocctcagcttttttg-3', oligo antisentido: 5'-aattcaaaaaaagctgagggagaatgcttttctcgagaaagacattctocctcagctt-3'; Secuencia cortactina-2: caccaggagcatalcaacata (Qiagen siRNA CTTN 5, 85% de acuerdo a nuestra experiencia), oligo sentido: 5'-cggcaccaggagcatalcaacatactcgagtatgttgatagctcctgggttttttg-3', oligo antisentido: 5'-aattcaaaaaacaccaggagcatalcaacatactcgagtatgttgatagctcctgggt-3'. La secuencia control (Scr, scrambled por sus siglas en inglés) empleada fue 5'-cggagaagtggagaagcatac-3'. Estas tres secuencias se clonaron en el vector lentiviral pLKO.1-TRC. La producción del vector lentiviral se llevó cabo en células HEK293, mediante el empleo del Kit Trans-Lentiviral (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se colocaron 2.4 ml de medio DMEM sin suero y se mezclaron con 140 µl de polietilimina (mezcla 1). Paralelamente, se mezclaron los plásmidos de empaquetamiento y los shRNA específicos para cortactina o el shRNA control (Scr) (mezcla 2). Posteriormente, en un tubo de polipropileno se combinaron las dos mezclas y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Seguidamente, las mezclas se adicionaron a las células HEK293 crecidas a un 70-80% de confluencia, en una placa de 10 cm con 5 ml de medio DMEM, suplementado con SFB al 5%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron durante 6 h a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Después de este tiempo, el medio de transfección se cambió por medio DMEM fresco suplementado con 5% de FBS y sin antibióticos o antimicóticos. Al cabo de 48 y 72 h, el medio de las células se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min a 4°C y después a 13,000 rpm durante 2 h. La pastilla obtenida y conteniendo a los virus, se resuspendió en medio RPMI-1640; 3 ml de esta mezcla se colocaron a células BxPC-3 con una confluencia del 80% y se crecieron en placas de 6 pozos.

Adicionalmente, a cada pozo se le añadió 8 µg/ml de polybrene, el cual ayuda a aumentar la eficacia de la transfección. Las placas se centrifugaron a 3,000 rpm por 1 h a 32°C. Las células se incubaron a 37°C y después de 24 h, se cambió el medio por medio RPMI fresco con puromicina a una concentración de 1 µg/mL. Cada dos días se reemplazó el medio por medio fresco con antibiótico. El silenciamiento de la cortactina se evidenció mediante ensayos de western blot.

10.8 Lisado de tejido y células: el páncreas se lisó con buffer RIPA (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1M, EDTA 50 mM, EGTA 50 nM, desoxicolato de sodio 10%, NP-40 20% e inhibidores de proteasas Complete™ [Roche]), mediante el uso de un homogenizador durante 3 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se agitaron suave durante 1 h a 4°C y se centrifugaron a 4°C por 20 min a 15,000 rpm. El sobrenadante con las proteínas totales se recuperó.

Las células BxPC-3 se lavaron tres veces con PBS frío y se lisaron también con buffer RIPA durante 30 min en agitación suave a 4°C. Los extractos se sonicaron tres veces por 5 seg a 80% de intensidad en un sonicador y después se centrifugaron por 15 min a 14,000 rpm a 4°C, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recolectó.

Las proteínas totales de los sobrenadantes, se cuantificaron mediante el método de Lowry (kit DC protein assay, Bio Rad) y las muestras se alicuotaron y almacenaron a -70°C.

10.9 Ensayos tipo western blot: las muestras de proteínas se incubaron con buffer de carga Laemmli (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, bromofenol azul 0,004% y Tris HCl 0,125 M,) y se hirvieron durante 5 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6, 8 10 y 12%, los cuales se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 1.5 h a 400 mA. Luego, las membranas se bloquearon en leche baja en grasa al 5% durante 2 h a TA en agitación. Después, se incubaron a 4°C durante toda la noche (ON) con los anticuerpos primarios específicos, hecho en conejo: α-cortactina (1:1000), α-actina (1:1000), α-occludina (1:500), α-ZO-1 (1:500) y α-GAPDH (1:1000) y hecho en ratón: α-claudina-1 (1:250), diluidos en leche baja en grasa al 5%. Al día siguiente, las membranas se

lavaron tres veces con TBS (50 mM de Tris-Cl pH 7.5 y 150 mM de NaCl) suplementado con Tween-20 al 0.05%, durante 10 min cada vez. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 2 h a TA con los anticuerpos secundarios respectivos acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y diluidos 1:10,000 en leche baja en grasa al 5%. Después, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween durante 10 min cada vez y las proteínas específicas se revelaron por quimioluminiscencia empleando el kit de Supersignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher).

10.10 Inmunofluorescencia indirecta: El páncreas embebido en Tissue-Tek® se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se cortó en secciones de 5 µm en un criostato. Las rebanadas se colocaron sobre un portaobjetos, se fijaron con etanol absoluto por 20 min a -20°C, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) libre de IgG al 0.5% durante 2 h a TA y se lavaron tres veces por 5 min, cada vez con PBS. Después, las preparaciones se incubaron ON con los anticuerpos primarios de conejo α-cortactina (1:500), α-occludina (1:200), α-claudina (1:50) y α-ZO-1 (1:50) y se lavaron 3 veces por 5 min cada vez con PBS. A continuación, las muestras se incubaron durante 2 h a TA y en oscuridad, con los anticuerpos secundarios respectivos acoplados a fluorocromos (FITC, TRITC, Cy5 o Alex 647). Después de tres lavados similares a los anteriores, las preparaciones se incubaron con faloidina rodaminada (1:100) por 20 min en oscuridad, se volvieron a lavar tres veces con PBS y los núcleos se tñeron con 2.5 µg/ml de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 min a TA. A continuación, las preparaciones se lavaron nuevamente con PBS y para preservar la fluorescencia se colocaron 5 µl de Vectashield (Vector). Las preparaciones se cubrieron con un cubreobjetos y se analizaron en un microscopio confocal (Leica TCS_SP5_MO), a través de secciones digitales de 0.5 µm de grosor en el plano xy. Para todos los ensayos se analizaron 10 campos por condición y se seleccionaron las imágenes más representativas de cada tejido.

Por otra parte, las células BxPC-3 se cultivaron a confluencia en cubreobjetos y después de tres lavados con PBS, se fijaron durante 30 min a 4°C con PFA al 4%. A continuación, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 10 min a TA. Después de tres

lavados más con PBS, las muestras se bloquearon y procesaron como anteriormente se mencionó para el tejido pancreático. El análisis en el microscopio confocal se llevó a cabo tanto en el plano *xy*, como en el *xz*.

10.11 Mediciones de resistencia eléctrica transepitelial (RET): las células BxPC-3 se sembraron en filtros Transwell® (poro de 0.4 μm) y cuando alcanzaron el 100% de confluencia y desarrollaron una resistencia aproximada de 200 Ω/cm^2 , la RET de cada filtro se monitoreó durante cada 24 h durante 7 días con un voltímetro EVOM (World Precision Instruments). Los valores de RET se normalizaron de acuerdo con el valor inicial de cada Transwell.

10.12 Infección de las células BxPC-3 con *H. pylori*: células BxPC-3 se sembraron en filtros Transwell y cuando las células alcanzaron 100% de confluencia y desarrollaron una resistencia estable, se infectaron con *H. pylori* a un MOI 1:100. La RET de cada filtro se monitoreó después de 24 y 48 h con el voltímetro EVOM. Los valores de RET se normalizaron de acuerdo con el valor inicial de cada Transwell, previo a la infección.

10.13 Análisis de glucosa en sangre: Se tomó una gota de sangre de los ratones WT y KO y se colocó en el glucómetro, y el resultado es en mg/dl.

10.14 Análisis estadístico: todos los resultados obtenidos representan los datos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado y en la mayoría de los casos se muestra la media y el error estándar. El análisis estadístico realizado en el programa GraphPad Prism 5, incluyó *t* de Student y Anova y la significancia estadística correspondió a (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ o (***) $p < 0.001$.

11. RESULTADOS

11.1 La deficiencia de cortactina no produce cambios morfológicos en el páncreas de ratones

La cortactina es una proteína multifuncional que participa en diversos procesos celulares relacionados con la actina, incluyendo la adhesión (Tilghman and Hoover, 2002). A pesar de que se ha detectado la expresión de esta proteína en el páncreas y su localización en los bordes celulares (Singh and McNiven, 2008), aún se desconoce su función en este órgano, ni su relación con la actina. Por lo tanto, en este trabajo para determinar la participación de la cortactina en el páncreas, particularmente en la adhesión célula-célula y su efecto en la actina, se empleó en la primera parte de este trabajo ratones KO de cortactina y en la segunda parte se generaron células silenciadas en cortactina.

En primer lugar, se estudió la morfología del páncreas de los ratones mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina. En las imágenes obtenidas de ratones KO y WT, se observó tejido endócrino, conformado por islotes de Langerhans y, tejido exocrino constituido por abundantes acinos y ductos. Los acinos se encontraron rodeados por copioso tejido conectivo. Además, también se apreciaron venas y arterias, indicando que el páncreas es un órgano bien irrigado (Figura 18). Sin embargo, a simple vista no se apreciaron diferencias morfológicas indicativas de algún tipo de daño tisular producido por la deficiencia de cortactina. Por tal motivo, mediante el análisis de diferentes campos ópticos se evaluó el tamaño de los islotes de Langerhans y de los ductos, en ambos tipos de animales. Las gráficas mostraron que el área de los islotes provenientes de los animales KO de cortactina son ligeramente mayores que los de animales WT, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 19). En cambio, el área de los ductos pancreáticos en ambos animales es similar (Figura 20).

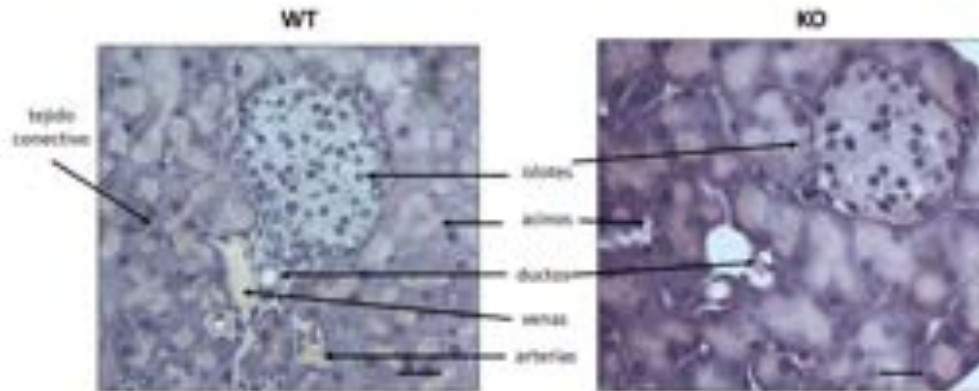


Figura 18. Tinción histológica del páncreas derivado de ratones. El páncreas de ratones KO de cortactina y WT se disecó, se embebió en parafina y se procesó para histología con tinción de hematoxilina y eosina. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico con un objetivo de 40x. Barra= 20 μm

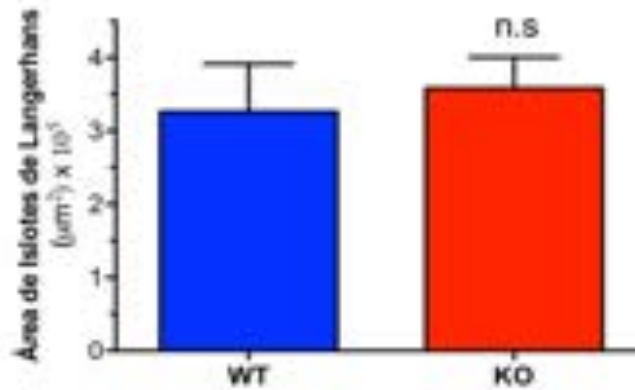


Figura 19. Cuantificación del área de islotos de Langerhans en el páncreas murino. El área de los islotos se cuantificó en 45 islotos de Langerhans teñidos con hematoxilina y eosina de 3 ratones WT o KO. La cuantificación se llevó a cabo en el programa ImageJ. Los valores representan la media y el error estándar, los cuales fueron analizados estadísticamente con la prueba 'T' de Student. n.s=no significativo

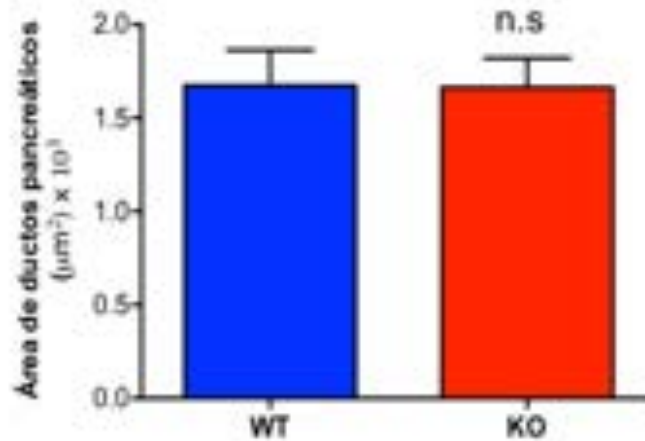


Figura 20. Cuantificación del área de los ductos pancreáticos murinos. El área de los ductos se cuantificó en 20 ductos pancreáticos teñidos con hematoxilina y eosina de 3 ratones WT o KO. La cuantificación se llevó a cabo en el programa ImageJ. Los valores representan la media y el error estándar, los cuales fueron analizados estadísticamente con la prueba T de Student. n.s. no significativo

Con estos resultados se puede concluir que la deficiencia de cortactina aparentemente no afectó la morfología del páncreas (endócrino o exócrino) de estos ratones. Sin embargo, no se puede descartar que existan alteraciones moleculares que podrían afectar la función pancreática.

11.2 La falta de cortactina produce una disminución de la expresión y localización de la actina en el páncreas de ratones

La cortactina se ha descrito como una proteína de asociación con la actina, debido a que posee dominios de unión a esta molécula, además interactúa con otros reguladores de la actina como Arp2/3, WASP y dinamina (Weed and Parsons, 2001; Martínez-Quiles et al., 2004). Por lo tanto, se ha descrito que la cortactina contribuye en la regulación de la actina, en su polimerización y reorganización hacia estructuras específicas de las células como UICs, lamelopodios, invadopodios y podosomas (Yamaguchi and Condeelis, 2007). De manera que se evaluó si la ausencia de cortactina en ratones KO, podría afectar a la actina, tanto su expresión como su localización. A través de ensayos de western blot se corroboró la deficiencia de cortactina en los ratones KO (Figura 21A). En estos animales,

también se observó una disminución significativa del 43% en la cantidad de actina, en comparación con los ratones WT (Figura 21B).

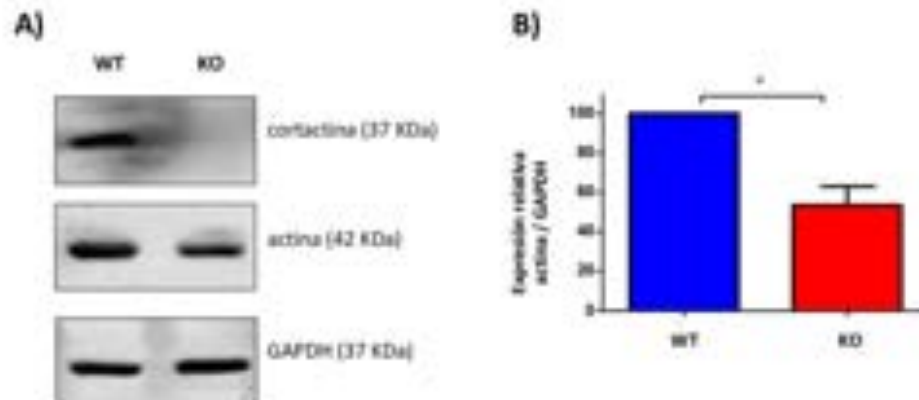
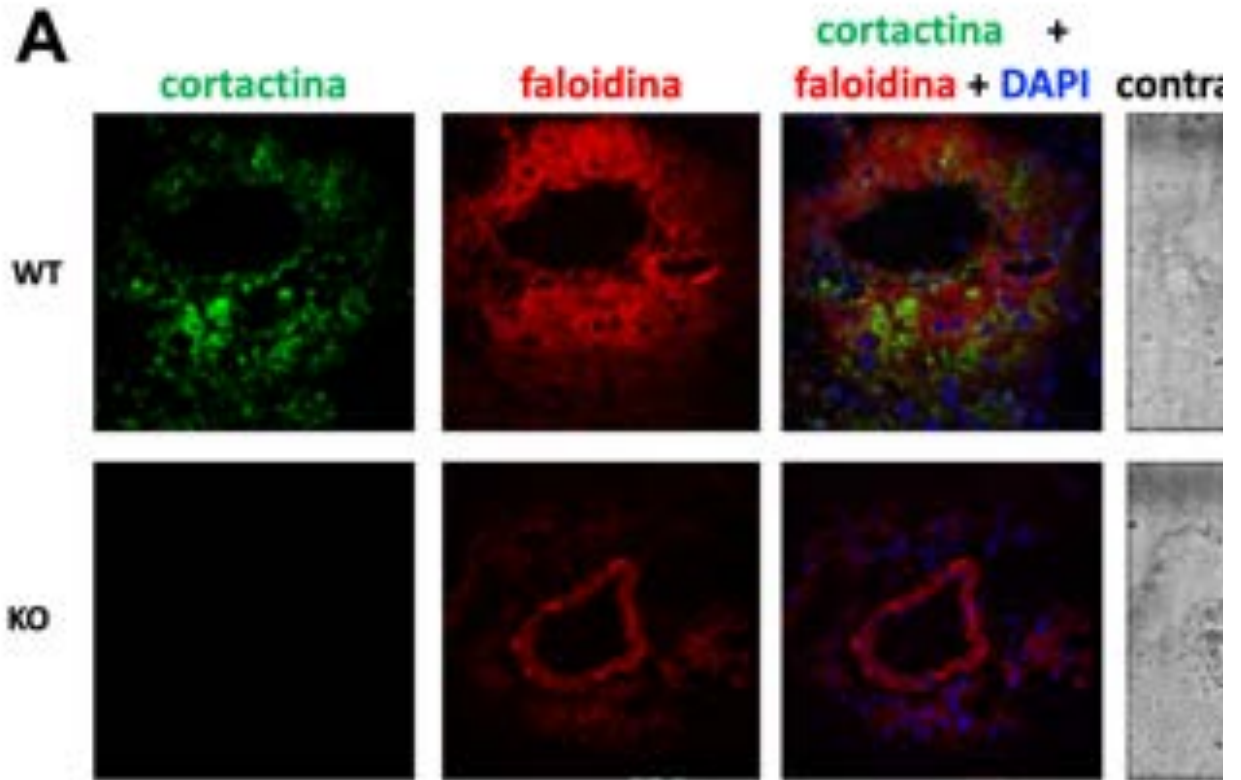


Figura 21. Expresión de actina en páncreas de ratones. **A)** Lisados de proteínas de páncreas de ratones KO y WT, fueron separados por electroforesis SDS-PAGE y electrotransferidos. Los anticuerpos empleados fueron anti-cortactina, anti-actina y como control de carga anti-GAPDH. Los números de la derecha indican el marcador del peso molecular estándar. **B)** Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la actina observada en el inciso (A) con respecto a la cantidad de GAPDH. Los valores representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes, los cuales se analizaron estadísticamente con la prueba T de Student llevada a cabo en el programa GraphPad Prism 5. (*) $p < 0.05$.

Por otro lado, la localización de cortactina y actina se analizó a través de ensayos de inmunofluorescencia en cortes congelados provenientes del páncreas de estos animales. Las imágenes mostraron que la cortactina se distribuyó tanto en la parte endócrina como exocrina del páncreas de ratones WT (Figura 22A). Cabe mencionar que, en las estructuras con lumen la cortactina se orientó hacia la parte apical. Esta localización es similar a la descrita en el páncreas de ratas y en muestras de pacientes con cáncer pancreático (Singh and McNiven, 2008; Stock et al., 2019). Como era de esperarse, en los animales KO, el anticuerpo anti-cortactina no reconoció nada (Figura 22A). Con respecto a la actina polimerizada detectada con faloidina, se observó una distribución más homogénea en el tejido pancreático de los ratones WT, aunque la tinción en la parte apical de las células ductales es bastante evidente. En cambio, en los animales KO, la actina disminuyó significativamente (57%), aunque conserva su patrón en los bordes celulares de las estructuras con lumen. La disminución de la fluorescencia correspondiente a la actina fue similar a la obtenida en la densitometría de los ensayos de western blot

(57% vs 43%). Por lo tanto, se puede concluir que la deficiencia de cortactina afecta tanto la expresión como la localización de la actina en el páncreas de estos ratones.



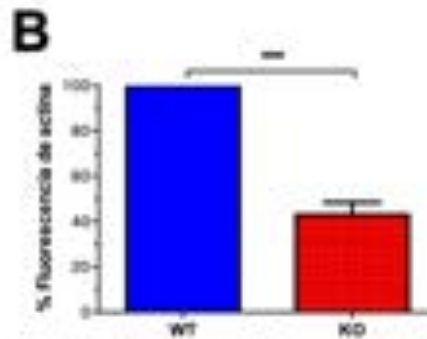


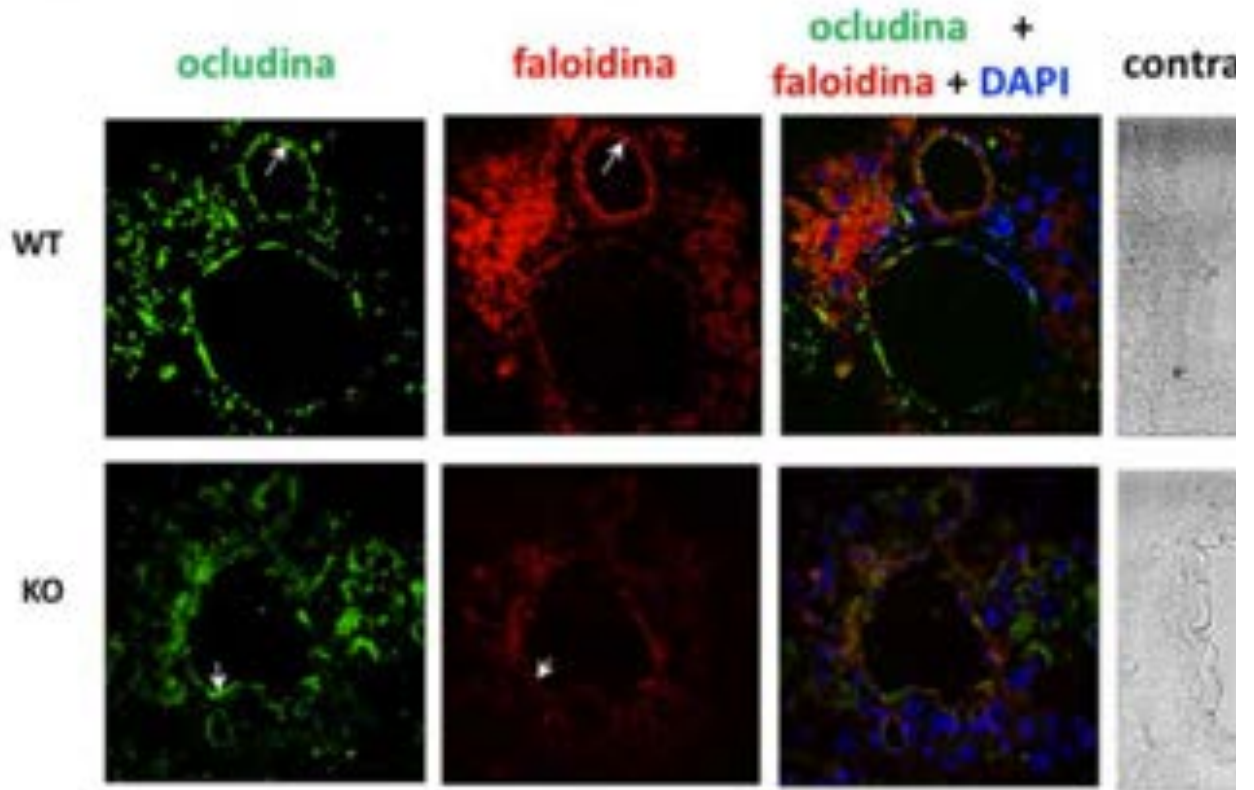
Figura 22. Localización de actina en el páncreas de ratones. **A)** Cortes congelados del páncreas de ratones WT y KO, se procesaron por inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-cortactina (verde) y posteriormente las preparaciones se incubaron con faloidina rodaminada (rojo). Los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las flechas indican la localización apical de las proteínas. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a la faloidina realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las muestras WT y representan la media y el error estándar de 14 campos analizados en tres ratones WT y KO. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (***) $p < 0.001$.

11.3 La deficiencia de cortactina afecta la localización de las proteínas de las UICs del páncreas de ratones

La formación y el mantenimiento eficiente de las UICs requiere de la fuerza generada por los rearrreglos del citoesqueleto de actina (Ivanov *et al.*, 2010). Por lo tanto, si se observaron cambios en la actina cuando se eliminó a la cortactina en el páncreas de los ratones, es posible que algunas moléculas que conforman las UICs, también se vean afectadas. En el intestino de estos ratones, las criptas del colon se ven alteradas y la cantidad de las proteínas ZO-1 y claudina-1 disminuyó (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Por otro lado, se sabe que la cortactina interactúa con ZO-1, algunos miembros de la familia p120-catenina y E-cadherina. Además, la cortactina es necesaria para la formación de los contactos celulares mediados por E-cadherina, con la participación de la actina (Martinez *et al.*, 2003; Helwani *et al.*, 2004).

Así que, en este trabajo de primera instancia se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia, la localización de ocludina, claudina-1, ZO-1 y E-cadherina. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que la ocludina presentó un patrón apical en las células que conforman a las estructuras con lumen de ratones WT. Además, esta proteína se localizó en las uniones de las células acinares

(Figura 23A). Sin embargo, en los ratones KO se observó una disminución del 53% de esta proteína, aunque el patrón de localización celular sigue siendo apical pero discontinuo (Figura 23A). En estas preparaciones, también se tñó a la actina polimerizada con faloidina y se apreció co-localización con la ocludina, sobretodo en la parte apical de las células orientadas hacia la luz de ratones WT. En tanto que, en los animales KO la co-localización fue menor.

A

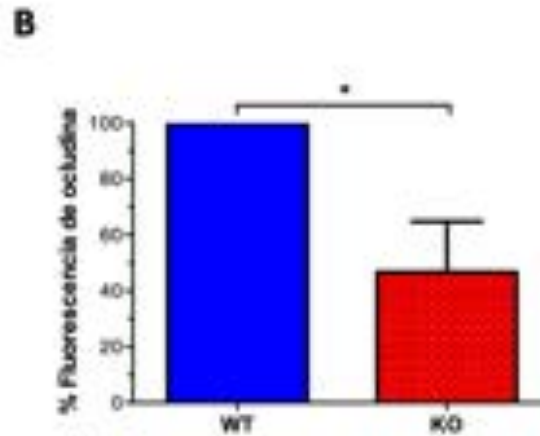
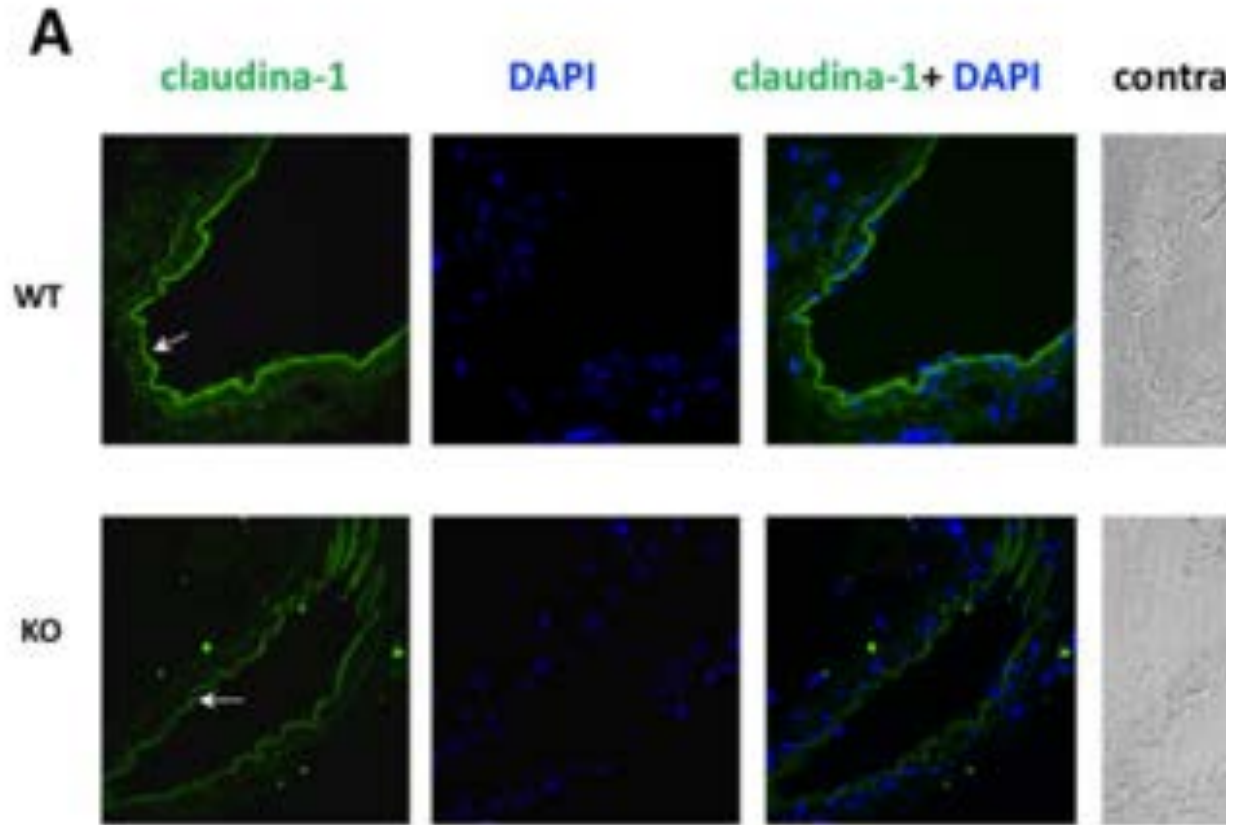


Figura 23. Localización de ocludina en el páncreas de ratones. A) Cortes congelados del páncreas de ratones WT y KO se procesaron por inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-occludina (verde). Posteriormente las preparaciones se incubaron con faloidina rodaminada (rojo) y los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las flechas indican la localización apical de las proteínas. B) Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a la ocludina realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las muestras WT y representan la media y el error estándar de 5 campos analizados en tres ratones WT y KO. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (*) $p < 0.05$.

Otras de las proteínas que se analizó fue la claudina-1, la cual mostró el patrón típico de una proteína de UE; es decir, en la parte apical de las células que componen a las estructuras con lumen de ratones WT (Figura 24A). La localización de esta proteína en los animales KO se mantiene y disminuye ligeramente, aunque la diferencia con los ratones control no fue significativa (Figura 24B).



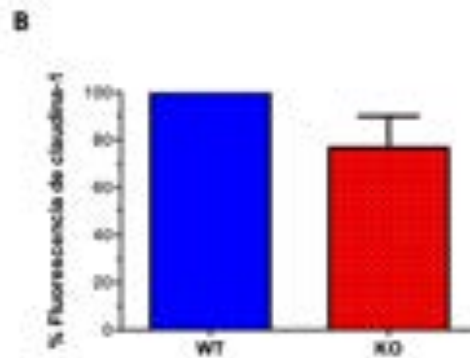
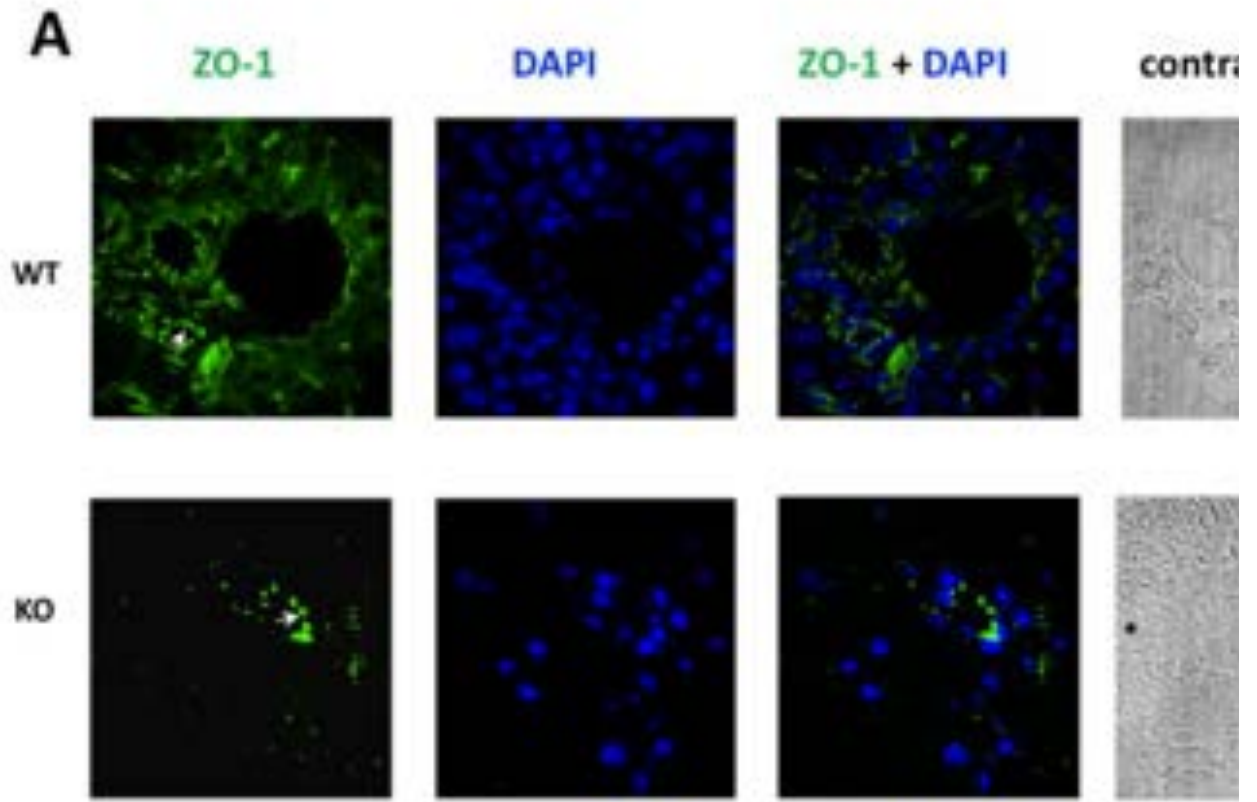


Figura 24. Localización de claudina-1 en el páncreas de ratones. A) Cortes congelados del páncreas de ratones WT y KO se procesaron por inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-claudina-1 (verde). Los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las flechas indican la localización apical de la proteína. B) Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a la claudina-1, realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las muestras WT y representan la media y el error estándar de 3 campos analizados en tres ratones WT y KO. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba "t" de Student.

En cambio, la localización de proteína ZO-1, al igual que la de ocludina, se vio seriamente afectada en los ratones sin cortactina (Figura 25A). En animales WT, ZO-1 se detectó en la parte apical y en los bordes laterales, en tanto que en los ratones KO, la proteína sólo se detectó en la zona apical de algunas células ductales. La disminución de ZO-1, evaluada mediante la cantidad de fluorescencia, fue del 70% en los animales sin cortactina con respecto a los ratones control (Figura 25B).



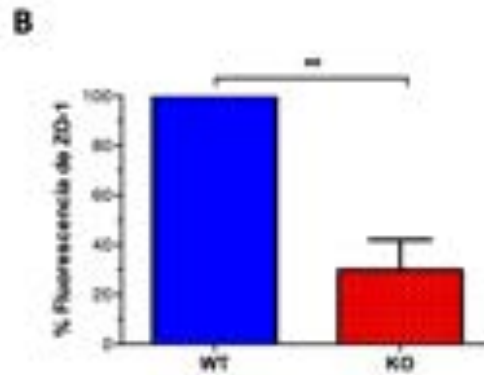
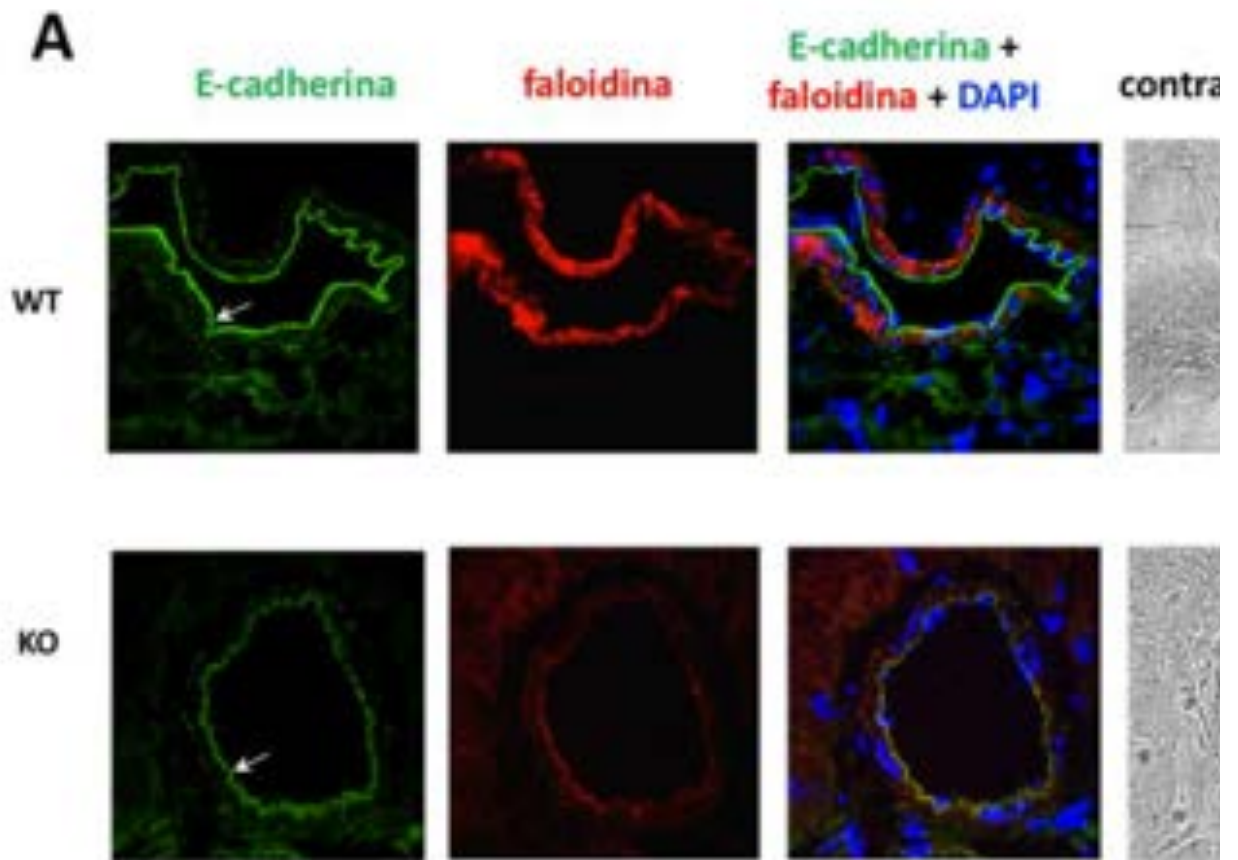


Figura 25. Localización de ZO-1 en el páncreas de ratones. **A)** Cortes congelados del páncreas de ratones WT y KO se procesaron por inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-ZO-1 (verde). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). Las flechas indican la localización apical de la proteína. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a la ZO-1, realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las muestras WT y representan la media y el error estándar de 6 campos analizados en tres ratones WT y KO. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (**) $p < 0.01$.

La proteína de la UA, E-cadherina al igual que claudina-1, presentó un patrón más definido en la parte apical de las células ductales (Figura 26A). Esta localización disminuyó en un 37% en ratones KO, en comparación con los animales WT (Figura 26B). La co-localización de E-cadherina con actina, fue más evidente en el páncreas sin cortactina.



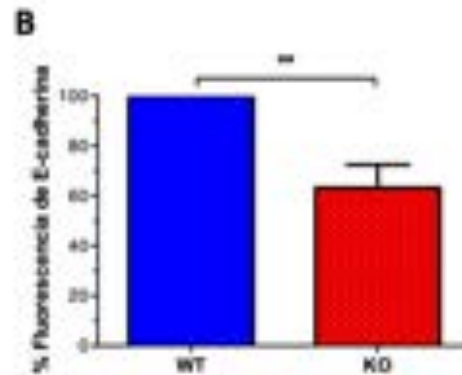


Figura 26. Localización de E-cadherina en el páncreas de ratones. **A)** Cortes congelados del páncreas de ratones WT y KO se procesaron por inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-E-cadherina (verde). Posteriormente las preparaciones se incubaron con falodina rodaminada (rojo) y los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las flechas indican la localización apical de las proteínas. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a la E-cadherina realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las muestras WT y representan la media y el error estándar de 8 campos analizados en tres ratones WT y KO. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (**) $p < 0.01$.

La alteración de la localización de la mayoría de las proteínas de las UICs analizadas en los animales KO, sugiere que la cortactina afecta los contacto célula-célula, quizá por el daño producido en la actina como se demostró en el inciso anterior. Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar las repercusiones de los rearrreglos del citoesqueleto de actina en las UICs. Además, también se debe comprobar si la falta de cortactina disminuye la cantidad de las proteínas analizadas mediante ensayos de western blot.

11.4 La deficiencia de cortactina no afecta los niveles de glucosa sérica en ratones

El páncreas es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, debido a que su epitelio glandular secreta hormonas como insulina y glucagón, que contribuyen a la regulación de la glucosa en la sangre periférica (Ross and Pawlina, 2007). De manera que, los contactos intercelulares son cruciales para una adecuada respuesta secretora por parte del páncreas endócrino (Collares-Buzato et al., 2004). La síntesis y liberación de la insulina se alteró significativamente

51

después de que las células β se dispersaron y se recuperó rápidamente después de que las células se re-agregaron, indicando que el mecanismo secretor depende de las UICs dentro de los islotes de Langerhans (Halban *et al.*, 1982; Bosco *et al.*, 1989). Con estas ideas en mente, se analizaron los niveles de glucosa en sangre proveniente de ratones WT y KO. Los ratones sin cortactina presentaron valores similares de glucosa en sangre, comparados con los animales control (Figura 27). Sin embargo, se debe considerar que la glucosa fue monitoreada en animales que ingirieron alimento *ad libitum*, por lo que sería más preciso evaluar este parámetro en animales con ayuno de 12 h, para definir si la cortactina repercute o no en la homeostasis de la glucosa.

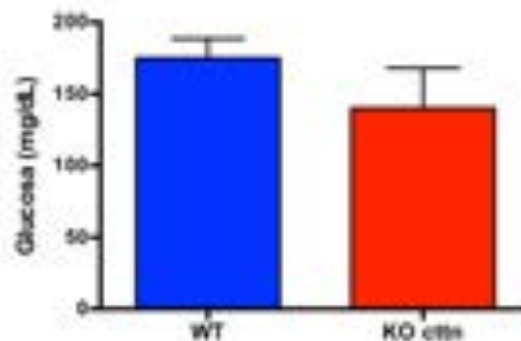


Figura 27. Determinación de glucosa en sangre de ratones. Muestras de sangre obtenida de la cola de animales WT y KO, se analizaron con un glucómetro para cuantificar la concentración de glucosa. Los datos representan la media y el error estándar de 6 animales de cada condición.

11.5 El silenciamiento de cortactina produce un aumento de la permeabilidad de células de ducto pancreático

Con la finalidad de evaluar la participación de la cortactina en la permeabilidad del epitelio pancreático, se generaron células ductales (BxPC-3) silenciadas en cortactina. El knock-down (KD) de cortactina se llevó a cabo utilizando un tipo de ARN interferente llamado "horquilla corta de ARN" (shRNA, short harping ARN por sus siglas en inglés). En este caso, se emplearon dos secuencias de ARN ubicadas en el extremo 5' del gen de cortactina, que ya han sido empleadas para generar el silenciamiento de este gen en células intestinales Caco-2 (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Como control se empleó una de las secuencias, pero en desorden y se le denominó scramble (scr). Estas secuencias (*cttn-1*, *cttn-2* y *scr*) se incorporaron en

vectores virales, los cuales se transfectaron en células BxPC-3. Las células epiteliales que incorporaron los virus se seleccionaron por su crecimiento en medio con 1 μ g/mL de puomicina. El silenciamiento de cortactina se evidenció mediante ensayos de western blot, los cuales revelaron que las células transfectadas con las secuencias ctn-1 y ctn-2 (Ctn-KD1 y Ctn-KD2) presentaron una disminución del 68% de la expresión de cortactina, en comparación con las células control (scr) (Figura 28 A-B). A pesar de que la transfección afectó ligeramente la expresión de la cortactina (compárense los valores en las células WT y scr), la diferencia no fue significativa. Por lo tanto, se puede considerar que se obtuvieron células pancreáticas silenciadas en cortactina. Dado que ambas secuencias disminuyeron la expresión de cortactina, en los experimentos subsecuentes se empleó la población celular Ctn-KD1.

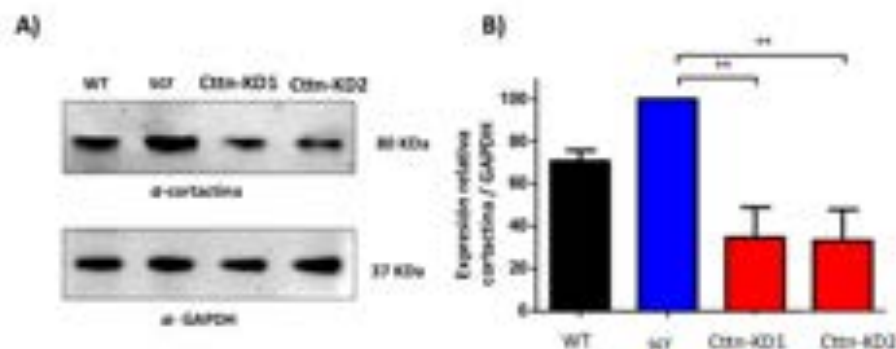


Figura 28. Expresión de cortactina en células pancreáticas. **A)** Usados proteolitos de células BxPC-3 WT o transfectadas con las secuencias ctn-1, ctn-2 o scr, se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y ensayos de western blot, empleando los anticuerpos en anti-cortactina y como control de carga anti-GAPDH. Los números de la derecha indican el peso molecular de cada proteína. **B)** Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la cortactina observada en el inciso **(A)** con respecto a la cantidad de GAPDH. Los valores representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes, los cuales se analizaron estadísticamente con la prueba T de Student en el programa GraphPad Prism 5. (***) $p < 0.01$.

Una vez que se comprobó el silenciamiento de la cortactina en las células BxPC3, se midió su permeabilidad epitelial a través de ensayos de resistencia eléctrica transepitelial (RET). Este es un método para evaluar la permeabilidad *in vitro*, ya que mide el flujo de iones a través de la monocapa celular, lo que refleja la integridad de las UICs (Srinivasan *et al.*, 2015). Los resultados evidenciaron que las células control (WT y scr) desarrollaron una resistencia estable de $\sim 170 \Omega \cdot$

cm², a partir del cuarto día de cultivo (Figura 29). En cambio, las células Ctnn-KD desarrollaron una resistencia estable a partir del tercer día, aunque fue menor (del 55 al 58%) en comparación con las células control (Figura 29).

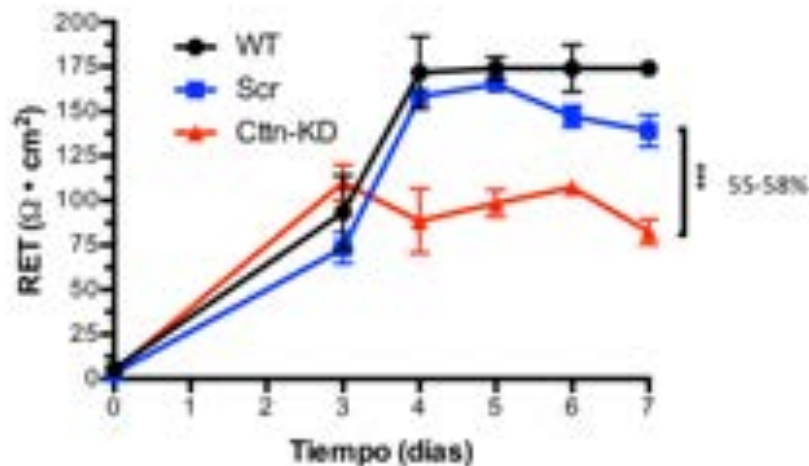


Figura 29. RET de células BxPC-3. Células BxPC-3 WT o transfectadas con las secuencias ctnn-1, ctnn-2 o scr, fueron crecidas en filtros Transwell y su RET se monitoreó durante 7 días con un electrodo EVOM. Los datos representan la media y el error estándar de un experimento llevado a cabo por triplicado. Los datos se analizaron utilizando la prueba estadística ANOVA. (**) $p < 0.01$

Estos hallazgos demuestran que la cortactina participa en la permeabilidad del epitelio ductal pancreático y sugiere fuertemente que las proteínas responsables del mantenimiento de esta barrera podrían estar alteradas.

11.6 La disminución de cortactina afecta la expresión y localización de proteínas de las UICs en células de ducto pancreático

A partir de los resultados anteriores sobre la RET, se consideró que el silenciamiento de cortactina podría afectar a los componentes moleculares de las UICs. Por tal motivo, se analizó en primer lugar la expresión y localización de las proteínas ocludina, claudina-1, ZO-1 y E-cadherina, mediante experimentos de western blot e inmunofluorescencia. En cuanto a la expresión de estas proteínas, se observó una clara disminución en células Ctnn-KD, en comparación con las células scr (Figura 30A). Sin embargo, hasta el momento solo se ha podido demostrar para la ocludina que esta reducción del 75% es significativa (Figura 30B).

Falta incrementar el número de experimentos para validar la significancia de estos datos.

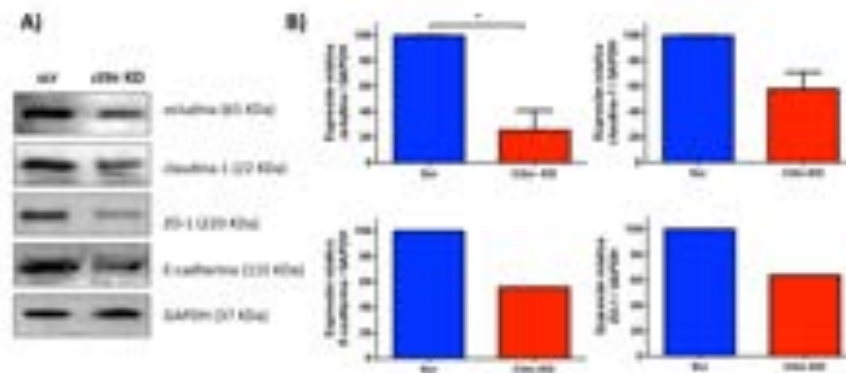
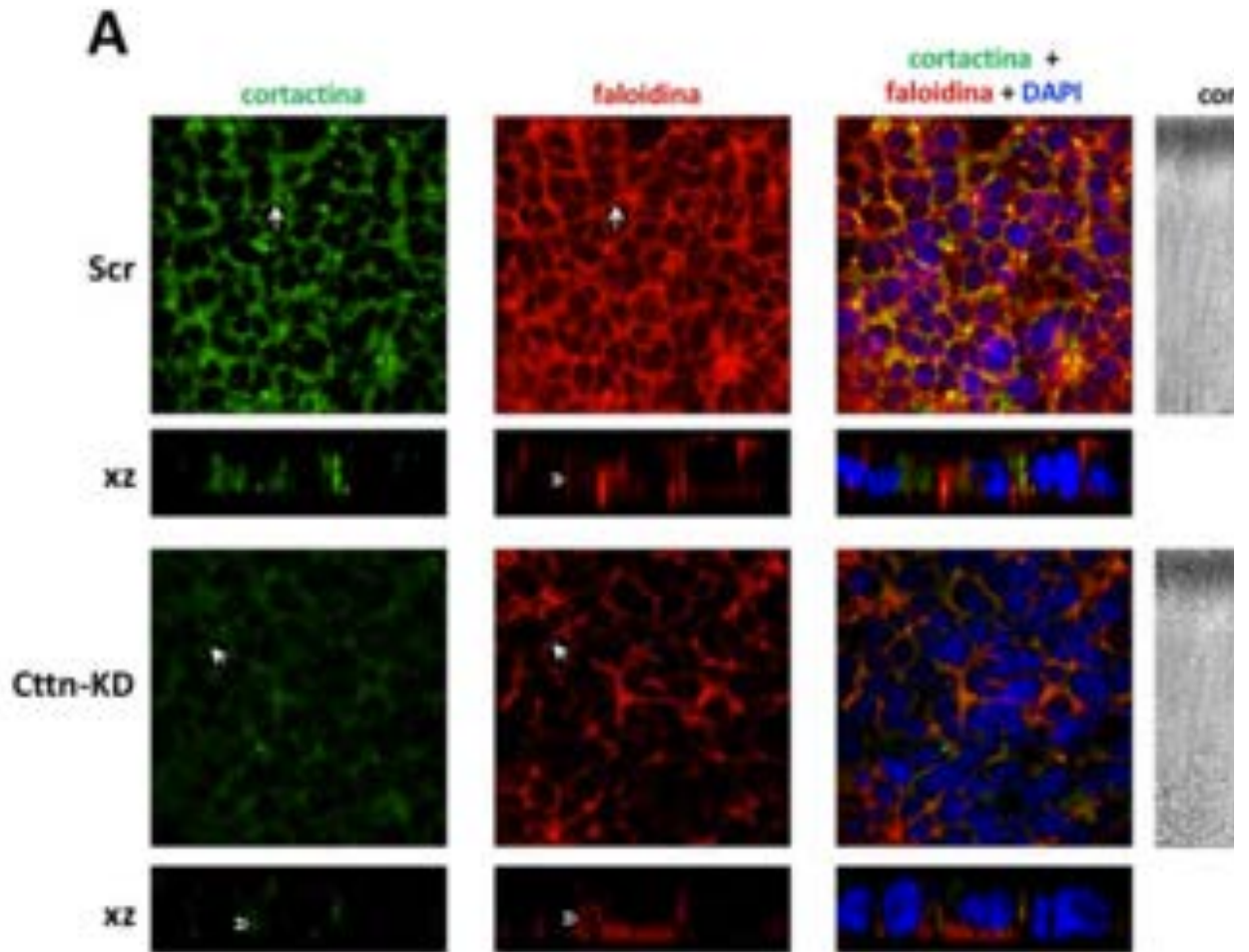


Figura 30. Expresión de occludina, claudina-1, ZO-1 y E-cadherina en células BxPC-3. A) Lisados proteicos de células BxPC-3 WT o transfectadas con las secuencias ctn-1, ctn-2 o scr, fueron separados por electroforesis SDS-PAGE y analizados mediante ensayos de western blot, empleando los anticuerpos anti-occludina, anti-claudina-1, anti-ZO-1, anti-E-cadherina y como control de carga anti-GAPDH. Los números de la derecha indican el peso molecular de las proteínas. B) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes de las proteínas analizadas en el inciso (A), con respecto a la cantidad de GAPDH. Los valores de occludina representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes, los cuales se analizaron estadísticamente con la prueba "T" de Student, llevada a cabo en el programa GraphPad Prism 5. (*) $p < 0.05$.

A continuación, se estudió la localización de cortactina y actina a través de ensayos de inmunofluorescencia. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que la cortactina se distribuyó en los bordes celulares, a lo largo de la membrana lateral, como se observa más claramente en el plano xz (Figura 31A). Asimismo, es evidente un patrón puntal de la cortactina, específicamente en la unión de tres células. Esta tinción ya ha sido descrita y se ha asociado con la co-localización de la proteína tricelulina. En células Ctn-KD, la cortactina disminuyó drásticamente en un 57%, confirmando la reducción del 68% observada por western blot (Figura 31B). En el caso de la actina polimerizada, también se observó localizada como un anillo cortical a la altura de las UEs y a lo largo de la membrana lateral (Figura 31A, véase plano xz) de las células Scr. En cambio, en las células con menos cortactina, la actina disminuyó en un 50%, principalmente en los bordes celulares, relocalizándose en la membrana lateral (Figura 31A, véase plano xz). La co-localización de cortactina y actina en los bordes celulares, fue más evidente en

células control y disminuyó significativamente en las células Ctn-KD. Cabe resaltar que estas células se observaron más dañadas, con más espacios en la monocapa (Figura 31A, véase panel de contraste de fases) y, quizá esto también contribuya al desarrollo de una menor RET que las células control.



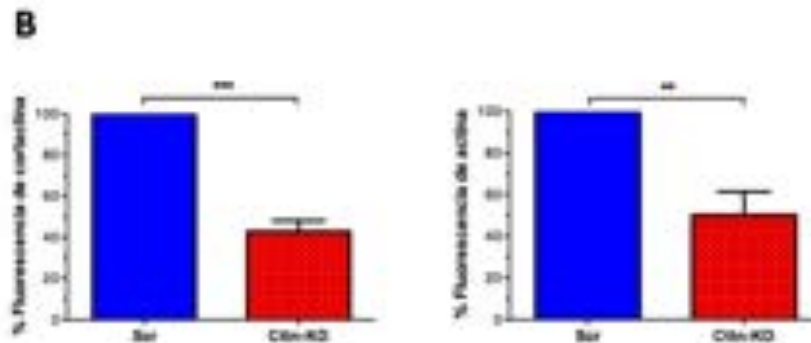
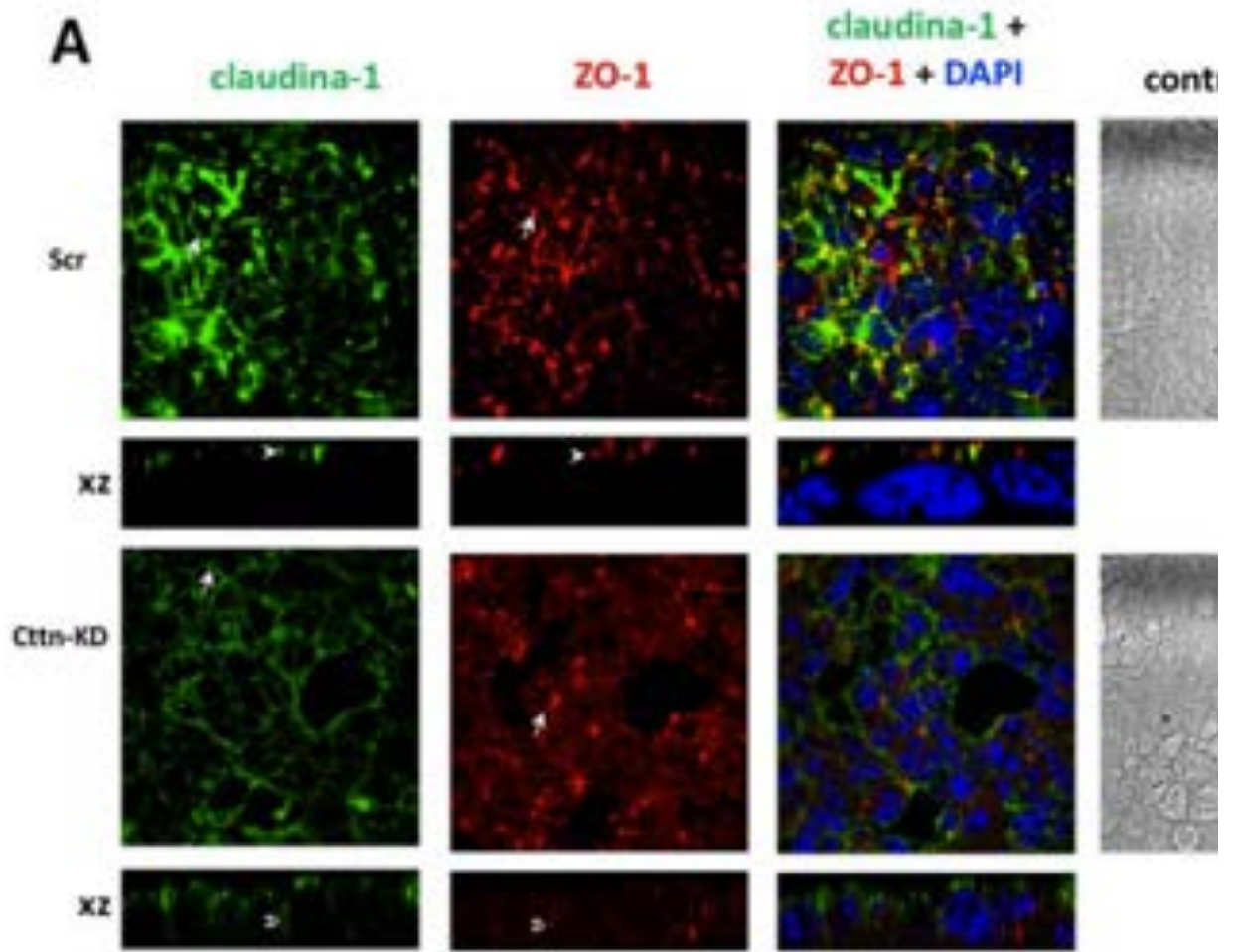


Figura 31. Localización de cortactina y actina en células pancreáticas. **A)** Células BxPC-3 transfectadas con las secuencias scr y *cttn-1* fueron crecidas a confluencia en cubreobjetos y se procesaron para inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-cortactina (verde). Posteriormente, las células se incubaron con faloidina rodamina (rojo) y los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal en los planos xy y xz. Las flechas indican el patrón puntual de la cortactina en la unión de tres células. Los asteriscos indican los huecos en la monocapa. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a cortactina y actina, realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las células Scr y representan la media y el error estándar de 10 campos analizados en cada población celular. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Estos resultados en las células BxPC-3, confirman los hallazgos en el ratón, sobre el efecto de la cortactina en la cantidad y localización de la actina.

También se analizó la localización de las proteínas de las UEs, claudina-1 y ZO-1. La claudina-1, se distribuyó típicamente en los bordes celulares de la población Scr, a la altura de la UE, como lo demuestra el plano xz (Figura 32A). En células Cttn-KD, claudina-1 disminuyó en un 50% (Figura 32A), principalmente de los bordes celulares y se redistribuyó a lo largo de la membrana lateral. Por su parte, el patrón de ZO-1 no fue tan continuo en los bordes celulares como en otros epitelios (Citalán-Madrid *et al.*, 2017), aunque en el plano xz sí se ubica en la zona de la UE de las células control. En células con menos cortactina, la reducción de ZO-1 fue del 34%, no tan drástica como en los ratones (70%). Al igual que la claudina-1, ZO-1 también se relocalizó en la membrana lateral y en el citoplasma de células Cttn-KD (Figura 32A).



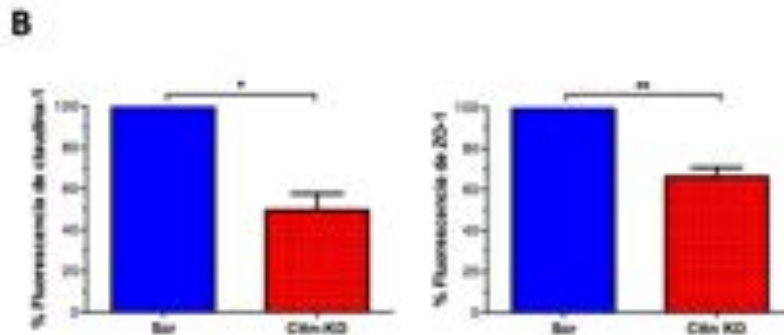
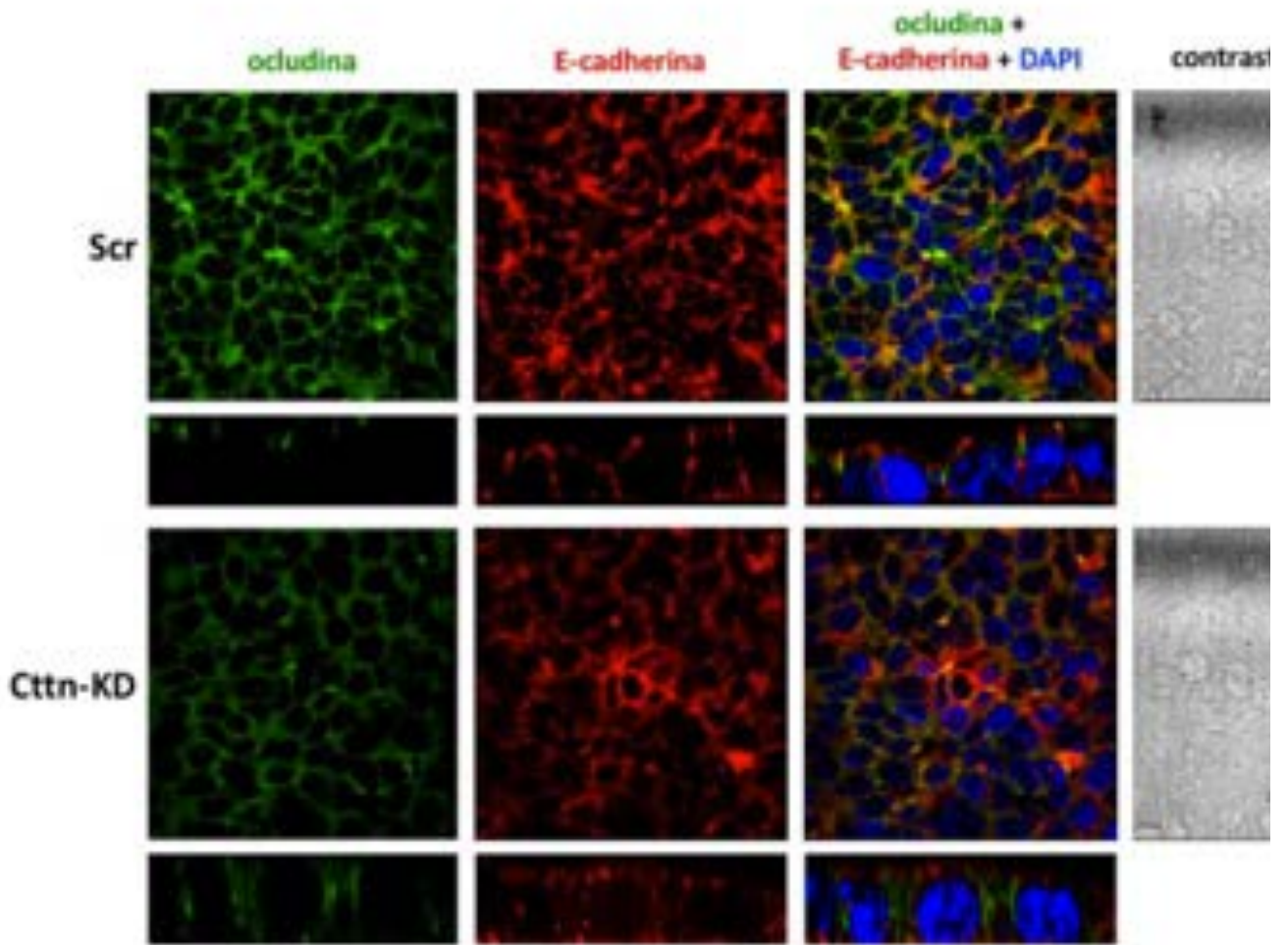


Figura 32. Localización de claudina-1 y ZO-1 en células pancreáticas. A) Células BxPC-3 transfectadas con las secuencias scr y ctn-1 fueron crecidas a confluencia en cubreobjetos y se procesaron para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos anti-claudina-1 (verde) y anti-ZO-1 (rojo). Los núcleos se contrañieron con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal en los planos xy y xz. Las flechas indican la localización de las proteínas en los bordes celulares. Las cabezas de flecha llenas señalan la ubicación de las proteínas en la UE. Las cabezas de flecha vacías apuntan la localización de las proteínas en la membrana lateral. Los asteriscos indican los huecos en la monocapa. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a claudina-1 y ZO-1, realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las células Scr y representan la media y el error estándar de 10 campos analizados en cada población celular. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba T de Student. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

La localización de la ocludina también se vio alterada por la disminución de cortactina, ya que de un patrón continuo en la UE de las células control, su expresión se redujo en un 40% y se relocalizó hacia la membrana lateral y el citoplasma de células Ctn-KD (Figura 33A). En estas mismas células, la proteína de la UA, E-cadherina exhibió un patrón discontinuo en los bordes celulares, se internalizó hacia el citoplasma y disminuyó ligeramente (20%) (Figura 33B).



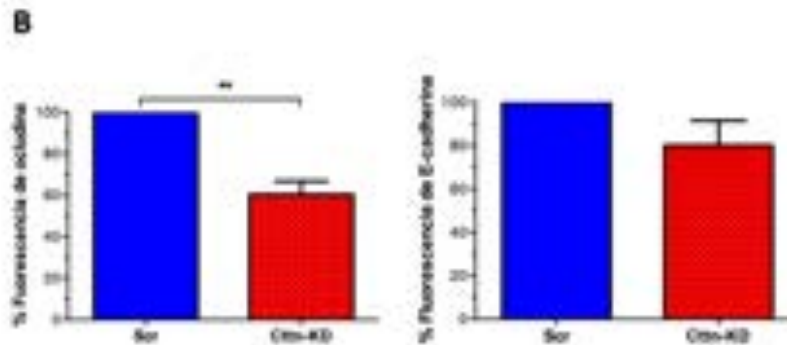


Figura 33. Localización de ocludina y E-cadherina en células pancreáticas. A) Células BxPC-3 transfectadas con las secuencias scr y ctn-1 fueron crecidas a confluencia en cubreobjetos y se procesaron para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos anti-occludina (verde) y anti-E-cadherina (rojo). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal en los planos xy y xz. Las flechas indican la localización de las proteínas en los bordes celulares. Las cabezas de flecha llenas señalan la ubicación de ocludina en la UE. Las cabezas de flecha vacías apuntan la localización de las proteínas en la membrana lateral. Los asteriscos indican los huecos en la monocapa. **B)** Cuantificación de la fluorescencia correspondiente a ocludina y E-cadherina, realizada en el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las células Scr y representan la media y el error estándar de 10 campos analizados en cada población celular. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba *t* de Student. (**) $p < 0.01$.

Estos hallazgos coinciden con la información obtenida en los westerns blot, en el sentido de que la disminución de cortactina provoca una reducción de proteínas de la UE y UA. Además, los datos *in vivo* validan esta información, indicando que como en el intestino, la cortactina en el páncreas también participa en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera epitelial, regulando los rearrreglos del citoesqueleto de actina, así como modulando la expresión y localización de los constituyentes moleculares de las UICs.

11.7 La disminución de cortactina hace más susceptibles a las células de ducto pancreático a la infección con *H. pylori*

Trabajos previos han sugerido que la cortactina participa activamente durante la infección por diversos patógenos (Dehio *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Seibach *et al.*, 2003; Bougnères *et al.*, 2004; Cantarelli *et al.*, 2006). En células gástricas infectadas con *H. pylori*, la inhibición de la cinasa Src induce la fosforilación de la cortactina y esto produce rearrreglos en el citoesqueleto de actina, lo que conlleva

al fenotipo colibrí característico de las células infectadas (Selbach *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha detectado la presencia de *H. pylori* en el páncreas y se ha demostrado que afecta la permeabilidad epitelial y a las proteínas de las UICs (Testerman and Morris, 2014; Hurtado, 2018). De manera que, en este trabajo se evaluó si la cortactina contribuía en el daño producido por esta bacteria en el epitelio pancreático. Así, células silenciadas en cortactina se infectaron con *H. pylori* a una MOI 1:100 y después de 24 y 48 h se monitoreó su RET. Con la finalidad de observar mejor las diferencias, todos los valores se normalizaron al 100% con respecto al valor inicial de RET de cada Transwell. Los resultados mostraron que la infección bacteriana disminuyó en aproximadamente un 20% la RET de células control (WT y Scr), después de 48 h (Figura 34). Sin embargo, la caída fue más pronunciada en las células Ctn-KD infectadas, de alrededor de un 70%. Estos resultados sugieren que la disminución de cortactina en las células pancreáticas, las hace más susceptibles a la infección con *H. Pylori*. Probablemente, la participación de la actina juegue un papel determinante en este fenómeno, afectando a las moléculas responsables de mantener la integridad epitelial. El análisis de las proteínas de las UICs y el estudio de los rearrreglos de la actina serán determinantes para esclarecer el mecanismo de acción de la cortactina.

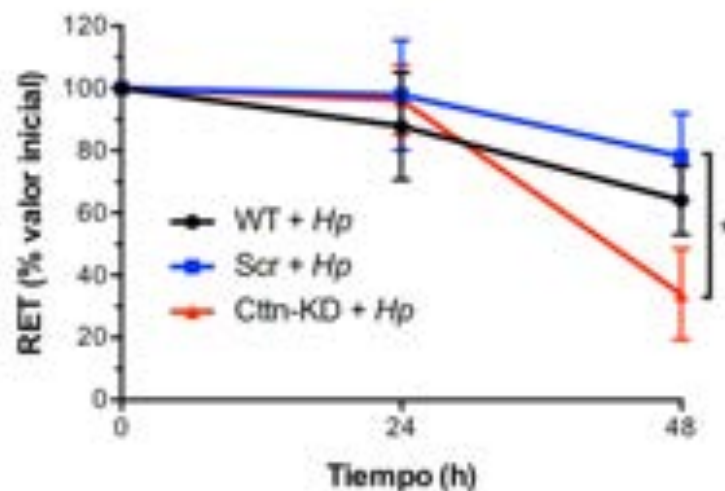


Figura 34. RET de células BxPC-3 infectadas con *H. pylori*. Células BxPC-3 WT o transfectadas con la secuencia scr o ctn-1 fueron crecidas en filtros Transwell y una vez que desarrollaron RET, se infectaron con *H. pylori* a un MOI 1:100. La RET se monitoreó a las 24 y 48 h con un electrodo EVOM. Los valores se normalizaron con respecto al valor inicial de RET de cada Transwell. Los datos representan la media y el error estándar de un experimento llevado a cabo por triplicado. Los datos

se analizaron en el programa ImageJ, utilizando la prueba estadística ANOVA. (*)
 $p < 0.05$.

En conclusión, los resultados de este trabajo señalan que la cortactina regula la cantidad actina, e influye en los rearrreglos de la actina filamentosa. Probablemente estos cambios afecten la localización y expresión de los componentes moleculares de las UICs, perturbando eventualmente la integridad del epitelio pancreático y haciéndolo más susceptible a patógenos. No obstante, los mecanismos involucrados en estos eventos aún deben ser elucidados.

12. DISCUSIÓN

La cortactina es un regulador maestro de la barrera epitelial intestinal, sin embargo, su papel en otros epitelios no se ha explorado todavía. Así que en el presente trabajo, a través de modelos *in vivo* e *in vitro*, se estudió la participación de la cortactina en la permeabilidad epitelial y las UICs del páncreas. En primer lugar, se demostró que la ausencia de cortactina aparentemente no produjo cambios en la morfología del páncreas de ratones. No obstante, si se observaron modificaciones moleculares, como disminución de la cantidad de actina, así como cambios en la localización de la F-actina. También, se encontraron cambios en la localización de las proteínas de las UICs como ocludina, ZO-1 y E-cadherina. En el sistema *in vitro*, es decir en células derivadas de ducto pancreático (BxPC-3) silenciadas en cortactina, se observó un incremento de la permeabilidad epitelial pancreática, correspondiente con cambios en la expresión y localización de las proteínas de las UICs encargadas de mantener y regular la permeabilidad epitelial. Dado que, en otros tejidos, la cortactina participa en la infección por patógenos, células BxPC-3 silenciadas en cortactina fueron infectadas con *H. pylori*, encontrando que la bacteria incrementó la permeabilidad intestinal en mayor medida que en las células control. Estos hallazgos revelan la importancia de la cortactina como un regulador clave de la homeostasis epitelial, contribuyendo a mantener su permeabilidad, así como la estabilidad de las proteínas de las UICs, en este caso en el páncreas, como se ha demostrado para otros tejidos.

Los ratones KO de cortactina empleados en este estudio y generados a partir de la remoción del exón 7 del RNAm para este mismo gen, no demostraron ninguna anomalía fenotípica visible y presentaron una sobrevivencia normal. Esto podría sugerir que la cortactina no es esencial para el desarrollo normal y la supervivencia de estos animales (Craig *et al.*, 2001). Sin embargo, no solo el epitelio intestinal se ha visto seriamente afectado, sino que también se ha observado un aumento de la permeabilidad endotelial (Schnoor *et al.*, 2011). De manera que, el ratón KO de cortactina ofrece un valioso modelo para el estudio de la participación de la cortactina en otros epitelios, como el páncreas.

El páncreas es un epitelio glandular con funciones endócrinas que implican la secreción al torrente sanguíneo de hormonas como insulina, glucagón, polipéptido pancreático y somatostatina; en tanto que las funciones exócrinas involucran la

secreción de jugo pancreático, el cual contiene bicarbonato y enzimas digestivas. Para que estas funciones se lleven a cabo, las células pancreáticas deben mantenerse fuertemente unidas a través de UICs, con la participación dinámica de la actina y de proteínas reguladoras de la actina. Por lo tanto, en este trabajo analizamos la participación de cortactina en la permeabilidad epitelial del páncreas, así como su efecto sobre la actina polimerizada y algunos componentes moleculares de las UICs.

En primer lugar, se observó que la ausencia de cortactina aparentemente no afectó la morfología del páncreas tanto endócrino (islotos de Langerhans) como exocrino (ductos) de ratones KO (Figura 18). En cambio, en el intestino de estos mismos ratones se han reportado alteraciones morfológicas significativas. Hay presencia de edema en el tejido intestinal y las criptas epiteliales están alteradas, pues hay un incremento de la distancia entre los núcleos celulares y el lumen de las criptas es más grande en animales KO comparado con los ratones WT (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Sin embargo, no se puede descartar que existan alteraciones moleculares en el tejido pancreático.

La presencia de cortactina ya ha sido descrita en el páncreas de ratas, específicamente en la membrana apical de las células acinares (Singh and McNiven, 2008). Además, se ha mostrado una expresión diferencial de cortactina en diferentes líneas celulares derivadas de adenocarcinomas de ductos pancreáticos, como las células BxPC-3 y Panc-1 (Chen *et al.*, 2019). En esta tesis, se observó por ensayos de inmunofluorescencia, que la cortactina se localizaba tanto en la porción endócrina, como en la exocrina de páncreas de ratones (Figura 22). En particular, se evidenció una localización apical de esta proteína en las células que conforman las estructuras tipo ducto. En tanto que en la línea celular BxPC-3, la cortactina se localizó en los bordes celulares (Figura 31). Todo esto coincidiendo con las localizaciones previamente reportadas para cortactina en el páncreas (Singh and McNiven, 2008; Chen *et al.*, 2019; Stock *et al.*, 2019).

En su extremo carboxilo terminal, la cortactina contiene un dominio SH3 mediante el cual se une a una gran cantidad de moléculas que también participan en la dinámica del citoesqueleto y su remodelación, así como en la estabilidad de las UICs (Daly, 2004). Además, en el intestino, la deficiencia de cortactina incrementa

la contractibilidad de la actomiosina dependiente de RhoA/ROCK1 y altera la composición molecular de las UEs y UAs, conduciendo a un incremento en la permeabilidad (Citalán-Madrid, 2017). Conjuntamente, la fosforilación y acetilación de cortactina, juegan un papel relevante en la dinámica del citoesqueleto de actina (Weed and Parsons, 2001; Ammer and Weed, 2009). En el páncreas de ratas, se sabe que la cortactina co-localiza con la actina en la membrana apical de las células acinares (Singh and McNiven, 2008) y, en las células ductales BxPC-3 y Panc-1 promueve la polimerización de actina (Stock *et al.*, 2019). Por lo tanto, en este trabajo se analizó el efecto de la depleción de cortactina en la cantidad y distribución de la actina en el páncreas. En este tejido, la ausencia de cortactina produjo una disminución significativa de la actina total y de la actina filamentosa, como se observó en los ensayos de western blot e inmunofluorescencia (Figura 21-22). A diferencia de lo reportado en el intestino, donde la falta de cortactina no afectó la expresión de la actina (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Probablemente en el páncreas, la cortactina participe más activamente en la dinámica de la actina y en su polimerización, o quizá los cambios postraduccionales de la cortactina contribuyan a estas diferencias entre tejidos. Sin embargo, se requieren de más estudios para comprobar estas hipótesis.

La actina es fundamental para el mantenimiento de las UICs, ya el citoesqueleto de actomiosina asegura las interacciones entre proteínas integrales de las UEs y UAs, a través de su asociación con las proteínas citosólicas de estas estructuras (Bezanilla *et al.*, 2015). Así que, rearrreglos en el citoesqueleto de actomiosina repercuten en la permeabilidad epitelial (Ivanov *et al.*, 2010). Conjuntamente, la cortactina participa en la formación y estabilización de las UICs. También se ha observado que cortactina promueve la formación de UAs estables dependientes de E-cadherina (Helwani *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, se demostró que el reclutamiento de cortactina a estos contactos celulares es necesario para su fosforilación por Src, promoviendo la integridad de los contactos y la polimerización del anillo cortical de actina (Ozawa, K., Kashiwada, K., Takahashi, M., & Sobue, 1995; Cantarelli *et al.*, 2000; Weed and Parsons, 2001; Helwani *et al.*, 2004). Más aún, se ha demostrado que el reclutamiento hacia estos sitios requiere de la participación de N-WASP, donde se promueve la nucleación de los filamentos de actina a través de su interacción con Arp2/3 y WAVE2 (Weaver *et al.*, 2002). En el

páncreas, la deficiencia de cortactina provocó una disminución de la ocludina, ZO-1 y E-cadherina sobre todo de los bordes celulares. En cambio, la claudina-1 tuvo una disminución ligera pero no fue significativa (Figura 23, 24, 25 y 26). La disminución de ZO-1 coincide con la observada en el epitelio intestinal de ratones KO de cortactina, aunque en ese estudio la E-cadherina no se alteró, pero la claudina-1 sí se redujo significativamente (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). El efecto observado sobre ZO-1, quizá se deba a que la cortactina tiene la capacidad de interactuar con ZO-1 por medio de su dominio SH3 (Katsube *et al.*, 1998). En cuanto a la E-cadherina, se sabe que interactúa con la cortactina. Además, la fosforilación de cortactina inducida por RhoA de su residuo S298 y llevada a cabo por la proteína cinasa D1, daña el ensamblaje de las UAs (Sroka *et al.*, 2016). La fosforilación de cortactina en este residuo también disminuye su interacción con β -catenina y con la proteína de unión a actina, vinculina (Sroka *et al.*, 2016). De manera que cuando no hay cortactina, es posible que la estabilidad de ZO-1 y E-cadherina en los bordes de células pancreáticas se pierda, lo cual se ve potenciado por el daño en la actina, quien también contribuye con la formación y estabilización de las UICs.

Los daños moleculares observados en el epitelio pancreático podrían repercutir en sus funciones glandulares. De hecho, se ha observado que la síntesis y liberación de la insulina se ve modificada de manera importante cuando las células β se dispersan y pierden sus contactos celulares (Halban *et al.*, 1982; Bosco *et al.*, 1989). Además, islotes provenientes de ratas neonatas, los cuales presentan una secreción de insulina dañada en comparación con los islotes de ratas adultas, mostraron una baja expresión y una difusa localización citoplásmica de ocludina, ZO-1, α -catenina y β -catenina (Collares-Buzato *et al.*, 2004). En este trabajo, dado que se observó una reducción de ocludina, ZO-1 y E-cadherina, así como redistribución de estas proteínas desde la membrana plasmática hacia el citoplasma, se analizaron los niveles de glucosa sérica en los animales KO de cortactina, los cuales podrían reflejar de manera indirecta una secreción alterada de insulina. Los resultados demostraron una concentración similar de glucosa sanguínea proveniente de animales KO y WT, sugiriendo que al menos la producción de insulina no está alterada en los animales sin cortactina (Figura 27). Aunque, se debe considerar que la glucosa fue monitoreada en ratones que

ingirieron alimento *ad libitum* y no se encontraban en ayuno. Posiblemente otras pruebas bioquímicas como la determinación de hemoglobina glicosilada, triglicéridos y colesterol, soportarían una conclusión más robusta sobre la participación de cortactina en la homeostasis de la glucosa. Tampoco se puede descartar que la deficiencia de cortactina modifique la secreción de otras hormonas o enzimas pancreáticas. En este sentido, se ha determinado que la cortactina tiene un papel importante en el tráfico vesicular, ya que al inhibir la asociación de cortactina con dinamina se bloquea el transporte retrógrado de proteínas del Golgi. Asimismo, la deficiencia de cortactina produce cambios morfológicos en el aparato de Golgi y aumenta el número de endosomas tardíos y lisosomas, produciendo así un defecto en el transporte retrógrado del receptor de manosa 6-fosfato desde los endosomas tardíos hacia el Golgi (Cao *et al.*, 2005; Kirkbride *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha descrito que en el páncreas al trastornar el tráfico vesicular, se puede alterar la secreción de hormonas, como insulina y glucagón (Xiong *et al.*, 2017). También se sabe que la reorganización del citoesqueleto de actina participa en el tráfico celular de la insulina antes de que pueda salir de las células β . Este proceso es coordinado por la activación de varias proteínas G pequeñas y sus factores intercambiadores de nucleótidos. Rac1 en su forma activa, promueve el remodelamiento de la actina cortical, posiblemente vía la interacción con gelsolina (Kalwat and Thurmond, 2013). Además, recientemente se describió que la gelsolina interactúa con cortactina, probablemente contribuyendo en la remodelación de la actina (Stock *et al.*, 2019).

Los hallazgos *in vivo* de esta primera parte del trabajo sugieren que los cambios observados en las proteínas de las UICs responsables del mantenimiento de la permeabilidad en el páncreas sin cortactina, podrían afectar sus funciones de barrera epitelial. Sin embargo, ante la imposibilidad de contar por el momento con una herramienta metodológica que permita evaluar la permeabilidad del epitelio pancreático y para ahondar en la función de la cortactina en este tejido, se generó una línea celular derivada de ductos pancreáticos silenciadas en cortactina (Ctn-KD). Estas células, que presentaron un silenciamiento de aproximadamente 70%, desarrollaron una RET menor (55%), en comparación con las células control (Figura 29), sugiriendo fuertemente una disfunción de las UICs. Algo similar sucedió en células intestinales Caco-2 silenciadas en cortactina, quienes presentaron una

reducción significativa de la RET y un aumento de la permeabilidad paracelular de solutos (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Por esta razón, en las células Ctn-KD se evaluó tanto la expresión como la localización de la actina y algunas de las proteínas de las UEs y UAs que forman parte de las UICs. En estas células, la actina se relocalizó de los bordes celulares hacia el citoplasma y presentó una reducción de alrededor del 50%. Asimismo, ocludina, claudina-1, ZO-1 y E-cadherina también se vieron afectadas por la disminución de cortactina y redujeron su presencia en los bordes celulares (Figura 32 y 33). Estos resultados son similares a los obtenidos en el modelo *in vivo*, específicamente para la ocludina, ZO-1, E-cadherina y actina, aunque no para claudina-1. Del mismo modo, se reportó que la disminución de la expresión de cortactina en la línea celular intestinal Caco-2, produjo una disminución de la expresión de claudina-1 y ocludina, así como un aumento en la expresión de claudina-2 (Citalán-Madrid *et al.*, 2017). Esto es relevante, dada la participación de las claudinas en la regulación del flujo paracelular de iones y solutos en el epitelio (Khan and Asif, 2015). La claudina-2 permite el paso de iones, en tanto que la claudina-1 es la principal barrera selectiva de la vía paracelular entre las células epiteliales (Elkouby Naor and Ben Yosef, 2010; Khan and Asif, 2015). Por otra parte, se conoce que la deficiencia de ocludina produce un incremento del flujo paracelular, ya que es una proteína importante para el ensamble y el mantenimiento de las UEs (Matter, K., & Balda, 1998; Rao, 2009). En el caso de la E-cadherina, se sabe que tiene un rol integral en el mantenimiento de la arquitectura exocrina del páncreas (Serrill *et al.*, 2018). Además, la disminución de cortactina mediante un RNAi condujo a la desestabilización de los contactos celulares dependientes de E-cadherina, una alteración en la morfología celular y su disminución en la región apical de las células epiteliales (Helwani *et al.*, 2004). Estos antecedentes señalan que, la expresión reducida de claudina-1, ocludina, ZO-1 y E-cadherina podría explicar la disminución de la barrera y el aumento de la permeabilidad epitelial en las células pancreáticas deficientes de cortactina y quizá el páncreas de los ratones KO, también presente una mayor permeabilidad. Sin embargo, esto debe ser comprobado experimentalmente. Por otra parte, estudios previos han reportado que la cortactina es un blanco común explotado por algunos patógenos durante la infección que producen (Selbach and Backert, 2005). La participación de la cortactina en el desarrollo de enfermedades,

se ejemplifica en una amplia variedad de procesos patogénicos, como la formación de pedestales producidos por *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica; la invasión de *Shigella*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Staphylococcus* y *Cryptosporidium*; la movilidad dependiente de actina e inducida por *Listeria*, *Shigella* y el virus vaccinia; y la dispersión celular promovida por rearrreglos del citoesqueleto producidos por *Helicobacter*. Esto habla del efecto tan importante que ejercen los patógenos para "abusar" de la cortactina, con la finalidad de modular la arquitectura del citoesqueleto de actina del huésped (Selbach and Backert, 2005). Específicamente, se ha descrito que *H. pylori* modifica a cortactina durante la infección en células gástricas, haciéndola un "hallmark" para distinguir células infectadas con esta bacteria (Selbach et al., 2003). La citotoxina CagA de *H. pylori* induce desfosforilación de cortactina y rearrreglos de actina inducidos por la inactivación de c-Src (Selbach et al., 2003). Además, la cortactina está involucrada en la regulación de la apoptosis inducida por la citotoxina bacteriana VacA en células gástricas (Chang et al., 2016). En el páncreas, ya se ha reportado la presencia de esta bacteria, aunque sus implicaciones funcionales no habían sido reveladas (Testerman and Morris, 2014). En nuestro grupo de trabajo, se ha analizado el efecto de esta bacteria y de las vesículas que secreta, sobre las mismas células pancreáticas empleadas en esta tesis (BxPC-3). Los resultados de estos trabajos demostraron una disminución de la RET de aproximadamente 30-35%, así como cambios morfológicos importantes y rearrreglos del citoesqueleto de actina (Hurtado, 2018; Gaspar, 2019). Por lo tanto, en esta tesis se evaluó la participación de la cortactina durante la infección por *H. pylori* en células pancreáticas. Los resultados demostraron que las células BxPC-3 silenciadas en cortactina e infectadas con *H. pylori*, disminuyeron significativamente su RET, en comparación con las células control infectadas (Figura 34). Estos hallazgos sugieren que la cortactina, vuelve al epitelio pancreático más susceptible a la infección por *H. pylori*. Probablemente en este efecto, participen de manera importante las citotoxinas bacterianas CagA y VacA, y la cortactina produzca rearrreglos significativos del citoesqueleto de actina que conduzcan a alteraciones moleculares de las UICs, las cuales eventualmente afectarían la permeabilidad epitelial del páncreas. No obstante, los mecanismos de la contribución de la cortactina durante la infección por *H. pylori* en el páncreas, aún quedan por definirse

experimentalmente. La susceptibilidad epitelial a enfermedades, producida por la deficiencia de cortactina, ya se ha puesto en evidencia anteriormente en el intestino. Así, ratones KO de cortactina fueron más susceptibles al desarrollo de colitis inducida por dextran sulfato de sodio y mostraron daño severo del colon, así como formación de edema (Citalán-Madrid, 2017).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo ¹⁸ han demostrado la importancia de la cortactina para el mantenimiento y estabilidad de la actina y proteínas de las UAs y UEs tanto *in vivo* como *in vitro*, así como su participación en la permeabilidad pancreática. Además, sugieren que la disminución de cortactina vuelve al epitelio pancreático más susceptible a la infección por *H. pylori*. Sin embargo, aún se debe seguir evaluando el papel que tiene la cortactina en el páncreas. Dada su participación en los procesos de endocitosis y exocitosis descritos en otros tejidos, es posible que la cortactina afecte la secreción de hormonas y enzimas digestivas. Hasta el momento, a partir de la información actual y la encontrada en este estudio, se puede considerar a la cortactina como ser un regulador crítico de la homeostasis epitelial en varios órganos.

13. CONCLUSIONES

- La falta de cortactina en ratones KO no afectó la morfología del páncreas, sin embargo, sí produjo cambios moleculares significativos en algunas proteínas de las UEs como ocludina, claudina-1 y ZO-1, así como en la proteína de la UA E-cadherina, sugiriendo alteraciones importantes en la permeabilidad del epitelio pancreático.
- Además, en estos ratones la disminución de actina total y una relocalización desde los bordes celulares hacia el citoplasma de la actina filamentosa, sugieren rearrreglos importantes del citoesqueleto con repercusiones funcionales en las UICs.
- En células de ducto pancreático BxPC-3, se demostró la participación de la cortactina en la permeabilidad epitelial, correlacionándose con cambios de localización y disminución de la expresión de las proteínas de las UICs, responsables de mantener la estabilidad de la barrera pancreática.
- En el páncreas, cortactina participa durante el proceso de infección por *H. pylori*, probablemente reorganizando el citoesqueleto de actina y modificando proteínas de las UICs para desestabilizar la integridad epitelial.
- La cortactina en el páncreas, así como en otros órganos, es un jugador clave en el mantenimiento y estabilidad de la arquitectura y función epitelial.

14. PERSPECTIVAS

- Evaluar *in vivo* la participación de la cortactina durante la infección con *H. pylori* en el páncreas, empleando el modelo de ratones KO en cortactina.
- Debido a que la línea celular empleada en este trabajo es derivada de un adenocarcinoma ductal pancreático, es necesario analizar el efecto de la deficiencia de cortactina en células pancreáticas normales como la línea celular hTERT-HPNE.
- También es necesario, evaluar el papel de la cortactina en otros modelos *in vitro*, como células endócrinas (Beta-TC-6) y en acinos pancreáticos aislados.
- Analizar las cascadas de señalización durante la infección de *H. pylori*, para determinar los mecanismos de acción de la cortactina.
- Determinar el efecto de la deficiencia de cortactina en la producción y secreción de hormonas y enzimas digestivas, con la finalidad de revelar su importancia en la función pancreática.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Amieva, M. R., & El-Omar, E.M. (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **134**: 306–323.
- Ammer, A., and Weed, S. (2009) Cortactin branches out: Roles in regulating protrusive actin dynamic. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**: 687–707.
- Bardeesy, N., and DePinho, R.A. (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**: 897–909.
- Bezanilla, M., Gladfelter, A., Kovar, D., and Lee, W.L. (2015) Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. *J Cell Biol* **209**: 329–337.
- Bosco, D., Orci, L., and Meda, P. (1989) Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Exp Cell Res* **184**: 72–80.
- Bougnères, L., Girardin, S., Weed, S., Karginov, A., Olivo-Marin, J., Parsons, J., and Nhieu, G.T. Van (2004) Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Cell Biol* **166**: 225-235.
- Cantarelli, V., Kodama, T., Nijstad, N., Abolghait, S., Iida, T., and Honda, T. (2006) Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)-and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. *Cell Microbiol* **8**: 769–780.
- Cantarelli, V., Takahashi, A., Akeda, Y., Nagayama, K., and Honda, T. (2000) Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect Immun* **68**: 382–386.
- Cao, H., Weiler, S., Orth, J., Chen, J., Huang, B., Chen, J., and McNiven, M. (2005) Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin–dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat cell Biol* **7**: 483.
- Chang, H., Chen, D., Ni, B., Zuo, Q., Wang, C., Han, R., and Lan, C. (2016) Cortactin Mediates Apoptosis of Gastric Epithelial Cells Induced by VacA Protein of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* **61**: 80–90.
- Chen, X., Huang, B., Splinter, P., Cao, H., Zhu, G., McNiven, M., and Larusso, N. (2003) *Cryptosporidium parvum* invasion of biliary epithelia requires host cell

- tyrosine phosphorylation of cortactin via c-Src. *Gastroenterology*, 125(1), 216-228. *Gastroenterology*, **125**: 216-228.
- Chen, Y.C., Baik, M., Byers, J.T., Chen, K.T., French, S.W., and Diaz, B. (2019) Experimental supporting data on TKS5 and Cortactin expression and localization in human pancreatic cancer cells and tumors. *Data Br* **22**: 132–136 <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.11.138>.
- Chhabra, E. S., & Higgs, H.N. (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**: 1110.
- Citalán-Madrid, A.F., Vargas-Robles, H., García-Ponce, A., Shibayama, M., Betanzos, A., Nava, P., et al. (2017) Cortactin deficiency causes increased RhoA/ROCK1-dependent actomyosin contractility, intestinal epithelial barrier dysfunction, and disproportionately severe DSS-induced colitis. *Mucosal Immunol* **10**: 1237–1247.
- Clark, E., Whigham, A., Yarbrough, W., and Weaver, A. (2007) Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* **67**: 4227-4235.
- Collares-Buzato, C., Carvalho, C., Furtado, A., and Boschero, A. (2004) Upregulation of the expression of tight and adherens junction-associated proteins during maturation of neonatal pancreatic islets in vitro. *J Mol Histol* **35**: 811-822.
- Correa, P., and Houghton, J. (2007) Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **133**: 659-672.
- Craig, A.W., Zirngibl, R., Williams, K., Cole, L., and Greer, P. (2001) Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol Cell Biol* **21**: 603–613.
- Daly, R. (2004) Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* **382**: 13–25 <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20040737>.
- Dehio, C., Prevost, M., and Sansonetti, P. (1995) Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J* **14**: 2471-2482.
- Du, Y., Weed, S., Xiong, W., Marshall, T., and Parsons, J. (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* **18**: 5838-5851.
- Elkouby Naor, L., and Yosef, T. Ben (2010) Functions of claudin tight junction

- proteins and their complex interactions in various physiological systems. *Int Rev cell Mol Biol* **279**: 1–32.
- Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A., and Engstrand, L. (1999) In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter* **4**: 7–16.
- Garrod, and Chidgey (2008) Desmosome structure, composition and function *Biochim. Biophys Acta*, **1778**: 572–587.
- Gaspar, R. (2019) Efecto de las vesículas secretadas por *Helicobacter pylori* sobre las células ductales pancreáticas. .
- Geneser, F. (2001) *Histología*. Tercera ed.,.
- Giepmans, B.N.G., and Uzendoom, S.C.D. van (2009) Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1788**: 820–831 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2008.07.015>.
- Glick, A. B., & Yuspa, S.H. (2005) Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin cancer Biol* **15**: 75–83.
- Halban, P., Wollheim, C., Blondel, B., Meda, P., Niesor, E., and Mintz, D. (1982) The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology* **111**: 86–94.
- Hammer, G., and McPhee, J. (2010) *Fisiopatología de la enfermedad*. Séptima ed.,.
- Head, J.A., Jiang, D., M. Li, L.J., Zorn, E.M., Schaefer, Parsons, J.T., and Weed, S.A. (2003) Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**: 3216–3229.
- Helwani, F., Kovacs, E., Paterson, A., Verma, S., Ali, R., Fanning, A., and Weed, S. (2004) Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* **164**: 899-910.
- Higgs HN, P.T. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* **70**: 649–76.
- Holmes, E., Li, J., Athanasiou, T., Ashrafian, H., and Nicholson, J. (2011) Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol* **19**: 349–359.
- Hubbard, S.R. (1999) Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat Struct Mol Biol* **6**: 711.

- Hunter, T. (1987) A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell* **49**: 1-4.
- Hurtado, E. (2018) Efecto de *Helicobacter pylori* sobre las uniones estrechas de células ductales pancreáticas. .
- Ivanov, A., Parkos, C., and Nusrat, A. (2010) Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am J Pathol* **177**: 512-524.
- Kalwat, M., and Thurmond, D. (2013) Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. *Exp Mol Med* **45**: e37.
- Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M., and Togashi, S. (1998) Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and Mouse. *J Biol Chem* **273**: 29672-29677.
- Khan, N., and Asif, A. (2015) Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions. *Mediators Inflamm* **2015**.
- Kinley, A., Weed, S., Weaver, A., Karginov, A., Bissonette, E., Cooper, J., and Parsons, J. (2003) Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr Biol* **13**: 384-93.
- Kirkbride, K., Hong, N., French, C., Clark, E., Jerome, and Weaver, A. (2012) Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgi morphology. *Cytoskeleton* **69**: 625-643.
- Knoll B, D.U. (2004) Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* **24**: 6248-57.
- Longnecker, D. (2014) Anatomy and Histology of the Pancreas Daniel. *Am Pancreat Assoc* 4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8149907>.
- Lua, B., and Low, B. (2004) BPGAP1 interacts with cortactin and facilitates its translocation to cell periphery for enhanced cell migration. *Mol Biol Cell* **15**: 2873-2883.
- Lua, B.L., and Low, B.C. (2005) Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett* **579**: 577-585.
- Lynch, Winata, Lyons, Hughes, Lehrbach, Wasinger, et al. (2003) A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**: 21805-21813.
- Marchesi, J., Adams, D., Fava, F., Hermes, G., Hirschfield, G., Hold, G., and Thomas, L. (2016) The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*

65: 330–9.

Martinez-Quiles, N., Ho, H., Kirschner, M., Ramesh, N., and Geha, R. (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* **24**: 5269–5280.

Martinez, M., Ochiishi, T., Majewski, M., and Kosik, K. (2003) Dual regulation of neuronal morphogenesis by a δ -catenin–cortactin complex and Rho. *J cell Biol* **162**: 99–111.

Martinez, N., Ho, M., Kirschner, N., Ramesh, R., and Geha (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol*, **12**: 5269–5280.

Matter, K., & Bakda, M.S. (1998) Occludin and the Functions of Tight Junctions. *Int Rev Cytol* **186**: 117–146.

McNiven, M., L. Kim, E., Krueger, J., Orth, H.C., and T.W. W. (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* **151**: 187–198.

Navarro, F., Serapio, A., Ugalde, P., Tapia, G., and Chavez, L. (2013) Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *BioMed research international*, 2013. .

Nikitas, G., and Cossart, P. (2012) Adherens junctions and pathogen entry. *Springer, Dordrecht* 415–425.

Ozawa, K., Kashiwada, K., Takahashi, M., & Sobue, K. (1995) Translocation of cortactin (p80/85) to the actin-based cytoskeleton during thrombin receptor-mediated platelet activation. *Exp Cell Res* **221**: 197–204.

Rao, R. (2009) Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann New York Acad Sci* **1165**: 62.

Ribet, D., and Cossart, P. (2015) How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect* **17**: 173–183.

Rodríguez, M., Muñoz, P., Valerio, M., Bouza, E., Martín-Rabadán, P., and Anaya, F. (2010) Infección por *Cryptosporidium parvum* en un receptor de trasplante renal. *Nefrología* **30**: 476–477.

Ross, M., and Pawlina, W. (2007) *Histología. Texto y Atlas color con biología celular y molecular*. Quinta edl.,

Schnoor, M., Lai, F.P.L., Zarbock, A., Kläver, R., Polaschegg, C., Schulte, D., et al.

- (2011) Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J Exp Med* **8**: 1721–35.
- Schnoor, M., Stradal, T.E., and Rottner, K. (2017) Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein. *Trends Cell Biol* **28**: 79–98 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.009>.
- Selbach, M., and Backert, S. (2005) Cortactin: An Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol* **13**: 181–189.
- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* **22**: 515–528.
- Sepúlveda, J. (2012) *Texto Atlas De Histología Biología Celular y Tisular*. Segunda Ed.,.
- Serrill, J., Sander, M., and Shih, H. (2018) Pancreatic Exocrine Tissue Architecture and Integrity are Maintained by E-cadherin During Postnatal Development. *Sci Rep* **8**: 13451.
- Singh, V., and McNiven, M. (2006) Src-mediated cortactin phosphorylation regulates actin localization and injurious blebbing in acinar cells. *Mol Biol Cell* **19**: 2339–2347.
- Srinivasan, B., Kollu, A., Esch, M., Abaci, H., Shuler, M., and Hickman, J. (2015) TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**: 107–126.
- Sroka, R., Lint, J. Van, Katz, S., Schneider, M., Kieger, APaschke, S., and Eiseler, T. (2016) Cortactin is a scaffolding platform for the E-cadherin adhesion complex and is regulated by protein kinase D1 phosphorylation. *J Cell Sci* **129**: 2416–2429.
- Stock, K., Borrink, R., Mikesch, J., Hansmeier, A., Rehkämper, J., Trautmann, M., and Steinestel, K. (2019) Overexpression and Tyr421-phosphorylation of cortactin is induced by three-dimensional spheroid culturing and contributes to migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. *Cancer Cell Int* **1**.
- Tegtmeyer, N., and Backert, S. (2017) *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori*. .
- Testerman, T.L., and Morris, J. (2014) Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* **20**: 12781–12808.

- Tilghman, R., and Hoover, R. (2002) The Src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *FASEB J* **16**: 1257–1259.
- Tondravi, Smith, Haudenschild, Kaczmarek, and Zhan (2001) Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* **61**: 6906–11.
- Tsai, W., Lin, C., Lee, H., Gao, H., Nieh, S., Chan, D., and Jin, J.S. (2013) The correlation of cortactin and fascin-1 expression with clinicopathological parameters in pancreatic and ampulla of Vater adenocarcinoma. *Apmis* **121**: 171-181.
- Weaver, A., Heuser, J., Karginov, A., Lee, W., Parsons, J., and Cooper, J. (2002) Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol* **12**: 1270-1278.
- Weed, S., Karginov, A., Schafer, D., Weaver, A., Kinley, A., Cooper, J., and Parsons, J. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **151**: 29–40.
- Weed, S., and Parsons, J. (2001) Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*, **20**: 6418.
- Wu, Reynolds, Kanner, Vines, and Parsons (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol* **11**: 5113-5124.
- Xiong, Q., Yu, C., Zhang, Y., Ling, L., Wang, L., and Gao, J. (2017) Key proteins involved in insulin vesicle exocytosis and secretion. *Biomed reports* **6**: 134–139.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 642–652.
- Young, B., and Heath, J. (2001) *Wheater's Histología funcional*. Cuarta ed.,.
- Zambirinis, C., Pushakar, S., Saxena, D., and Miller, G. (2014) Pancreatic cancer, inflammation and microbiome. *Cancer J* **20**: 195.
- Zhang, X. et al. (2007) HDAC8 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* **27**: 197–213.
- Zou, S., Fang, L., and Lee, M. (2017) Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep* **6**: 1-12.

