



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“El Papel de Cortactina en la Homeostasis
del Epitelio Intestinal”**

TESIS
que presenta
ALÍ FRANCISCO CITALÁN MADRID

para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis: **Dr. Michael Schnoor**

Ciudad de México, México

Agosto del 2016

ASESORES:

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN

DRA. MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN

DRA. ABIGAIL BETANZOS FERNÁNDEZ

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN

DR. RICARDO VALLE RIOS

División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM-Hospital Infantil de México Federico Gómez

Esta tesis de doctorado fue llevada a cabo en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Michael Schnoor.

Durante el desarrollo de mi proyecto de tesis fui apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de una beca para la formación a nivel de posgrados, con el número de registro: 230930.

Este trabajo está dedicado a mi familia: Analí, Everardo, Merlin, Leonardo, Almita, Ginna, Giovanna y Laura. Con especial cariño a la memoria de mis sobrinos Paolo y Fabián.

Quiero agradecer a los Doctores Vianney Ortiz Navarrete, Ma. Teresa Estrada García, Abigail Betanzos Fernández y Ricardo Valle Ríos por haber aceptado ser parte de mi comisión de tesis y también por la revisión y los comentarios de cada uno de ellos hacia este trabajo.

Agradecer de manera particular al Dr. Michael Schnoor por permitirme trabajar en su laboratorio, por su paciencia y sobre todo por enseñarme a hacer ciencia. He aprendido mucho durante estos últimos cuatro años.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Agradecimientos	I
Resumen	II
Abstract	III
Introducción	1
El epitelio intestinal y su función en el mantenimiento de la barrera y la permeabilidad	1
Las uniones intercelulares y su interacción con el citoesqueleto de actina en el mantenimiento de la barrera epitelial	7
El papel de cortactina en la remodelación del citoesqueleto de actina	14
Cortactina y su función en la regulación de la permeabilidad	22
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivos	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
Materiales y métodos	28
Material biológico, equipos, reactivos y programas bioinformáticos	28
Métodos	33
Resultados	42
La función de cortactina en la regulación de la permeabilidad intestinal <i>in vivo</i>	42
Cortactina es un importante regulador de la permeabilidad epitelial intestinal <i>in vitro</i>	56
Discusión	69
Conclusiones	80
Perspectivas	81

Referencias	82
Anexo 1. Artículos publicados durante el doctorado	94
Anexo 2. Artículo enviado a la revista Mucosal Immunology	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Función de barrera del epitelio intestinal	2
Figura 2. Homeostasis del epitelio intestinal	5
Figura 3. Estructura molecular de las uniones intercelulares de las células del epitelio intestinal	8
Figura 4. Estructura y nucleación de los filamentos de actina (F-actina)	15
Figura 5. Estructura de cortactina	17
Figura 6. Cortactina tiene un papel importante en la remodelación del citoesqueleto de actina	19
Figura 7. Mapa del vector de clonación lentiviral pLKO.1	29
Figura 8. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial en cultivo	37
Figura 9. El tratamiento con DSS en los ratones silvestres indujo los signos clínicos de la colitis experimental	43
Figura 10. El tratamiento con DSS en los ratones silvestres produjo un incremento de la permeabilidad intestinal	44
Figura 11. La deficiencia de cortactina condujo a un incremento de la permeabilidad intestinal basal in vivo	45
Figura 12. Los ratones CTTN-KO presentaron sangre oculta aún antes del inicio del tratamiento con DSS	46
Figura 13. Evaluación de la consistencia de las heces en los ratones con tratamiento	47
Figura 14. El tratamiento con DSS produjo una mayor pérdida del peso en los CTTN-KO tratados con DSS en comparación con los ratones silvestres	48
Figura 15. El tratamiento con DSS produce una colitis experimental más severa en los ratones CTTN-KO	48

Figura 16. Medición de las longitudes de los cólonos antes y después del tratamiento con DSS	50
Figura 17. Análisis histológico de los cólonos de los ratones CTTN-KO y silvestres, con y sin tratamiento de DSS	51
Figura 18. La deficiencia de cortactina afectó la expresión de algunas proteínas intercelulares	52
Figura 19. La deficiencia de cortactina condujo a una alteración de las uniones intercelulares	53
Figura 20. La deficiencia de cortactina produjo una alteración de la morfología de las criptas del epitelio	54
Figura 21. La deficiencia de cortactina contribuyó a una disfunción en el balance homeostático del epitelio intestinal	55
Figura 22. Cuantificación de los niveles de expresión de cortactina en la línea celular KD	57
Figura 23. La disminución de la expresión de cortactina produjo un aumento en la fosforilación de la histona-H3 por medio de JNK	58
Figura 24. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial en las líneas celulares CTTN-KD y scrambled	59
Figura 25. La disminución de la expresión de cortactina condujo a un aumento en el flujo paracelular de solutos	60
Figura 26. La disminución de la expresión de cortactina produjo una alteración en la expresión de las uniones intercelulares	61
Figura 27. Tinción por inmunofluorescencia de las uniones intercelulares en las células KD de cortactina y scrambled	62
Figura 28. La disminución de cortactina no afectó la formación de las uniones estrechas	63
Figura 29. La deficiencia de cortactina condujo a un incremento en el número de polimorfonucleares en la transmigración	64
Figura 30. La disminución de la expresión de cortactina produjo un incremento de las fibras de actina	65
Figura 31. La disminución de la expresión de cortactina produjo un	66

aumento de la expresión de ROCK1

Figura 32. La inhibición de ROCK1 condujo al rescate de la resistencia eléctrica transepitelial en la línea celular deficiente de cortactina 67

Figura 33. Los ratones CTTN-KO presentan una mayor expresión de ROCK1 en el epitelio intestinal 68

Figura 34. Cortactina regula la permeabilidad del epitelio intestinal 69

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tabla de reactivos utilizados en los experimentos de este proyecto	30
Tabla 2. Lista de materiales utilizados en este proyecto	31
Tabla 3. Equipos utilizados en este proyecto	31
Tabla 4. Anticuerpos usados en los ensayos de inmunofluorescencia y Western blot.	32
Tabla 5. Parámetros evaluados en el índice de actividad de la enfermedad (IAE)	33

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Hilda Vargas Robles, por su colaboración y apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A la Q.F.B. Leticia Alemán Lazarina por su apoyo técnico en la captura de imágenes de inmunofluorescencias y el manejo del microscopio confocal láser.

Al M.V.Z. Ricardo Gaxiola por su ayuda en el mantenimiento de los ratones deficientes de cortactina para mi proyecto de tesis.

También quiero agradecer a los Doctores Nicolás Villegas Sepúlveda, Leticia Cedillo Barrón, Carmen Sánchez Torres, Rosaura Hernández Rivas, Isaura Meza Gómez Palacio, Leopoldo Santos Argumedo, así como todo el personal que conforman sus laboratorios por las facilidades que me otorgaron en varias ocasiones para poder desarrollar mi proyecto de tesis.

RESUMEN

Un epitelio estable es la base para la salud de los intestinos. El daño epitelial causa el incremento de la permeabilidad intestinal, la translocación de bacterias y una respuesta inmune aberrante, como la observada en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tales como la colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn. El citoesqueleto de actina regula la integridad de la barrera epitelial a través de las uniones estrechas y adherentes; sin embargo, las funciones de algunos reguladores de actina, tales como cortactina (CTTN) aún no están bien estudiadas. La deficiencia de CTTN produjo un incremento de la permeabilidad basal del epitelio intestinal en los CTTN-KO y en la línea celular Caco-2 deficiente de CTTN, caracterizada por una alteración de la expresión y relocalización de las proteínas de las uniones intercelulares (UI). En esta última, la deficiencia de CTTN produjo el incremento de la proliferación celular a través de la vía de JNK pero no indujo apoptosis ni la transmigración más rápida de células polimorfonucleares en la monocapa de las células deficientes de CTTN. En los ratones KO, la ausencia de CTTN produjo una alteración de la estructura de la mucosa intestinal y los signos clínicos de la colitis experimental se agravaron. *In vitro*, la deficiencia de CTTN en las células Caco-2 produjo un incremento de fibras de estrés caracterizadas por un incremento de la expresión de ROCK1 y de la fosforilación de MLC. La inhibición de ROCK mediante Y27632, condujo al rescate de la resistencia eléctrica *in vitro*, demostrando con ello el papel de ROCK en la desestabilización de las UI y el aumento de la permeabilidad. En conclusión, nuestros datos demuestran que CTTN controla la integridad de la barrera epitelial en condiciones basales e inflamatorias, a través del citoesqueleto de actina y manteniendo la estabilidad de las UI y que su pérdida conduce a la disfunción del epitelio, de manera similar a lo observado en la EII.

ABSTRACT

A stable epithelium is the basis for healthy intestines. Epithelial damage causes increased intestinal permeability, bacterial translocation and aberrant immune response as seen in inflammatory bowel disease (IBD), such as ulcerative colitis or Crohn disease. The actin cytoskeleton regulates the integrity of the epithelial barrier via the tight and adherens junctions; however, functions of actin regulators such as cortactin (CTTN) are not well studied. CTTN deficiency caused an increased basal intestinal epithelial permeability in CTTN-KO mice and in CTTN-deficient Caco-2 cell line, characterized by an altered expression and relocation of intercellular junctions (IJ). In the latter, CTTN deficiency increased cell proliferation through the JNK pathway but not apoptosis and rapid transmigration of polymorphonuclear cells in a monolayer of CTTN-deficient cells. In KO mice, the absence of CTTN produced alteration of the structure of the intestinal mucosa and the worsening of clinical symptoms under experimental colitis. *In vitro*, CTTN deficiency produced an increased stress fibers formation, characterized by increased expression of ROCK1 and MLC phosphorylation. ROCK inhibition by Y27632 led to the rescue of the electrical resistance *in vitro*, thereby demonstrating the role of ROCK destabilizing IJ and increased permeability. In conclusion, our data demonstrate that CTTN controls the integrity of the epithelial barrier integrity, under basal and inflammatory conditions by controlling actin cytoskeleton and maintaining intercellular junctions and their loss leads to dysfunction of the epithelium, as seen in IBD.

INTRODUCCIÓN

El epitelio intestinal y su función en el mantenimiento de la barrera y la permeabilidad.

Los epitelios son construidos a partir de una capa polarizada de células adherentes, las cuales conforman los bloques de construcción de órganos o apéndices en todos los animales [1]. Estas células forman una barrera dinámica entre el ambiente externo y el interior del organismo. El epitelio intestinal, está conformado de una delgada capa de células que recubren el intestino y su principal tarea es la absorción de nutrientes. Esta barrera tiene que ser permeable para los nutrientes y macromoléculas que son importantes para el crecimiento y desarrollo, y al mismo tiempo proveer una barrera efectiva contra macromoléculas dañinas y microorganismos [2]. Sin embargo, también juega un papel importante en nuestro organismo al conformar una barrera adaptada a la colonización de bacterias comensales que participan en la digestión y que influyen el desarrollo y función del sistema inmune [3, 4] (**figura 1**). De esta forma, una barrera comprometida o dañada puede conducir a la translocación de bacterias y sus antígenos. Esto sugiere un papel central de la desregulación de la función de la barrera epitelial intestinal tanto en la etiología como en la patología de la inflamación intestinal y de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) [4, 5].

Las células del epitelio intestinal están unidas por una serie de uniones intercelulares por medio de los cuales el movimiento de fluidos y solutos toma lugar. La región más apical de estas uniones intercelulares se conoce como complejo de unión apical (CUA), el cual a su vez se compone por proteínas de las uniones estrechas (UE) y adherentes (UA) [2]. Las UA son importantes en la adaptación y respuesta al estrés mecánico, la densidad celular y el mantenimiento de su morfología; mientras que las UE controlan la difusión de moléculas en la membrana plasmática dentro de la misma célula y el flujo paracelular entre las células adyacentes [6, 7]. De esta manera, las uniones intercelulares son

elementos claves en la regulación de la permeabilidad intestinal, y su disfunción puede conducir a alteraciones en la barrera y un incremento en la permeabilidad del intestino y la inflamación. Esta afirmación es apoyado por estudios que demuestran la pérdida de las uniones intercelulares (UE/UA) en varias líneas celulares epiteliales; como por ejemplo, T84, Caco-2 y HT-29, seguido de la estimulación con diferentes agentes, tales como especies reactivas del oxígeno (ROS) o las citosinas proinflamatorias IFN- γ o TNF- α [8-11].

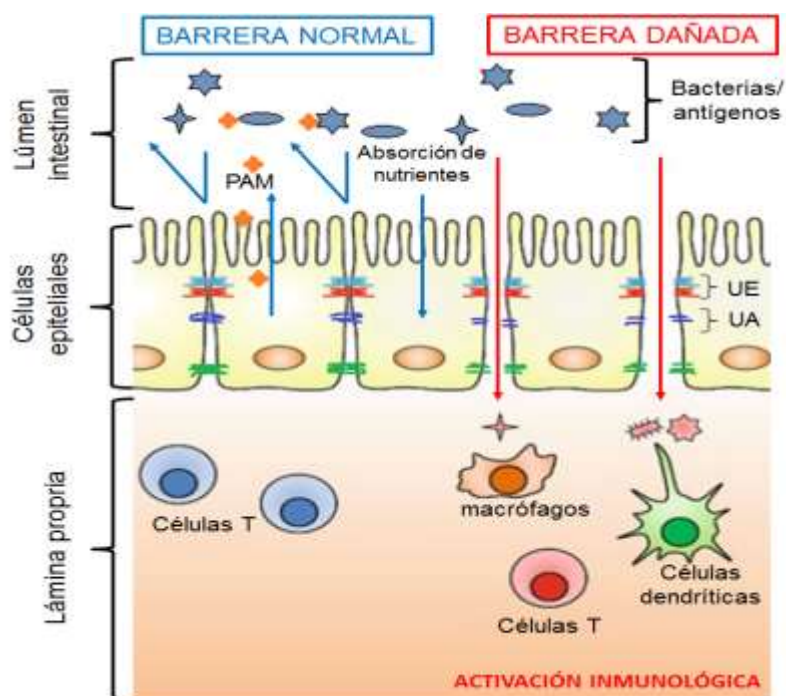


Figura 1. Función de barrera del epitelio intestinal. El epitelio intestinal provee una barrera física a las bacterias del lúmen intestinal, toxinas y antígenos. La barrera está organizada por diferentes componentes, incluyendo UE y UA. Mientras que las UA proveen estabilidad, las UE regulan el flujo paracelular de iones, solutos y agua entre las células adyacentes. Las macromoléculas que son nocivas no pueden penetrar el epitelio debido a la barrera formado por las UE. Sin embargo, cuando esta barrera se ve comprometida o dañada, estas moléculas nocivas pueden inducir la activación excesiva de las células residentes en la lámina propia y la inflamación [8].

Así, por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento con IFN- γ en la línea celular epitelial intestinal T84, induce la internalización por medio de macropinocitosis de las proteínas transmembranales de UE ocludina, JAM-A (Junctional Adhesion Molecule-A) y claudina-1 [12]. No obstante, otros mecanismos como la

desregulación de la expresión de las proteínas de unión también se han observado involucrados en la alteración de la barrera epitelial, después del tratamiento con estas citosinas. Por ejemplo, el tratamiento con IFN- γ disminuye los niveles de RNAm de ZO-1 en la línea celular T84 [10]; mientras que el tratamiento con TNF- α promueve la disminución de la expresión de ocludina en las células HT-29 [13]

Otra variedad de estímulos también participan en la alteración de la barrera epitelial intestinal, por medio de la degradación de las proteínas de uniones intercelulares. Por ejemplo, se ha observado que la enterotoxina de *Bacteroidis fragilis* (BFT), puede inducir selectivamente el corte de la región extracelular y la posterior degradación de E-cadherina pero no de ocludina o de la integrina- β 1 en las células HT-29. Se demostró además, que después del tratamiento con esta toxina, existe una marcada relocalización de ZO-1 y ocludina, así como una alteración en la morfología celular [14]. Por otro lado en un modelo *in vivo*, de la enfermedad del injerto contra el huésped (*graft-versus-host-disease, GvHD*), caracterizada por diarrea severa, dolor abdominal, náusea y vómito, se pudo observar en el epitelio del yeyuno, un incremento en la permeabilidad del manitol. Este incremento de la permeabilidad estuvo acompañado por una reducción de la proteína transmembranal ocludina y su relocalización desde la periferia hacia el citosol, en las células epiteliales; así como un cambio en el rearrreglo del citoesqueleto de actina; no obstante, ningún cambio significativo se observó en ZO-1 [15].

También se ha observado que la proteína transmembranal JAM-A participa en la regulación de la barrera intestinal. La ruptura de las interacciones homotípicas de JAM-A, mediante el uso de la proteína recombinante de reovirus σ -1 produjo una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial de las líneas celulares epiteliales SK-CO15 y T84. Además, JAM-A interactúa con ZO-2, afadina y PDZ-GEF1 para activar Ropc2 y propiciar la contracción del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, *in vivo*, en el ratón KO de JAM-A se incrementó de hasta seis veces la permeabilidad intestinal del dextrano de 40 kDA en comparación con

ratones silvestres [16]. Estos resultados sugieren la participación de JAM-A y su interacción con otros componentes de las uniones intercelulares en la regulación de la permeabilidad intestinal.

Los defectos producidos en la barrera epitelial también han sido asociados con la patogénesis de la EII, tales como la colitis ulcerativa (CU), la enfermedad de Crohn (EC) o el síndrome de colon irritable [17-20]. Por eso el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal es de vital importancia [21]. Este correcto balance asegura la integridad de las uniones, incluso cuando la célula se encuentra en constante movimiento en la monocapa de las células del epitelio. Por ejemplo, se ha observado en la línea celular Eph4 de epitelio mamario de ratón que la internalización de claudina-3 está asociada a las células individuales en movimiento. Las UE en las membranas opuestas de las células adyacentes no fueron desensambladas, pero parte de ellas fueron endocitadas por una de las células. Adicionalmente, se observó una disociación de ocludina, JAM y ZO-1 antes de que las claudinas fueran endocitadas. Por otro lado, el proceso de migración celular aceleró la endocitosis de estas moléculas [22]. En conclusión, esto sugiere que la internalización de los componentes de las uniones intercelulares, tal es el caso de claudina-3, juegan un papel importante en la remodelación de las UE, y que su regulación es fundamental para sellar el espacio intercelular entre las células epiteliales y para el mantenimiento de la barrera.

Por otro lado, el epitelio intestinal se encuentra finamente regulado por los mecanismos de apoptosis y proliferación, que juegan un papel importante en el recambio de las células epiteliales (enterocitos) [21, 23]. En el intestino grueso y delgado, los enterocitos diferenciados son removidos y reemplazados de manera constante por nuevas células que se originan de las células madres no diferenciadas, localizadas en la tercera o cuarta posición en relación con la base de la cripta [24-26]. Estas nuevas células que migran desde la base de la cripta hasta la zona apical del intestino experimentan maduración. De esta manera, la monocapa de células epiteliales muestran un estricto balance entre la

proliferación y la muerte celular, con la finalidad de mantener la barrera intestinal (figura 2) [27-30].

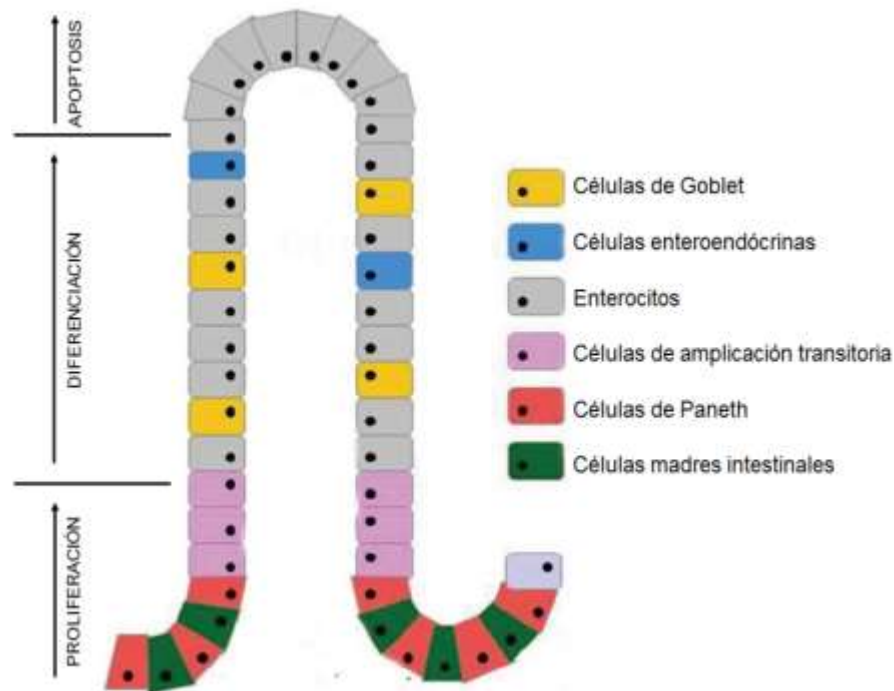


Figura 2. Homeostasis del epitelio intestinal. La regulación de la homeostasis del epitelio intestinal es crucial para el mantenimiento de la estructura de la mucosa y las funciones defensivas de la barrera [31]. Las células de Paneth y de Goblet limitan la adhesión de bacterias y su infiltración, secretando péptidos antimicrobianos y mucinas, de manera respectiva. La rápida renovación celular (proliferación), de lo cual las células madres son responsables, coincide con el desprendimiento de los enterocitos “viejos” sin comprometer la integridad de la barrera epitelial. Sin embargo, cuando la integridad de la barrera se ve comprometida por algún estímulo inflamatorio, se observa un incremento en la apoptosis, produciendo la pérdida de la barrera y un aumento de la permeabilidad, permitiendo con ello, la infiltración de bacterias y antígenos, y exacerbando el proceso de inflamación [32].

La muerte celular es crucial para el desarrollo del tejido y su equilibrio, eliminando las células dañadas o envejecidas, y es clave en el restablecimiento homeostático después de un daño agudo o crónico, limitando la propagación del estímulo inflamatorio y la pérdida de la función del tejido. Particularmente, esto es importante en el tracto gastrointestinal, dado que el epitelio intestinal experimenta de manera continua la autorenovación del tejido, al mismo tiempo que se expone

a una gran variedad de antígenos o patógenos microbianos presentes en el lumen. En consecuencia, la renovación de las células del epitelio intestinal tiene que estar finamente regulada, ya que una inapropiada respuesta a la muerte celular podría conducir al desarrollo de ciertas patologías, tales como desórdenes inflamatorios o cáncer [27].

En condiciones normales, este balance se lleva a cabo de una manera controlada. Por ejemplo, el desprendimiento de las células epiteliales del yeyuno de ratón es antecedido por una redistribución de ZO-1 desde las UE hacia la región basolateral y un incremento en el flujo paracelular. Esta redistribución en ZO-1 no alteró la redistribución o relocalización de ezrina o E-cadherina [33], demostrando con ello el balance controlado en la distribución de algunos componentes de las uniones intercelulares, en la homeostasis del epitelio intestinal.

Sin embargo, en ciertas patologías que involucran la inflamación de los intestinos, como en la EC y CU, el daño a los elementos esenciales de la barrera intestinal produce defectos en la permeabilidad. Estos defectos en la barrera exacerban la respuesta inmune por parte de las células que yacen en la lámina propia e inducen un daño al tejido epitelial. El fenotipo en la EII, tanto en la EC como la CU es similar, involucrando la secreción de cloro (Cl⁻) y la producción de diarrea, además de un incremento en la permeabilidad transcelular y paracelular, y de la apoptosis en las células epiteliales.

Algunos estudios han remarcado la importancia de este fenómeno. En pacientes con CU fue posible visualizar un incremento de la apoptosis. En las áreas de tejido normal, las células positivas para apoptosis se encontraron principalmente en la región apical/luminal del epitelio; mientras que aquellos tejidos derivados de pacientes con la enfermedad activa, en las criptas epiteliales se observó un incremento de la apoptosis, en adición a la región apical/luminal [34]. Adicionalmente, *in vitro* se ha demostrado que existe una sobreexpresión de interleucina-13 (IL-13) y de claudina-2 en la línea celular HT-29/B6 cuando experimentan apoptosis, lo cual se intensificó mediante la exposición simultánea

con TNF- α , repercutiendo de manera directa en un aumento de la permeabilidad intestinal. No obstante, el inhibidor de caspasas N-benziloxycarbonil-val-ala-asp indujo la inhibición de IL-13, así como la disminución en la apoptosis y el aumento de la resistencia transepitelial (RET) de hasta un 50% [35]. En concordancia con esto, se ha observado un incremento en la apoptosis y una disminución de la RET en pacientes que sufren de EC en comparación con pacientes normales. No obstante, el tratamiento con anti-TNF- α produjo un descenso en los índices apoptóticos y un aumento de la RET, pero no se afectaron las proteínas ocludina, claudina-1 y claudina-4. En adición a esto, un desbalance y alteración de las uniones intercelulares también se ha reportado en pacientes que sufren EII. Por ejemplo, en un estudio con pacientes con EC y CU se observó un incremento de la permeabilidad intestinal, caracterizada por una redistribución y disminución de la expresión de las proteínas ocludina, claudina-5 y claudina-8. En este mismo estudio, se observó un fuerte incremento de la expresión de la proteína formadora de poros claudina-2; sin embargo, no se observaron cambios en la expresión o la distribución de las claudinas-1, -4 y -7. El aumento de la expresión de claudina-2 fue más pronunciado en aquellos pacientes con CU en comparación con los de EC, el cual fue inducido por TNF- α . Además, en los pacientes con EC y CU se observaron más células apoptóticas que en los pacientes normales [36].

En conclusión, todos estos estudios remarcan el importante papel que el epitelio intestinal tiene en la regulación de la homeostasis y en el mantenimiento correcto de la permeabilidad. Al mismo tiempo, señala la importancia de las uniones intercelulares dentro de esta función.

Las uniones intercelulares y su interacción con el citoesqueleto de actina en el mantenimiento de la barrera epitelial

Como ya se ha mencionado, las uniones intercelulares son un conglomerado de moléculas transmembranales y citoplasmáticas que en conjunto forman lo que se denomina el complejo de unión apical (CUA). Estas uniones intercelulares tienen

la delicada función de mantener la integridad y polaridad de las células epiteliales [37, 38] y participar en la regulación de la barrera y la permeabilidad del epitelio [39]. El CUA, comprende a las UE y las UA, localizadas muy cerca de la región apical de la célula. Además, en la región más basolateral de la célula, se encuentran los desmosomas (DSMs) que contribuyen a la estabilidad de los contactos interepiteliales, sirviendo de conexión con los filamentos intermedios de la célula (**figura 3**) [40, 41].

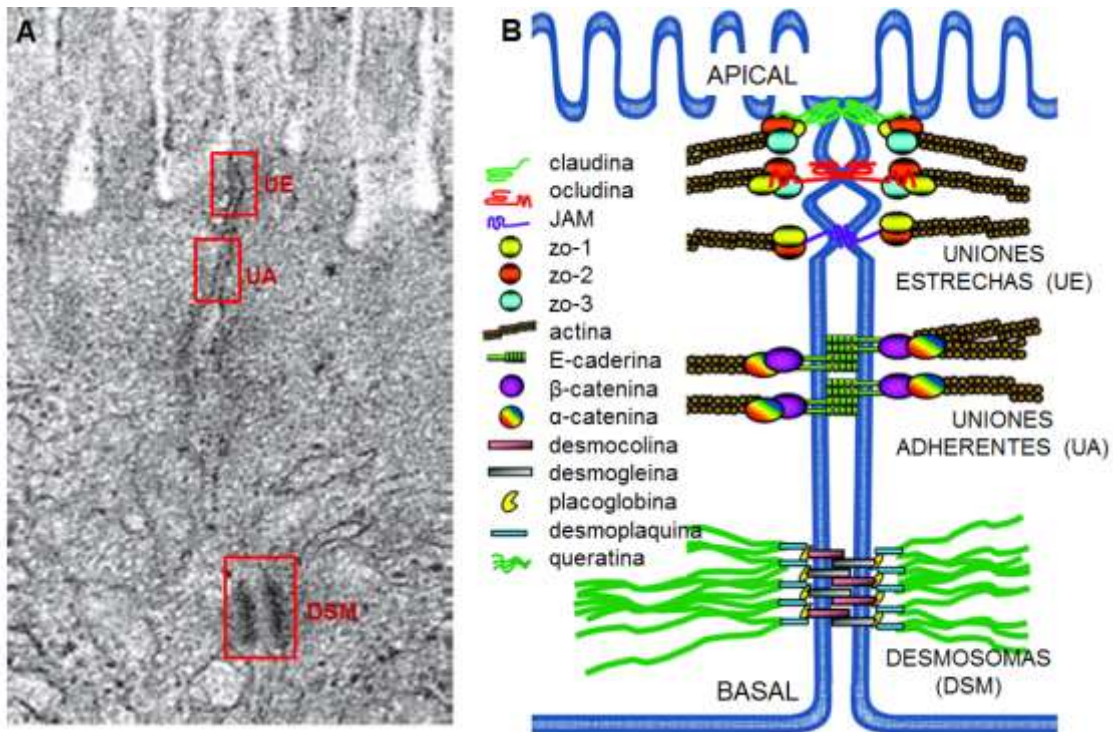


Figura 3. Estructura molecular de las uniones intercelulares de las células del epitelio intestinal. Las uniones intercelulares de las células del epitelio intestinal están formadas por diferentes complejos de proteínas: las UE y UA, que en conjunto forman el CUA, y los DSMs. **A**, microfotografía electrónica que muestra la localización precisa (delimitados por los rectángulos rojos), de cada uno de los complejos proteicos que componen las uniones intercelulares [41, 42]. **B**, debajo de la base de las microvellosidades, las membranas plasmáticas de las células adyacentes parecen fusionarse mediante las UE, donde las claudinas, ocludina, JAM, las proteínas ZO-1, -2 y -3 y F-actina interactúan. E-cadherina, α-catenina, β-catenina, p120 catenina (no mostrada) y F-actina interactúan para formar las UA. Los DSMs, que se localizan por debajo del complejo de unión apical, están formados por las interacciones entre desmogleína, desmocolina, placoglobina, desmoplaquina y los filamentos intermedios (de queratina) [43].

En el caso de las UE, se han identificado tres grandes familias de moléculas que participan en su formación: la familia de las ocludinas/tricelulinas, la familia de las claudinas, y las moléculas de adhesión (JAM). Las UE se localizan en torno de la región apical y lateral de las membranas de las células del epitelio y determinan de manera selectiva la permeabilidad paracelular de los solutos [44].

Ocludina es una proteína transmembranal de 65 kDa perteneciente a la familia de las tetraspaninas. Su interacción homofílica con la célula adyacente crea una barrera contra las macromoléculas, pero no contra pequeños iones [45]. Esta molécula posee un largo dominio C-terminal intracelular, a través del cual puede unirse a otras moléculas tales como ZO-1, interactuando de manera indirecta con el citoesqueleto de actina. La función de ocludina no está perfectamente comprendida pero algunos estudios indican un papel crucial en la estructura de las UE y en la permeabilidad del epitelio intestinal [45, 46].

Las claudinas también son miembros de las tetraspaninas, con un peso aproximado de entre 20-27 kDa. Estas tienen la capacidad de formar interacciones homofílicas y heterofílicas con las moléculas de las células adyacentes, creando una barrera o formando poros selectivos al paso de moléculas [47, 48]. Las claudinas son una familia multigénica compuesta de 24 miembros en el humano y ratón, mostrando un patrón único de expresión en tejidos y líneas celulares [49]. Funcionalmente, estas pueden dividirse en dos tipos, aquellas involucradas en la formación de la barrera (disminuyendo la permeabilidad paracelular), tales como claudina-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11 y -14, y las que forman poros (incrementando la permeabilidad paracelular) como claudina-2, -7, -10, -12 y -15 [41].

La familia de las proteínas JAM, están caracterizadas por dos dominios Ig extracelulares, un dominio transmembranal, y un dominio C-terminal intracelular. La familia JAM se subdivide en dos grupos, aquellas conteniendo un dominio intracelular denominado PDZ [*postsynaptic density protein (PSD)-95, Drosophila disc large tumor supresor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (ZO-1)*]

domain(s)] de clase II, con capacidad de unirse a ZO-1 y Par-3, entre las cuales se encuentran JAM-A, -B y -C (conocidas también como JAM-1, -2 y -4). Por otro lado, se encuentran las proteínas con un dominio PDZ de clase I, tales como JAM-4, CAR (*cox sackie- and adenovirus receptor*), ESAM (*endothelial cell selective adhesion molecule*) y BT-IgSF (*brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily*). La interacción homofílica de los miembros de JAM, se ha relacionado con la formación de las UE así como en el mantenimiento de la barrera epitelial [16, 41, 50].

Por su parte, el núcleo de adhesión de las UA en el epitelio está compuesto de dos tipos principales de proteínas transmembranales, estas son: cadherinas y nectinas; aunque esta también puede contener varios componentes moleculares que aún no han sido del todo caracterizados. Las UA se forman en su mayoría mediante la asociación homofílica de la molécula E-cadherina expresada en la región apical-basal entre dos células epiteliales. Estas aseguran la adhesión intercelular y regulan muchos aspectos de la biología del epitelio [37], tales como la integridad del tejido, la diferenciación celular y la formación del parche preapical, que origina a las UA y que eventualmente desencadena la formación de las UE en la región apical de los contactos celulares. Las UA, también participan en otras importantes funciones, tales como la regulación de la polaridad, así como el control de la proliferación y la motilidad celular [51].

E-cadherina, es una glicoproteína que pertenece a la familia de las cadherinas cuya adhesión es dependiente de calcio (Ca^{2+}); otros miembros de esta familia incluyen a las N-, P- y R-cadherinas. Las cadherinas clásicas como E-cadherina, contienen cinco repetidos extracelulares, a los cuales se le unen iones de calcio para su correcta organización conformacional e iniciar la correcta interacción entre las células adyacentes y la formación de UA [52]. E-cadherina, de esta manera, tiene una importante función en la formación de las uniones intercelulares. Así, después de la formación de estas, E-cadherina experimenta un agrupamiento y una dispersión a lo largo de la membrana lateral, lo que posibilita el fortalecimiento de los contactos celulares [44, 53].

Por otro lado, los DSMs son estructuras altamente especializadas que participan en el anclaje del citoesqueleto de citoqueratina con los sitios de adhesión intercelular. De esta forma, los DSMs facilitan la formación de un andamio altamente organizado, que distribuye las fuerzas mecánicas por todo el tejido epitelial. Estas uniones, son de particular importancia para el mantenimiento de la integridad del tejido y para resistir el estrés físico [54-57]. Las proteínas desmosomales provienen de tres grandes familias: la familia de las cadherinas, proteínas armadillo, y plaquinas. Los miembros de la familia de las cadherinas, las desmogleínas (Dsgs) y las desmocollinas (Dscs), cooperan para formar una zona adhesiva, mientras que la cola citoplasmática de éstas provee de una plataforma de unión para plakoglobina (PG), plakofilinas (PKPs) 1-3 y p007 que son miembros de la familia armadillo. Por su parte, desmoplakina, miembro de la familia de las plakinas, une el citoesqueleto de citoqueratina a esta región especializada de la membrana plasmática cuando ésta es sometida a un estrés, mientras que las interacciones laterales entre éstas proteínas refuerzan su estabilidad [58, 59].

Las proteínas del CUA están asociadas con un conjunto de proteínas que forman una placa citosólica localizada inmediatamente por debajo de la membrana celular, conectando de esta forma a las uniones intercelulares con el citoesqueleto de actina. Así, por ejemplo, las proteínas *zonula occludens* (ZO) (que incluyen a ZO-1, ZO-2 y ZO-3), se asocian de manera directa con los filamentos de actina y con las proteínas transmembranales claudinas y ocludina, además de algunos de los miembros de la familia JAM, tal es el caso de JAM-A, sirviendo como un vínculo entre los componentes de las UE y el citoesqueleto [60-62]

Las proteínas ZO, pertenecen a su vez a la familia de proteínas MAGUK (*membrane-associate guanylate kinase homologs*), que tienen no solo la capacidad de unirse a las UE sino también a las UA, además del citoesqueleto de actina. *In vitro*, ZO-1 y ZO-2 se unen a α -catenina, mientras que ZO-3 se asocia con p120-catenina. ZO-1 y ZO-2. Además de interactuar con ocludina, claudinas o JAM-A, también tienen la capacidad de formar homodímeros por medio de su

dominio PDZ [44]. Adicional a esta importante función, se ha demostrado que ZO-3 tiene un papel relevante en la regulación de la proliferación celular *in vivo*. Se observó además que ZO-3 interactúa con ciclina D1 durante la mitosis, a través de su dominio PSD-95 de clase II. Cuando se rompe esta interacción se incrementa la proteólisis de la ciclina D1 y el arresto en la transición de la fase G₀/G₁ del ciclo celular [63].

Al lado de esta importante función, no obstante, varios de los estudios involucrando a los miembros de la familia ZO remarcan un papel preponderante en el mantenimiento de la polaridad celular, el mantenimiento y estabilidad de las UE en las células epiteliales a través de la interacción con algunos componentes transmembranales y el citoesqueleto [62, 64, 65]. Por ejemplo, *in vitro*, el tratamiento con ácido fítico (*IP6*) en la línea celular epitelial Caco-2 produjo un descenso en la RET y un incremento en el flujo paracelular de solutos. Adicionalmente se observó una redistribución de las proteínas transmembranales ZO-1, ocludina y claudina-1, así como una disminución en la expresión de las mismas, lo cual resultó en una apertura de las UE y en consecuencia un aumento de la permeabilidad [66].

Por otro lado el tratamiento con quercetina, un agonista de la barrera intestinal produjo un aumento de la RET en la línea celular Caco-2 y una disminución del flujo paracelular. El análisis por Western blot de ZO-2, ocludina y claudina demostró un aumento en los niveles totales de estas moléculas y un incremento de la expresión en la fracción del citoesqueleto, lo cual se correlacionó con el incremento de la TER. Adicionalmente, los análisis por inmunofluorescencia demostraron un aumento de claudina-1 y -4 en la región apical que corresponde a las UE [67].

En el caso de las UA, E-cadherina interactúa por medio de su extremo carboxilo terminal en el citoplasma de manera directa con moléculas tales como β -catenina y p-120 catenina y de manera indirecta con α -catenina [68] [51]. α -catenina se une a β -catenina, resultando en la formación del complejo E-cadherina- β -catenina- α -

catenina. α -catenina, por su parte tiene la capacidad de interactuar con los filamentos de actina del citoesqueleto, actuando de esta manera como un vínculo entre el complejo E-cadherina- β -catenina y F-actina [44]. Sin embargo, se ha demostrado *in vitro*, que α -catenina unida a β -catenina es incapaz de unirse a F-actina, y que únicamente la forma libre puede hacerlo, lo que sugiere que el complejo E-cadherina- β -catenina- α -catenina podría estar interactuando a través de otra(s) moléculas(s) que funcionarían como mediador(es) [69]. Algunos estudios han demostrado que α -catenina tiene la capacidad de unirse a EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm actin-binding protein*), el cual estabiliza los filamentos de actina evitando su despolimerización. EPLIN se une a α -catenina cuando esta se asocia a β -catenina y a F-actina, demostrando con ello una nueva vía por medio de la cual E-cadherina interactúa con el citoesqueleto de actina [70, 71].

Por otro lado E-cadherina, se ha involucrado de manera directa con la regulación de la permeabilidad intestinal. La reducción de poliaminas, que se sabe que regulan la permeabilidad intestinal, por medio de DFMO (*alpha-difluoromethylornithine*) redujo el calcio intracelular (Ca^{2+}) y condujo a una disminución de la expresión de E-cadherina, pero no de ZO-1, ZO-2 o JAM-A, guiando a un incremento del flujo paracelular en la línea celular IEC-6. En concordancia con esto, la adición de la poliamina espermidina exógena revertió los efectos producidos por DFMO, restaurando la expresión de E-cadherina y con ello el flujo paracelular [72, 73].

Así también, se ha demostrado que el tratamiento con esfingosina-1-fosfato (S1P) juega un papel relevante en el incremento de la función de la barrera a través de E-cadherina. Así, el tratamiento con este agonista en la línea celular intestinal epitelial IEC-Cdx2L1 condujo a un incremento en los niveles totales de E-cadherina y una fuerte localización de ésta en los bordes celulares. Este incremento en su expresión se vio acompañado de una disminución del flujo paracelular del manitol y de un incremento en la RET [74].

Hasta ah, hemos señalado la importancia del mantenimiento de la barrera epitelial intestinal, formada por las UE y las UA por medio de las cuales se forman los contactos celulares. Se ha descrito también como estas se conectan al citoesqueleto de actina mediante un conjunto de moléculas adaptadoras. En consecuencia, el citoesqueleto de actina juega una importante función en la regulación de la estabilidad de los contactos de las células epiteliales y en la permeabilidad del epitelio intestinal. El citoesqueleto de actina forma un anillo cortical que estabiliza las uniones intercelulares, o caso contrario forma fibras de estrés contráctiles que conducen a su desestabilización. Sin embargo, el rol de algunas proteínas de unión a actina (*actin-binding proteins, ABP*) tales como cortactina, en el control de la permeabilidad se ha estudiado poco [75]. Si bien es cierto que cortactina interactúa con el citoesqueleto de actina y de manera importante con ZO-1 en las UE y con E-cadherina en las UA en las células epiteliales, promoviendo la formación y estabilidad de las uniones intercelulares, su función en la regulación de la permeabilidad intestinal aún no se ha estudiado [76-78].

El papel de cortactina en la remodelación del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de las células está compuesto por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos. Todos estos elementos son parte fundamental del entramado molecular que da forma, rigidez y soporte a la célula [79]. Los microfilamentos, se componen de pequeñas subunidades de actina globular (G-actina), cuyo papel es de particular relevancia en la remodelación del citoesqueleto [80]. Así, muchos de los fenómenos celulares, tales como adhesión, motilidad y migración, mantenimiento de la morfología y polaridad, además del tráfico intravesicular y fagocitosis, dependen fundamentalmente de los procesos de remodelación del citoesqueleto de actina.

Dichos procesos, a su vez, dependen del balance entre la polimerización y la despolimerización de la actina, bajo una estrecha regulación espacial y temporal.

En este sentido el ensamble del citoesqueleto dependerá de una transición regulada entre la G-actina y la actina filamentosa (F-actina). La actina es una GTPasa, y su hidrólisis nucleotídica llevada a cabo por la actina es un factor crítico que regula esta transición (**figura 4**) [81].

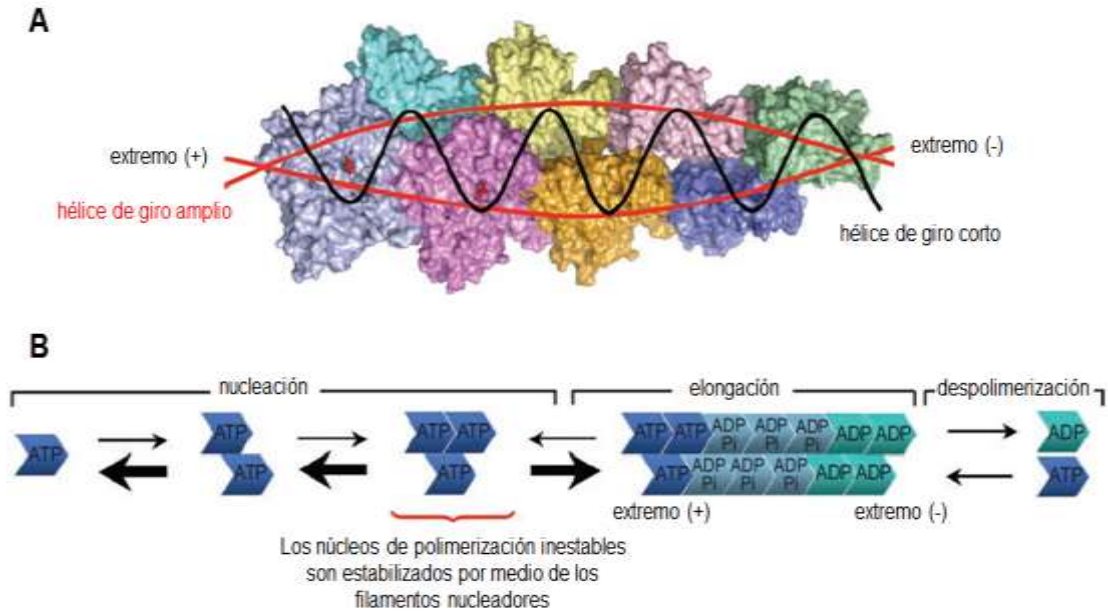


Figura 4. Estructura y nucleación de los filamentos de actina (F-actina). **A.** La estructura de un filamento puede ser descrita como una hélice de giro corto que va en sentido contrario de las manecillas del reloj, construida por subunidades colocadas una con respecto de la otra con una longitud promedio de la mitad de una subunidad, o bien, como dos hélices diestras de giro amplio enrolladas una con respecto a la otra y construidas de monómeros de actina. **B.** Los monómeros de actina-ATP se adicionan más rápido en los extremos (+), la hidrólisis de los nucleótidos se lleva a cabo en el filamento, y la disociación de los monómeros de actina-ADP toma lugar principalmente en el extremo (-). En las células, la transición entre la actina monomérica y filamentosa es controlada por numerosos factores, incluyendo la hidrólisis nucleotídica llevada a cabo por la misma actina y por proteínas conocidas como nucleadoras de los filamentos de actina. Adicionalmente, la dinámica del citoesqueleto dependerá de las proteínas de unión a F-actina, así como de las proteínas de andamiaje y señalización [81, 82].

Los monómeros de actina se unen al extremo rasurado (*barbed*, +) en crecimiento del filamento primario en su estado de ATP. La hidrólisis toma lugar en el filamento, y los monómeros de actina-ADP se disocian del extremo agudo (*pointed*, -). Sin embargo, este proceso de polimerización y despolimerización de

la actina, no es suficiente para explicar la gran variedad de procesos que toman lugar en la célula. Por ello, junto con los monómeros de actina, las proteínas de unión a la F-actina, las proteínas de andamiaje y de señalización, intervienen de manera invariable en la dinámica del citoesqueleto de actina [81, 82]. Uno de tales elementos es la proteína de unión a actina llamada cortactina (CTTN) [75, 83].

CTTN es un factor promotor de la nucleación (nucleation promoting factor, NPF) de los filamentos de actina. Esta, se expresa de manera ubicua en casi todos los tipos celulares, excepto en algunas de origen hematopoyético, donde se expresa su homólogo HS1 [84]. En el año de su descubrimiento, CTTN se identificó como un nuevo elemento de unión al citoesqueleto, destacándose por ser el blanco de la fosforilación de la tirosina cinasa, Src [85]. CTTN, tiene un peso aproximado entre 63-65 kDa, y en el humano se expresan las isoformas SV-1 y SV-2, derivada del empalme (*splicing*) alternativo de los exones 10 y 11 del gen EMS1, el cual está localizado en la región cromosomal 11q13 [86]. Dicha región se ha visto involucrada en el desarrollo de ciertos cánceres, tales como cáncer de cabeza y cuello, pulmón y esófago, así como en cánceres de hígado, vejiga y pecho, donde su sobreexpresión es comúnmente observada [87].

Estructuralmente, CTTN se compone por un dominio ácido en su extremo amino-terminal, que le permite unirse al complejo Arp2/3 y activarlo y dar inicio al proceso de polimerización y ramificación de los filamentos de actina. Posee además, un dominio hexarrepetido de 37 aminoácidos que le confiere la capacidad de unirse a la F-actina del citoesqueleto. En su extremo carboxilo terminal, CTTN posee una región rica en prolinas, serinas y treoninas y otra más rica en tirosinas, permitiéndole ser fosforilada (activada) por diferentes cinasas. También, en su extremo carboxilo, se puede encontrar un dominio SH3 (*Src homology 3-domain*), mediante el cual CTTN se une a una plétora de moléculas que también participan en la dinámica del citoesqueleto y su remodelación, además del tráfico intravesicular, y de manera muy importante en el mantenimiento y estabilidad de las uniones intercelulares (**figura 5**) [76, 77, 86-88].

Cuando CTTN es analizada por medio de Western blot, ésta migra como una banda doble de 80/85 kDa, debido a la fosforilación de las serinas 405 y 418 (S405 y S408) por parte de la cinasa ERK1/2, provocando la liberación de su dominio SH3 y su cambio conformacional, resultando en la activación de N-WASP e incrementando la nucleación de los filamentos de actina, mediante el complejo Arp2/3 [89]. Por otro lado, existen tres residuos de tirosinas que son críticas (Y421/466/482) para la fosforilación de CTTN, por varios miembros de la familia de cinasas Src, entre ellos v-Src, c-Src y Fyn, además de otras tirosinas cinasas, tales como FER, Syk y Met. Dichas fosforilaciones son importantes para incrementar la función de CTTN en fenómenos tales como la migración y la invasión [76, 90].

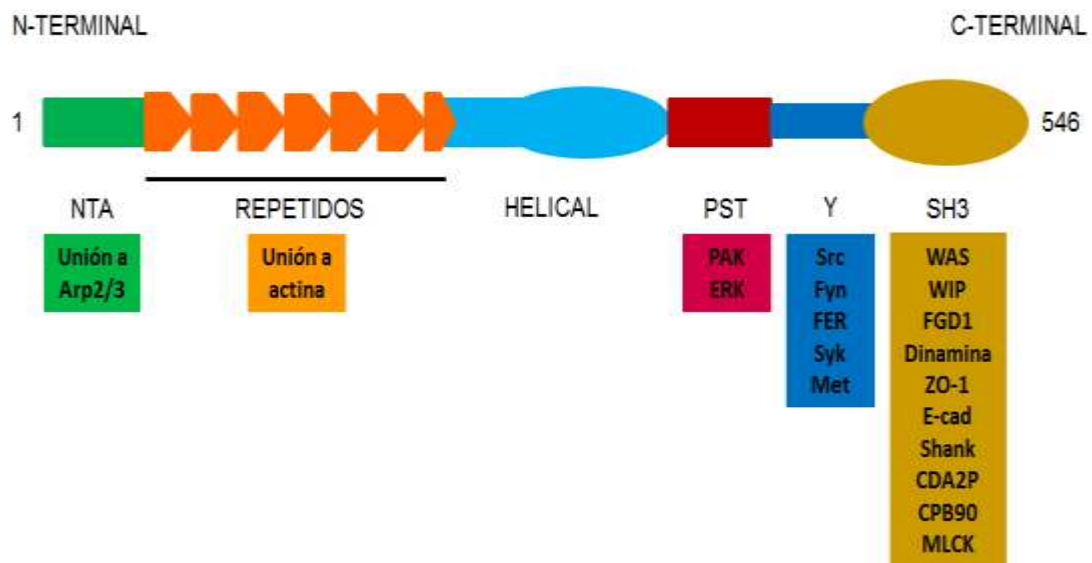


Figura 5. Estructura de cortactina. CTTN es un factor promotor de la nucleación de los filamentos de actina. Posee un dominio ácido (NTA) y un dominio hexarrepetido localizados en su extremo amino terminal que le permite interactuar con el complejo Arp2/3 y con los filamentos de actina, de manera respectiva. CTTN, posee además, un dominio rico en prolina, serinas y treoninas (PST) y otro más rico en tirosinas (Y), que son fosforilados por diferentes cinasas. En su extremo carboxilo terminal existe un dominio SH3, que le permite interactuar con una variedad de moléculas, entre ellas ZO-1 y E-cadherina, componentes primordiales de las uniones intercelulares [76, 86].

En adición a su fosforilación, CTTN también es regulada a través de la acetilación, por medio de la acetil transferasa p300, y la desacetilación por medio de la

histona deacetilasa 6 (HDAC6) y sirtuina-1 [91]. La acetilación de CTTN conlleva a la neutralización de la carga de los residuos de lisina dentro de su motivo de unión a F-actina, disminuyendo su capacidad de unión y motilidad celular. La acetilación de CTTN parece tener relevancia en la progresión del cáncer, ya que la expresión de HDAC6 es requerida para la formación y degradación de los invadopodios en el cáncer de mama [92]. La fosforilación y acetilación de CTTN, juegan un papel relevante en la dinámica del citoesqueleto de actina, pues existe una competencia entre ambos procesos. De esta manera, la fosforilación de CTTN inhibe la propagación celular, ya que se inhibe su asociación con FAK [93].

La habilidad de CTTN de unirse al complejo Arp2/3, -responsable directo de la polimerización de los filamentos de actina, así como la habilidad de su dominio SH3 para interactuar con diferentes moléculas, le confiere un importante papel en la formación de estructuras celulares que participan en la motilidad, la invasión, el tráfico intravesicular, en la adhesión celular, formación de sinapsis y en la morfogénesis celular [76]. Para llevar a cabo estos complejos procesos, CTTN es fosforilada por ERK1/2 (S405/S418) en función de diferentes estímulos, lo que resulta en su unión a N-WASP (neuron Wiskott Aldrich Syndrome protein), a través del dominio SH3, produciendo el incremento de la nucleación de los filamentos de actina (F-actina) por parte del complejo Arp2/3 (**figura 6**). No obstante, la fosforilación de CTTN por medio de las tirosinas cinasas (Y421/466/482) de la familia Src se ha visto involucrada en la inhibición de su capacidad para unirse a N-WASP, funcionando de esta manera como un interruptor de encendido y apagado que controla el proceso de polimerización de F-actina [94]. En conjunto, tales mecanismos llevados a cabo por CTTN, tienen un papel importante no solo en la estabilización de los filamentos ramificados de actina, sino también en la inhibición de la despolimerización de los mismos.

Como ya se anticipó, la fosforilación de CTTN, es un importante activador y regulador de su función. De esta manera, la fosforilación de CTTN por medio de Erk1/2 ha demostrado ser importante para la formación y persistencia de los lamelipodios en células tumorales. Su fosforilación simultánea por parte de Erk1/2

y por tirosinas cinasas, permiten a las células regular la remodelación de los filamentos de actina. Por otro lado, la interacción de CTTN con N-WASP y otras proteínas efectoras a través de SH3, median la sincronización de las vías regulatorias río arriba (estímulos externos o internos), confirmando con ello papel de CTTN como un punto de integración en la transducción de señales [95].

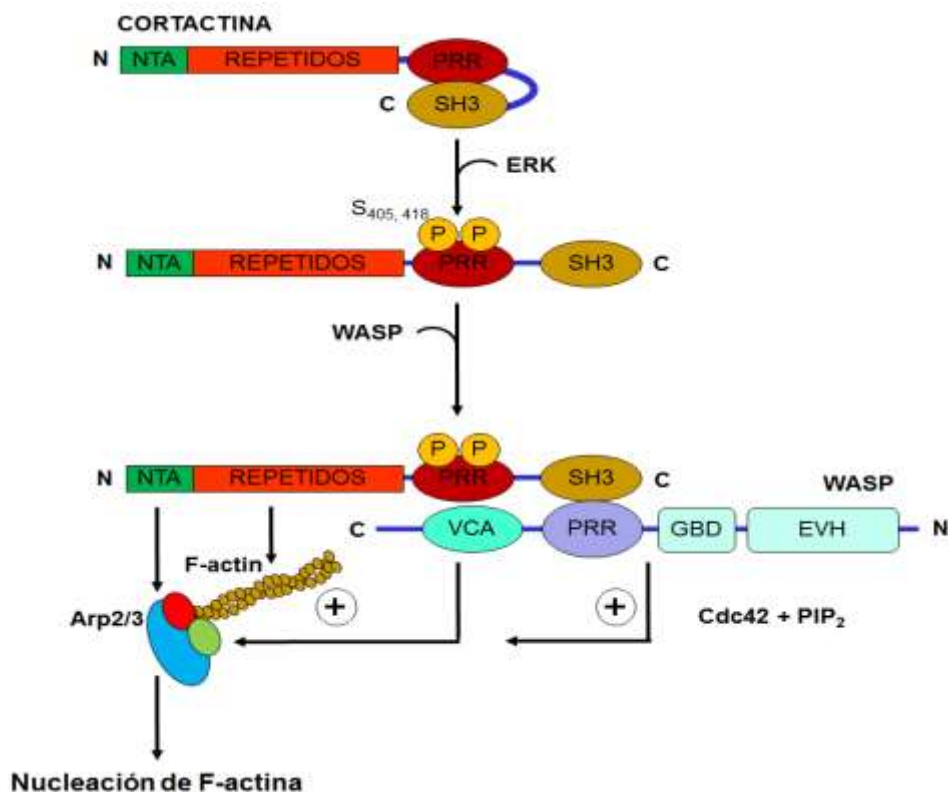


Figura 6. Cortactina tiene un papel importante en la remodelación del citoesqueleto de actina. CTTN puede existir en su forma inactiva interactuando intramolecularmente con su dominio SH3 por medio de la región rica en prolinas (PRR), inhibiendo su interacción con otros blancos celulares. La fosforilación de CTTN dentro de esta región por parte de Erk1/2 lo libera de su inhibición e induce un cambio conformacional permitiendo su unión con N-WASP. Esto, junto con su habilidad para unirse a los filamentos de actina y al complejo Arp2/3, así como la presencia de Cdc42 y PIP₂, ayudan a estabilizar la estructura ternaria de CTTN-N-WASP-Arp2/3 e incrementar (+) la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto [96].

Por otro lado, se ha observado que la fosforilación de los residuos de tirosinas localizados cerca del extremo carboxilo de CTTN, requiere de la participación de su dominio amino terminal y de su localización dependiente de Rac-1 en la

periferia de la célula. De esta forma, la fosforilación de cortactina en los residuos de tirosina 421 y 466 por medio de Src, se incrementa en respuesta a la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Rac-1 guiandola a su localización junto con los filamentos de actina (F-actina) en podosomas y lamelipodios [97]. Sin embargo, también se ha reportado que la polimerización de actina mediada por CTTN solo requiere de la activación de Rac-1; mientras que la fosforilación de serinas o treoninas no son necesarias para llevar a cabo este proceso [98].

Esta capacidad de CTTN de unirse a otros factores, le confiere un papel versátil y relevante en la remodelación del citoesqueleto. Se ha demostrado, por ejemplo que, CTTN tiene la capacidad de interactuar con WIP (*WASP-Interacting Protein*) incrementando con ello, la eficiencia de activación del complejo Arp2/3 y de la polimerización de los filamentos de actina en la periferia de las células [99], específicamente en los sitios de polimerización de actina dentro de los lamelipodios [95, 100]. Sin embargo, el papel de CTTN dentro de estas estructuras parece ser dispensable, ya que la ausencia de CTTN en fibroblastos KO de CTTN, no mostró ninguna diferencia ultraestructural en el ensamblaje de tales estructuras [101]. Aún más, se ha argumentado que dichas estructuras no son requeridas para la motilidad celular, sugiriendo de esta manera un mecanismo alternativo. Se ha reportado que la deficiencia de CTTN produce defectos en la secreción de matriz extracelular (MEC) y defectos en los lamelipodios y la motilidad celular. Además de esto, se observó que la secreción de MEC depende de la interacción de CTTN con el complejo Arp2/3 y de los filamentos de actina, incrementado de esta forma la persistencia de dichas estructuras. De esta manera el defecto en la secreción de MEC debido a la deficiencia de CTTN, explicaría el defecto en la adhesión en éstas células [102, 103].

La degradación de MEC es un evento importante para crear un espacio que permite el crecimiento tumoral y la migración, donde la formación de estructuras especializadas, como los invadopodios o los podosomas tienen una función

importante, donde CTTN es un elemento clave en su formación. De hecho, se usa frecuentemente como un marcador que permite la identificación de tales estructuras [90]. En concordancia con esto, se ha observado la participación de CTTN en la formación de invadopodios en la línea celular MDA-MB-231. De manera interesante, se observó la colocalización y acumulación de CTTN con la metaloproteasa MT1-MMP en la base del invadopodio; mientras que su inhibición condujo a un defecto en la formación de estas estructuras y en la degradación de la MEC [104]. De esta forma, se propone que CTTN actúa en la formación de invadopodios, primeramente facilitando el ensamblaje de estas estructuras por medio de Arp2/3 y N-WASP, así como de moléculas reguladoras río arriba (*upstream*), tales como cdc42, Fgd1 y Nck1; y segundo, mediante la regulación del reclutamiento de metaloproteasas hacia los invadopodios, por medio de proteínas relacionadas con el tráfico intravesicular hacia el citoesqueleto de actina, tales como v-SNARE VAMP7, o de Sce8/EXOC4 por medio de SHANK2 involucradas de manera directa con el proceso de exocitosis [90].

En los podosomas, CTTN se ha localizado cerca de las terminaciones de las fibras de estrés, actuando como una plataforma para el ensamblaje de estas estructuras. Adicionalmente, la translocación de CTTN hacia estos sitios requiere de su interacción con N-WASP por medio de su dominio SH3 y de su interacción con el dominio de unión a CTTN de WIP (WIP110-170) [105, 106]. Aún más, la interacción de CTTN con WIP resulta necesaria para la secreción de metaloproteasas de la matriz (MMP), *in vitro*. De esta manera, la infección de células dendríticas deficientes de WIP (WIP^{-/-}) con una forma mutante incapaz de unirse a CTTN, fue capaz de formar podosomas desorganizados pero no de degradar la MEC. Estos resultados sugieren la participación de CTTN en la formación de podosomas, a través de la interacción con WIP y WASP, y de su función en la degradación de la MEC, por medio de la secreción de MMP [106].

También, se ha observado que CTTN participa en la remodelación de los filamentos de actina, a través de su unión con dinamina-2, *in vitro*. CTTN estimula la actividad intrínseca de la actividad de la GTPasa dinamina-2 y mantiene la

unión estable entre los filamentos de actina y dinamina-2 [107, 108]. Esto tiene particular importancia en algunas estructuras celulares involucradas en la motilidad, tales como los lamelipodios, donde se ha observado que dinamina-2 regula la distribución, tanto de α -actinina como de CTTN, dentro de estas estructuras [109]. Particularmente, dentro del cono de crecimiento neural donde se observó la colocalización de CTTN y dinamina-2 en la base de la zona de transición de avance. De igual forma, se pudo demostrar que la sobreexpresión de CTTN y dinamina-2 produce un crecimiento excepcional en el cono neural [110], el cual estaría controlado por Src2 mediante su fosforilación; de esta manera la sobre expresión y activación de Src2 conduce a un incremento de la longitud de los lamelipodios, el tiempo de protrusión, y la densidad de la red de los filamentos de actina en el cono neural; mientras que su disminución tiene el efecto opuesto [111].

Por otro lado, la interacción de CTTN con dinamina-2 tiene relevancia en el proceso de internalización celular. Esta interacción participa de manera directa en la endocitosis dependiente e independiente de clatrina, demostrando el papel de CTTN en la dinámica de la actina y la endocitosis [112]. También se ha demostrado que, CTTN participa en la endocitosis del EGFR *in vitro*. El tratamiento con EGF, en la línea celular MDA-MB-231, condujo a la interacción de CTTN con la proteína CD2AP y el complejo Arp2/3 y con el complejo EGFR-Cbl en las membranas celulares, produciendo la internalización de este receptor. De esta manera, CTTN participa en la maquinaria endocítica que regula el tráfico de vesículas conteniendo receptores, tales como EGFR, proveyendo así, un mecanismo de autorregulación al estímulo de EGF [113].

Cortactina y su función en la regulación de la permeabilidad

Hasta ahora se ha descrito que CTTN es una molécula que cumple múltiples funciones en la célula, destacando aquellas relacionadas con el ensamblaje de los filamentos de actina. No obstante, CTTN participa en la formación y estabilización

de las uniones intercelulares. In vivo, se ha demostrado que CTTN tiene la capacidad de interactuar con la proteína intracitosólica de las UE ZO-1, por medio de su dominio SH3, contribuyendo a su estabilidad [78]. También se ha observado que CTTN promueve la formación de UA estables dependientes de E-cadherina, *in vitro*. La disminución de la expresión de CTTN mediante un RNAi conduce a la desestabilización de los contactos celulares dependientes de E-cadherina, una alteración en la morfología celular y la disminución de E-cadherina en la región apical de las células epiteliales. Adicionalmente, la desestabilización de las UA, por medio de la reducción del calcio extracelular con EGTA, conduce a un dramático retraso en el restablecimiento de las uniones dependientes de E-cadherina, demostrando con esto el papel de CTTN en la formación de los contactos celulares [77]. Posteriormente, en un estudio *in vitro*, se demostró que el reclutamiento de CTTN a estos contactos celulares es necesario para su fosforilación por Src, promoviendo la preservación de la integridad de los contactos y del anillo cortical del citoesqueleto de actina [114]. Aún más, 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 [88].

Por el contrario, se ha observado que la fosforilación de CTTN por PKD1, dependiente de RhoA en la serina 298 (S298) conduce a la disolución de las UA. Dicha fosforilación disminuye su interacción con β -catenina y con la proteína de unión a actina, vinculina, y la disolución de estas desde los filamentos de actina [115]. Estos estudios llevados a cabo *in vitro* no solo refuerzan la importancia de CTTN en la formación y estabilización de las uniones intercelulares sino también su función como un importante nodo de integración en la dinámica de los complejos proteicos, durante el desensamble y la formación de estos. No obstante su papel en el mantenimiento de la estabilidad de las uniones intercelulares y la barrera epitelial intestinal *in vivo*, aún no ha sido estudiado.

Dado que la dinámica de las uniones intercelulares afecta directamente la permeabilidad del epitelio [41, 72, 116-118], suponemos, que CTTN participa en la

regulación de la permeabilidad. Y aunque, la función de CTTN en la regulación de la permeabilidad epitelial no ha sido analizada, algunos estudios demuestran su función en el control de la permeabilidad del endotelio vascular, el cual es un tipo de epitelio especializado y dinámico que recubre enteramente el sistema vascular [119, 120].

Así, se ha demostrado que el incremento de la barrera endotelial por ATP en células endoteliales de arteria pulmonar humana conduce a una rápida translocación de Rac y CTTN en la periferia de las células y a un incremento significativo en la activación de ambas moléculas. No obstante, la reducción de la expresión, tanto de Rac como CTTN, produjo un marcado incremento de la permeabilidad, aún en presencia de ATP [121], lo que remarca la importancia de CTTN en la protección de la barrera endotelial. *In vivo*, se ha demostrado que la deficiencia de CTTN conduce a un incremento de la permeabilidad endotelial de solutos de alto peso molecular, en un modelo de ratón KO de CTTN. No obstante, a pesar de este incremento en la permeabilidad, los niveles de expresión de los componentes de las uniones intercelulares del endotelio vascular tales como VE-cadherina (*vascular endotelial cadherin*), ESAM (*endotelial cell-selective adhesión molecule*), JAM-A, así como claudina-5 e ICAM-1 (*intercelular adhesión molecule-1*) no fueron afectados en comparación con los ratones silvestres. *In vitro*, se observó un incremento de la permeabilidad así como una disminución de la resistencia eléctrica endotelial, lo que sugiere que CTTN es necesaria para el mantenimiento de la estabilidad de las uniones intercelulares [122].

Los ratones CTTN-KO generados a partir de la remoción del exón 7 del RNAm para este mismo gen, fenotípicamente no demostraron ninguna anomalía visible, y en consecuencia estos animales presentaron una sobrevivencia normal. De esta manera, parece ser que CTTN no es esencial para el desarrollo normal y la sobrevivencia de estos animales [122]. Sin embargo, el aumento de la permeabilidad endotelial demuestra que realmente existe una consecuencia fisiológicamente importante. Es por ello, que el modelo de ratón KO de CTTN representa un importante modelo para el estudio de la barrera intestinal *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

La integridad de las uniones intercelulares es indispensable para el mantenimiento de la barrera del epitelio intestinal. Su correcto funcionamiento es dependiente de la remodelación del citoesqueleto de actina, cuyo proceso depende de sus reguladores, tales como CTTN. Si bien se ha estudiado la presencia de CTTN en los contactos de las células epiteliales, facilitando la adhesión celular, el ensamble y la estabilidad de las uniones, así como su papel en la permeabilidad del endotelio vascular han sido estudiados; su papel en la regulación y mantenimiento de la barrera epitelial intestinal aún necesitan ser estudiadas.

HIPÓTESIS

Cortactina se requiere para controlar la integridad de la barrera epitelial intestinal.

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar los mecanismos moleculares por los cuales CTTN regula la integridad de los contactos intercelulares y la permeabilidad del epitelio intestinal.

Objetivos particulares

- Investigar el papel del CTTN en el progreso y la severidad de la colitis experimental *in vivo*.
- Generar una línea celular epitelial intestinal *knockdown* estable de CTTN.
- Investigar la participación de CTTN en la permeabilidad epitelial.
- Evaluar el papel de CTTN en la composición de las uniones intercelulares y en la remodelación del citoesqueleto de actina.
- Analizar la contractilidad de actomiosina en la regulación de la permeabilidad intestinal *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico, equipos, reactivos y programas bioinformáticos

Animales

Para la estandarización del protocolo de la colitis aguda experimental se utilizaron ratones silvestres de la cepa C57BL/6. Una vez que el protocolo fue estandarizado, se utilizaron ratones deficientes de CTTN (CTTN-KO) con un *background* genético C57BL/6 que ya fueron descritos [122]. Tanto los ratones silvestres como los KO fueron machos, con una edad entre 10-12 semanas y un peso promedio de 22.0 g. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el CICUAL del Cinvestav.

Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas bacterianas DH5- α y XL-1 blue calcio-competentes, transformadas por choque térmico a 42 °C durante 2 minutos con el plásmido lentiviral conteniendo el shRNA de CTTN o el control (*scrambled*) y con 5 plásmidos para el empaquetamiento de la partícula viral. Las bacterias transformadas fueron expandidas y usadas para la extracción de los plásmidos. El resto de las bacterias fueron resuspendidas en medio LB (Luria-Bertani) con glicerol 10% y almacenadas a -80 °C para su preservación.

Células y medios de cultivo

La línea celular humana derivada de riñón embrionario HEK293T (ATTC®, E.U.A) y de cáncer colorectal de epitelio intestinal humano Caco-2 (ATTC®, EUA) fueron cultivados en medio DMEM Advanced (GIBCO, E.U.A), suplementado con 2 mM de L-glutamina (GIBCO, E.U.A), 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de

estreptomycin (Corning, E.U.A). El medio de cultivo, tanto para las células HEK293T como para las Caco-2 fueron suplementadas con 5% y 10% de SFB (GIBCO, E.U.A), de manera respectiva. Para la producción del vector lentiviral, la línea celular HEK293T fue utilizada en el pasaje celular 13; mientras que para la producción de la línea celular *Knock-Down* de CTTN, se utilizó la línea celular Caco-2 en el pasaje 14

Plásmidos y oligonucleótidos

Para la clonación del shRNA de CTTN y scrambled se utilizó el vector lentiviral pLKO.1-TRC Cloning Vector (Addgene, E.U.A) (**figura 7**). También, se utilizaron 5 plásmidos de empaquetamiento (Thermo Scientific, E.U.A), con los genes de resistencia a puromicina y ampicilina. **Secuencia cortactina-1:**aagctgagggagaatg tcttt [123], oligo sentido: 5'-ccggaagctgagggagaatgtctttctcgagaaagacattctccctcagctt ttttg-3', oligo antisentido: 5'-aattcaaaaaaagctgagggagaatgtctttctcgagaaagacattctcc ctcaagctt-3'. **Secuencia cortactina-2:**caccaggagcatatcaacata (Qiagen siRNA CTTN 5), oligo sentido: 5'-ccggcaccaggagcatatcaacatactcgagtatgtt gatatgctctggtgttttg-3', oligo antisentido: 5'-aattcaaaaacaccaggagcatatcaacatactcgagtatgttgatgctctg gtg-3'. **Secuencia control (scrambled) shRNA:** 5'-cggagaagt ggagaagcatac-3'.

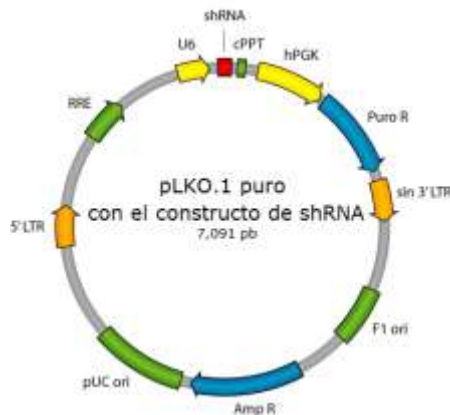


Figura 7. Mapa del vector de clonación lentiviral pLKO.1. El vector contiene el sitio de clonación (EcoRI y AgeI) para la secuencia oligonucleotídica correspondiente al shRNA de CTTN y scrambled.

Reactivos, materiales, equipos y anticuerpos

Tabla 1. Tabla de reactivos utilizados en los experimentos de este proyecto.

Reactivo	Marca/País
2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), ABTS	Sigma-Aldrich, E.U.A
4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazinetanosulfónico ácido, HEPES	Sigma-Aldrich, E.U.A
Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA	Sigma-Aldrich, E.U.A
Agua desionizada, H ₂ O	MilliQ®, E.U.A
Albumina de suero bovino, BSA	Sigma-Aldrich, E.U.A
Anestésico general de uso veterinario xilazina y ketamina	PiSA, México
Bromuro de hexadimetrina, polibreno	Sigma-Aldrich, E.U.A
Buffer salino de fosfatos 1X, PBS	Sigma-Aldrich, E.U.A
Citrato de sodio dihidratado	Sigma-Aldrich, E.U.A
Colorante azul de Evans	Sigma-Aldrich, E.U.A
Colorante cristal violeta	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	Affymetrix, E.U.A
Dextrano-isotiocianato de fluoresceína de 4 kDa	Sigma-Aldrich, E.U.A
Dihidrocloruro de puromicina	Sigma-Aldrich, E.U.A
Dimetilformamida	MACRON, A. Saudita
Etileno glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetracético, EGTA	R.Organics, E.U.A
Gelatina factor de anclaje, AF	GIBCO, E.U.A
Glicerol	Sigma-Aldrich, E.U.A
Histopaque® 1077/1119	Sigma-Aldrich, E.U.A
Inhibidor de Akt1/2	Sigma-Aldrich, E.U.A
Inhibidor de fosfatasas phosSTOP	ROCHE, E.U.A
Inhibidor de JNK, SP600125	Sigma-Aldrich, E.U.A
Inhibidor de mTOR	Sigma-Aldrich, E.U.A
Inhibidor de proteasas Complete™	ROCHE, E.U.A
Inihibidor de ROCK1, Y-27632	Sigma-Aldrich, E.U.A
Medio de montaje Vectashield con DAPI	V. Laboratories, E.U.A
MgCl ₂	J.T. Baker; E.U.A
N-Acetil-L-cisteina	Sigma-Aldrich, E.U.A
NaCl	J.T. Baker; E.U.A
N-formilmetionil-L-fenilalanina, fMLP	Sigma-Aldrich, E.U.A

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

Péptido faloidina-AF568	T. Scientific, E.U.A
Polietilenimía	Sigma-Aldrich, E.U.A
Solución bis/acrilamida 30%	BIORAD
Solución de peróxido de hidrógeno, H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, E.U.A
Solución salina balanceada de Hank, HBSS/HBSS-	GIBCO, E.U.A
substrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico/Femto	T. Scientific, E.U.A

Tabla 2. Lista de materiales utilizados en este proyecto.

Materiales	Marca/País
Cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro	Corning, E.U.A
Filtros transwells de poliéster de 6.5 mm x de 0.4/3.0 µm	Costar, E.U.A
Jeringas para tuberculina	BD Plastipak, México
Kit para detectar sangre oculta en heces ColoScreen	H. Laboratories, E.U.A
Membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm	BIORAD, E.U.A
Pipetas serológicas de 5/10 ml	Costar, E.U.A
Placas de cultivo bacteriológico	Corning, E.U.A
Placas de cultivo celular de 60/100 x 20 mm	Corning, E.U.A
Placas de cultivo de 6/24/96 pozos,	Costar, E.U.A
Tubos de microcentrífuga de 1.6 ml	Axygen, E.U.A
Tubos para centrifugación de 15/50 ml	Corning, E.U.A
Viales criogénicos de 2 ml	Corning, E.U.A

Tabla 3. Equipos utilizados en este proyecto.

Equipos	Marca/País
Agitador de balanceo (rocker)	Daigger®, E.U.A
Agitador orbital (mini shaker)	Daigger®, E.U.A
Balanza analítica	Ohaus, E.U.A
Baño de agua HOT TUBE	B. Scientific, E.U.A
Centrífuga refrigerada Allegra® X-12R	B. Coulter, E.U.A
ChemiDoc MP System	BIORAD, E.U.A
Criotomo CM3050 S	Leica, E.U.A
Escaner CS2 digital pathology	Leica, E.U.A
Espectrofotómetro BioPhotometer	Eppendorf, E.U.A
Fluorómetro Versa Fluor	BIORAD, E.U.A
Incubadora de células con CO ₂ 8000 WJ	T. Scientific, E.U.A
Microcentrífuga refrigerada 5424R	Eppendorf, E.U.A
Microscopio confocal láser Fluoview™ 300	Olympus, E.U.A

Microscopio invertido de campo claro TYPE101M	Motic, Alemania
Ohmímetro Millecell®-ERS	Millipore, E.U.A
Thermomixer confort de 24 tubos de 1.5 ml	Eppendorf, E.U.A
Ultracongelador -80 °C	T. Scientific, E.U.A

Tabla 4. Anticuerpos usados en los ensayos de inmunofluorescencia y Western blot. Las concentraciones utilizadas son descritas en la parte de métodos.

Anticuerpos primarios	Marca/País
Conejo anti-ZO1	Invitrogen, E.U.A
Conejo anti-occludina	T.-Fisher, E.U.A
Conejo anti-claudina-1, -2, -4	T.-Fisher, E.U.A
Conejo anti- β -catenina	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-E-caderina	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-Ki67	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-capasa-3	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-PARP	Cell Signaling, E.U.A
Conejo anti-Erk o p-Erk	Cell Signaling, E.U.A
Conejo anti-p-histona-H3	Santa Cruz, E.U.A
Conejo anti-MLC o p-MLC	Cell Signaling, E.U.A
Ratón anti-cortactina	Millipore, E.U.A
Ratón anti-actina;	Laboratorio
Ratón anti- γ -tubulina	T.-Fisher, E.U.A
Anticuerpos secundarios	Marca/País
Cabra anti-ratón-AF568/488	T.-Fisher, E.U.A
Cabra anti-conejo-AF568/488	T.-Fisher, E.U.A
Cabra anti-ratón-HRP	Santa Cruz, E.U.A
Cabra anti-conejo-HRP	Santa Cruz, E.U.A

Programas bioinformáticos

Para la medición de la distancia entre los núcleos celulares de las criptas y la edición de imágenes se utilizó el programa ImageJ (NIH, E.U.A). Para la elaboración y edición de gráficos se utilizaron los programas Excel® (Microsoft, E.U.A) y SigmaPlot V11 (Systat Software, E.U.A). Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad

Software, E.U.A). Para el análisis y edición de las imágenes de las tinciones con H&E se utilizó el software LAS AF Lite (Leica, E.U.A).

Métodos

Estandarización del protocolo de colitis aguda experimental in vivo y evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAE)

Se utilizaron ratones silvestres C57BL/6 provenientes del bioterio del CINVESTAV. Estos fueron puestos en jaulas durante 3 días para su aclimatación. Luego, los animales fueron tratados con las concentraciones de 3.0, 3.5 y 4.0% de DSS (40-50 kDa), durante 7 días; mientras que el grupo de animales control solo con agua potable. En este tiempo el índice de actividad de la enfermedad (IAE) fue monitoreado diariamente [124, 125], asignando un valor a cada parámetro evaluado, dependiendo de la severidad del daño (**Tabla 5**). La sumatoria de los parámetros evaluados representa el IAE, y su valor máximo es de 12 puntos. Una vez estandarizado el protocolo de colitis experimental y que se hubo determinado la concentración ideal de DSS para la inducción de la enfermedad se procedió al tratamiento con los ratones RATONES CTTN-KO.

Tabla 5. Parámetros evaluados en el índice de actividad de la enfermedad (IAE)

Puntuación	Pérdida de peso, %	Consistencia de las heces	Sangrado
0	No	Normal	No
1	1-5		
2	5-10	Heces pastosas	Sangrado oculto
3	10-20		
4	>20	Diarrhea	Sangrado severo

Ensayo de permeabilidad intestinal in vivo

Los ratones CTTN-KO y silvestres con DSS y controles fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una dosis de xilazina/ketamina (20/100 mg/kg). Los

animales anestesiados, fueron sometidos a una cirugía para exponer el colon. Luego, se hizo una pequeña incisión cerca de la región proximal para introducir una cánula metálica. Las heces del colon fueron lavadas con PBS y el colon fue perfundido con 1 ml del colorante azul de Evans 0.2% e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, el animal fue sacrificado por dislocación cervical, el colon extraído y el excedente de colorante lavado con PBS y adicionalmente con 5 ml de acetil cisteína 6 mM. Posteriormente, el colon fue cortado de manera longitudinal para exponer la mucosa. Luego de pesar el órgano, éste fue puesto en un tubo de microcentrífuga conteniendo 1 mL de dimetilformamida para extraer el colorante, en agitación a 600 rpm durante toda la noche a temperatura ambiente. El colorante absorbido fue determinado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm y el resultado obtenido fue graficado como la absorbancia por cada gramo de tejido.

Medición del acortamiento del colon inducido por el tratamiento con DSS

Después de 5 días los ratones *RATONES CTTN-KO* y silvestres con y sin tratamiento de DSS fueron sacrificados y el colon de cada animal fue extraído. Los órganos fueron extendidos de manera longitudinal sobre la superficie de una placa Petri de plástico y luego colocados sobre una hoja milimétrica para registrar su longitud desde la porción que conecta el colon con el ciego hasta el recto.

Análisis histológico del daño inducido por el tratamiento con DSS

Para este análisis, se utilizó el protocolo de tinción con eosina y hematoxilina (H&E). Previamente, los colones extraídos de los ratones *RATONES CTTN-KO* y silvestres fueron cortados de manera transversal cerca de la región proximal o fueron enrollados desde la región proximal hasta la distal quedando el lumen del epitelio hacia el interior del tejido enrollado [126]. Los tejidos fueron incubados en formalina durante 48 h a temperatura ambiente, embebidos en parafina y

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

procesados para su tinción con H&E. Una vez que las muestras fueron teñidas, se tomaron imágenes mediante escaneo de alta resolución (Aperio CS2; Leica, EUA) para su posterior análisis. La evaluación de los tejidos fue realizada mediante un análisis en ciego por un patólogo, y los resultados reportados como una descripción del daño observado en cada uno de los tejidos.

Análisis de la arquitectura de las criptas del epitelio intestinal

Se hicieron criocortes (criotomo CM3050 S; Leica, EUA) transversales del colon de los ratones RATONES CTTN-KO y silvestres con tratamiento de DSS y controles. Posteriormente, se realizaron tinciones por inmunofluorescencia de ZO-1 y E-cadherina, del marcador de proliferación KI67, caspasa-3, así como de los núcleos celulares con DAPI. Las muestras teñidas fueron visualizadas en un microscopio confocal láser y se seleccionaron aquellas regiones correspondientes a las criptas del epitelio intestinal. Posteriormente, se midieron las distancias de separación entre los núcleos celulares adyacentes de las células que conformaban las criptas usando el software Image J (NIH), tomando como referencia la barra de escala de la imagen.

Generación del vector lentiviral para la disminución de la expresión de cortactina in vitro

Para la generación de partículas lentivirales se utilizó el sistema pLKO.1-TRC Cloning Vector y el kit de empaquetamiento Trans-Lentiviral Packaging System de Thermo Fisher. De manera general, la línea celular HEK293T fue cultivada en medio advanced DMEM a 37 °C en placas de cultivo de 10 cm de diámetro hasta alcanzar 80% de confluencia. Cuando las células estuvieron listas, el medio de cultivo fue removido y las células fueron transfectadas con el plásmido lentiviral conteniendo el shRNA de CTTN o scrambled y con los plásmidos de empaquetamiento resuspendidos en medio sin suero con PEI (8 mg/ml). Después

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

de 4 h, el medio de cultivo de la transfección fue reemplazado por medio fresco conteniendo 5% de SFB. A las 48 h post transfección, el sobrenadante y las células aún adheridas a la placa de cultivo fueron y sometidas a dos rondas de congelamiento (-80 °C) y descongelamiento (37 °C). Los sobrenadantes colectados fueron centrifugados a 900 rpm durante 2 minutos, se hicieron alícuotas en crioviales y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Cuantificación de las partículas del vector lentiviral

La línea celular HEK293T fue cultivada en una placa de cultivo de 6 pozos en medio DMEM advanced suplementado a 37 °C hasta 70% de confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo celular fue reemplazado por 1 ml de medio fresco y luego se adicionó a cada uno de los 6 pozos 1 ml de una dilución seriada del vector lentiviral entre 1×10^{-4} – 1×10^{-8} , más el pozo control (sin el vector) de tal manera que el volumen final por pozo fuera de 2 ml. Después de 24 h, el medio de cultivo de la transducción fue removido y reemplazado por medio fresco, y a las 48 h reemplazado por medio conteniendo el antibiótico puromicina (2 µg/ml). El medio de cultivo celular con puromicina fue reemplazado cada tercer día hasta el día 14, cuando todas las colonias sobrevivientes fueron cuantificadas mediante la tinción con cristal violeta al 0.5%. El número de colonias teñidas fueron multiplicadas por el logaritmo del factor de dilución para obtener el número de unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

Producción de la línea celular epitelial estable Knock-Down de cortactina (CTTN-KD)

La línea celular Caco-2, fue cultivada en medio DMEM advanced en placa de cultivo de 10 cm de diámetro a 37°C, hasta alcanzar 80% de confluencia. Posteriormente, las células fueron infectadas con 6×10^7 UFP del vector lentiviral expresando el shRNA de ctn o el scrambled. Después de 24 h post infección el

medio fue reemplazado por medio de cultivo fresco y a las 48 h por medio de cultivo conteniendo el antibiótico de selección puromicina (10 µg/ml). Después de que las células fueron seleccionadas por efecto de la puromicina (1-3 semanas después), las células CTTN-KD y las scrambled fueron expandidas, y almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) en las líneas celulares CTTN-KD y scrambled

La resistencia eléctrica transepitelial (RET) mide la integridad de las uniones estrechas en cultivos celulares. En este caso el valor de RET indicará que tan íntegra es la barrera celular en función del transporte de ciertos químicos o iones (**figura 8**) [127].

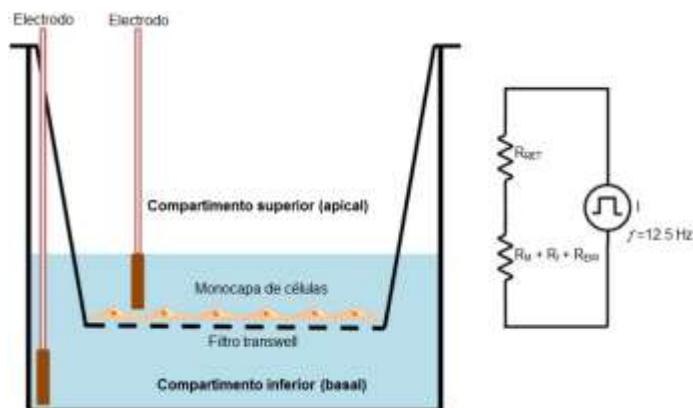


Figura 8. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial en cultivo. La medición de la resistencia eléctrica (RET) se llevó a cabo mediante un ohmímetro de 12.5 Hz. La RET fue monitoreada diariamente. La resistencia eléctrica total la resistencia óhmica de la monocapa de células R_{RET} , la del medio de cultivo celular (R_M), la de la membrana semipermeable o filtro transwell (R_i), y la interface electrodo-medio (R_{EM}).

De esta manera se evaluó la integridad de la barrera tanto en las células CTTN-KD y scrambled. Estas células fueron crecidas en filtros transwells con un tamaño de poro de 0.4 µm a una densidad de 60,000 células por pozo. Después de 24 h, el desarrollo de la RET se empezó a monitorear diariamente mediante un

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

ohmímetro, cambiando el medio de cultivo celular cada tercer día. Bajo el tratamiento del inhibidor de ROCK1 (Y-27632), ambas líneas celulares fueron crecidas en filtros transwells adicionando el inhibidor (10 μ M) desde el día 0. Después de 24 h, el desarrollo de la RET se empezó a monitorear de la manera ya antes descrita. No obstante, para este caso, el medio de cultivo fue remplazado cada 24 h, manteniendo de manera constante la disponibilidad del inhibidor. Los valores de resistencia eléctrica obtenidos para ambos experimentos fueron graficados como el valor de la resistencia eléctrica en ohms (Ω) por cm^2 .

Evaluación del flujo paracelular de solutos en las líneas celulares CTTN-KD y scrambled

Al finalizar la última medición de la RET, las mismas células fueron utilizadas para evaluar el flujo paracelular de la molécula dextrano de 4 kDA marcada con FITC. De manera general, tanto la línea celular CTTN-KD como la scrambled fueron lavadas con solución de Hank (HBSS). Posteriormente, se adicionó a las células 90 μ l de medio cultivo más 10 μ L del dextrano con FITC (10 μ g/ μ L) e incubadas a 37 °C. Después de 24 y 48 h, 100 μ L del medio de cultivo en la cámara inferior del filtro fue colectado y el dextrano difundido fue cuantificado por medio de la fluorescencia emitida por el FITC (longitud de excitación = 492 nm y longitud de emisión λ = 520 nm). Los valores obtenidos fueron graficados como unidades relativas de fluorescencia (U.R.F).

Ensayo de transmigración de células polimorfonucleares de sangre periférica (CPSP) en las líneas celulares CTTN-KD, scrambled y no infectada

Las líneas celulares CTTN-KD, scrambled y la línea celular no infectada fueron crecidas en los filtros transwells con un tamaño de poro de 5 μ m, de manera inversa para reproducir el sentido fisiológico de la transmigración de las células

polimorfonucleares en el epitelio [128]. Cuando las células alcanzaron el valor máximo de RET, fueron lavadas con solución de Hank (HBSS). Posteriormente se adicionaron 100 μ L de este buffer en la parte superior del filtro y 500 μ L más en la parte inferior de la cámara. Adicionalmente, células polimorfonucleares de sangre periférica humana (CPSP) fueron extraídas mediante centrifugación por gradiente de Histopaque®, contadas y resuspendidas en HBSS, adicionando a cada filtro 800,000 CPSP resuspendidas en 20 μ L de HBSS, las cuales migraron hacia un gradiente de fMLP (10 μ M) en la parte inferior de la cámara. Las células que migraron a través de la monocapa de células fueron contabilizadas a los 0, 30, 60 y 90 minutos usando un ensayo de mieloperoxidasa [128]. La reacción colorimétrica resultante fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Los valores de absorbancia fueron extrapolados a una curva de calibración estándar, construida a partir de los valores de absorbancia para un número conocido de CPSP. Los resultados obtenidos fueron graficados como el número de células sobre el tiempo.

Evaluación in vitro del efecto de la ausencia de cortactina sobre la formación de las uniones intercelulares mediante un ensayo de calcium-switch

Se cultivaron las líneas celulares CTTN-KD y scrambled sobre la superficie de cubreobjetos redondos de vidrio pretratados con gelatina. Cuando las células alcanzaron 80% de confluencia, fueron lavadas tres veces con solución de Hank sin calcio ni magnesio (HBSS-). Luego, se adicionó a cada pozo 500 μ L de HBSS-/EGTA 2mM y las células fueron puestas en incubación a 37 °C durante 20 minutos. Después, las células fueron lavadas tres veces con medio de cultivo, tratando de eliminar cualquier remanente del quelante y evitando que las células se despegaran. Más tarde, se adicionó a cada pozo 1 ml de medio de cultivo, y las células fueron incubadas para su recuperación a 37 °C. El monitoreo del tiempo de recuperación de las uniones intercelulares se hizo a los 0, 0.5, 1, 3 y 12 h, mediante la detección por inmunofluorescencia de ZO1.

Análisis por inmunofluorescencia de las uniones intercelulares en tejido de colon de ratón y en las células CTTN-KD y scrambled

Criocortes de colon de los ratones RATONES CTTN-KO y silvestres con DSS y controles, y también de las células CTTN-KD y scrambled fueron fijadas con etanol a -20 °C por 20 minutos. Luego, los tejidos y las células fueron bloqueadas con PBS-Tween 0.01%+BSA 2% durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente incubadas a 4°C con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: raton anti-cortactina (1:100); además de los anticuerpos de conejo anti-ZO1 (1:100), anti-occludina (1:100), anti-claudina-1, -2, -4 (1:100), anti- β -catenina (1:100), anti-E-caderina (1:100), anti-Ki67 (1:400) y anti-capasa-3 (1.100) (ver tabla 4). Luego, las muestras fueron lavadas con PBS-Tween 0.01% e incubadas a temperatura ambiente durante 1 h con los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón o conejo-AF488 (1:4000) en conjunto con faloidina-AF568 (1:200). Por último, las muestras fueron lavadas como ya antes se ha descrito, secadas a temperatura ambiente, y embebidas en Vectashield® con DAPI, para su análisis en un microscopio confocal láser.

Análisis por Western blot de las uniones intercelulares en tejido de colon de ratón y las células CTTN-KD y scrambled

Se extrajeron proteínas de los colones de los ratones RATONES CTTN-KO y silvestres con DSS y controles, y de las células con o sin tratamiento de los inhibidores de ROCK1 (Y-27632) 10 μ M, JNK (SP600125) 20 μ M, mTorC1/C2 10 μ M y Akt (AktVIII) 10 μ M, mediante el buffer de lisis de magnesio (HEPES 25 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; MgCl₂; EDTA 1mM; NP-40 1%; glicerol 2%; inhibidor de proteasas; inhibidor de fosfatasas). Las proteínas extraídas fueron cuantificadas y separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a 90 volts por 90 minutos. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 220 miliA por 120 minutos. Más tarde, las membranas fueron

bloqueadas a temperatura ambiente durante 1 h con TBS-Tween (TBST) 0.1%/leche 5%, o BSA 3% para proteínas fosforiladas. Enseguida, la membrana fue enjuagada con TBST e incubada toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios de ratón: anti-cortactina (1:4,000), anti-actina (1:500), anti- γ -tubulina (1:4,000); y de conejo: anti-PARP (1:500), anti-ZO1 (1:100), anti- β -catenina (1:500), anti-occludina (1:500), anti-E-cadherina (1:1,000), anti-Erk/p-Erk (1:500), anti-p-histona-H3 (1:100), anti-capasa-3 (1:100), anti-claudina-1, -2, -4 (1:500) y anti-MLC o p-MLC (1:500) (ver tabla 4). Después, la membrana fue lavada con TBST e incubada con los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón-HRP (1:5,000) o anti-conejo-HRP (1:5,000) a temperatura ambiente durante 1 h. Después de este tiempo, la membrana fue lavada en la forma ya antes descrita y revelada adicionando el sustrato Super West Femto o Pico de Thermo Fisher en el sistema ChemiDoc MP System.

Análisis estadístico

Todos los datos en este trabajo son presentados como valores promedios y desviaciones estándares de experimentos llevados a cabo por triplicado ($n = 3$), excepto en experimentos llevados a cabo *in vivo*, donde el valor de n varía ($n \geq 3$). Para el análisis estadístico de los datos, se recurrió a una prueba t de Student para obtener una comparación estadística entre las muestras.

RESULTADOS

La función de cortactina en la regulación de la permeabilidad intestinal *in vivo*

La severidad de la colitis aguda experimental fue dependiente de la concentración de DSS

Para la evaluación el efecto de la deficiencia de CTTN sobre la permeabilidad *in vivo*, se indujo la colitis aguda experimental con DSS. Este protocolo ha sido ampliamente utilizado en diferentes modelos murinos [124, 129], debido a que es económico y reproducible, y porque los signos clínicos inducidos son similares a los observados en personas con la enfermedad. Sin embargo, su uso necesita ser estandarizado, ya que la intensidad y severidad de los signos clínicos varían en función del tipo y concentración de DSS, del modelo murino y de la cepa utilizada [130].

De esta forma, los ratones silvestres de la cepa C57BL/6 (**ver materiales y métodos**) fueron tratados con DSS, con un peso molecular de 40 - 50 kDa, a las concentraciones de 3.0, 3.5, 4.0 y 5.0% en agua de bebida en condiciones *ad libitum* por 7 días. Sin embargo, la concentración de 5.0% resultó letal para los animales y fue descartada; así, las concentraciones de 3.0, 3.5 y 4.0% fueron evaluadas, mediante el índice de actividad (IAE) de la enfermedad en los animales tratados (**ver Tabla 5**). El tratamiento con DSS indujo en los animales los signos clínicos de la colitis aguda; sin embargo, se observó que la severidad de los signos clínicos estuvo correlacionada con la concentración de DSS utilizada (**figura 9**). A pesar de que al final del experimento, el IAE es similar para todas las concentraciones utilizadas, los signos clínicos de la colitis aguda aparecen desde el primer día bajo las concentraciones de 3.5 y 4.0% de DSS. La última de estas concentraciones fue la más severa, mientras que con la concentración de 3.0%, el progreso de la enfermedad resultó ser más lento y menos severa, en relación con el resto de las concentraciones utilizadas.

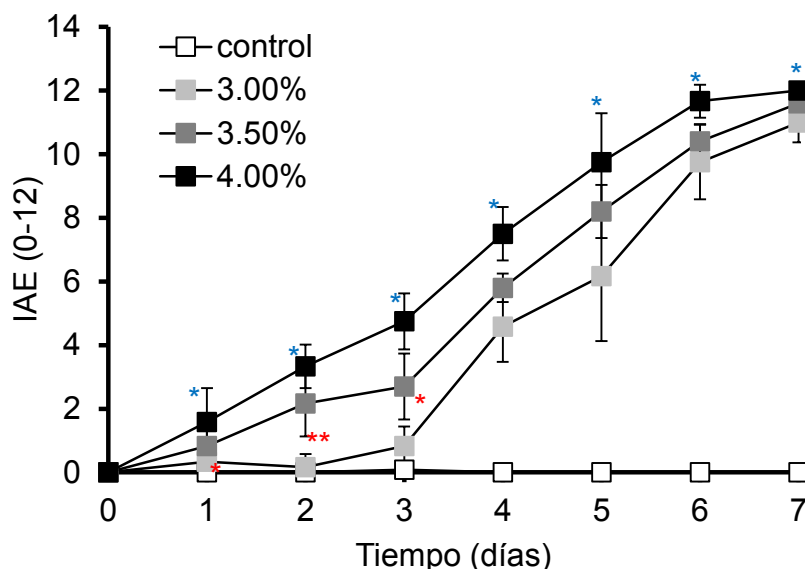


Figura 9. El tratamiento con DSS en los ratones silvestres indujo los signos clínicos de la colitis experimental. Los ratones silvestres fueron tratados con diferentes concentraciones de DSS o solamente con agua potable durante 7 días, en condiciones *ad libitum*. La severidad de los signos clínicos fue evaluada por medio del IAE, demostrando que la severidad del daño inducido en los ratones, depende de la concentración de DSS. n = 6 por cada grupo. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. (* 3.5 vs 4.0, * 3.0 vs 3.5).

El tratamiento con DSS produjo un incremento de la permeabilidad intestinal in vivo, en función de la concentración utilizada

El tratamiento con DSS indujo erosión y daño en la mucosa del colon y un incremento de la permeabilidad intestinal e inflamación [131, 132]. Partiendo de este hecho, procedimos a evaluar la magnitud del incremento de la permeabilidad intestinal mediante un ensayo de permeabilidad con el colorante azul de Evans (**ver métodos**), que consiste en cuantificar el colorante absorbido por la mucosa del intestino. De esta manera, mientras más permeable es la mucosa intestinal más colorante es absorbido. Teniendo en cuenta esto, evaluamos la permeabilidad inducida por las concentraciones de 3.5% y 4.0% de DSS, dejando de lado la concentración de 3% de DSS, debido a la falta de animales al llevar a cabo este experimento. Se observó, que el incremento de la permeabilidad a una

concentración de 4.0% de DSS ($\text{abs}_{600\text{nm}} = 9.915 \pm 4.130$), es mucho mayor en comparación que con 3.5% ($\text{abs}_{600\text{nm}} = 1.563 \pm 0.269$) (**figura 10**). Tomando en cuenta lo ya observado, se optó por conducir los siguientes experimentos utilizando la concentración de 3.5% de DSS en ratones silvestres (C57BL/6) y en ratones deficientes de CTTN (RATONES CTTN-KO).

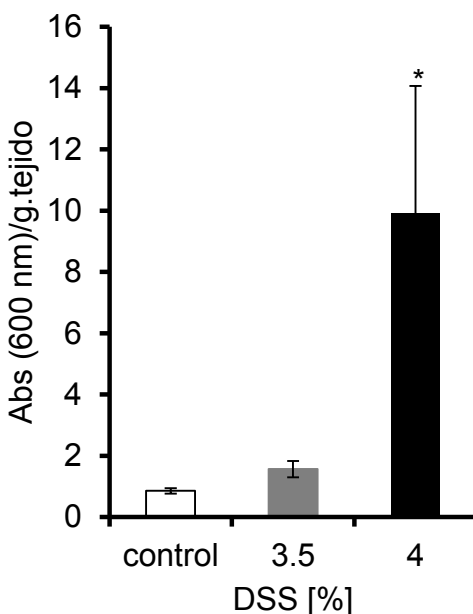


Figura 10. El tratamiento con DSS en los ratones silvestres produjo un incremento de la permeabilidad intestinal. El colon de los ratones anestesiados fue perfundido con el colorante azul de Evans. Posteriormente, el colorante absorbido en la mucosa intestinal fue cuantificado por espectrofotometría a 600 nm. Se puede apreciar que el incremento de dicha permeabilidad está determinado por la concentración de DSS. $n = 3$ por cada grupo. $*P \leq 0.05$.

La deficiencia de cortactina produjo un incremento de la permeabilidad intestinal basal in vivo

El mantenimiento de la barrera y la permeabilidad del epitelio son requisitos para el mantenimiento de la homeostasis del intestino [133], donde el citoesqueleto de actina, tiene un papel preponderante. Sin embargo, la dinámica de este último no puede ser entendida sin la intervención de moléculas que participan en su remodelación, entre ellas CTTN [76, 84, 96]. Por ello, evaluamos el efecto de la

ausencia de CTTN sobre la permeabilidad del epitelio intestinal en ratones RATONES CTTN-KO y silvestres mediante un ensayo con azul de Evans (ver materiales y métodos). En estos animales, mediante Western blot (**figura 11A**), pudimos observar la deficiencia de CTTN en diferentes tejidos en los ratones KO. Esta deficiencia, condujo a un aumento de la permeabilidad intestinal, aún en condiciones basales, en comparación con los ratones silvestres (**figura 11B**).

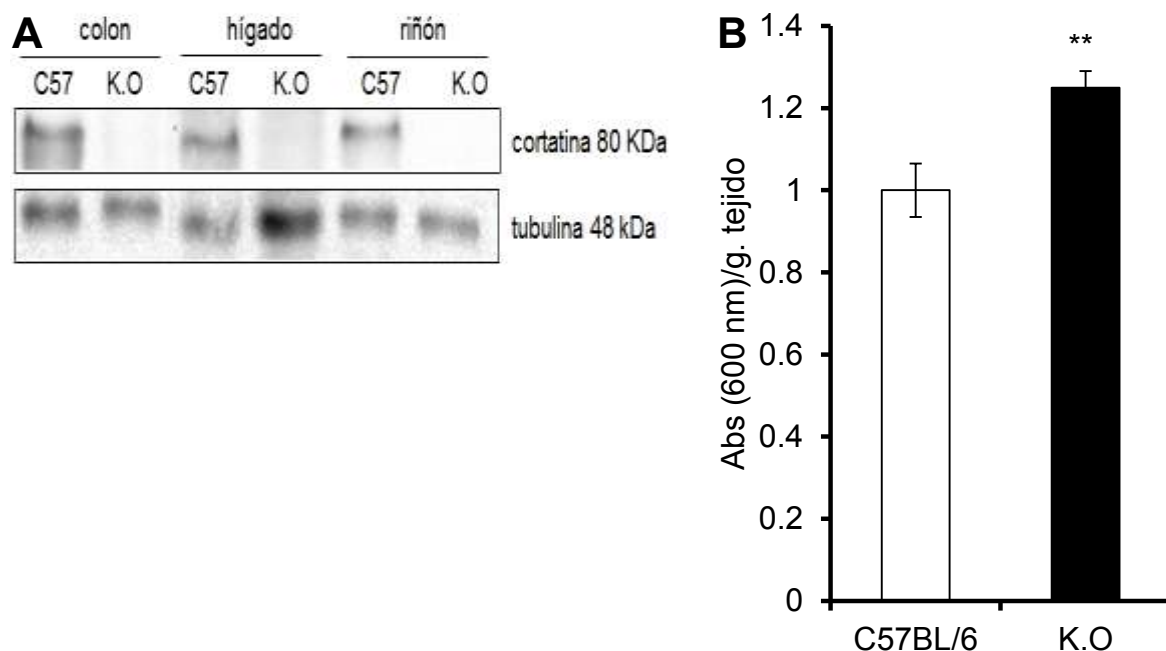


Figura 11. La deficiencia de cortactina condujo a un incremento de la permeabilidad intestinal basal in vivo. A. Evaluación de la expresión de CTTN por Western blot en diferentes órganos de los ratones CTTN-KO. **B.** En comparación con los animales controles (C57BL/6), la ausencia de CTTN produjo un incremento de 24.8% del colorante azul Evans absorbido en la mucosa intestinal de los ratones CTTN-KO. C57BL/6, n = 5; KO, n = 8. **P ≤ 0.01.

Estos resultados, indican que la ausencia de CTTN en el epitelio afecta la barrera intestinal, propiciando un aumento de la permeabilidad. Teniendo en cuenta este resultado, la siguiente cuestión fue investigar el rol de CTTN en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal en condiciones inflamatorias, tal y como sucede en la enfermedad inflamatoria intestinal. Para conseguir este objetivo, se utilizó el protocolo de colitis aguda experimental con DSS, bajo las condiciones ya estandarizadas y se procedió a evaluar el IAE en los ratones KO y silvestres.

La deficiencia de cortactina condujo a una mayor severidad de la colitis aguda experimental in vivo

Para llevar a cabo este objetivo, los ratones CTTN-KO y silvestres fueron tratados con 3.5% de DSS bajo las condiciones ya descritas. Sin embargo, aún antes de empezar el tratamiento, algunos ratones deficientes de CTTN presentaron sangre oculta en las heces analizadas, lo cual se agravó durante el tratamiento con DSS (**figura 12**).

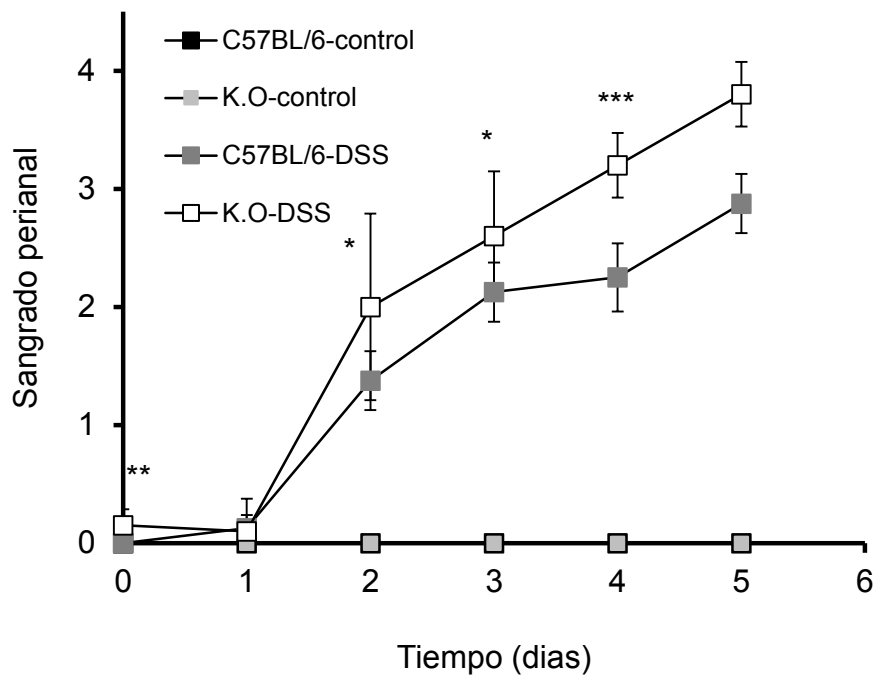


Figura 12. Los ratones CTTN-KO presentaron sangre oculta aún antes del inicio del tratamiento con DSS. La presencia de sangre en heces es un indicio de daño en la mucosa intestinal y permeabilidad incrementada. Los ratones, tanto CTTN-KO como silvestres fueron tratados con una concentración de 3.5% de DSS durante 5 días consecutivos en condiciones *ad libitum*. Dicho tratamiento, agravó el sangrado en los ratones CTTN-KO en comparación con los ratones silvestres. C57BL/6-control, n = 6; KO-control, n = 3; C57BL/6-DSS, n = 6; KO-DSS, n = 5. * $P \leq 0.5$; ** $P \leq 0.1$; *** $P \leq 0.01$.

Así también, el tratamiento con DSS produjo un incremento significativo de diarrea en los ratones CTTN-KO en comparación con los ratones silvestres con tratamiento (**figura 13**).

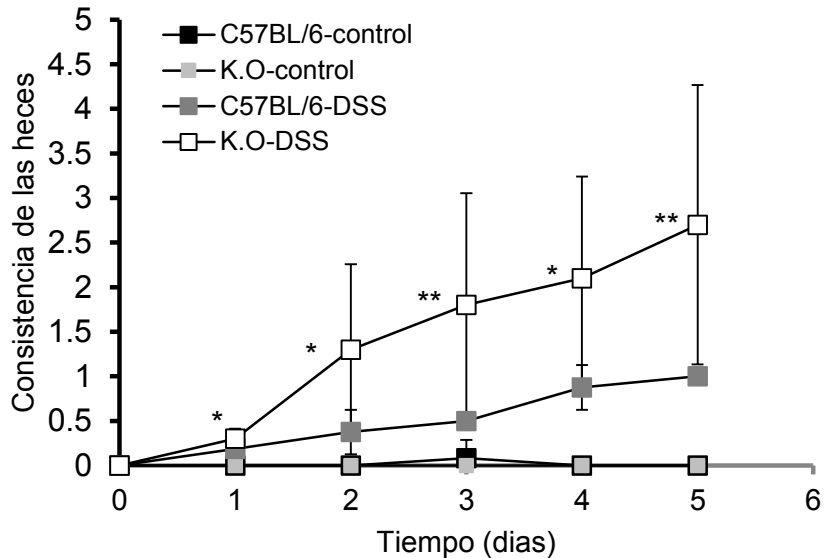


Figura 13. Evaluación de la consistencia de las heces en los ratones con tratamiento. Los ratones, tanto CTTN-KO como silvestres fueron tratados con una concentración de 3.5% de DSS durante 5 días consecutivos en condiciones *ad libitum*. El tratamiento con DSS produjo un incremento significativo de diarrea en los ratones CTTN-KO en comparación con los ratones silvestres. C57BL/6-control, n = 6; KO-control, n = 3; C57BL/6-DSS, n = 6; KO-DSS, n = 5. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Aún más, el tratamiento con DSS fue más agresivo en los ratones CTTN-KO que en los ratones silvestres, lo que resultó en la muerte de los primeros murieron al día 5 de tratamiento. En general, los ratones CTTN-KO tratados con DSS perdieron peso más rápido, en comparación con los silvestres (**figura 14**). Esta pérdida de peso fue muy evidente desde el día 1 del tratamiento en los ratones KO ($2.24\% \pm 1.73$) y se disparó al día 3 ($8.1\% \pm 1.32$), mientras que en los ratones silvestres la pérdida de peso resultó ser evidente hasta el día 5 de tratamiento ($2.27\% \pm 0.33$) y mucho mayor aún en los ratones KO ($11.7\% \pm 5.65$). Por otro lado, el IAE demostró que el tratamiento con DSS indujo una mayor severidad de la colitis en los ratones CTTN-KO, comparados con los ratones silvestres (**figura 15**). En los ratones KO, los signos de la colitis experimental eran ya evidentes desde el primer día de tratamiento, los cuales empeoraron al final del tratamiento en comparación con los ratones silvestres tratados.

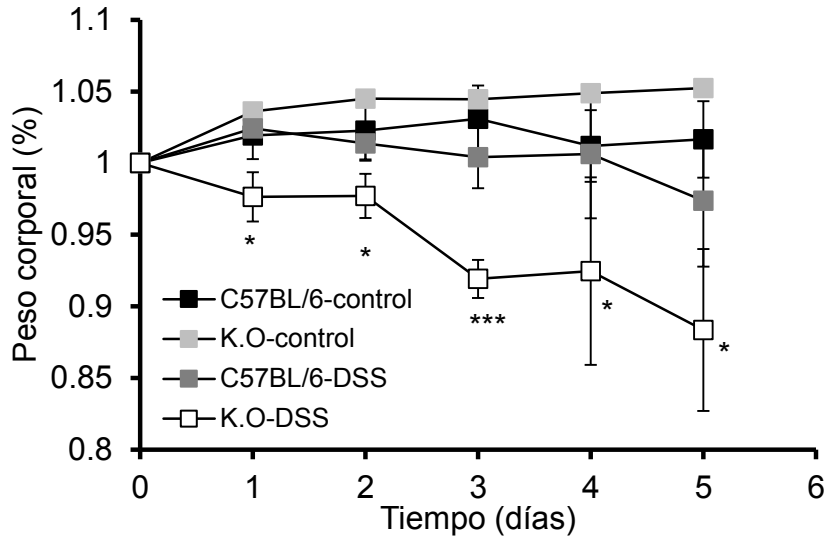


Figura 14. El tratamiento con DSS produjo una mayor pérdida del peso en los ratones CTTN-KO tratados con DSS en comparación con los ratones silvestres. El tratamiento con DSS indujo la pérdida de peso corporal desde el día 0 en los ratones KO el cual se disparó en el día 3 de tratamiento, resultando mucho mayor que los ratones silvestres (C57BL/6). C57BL/6-control, n = 6; KO-control, n = 3; C57BL/6-DSS, n = 6; KO-DSS, n = 5. * $P \leq 0.1$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

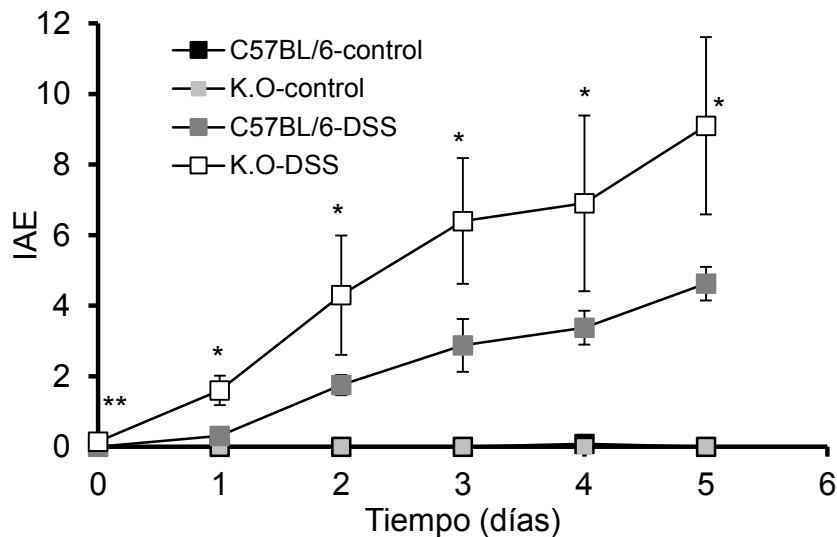


Figura 15. El tratamiento con DSS produjo una colitis experimental más severa en los ratones CTTN-KO. En comparación con los ratones silvestres, los ratones KO son más susceptibles al tratamiento con DSS. En los ratones KO los signos de la enfermedad ya son visibles desde el primer día del tratamiento. El daño provocado por el tratamiento fue tan severo en los ratones KO, que estos empezaron a morir al día 5 en comparación con los ratones silvestres. C57BL/6-control, n = 6; KO-control, n = 3; C57BL/6-DSS, n = 6; KO-DSS, n = 5. * $P \leq 0.5$; ** $P \leq 0.1$.

Otro de los parámetros evaluados en la colitis experimental y que reviste importancia como un indicador adicional de la severidad del daño, es el acortamiento del colon [130, 131]. Por ello, procedimos a inspeccionar y medir la longitud del colon en los ratones CTTN-KO y silvestres, en condiciones basales y con tratamiento de DSS. En condiciones basales, la longitud del colon de los ratones KO y silvestres fue muy similar (**figura 16**). No obstante, el tratamiento con DSS produjo un acortamiento del colon, aunque no resultó significativo entre los ratones KO y silvestres (5.26 ± 0.67 cm vs 5.54 ± 0.78 cm, respectivamente). Por otro lado, el tratamiento con DSS indujo mayor lesión en la mucosa y sangrado en los ratones CTTN-KO en comparación con los ratones silvestres (**figura 16A**). Estos resultados demuestran una vez más la importancia de CTTN en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal *in vivo*, y que su deficiencia puede comprometer y agravar la severidad de los signos clínicos de la colitis aguda experimental, bajo el tratamiento con DSS.

Se ha demostrado hasta este punto que la deficiencia de CTTN conduce a un incremento de la permeabilidad y a una mayor severidad de la colitis aguda experimental. Sin embargo, era necesario conocer hasta qué punto su deficiencia conducía a la alteración y el daño del epitelio intestinal. Para ello, se hicieron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) en el tejido del colon enrollado (*Swiss-roll*) [126] de los ratones CTTN-KO y silvestres, con y sin tratamiento de DSS. Esta técnica nos permitió visualizar al colon del animal en toda su extensión, partiendo de la región proximal (cerca del ciego) hasta la porción distal (cerca del recto) (**figuras 17**). En condiciones basales, la morfología y la estructura del epitelio del colon en los ratones CTTN-KO lucen normales y sin ningún problema aparente (**figuras 17A y C**). Sin embargo, la magnificación de la imagen del tejido de los ratones KO, evidenció la formación de edema (**figura 17G, flecha roja**), en comparación con los silvestres (**figura 17E**). La formación de edema en la mucosa del colon de los ratones KO, podría ser una explicación del incremento de la permeabilidad intestinal observado bajo estas condiciones, lo que en suma refleja la importancia de CTTN en el mantenimiento de la estructura y permeabilidad del epitelio intestinal.

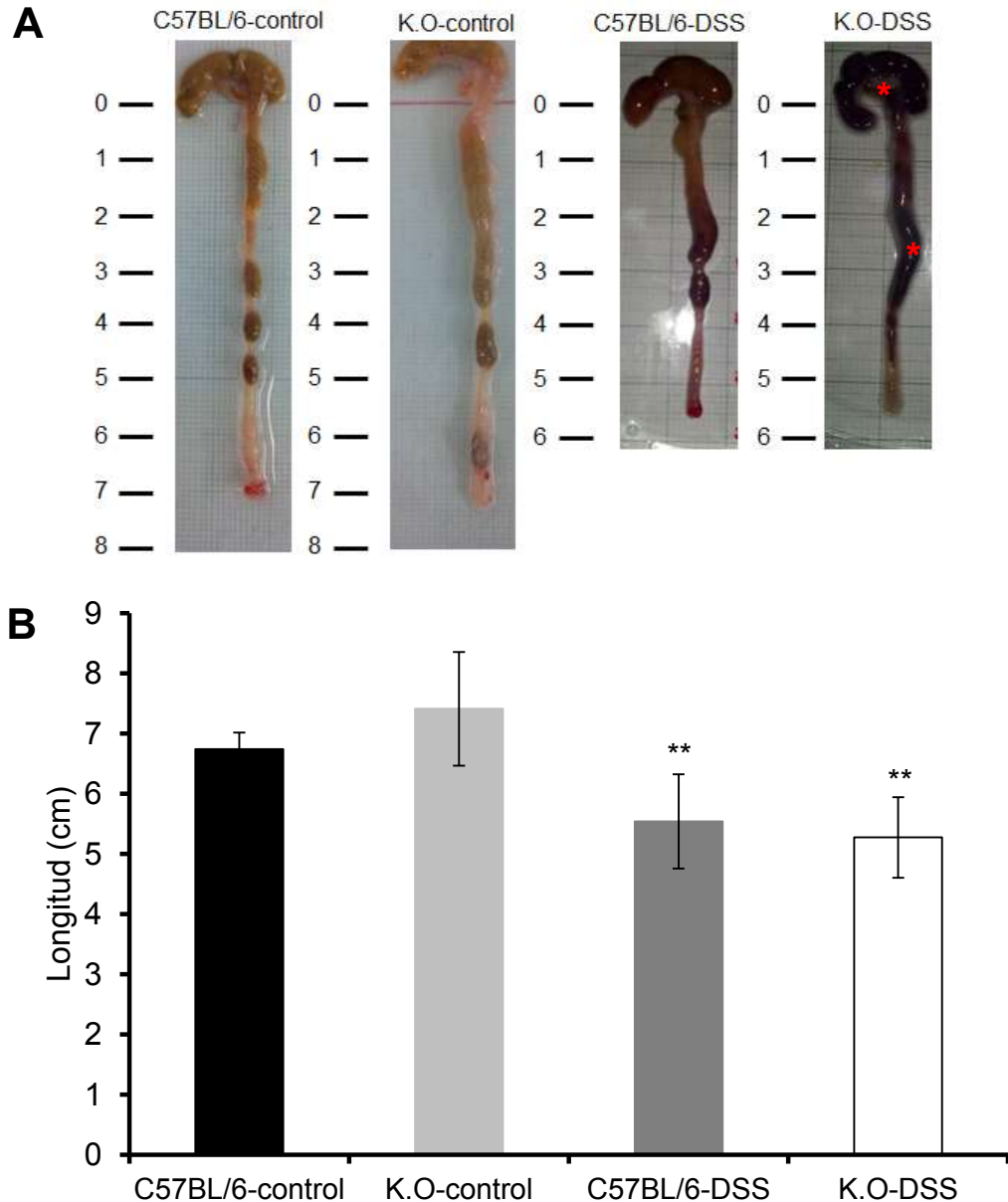


Figura 16. Medición de las longitudes de los cólores antes y después del tratamiento con DSS. Los ratones CTTN-KO y silvestres fueron tratados con DSS o solamente agua durante 5 días consecutivos en condiciones *ad libitum*. **A.** El tratamiento con DSS no solo indujo el daño en la mucosa caracterizado por la presencia de sangre, sino también, un acortamiento del colon en los ratones KO y silvestres. Sin embargo, el tratamiento con DSS, resultó ser aparentemente, más severo en los ratones CTTN-KO, en comparación con los ratone silvestres, debido a la mayor presencia de sangrado observado en los primeros (*). **B.** La medición de las longitudes de los cólores, demostró que sus acortamientos después del tratamiento con DSS, no resultó ser significativo entre los animales. C57BL/6-control, n = 10; KO-control, n = 8; C57BL/6-DSS, n = 7; KO-DSS, n = 3. ** $P \leq 0.01$.

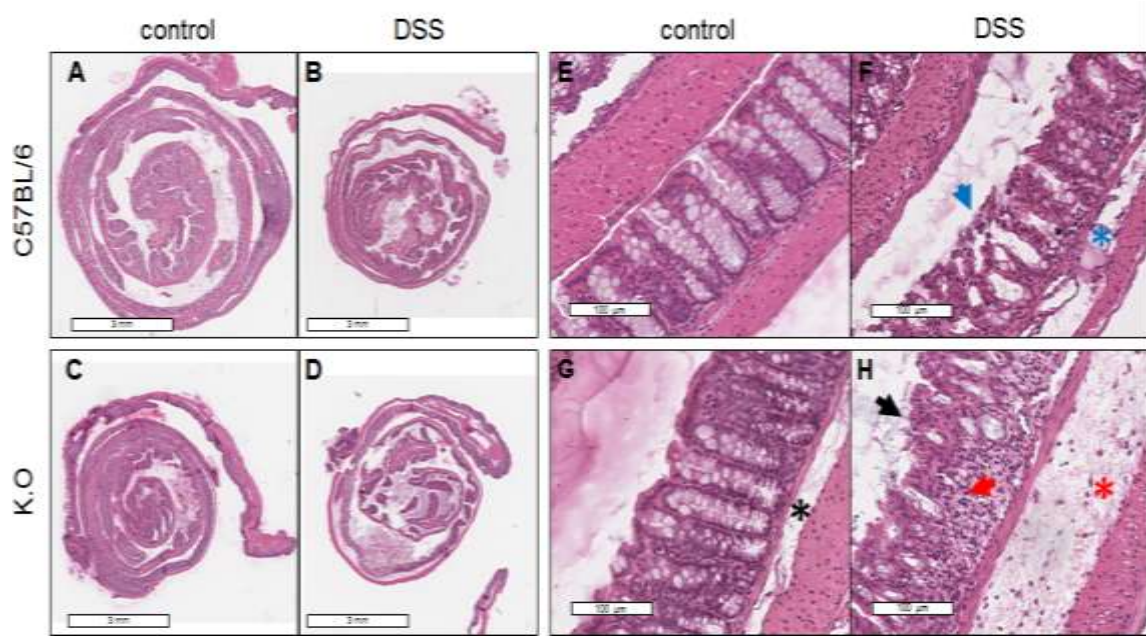


Figura 17. Análisis histológico de los cólores de los ratones CTTN-KO y silvestres, con y sin tratamiento de DSS. En condiciones basales no existió diferencia aparente entre los ratones KO y silvestres (A y C); sin embargo, la magnificación de las imágenes de los tejidos evidenció, la formación de edema en la submucosa de los ratones KO, en comparación con los ratones silvestres (G, *). El tratamiento con DSS produjo una mayor lesión en los ratones KO en comparación con los silvestres (B y D). En esto últimos, el daño estuvo caracterizado por erosión severa de la mucosa (H, →), alteración y destrucción de las criptas, infiltración masiva de la mucosa (H, →) y la formación de edema (H, *), en comparación con los ratones silvestres (G, →, *). El daño ocasionado por el tratamiento de DSS en los ratones KO, explica la severidad de la colitis experimental y la muerte de estos animales. C57BL/6 = 3; KO = 3.

El tratamiento con DSS indujo el acortamiento y erosión de la mucosa intestinal en los ratones CTTN-KO y silvestres; sin embargo, éste provocó un daño más severo en los primeros (**figuras 17B y D**). La magnificación de las imágenes de los tejidos de los ratones evidencian este hecho (**figuras 17F y H**); apreciándose un daño más agudo en la mucosa de los ratones CTTN-KO (estrella roja), en comparación con los silvestres (flechas azules). En los primeros, el daño inducido por el tratamiento con DSS estuvo caracterizado por una erosión severa de la mucosa y su alteración, destrucción y acortamiento de las criptas, infiltración de células del sistema inmune hacia la mucosa y la formación generalizada de edema, en comparación con los ratones silvestres (**figuras 17E y H**).

La deficiencia de cortactina condujo a una desestabilización de las uniones intercelulares

Es bien sabido que el mantenimiento de la barrera epitelial depende de la estabilidad de las uniones intercelulares y de la dinámica del citoesqueleto de actina [133]. Dado que CTTN es un importante factor que afecta la remodelación del citoesqueleto es factible pensar que su deficiencia podría tener un impacto negativo en la formación de las uniones intercelulares y su estabilidad. Por ello, analizamos mediante Western blot si la ausencia de CTTN afecta la expresión de las UE y las UA. Con esto, pudimos observar que su ausencia, condujo a una disminución de la expresión de ZO-1. Sin embargo, la ausencia de CTTN poco o nada afectó la expresión de actina, claudina-4, β -catenina E-cadherina o actina. De manera interesante, la ausencia de CTTN produjo un incremento en la expresión de la proteína transmembranal claudina-2 y de manera contraria una disminución en la expresión de claudina-1 (**figura 18**).

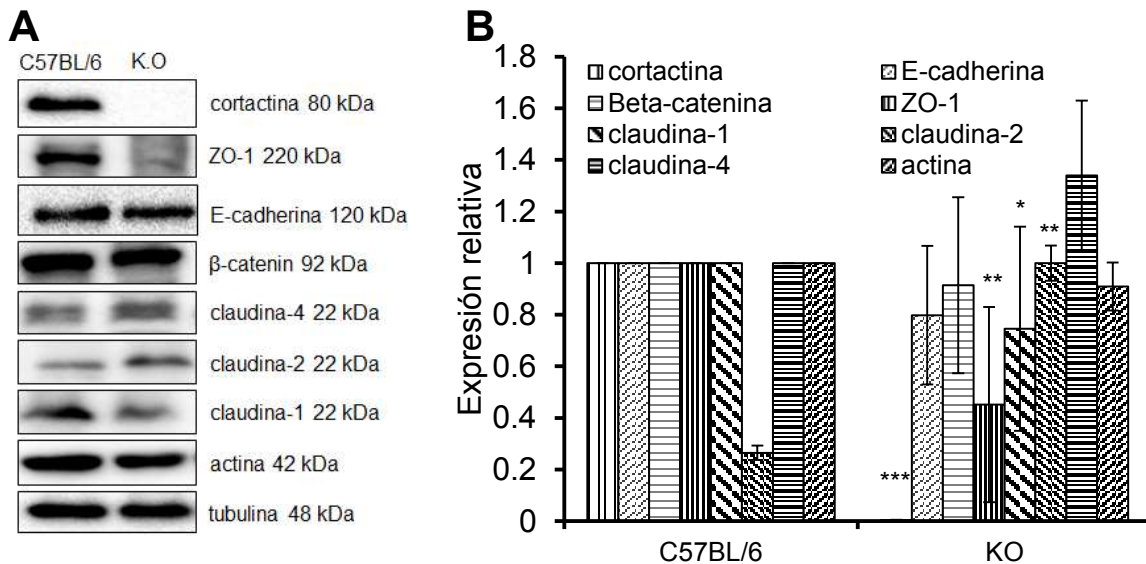


Figura 18. La deficiencia de cortactina afectó la expresión de algunas proteínas intercelulares. A. Análisis por Western blot de las proteínas de uniones intercelulares en los cólones de los ratones CTTN-KO y silvestres. **B.** Análisis densitométrico de las proteínas detectadas en A. La ausencia de CTTN produjo una disminución de la expresión de ZO-1 y claudina-1, pero no afectó la expresión de claudina-4, β -catenina, E-cadherina o actina. Por otro lado, la ausencia de CTTN produjo un aumento de la expresión de claudina-2. n = 3 por cada grupo.

Por otro lado las tinciones por inmunofluorescencia de tejidos de los ratones KO y silvestres confirmaron la importancia de CTTN en el mantenimiento de las uniones intercelulares (**figura 19**). En los primeros, la deficiencia de CTTN condujo a una disminución de ZO-1 y su relocalización de la región apical de las uniones intercelulares hacia el citosol en las células epiteliales que componen las criptas intestinales, coincidiendo con lo observado en los ensayos de Western blot. Adicionalmente, se observó que la ausencia de CTTN provocó la deslocalización de la proteína transmembranal ocludina en los ratones KO, la cual ha sido relacionada con el mantenimiento y estabilidad de las uniones estrechas y regulación de la permeabilidad [134, 135]. Así también, la tinción de E-caderina también mostró una marcada deslocalización desde la periferia hacia el citosol de las células. En suma, estos resultados señalan la importancia de CTTN en el mantenimiento de las uniones intercelulares.

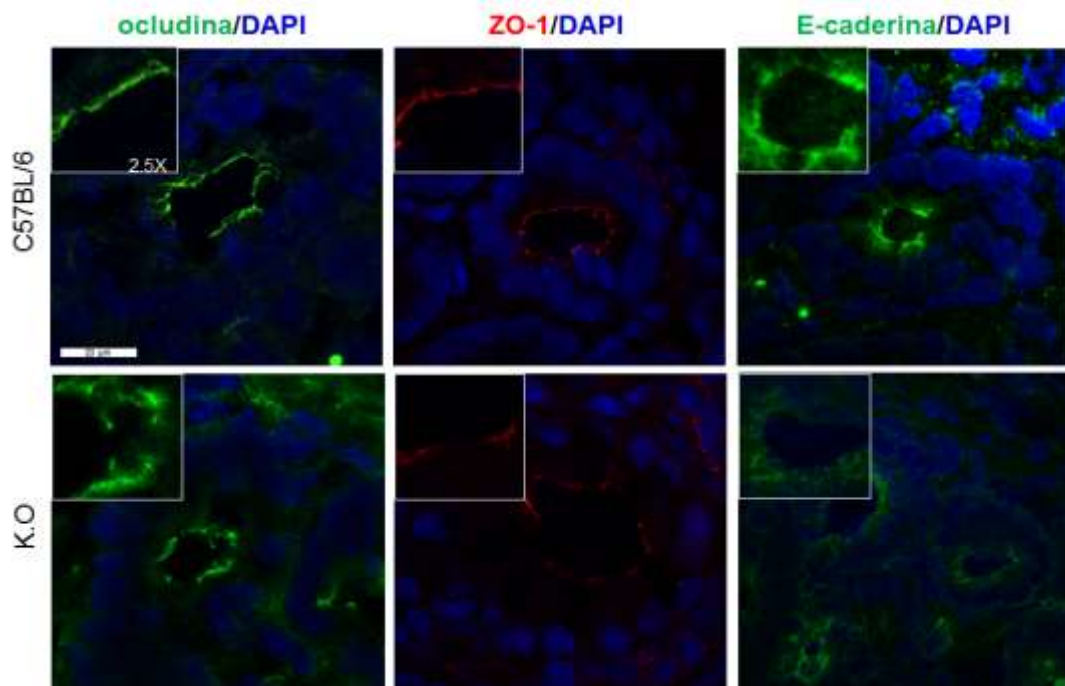


Figura 19. La deficiencia de cortactina condujo a una alteración de las uniones intercelulares. Las tinciones por inmunofluorescencia demostraron que la ausencia de CTTN produjo la deslocalización de ocludina y E-caderina en el epitelio intestinal. La ausencia de CTTN, no solo contribuyó a la disminución de la expresión de ZO-1, sino también a su deslocalización. n = 3 por cada grupo.

Un común denominador observado en las muestras de tejido de los ratones CTTN-KO analizadas por inmunofluorescencia, fue la alteración evidente de la arquitectura de las criptas del epitelio (**figura 20A**). A pesar de que el número de células que componen la estructura de la cripta permaneció constante, la distancia entre los núcleos de los mismos se incrementó de manera significativa (**figura 20B**). Esta alteración en la morfología de la cripta tendría importantes repercusiones en el mantenimiento de la barrera epitelial, debido a la probable desestabilización de las uniones intercelulares. Aunque, lo ahora descrito no ha sido reportado en la literatura, esto demuestra, las repercusiones que tiene la ausencia de CTTN en el epitelio intestinal.

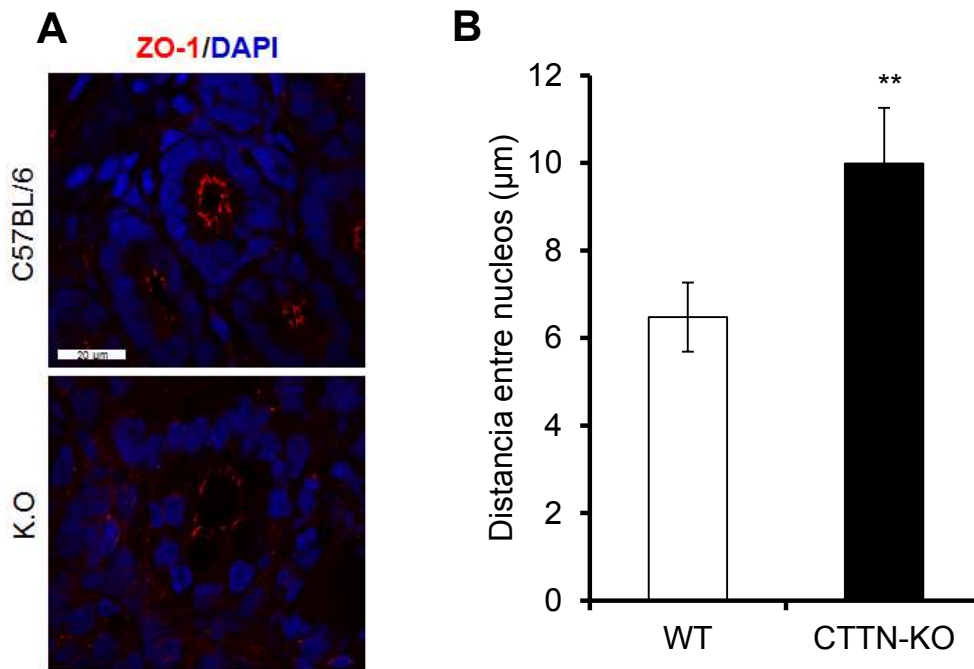


Figura 20. La deficiencia de cortactina produjo una alteración de la morfología de las criptas del epitelio. A. Análisis por inmunofluorescencia del marcador de las UE ZO-1 y de los núcleos teñidos con DAPI de las células que componen las criptas del epitelio intestinal en los ratones CTTN-KO y silvestres. La ausencia de CTTN produjo una alteración marcada en la arquitectura de las criptas intestinales. **B.** Cuantificación de las distancias entre los núcleos celulares de las criptas del epitelio intestinal en los ratones CTTN-KO y silvestres utilizando el software ImageJ (NIH). La ausencia de CTTN, se tradujo en un aumento de la distancia de los núcleos de las células que componen las criptas del epitelio intestinal de los ratones KO, en comparación con los ratones silvestres. C57BL/6, n = 3; KO, n = 3. ****** $P \leq 0.01$.

La deficiencia de cortactina condujo a un aumento de la proliferación de las células del epitelio intestinal

La disfunción del balance entre la apoptosis y la proliferación del epitelio intestinal produce la alteración del epitelio intestinal, la pérdida de la barrera y un proceso inflamatorio como lo observado en la EII [136, 137]. Dado que la ausencia de CTTN alteró la estabilidad y la arquitectura del epitelio intestinal, lo siguiente fue analizar su papel en la homeostasis del epitelio intestinal. Para esto, evaluamos la fosforilación de la histona-H3 como marcador de proliferación [138-140]; caspasa-3 y la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) como marcadores de apoptosis [141-143]. El análisis de la histona-H3 en los ratones KO de CTTN demostró un incremento en su fosforilación en comparación con los ratones silvestres (**figura 21**), y por ende un aumento en la proliferación celular. No obstante, los niveles de apoptosis en los ratones CTTN-KO parecen no haber cambiado en comparación con los ratones silvestres (**figura 21**).

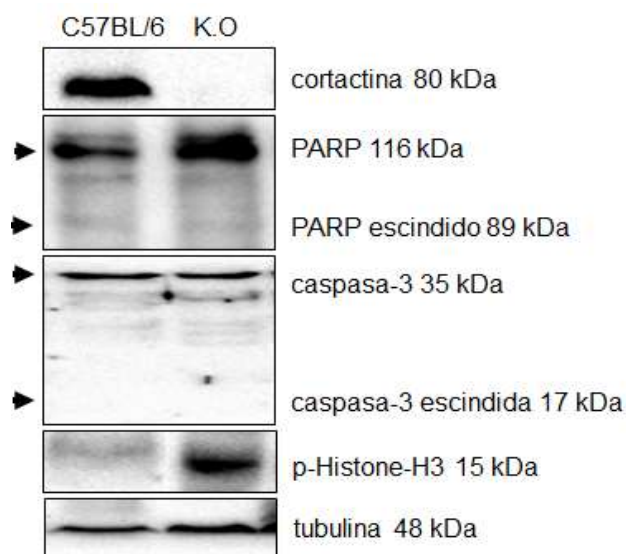


Figura 21. La deficiencia de cortactina contribuyó a una disfunción en el balance homeostático del epitelio intestinal. Análisis por Western blot de p-histona-H3, caspasa-3 y PARP en los cólonos de los ratones CTTN-KO y silvestres. El epitelio intestinal de los ratones CTTN-KO estuvo caracterizado por un aumento de la fosforilación de la histona-H3, lo que indicó un incremento de la proliferación celular; sin embargo, los niveles de apoptosis permanecieron sin cambios. n = 3 para cada grupo.

Cortactina es un importante regulador de la permeabilidad epitelial intestinal *in vitro*

In vivo, CTTN ha demostrado tener un importante rol en la regulación de la permeabilidad vascular [122]. Su ausencia en el endotelio vascular incrementa la permeabilidad de solutos, sin embargo, esta ausencia conduce a una disminución en la extravasación de células polimorfonucleares. De esta manera, decidimos estudiar *in vitro* los mecanismos moleculares por medio de los cuales CTTN conduce al aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal. Para ello, produjimos una línea celular epitelial intestinal humana que fuera deficiente en la expresión de CTTN. Una vez que la línea celular fue producida (ver materiales y métodos), se evaluaron diferentes aspectos de la permeabilidad, de las uniones intercelulares, así como la remodelación del citoesqueleto de actina para corroborar los datos obtenidos *in vivo* y al mismo tiempo comprender el mecanismo posible por el cual CTTN ejerce su acción sobre la permeabilidad.

Producción de una línea celular epitelial estable deficiente en la expresión de cortactina (CTTN-Knock-Down)

Para el estudio de la función de CTTN *in vitro*, se decidió utilizar la línea celular humana Caco-2, procedente de cáncer colorectal. Esta línea celular es ampliamente usada como modelo de estudio de procesos infeccioso y de la permeabilidad epitelial intestinal [144-150]; su metabolismo y fenotipo es muy similar a la encontrada en el epitelio intestinal normal y es capaz de formar una monocapa de células completamente polarizadas, mediante la formación de uniones intercelulares maduras y estables, además de poseer una alta expresión de CTTN [151-153]. Una vez producida la línea celular *Knock-Down* de CTTN (CTTN-KD) y su control *scrambled* procedimos a evaluar los niveles de disminución de la expresión de CTTN mediante Western blot (**figura 22**), los cuales disminuyeron hasta un 82% en las células CTTN-KD, en comparación con la línea celular *scrambled* o la no infectada.

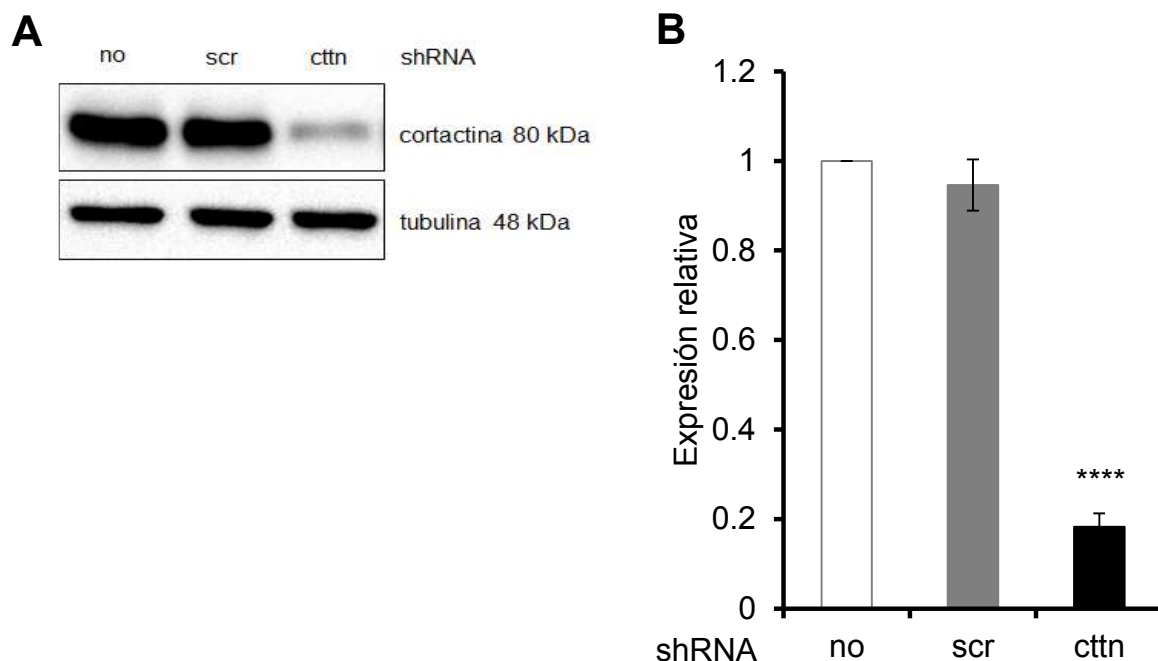


Figura 22. Cuantificación de los niveles de expresión de cortatina en la línea celular KD. A. Análisis por Western blot de los niveles de expresión en la línea celular CTTN-KD y controles. La infección con el vector lentiviral expresando el shRNA de CTTN produjo una disminución de su expresión. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión observados en el panel A. La cuantificación de los niveles relativos de la expresión de CTTN demostró que existe un 82% de disminución de su expresión en la línea celular KD. (Caco-2 no infectada, no; scrambled, scr; CTTN-KD, ctn). n = 3 para cada grupo; **** $P \leq 0.001$.

Por otro lado, pudimos observar que las células KD, una vez adheridas a la placa de cultivo formaban una monocapa de células más rápido, en comparación con las células control, indicando con ello un probable aumento en la proliferación celular. Partiendo de este hecho decidimos averiguar si existía un incremento en la proliferación celular. El análisis por Western blot de la línea celular KD, demostró un incremento en la fosforilación de la histona-H3, pero ningún cambio significativo en los niveles de apoptosis, en comparación con la línea celular scrambled o la no infectada, similar a lo ya observado *in vivo* (**figura 23A**).

El incremento de la proliferación celular en el epitelio es regulado por diferentes vías de señalización que contribuyen en la homeostasis intestinal, entre ellas la vía JNK. Por ello decidimos analizar el papel de JNK en la fosforilación de la

histona-H3 como marcador de la proliferación celular. La inhibición de JNK mediante SP600125 y el posterior análisis por Western blot demostró una disminución de la fosforilación de la histona-H3 en la línea celular KD de CTTN (**figura 23B**), demostrando con ello la participación de JNK en el proceso de fosforilación de esta molécula y muy probablemente en la proliferación.

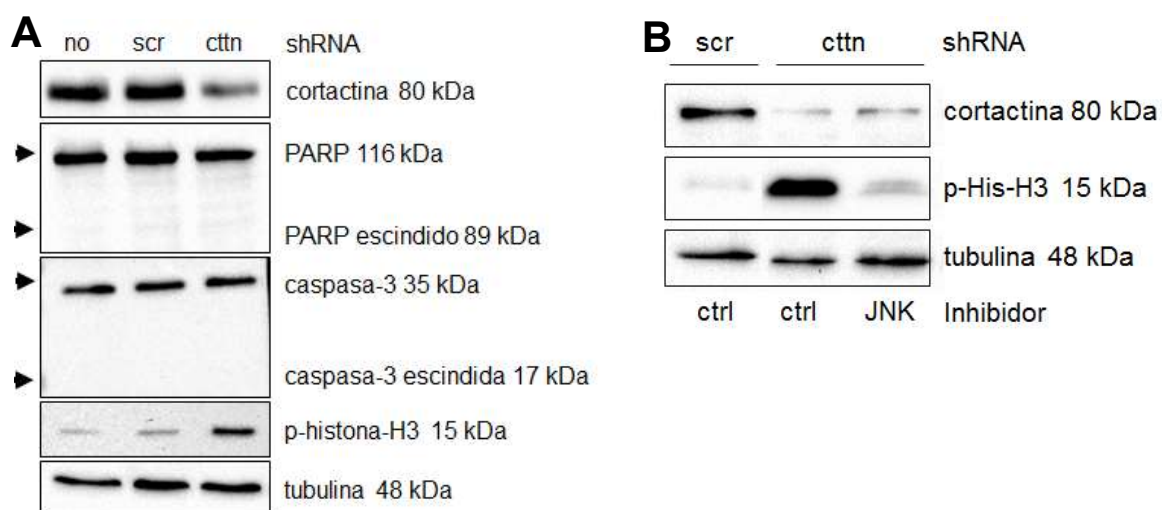


Figura 23. La disminución de la expresión de cortactina produjo un aumento en la fosforilación de la histona-H3 por medio de JNK. A. Análisis por Western blot de p-histona-H3, caspasa-3 y PARP en la línea celular CTTN-KD y controles. La fosforilación de la histona-H3 indica un aumento de la proliferación en las células KD de CTTN. Sin embargo, este aumento en la proliferación celular no se ve acompañado de un aumento en los niveles de la apoptosis. **B.** La inhibición de JNK demostró la participación de esta vía de señalización en la fosforilación de la histona-H3 y en la proliferación celular en la línea celular CTTN-KD. (Caco-2 no infectada, no; scrambled, scr; CTTN-KD, ctn). n = 3 para cada grupo.

La disminución de la expresión de cortactina produjo un aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal in vitro.

In vivo, CTTN juega un papel relevante en el mantenimiento de las uniones intercelulares y la regulación de la permeabilidad, tal y como ya hemos demostrado. Bajo este esquema, se evaluó si la disminución de la expresión de CTTN también conducía a una disminución de la barrera epitelial y en

consecuencia a un aumento de la permeabilidad, *in vitro*. Para esto, medimos la RET de la línea celular KD de CTTN y scrambled (ver métodos). La medición de la RET es un método muy conocido y útil para evaluar la permeabilidad, es una medida directa del flujo paracelular de iones y pequeñas moléculas cargadas a través de una monocapa de células y es un indicador directo de la integridad de las uniones intercelulares, particularmente de las UE [127, 154]. El monitoreo de la RET, demostró que línea celular CTTN-KD no desarrolló valores altos de la TER, en comparación con la línea celular control (**figura 24**). Luego de 48 h (día 2), los valores de la RET en la línea celular CTTN-KD y scrambled empezaron a aumentar, alcanzando el pico máximo de valor de la RET en el día 5 para ambos casos ($128.00 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 14.74$ vs $232.22 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 42.47$, de manera respectiva). Aún, cuando los valores de resistencia se mantuvieron constantes durante los tres días restantes para ambos casos, la RET de la línea celular CTTN-KD fue significativamente menor en comparación con la línea celular control.

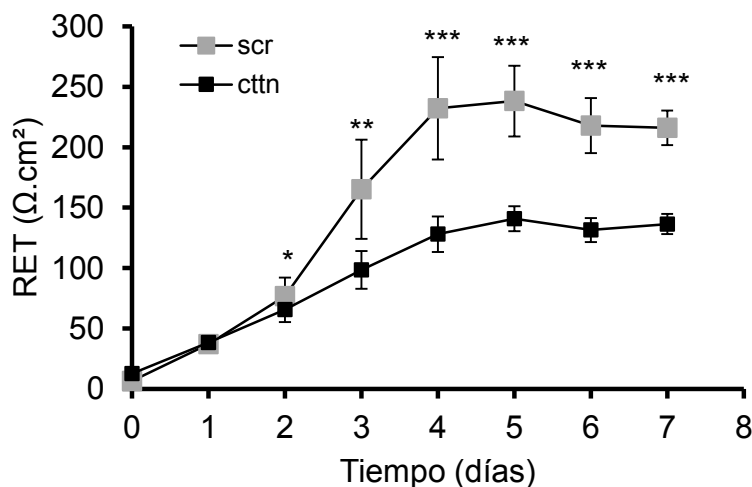


Figura 24. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial en las líneas celulares CTTN-KD de y scrambled. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas en filtros transwells y posteriormente la RET fue medida diariamente, hasta que estas alcanzaron sus valores máximos. La disminución de la expresión de CTTN, produjo un menor desarrollo en los valores de la RET en comparación con la línea celular control. Los valores máximos de resistencia para ambas líneas celulares se mantuvieron constantes; sin embargo, la RET en la línea celular KD se mantuvo baja hasta al término del experimento. (Scrambled, scr; CTTN-KD, cttn). $n = 3$ para cada grupo. $*P \leq 0.1$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$.

Con este resultado, fue posible afirmar que la disminución de la expresión de CTTN conduce a una alteración de los componentes de las uniones intercelulares, particularmente en las UE. Sin embargo, la regulación de la permeabilidad es más compleja, involucrando no solo la regulación de iones sino también la regulación de macromoléculas de pequeño peso molecular. Por lo que, decidimos también evaluar el flujo paracelular de solutos en la misma monocapa de células descritas anteriormente utilizando dextrano de 4 kDa marcada con FITC (ver métodos). Así, pudimos demostrar que la deficiencia de CTTN produjo un incremento en el flujo paracelular del dextrano con FITC las 24 y 48 h, en comparación con la línea celular control (**figura 25**). En suma, estos resultados confirman la contribución de CTTN en el mantenimiento de las uniones intercelulares y en la regulación de la permeabilidad intestinal tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

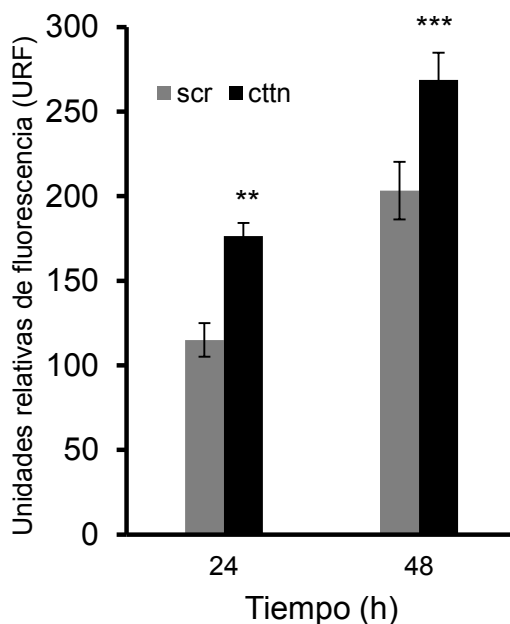


Figura 25. La disminución de la expresión de cortactina condujo a un aumento en el flujo paracelular de solutos. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas en filtros transwells y adicionadas con dextrano de 4 kDa marcado con FITC para evaluar el flujo paracelular de solutos. En comparación con las células control, la línea celular CTTN-KD es más permisiva al flujo paracelular del dextrano de 4 kDa. En ambas líneas celulares el flujo del dextrano se incrementa a las 48 h respecto de las 24h; sin embargo, este incremento es mucho mayor en las células CTTN-KD. (scrambled, scr; cortactin-KD, cttn), n = 4 para cada grupo. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

La disminución de la expresión de cortactina afectó la expresión y la estabilidad de las uniones intercelulares

Lo anterior, nos condujo a investigar si CTTN podría afectar las uniones intercelulares y la dinámica del citoesqueleto de actina. Para ello, se realizaron ensayos de Western blot para analizar la expresión de las moléculas de las uniones intercelulares. Estos ensayos demostraron que la deficiencia de CTTN produjo una disminución de la expresión de ZO-1, ocludina, claudina-1 y en menor medida E-cadherina, y un aumento en la expresión de claudina-2 en las células CTTN-KD, en comparación con las células controles (**figura 26**)

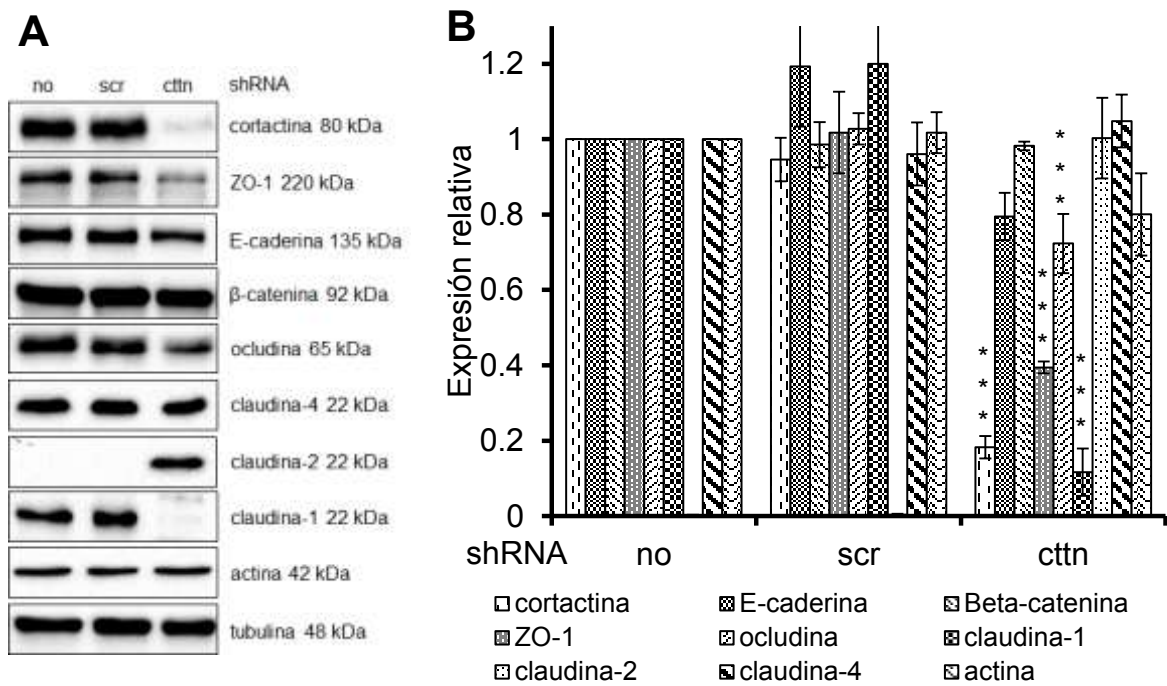


Figura 26. La disminución de la expresión de cortactina produjo una alteración en la expresión de las uniones intercelulares. **A.** Análisis de la expresión de diferentes marcadores de uniones intercelulares en las células CTTN-KD y controles. La disminución de CTTN, afectó la expresión de ZO-1, E-cadherina, ocludina, claudina-1 y en menor medida a actina. Interesantemente, se observó una sobreexpresión de claudina-2. **B.** Cuantificación de la expresión relativa de los marcadores de uniones intercelulares respecto a gamma-tubulina en las células CTTN-KD y controles. La cuantificación de la expresión de estas moléculas demostró que dichas disminuciones son significativas. (Caco-2 no infectada, no; scrambled, scr; CTTN-KD, ctnn). n = 3 para cada grupo. *** $P \leq 0.001$.

Como se pudo observar *in vivo*, la ausencia de CTTN afectó la estabilidad de las uniones intercelulares, por eso decidimos analizar la localización de estas proteínas en dichas uniones. La tinción por inmunofluorescencia, reveló que existe una marcada internalización desde la periferia de la célula hacia el citosol de ZO-1 y ocludina y en menor grado de E-cadherina, pero no de β -catenina (figura 27).

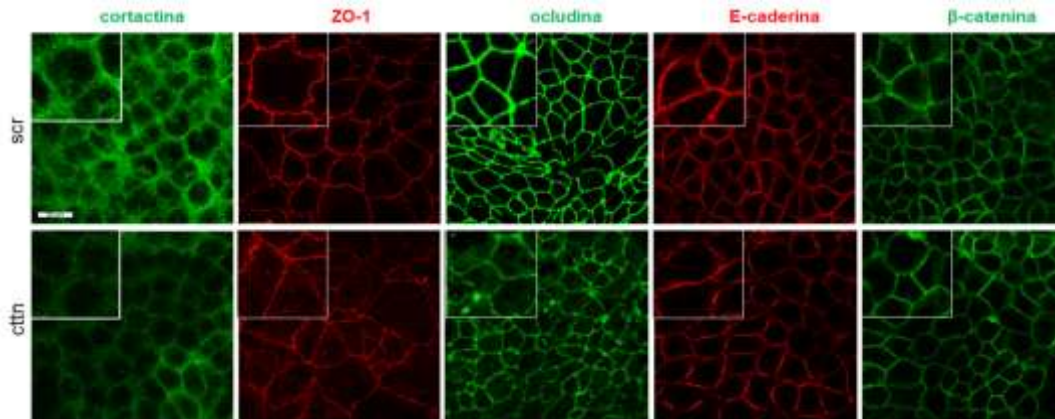


Figura 27. Tinción por inmunofluorescencia de las uniones intercelulares en las células KD de cortactina y scrambled. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio y teñidas por inmunofluorescencia para analizar la localización de algunos marcadores de uniones intercelulares. La disminución de la expresión de CTTN produjo la disminución de ZO-1 y ocludina en la región apical de las uniones intercelulares y también su relocalización desde la periferia hacia el citosol. Esta disminución, aunque en menor grado afectó la expresión de E-cadherina en la periferia de las células; sin embargo, no se observó una afectación en la expresión o localización de β -catenina. (scrambled, scr; CTTN-KD, cttn). n = 3 por cada grupo.

La disminución de la expresión de cortactina no afectó la formación de las uniones estrechas

CTTN es un elemento importante en la estabilidad de las uniones intercelulares. Para comprobar si la ausencia de CTTN repercutía en la formación de las UE, se realizó un ensayo de *calcium-switch* con EGTA para provocar la desestabilización de ZO-1 en las UE. Luego de restablecer el calcio en el medio se monitoreó la restitución de ZO-1 en las UE a diferentes tiempos (figura 28).

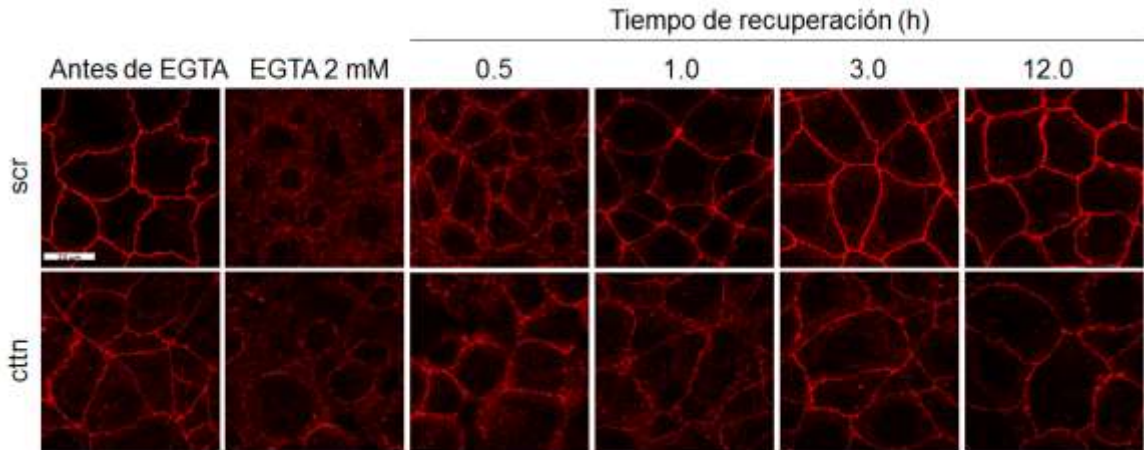


Figura 28. La disminución de cortactina no afectó la formación de las uniones estrechas. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, tratadas con EGTA y teñidas por inmunofluorescencia para monitorear el restablecimiento de ZO-1 en las uniones estrechas a diferentes tiempos. Después del restablecimiento del calcio extracelular se observó una rápida recuperación de las uniones estrechas en las células CTTN- KD y scrambled. A pesar de la disminución de ZO-1 en la periferia de las células y de su internalización en el citosol, la disminución de la expresión de CTTN no afectó el restablecimiento de ZO-1 en las uniones estrechas. (scrambled, scr; CTTN-KD, cttn). n = 3 por cada grupo.

La tinción con ZO-1 previo a la adición de EGTA, muestra su disminución en las uniones estrechas y su internalización. Sin embargo, la adición de EGTA a las células provocó la desestabilización de ZO-1 en ambas líneas celulares. No obstante, después del restablecimiento del calcio no se observó retraso o impedimento en el restablecimiento de ZO-1 en las uniones estrechas. Esto demuestra que CTTN no es totalmente indispensable en el restablecimiento de las uniones intercelulares, pero sí en su estabilidad.

La disminución de la expresión de CTTN condujo a un incremento en la trasmigración de células polimorfonucleares a tiempos tempranos

La trasmigración de células polimorfonucleares es el marcador por excelencia de cualquier proceso inflamatorio [155, 156]. En este proceso, las uniones intercelulares tienen un rol importante controlando la trasmigración de estas

células durante la inflamación. Bajo este supuesto, analizamos el papel de CTTN en el proceso de trans migración de células polimorfonucleares humanas, hacia un gradiente quimiotáctico de fMLP. Este experimento demostró que la disminución de la expresión de CTTN en las células KD incrementó la trans migración de las células polimorfonucleares a tiempos tempranos (**figura 29**).

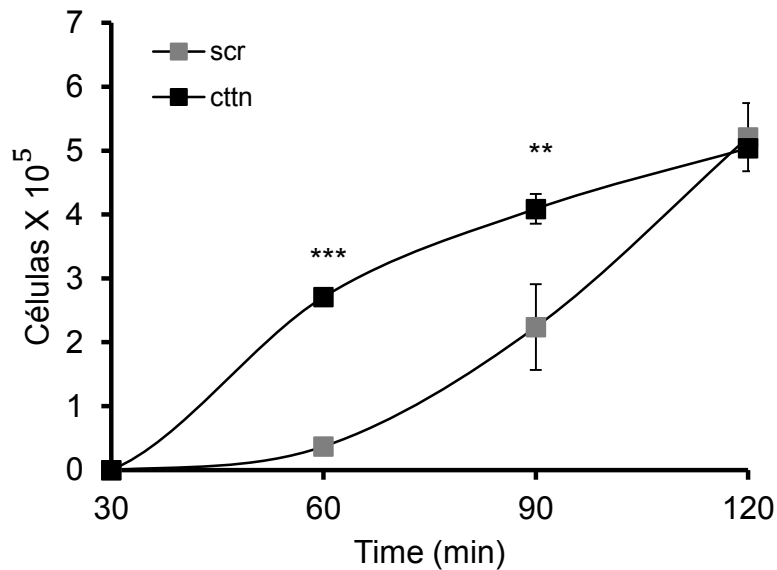


Figura 29. La deficiencia de cortactina condujo a un incremento en el número de polimorfonucleares en la trans migración. Las células CTTN-KD y scrambled fueron crecidas de manera inversa en filtros transwells para reproducir el sentido fisiológico de migración de las células polimorfonucleares hacia un gradiente quimiotáctico de fMLP. Se pudo determinar que, las células polimorfonucleares atravesaron más rápidamente la monocapa de las células CTTN-KD en comparación con las scrambled. El debilitamiento y desestabilización de las uniones intercelulares cuando CTTN se encuentra disminuido podría contribuir a este proceso. (scrambled, scr; CTTN-KD, ctn) n = 4 para cada grupo. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

La cuantificación de estas células, demostró que a los 30 y 60 min, el número de polimorfonucleares era mayor en las células CTTN-KD en comparación con las células scrambled; sin embargo, al final del experimento (120 min), el número total de tales células fue similar en ambas líneas celulares. Demostrando que, las células polimorfonucleares pueden atravesar más fácilmente el espacio paracelular, debido al debilitamiento y desestabilización de las uniones intercelulares cuando CTTN se encuentra disminuida en su expresión.

La disminución de cortactina afectó la remodelación del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina controla la dinámica de las uniones intercelulares y su estabilidad; sin embargo, su función depende de moléculas, tales como CTTN. De esta manera, se evaluó el papel de CTTN en la remodelación del citoesqueleto mediante la tinción de actina con faloidina, la cual reveló que la disminución de la expresión de CTTN en las células KD incrementó la formación de fibras de actina (**figura 30**). Estos resultados demostraron que CTTN regula la dinámica del citoesqueleto y que su disminución conlleva a un rearrreglo de su estructura.

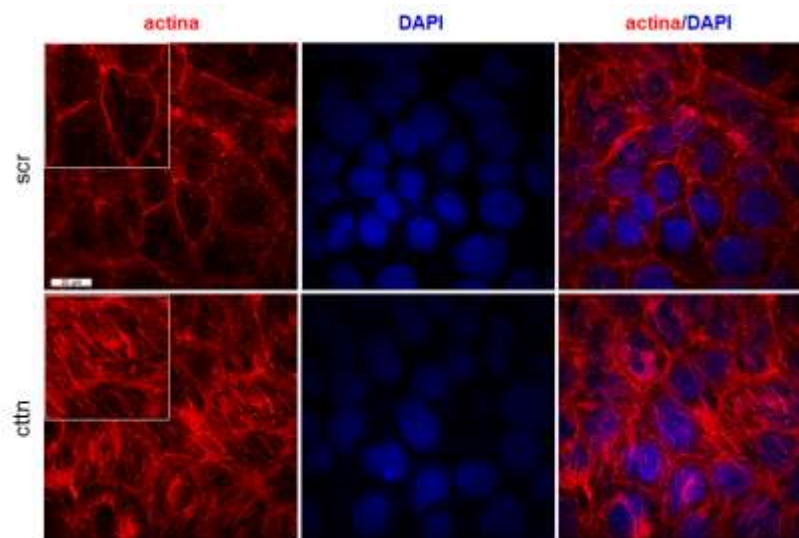


Figura 30. La disminución de la expresión de cortactina produjo un incremento de las fibras de actina. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio y teñidas con faloidina para analizar la remodelación del citoesqueleto de actina. La disminución de la expresión de CTTN produjo un incremento en la generación de estas estructuras en la línea celular CTTN-KD, en comparación con las células scrambled. (scrambled, scr; CTTN-KD, ctn) n = 3 para cada grupo.

La disminución de la expresión de cortactina condujo a un aumento de la expresión de ROCK1 y p-MLC

La GTPasa Rho juega un papel fundamental en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina a través de su efector ROCK1 y la activación

(fosforilación) de la proteína motora miocina-2, para llevar a cabo su contracción por medio de las fibras de estrés [83]. Es por este motivo que decidimos evaluar la actividad de ROCK1 y la fosforilación de MLC2. Para esto, analizamos la expresión de ROCK1 en la línea celular CTTN-KD y scrambled, mediante un ensayo de Western blot (**figura 31**).

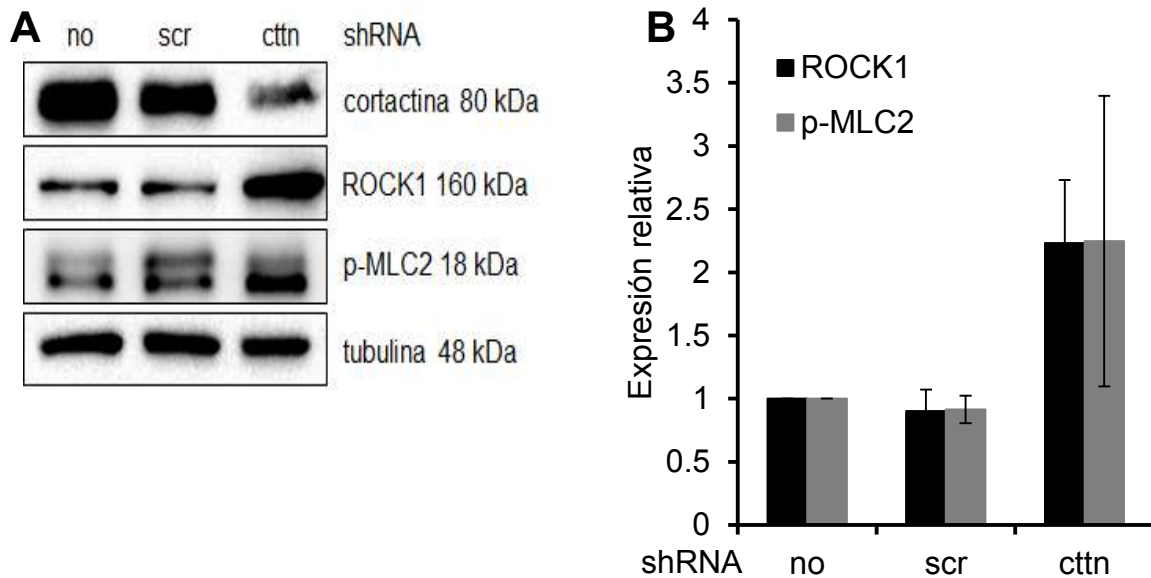


Figura 31. La disminución de la expresión de cortactina produjo un aumento de la expresión de ROCK1. A. Se extrajeron proteínas de los lisados de las células CTTN-KD y controles, más tarde estos fueron analizados mediante Western blot para las proteínas ROCK1 y p-MLC2. **B.** Cuantificación de la expresión relativa de ROCK1 y p-MLC2 respecto a gamma-tubulina en las células CTTN-KD y controles. Estos resultados, demostraron que existe una mayor expresión de ROCK1, en las células CTTN-KD en comparación con los controles, la cual se correlacionó con un aumento en los niveles de p-MLC2, demostrando con esto, su activación. (Caco-2 no infectada, no; scrambled, scr; CTTN-KD, ctn). n = 3 para cada grupo.

Este ensayo, demostró que tras la disminución de CTTN existe una sobreexpresión de ROCK1 en la línea celular KD en comparación con las células controles. Esta sobreexpresión de ROCK1, se correlacionó con un aumento en la fosforilación de MLC2, demostrando con ello, que también ROCK1 se encuentra activada. De acuerdo con esto, las fibras de actina observadas anteriormente indicarían que se tratan de fibras de estrés contráctiles, y la deficiencia de CTTN sería un factor importante que promovería su formación.

La inhibición de ROCK1 rescató la resistencia eléctrica transepitelial en la línea celular CTTN-KD

Con base en el argumento anterior, la inhibición de ROCK1 debería disminuir las fibras de actina y rescatar de la permeabilidad en la línea celular CTTN-KD. Por ello, evaluamos el papel de ROCK1 sobre la permeabilidad, midiendo la RET bajo la acción del inhibidor de ROCK1/2, Y27632. La inhibición de ROCK produjo un rápido aumento de la RET en ambas líneas celulares, sugiriendo que la inhibición ROCK promueve la estabilidad de las uniones, *in vitro* (**figura 32**). Este aumento fue evidente a las 24 h, alcanzando un máximo a las 96 h. Por otro lado, las células sin tratamiento desarrollaron la RET de manera gradual, alcanzando su valor máximo hasta las 192 h. En resumen, el rescate de la RET mediante la inhibición de ROCK demuestra su participación en la regulación de la permeabilidad del epitelio intestinal *in vitro*.

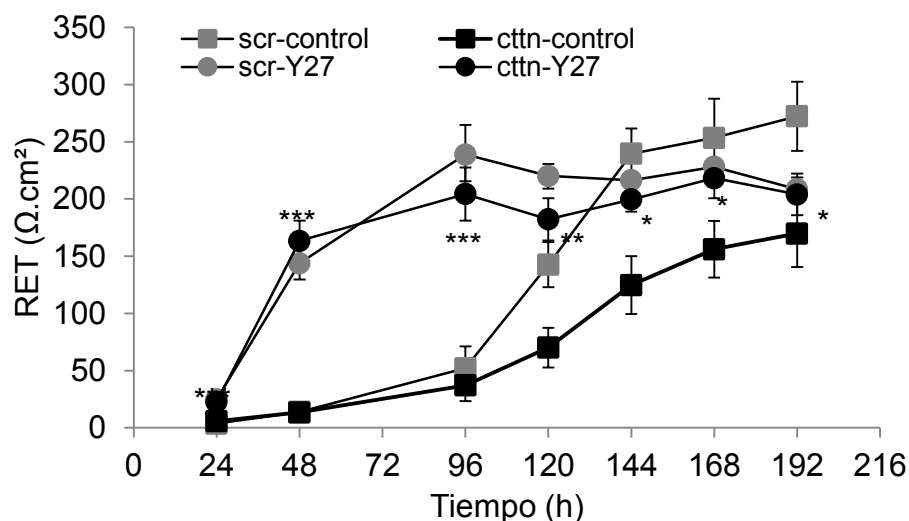


Figura 32. La inhibición de ROCK1 condujo al rescate de la resistencia eléctrica transepitelial en la línea celular deficiente de cortactina. Las células CTTN-KD y scrambled fueron cultivadas en filtros transwells. Posteriormente el desarrollo de RET fue monitoreado con o sin la acción del inhibidor de ROCK (Y27632). La inhibición de ROCK, incrementó la TER en las células CTTN-KD y scrambled; mientras que, las células sin tratamiento desarrollaron más lentamente la RET. Sin embargo, los valores de RET para la línea celular CTTN-KD fueron menores en comparación con las células scrambled. (scrambled, scr; CTTN-KD, ctnn). n = 4 para cada grupo. * $P \leq 0.1$ ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. (* ctnn-control vs ctnn-Y27).

In vivo, este mismo mecanismo podría estar operando dado que el análisis por Western blot de los ratones CTTN-KO reveló un incremento de la expresión de ROCK1 en los cólonos en comparación con los ratones silvestres (**figura 33**).

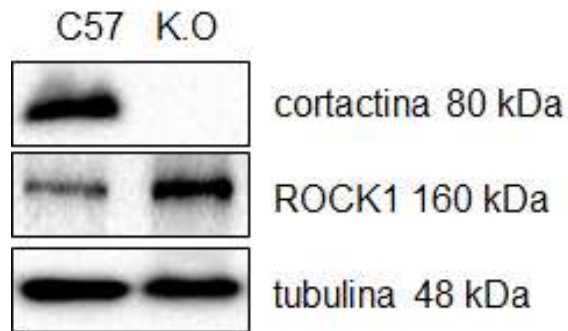


Figura 33. Los ratones CTTN-KO presentaron una mayor expresión de ROCK1 en el epitelio intestinal. Análisis por Western blot de ROCK1 en los lisados proteicos obtenidos de los cólonos de los ratones CTTN-KO y silvestres. Este ensayo demostró un aumento en la expresión de ROCK-1 en los ratones CTTN-KO, en comparación con los ratones silvestres, similar a lo observado en las células CTTN-KD. n = 3 para cada grupo.

DISCUSIÓN

La dinámica del citoesqueleto de actina es un factor clave que controla la barrera epitelial intestinal y el ensamblaje de las uniones intercelulares. Los filamentos de actina cortical conectados a las proteínas de unión son estructuras que experimentan un constante recambio en respuesta a diferentes estímulos. Durante este proceso, las proteínas de unión a los filamentos de actina (*actin binding protein*, *ABP*) desempeñan una importante función controlando su dinámica y polimerización/despolimerización, y al mismo tiempo contribuyendo en la integridad de las uniones intercelulares [8, 80, 157].

En este trabajo, a través de modelos *in vivo* e *in vitro*, hemos demostrado que CTTN es un importante regulador de la barrera y la permeabilidad del epitelio intestinal bajo condiciones basales e inflamatorias (**figura 34**).

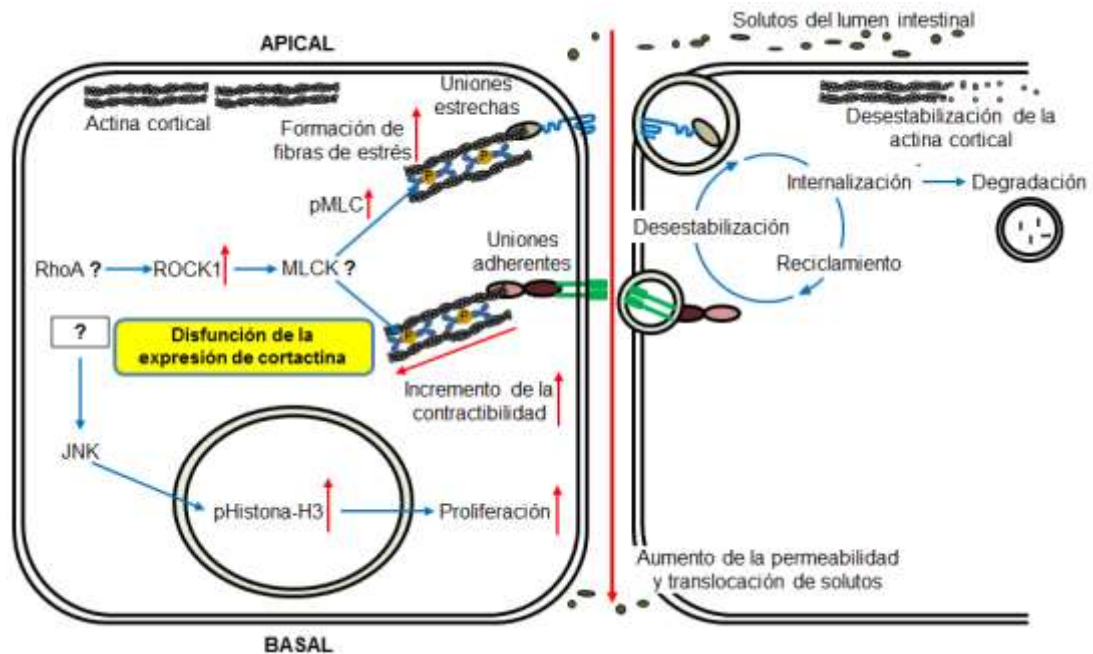


Figura 34. Cortactina regula la permeabilidad del epitelio intestinal. La deficiencia de CTTN en el epitelio intestinal conduce a la desestabilización de las uniones intercelulares y la remodelación del citoesqueleto de actina, provocando el debilitamiento de la barrera y un incremento de la permeabilidad. Así mismo, esto conduce a un aumento de la proliferación celular, presumiblemente a través de la vía de JNK.

La deficiencia de CTTN produjo un incremento de la permeabilidad intestinal y la desestabilización de las uniones intercelulares (uniones estrechas y adherentes), además de un incremento en la formación de fibras de estrés. Esto último, se correspondió con un aumento de la fosforilación de MLC y el incremento de la expresión de ROCK1 en el epitelio intestinal, sugiriendo con ello un mecanismo molecular responsable de la desestabilización de las uniones intercelulares y el aumento de la permeabilidad. La ausencia de CTTN condujo a una alteración de la arquitectura de las criptas del epitelio intestinal, pero sin causar la activación de un proceso inflamatorio; sin embargo, se pudo observar un aumento de la proliferación celular, sin afectar los niveles de la apoptosis del epitelio intestinal. *In vivo*, la ausencia de CTTN también produjo el agravamiento de la colitis experimental bajo el tratamiento con DSS, demostrando con ello la importancia de CTTN como un regulador maestro de la permeabilidad y la homeostasis intestinal.

In vivo, la ausencia de CTTN en nuestro modelo de ratón KO, produjo un incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal en condiciones basales (**figura 11**). Este resultado es similar a lo reportado en otros estudios que utilizan modelos KOs de moléculas que participan en la dinámica del citoesqueleto de actina y de uniones intercelulares, como por ejemplo JAM-A o p120-catenina, donde la ausencia de estas moléculas promueve un incremento en la permeabilidad del epitelio intestinal, la generación de un proceso inflamatorio y la desestabilización de las uniones intercelulares [158, 159]. En este sentido, es importante mencionar que la expresión y estabilidad de las proteínas de las uniones intercelulares también se vio afectada en la ausencia de CTTN, causando con ello la disminución de la expresión de ZO-1 y su relocalización en las células del epitelio intestinal (**figuras 18 y 19**). Esto, también, afectó la expresión y relocalización de ocludina y E-cadherina, causando su movilidad desde la periferia hacia el citosol (**figura 19**). En las células KD de CTTN este efecto fue consistente con lo observado en los ratones KO, provocando la disminución de los niveles de expresión de E-cadherina, ZO-1, ocludina y de su relocalización desde la periferia celular hacia el citosol (**figuras 26 y 27**). Cabe mencionar, que E-cadherina participa en la formación no solo de las uniones adherentes sino también en la

formación y maduración de las uniones estrechas [43, 75, 160], además, tiene un importante papel en el mantenimiento de la barrera del epitelio pulmonar [161] e intestinal [162].

ZO-1 también participa en el mantenimiento de las uniones estrechas, el mantenimiento de la barrera y la regulación de la permeabilidad [134], no obstante el estímulo proinflamatorio con LPS se ha visto que no solo promueve la desestabilización y disminución de la expresión de ZO-1 y ocludina, sino que también conduce a un aumento de la permeabilidad en el epitelio intestinal [163]. Por ello, su alteración bien podría estar contribuyendo a la formación de uniones intercelulares débiles y poco estables, y al aumento de la permeabilidad. No obstante, aun cuando la deficiencia de CTTN produjo una disminución de ZO-1 y su relocalización en las células en cultivo (**figura 28**), no afectó su reintegración en la periferia celular, después de la restitución del calcio extracelular en el medio en comparación con las células control. Esto indica, que CTTN puede no estar participando de manera directa en la formación de las uniones intercelulares, pero sí resultaría esencial en el mantenimiento y estabilidad de las mismas.

De manera interesante, la ausencia de CTTN en los ratones KO condujo a un aumento de la expresión de la proteína transmembranal claudina-2 y la disminución de la expresión de claudina-1, además de la relocalización de ZO-1, E-cadherina y ocludina, desde la periferia celular hacia el citosol. *In vitro*, la disminución de la expresión de CTTN en la línea celular epitelial Caco-2, no solamente produjo un aumento en la expresión de claudina-2 y la disminución de la expresión de claudina-1, sino que también estuvo acompañado por una disminución de la expresión de ocludina (**figuras 19, 26 y 27**). Esto repercutió de manera significativa en una reducción de la RET y en un aumento de la permeabilidad paracelular de solutos, confirmando con ello la disfunción de las uniones intercelulares (**figuras 24, 25**), tal y como fue observado en los ratones CTTN-KO. Esto es particularmente importante, dado el papel que desempeñan las claudinas en la regulación del flujo paracelular de iones y solutos en el epitelio intestinal [164, 165]. Mientras que claudina-2 se ha descrito como permisible al

paso de iones [166-168], claudina-1 estaría involucrada en el mantenimiento de la barrera epitelial [169, 170]. Por otro lado, ocludina participa en el mantenimiento de la barrera epitelial, y su deficiencia se sabe que incrementa el flujo paracelular de macromoléculas [171, 172]. Estos antecedentes encajarían de manera perfecta con nuestros resultados, ya que un aumento de la expresión de claudina-2 y la consiguiente disminución de la expresión de claudina-1 y ocludina, podrían explicar la disminución de la barrera y el aumento de la permeabilidad intestinal basal en los ratones KO y en las células deficientes de CTTN.

Por otro lado, la deficiencia de CTTN incrementó la expresión de ROCK1, la fosforilación de MLC y la contracción del citoesqueleto de actina (**figuras 30 y 31**). La contracción del citoesqueleto de actina, en consecuencia estaría produciendo la alteración de la composición molecular de las uniones intercelulares. Es decir, el incremento de la fuerza de contracción generada mediante las fibras de estrés en las células KD de CTTN, pudiera estar contribuyendo a la alteración de las uniones y al incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal [173, 174]. Cabe mencionar, que ROCK1 puede fosforilar y activar de manera directa a MLCK, produciendo de esta forma un incremento en la formación de fibras de estrés y la fuerza de contracción, y por ende un incremento de la permeabilidad [175]. Es probable que el incremento de la activación de ROCK1 en la ausencia de CTTN sea un efecto mediado a través de RhoA, sin embargo la activación de ROCK1 independiente de RhoA mediado por PKC, podría ser otra posibilidad como bien se ha demostrado [176]. No obstante, si la activación de ROCK1 es un efecto directo llevado a cabo mediante CTTN es algo que necesita ser evaluado.

Sin embargo, en el endotelio, donde CTTN juega un papel en la regulación de la permeabilidad vascular, su ausencia conduce a una disminución de la actividad de Rap1, con el consiguiente aumento en la actividad de ROCK1, la disminución de la secreción de adrenomedulina (ADM), el incremento de la fosforilación de MLC y la formación de fibras de estrés [122, 177]. Dado que ADM activa Rap1 y este a su vez inhibe el eje RhoA/ROCK, es probable que CTTN promueva la

actividad de Rap1 por medio de la producción de AMP cíclico (cAMP) . En el epitelio intestinal, ADM puede ejercer un efecto antiinflamatorio y antimicrobiano, y estimular la regeneración de la mucosa y el mantenimiento de la barrera [178]. De manera interesante, el tratamiento con ADM en el epitelio intestinal de ratas, no solo mejora la función de la barrera epitelial intestinal mediante la disminución de la fosforilación de MLC, sino que confiere un mecanismo protector durante la colitis experimental con DSS y TNBS, al disminuir la inflamación intestinal [178, 179]. El mecanismo de secreción de ADM y su papel en la protección del epitelio intestinal es algo que pudiera estar afectado en los ratones CTTN-KO, similar a lo ya demostrado en el endotelio vascular de estos animales. Si esto es cierto, dicho mecanismo proveería una explicación al aumento de la permeabilidad en el epitelio intestinal observado en estos animales. Sin embargo, esta posibilidad es algo que aún necesita ser estudiado.

En los ratones KO esto tendría importantes consecuencias, ya que, *in vivo* el tratamiento con DSS estaría promoviendo la desestabilización de las uniones intercelulares, lo que produciría una exposición excesiva de las bacterias y sus antígenos encontrados en el lumen y en consecuencia induciendo una mayor severidad de la colitis experimental. Esto es similar a lo observado en otros modelos deficientes de ABPs. Por ejemplo, en los ratones deficientes de miosina-IIA no muscular (*non-muscle myosin IIA, NMIIA*), el epitelio intestinal muestra signos de una disfunción de la barrera e inflamación en condiciones basales pero no desarrollan colitis de manera espontánea. En contraste, los ratones KO de ADF (*actin-depolymerizing factor*) no mostraron signos de inflamación de la mucosa. Similar a los ratones CTTN-KO, los ratones KO de ADF y NMIIA desarrollaron una colitis más severa bajo el tratamiento con DSS, sugiriendo de esta forma que las ABPs juegan un papel muy importante en la protección de la barrera durante la colitis.

El mecanismo molecular exacto del efecto protector producido por las ABPs aún no se ha investigado, pero es probable que esta involucre una preservación de la integridad de la barrera dependiente de actina, ya que la inhibición de ROCK1 y

de esta manera la contractilidad del citoesqueleto pudo rescatar el incremento de la permeabilidad en las células KD de CTTN (**figura 32**). De manera interesante, la inhibición de ROCK1 resultó en un rápido desarrollo de la RET, tanto en la línea celular KD de CTTN como en el control, lo que sugiere que ROCK1 es el principal regulador del desarrollo de la barrera epitelial independientemente de la presencia de CTTN. Se ha descrito, que la fosforilación de MLC también ocurre en respuesta a citosinas proinflamatorias, la cual también ha sido observada en pacientes que sufren EII [173]. Aunque la fosforilación de MLC en la ausencia de CTTN, es más bien dependiente de ROCK1, nuestros resultados indican que el incremento de la contractilidad contribuye a la disfunción de la barrera epitelial. Como ya se ha hecho mención, este fenotipo no es suficiente para el desarrollo de la colitis espontánea, pero sí para el agravamiento de la colitis inducida por DSS. En adición a lo observado en los ratones KO de ABP, este efecto también ha sido descrito en modelos de ratones transgénicos sobreexpresando MLCK constitutivamente activado en el epitelio intestinal [180]. Sin embargo, en estos ratones la disfunción de la barrera fue atribuida a la activación de la respuesta inmune de la mucosa, más que a una disfunción de las uniones intercelulares. Dado la ausencia de una respuesta inmune significativa en el colon de ratones CTTN-KO, posiblemente debido a la reducida extravasación de leucocitos en la ausencia de CTTN [122], los ratones deficientes de CTTN pudieran proveer un nuevo sistema que permita estudiar el rol de los defectos de la barrera en la patogénesis y la progresión de la colitis experimental, sin la excesiva activación de una respuesta inmune.

Por otro lado la disfunción de la barrera epitelial podría ser aprovechada por las células del sistema inmune, ya que los ensayos de trans migración *in vitro* demostraron que los neutrófilos de sangre periférica humana pueden trans migrar de manera más rápida a través de la monocapa de las células epiteliales deficientes de CTTN (**figura 29**). Esto contrasta con algunos estudios, donde la ausencia de CTTN reduce de manera drástica la migración transendotelial debido al fallo del reclutamiento y agrupamiento de ICAM-I en la membrana celular [122, 181]. En las células epiteliales donde la dirección de trans migración de los

neutrófilos es en dirección basal-apical, el inicio de la transmigración no es dependiente de ICAM-I, sino de otros receptores que aún no han sido del todo identificados y cuyo reclutamiento no sería dependiente de CTTN. ICAM-I se ha demostrado que regula las interacciones epitelio-leucocito después de la transmigración hacia la región apical del epitelio [182]. De esta manera, es posible especular que, en adición a la facilidad con que los neutrófilos atraviesan las uniones intercelulares, la deficiencia de CTTN también prevendría la adhesión dependiente de ICAM-I de manera que estos estarían siendo liberados más rápidamente. No obstante, aun cuando los contactos celulares son desestabilizados en los ratones CTTN-KO, no fue posible observar el reclutamiento significativo de leucocitos, similar a lo ocurrido en los ratones KO de JAM-A [158]. Esto es muy probable, debido a la reducida disponibilidad de polimorfonucleares en la mucosa intestinal dado que la extravasación de leucocitos es reducida en los ratones CTTN-KO [122]. Sin embargo, no podemos descartar que aquellas células del sistema inmune que alcanzan la mucosa, pudieran estar atravesando el epitelio de manera más fácil hacia el lumen de las criptas.

La ausencia de CTTN también produjo cambios en la morfología de las criptas del epitelio intestinal (**figura 20**). Como consecuencia del incremento de la distancia entre los núcleos celulares, el lumen de las criptas fue más grande en estos animales. Esto parece estar de acuerdo con algunas observaciones, ya que la disminución de la densidad celular y la estabilidad de los contactos en una monocapa de células epiteliales, disminuyen la inhibición por contacto conduciendo a un aumento de la proliferación celular (**figura 21**) [183, 184]. Este hecho, refuerza la idea de que la disminución de la estabilidad de los contactos celulares en la ausencia de CTTN, incrementa la proliferación celular del epitelio intestinal *in vivo*. En este sentido, la proliferación celular jugaría también un importante papel al contrarrestar la disfunción de la barrera epitelial, ya que el incremento de la proliferación puede coadyuvar en un fenotipo regenerativo en la mucosa intestinal [158].

No obstante, el incremento de la proliferación celular, pero no de la apoptosis del epitelio intestinal, tal y como se observó en los ratones KO y las células deficientes de CTTN (**figuras 21 y 23A**), sugeriría un desbalance de los mecanismos homeostáticos en condiciones basales. Como ya se ha descrito, el epitelio intestinal es un tejido con alto índice de proliferación, pero también de apoptosis celular, asegurando con ello el recambio de las células que mueren por apoptosis o lesión, por aquellas que se originan de las células madres epiteliales presentes en las criptas del intestino [185]. En el epitelio intestinal, algunas vías de señalización como PI3K/Akt, mTOR, JNK y Hippo juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular, en la regulación del tamaño de los órganos y en su regeneración, esto por medio de la transducción de señales intracelulares, o el mantenimiento de la polaridad y la adhesión celular [186-189]. Por ello, sería necesario analizar si algunos de estos mecanismos moleculares estarían afectados en la ausencia de CTTN, contribuyendo de esta manera al incremento de la proliferación del epitelio intestinal.

No obstante, JNK (c-Jun N-terminal Kinase) parece estar contribuyendo en el incremento de la fosforilación de la histona-H3, tanto en los ratones CTTN-KO, como en las células deficientes de CTTN, ya que su inhibición mediante SP600125 contribuyó en la disminución de la fosforilación de la histona-H3 en las células deficientes de CTTN (**figura 23B**). La fosforilación de la histona-H3 es un marcador de proliferación, y se observa con frecuencia durante la condensación de la cromatina en la mitosis, mientras que su disfunción está relacionada con una segregación aberrante del material genético [190-192]. Parece lógico pensar entonces, que este mecanismo pudiera estar contribuyendo al aumento de la proliferación celular observada a través de la vía JNK en la ausencia de CTTN. Sin embargo, si JNK es la cinasa única involucrada de manera directa en la fosforilación de la histona-H3, es algo que todavía necesita ser analizado.

La pérdida de este balance homeostático, también se relaciona con un incremento de la inflamación y de la permeabilidad en el epitelio intestinal, como lo descrito en las enfermedades inflamatorias que involucran el tracto intestinal [18, 28, 133].

No obstante, la ausencia de apoptosis, así como el incremento de la proliferación celular tanto en los ratones KO como en las células deficientes de CTTN bien podría obedecer a un mecanismo compensatorio en respuesta al incremento de la permeabilidad intestinal en condiciones basales. Esto último pudiera ser cierto, ya que el análisis histológico de los cólores de los ratones CTTN-KO en condiciones basales no demostró alteración de la arquitectura de la mucosa intestinal o el reclutamiento de células del sistema inmune sugiriendo con ello la ausencia de cualquier proceso de activación inmunológica y con ello la ausencia de apoptosis.

No está claro el porqué de la ausencia de apoptosis, pero podría estar relacionado con un incremento de la activación del receptor tipo Toll-2 (*toll-like receptor-2*, *TLR2*), en la ausencia de CTTN. Dichos receptores, están involucrados en el reconocimiento y respuesta a los componentes bacterianos gram-positivos y –negativos y juegan un papel crucial en la inmunidad innata. Los TLRs individuales interactúan con diferentes combinaciones de proteínas adaptadoras y activan de manera funcional la vía NF- κ B, como el factor central de transcripción, modulando la respuesta inmune y la defensa del epitelio intestinal [193]. Se ha reportado, por ejemplo, que la activación de TLR2 mediante el ligando PCSK (*Pam3Cys-SKxxx3HCl*, *Pam3CysSK4*) en un modelo *ex vivo* de colon de ratón, controla la integridad de la barrera mediante el mantenimiento de las proteínas de las uniones intercelulares (ZO-1 y E-cadherina) y el balance de la homeostasis de la mucosa intestinal, previniendo la inflamación y la apoptosis. Se observó además que el estímulo de TLR2 mediante PCSK, en el epitelio intestinal es regulado por PI3K-Akt, mediante la activación de este último por medio de MyD88, modulando así la función de la barrera del epitelio intestinal [194, 195]. No sabemos si este mecanismo se encuentra sobreactivado y operando en los ratones CTTN-KO o en las células deficientes de CTTN; de ser así, explicaría el porqué de la ausencia de apoptosis en el epitelio intestinal; sin embargo, sería interesante en un futuro analizar esta posibilidad.

El análisis histológico de las muestras de tejido de los ratones KO y silvestres en condiciones basales, reveló que la ausencia de CTTN no produce alteración

aparente en la morfología de la mucosa intestinal (**figuras 17A y C**), pero sí la formación de edema en los ratones CTTN-KO en comparación con los ratones silvestres (**figuras 17E y G**), lo que correlacionó con el incremento de la permeabilidad intestinal, aún antes del tratamiento con DSS. No obstante, el análisis detallado de la histología del colon, reveló un incremento aparente en el número de células de Goblet presentes en la mucosa intestinal, después del tratamiento con DSS. También se observaron más depósitos de mucina en los ratones CTTN-KO con DSS. Esto reviste particular importancia dado la función que estas células desempeñan en la secreción de moléculas bioactivas tales como mucinas. La secreción de mucinas en particular mucina 2 (MUC2), provee la primera línea de defensa contra microorganismos o factores químicos y físicos que pudieran dañar el epitelio [196]. Por ello es de suponer que el incremento en el número de células Goblet suponga un mecanismo de respuesta y al mismo tiempo de protección ante el aumento de la permeabilidad intestinal, coadyuvando de esta manera en el mantenimiento de la homeostasis y previniendo la inflamación. Sin embargo, la secreción de otros factores por parte de estas mismas células, tales como TFF (trefoil factor) que se sabe participan, no solo en la reparación del epitelio, sino también en su proliferación [197], podrían estar contribuyendo en la protección del epitelio intestinal en la ausencia de CTTN.

A diferencia de lo que se observó en los ratones silvestres, el tratamiento con DSS en los ratones CTTN-KO fue más severo (**figura 15**), esto debido a una mayor presencia de sangre, diarrea, y una mayor pérdida de peso (**figuras 12-14**). Esto contrasta con lo reportado para los ratones KO de JAM-A, donde si bien es cierto que el tratamiento con DSS produjo los signos de la colitis experimental, el análisis histológico reveló una menor lesión de la mucosa intestinal en comparación con los ratones silvestres. Cabe también mencionar, que el incremento de la permeabilidad basal observado en los ratones CTTN-KO no fue suficiente para que estos animales desarrollaran colitis de manera espontánea, pero sí el agravamiento de la colitis inducida por DSS (**figura 15**). Esto contrasta con lo reportado en otros modelos de ratones KO, como lo es el caso de los ratones deficientes de *IL-10* [198, 199], *mdr1a* [200] o de *muc2* [201], donde la

ausencia de cada una de estas moléculas promueve la aparición de los síntomas de la colitis de manera espontánea a las pocas semanas del nacimiento. Por ahora no existe una explicación convincente del porqué estos animales no enferman a pesar del incremento de la permeabilidad; sin embargo, esto parece concordar con lo observado en familiares de primer grado de pacientes que sufren EII, donde a pesar del incremento de la permeabilidad intestinal, la enfermedad no está presente [202-205]. Esto refuerza la hipótesis de un mecanismo compensatorio que contribuye a un fenotipo aparentemente sano, muy a pesar del aumento de la permeabilidad intestinal observada.

Cabe mencionar que la EII, es acompañada por una disfunción de las uniones intercelulares, tanto en su expresión como en su relocalización, explicando con ello el aumento de la permeabilidad intestinal, la translocación de los antígenos del lumen intestinal y conduciendo con ello a un proceso crónico de inflamación que caracteriza a esta enfermedad [206]. CTTN, como ya hemos demostrado, contribuye en la estabilidad de las uniones intercelulares del epitelio intestinal, y al mantenimiento de la barrera y la permeabilidad. De esta manera, sería importante analizar la expresión y localización de CTTN en el epitelio intestinal de pacientes que sufren EII, y si esto pudiera estar afectando el desarrollo y la etiología de esta enfermedad.

En conclusión, hemos demostrado la importancia de CTTN como un regulador central de la permeabilidad intestinal a través del mantenimiento de la estabilidad de las uniones estrechas y adherentes y la regulación del citoesqueleto de actina. Su disfunción conduce a un daño en la barrera y al incremento de la permeabilidad intestinal, que no obstante, resulta insuficiente para inducir inflamación y el surgimiento de la colitis espontánea. La permeabilidad intestinal es una característica observada en todos los pacientes que sufren de EII, donde la inflamación y la disfunción de las uniones intercelulares juegan un papel crucial. La posibilidad de que CTTN pudiera tener un papel relevante en la etiología de esta enfermedad resulta tentadora; sin embargo, es algo que aún necesita ser estudiado.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos demostrado el papel de CTTN en la regulación de la permeabilidad del epitelio intestinal. La deficiencia de CTTN conduce a un incremento de la permeabilidad basal, tanto *in vivo* como *in vitro*, caracterizada por la alteración de la expresión y la relocalización de las uniones intercelulares. *In vitro*, la desestabilización de las uniones intercelulares produjo una disminución de la RET y un incremento del flujo paracelular de solutos, así como la rápida transmigración de células polimorfonucleares en la línea celular deficiente de CTTN. *In vivo*, la ausencia de CTTN condujo a una alteración de la mucosa y de la arquitectura de las criptas del epitelio intestinal y el agravamiento de la colitis experimental. En los ratones-KO y en la línea celular, la deficiencia de CTTN produjo un incremento de la proliferación celular, por medio de la vía JNK pero no de la apoptosis. *In vitro*, la deficiencia de CTTN condujo a un incremento de la formación de fibras de estrés, la sobreexpresión de ROCK1 y el aumento de la fosforilación de MLC, vinculando la participación de este mecanismo en la desestabilización de las uniones intercelulares y el aumento de la permeabilidad intestinal. Por último, CTTN es un importante regulador de la integridad de la barrera epitelial y la estabilidad de las uniones intercelulares, por medio de la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, ya que su deficiencia conduce a un incremento de la permeabilidad intestinal (**figura 34**). La inflamación, la permeabilidad intestinal y la disfunción de las uniones intercelulares es una característica de los pacientes que sufren de EII. La posibilidad de que CTTN pudiera tener un papel relevante en la etiología de esta enfermedad resulta tentadora; sin embargo, es algo que aún necesita ser evaluado.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la producción de citosinas proinflamatorias en condiciones basales y durante el tratamiento con DSS en los ratones CTTN-KO.
- Evaluar la activación de la GTPasa RhoA en ausencia de CTTN.
- Evaluar los niveles de secreción de ADM, tanto *in vivo* como *in vitro*, y su papel en la permeabilidad del epitelio intestinal.
- Evaluar si la deficiencia de CTTN afecta la expresión y localización de ICAM-I en el epitelio intestinal.
- Analizar la expresión y la función de TLR2 en el epitelio intestinal en ausencia de CTTN.
- Evaluar si la cinasa JNK está directamente involucrada en la fosforilación de la histona-H3 en ausencia de CTTN.
- Evaluar la expresión de los factores bioactivos MUC2 y TFF en el epitelio intestinal de los ratones CTTN-KO.
- Analizar si la microbiota se encuentra alterada en ratones CTTN-KO.
- Analizar la expresión y distribución de CTTN en tejidos de colon provenientes de pacientes con EII.

REFERENCIAS

1. Ragkousi, K. and M.C. Gibson, *Cell division and the maintenance of epithelial order*. J Cell Biol, 2014. **207**(2): p. 181-8.
2. Laukoetter, M.G., P. Nava, and A. Nusrat, *Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 401-7.
3. Gunther, C., et al., *Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium*. Gut, 2013. **62**(7): p. 1062-71.
4. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
5. Blander, J.M., *Death in the intestinal epithelium - Basic biology and implications for inflammatory bowel disease*. FEBS J, 2016.
6. Macara, I.G., et al., *Epithelial homeostasis*. Curr Biol, 2014. **24**(17): p. R815-25.
7. Hagios, C., A. Lochter, and M.J. Bissell, *Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. **353**(1370): p. 857-70.
8. Ivanov, A.I., C.A. Parkos, and A. Nusrat, *Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation*. Am J Pathol, 2010. **177**(2): p. 512-24.
9. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
10. Youakim, A. and M. Ahdieh, *Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. G1279-88.
11. Marano, C.W., et al., *Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line*. J Membr Biol, 1998. **161**(3): p. 263-74.
12. Bruewer, M., et al., *Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 923-33.
13. Mankertz, J., et al., *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 11): p. 2085-90.
14. Wu, S., et al., *Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14979-84.
15. Noth, R., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model*. BMC Gastroenterol, 2011. **11**: p. 109.
16. Monteiro, A.C., et al., *JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(18): p. 2849-60.
17. Turner, J.R., *Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 1901-9.

18. Camilleri, M., et al., *Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(6): p. 503-12.
19. Piche, T., et al., *Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators*. Gut, 2009. **58**(2): p. 196-201.
20. Bertiaux-Vandaele, N., et al., *The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(12): p. 2165-73.
21. Hoppler, S. and C.L. Kavanagh, *Wnt signalling: variety at the core*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 385-93.
22. Matsuda, M., et al., *A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 7): p. 1247-57.
23. Marchiando, A.M., W.V. Graham, and J.R. Turner, *Epithelial barriers in homeostasis and disease*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 119-44.
24. Potten, C.S., et al., *The stem cells of small intestinal crypts: where are they?* Cell Prolif, 2009. **42**(6): p. 731-50.
25. Hamilton, K.E., et al., *Culturing adult stem cells from mouse small intestinal crypts*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(4): p. 354-8.
26. Clevers, H., *The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment*. Cell, 2013. **154**(2): p. 274-84.
27. Negroni, A., S. Cucchiara, and L. Stronati, *Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 250762.
28. Edelblum, K.L., et al., *Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(5): p. 413-24.
29. Williams, J.M., et al., *Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip*. Vet Pathol, 2015. **52**(3): p. 445-55.
30. Watson, A.J., et al., *Mechanisms of epithelial cell shedding in the Mammalian intestine and maintenance of barrier function*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1165**: p. 135-42.
31. Jeon, M.K., et al., *Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2013. **4**(4): p. 94-9.
32. Vereecke, L., R. Beyaert, and G. van Loo, *Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease*. Trends Mol Med, 2011. **17**(10): p. 584-93.
33. Guan, Y., et al., *Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(6): p. C1404-14.
34. Iwamoto, M., et al., *Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis*. J Pathol, 1996. **180**(2): p. 152-9.
35. Heller, F., et al., *Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory*

- interleukin-13 on epithelial cell function*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S58-61.
36. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(1): p. 61-72.
 37. Coopman, P. and A. Djiane, *Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity*. Cell Mol Life Sci, 2016.
 38. Green, K.J., et al., *Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a000125.
 39. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Architecture of tight junctions and principles of molecular composition*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **36**: p. 157-65.
 40. Schnoor, M. and C.A. Parkos, *Disassembly of endothelial and epithelial junctions during leukocyte transmigration*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6638-52.
 41. Suzuki, T., *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(4): p. 631-59.
 42. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
 43. Citalan-Madrid, A.F., et al., *Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms*. Tissue Barriers, 2013. **1**(5): p. e26938.
 44. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 660-9.
 45. Al-Sadi, R., et al., *Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(6): p. G1054-64.
 46. Wong, V. and B.M. Gumbiner, *A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 399-409.
 47. Yu, A.S., *Claudins and epithelial paracellular transport: the end of the beginning*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(5): p. 503-9.
 48. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Claudins and epithelial paracellular transport*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 403-29.
 49. Holmes, J.L., et al., *Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(6): p. 581-8.
 50. Mitchell, L.A., et al., *Junctional adhesion molecule A promotes epithelial tight junction assembly to augment lung barrier function*. Am J Pathol, 2015. **185**(2): p. 372-86.
 51. Ivanov, A.I. and N.G. Naydenov, *Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies*. Int Rev Cell Mol Biol, 2013. **303**: p. 27-99.
 52. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3199-214.

53. Adams, C.L., et al., *Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein*. J Cell Biol, 1998. **142**(4): p. 1105-19.
54. Green, K.J. and C.L. Simpson, *Desmosomes: new perspectives on a classic*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2499-515.
55. Resnik, N., et al., *Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1499-507.
56. Windoffer, R., M. Borchert-Stuhltrager, and R.E. Leube, *Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 8): p. 1717-32.
57. Garrod, D. and M. Chidgey, *Desmosome structure, composition and function*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 572-87.
58. Holthofer, B., et al., *Structure and function of desmosomes*. Int Rev Cytol, 2007. **264**: p. 65-163.
59. Kowalczyk, A.P. and K.J. Green, *Structure, function, and regulation of desmosomes*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **116**: p. 95-118.
60. Ebnet, K., et al., *Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 1): p. 19-29.
61. Bazzoni, G., et al., *Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20520-6.
62. Fanning, A.S., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson, *Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(4): p. 577-90.
63. Capaldo, C.T., et al., *Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(10): p. 1677-85.
64. McNeil, E., C.T. Capaldo, and I.G. Macara, *Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1922-32.
65. Van Itallie, C.M., et al., *ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(17): p. 3930-40.
66. Fu, Q., et al., *The effect of phytic acid on tight junctions in the human intestinal Caco-2 cell line and its mechanism*. Eur J Pharm Sci, 2015. **80**: p. 1-8.
67. Suzuki, T. and H. Hara, *Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells*. J Nutr, 2009. **139**(5): p. 965-74.
68. Niessen, C.M. and C.J. Gottardi, *Molecular components of the adherens junction*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 562-71.
69. Yamada, S., et al., *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889-901.

70. Maul, R.S., et al., *EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 399-407.
71. Meng, W. and M. Takeichi, *Adherens junction: molecular architecture and regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a002899.
72. Guo, X., et al., *Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(5): p. C1174-87.
73. Wang, J.Y., *Polyamines regulate expression of E-cadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function*. Inflammopharmacology, 2005. **13**(1-3): p. 91-101.
74. Greenspon, J., et al., *Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of adherens junction protein E-cadherin and enhances intestinal epithelial cell barrier function*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(5): p. 1342-53.
75. Garcia-Ponce, A., et al., *The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity*. Thromb Haemost, 2015. **113**(1): p. 20-36.
76. Cosen-Binker, L.I. and A. Kapus, *Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 352-61.
77. Helwani, F.M., et al., *Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization*. J Cell Biol, 2004. **164**(6): p. 899-910.
78. Katsube, T., et al., *Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both Drosophila and mouse*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29672-7.
79. Revenu, C., et al., *The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(8): p. 635-46.
80. Letort, G., et al., *Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton*. F1000Res, 2015. **4**.
81. Dominguez, R., *Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009. **44**(6): p. 351-66.
82. Chesarone, M.A. and B.L. Goode, *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(1): p. 28-37.
83. Ivanov, A.I., et al., *Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2639-51.
84. Weed, S.A. and J.T. Parsons, *Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6418-34.
85. Wu, H. and J.T. Parsons, *Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex*. J Cell Biol, 1993. **120**(6): p. 1417-26.
86. Daly, R.J., *Cortactin signalling and dynamic actin networks*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 1): p. 13-25.
87. Ammer, A.G. and S.A. Weed, *Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics*. Cell Motil Cytoskeleton, 2008. **65**(9): p. 687-707.
88. Han, S.P., et al., *Cortactin scaffolds Arp2/3 and WAVE2 at the epithelial zonula adherens*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7764-75.

89. Evans, J.V., et al., *Further insights into cortactin conformational regulation*. Bioarchitecture, 2011. **1**(1): p. 21-23.
90. Kirkbride, K.C., et al., *Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 187-98.
91. Zhang, X., et al., *HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin*. Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 197-213.
92. MacGrath, S.M. and A.J. Koleske, *Cortactin in cell migration and cancer at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 7): p. 1621-6.
93. Meiler, E., E. Nieto-Pelegrin, and N. Martinez-Quiles, *Cortactin tyrosine phosphorylation promotes its deacetylation and inhibits cell spreading*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33662.
94. Martinez-Quiles, N., et al., *Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5269-80.
95. Kelley, L.C., et al., *Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13847.
96. Lua, B.L. and B.C. Low, *Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control*. FEBS Lett, 2005. **579**(3): p. 577-85.
97. Head, J.A., et al., *Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3216-29.
98. Illes, A., et al., *Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation*. Cell Signal, 2006. **18**(6): p. 830-40.
99. Kinley, A.W., et al., *Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion*. Curr Biol, 2003. **13**(5): p. 384-93.
100. Weed, S.A., et al., *Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex*. J Cell Biol, 2000. **151**(1): p. 29-40.
101. Lai, F.P., et al., *Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(14): p. 3209-23.
102. Sung, B.H., et al., *Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM secretion*. Curr Biol, 2011. **21**(17): p. 1460-9.
103. Bryce, N.S., et al., *Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence*. Curr Biol, 2005. **15**(14): p. 1276-85.
104. Artym, V.V., et al., *Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3034-43.
105. Webb, B.A., R. Eves, and A.S. Mak, *Cortactin regulates podosome formation: roles of the protein interaction domains*. Exp Cell Res, 2006. **312**(6): p. 760-9.
106. Banon-Rodriguez, I., et al., *The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 213-23.

107. Mooren, O.L., et al., *Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 23995-4005.
108. Schafer, D.A., et al., *Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization*. Curr Biol, 2002. **12**(21): p. 1852-7.
109. Menon, M., O.L. Askinazi, and D.A. Schafer, *Dynamin2 organizes lamellipodial actin networks to orchestrate lamellar actomyosin*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94330.
110. Kurklinsky, S., J. Chen, and M.A. McNiven, *Growth cone morphology and spreading are regulated by a dynamin-cortactin complex at point contacts in hippocampal neurons*. J Neurochem, 2011. **117**(1): p. 48-60.
111. He, Y., et al., *Src and cortactin promote lamellipodia protrusion and filopodia formation and stability in growth cones*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(18): p. 3229-44.
112. Sauvonnnet, N., A. Dujeancourt, and A. Dautry-Varsat, *Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor*. J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 155-63.
113. Lynch, D.K., et al., *A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21805-13.
114. Ren, G., et al., *Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers*. J Biol Chem, 2009. **284**(28): p. 18913-22.
115. Sroka, R., et al., *Cortactin is a scaffolding platform for the E-Cadherin adhesion complex controlled by protein kinase D1 phosphorylation*. J Cell Sci, 2016.
116. Dejana, E., F. Orsenigo, and M.G. Lampugnani, *The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2115-22.
117. Yang, S.K., *Intestinal Research Is Now Registered in PubMed Central*. Intest Res, 2015. **13**(1): p. 1.
118. Utech, M., M. Bruwer, and A. Nusrat, *Tight junctions and cell-cell interactions*. Methods Mol Biol, 2006. **341**: p. 185-95.
119. Sandoo, A., et al., *The endothelium and its role in regulating vascular tone*. Open Cardiovasc Med J, 2010. **4**: p. 302-12.
120. Csontos, C., I. Kolosova, and A.D. Verin, *Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(4): p. L843-54.
121. Jacobson, J.R., et al., *Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L289-95.
122. Schnoor, M., et al., *Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo*. J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1721-35.
123. Croucher, D.R., et al., *Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle*

- progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. Mol Cell Biol, 2010. 30(21): p. 5057-70.*
124. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology, 1990. 98(3): p. 694-702.*
 125. Mennigen, R., et al., *Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. 296(5): p. G1140-9.*
 126. Moolenbeek, C. and E.J. Ruitenber, *The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. Lab Anim, 1981. 15(1): p. 57-9.*
 127. Srinivasan, B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom, 2015. 20(2): p. 107-26.*
 128. Lee, W.Y., et al., *In vitro neutrophil transepithelial migration. Methods Mol Biol, 2006. 341: p. 205-15.*
 129. Ohkusa, T., *[Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi, 1985. 82(5): p. 1327-36.*
 130. Perse, M. and A. Cerar, *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 718617.*
 131. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol, 2014. 104: p. Unit 15 25.*
 132. Bauer, C., et al., *Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. Gut, 2010. 59(9): p. 1192-9.*
 133. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. J Allergy Clin Immunol, 2009. 124(1): p. 3-20; quiz 21-2.*
 134. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 286(6): p. C1213-28.*
 135. Harhaj, N.S. and D.A. Antonetti, *Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(7): p. 1206-37.*
 136. Bloemendaal, A.L., et al., *Intestinal stem cells and intestinal homeostasis in health and in inflammation: A review. Surgery, 2016. 159(5): p. 1237-48.*
 137. Butto, L.F. and D. Haller, *Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. Int J Med Microbiol, 2016.*
 138. Nielsen, P.S., et al., *Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. Mod Pathol, 2013. 26(3): p. 404-13.*
 139. Hans, F. and S. Dimitrov, *Histone H3 phosphorylation and cell division. Oncogene, 2001. 20(24): p. 3021-7.*
 140. Aune, G., et al., *The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. Int J Clin Exp Pathol, 2011. 4(5): p. 444-53.*

141. Boulares, A.H., et al., *Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22932-40.
142. Chaitanya, G.V., A.J. Steven, and P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration.* Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 31.
143. Yang, Y., S. Zhao, and J. Song, *Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 223-34.
144. Svensson, L., et al., *Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* J Virol, 1991. **65**(8): p. 4190-7.
145. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Salmonella interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells.* J Infect Dis, 1990. **162**(5): p. 1096-106.
146. Basson, M.D., G. Turowski, and N.J. Emenaker, *Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins.* Exp Cell Res, 1996. **225**(2): p. 301-5.
147. Belouqui, A., A. des Rieux, and V. Preat, *Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier.* Adv Drug Deliv Rev, 2016.
148. Kamiloglu, S., et al., *Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells--A Review.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(9): p. 21555-74.
149. Awortwe, C., P.S. Fasinu, and B. Rosenkranz, *Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges.* J Pharm Pharm Sci, 2014. **17**(1): p. 1-19.
150. Sarmiento, B., et al., *Cell-based in vitro models for predicting drug permeability.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(5): p. 607-21.
151. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.* Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-49.
152. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics.* Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(1): p. 1-26.
153. Delie, F. and W. Rubas, *A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model.* Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1997. **14**(3): p. 221-86.
154. Benson, K., S. Cramer, and H.J. Galla, *Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond.* Fluids Barriers CNS, 2013. **10**(1): p. 5.
155. Chin, A.C. and C.A. Parkos, *Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury.* Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 111-43.
156. Jaye, D.L. and C.A. Parkos, *Neutrophil migration across intestinal epithelium.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **915**: p. 151-61.
157. Sukriti, S., et al., *Mechanisms regulating endothelial permeability.* Pulm Circ, 2014. **4**(4): p. 535-51.

158. Laukoetter, M.G., et al., *JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo*. *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3067-76.
159. Smalley-Freed, W.G., et al., *p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(6): p. 1824-35.
160. Quiros, M. and A. Nusrat, *RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **36**: p. 194-203.
161. Zabner, J., et al., *Histamine alters E-cadherin cell adhesion to increase human airway epithelial permeability*. *J Appl Physiol (1985)*, 2003. **95**(1): p. 394-401.
162. Liu, L., et al., *Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(4): p. C801-10.
163. Bein, A., et al., *LPS induces hyper-permeability of intestinal epithelial cells*. *J Cell Physiol*, 2016.
164. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(2): p. 525-69.
165. Khan, N. and A.R. Asif, *Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 219843.
166. Escaffit, F., F. Boudreau, and J.F. Beaulieu, *Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells*. *J Cell Physiol*, 2005. **203**(1): p. 15-26.
167. Rosenthal, R., et al., *Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 11): p. 1913-21.
168. Weber, C.R., et al., *Claudin-2-dependent paracellular channels are dynamically gated*. *Elife*, 2015. **4**: p. e09906.
169. Inai, T., J. Kobayashi, and Y. Shibata, *Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells*. *Eur J Cell Biol*, 1999. **78**(12): p. 849-55.
170. Balkovetz, D.F., *Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(3): p. F572-9.
171. Matter, K. and M.S. Balda, *Occludin and the functions of tight junctions*. *Int Rev Cytol*, 1999. **186**: p. 117-46.
172. Tsukita, S. and M. Furuse, *Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin*. *Genes Cells*, 1998. **3**(9): p. 569-73.
173. Cunningham, K.E. and J.R. Turner, *Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1258**: p. 34-42.
174. Gomez, G.A., R.W. McLachlan, and A.S. Yap, *Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions*. *Trends Cell Biol*, 2011. **21**(9): p. 499-505.
175. Pellegrin, S. and H. Mellor, *Actin stress fibres*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 20): p. 3491-9.

176. Ivanov, A.I., et al., *Protein kinase C activation disrupts epithelial apical junctions via ROCK-II dependent stimulation of actomyosin contractility*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 36.
177. Garcia Ponce, A., et al., *Loss of cortactin causes endothelial barrier dysfunction via disturbed adrenomedullin secretion and actomyosin contractility*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29003.
178. Ashizuka, S., et al., *Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium*. Microbiol Immunol, 2009. **53**(10): p. 573-81.
179. Yi, Z., et al., *Adrenomedullin improves intestinal epithelial barrier function by downregulating myosin light chain phosphorylation in ulcerative colitis rats*. Mol Med Rep, 2015. **12**(3): p. 3615-20.
180. Su, L., et al., *Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 551-63.
181. Yang, L., et al., *Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6440-9.
182. Sumagin, R., et al., *Transmigrated neutrophils in the intestinal lumen engage ICAM-1 to regulate the epithelial barrier and neutrophil recruitment*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 905-15.
183. Eisenhoffer, G.T. and J. Rosenblatt, *Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(4): p. 185-92.
184. McClatchey, A.I. and A.S. Yap, *Contact inhibition (of proliferation) redux*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(5): p. 685-94.
185. Delgado, M.E., T. Grabinger, and T. Brunner, *Cell death at the intestinal epithelial front line*. FEBS J, 2015.
186. Yu, F.X., B. Zhao, and K.L. Guan, *Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer*. Cell, 2015. **163**(4): p. 811-28.
187. Hayashi, S., H. Yokoyama, and K. Tamura, *Roles of Hippo signaling pathway in size control of organ regeneration*. Dev Growth Differ, 2015. **57**(4): p. 341-51.
188. Zhao, B., K. Tumaneng, and K.L. Guan, *The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(8): p. 877-83.
189. Sheng, H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1472-8.
190. Hsu, J.Y., et al., *Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes*. Cell, 2000. **102**(3): p. 279-91.
191. Fass, E., et al., *Phosphorylation of histone h3 at serine 10 cannot account directly for the detachment of human heterochromatin protein 1gamma from mitotic chromosomes in plant cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30921-7.

192. Crosio, C., et al., *Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 874-85.
193. Mitchell, S., J. Vargas, and A. Hoffmann, *Signaling via the NFkappaB system*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016. **8**(3): p. 227-41.
194. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1359-74.
195. Podolsky, D.K., et al., *Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 209-20.
196. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
197. Aamann, L., E.M. Vestergaard, and H. Gronbaek, *Trefoil factors in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(12): p. 3223-30.
198. Zhang, H., et al., *Mast cell deficiency exacerbates inflammatory bowel symptoms in interleukin-10-deficient mice*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(27): p. 9106-15.
199. Zigmond, E., et al., *Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 720-33.
200. Wilk, J.N., J. Bilsborough, and J.L. Viney, *The mdr1a^{-/-} mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease*. Immunol Res, 2005. **31**(2): p. 151-9.
201. Wenzel, U.A., et al., *Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100217.
202. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* Gut, 2006. **55**(3): p. 342-7.
203. Breslin, N.P., et al., *Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(10): p. 2934-8.
204. Welcker, K., et al., *Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease*. Eur J Med Res, 2004. **9**(10): p. 456-60.
205. Hollander, D., et al., *Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor*. Ann Intern Med, 1986. **105**(6): p. 883-5.
206. Landy, J., et al., *Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(11): p. 3117-26.

ANEXO 1

Artículos publicados durante el doctorado

Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms

All Francisco Citalán-Madrid¹, Alexander García-Ponce¹, Hilda Vargas-Robles¹, Abigail Betanzos² and Michael Schnoor^{1*}

¹Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav del IPN), Mexico City, Mexico; ²Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav del IPN), Mexico City, Mexico

Keywords: Rho, Rac, cdc42, Ras, Rap, Arf, inflammatory bowel disease, colitis, tight junction, adherens junction, actin cytoskeleton

Abbreviations: AJ, adherens junction; AJC, apical junctional complex; Arf, ADP-ribosylation factor; Cdc42, cell division cycle 42; DSS, dextran sulfate sodium; EGF, epidermal growth factor; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; ERK, extracellular-regulated kinase; FPR, formyl peptide receptor-1; GDP, guanylate-diphosphate; GTP, guanylate-triphosphate; GAP, GTPase-activating protein; GDI, guanine nucleotide dissociation inhibitor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; IBD, inflammatory bowel disease; IEC, intestinal epithelial cells; IL, interleukin; JAM, junctional adhesion molecule; JNK, c-jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDCK, Madine Darby canine kidney; mDia1, mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous 1; MEK, MAP/ERK kinase; MLC, myosin light chain; MLCP, myosin light chain phosphatase; mTOR, mammalian target of rapamycin; MVID, microvillous inclusion disease; N-WASP, neural Wiskott-Aldrich syndrome protein; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; Rac1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Rap1, ras-related protein 1; Ras, rat sarcoma viral oncogene homolog; RhoA, ras homolog A; ROCK1, Rho kinase 1; TcdA/B, *Clostridium difficile* toxin A/B; TJ, tight junction; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; ZO, zonula occludens

The intestinal epithelium forms a stable barrier protecting underlying tissues from pathogens in the gut lumen. This is achieved by specialized integral membrane structures such as tight and adherens junctions that connect neighboring cells and provide stabilizing links to the cytoskeleton. Junctions are constantly remodeled to respond to extracellular stimuli. Assembly and disassembly of junctions is regulated by interplay of actin remodeling, endocytotic recycling of junctional proteins, and various signaling pathways. Accumulating evidence implicate small G proteins of the Ras superfamily as important signaling molecules for the regulation of epithelial junctions. They function as molecular switches circling between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound state. Once activated, they bind different effector molecules to control cellular processes required for correct junction assembly, maintenance and remodelling. Here, we review recent advances in understanding how GTPases of the Rho, Ras, Rab and Arf families contribute to intestinal epithelial homeostasis.

Introduction

The intestinal epithelium separates intestinal tissues from the environment including the intestinal luminal microflora. It is a highly specialized cell layer characterized by tight intercellular contacts that prevent unwanted fluid leakage and penetration of pathogens.¹ Disruption of this cellular barrier can lead to diarrhea or acute colitis and is also a hallmark of chronic inflammatory disorders of the intestines such as Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC), also referred to as inflammatory bowel disease (IBD).² The stability of the epithelial barrier is ensured by transmembrane adhesion molecules organized into structures called tight junctions, adherens junctions and desmosomes (Fig. 1).^{3,4} These structures also guarantee a strict polarization of the epithelium into apical and basal compartments by blocking intramembranal diffusion of plasma membrane components. The most apically localized junction is the tight junction followed immediately by adherens junctions. Together they are referred to as the apical junctional complex (AJC).⁵ Tight junctions (TJ) are comprised of transmembrane adhesion molecules of various protein families such as the claudins, junctional adhesion molecules (JAM) or occludin that are intracellularly linked to the actin cytoskeleton via various adaptor molecules such as members of the zonula occludens (ZO) family.⁶ Adherens junctions (AJ) are comprised mainly of E-cadherin that is connected to the stabilizing circumferential actin belt via adaptor molecules of the catenin family. Moreover, nectins are components of AJ.⁷ Desmosomes are found beneath AJ, are comprised of the desmosomal cadherins desmoglein and desmocollin and connected intracellularly to the cytoskeleton intermediate filament cytoskeleton via the adaptor molecules

*Correspondence to: Michael Schnoor; Email: mschnoor@cinvestav.mx
Submitted: 09/15/2013; Revised: 10/21/2013; Accepted: 10/24/2013
Citation: Citalán-Madrid A, García-Ponce A, Vargas-Robles H, Betanzos A, Schnoor M. Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. Tissue Barriers 2013; 1:e26938; <http://dx.doi.org/10.4161/tb.26938>

The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity

Alexander García-Ponce¹; Ali Francisco Citalán-Madrid¹; Martha Velázquez-Avila¹; Hilda Vargas-Robles¹; Michael Schnoor^{1,2}

Department of Molecular Biomedicine, Center for Investigation and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav), Mexico-City, Mexico

Summary

The endothelial barrier of the vasculature is of utmost importance for separating the blood stream from underlying tissues. This barrier is formed by tight and adherens junctions (TJ and AJ) that form intercellular endothelial contacts. TJ and AJ are integral membrane structures that are connected to the actin cytoskeleton via various adaptor molecules. Consequently, the actin cytoskeleton plays a crucial role in regulating the stability of endothelial cell contacts and vascular permeability. While a circumferential cortical actin ring stabilises junctions, the formation of contractile stress fibres, e.g. under inflammatory conditions, can contribute to junction destabilisation. However, the role of actin-binding proteins (ABP) in the control of vascular permeability has long been underestimated. Naturally, ABP regulate permeability via regulation of actin remodelling but some actin-binding molecules can also act independently of actin and control vascular

permeability via various signalling mechanisms such as activation of small GTPases. Several studies have recently been published highlighting the importance of actin-binding molecules such as cortactin, ezrin/radixin/moesin, Arp2/3, VASP or WASP for the control of vascular permeability by various mechanisms. These proteins have been described to regulate vascular permeability under various pathophysiological conditions and are thus of clinical relevance as targets for the development of treatment strategies for disorders that are characterised by vascular hyperpermeability such as sepsis. This review highlights recent advances in determining the role of ABP in the control of endothelial cell contacts and vascular permeability.

Keywords

Actin cytoskeleton, cell-cell interactions, endothelial cells, GTPases, inflammation, vascular permeability

Correspondence to:

Dr. Michael Schnoor
CINVESTAV del IPN, Department for Molecular Biomedicine
Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, GAM
07360 Mexico City, Mexico
Tel.: +52 55 5747 3321, Fax: +52 55 5747 3938
E-mail: mschnoor@cinvestav.mx

Financial support:

This work was supported by a grant from the Mexican Council for Science and Technology (Conacyt, 179895 to MS).

Received: April 1, 2014

Accepted after major revision: July 1, 2014

Epub ahead of print: August 28, 2014

<http://dx.doi.org/10.1160/TH14-04-0298>

Thromb Haemost 2015; 113: 20–36

Introduction: Vascular permeability and the actin cytoskeleton

The endothelium lines the vasculature throughout the body and is an important barrier of the innate immune system that separates the blood stream from underlying tissues. The endothelium is comprised of endothelial cells that are connected via integral membrane structures called junctions (1). In the endothelium two major types of junctions are known, tight junctions (TJ) and adherens junctions (AJ), both of which are necessary to form a stable but selective semi-permeable endothelial barrier (2, 3). This barrier needs to be tightly controlled to allow passage of substances needed by the underlying tissue and to concomitantly prevent excessive leakage of fluids and substances that may harm underlying tissues. On the other hand, the endothelial barrier needs to be dynamic for example during acute inflammation to allow recruitment of leukocytes and resolution of inflammation (4, 5). Continuous dysfunction of the barrier as occurring during severe pathological conditions such as sepsis, ischaemia or diabetes can in some cases lead to acute organ failure (6, 7). Thus, a better

understanding of the molecular mechanisms controlling vascular permeability is needed for the development of novel treatment strategies that restrict endothelial hyperpermeability under these conditions.

TJ and AJ do not only form the actual endothelial barrier by mediating selective cell-cell adhesion but they also provide mechanical strength by connecting the plasma membrane and adjacent cells to the actin cytoskeleton (8). In order for the barrier to be dynamic, this mechanical strength needs to be altered by controlled actin remodelling. Actin dynamics are crucial for the regulation of endothelial barrier stability and vascular permeability (9). The best known mediators that control actin remodelling related to endothelial barrier function are small GTPases of the Rho family that are activated in response to a plethora of different stimuli (10). However, other molecules are involved in the regulation of GTPase activation cycles, actin dynamics and junctional remodelling to control vascular permeability. Among such molecules are actin-binding proteins (ABP) that help to coordinate actin remodelling (11). ABP can directly bind actin and affect actin remodelling by several modes of action e.g. actin filament polymerisation,

Research Article

Experimental Colitis Is Attenuated by Cardioprotective Diet Supplementation That Reduces Oxidative Stress, Inflammation, and Mucosal Damage

Hilda Vargas Robles,¹ Ali Francisco Citalán Madrid,¹ Alexander Garcia Ponce,¹ Angelica Silva Olivares,² Mineko Shibayama,² Abigail Betanzos,² Leonardo Del Valle Mondragón,³ Porfirio Nava,⁴ and Michael Schnoor¹

¹Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV, Avenida IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, DF, Mexico

²Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, CINVESTAV, Avenida IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, DF, Mexico

³Department of Pharmacology, National Cardiology Institute "Ignacio Chávez", 14080 Mexico City, DF, Mexico

⁴Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV, Avenida IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Michael Schnoor; mschnoor@cinvestav.mx

Received 24 October 2015; Accepted 1 December 2015

Academic Editor: Noriko Noguchi

Copyright © 2016 Hilda Vargas Robles et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are multifactorial, relapsing disorders of the gastrointestinal tract. However, the etiology is still poorly understood but involves altered immune responses, epithelial dysfunction, environmental factors, and nutrition. Recently, we have shown that the diet supplement corabion has cardioprotective effects due to reduction of oxidative stress and inflammation. Since oxidative stress and inflammation are also prominent risk factors in IBD, we speculated that corabion also has beneficial effects on experimental colitis. Colitis was induced in male mice by administration of 3.5% (w/v) dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water for a period of 3 or 7 days with or without daily gavage feeding of corabion consisting of vitamin C, vitamin E, L-arginine, and eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. We found that corabion administration attenuated DSS-induced colon shortening, tissue damage, and disease activity index during the onset of colitis. Mechanistically, these effects could be explained by reduced neutrophil recruitment, oxidative stress, production of proinflammatory cytokines, and internalization of the junctional proteins ZO-1 and E-cadherin leading to less edema formation. Thus, corabion may be a useful diet supplement for the management of chronic inflammatory intestinal disorders such as IBD.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) encompasses two idiopathic chronic inflammatory conditions: ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) both of which are characterized by recurrent episodes of cramping, lower abdominal pain, diarrhea, bloody stools, weight loss, and chronic inflammatory changes of the mucosal tissue resulting in scarring and fibrosis [1]. The pathophysiology of IBD is still poorly understood but it clearly is multifactorial including genetic, nutritional, environmental, and immunological risk

factors [2, 3]. Malnutrition is a common complication during acute relapses since nutrient absorption from the gastrointestinal tract is severely disturbed especially in CD [4]. Nutritional factors influence the initial vulnerability to the development of colitis [5] as well as the duration of disease remission [2, 5]. However, human studies investigating certain diets in IBD patients gave contradictory results. In general, high sugar consumption had detrimental effects while grain and vegetable consumption had rather beneficial effects [6, 7]. In animal models of experimental colitis, certain nutrient supplementations alleviated disease symptoms [8].

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Loss of cortactin causes endothelial barrier dysfunction via disturbed adrenomedullin secretion and actomyosin contractility

Received: 16 November 2015
Accepted: 13 June 2016
Published: 30 June 2016

Alexander García Ponce¹, Ali F. Citalán Madrid¹, Hilda Vargas Robles¹, Sandra Chánez Paredes¹, Porfirio Nava², Abigail Betanzos³, Alexander Zarbock⁴, Klemens Rottner^{5,6}, Dietmar Vestweber⁷ & Michael Schnoor¹

Changes in vascular permeability occur during inflammation and the actin cytoskeleton plays a crucial role in regulating endothelial cell contacts and permeability. We demonstrated recently that the actin-binding protein cortactin regulates vascular permeability via Rap1. However, it is unknown if the actin cytoskeleton contributes to increased vascular permeability without cortactin. As we consistently observed more actin fibres in cortactin-depleted endothelial cells, we hypothesised that cortactin depletion results in increased stress fibre contractility and endothelial barrier destabilisation. Analysing the contractile machinery, we found increased ROCK1 protein levels in cortactin-depleted endothelium. Concomitantly, myosin light chain phosphorylation was increased while cofilin, mDia and ERM were unaffected. Secretion of the barrier-stabilising hormone adrenomedullin, which activates Rap1 and counteracts actomyosin contractility, was reduced in plasma from cortactin-deficient mice and in supernatants of cortactin-depleted endothelium. Importantly, adrenomedullin administration and ROCK1 inhibition reduced actomyosin contractility and rescued the effect on permeability provoked by cortactin deficiency *in vitro* and *in vivo*. Our data suggest a new role for cortactin in controlling actomyosin contractility with consequences for endothelial barrier integrity.

Endothelial cells provide a selective barrier within the vasculature to separate the blood from tissues. During inflammation, pro-inflammatory cytokines activate endothelial cells by induction of adhesion molecule expression and loosening of integral membrane structures called tight and adherens junctions that form the inter-endothelial cell contacts. Such activation leads to leukocyte transmigration and leakage of blood components into tissues^{1–3}. The maintenance of the endothelium as a semi-permeable barrier is particularly important for the passage of macromolecules and fluid between the blood and interstitial space. If not controlled properly, excessive leakage may result in tissue inflammation and inflammatory diseases such as acute respiratory distress syndrome, arthritis or sepsis^{4,5}.

An important mechanism that regulates endothelial junctions and thus vascular permeability is the remodeling of the actin cytoskeleton into either a stabilising cortical actin ring or destabilising contractile stress fibres. Actin is one of the most abundant and highly conserved proteins in mammalian cells⁶. Under physiological conditions, actin exists as globular actin which assembles into organized filaments that, together with microtubules, intermediate filaments and septins, constitute the cytoskeleton. Actin filaments support many cellular functions such as movement of organelles, adhesion, migration, endocytosis and formation of lamellipodia and filopodia

¹Department for Molecular Biomedicine, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), 07360 Mexico-City, Mexico. ²Department for Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), 07360 Mexico-City, Mexico. ³Department for Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), 07360 Mexico-City, Mexico. ⁴Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Clinic of Münster, 48149 Münster, Germany. ⁵Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute, TU Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany. ⁶Department of Cell Biology, Helmholtz Centre for Infection Research, 38124 Braunschweig, Germany. ⁷Department for Vascular Cell Biology, Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, 48149 Münster, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.S. (email: mschnoor@cinvestav.mx)

ANEXO 2

Artículo enviado a la revista Mucosal Immunology

Decision Letter (MI-16-136)

From: william.agace@med.lu.se

To: mschnoor@cinvestav.mx

CC:

Subject: Mucosal Immunology - Decision on Manuscript ID MI-16-136

Body: 07-Jul-2016

Dear Dr. Schnoor:

Manuscript ID MI-16-136 entitled "Cortactin deficiency causes increased ROCK1-dependent actomyosin contractility, intestinal epithelial barrier dysfunction and disproportionately severe DSS-induced colitis" which you submitted to Mucosal Immunology, has been reviewed.

A number of major issues were identified that will need to be fully addressed before your manuscript can be reconsidered for publication. Your revised manuscript will, of course, be sent out for full peer review. There is no guarantee that your manuscript will be accepted for publication.

To revise your manuscript, log into <https://mc.manuscriptcentral.com/mi> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text. Please refer to the attached Revised Manuscript Checklist to ensure your manuscript is formatted correctly. This will avoid a delay in publication once your article is accepted for publication.

Color artwork is free only in the online version of the Journal. If your paper contains color artwork, please download and complete the attached Color Authorization Form. This form must also be faxed at the same time as your License to Publish form to the attention of NPG Mucosal Immunology also at (+1) 508-276-0594 as soon as possible. For members of the SMI, you must complete and return the color forms along with indication of SMI membership, otherwise this will result in you being charged non-member rates.

Mucosal Immunology and Nature Publishing Group (NPG) are pleased to offer authors of commissioned content the opportunity to have figures in their invited articles redrawn by NPG illustrators. Upon receipt of an initial decision to accept your manuscript with or without further revisions, please contact the Mucosal immunology Editorial office at mi@nature.com to take advantage of this gratis service. If you decide to have your figures redrawn, you will work directly with the NPG illustrators. Once you are in receipt of the finalized figures, you will need to upload them together with your final revised text to our on-line submission management system, ScholarOne.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Mucosal Immunology, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to the Mucosal Immunology and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. William Agace
Editor, Mucosal Immunology
william.agace@med.lu.se

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

Associate Editor

Comments to the Author:

The points raised by the reviewers should be very carefully considered. The manuscript can only be accepted if the authors reply with the appropriate changes made.

Reviewer: 1

Comments to the Author

This is an interesting study aimed at understanding the roles of actin cytoskeleton in regulating intestinal epithelial junctions and gut barrier under normal conditions and during mucosal inflammation. The authors focus on a key actin-binding protein, cortactin, and investigated the effects of cortactin deficiency *in vitro* and *in vivo*. Overall, this is a well-designed and carefully executed study that yields novel, interesting and unexpected data. The described effects are robust and consistent. However, the present manuscript has some problems with data analysis and presentation that should be addressed in order to increase general impact of this study.

Comments:

1. The authors report that cortactin deficiency results in multiple changes in expression of AJ/TJ proteins and cytoskeletal regulators (ROCK). Although the presented immunoblotting images are pretty convincing, it is important to perform their densitometry and statistical analysis. Bar graphs with such analysis should be added to Figs. 1, 4 and 5.
2. Figure 2B. Please modify the picture with body weight loss. Break the OY axis to expand the visibility of the effects.
3. Figure 2D, E. The presented histology images are difficult to view and interpret. First, I would recommend moving the low-magnification 'swiss roles' to supplemental data and to show bigger images of selected areas and even higher magnification inserts that would better illustrate the described effects of cortactin deletion in normal and inflamed intestinal mucosa. Finally, the authors should analyze/quantify tissue injury at H&E images and present the Tissue Injury Index.
4. Given dramatic alteration in the actin cytoskeleton in cortactin-depleted Caco2 cells, it would be important to show architecture of the perijunctional actin cytoskeleton in intestinal mucosa of control and cortactin-deficient animals.
5. Figure 5A. Since this Figure shows an important conversion of perijunctional F-actin bundles into stress fibers in cortactin-deficient Caco-2 cells, special care should be taken to ensure that the presented images demonstrate the same areas in control and cortactin depleted cells. The best way would be to show colocalization of F-actin with ZO-1 in both cell types.
6. Effects of cortactin depletion on proliferation of Caco2 cell monolayers should be included in the results section.
7. Since upregulation of ROCK expression represents a non-canonical effect of cortactin depletion, this effect should be emphasized and properly discussed. Are there any data on the roles of cortactin in regulating intracellular signaling/gene expression?
8. The reported changes in crypt size in cortactin-deficient mice is interesting, but this cannot be interpreted as altered cell polarity.
9. Are there any *in vivo* data regarding the effects of Rho-ROCK signaling on the structure and permeability of the intestinal barrier *in vivo*?

Reviewer: 2

Comments to the Author:

This study investigates the impact of cortactin deficiency on intestinal epithelial barrier assembly and function. The integrity and dynamics of apical tight and adherens junctions in intestinal epithelia are highly dependent on the associated actin cytoskeleton and actin-binding proteins. The authors provide compelling and functionally significant evidence that cortactin deficiency results in increased actomyosin contractility, increased barrier permeability and heightened susceptibility to experimental DSS colitis in a murine model. Moreover, cortactin expression and localization is altered in tissue from IBD patients, highlighting the clinical relevance of these findings. Overall, this is a very well written and comprehensive study that defines an important advance in our understanding of actin cytoskeleton dynamics at mucosal apical junctions in health and disease.

1. In the DSS model of colitis, the authors contend that (page 11) that there is an "absence of a significant mucosal immune response in the colon likely due to reduced leukocyte extravasation in the absence of cortactin". However they do not provide any quantification or profiling of immune infiltrate in WT and KO mice subjected to colitis, other than one representative H&E image. Quantification of immune cells by immunohistochemistry or profiling by flow cytometry analysis needs to be included to support this statement.

El papel de cortactina en la homeostasis del epitelio intestinal

2. Related to point 1, the neutrophil transmigration data outlined in Fig. 6 appears to be at odds with the authors' argument for reduced leukocyte extravasation and decreased immune cell recruitment.
3. Ki67 staining in Fig. 1F nicely demonstrates increased proliferative populations in 'healthy' cortactin-KO colonic crypts. Have the authors analyzed Ki67 staining patterns in DSS-treated mice? It would be interesting to know if this pro-proliferative phenotype extends to stressed colitic mucosa with cortactin deficiency.
4. Given the marked effect of cortactin knockdown/knockout on ROCK1 expression and MLC phosphorylation, have the authors considered profiling RhoA activity?
5. The authors mention that Caco-2 cortactin knockdown cells grow faster and lose contact inhibition (overgrow as a monolayer). What is the increased rate of proliferation relative to shRNA controls? Do they reach establish confluence significantly sooner? It might be prudent to include this interesting observation, even as supplementary data.
6. The cortactin-KO goblet cell hyperplasia and mucus deposition described in Fig 2E is particularly intriguing, and appears in striking contrast to the WT DSS colonic sections. While I agree that analysis of the mucin profile of these animals should be the subject of independent study, the authors might consider more accurately quantifying this phenotype in multiple tissue sections. Is this altered goblet cell phenotype also observed at baseline in these mice? Considering the increased basal epithelial permeability, augmented mucus production may be a candidate compensatory mechanism for barrier protection and exclusion of commensal bacteria in unchallenged cortactin KO mice.
7. On a similar note, is there anything known about the gut microbial profile of cortactin knockout mice?

Date Sent: 07-Jul-2016

Mucosal Immunology

Mucosal Immunology



Cortactin deficiency causes increased ROCK1-dependent actomyosin contractility, intestinal epithelial barrier dysfunction and disproportionately severe DSS-induced colitis

Journal:	<i>Mucosal Immunology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Citalán-Madrid, Ali; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Molecular Biomedicine Vargas-Robles, Hilda; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Molecular Biomedicine García Ponce, Alexander; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Molecular Biomedicine Shibayama, Mineko; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Infectomics and Molecular Pathogenesis Betanzos, Abigail; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Infectomics and Molecular Pathogenesis Nava-Domínguez, Porfirio; Instituto Politécnico Nacional, Fisiología Biofísica y Neurociencias Salinas-Lara, Citlaltepeltl; Faculty of Superior Studies Iztacala, UNAM, Department of Histology and Pathology Rottner, Klemens; Technische Universität Carolo Wilhelmina Zu Braunschweig Institut für Psychologie, Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute Mennigen, Rudolf; University Clinic of Münster, Clinic for General and Visceral Surgery Schnoor, Michael; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Molecular Biomedicine
Keyword:	Actin cytoskeleton, epithelial junctions, inflammatory bowel diseases, proliferation, cortactin
Please identify up to three subject search terms that best define your manuscript.:	Gastrointestinal tract < Tissues, Epithelial cells < Cells, Autoimmune/Inflammatory < Disease

SCHOLARONE[®]
 Manuscripts

Nature Publishing Group

For Peer Review

Cortactin deficiency causes increased ROCK1-dependent actomyosin contractility, intestinal epithelial barrier dysfunction and disproportionately severe DSS-induced colitis

Ali F. Citalán-Madrid,¹ Hilda Vargas-Robles,¹ Alexander Garcia-Ponce,¹ Mineko Shibayama,² Abigail Betanzos,² Porfirio Nava,³ Citlaltepelt Salinas-Lara,⁴ Klemens Rottner,^{5,6} Rudolf Mennigen⁷ & Michael Schnoor^{1,8}

¹Department of Molecular Biomedicine, ²Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis and ³Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, 07360 Mexico-City, Mexico; ⁴Department of Histology and Pathology, Faculty of Superior Studies Iztacala, UNAM, 54090 Mexico-City, Mexico; ⁵Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute, TU Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany; ⁶Department of Cell Biology, Helmholtz Centre for Infection Research, 38124 Braunschweig, Germany; ⁷Clinic for General and Visceral Surgery, University Clinic of Münster, 48149 Münster, Germany

Correspondence:

mschnoor@cinvestav.mx

Dr. Michael Schnoor

Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV-IPN

Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco

07360 Mexico DF, Mexico

Phone: +52 55 5747 3321

Fax: +52 55 5747 3938

Running head

Intestinal barrier integrity depends on cortactin

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Abstract

The intestinal epithelium constitutes a first line of defense of the innate immune system. Epithelial dysfunction is a hallmark of intestinal disorders such as inflammatory bowel diseases (IBD). The actin cytoskeleton controls epithelial barrier integrity but the function of actin regulators such as cortactin is poorly understood. Given that cortactin controls endothelial permeability, we hypothesized that cortactin is also important for epithelial barrier regulation. We found increased permeability in the colon of cortactin-KO mice under basal conditions that was accompanied by reduced protein levels of ZO-1, claudin-1 and E-cadherin. By contrast, the leaky claudin-2 was upregulated. Absence of cortactin led to increased ROCK1-dependent actomyosin contractility, and inhibition of ROCK1 rescued the barrier defect. Interestingly, cortactin deficiency caused increased epithelial proliferation without affecting apoptosis. KO mice did not develop spontaneous colitis, but were much more susceptible to DSS colitis and showed severe colon tissue damage, and edema formation. In healthy human colon tissues, cortactin co-localized with ZO-1 at epithelial cell contacts. In IBD patients, we observed decreased cortactin protein levels and loss of co-localization with ZO-1. Thus, cortactin is a master regulator of intestinal epithelial barrier integrity *in vivo* and could serve as suitable target for pharmacological intervention in IBD.

Introduction

The integrity of the epithelial monolayer is critical for healthy intestines. This monolayer constitutes a semi-permeable barrier that is tightly regulated to allow absorption of nutrients and water and at the same time restrict excessive leakage of macromolecules and invasion of bacteria from the gut lumen. Increased epithelial permeability is a characteristic of chronic inflammatory disorders such as inflammatory bowel diseases (IBD).¹ Epithelial permeability is mostly controlled by tight junctions (TJ),² whereas stable cell-cell adhesion depends on adherens junctions (AJ).³ Together, AJ and TJ form the apical junctional complex (AJC) that controls epithelial barrier integrity.⁴ These junctional structures are composed of transmembrane adhesion receptors that are intracellularly linked to the actin cytoskeleton via adaptor molecules such as zonula occludens (ZO) and catenins.^{5,6} It is commonly accepted that proper AJC functions and thus epithelial barrier integrity in health and disease is strongly dependent on actin dynamics.^{4,7} The connection of AJ and TJ is further regulated by several actin-binding molecules including cortactin.⁸

Cortactin is a multi-domain protein capable of directly binding actin filaments, other actin regulators such as the Arp2/3 complex and adaptor molecules including ZO-1.⁹ Several studies highlighted the importance of cortactin for epithelial junction stability *in vitro*. For example, cortactin is recruited to epithelial cell contacts upon homophilic E-cadherin engagement where it coordinates AJ formation and Arp2/3- and WAVE2-dependent actin remodeling.^{10,11} Cortactin also interacts and colocalizes with p120-catenin at cell-cell contacts.¹² Moreover, cortactin directly binds to ZO-1 at TJ.¹³ However, despite reports describing a decrease in epithelial junction integrity *in vitro* after downregulation of cortactin, it remains unexplored whether cortactin deficiency affects intestinal epithelial barrier functions *in vivo*. This is especially important given the fact that not all observed effects on actin dynamics after cortactin downregulation in cell lines could be reproduced in primary cortactin-deficient cells.¹⁴ Another open question is whether cortactin expression and

localization is affected in IBD patients.

Here, we addressed the physiological relevance of cortactin in the colon. We demonstrate that cortactin deficiency causes increased ROCK1-dependent actomyosin contractility and altered molecular composition of AJ and TJ leading to increased permeability. This barrier defect was not sufficient to induce spontaneous colitis but strongly aggravated experimental colitis in cortactin-KO mice. Furthermore, in human colon tissue biopsies of individuals suffering from IBD, we observed decreased levels of cortactin and loss of colocalization with ZO-1 at cell contacts.

For Peer Review

Results

Loss of cortactin leads to increased intestinal permeability, altered composition of junctions and increased proliferation

Epithelial dysfunction contributes to relapsing intestinal inflammation during IBD. For example, junctional adhesion molecule-A (JAM-A) deficiency causes enhanced colonic inflammation and permeability in mice.¹⁵ On the other hand, it is known that correct actin cytoskeleton dynamics are a prerequisite for epithelial barrier integrity. However, the functions of actin regulators such as cortactin in the colon are not well studied. In a previous study, we demonstrated that cortactin deficiency caused increased endothelial permeability.¹⁶ Thus, we hypothesized that loss of cortactin also leads to increased intestinal epithelial permeability. This was indeed the case as permeability in the colon increased by 24.8±3.7% under basal conditions (Fig. 1A). However, KO mice do not appear sick by visual inspection suggesting that hitherto unknown compensatory mechanisms may exist. Permeability is controlled by junctional adhesion molecules that are connected by adaptor molecules to the actin cytoskeleton.¹⁷ Thus, we analyzed whether the absence of cortactin would affect the expression or localization of junction molecules. As shown in figure 1B, there is a significant decrease in the expression of the TJ proteins ZO-1 and claudin-1. By contrast, the expression of the pore-forming claudin-2 increased significantly in cortactin-KO colons. E-cadherin levels were slightly decreased without cortactin, whereas β -catenin was not affected. Immunofluorescence studies confirmed that levels of ZO-1 and claudin-1 were decreased at cell contacts while claudin-2 was increased (Fig. 1C). These findings imply that cortactin contributes to the maintenance of junction architecture and thus a stable barrier *in vivo*. We also consistently observed that epithelial crypts seemed less densely packed as manifested by an increase in the distance between epithelial nuclei (Fig. 1D, left panel). Quantification demonstrated that the distance from the center of one nucleus to the center of the nucleus of the neighboring cell significantly increased from 6.48±0.79 μ m in WT crypts to 9.98±1.27

μm in cortactin KO crypts (Fig. 1D, right panel). However, the average number of cells that constitute a crypt was not significantly changed (data not shown) suggesting that cortactin KO crypt epithelial cells lose polarity and are wider than WT cells.

A correct balance between proliferation and apoptosis also contributes to a stable intestinal epithelial barrier. Interestingly, we detected increased phosphorylation of histone-H3 (Fig. 1E), and increased expression of KI67 in epithelial cells along the crypt axes which is in WT colons restricted to the crypt base (Fig. 1F) suggesting that cortactin deficiency triggers epithelial proliferation. PARP and caspase-3 were not cleaved in both WT and KO colons (Fig. 1E). Thus, apoptosis does not contribute to barrier destabilization without cortactin.

Cortactin deficiency aggravates experimental colitis

Given the observed barrier dysfunction in basal conditions, we speculated that cortactin deficiency might render mice more susceptible to experimental colitis. Indeed, treatment with 3.5% dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water, a concentration tolerated by our WT littermate control mice over the usual experimental period of seven days, induced such a severe colitis in cortactin KO animals that they had to be sacrificed on day 5. Figure 2 A shows that the disease activity index of KO animals with DSS was significantly higher over the entire course of the experiment starting on day one. Visible fecal bleeding in KO mice also started as early as one day after starting the treatment. Interestingly, untreated KO mice did not show any clinical signs of colitis supporting the notion that protective mechanisms are in place that prevent development of spontaneous colitis albeit increased permeability. Weight loss was significantly higher in treated KO mice already starting on day three (Fig. 2B). Both WT and KO colons were significantly shorter after five days of DSS treatment compared to untreated controls but this shortening was not further increased by cortactin deficiency (Fig. 2C). Histologic analysis of colon "swiss rolls" (Fig. 2D) and magnifications of distal colon areas of the respective "swiss rolls" (Fig. 2E) showed signs of edema formation in KO mice

even without treatment, thus corroborating the observed increased permeability (Fig. 1A). KO animals treated with DSS showed severe edema formation, recruitment of mononuclear cells and eosinophils, ulcerations and an overall loss of tissue architecture. Tissue alterations were much more pronounced in KO animals likely explaining why these animals die earlier as their littermate controls.

Cortactin-depleted Caco-2 cells also show barrier dysfunction under basal conditions

In order to analyze the mechanisms causing barrier dysfunction in the absence of cortactin, we generated stable cortactin-depleted Caco-2 cells using shRNA-expressing lentiviruses (Fig. 3A). We achieved a maximal knock-down efficiency of $84.3 \pm 8.7\%$ (Fig. 3B). First, we proved that these cells are an appropriate model resembling the observed *in vivo* effects. As expected, development of transepithelial electrical resistance (TER) was significantly lower in cortactin-depleted cells (Fig. 3C), while paracellular flux of 4kDa FITC-dextran was significantly higher without cortactin (Fig. 3D).

Cortactin depletion leads to altered junction architecture and increased proliferation

Similar to what we observed *in vivo*, we also detected reduced levels of the TJ proteins ZO-1, occludin and claudin-1, while the leaky claudin-2 was strongly increased without cortactin (Fig. 4A). E-cadherin levels were significantly reduced (quantifications not shown), whereas claudin-4 and β -catenin levels remained unaltered (Fig. 4A). Immunofluorescence stainings confirmed the Western blot data and showed reduction of ZO-1, occludin and E-cadherin to varying extents, without alterations in β -catenin levels (Fig 4B).

Apoptosis was not induced in the absence of cortactin as indicated by absence of PARP and caspase-3 cleavage (Fig. 4C), but we again observed higher phosphorylation levels of histone-H3 pointing to increased proliferation (Fig. 4C), which is consistent with our observation that cortactin-depleted Caco-2 cells grow faster in culture and tend to overgrow once a monolayer

is established (data not shown). Thus, cortactin-depleted Caco-2 cells are an appropriate model resembling the molecular changes observed in cortactin KO mice.

Absence of cortactin favors ROCK1-dependent stress fiber formation

Interestingly, we consistently observed many more actin fibers crossing cortactin-depleted cells (Fig. 5A) suggesting that increased actomyosin contractility may contribute to the destabilization of interepithelial junctions.⁴ Analyzing the G-actin to F-actin ratio in colons, we indeed found increased levels of F-actin in cortactin KO mice compared to WT littermates that was accompanied by a reduction in G-actin while the total actin concentration was unaffected (Fig. 5B). Given this increase in filamentous actin, we investigated molecules involved in the regulation of actomyosin contractility. We found increased levels of ROCK1 protein that was accompanied by increased phosphorylation of myosin light chain (MLC) (Fig. 5C). Importantly, ROCK1 expression and MLC phosphorylation were also increased in cortactin-KO colons, whereas MLCK and total MLC levels remained unchanged (Fig. 5D), showing that ROCK1-dependent increased actomyosin contractility also occurs *in vivo*. Importantly, treating cortactin-depleted Caco-2 cells with the ROCK1 inhibitor Y27236 rescued the observed defect in TER development in the absence of cortactin over the entire course of the experiment (Fig. 5E). We also blotted for activation of Erk1/2 as it is known to be involved in cortactin-mediated signaling,¹⁸ however, we did not detect Erk1/2 activation in cortactin-depleted Caco-2 cells (Fig. 5C).

Neutrophils transmigrate faster across cortactin-depleted Caco-2 monolayers

Excessive neutrophil recruitment is another hallmark of IBD.¹⁹ To analyze if neutrophils could exploit the weakened epithelial barrier in the absence of cortactin and transmigrate more easily, we performed inverted transwell filter transmigration experiments. Neutrophil transmigration across a cortactin-depleted Caco-2 monolayer occurred more rapidly with most

of the neutrophils having crossed the monolayer after 60 and 90 min (Fig. 6) suggesting that a cortactin-depleted epithelial monolayer is indeed more permissive for leukocyte transmigration. However, after 2 h, the final number of transmigrated cells was no longer significantly different.

Cortactin is reduced in colon tissues from IBD patients and co-localization with ZO-1 is lost

Finally, we wanted to unravel a potential role for cortactin in the pathogenesis of IBD. To this end, we analyzed cortactin expression and localization in colon tissue resections of consenting individuals suffering from CD or UC and healthy controls. In healthy tissues, we detected a prominent localization of cortactin at cell-cell contacts of crypt epithelium in partial co-localization with the TJ protein ZO-1 (Fig. 7A, left image). In both CD (Fig. 7A, middle) and UC (Fig. 7A, right) colon tissues, this co-localization was lost and cortactin accumulated in the cytosol. These localization patterns for both cortactin and ZO-1 were scored for CD (Fig. 7B) and UC (Fig. 7C) tissue samples as described in Materials and Methods. While 100 % of healthy control samples had cortactin localization primarily in the cell periphery at intercellular contacts, the pattern shifted towards more cytosolic location of both ZO-1 and cortactin with the latter losing its cell contact location almost completely. We also analyzed human tissue lysates by Western blot and found reduced cortactin protein levels in both CD and UC (Fig. 7D). Cortactin levels varied among samples as shown in three representative samples in the blot, but quantification of eight independent samples revealed that the reduction of cortactin levels were statistically significant (Fig. 7E) implicating that aberrant cortactin expression and localization may play an important role during IBD.

Discussion

The actin cytoskeleton controls the stability of the intestinal epithelial barrier by supporting the assembly and function of epithelial junctions. Cortical actin filaments connected to junctional proteins are dynamic structures in constant turnover depending on the challenges the barrier faces.³⁰ Several ABP play important roles in actin cytoskeleton remodeling by controlling filament severing and polymerization thus contributing to junctional integrity.⁸ Until recently, very little was known about the physiological functions of ABP in different tissues. The generation of KO mouse models for various ABP is now starting to fill this gap of knowledge. Our study provides the first *in vivo* evidence that the ABP cortactin is a master regulator of the intestinal epithelial barrier under basal and inflammatory conditions.

We found that cortactin deficiency increased expression of ROCK1, phosphorylation of MLC and actomyosin contractility thus causing altered molecular composition of epithelial junctions and increased intestinal epithelial permeability. The increased pulling forces generated by the abundant stress fibers in cortactin-deficient intestinal epithelial cells can certainly contribute to the observed junction disassembly.^{21, 22} Destabilization of the intestinal epithelial junctions is further enhanced during DSS colitis in cortactin KO mice leading to an excessive exposure to luminal bacteria and as a consequence to the exaggerated severity of the disease. Such phenomenon has also been observed in mice deficient for other ABP such as non-muscle myosin IIA (NMIIA). Mice deficient for NMIIA in the intestinal epithelium also show signs of barrier dysfunction and inflammation under basal conditions but do not develop spontaneous colitis.²³ By contrast, ADF-KO mice did not show signs of mucosal inflammation.²⁴ However, similar to cortactin KO mice, both ADF and NMIIA KO develop a much stronger DSS-induced colitis suggesting that ABP play a general role in protecting from barrier disruption during colitis. The exact molecular mechanisms of the protective effects of these ABP remain to be examined but likely involve actin-dependent preservation of barrier integrity since inhibition of ROCK1 and thus contractility rescued the permeability increase in

cortactin-depleted Caco-2 cells. Interestingly, inhibition of ROCK1 resulted in faster development of TER in both WT and cortactin-depleted cells suggesting that ROCK1 is a main regulator of epithelial barrier development independently of the presence of cortactin. MLC phosphorylation also occurs in response to proinflammatory cytokine-mediated MLCK activation and has also been observed in IBD patients.²¹ Although MLC phosphorylation in the absence of cortactin is rather dependent on ROCK1, our data confirm that increased actomyosin contractility contributes to epithelial barrier dysfunction. As mentioned, this phenotype is not sufficient to induce spontaneous colitis, but aggravates DSS colitis. In addition to the described ABP KO mice, this effect has also been observed in transgenic mice overexpressing constitutively active MLCK in intestinal epithelia.²⁵ However, in this mouse model, barrier dysfunction was related to mucosal immune activation rather than altered junction architecture. Given the absence of a significant mucosal immune response in the colon that is likely due to the known reduced leukocyte extravasation in the absence of cortactin,¹⁶ cortactin-KO mice thus provide a new model system to study the role of barrier defects for the pathogenesis and progression of experimental colitis without excessive immune activation. It remains unclear why these animals do not get ill despite increased permeability but this is in agreement with observations made in first-degree relatives of IBD patients that do not develop the disease despite enhanced permeability.^{26, 27} Possibilities include, for instance, a differential mucin production pattern as mucin4 deficiency has recently been shown to provide resistance to experimental colitis.²⁸ This is of particular importance since KO mice respond to DSS treatment with strongly increased mucus deposition (Fig. 2E). Thus, it will be interesting to analyze the mucin profile in cortactin-KO mice.

We also observed changes in the crypt morphology in the absence of cortactin (Fig. 1D). As a consequence of increased distances between nuclei without alterations in cell numbers, the crypt lumens appeared bigger in cortactin-deficient colons. Reductions in cell density and

contact stability within an epithelial monolayer are known to decrease contact inhibition and as a consequence can induce proliferation.^{29, 30} This supports the idea that decreased cell contact stability in the absence of cortactin increases intestinal epithelial cell proliferation *in vivo*. This is also in line with the observed reduction in E-cadherin (Fig. 1B) since E-cadherin levels fine-tune contact-dependent inhibition of proliferation.³¹ Increased proliferation could also be a mechanism of counteracting the observed barrier dysfunction as increased proliferation can contribute to a regenerative phenotype in the intestinal mucosa.¹⁵

Barrier dysfunction can be exploited by immune cells. *In vitro* transmigration assays showed that neutrophils transmigrated faster across cortactin-depleted Caco-2 monolayers (Fig. 6). This is in contrast to transendothelial migration that is strongly reduced without cortactin due to failure of ICAM-1 clustering.^{36, 32} In epithelial cells where the direction of transepithelial migration of neutrophils is from the basal to the apical side, the initiation of transmigration is not dependent on ICAM-1 but instead on other yet to be identified receptors that may not rely on cortactin to cluster around adhering leukocytes. ICAM-1 has been shown to regulate leukocyte-epithelial interactions after transmigration on the apical side.³³ It is tempting to speculate that, in addition to easier passage across junctions, cortactin-deficiency prevents this ICAM-1-dependent adhesive step so that neutrophils are released more rapidly. By contrast, even though cell contacts are destabilized in cortactin KO mice, we did not observe significant leukocyte recruitment as for example in JAM-A-deficient mice.¹⁵ This is likely due to reduced availability in mucosal tissue because leukocyte extravasation is reduced in cortactin-deficient mice.¹⁶ However, those immune cells that reach the mucosa could eventually cross the epithelium more easily towards the crypt lumen.

Finally, IBD patients showed reduced cortactin protein levels in the intestinal epithelium. Furthermore, the co-localization of cortactin with ZO-1 in healthy tissues was mostly lost in tissues from IBD patients. These alterations in cortactin expression and localization could certainly contribute to barrier dysfunction in these patients. However, whether this is a cause

or a consequence of the disease needs to be carefully investigated. Since barrier stability is a prerequisite for healthy intestines, differences in cortactin expression and localization may be a novel risk factor for IBD. We are not aware of any known cortactin mutations associated with IBD but this will also be interesting to analyze in the future.

In conclusion, our data establish cortactin as a critical regulator of intestinal epithelial barrier functions *in vivo* under basal and inflammatory conditions. Manipulating cortactin-dependent functions may therefore be an attractive new approach for the treatment of IBD.

For Peer Review

Materials and Methods

Antibodies and reagents

4 kDa FITC-dextran and the ROCK inhibitor Y27638 were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico). The following antibodies have been used: monoclonal anti-cortactin (clone 4F11, 1:3000, Millipore, Naucalpan, Mexico); anti- γ -tubulin (clone GTU-88, 1:5000) (Sigma-Aldrich); polyclonal antibodies against ROCK1, MLC, pMLC, ERK, pERK, KI67 and PARP (Cell Signaling, Danvers, MA); polyclonal antibodies against E-cadherin, β -catenin, caspase-3, KI67, p-histone-H3 and species-specific peroxidase-labelled secondary antibodies (1:5000, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA); polyclonal antibodies against claudins-1, -2, and-4, ZO-1, occludin and species-specific Alexa-labelled secondary antibodies (1:2000) and Alexa-568-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Cell culture

The human IEC line Caco-2 was obtained from ATCC (Manassas, VA) and cultured according to the provided protocols. Generation of a stable cortactin-depleted Caco-2 cell line was performed using the trans-lentiviral packaging kit (Thermo Scientific, Waltham, MA) and the pLKO.1 plasmid (Addgene, Cambridge, MA) according to the manufacturer's instructions. The following sequences have been used: scrambled: CCGAGAAGTGGAGAAGCATAAC; cortactin1: CACCAGGAGCATATCAACATA and cortactin2: AAGCTGAGGGAGAATGTCTTT. Cortactin1 shRNA displayed better downregulation efficiencies of 80-90% and has therefore been used in functional experiments.

Western blotting

Equal protein amounts of cell or tissue lysates were separated by SDS-PAGE and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Biorad, Mexico-City, Mexico). After blocking unspecific binding sites in TBS containing either 5% skim milk or 2% BSA (in case

of blots for phosphorylated proteins) for 1 h, membranes were incubated in primary antibodies at 4°C overnight, washed three times in TBS containing 0.05% Tween-20 for 10 min each and incubated with species-specific peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h. Chemiluminescence signals were recorded using a ChemiDoc imaging device (Biorad). Tubulin blots were performed as loading controls. Pixel intensities of resulting bands were quantified using ImageJ (NIH).

Transepithelial resistance (TER) and paracellular flux

Transduced Caco-2 cells were plated on 0.4 µm pore size transwell filters (Costar) and grown for 48 h. TER of epithelial monolayers was then measured every 24 h using an EVOMX electrovoltmeter with an STX2 electrode (World Precision Instruments, Sarasota, FL). When cells reached a plateau in TER, monolayers were washed three times with HBSS buffer before 10 µl of tracer solution containing 10 µg µl FITC-dextran (MW=4 kDa, Sigma-Aldrich) in PBS were added to the apical side of monolayers. After 24 and 48 h of incubation at 37°C, media from the bottom chambers were collected and analyzed fluorometrically (excitation wavelength = 492 nm and emission wavelength = 520 nm).

Neutrophil transepithelial migration

Neutrophil transmigration experiments were performed on 5-µm pore transwell filters (Corning) coated with Attachment factor (Invitrogen) as previously described³⁴. Briefly, human PMNs were isolated from blood of healthy consenting volunteers using Histopaque (Sigma). 1×10^6 cells were added to the upper reservoir and allowed to transmigrate across inverted Caco-2 monolayers (to assure the physiologically relevant direction of transmigration) towards a gradient of 10^{-7} M fMLP for 2 h at 37°C. Transmigrated neutrophils were quantified by assaying for myeloperoxidase as described before³⁴. Transmigration is expressed as percentage of total applied PMNs per filter.

Mice and DSS colitis

The Institutional Animal Care and Use Committee of Cinvestav approved all mouse experiments. Colitis was induced by 3.5% DSS (40-50 kDa, Affymetrix) in drinking water in cortactin-deficient¹⁶ or WT littermate control male mice on a C57Bl/6J background within a weight range of 21-25 g. In all experiments, animals received food and water *ad libitum* over a period of 5 days. The disease activity index (DAI) consisting of weight loss, stool consistency and perianal bleeding was determined daily as described³³. After sacrificing the animals by cervical dislocation, colons were removed, its length recorded and then used in further experiments.

Histology

Paraffin cross sections or "swiss rolls" of colon tissues were stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols. Stained "swiss rolls" were scanned using an Aperio CS2 digital pathology whole image scanner (Leica, Buffalo Grove, IL) and images were analyzed using ImageScope software (Leica).

Immunofluorescence

Caco-2 cells grown to confluence on glass cover slips coated with Attachment factor or 8 μ m frozen mouse colon tissue sections or 8 μ m frozen resected human colon tissue samples (approved by the Ethic committee of the University Clinic of Münster, Germany) were fixed for 20 min at -20°C in ethanol and blocked for 1 h in 2% BSA and 10 % normal goat serum followed by incubation in primary antibodies at 4°C overnight. Samples were washed and incubated for 1 h with species-specific fluorescently-labeled secondary antibodies (Invitrogen). Cover slips were mounted in Vecta-Shield medium containing DAPI

(Vectorlabs, Burlingame, CA) and analyzed on a confocal laser microscope (FV-300, Olympus, Miami, FL). Cortactin and ZO-1 distribution scores in stainings of human colon tissue samples were evaluated in a blinded fashion according to the following scheme: 3, staining primarily at cell borders; 2, staining more pronounced at cell borders but also positive in the cytoplasm; 1, staining more pronounced in the cytosol but still positive at cell borders; 0, similar intensities in the cytosol and at cell borders.

G- to F-actin ratio

G/F-actin ratios were analyzed using a G-actin/F-actin *in vivo* assay Biochem kit according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton Inc., Denver, CO).

Permeability assay in vivo

Evans Blue-based *in vivo* colon permeability assays were performed as described³⁵. WT and cortactin-KO littermates were anaesthetized with an intraperitoneal injection of 125 mg/kg ketamine hydrochloride (Sanofi) and 12.5 mg/kg xylazine (Phoenix Scientific). After laparotomy, a 22G polyethylene tube was inserted into the proximal *colon ascendens* and ligated. Remaining stool was rinsed out, and 1 ml of Evans blue 1.5% (Sigma Aldrich) in PBS was instilled for 15 min. After washing with PBS until the perianal washout was clear, animals were euthanized and the colon extracted. The colon was opened longitudinally and rinsed again with PBS, followed by 1 ml of 6 mM N-acetylcysteine to remove dye within the mucus. Colons were incubated in 2 ml formamide overnight at room temperature and the extracted dye was measured spectrophotometrically at 610 nm. Values are expressed as arbitrary units per gram tissue.

Statistical analysis

Data are presented as mean with standard deviation of the mean. Statistical significance was assessed using Student's t-test and one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test where appropriate. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Angelica Silva Olivares for excellent technical assistance. This work was supported by grants of the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT, 179895, 207268 and 233395 to Michael Schnoor). AFCM received a travel fellowship grant from the Journal of Cell Science, The Company of Biologists Limited (www.biologists.com). AFCM and AGP received predoctoral fellowship stipends from Conacyt (346966, 369767, respectively).

References

1. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ *et al.* Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; **116**(2): 301-309.
2. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011; **73**: 283-309.
3. Ivanov AI, Naydenov NG. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *International review of cell and molecular biology* 2013; **303**: 27-99.
4. Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am J Pathol* 2010; **177**(2): 512-524.
5. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in cell & developmental biology* 2014; **36**: 157-165.
6. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**(6): a002899.
7. Yonemura S. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 2011; **23**(5): 515-522.
8. Garcia-Ponce A, Citalan-Madrid AF, Velazquez-Avila M, Vargas-Robles H, Schnoor M. The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity. *Thromb Haemost* 2015; **113**(1): 20-36.
9. Cosen-Binker LI, Kapus A. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* 2006; **21**: 352-361.
10. Helwani FM, Kovacs EM, Paterson AD, Verma S, Ali RG, Fanning AS *et al.* Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* 2004; **164**(6): 899-910.
11. Han SP, Gambin Y, Gomez GA, Verma S, Giles N, Michael M *et al.* Cortactin scaffolds Arp2/3 and WAVE2 at the epithelial zonula adherens. *J Biol Chem* 2014; **289**(11): 7764-7775.
12. Boguslavsky S, Grosheva I, Landau E, Shtutman M, Cohen M, Arnold K *et al.* p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(26): 10882-10887.
13. Katsube T, Takahisa M, Ueda R, Hashimoto N, Kobayashi M, Togashi S. Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem* 1998; **273**(45): 29672-29677.
14. Lai FP, Szczodrak M, Oelkers JM, Ladwein M, Acconcia F, Benesch S *et al.* Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(14): 3209-3223.

15. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA *et al.* JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007; **204**(13): 3067-3076.
16. Schnoor M, Lai FP, Zarbock A, Klaver R, Polaschegg C, Schulte D *et al.* Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J Exp Med* 2011; **208**(8): 1721-1735.
17. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2009; **1**(2): a002584.
18. Stamatovic SM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. PDCD10 (CCM3) regulates brain endothelial barrier integrity in cerebral cavernous malformation type 3: role of CCM3-ERK1/2-cortactin cross-talk. *Acta neuropathologica* 2015.
19. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2012; **5**(4): 354-366.
20. Mehta S, Nijhuis A, Kumagai T, Lindsay J, Silver A. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ beta-catenin) in inflammatory bowel disease. *Cell and tissue research* 2015; **360**(3): 749-760.
21. Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann NY Acad Sci* 2012; **1258**: 34-42.
22. Gomez GA, McLachlan RW, Yap AS. Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends in cell biology* 2011; **21**(9): 499-505.
23. Naydenov NG, Feygin A, Wang D, Kuenmerle JF, Harris G, Conti MA *et al.* Nonmuscle Myosin IIA Regulates Intestinal Epithelial Barrier in vivo and Plays a Protective Role During Experimental Colitis. *Scientific reports* 2016; **6**: 24161.
24. Wang D, Naydenov NG, Feygin A, Baranwal S, Kuenmerle JF, Ivanov AI. Actin-Depolymerizing Factor and Cofilin-1 Have Unique and Overlapping Functions in Regulating Intestinal Epithelial Junctions and Mucosal Inflammation. *Am J Pathol* 2016; **186**(4): 844-858.
25. Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB *et al.* Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 2009; **136**(2): 551-563.
26. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A *et al.* Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006; **55**(3): 342-347.
27. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JJ. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Annals of internal medicine* 1986; **105**(6): 883-885.

28. Das S, Rachagani S, Sheinin Y, Smith LM, Gurumurthy CB, Roy HK *et al*. Mice deficient in Muc4 are resistant to experimental colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Oncogene* 2015.
29. Eisenhoffer GT, Rosenblatt J. Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends in cell biology* 2013; **23**(4): 185-192.
30. McClatchey AI, Yap AS. Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol* 2012; **24**(5): 685-694.
31. Kim JH, Kushiro K, Graham NA, Asthagiri AR. Tunable interplay between epidermal growth factor and cell-cell contact governs the spatial dynamics of epithelial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(27): 11149-11153.
32. Yang L, Kowalski JR, Yacono P, Bajmoczy M, Shaw SK, Froio RM *et al*. Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol* 2006; **177**(9): 6440-6449.
33. Sunagin R, Robin AZ, Nusrat A, Parkos CA. Transmigrated neutrophils in the intestinal lumen engage ICAM-1 to regulate the epithelial barrier and neutrophil recruitment. *Mucosal Immunol* 2014; **7**(4): 905-915.
34. Lee WY, Chin AC, Voss S, Parkos CA. In vitro neutrophil transepithelial migration. *Methods Mol Biol* 2006; **341**: 205-215.
35. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N *et al*. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**(5): G1140-1149.

Figure legends

Figure 1

Cortactin deficiency causes increased intestinal epithelial permeability, altered molecular composition of junctions and crypt deformation. (A) Intestinal epithelial permeability to Evan's Blue in wild-type (WT, n=6) and cortactin-deficient (KO, n=8) mice expressed as absorption per gram tissue. Data are presented as mean±SDM. *p<0.05. (B) Western blot analysis of the indicated proteins in colon tissue lysates of WT and KO mice. (C) IF stainings of ZO-1, claudin-1 and claudin-2 in crypts of WT and KO mice. Bar=20 µm. (D) Absence of cortactin alters crypt morphology as manifested by increased distances between epithelial nuclei. ZO-1 is shown in red, nuclei in blue. Bar=20 µm. Graph shows quantification of nuclei distances of 36 crypts from 3 independent experiments. (E) Cortactin deficiency does not cause cleavage of caspase 3 or PARP but induces phosphorylation of histone H3. (F) KI67 staining (red) shows proliferating cells along the crypt axis (arrows) in cortactin KO colons, while they are mostly restricted to the crypt base in WT colons. Bar=50µm. All blots and images are representative of 3 independent experiments.

Figure 2

Cortactin-KO mice are more susceptible to DSS-induced colitis. (A) Cortactin-KO mice develop a higher disease activity index (DAI) and start dying after 5 days of DSS treatment (n=12 in each group). (B) Cortactin-KO mice lose more weight during DSS colitis (n=12). (C) DSS induces colon shortening in both WT and KO mice (n=12). All data are presented as mean±SDM. *p<0.05, **p<0.01. (D) Histological scans of whole colon "swiss rolls" (bars=2mm). (E) Magnifications of H&E-stained distal colon areas from the respective "swiss rolls" shown in (D) (bars=100 µm). a) untreated WT showing normal tissue architecture; b) DSS-treated WT showing crypt dysplasia and ulceration (*), immune cell infiltration (arrow-head) that extends into the lamina propria and edema (arrow); c) untreated KO showing

mostly conserved tissue architecture but with light edema formation (arrow) and thickening of the muscularis (*); d) DSS-treated KO showing edema formation (arrow), inflammatory cell infiltration (arrow-head), ulceration (U), goblet cell hyperplasia (*) and large mucus deposits (M).

Figure 3

Contactin depletion causes barrier dysfunction. (A) Transduction of Caco-2 cells with lentiviral constructs expressing contactin-specific shRNA causes contactin downregulation. (B) Quantification of blots from 3 independent cell lysates revealed a significant downregulation of $84.3 \pm 8.7\%$ compared to scrambled control cells (no: Caco-2 cells without lentiviral transduction; scr: Caco-2 cells transduced with a lentivirus expressing a scrambled shRNA). (C) Contactin-depleted Caco-2 cells develop TER to a lesser extent compared to cells transduced with a scrambled control shRNA. (D) Paracellular flux of 4kDa FITC-dextran is increased without contactin. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Graphs summarize 3 independent experiments.

Figure 4

Contactin depletion leads to altered junction architecture and increased proliferation. (A) Western blot analysis of the indicated proteins in the respective Caco-2 lysates. (B) IF stainings of the indicated proteins in the respective Caco-2 monolayers in gray-scale. Bar=20 μm . (C) Contactin depletion does not cause cleavage of caspase 3 or PARP but induces phosphorylation of histone H3. All blots and stainings are representative of 3 independent experiments.

Figure 5

Contactin depletion causes ROCK1-dependent actomyosin contractility. (A) Contactin-

depleted Caco-2 cells show more actin fibers crossing the cell body. Images representative of 3 independent experiments. Bar=20 μ m. (B) Cortactin KO colons have increased F-actin and decreased G-actin levels with total actin levels being unaltered. (C) Cortactin depletion does not cause activation of Erk but increases expression of ROCK1 and phosphorylation of MLC. (D) Western blots of mouse colon tissue lysates also show increased ROCK1 expression and MLC phosphorylation in the absence of cortactin. All blots are representative of 3 independent experiments. (E) Inhibition of ROCK1 in Caco-2 cells with 10 μ m Y27632 rescues the permeability defect in the absence of cortactin. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Graph summarizes 3 independent experiments.

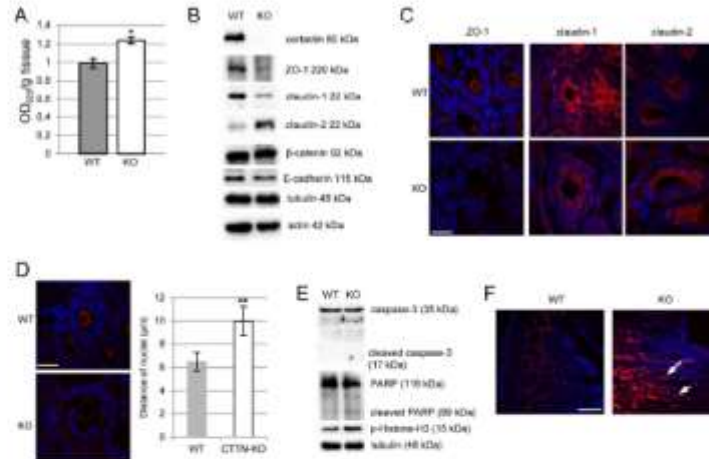
Figure 6

Neutrophils cross a cortactin-depleted Caco-2 monolayer faster. Neutrophils transmigrate faster across cortactin-depleted epithelial monolayers. ***p<0.001. Graph summarizes 3 independent experiments.

Figure 7

Cortactin is reduced and loses co-localization with ZO-1 at cell contacts in crypt epithelia of colon tissue derived from IBD patients. (A) Representative IF stainings of cortactin (green) and ZO-1 (red) in crypts of healthy individuals (n=10) and individuals suffering from either ulcerative colitis (UC, n=11) or Crohn's disease (CD, n=13). Bar=50 μ m. (B) Cortactin (upper graph) and ZO-1 (lower graph) distribution scores in CD tissues evaluated in a blinded fashion as described in Methods. (C) Cortactin (upper graph) and ZO-1 (lower graph) distribution scores in UC tissues. (D) Western blot analysis of cortactin protein levels in 3 different representative colon tissue lysates of each healthy, CD and UC patients. (E) Graph shows quantification of 8 different tissue lysates per condition. Pixel intensities are given as mean \pm SDM. *p<0.05.

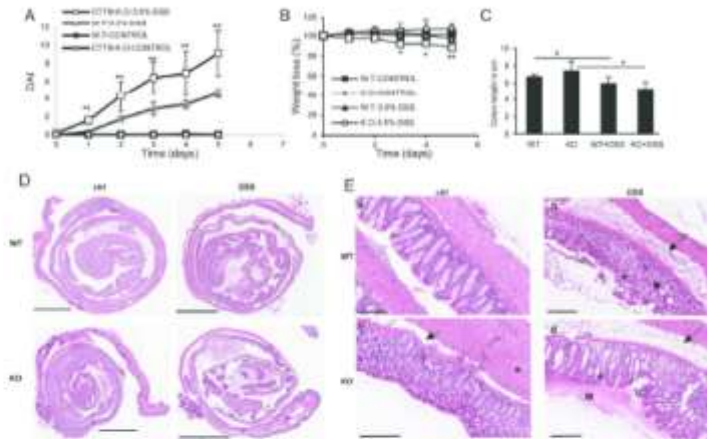
Figure 1



Cortactin deficiency causes increased intestinal epithelial permeability, altered molecular composition of junctions and crypt deformation. (A) Intestinal epithelial permeability to Evan's Blue in wild-type (WT, n=6) and cortactin-deficient (KO, n=8) mice expressed as absorption per gram tissue. Data are presented as mean±SDM. *p<0.05. (B) Western blot analysis of the indicated proteins in colon tissue lysates of WT and KO mice. (C) IF stainings of ZO-1, claudin-1 and claudin-2 in crypts of WT and KO mice. Bar=20 µm. (D) Absence of cortactin alters crypt morphology as manifested by increased distances between epithelial nuclei, ZO-1 is shown in red, nuclei in blue. Bar=20 µm. Graph shows quantification of nuclei distances of 36 crypts from 3 independent experiments. (E) Cortactin deficiency does not cause cleavage of caspase 3 or PARP but induces phosphorylation of histone H3. (F) KI67 staining (red) shows proliferating cells along the crypt axis (arrows) in cortactin KO colons, while they are mostly restricted to the crypt base in WT colons. Bar=50µm. All blots and images are representative of 3 independent experiments.

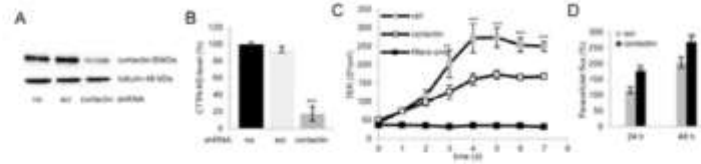
152x112mm (300 x 300 DPI)

Figure 2



Cortactin-KO mice are more susceptible to DSS-induced colitis. (A) Cortactin-KO mice develop a higher disease activity index (DAI) and start dying after 5 days of DSS treatment (n=12 in each group). (B) Cortactin-KO mice lose more weight during DSS colitis (n=12). (C) DSS induces colon shortening in both WT and KO mice (n=12). All data are presented as mean±SDM. *p<0.05; **p<0.01. (D) Histological scans of whole colon "swiss rolls" (bars=2mm). (E) Magnifications of H&E-stained distal colon areas from the respective "swiss rolls" shown in (D) (bars=100 µm). a) untreated WT showing normal tissue architecture; b) DSS-treated WT showing crypt dysplasia and ulceration (*), immune cell infiltration (arrow-head) that extends into the lamina propria and edema (arrow); c) untreated KO showing mostly conserved tissue architecture but with light edema formation (arrow) and thickening of the muscularis (*); d) DSS-treated KO showing edema formation (arrow), inflammatory cell infiltration (arrow-head), ulceration (U), goblet cell hyperplasia (*) and large mucus deposits (M).
129x88mm (300 x 300 DPI)

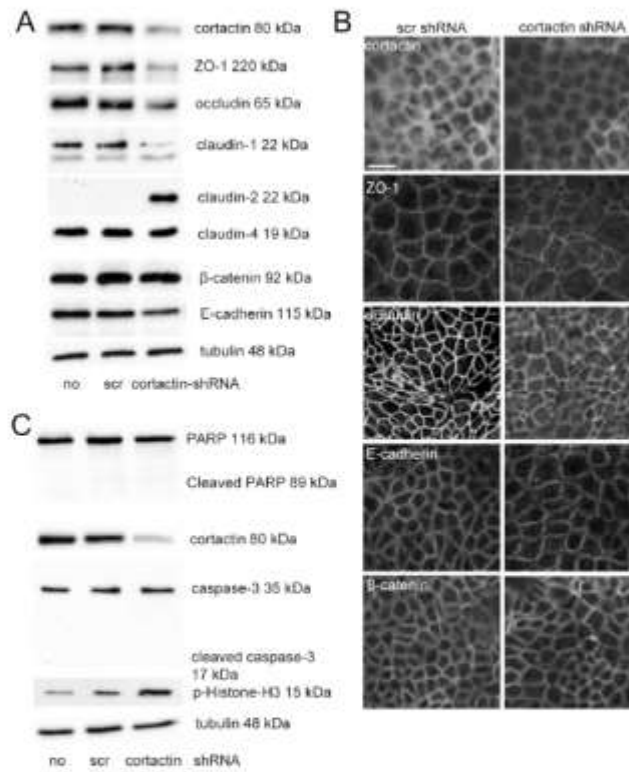
Figure 3



Cortactin depletion causes barrier dysfunction. (A) Transduction of Caco-2 cells with lentiviral constructs expressing cortactin-specific shRNA causes cortactin downregulation. (B) Quantification of blots from 3 independent cell lysates revealed a significant downregulation of $84.3 \pm 8.7\%$ compared to scrambled control cells (no: Caco-2 cells without lentiviral transduction; scr: Caco-2 cells transduced with a lentivirus expressing a scrambled shRNA). (C) Cortactin-depleted Caco-2 cells develop TER to a lesser extent compared to cells transduced with a scrambled control shRNA. (D) Paracellular flux of 4kDa FITC-dextran is increased without cortactin. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Graphs summarize 3 independent experiments.

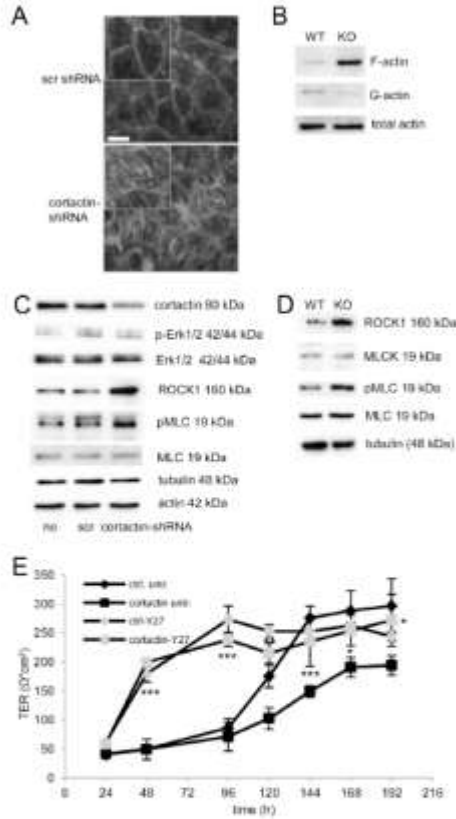
48x13mm (300 x 300 DPI)

Figure 4



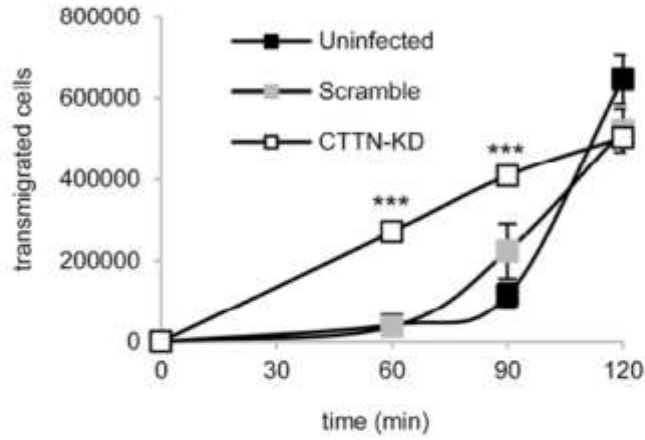
Cortactin depletion leads to altered junction architecture and increased proliferation. (A) Western blot analysis of the indicated proteins in the respective Caco-2 lysates. (B) IF stainings of the indicated proteins in the respective Caco-2 monolayers in gray-scale. Bar=20 μ m. (C) Cortactin depletion does not cause cleavage of caspase 3 or PARP but induces phosphorylation of histone H3. All blots and stainings are representative of 3 independent experiments.
123x161mm (300 x 300 DPI)

Figure 5



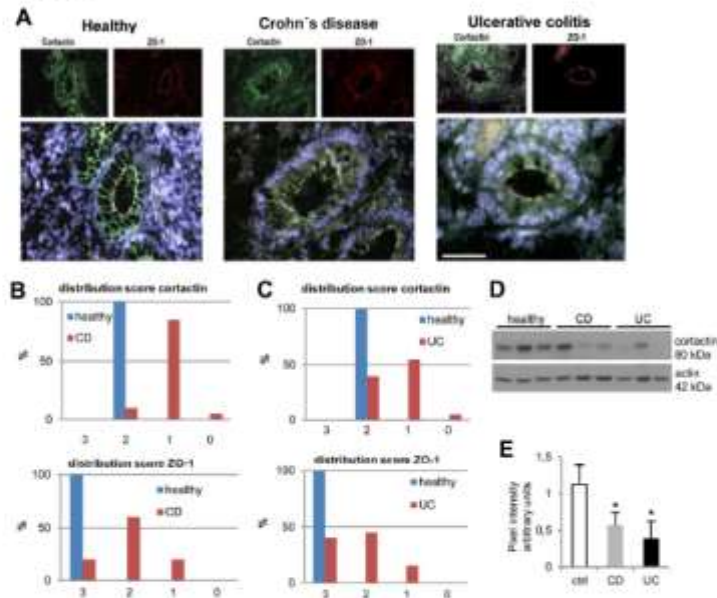
Cortactin depletion causes ROCK1-dependent actomyosin contractility. (A) Cortactin-depleted Caco-2 cells show more actin fibers crossing the cell body. Images representative of 3 independent experiments. Bar=20µm. (B) Cortactin KO colons have increased F-actin and decreased G-actin levels with total actin levels being unaltered. (C) Cortactin depletion does not cause activation of Erk but increases expression of ROCK1 and phosphorylation of MLC. (D) Western blots of mouse colon tissue lysates also show increased ROCK1 expression and MLC phosphorylation in the absence of cortactin. All blots are representative of 3 independent experiments. (E) Inhibition of ROCK1 in Caco-2 cells with 10 µm Y27632 rescues the permeability defect in the absence of cortactin. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Graph summarizes 3 independent experiments.
146x270mm (300 x 300 DPI)

Figure 6



Neutrophils cross a cortactin-depleted Caco-2 monolayer faster; Neutrophils transmigrate faster across cortactin-depleted epithelial monolayers. *** $p < 0.001$. Graph summarizes 3 independent experiments. 51x42mm (300 x 300 DPI)

Figure 7



Cortactin is reduced and loses co-localization with ZO-1 at cell contacts in crypt epithelia of colon tissue derived from IBD patients. (A) Representative IF stainings of cortactin (green) and ZO-1 (red) in crypts of healthy individuals (n=10) and individuals suffering from either ulcerative colitis (UC, n=11) or Crohn's disease (CD, n=13). Bar=50 μm. (B) Cortactin (upper graph) and ZO-1 (lower graph) distribution scores in CD tissues evaluated in a blinded fashion as described in Methods. (C) Cortactin (upper graph) and ZO-1 (lower graph) distribution scores in UC tissues. (D) Western blot analysis of cortactin protein levels in 3 different representative colon tissue lysates of each healthy, CD and UC patients. (E) Graph shows quantification of 8 different tissue lysates per condition. Pixel intensities are given as mean±SDM. *p<0.05. 119x107mm (300 x 300 DPI)