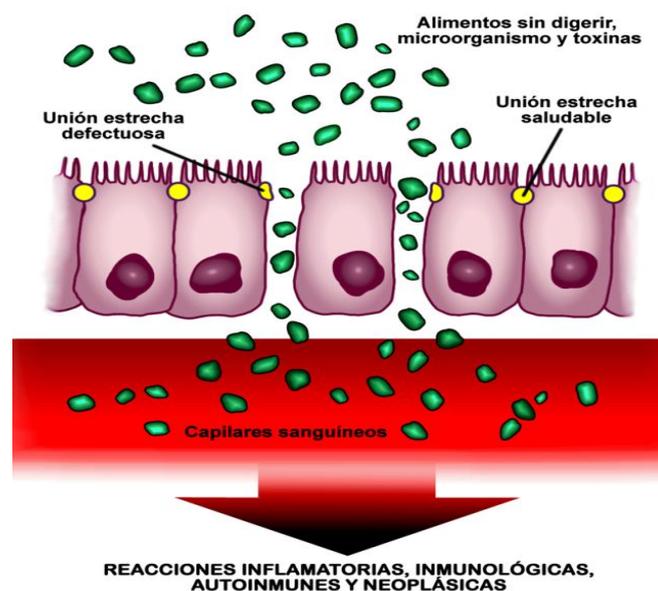


Importancia de las uniones estrechas en las enfermedades intestinales

María Concepción Arenas Bazán

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

Curso 2016-17





Facultad de Farmacia

Trabajo de fin de grado

Tipo: Revisión bibliográfica

Grado: en Farmacia

Título del trabajo: Importancia de las uniones estrechas en las enfermedades intestinales

Nombre: María Concepción Arenas Bazán

Presentación: día 6 de Julio 2017

Lugar: Facultad de Farmacia, Aula 1.1

Departamento de: Fisiología

Tutora: María Luisa Calonge Castrillo

Resumen

El intestino humano además de realizar su función de absorción de nutrientes, se encarga de la protección frente al paso de antígenos, para lo cual presenta mecanismos inmunológicos y no inmunológicos, que constituyen la barrera intestinal. Uno de los componentes fundamentales de la misma es el epitelio intestinal formado por una capa simple de células epiteliales adheridas entre sí por distintos tipos de uniones intercelulares. Las uniones estrechas se encuentran en la zona más apical del epitelio y tienen una función clave para mantener la homeostasis intestinal: sellando las uniones entre células vecinas, evita el paso por la vía paracelular y asegura el transporte unidireccional de moléculas, ya que además mantiene la polaridad de las células epiteliales. Las uniones estrechas están formadas por diferentes tipos de proteínas como las ocludinas, JAMs o claudinas, proteínas transmembrana que regulan y determinan la permeabilidad, pero además también presentan proteínas periféricas como las *Zonula occludens* (ZO) y las cingulinas, que ligan las anteriores al citoesqueleto de actina. La zonulina o pre-haptoglobina-2 es capaz de provocar el desensamblaje de las uniones estrechas y modificar la permeabilidad del epitelio. La alteración de la defensa de las uniones estrechas puede favorecer el paso de sustancias al medio interno provocando una respuesta inmunitaria exagerada, lo que puede ocasionar la aparición de enfermedades como: la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable, el cáncer colorrectal o la enfermedad celiaca. Estas alteraciones pueden ser producidas por cambios en los niveles de la zonulina, o bien por cambios en la expresión de las propias proteínas de la unión, entre las que están principalmente implicadas las claudinas.

Palabras clave: ‘uniones estrechas’, ‘zonulina’, ‘claudina’ y ‘enfermedades intestinales’.

Glosario de abreviaturas

ADAMS: "A disintegrin And Metalloprotease"

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

HLA-DQ2 ó DQ8: marcadores de susceptibilidad genética en celíacos

HP: haptoglobina

IFN: interferon

JAMs: moléculas de adhesión de la unión

PAR2: receptor activado por proteasa

PDZ: "Post synaptic density-95/Drosophila disc large/Zonula occludens-1 protein"

PKC: proteína kinasa C

Pre-HP: pre-haptoglobina

Pro-HB-EGF: precursor del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina

TNF: factor de necrosis tumoral

ZO: *zonula occludens*

Zot: toxina de la *zonula occludens*

Índice

1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos.....	11
4. Resultados y Discusión.....	12
4.1. Estructura y composición de las uniones estrechas.....	12
4.2. Funciones de las uniones estrechas	15
4.3. La zonulina como regulador intercelular de las uniones estrechas en la salud y la enfermedad.....	16
4.4. Implicación de la zonulina en enfermedades específicas	19
4.5. Implicación de las uniones estrechas en las enfermedades intestinales.....	20
4.5.1. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	20
4.5.2. Síndrome del intestino irritable	23
4.5.3. Enfermedades neoplásicas.....	23
4.5.4. Enfermedad celiaca.....	24
5. Conclusión.....	28
6. Bibliografía	29

1. Introducción

La pared del intestino humano en contacto con la luz está recubierta por una capa simple de células epiteliales que representa la mayor interfaz entre el medio externo y el medio interno (aproximadamente 250 m²) (Artis, 2008).

Para garantizar la homeostasis, el tracto gastrointestinal desarrolla una función doble: **digestiva** que permite la absorción de nutrientes, el transporte de agua y electrolitos y la secreción de agua y proteínas a la luz intestinal, y **defensiva** que impide el paso de sustancias potencialmente nocivas, hacia el medio interno (Turner, 2009). Dada la gran superficie de contacto que presenta con el exterior, el tracto gastrointestinal es una de las regiones que mayor carga antigénica recibe y, para proteger adecuadamente al organismo la mucosa intestinal presenta mecanismos inmunológicos y no inmunológicos, que constituyen la barrera intestinal (Rescigno, 2011) (**Figura 1**).

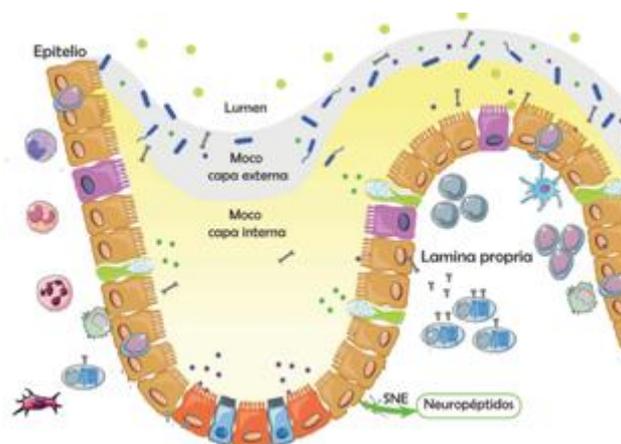


Figura 1. Componentes de la barrera intestinal. La capa de moco con sustancias antimicrobianas recubre un epitelio simple con enterocitos, células globet (segregan mucina), células Paneth (segregan péptidos antimicrobianos), células enterocromafines, (producen hormonas) y células madre intestinales. La lámina propia contiene tejido linfóide con macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos (Modificada de Salvo-Romero y cols., 2015)

La primera línea de defensa del tracto gastrointestinal se encuentra en la propia luz intestinal, donde los microorganismos y antígenos son degradados de manera inespecífica por acción del pH, las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares. Las enzimas digestivas, principalmente proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas, ejercen una acción tóxica sobre los microorganismos a través de la destrucción de la pared celular (Sarker y Gry, 1992), consiguiendo eliminar en un primer paso una gran parte de los microorganismos procedentes de la dieta.

Recubriendo el epitelio intestinal se encuentra una capa de moco, de aproximadamente unas 100 micras de espesor, secretado fundamentalmente por las células caliciformes o células goblet. Esta capa de moco contribuye de forma importante a la barrera intestinal, debido a la carga negativa de las glicoproteínas que contiene y a la capacidad del moco para crear una barrera hidrofóbica que evita el paso de moléculas hidrosolubles, tales como toxinas y ácidos, además previene la adhesión de las bacterias entéricas al epitelio intestinal (Qin y cols., 2008). Dentro de la propia capa de moco se puede diferenciar una capa más externa (capa de moco agitada), que contribuye a la retención de secreciones mucosas ricas en péptidos antibacterianos y previene la adhesión y posterior invasión transepitelial de microorganismos. Esta capa contiene inmunoglobulina A (IgAs) sintetizada por las células plasmáticas de la lámina propia y productos antimicrobianos secretados por las células Paneth, como fosfolípidos, mucinas cargadas negativamente y péptidos con actividad frente a bacterias, levaduras, hongos, virus e incluso células tumorales, como por ejemplo: las defensinas, los péptidos “trefoil”, criptidinas, ribonucleasas. Adherida al epitelio se encuentra la capa de moco no agitada, más densa, por el alto contenido en glicoproteínas, que facilita la absorción de nutrientes, mantiene la hidratación epitelial y protege el revestimiento epitelial de las fuerzas de cizallamiento luminales y de las enzimas digestivas (Bevins y Salzman, 2011).

Otro componente fundamental de la barrera intestinal es el propio epitelio. Las uniones entre las células epiteliales ayudan a mantener la separación entre el medio externo y el interno y pueden clasificarse de acuerdo con su función: i) las uniones estrechas permiten un cierre hermético entre las células que forman el epitelio; ii) las uniones adherentes, los desmosomas y los hemidesmosomas representan uniones mecánicas resistentes y iii) las uniones comunicantes o uniones “gap” constituyen un tipo de comunicación entre células vecinas. En la mayor parte de los epitelios es posible encontrar todos estos tipos de uniones (**Figura 2**).

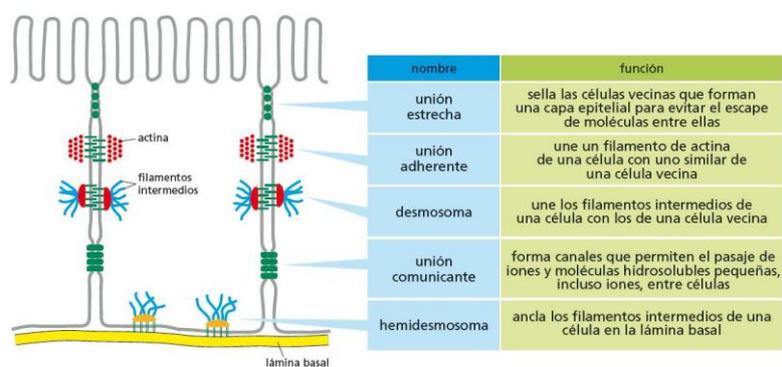


Figura 2. Tipos y funciones de las uniones intercelulares específicas del epitelio (Alberts y cols., 2011)

Existen dos vías principales para el transporte de moléculas, desde del medio externo al interno, a través de la barrera epitelial. Así, las moléculas pueden pasar por la vía transcelular o por la vía paracelular (**Figura 3**). Por la vía transcelular, los iones y solutos atraviesan el epitelio utilizando canales, transportadores y bombas o ATPasas. Por la vía paracelular el movimiento transepitelial se produce por el espacio intercelular entre las células vecinas.

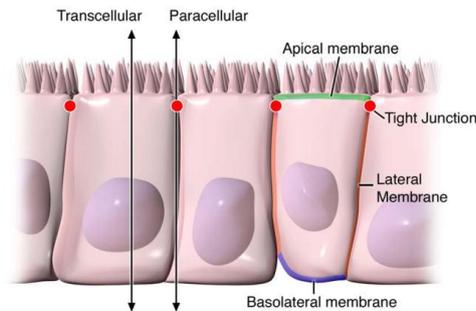


Figura 3. Mecanismo de transporte por las vías transcelular y paracelular (Groschwitz y Hogan, 2009)

Las uniones estrechas o “tight junction” desempeñan una función clave en la vía paracelular, ya que mantienen el transporte unidireccional a través de los epitelios por dos mecanismos: i) sellan las células vecinas de manera que las moléculas hidrosolubles no pueden pasar con facilidad por la vía paracelular; ii) mantienen la polaridad de las células epiteliales al evitar el movimiento de las proteínas entre las membranas apical y basolateral. Se ha demostrado que si se introduce un trazador en un lado del epitelio, por lo general, no podrá pasar más allá de la unión estrecha (**Figura 4**).

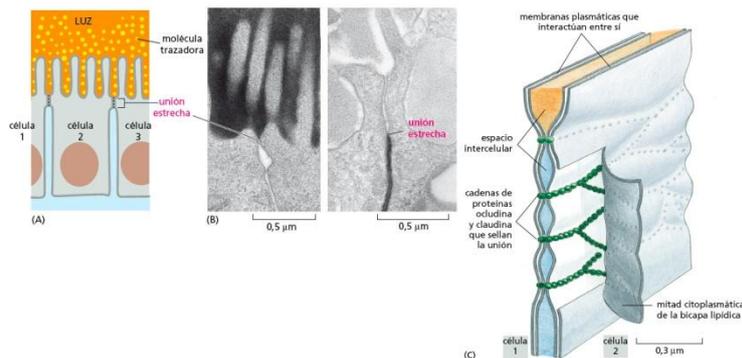


Figura 4. Las uniones estrechas permiten que los epitelios actúen como barrera al paso de moléculas. A) La molécula trazadora no puede atravesar la unión estrecha. B) Microfotografía de la unión estrecha con el microscopio electrónico. C) Esquema de la estructura de las uniones estrechas, mostrando las proteínas de la unión: claudinas y ocludinas (Alberts y cols., 2011).

Históricamente se pensaba que las uniones estrechas formaban una barrera impermeable que bloqueaba el paso paracelular de solutos, macromoléculas y microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que los distintos epitelios presentan diferente permeabilidad, clasificándose en epitelios 'porosos' y epitelio 'estrechos'. Además, las uniones estrechas son estructuras dinámicas cuya permeabilidad está regulada y están involucradas en la regulación tanto fisiológica como patológica ante la presencia de antígenos epiteliales intestinales (Turner, 2009).

La alteración en los mecanismos de defensa que componen la función de la barrera intestinal favorece el paso de sustancias lumenales al medio interno, que en condiciones normales serían excluidas, dando lugar al desarrollo de respuestas inmunitarias exageradas que, a su vez, pueden amplificar la disfunción de la barrera y perpetuar el proceso inflamatorio. Se ha descrito que los antígenos microbianos en el tracto gastrointestinal han desarrollado estrategias para interferir con las uniones intercelulares, aumentar la permeabilidad epitelial y así poder atravesar la barrera epitelial (Sousa y cols., 2005). El mecanismo exacto por el que se produce la alteración de las uniones estrechas no es conocido, el único regulador fisiológico de las uniones estrechas descrito hasta el momento es la zonulina, el cual está implicado en el tráfico de macromoléculas y, por lo tanto, en el equilibrio entre tolerancia y respuesta inmune. Cuando la vía de la zonulina está desregulada pueden producirse enfermedades autoinmunes, inflamatorias y neoplásicas (Fasano, 2011).

Aunque se desconoce su implicación exacta, la alteración de la barrera intestinal se ha asociado al desarrollo de enfermedades inflamatorias en el tracto digestivo (celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable), pero también a otras patologías extradigestivas como la esquizofrenia, la diabetes o la sepsis, entre otras (Pascual y cols., 2001).

2. Objetivo

Realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre la implicación de las uniones estrechas en el desarrollo de enfermedades intestinales. Para ello empezaremos por realizar un estudio de: i) la estructura, composición y funciones de las uniones estrechas en condiciones homeostáticas, ii) la implicación de la zonulina como regulador de las uniones estrechas en condiciones fisiológicas y en procesos patológicos y iii) la alteración de las uniones estrechas y su implicación en el desarrollo de patologías intestinales.

3. Material y métodos

Para la elaboración de este trabajo de fin de grado se han consultado diversas fuentes:

- Libros de textos de fisiología
- Artículos científicos.

Ya que el tema del trabajo se conoce desde hace bastante tiempo, se ha optado por la búsqueda y utilización de artículos tanto originales, donde se describió por primera vez un mecanismo, como revisiones y artículos más recientes publicados en los últimos años.

La búsqueda de artículos se ha realizado a través de una parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos llamada NCBI (The National Center for Biotechnology Information) y dentro de la misma en las bases de datos “PubMed” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y “OMIM” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

La búsqueda se comenzó utilizando palabras clave como: ‘tight junction’, ‘zonulin’, ‘claudin’ y ‘intestinal diseases’, solas o combinadas. De todos los artículos encontrados, se han seleccionado aquellas revisiones más recientes y, a partir de las mismas se han buscado los artículos originales, de mayor relevancia en el tema de estudio.

4. Resultados y Discusión

4.1. Estructura y composición de las uniones estrechas.

Las **uniones estrechas** se localizan en la zona más apical de los epitelios y forman un anillo continuo alrededor de la célula epitelial (ver Figura 6). Están formadas por proteínas transmembrana como las ocludinas, claudinas y las moléculas de adhesión intercelular (JAMs), responsables de determinar y regular la permeabilidad paracelular. Estas proteínas interactúan en el espacio paracelular con proteínas de las células adyacentes. Las interacciones pueden ser homofílicas (de proteínas iguales) o heterofílicas (uniones de proteínas diferentes). Además, las uniones estrechas también presentan proteínas periféricas o adaptadoras, como las ZO (*Zonula ocludens*) y las cingulinas, que están vinculadas a las proteínas transmembrana descritas anteriormente y al citoesqueleto de la célula a través de la F-actina y la miosina II (Edelblum y Turner, 2009). La unión de las proteínas ZO con las proteínas transmembrana de las uniones estrechas (claudinas, ocludinas y proteínas JAMs) se realiza a través de dominios PDZ ("Post synaptic density-95/Drosophila disc large/Zonula ocludens-1 protein"). Estos dominios de aminoácidos se encuentran en proteínas de señalización celular. De hecho, las ZO son proteínas efectoras de diferentes vías de señalización y pueden alterar el mantenimiento y la función de barrera de las uniones estrechas (Shen y cols., 2008) (**Figura 5**).

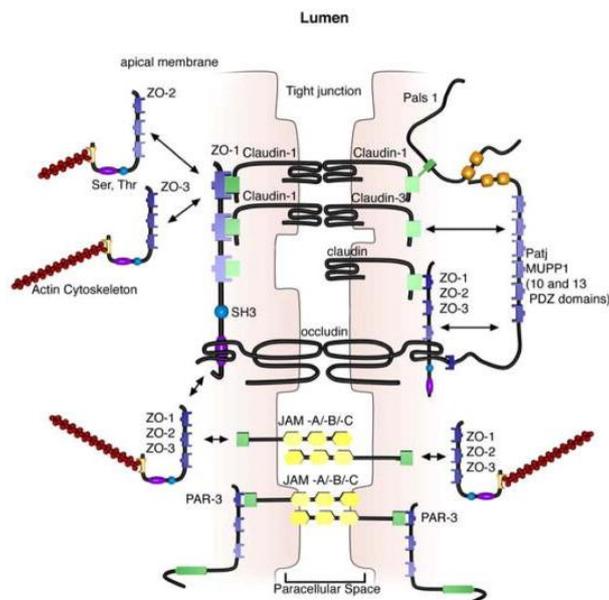


Figura 5. Las uniones estrechas son complejos multiprotéicos. Las proteínas transmembrana (claudinas, ocludinas y JAMs) interactúan con las proteínas adaptadoras (ZO y cingulinas) que ligan la unión estrecha al citoesqueleto de actina (Groschwitz y Hogan, 2009).

La expresión de los diferentes tipos de uniones estrechas (más o menos permeables) en el intestino varía según la localización y las propiedades funcionales del intestino (Groschwitz y Hogan, 2009).

La **occludina** fue la primera proteína identificada específica de las uniones estrechas. La ocludina (Pm=60-82 kDa) es una proteína integral de membrana con cuatro dominios transmembranarios, dos asas extracelulares y dos extremos citoplasmáticos. Funcionalmente regula la permeabilidad selectiva paracelular. El extremo carboxilo terminal intracelular interacciona con los dominios PDZ de la proteína ZO-1, la cual liga la ocludina al citoesqueleto de actina. Se han identificado varias isoformas, y se cree que son el resultado del empalme o “splicing” alternativo del ARNm. Además se ha descrito que varían en su distribución celular y en la interacción con otras moléculas (Groschwitz y Hogan, 2009). Aunque la función de la ocludina no está totalmente definida, se ha descrito que una de las principales sustancias alérgicas de las casas, los ácaros, hidrolizan la ocludina produciendo una alteración de la unión estrecha y un aumento de la permeabilidad paracelular (Wan y cols., 1999). No obstante, aunque la ocludina es uno de los principales constituyentes de las uniones estrechas, ni la formación de la unión, ni la función de barrera paracelular dependen de la ocludina. Esta observación se ha podido demostrar utilizando ratones transgénicos que no expresan ocludina. Por otro lado, se ha demostrado que la fosforilación de la ocludina regula su interacción con la ZO-1 y así colabora en el mantenimiento de la unión estrecha y en la función de la barrera paracelular (Groschwitz y Hogan, 2009).

Las **claudinas** (Pm=20-27 kDa) son proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembranarios hidrofóbicos, dos asas extracelulares y dos dominios citoplasmáticos, los extremos amino- y carboxi- terminal. Las asas extracelulares son críticas para las interacciones homofílicas y heterofílicas y para la formación de canales iónicos selectivos. El dominio carboxílico terminal está implicado en el anclaje al citoesqueleto vía proteínas ZO (Van Itallie y Anderson, 2006).

Hasta la actualidad se han identificado 24 isoformas de la familia de las claudinas en humanos (Groschwitz y Hogan, 2009). Las claudinas 1 y 2 son capaces de iniciar la formación de las uniones estrechas, lo que sugiere que son los principales componentes de las mismas. La claudina 2 controla el movimiento de cationes monovalentes como el Na⁺ al intersticio y favorece el movimiento transepitelial de iones y de agua, en contraste con otras claudinas (como por ejemplo las claudinas 1, 3, 4, 5 y 8) que estrechan e impermeabilizan el epitelio

(Furuse y cols., 2002). La claudina 2, al favorecer el movimiento transepitelial de agua e iones, disminuye directamente la función de barrera. Por lo tanto, la presencia de las diferentes claudinas en la unión estrecha determina su permeabilidad. Igual que con las ocludinas, la localización de las claudinas en las uniones estrechas y su función están regulados por fosforilación post-transduccional y vía interacción con los dominios PDZ (Groschwitz y Hogan, 2009).

Las **moléculas de adhesión de la unión** (JAMs) son proteínas integrales que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se subdividen en 4 subtipos según los dominios de unión al dominio PDZ que, al igual que con las anteriores, sirve de anclaje al citoesqueleto de actina. La región extracelular de JAMs puede unir múltiples ligandos, los cuales se han propuesto que regulan las funciones celulares y la permeabilidad paracelular de JAMs. Se ha demostrado la importancia de JAM-A en la formación y ensamblaje de las uniones estrechas en las células del epitelio intestinal (Groschwitz y Hogan, 2009).

En relación con las **proteínas ZO**, actualmente se han descrito 3 isoformas (ZO-1, ZO-2 y ZO-3), las cuales se unen al citoesqueleto e interactúan con proteínas Rab13 (miembros de la familia de oncogenes RAS), participando así en procesos de proliferación y diferenciación celular (Shin y cols., 2006).

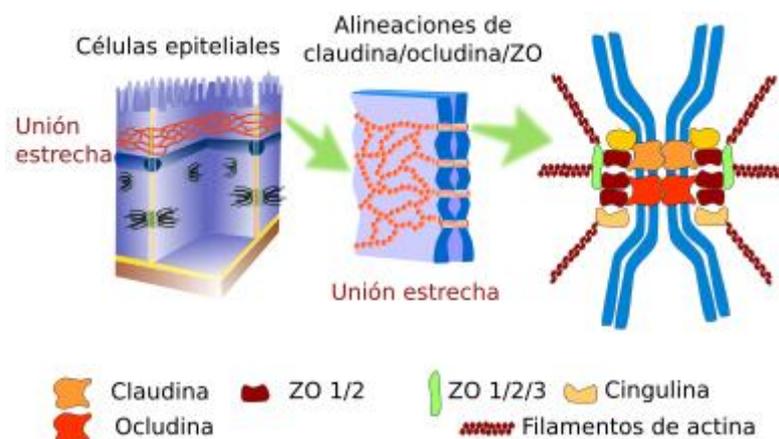


Figura 6. Esquema de las uniones estrechas y las proteínas que la forman, mostrando las diferentes isoformas de la zonulina (ZO 1/2/3) (Modificado de Niessen, 2007)

4.2. Funciones de las uniones estrechas

Como ya hemos descrito anteriormente, la mayoría de las proteínas de las uniones estrechas tienen propiedades que aumentan la formación de la barrera, sin embargo, otras forman canales o poros selectivos al tamaño o a la carga de las moléculas (Kray y cols., 2008). Sin uniones estrechas que impidan las filtraciones sería inútil la actividad de los transportadores y las bombas en las células destinados a la absorción unidireccional, como por ejemplo, la que se produce en el intestino, y la composición del medio a ambos lados del epitelio se haría homogénea (Alberts y cols., 2011).

La disfunción de las uniones estrechas puede producir la disrupción de la integridad de la barrera intestinal. Cambios en el pH, la carga osmótica o las funciones del citoesqueleto, todo afecta a la función de la barrera de las uniones estrechas.

Además de limitar el paso de moléculas de un lado al otro del epitelio, las uniones estrechas cumplen una función clave en el mantenimiento de la polaridad de los epitelios por dos mecanismos:

- En primer lugar, el complejo de la unión estrecha que se localiza cerca del borde apical de las células evita la libre difusión de las proteínas de la membrana, lo cual mantiene la diferencia entre el dominio apical y el dominio basolateral de la membrana (**Figura 7**).

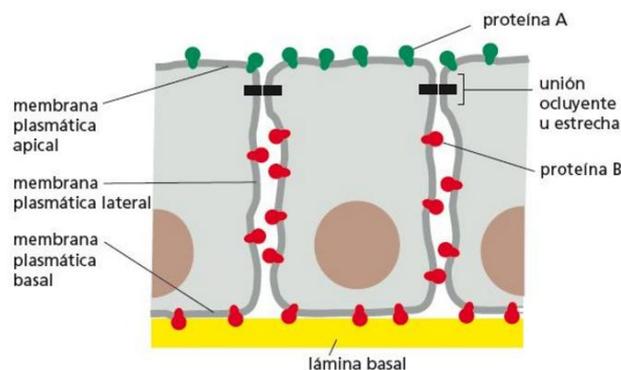


Figura 7. Función de las uniones estrechas en la diferente localización de las proteínas en la membrana apical o en la basolateral (Alberts y cols., 2011).

- En segundo lugar, en muchos epitelios las uniones estrechas son sitios del ensamblado de los complejos de proteínas intracelulares que determinan la polaridad apicobasal en el interior de la célula (Alberts y cols., 2011).

4.3. La zonulina como regulador intercelular de las uniones estrechas en la salud y la enfermedad

La investigación realizada durante el desarrollo de la vacuna del cólera, condujo al descubrimiento de la toxina *zonula occludens* (Zot), una enterotoxina capaz de abrir reversiblemente las uniones estrechas intercelulares. Investigaciones posteriores demostraron la complejidad de las cascadas de señalización desencadenadas por Zot e involucradas en la regulación de la vía paracelular (Fasano, 2011).

Zot provoca la polimerización de la actina de las células diana lo que conduce al desensamblaje de los complejos de la unión estrecha a través de un mecanismo dependiente de la proteína quinasa C (PKC) (**Figura 8**). Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que Zot es capaz de interactuar con las células epiteliales a lo largo del tracto gastrointestinal, siendo mayor la señal en el yeyuno y en el íleon distal (Fasano, 2011).

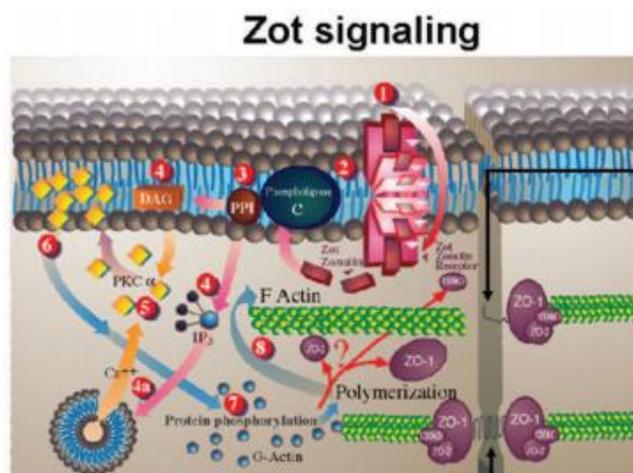


Figura 8. Mecanismo propuesto sobre la señalización celular desencadenada por la zonulina (Zot) y la apertura de las uniones estrechas (Modificada de Fasano, 2008).

Dada la complejidad de la señalización intercelular activada por Zot que conduce a la modulación de la unión estrecha, se planteó la hipótesis de que la toxina puede imitar una proteína endógena capaz de regular las uniones estrechas epiteliales. La combinación de experimentos de permeabilidad "in vitro" y experimentos utilizando los anticuerpos anti-Zot condujeron a la identificación de un análogo humano a Zot de ~ 47 kDa, denominado **zonulina** (Fasano, 2011).

Los estudios "in vitro" muestran que la zonulina humana endógena es capaz de aumentar la permeabilidad tanto en el yeyuno como en el íleon (Wang y cols, 2000).

Por otro lado, estudios con sueros humanos de pacientes con enfermedad de Crohn, muestran niveles aumentados de zonulina, y revelan que la zonulina es la pre-haptoglobina-2 (pre-(Hp)-2), proteína precursora de la haptoglobina-2 antes de la división enzimática en su forma madura (Tripathi y cols., 2009). La haptoglobina es una proteína de unión a la hemoglobina con propiedades inmunomoduladoras, su función primaria es prevenir el estrés oxidativo causado por la hemoglobina intravascular libre. En humanos hay dos variantes la 1 y la 2 (Asleh y cols., 2003).

Para confirmar que el aumento de la permeabilidad era producido específicamente por la zonulina, ésta fue sometida a proteólisis, generándose las cadenas α y β de la haptoglobina. Los efectos de la zonulina sobre la permeabilidad no pudieron ser reproducidos ni en experimentos “in vivo” ni “In vitro” tras la proteólisis. Todos estos resultados confirmaron que la zonulina es pre-haptoglobina 2 y cuando se escinde en su forma Hp2 madura, pierde su efecto sobre la permeabilidad paracelular (Tripathi y cols., 2009) (**Figura 9**).

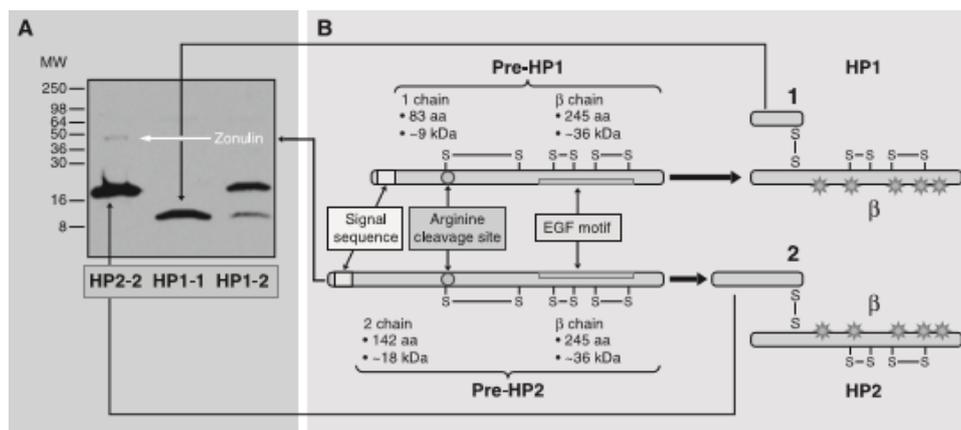


Figura 9. A. Western blot de suero de pacientes con enfermedad de Crohn, utilizando anticuerpos policlonales anti-Zot. La flecha blanca indica la banda correspondiente a la zonulina. B. Esquema de las prehaptoglobinas (pre-HP) y haptoglobinas (HP) maduras. La zonulina se corresponde con la pre-HP2 (Fasano, 2011).

Antes del descubrimiento de la zonulina como pre-haptoglobina 2, no se había descrito ninguna función biológica para ninguno de los precursores de la haptoglobina, ya que se escinden significativamente en el retículo endoplasmático y circulan en el plasma en cantidades mínimas. Curiosamente, la haptoglobina se utiliza en clínica como un marcador de inflamación general (Sturgeon y Fasano, 2016).

Se ha demostrado que la zonulina, pero no sus subunidades, activa el receptor EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y disminuye la resistencia eléctrica transepitelial. Se ha sugerido que la zonulina debe estar debidamente plegada, en su forma completa, no escindida, para activar al receptor y por tanto, para provocar el desensamblaje de las uniones estrechas. Varios receptores acoplados a proteína G, como el receptor PAR2 (receptor activado por proteinasas), activan al receptor EGFR. Además, se ha demostrado que la estimulación de PAR2 basolateral aumenta la permeabilidad a través de la redistribución de ZO-1, ocludinas y F-actina (Sturgeon y Fasano, 2016). Coelho y cols. (2002) demostraron “in vivo” que la estimulación apical con un péptido activador de PAR2 provoca un aumento dependiente de la dosis en la permeabilidad intestinal.

Para establecer una función de PAR2 en la activación del receptor EGFR en respuesta a la zonulina, se estudió la permeabilidad del intestino delgado usando segmentos aislados. La zonulina disminuyó la resistencia eléctrica transepitelial en el intestino de ratón, mientras que no consiguió reducirla en segmentos del intestino delgado de ratones mutantes que no expresan PAR2. Esto demostró que la zonulina regula la función de la barrera intestinal mediante la transactivación del receptor EGFR dependiente de PAR2. Además, esta transactivación puede ser directa o estar mediada por proteínas transmembranarias, tales como Pro-HB-EGF (precursor del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina), metaloproteinasas y proteínas ADAMS (“A Disintegrin And Metalloprotease”) (Drago y cols., 2006).

En resumen, se ha caracterizado la zonulina como pre-haptoglobina2, la cual regula la permeabilidad intestinal causada por la transactivación del receptor EGFR a través de PAR2, mientras que en su forma escindida actúa como amortiguador de la hemoglobina (**Figura 10**) (Drago y cols., 2006).

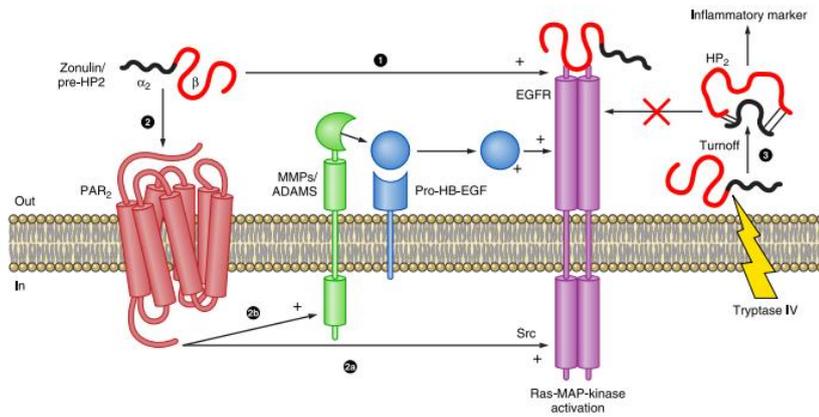


Figura 10. Mecanismos propuestos a través de los cuales la zonulina activa el receptor EGFR. La zonulina puede activar el EGFR a través de la unión directa (1) y / o por la transactivación de PAR2 (2). El procesamiento de la zonulina en su forma madura suprime su capacidad para unirse a EGFR (3) (Fasano, 2011).

4.4. Implicación de la zonulina en enfermedades intestinales

La zonulina está implicada en muchas enfermedades inflamatorias intestinales crónicas. Independientemente de la enfermedad considerada, los pasos que conducen a la ausencia de respuesta de la zonulina y posterior desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal parecen ser similares. En condiciones normales, hay un control estricto del tráfico de antígenos mucosales que, junto con las células inmunitarias específicas y con los mediadores inflamatorios, como quimiocinas y citoquinas, aumentan la resistencia de la mucosa frente al paso de antígenos.

Los estímulos ambientales provocan un desequilibrio en el microbioma desencadenando la liberación descontrolada de zonulina, lo cual causa una pérdida funcional de la barrera intestinal, con un tráfico posterior de antígenos inapropiado e incontrolado, que desencadena una respuesta inmune innata en el compartimento inmune submucosal. Si este proceso continúa, se produce una respuesta inmune adaptativa que provoca la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IFN- γ y TNF- α , las cuales provocan una mayor apertura de la vía paracelular al paso de antígenos, creando un círculo vicioso, que conduce a la rotura de la barrera intestinal y al inicio de la enfermedad inflamatoria intestinal (**Figura 11**) (Fasano, 2011).

Loss of Mucosal Immune Homeostasis

Chronic Inflammation-Allergy

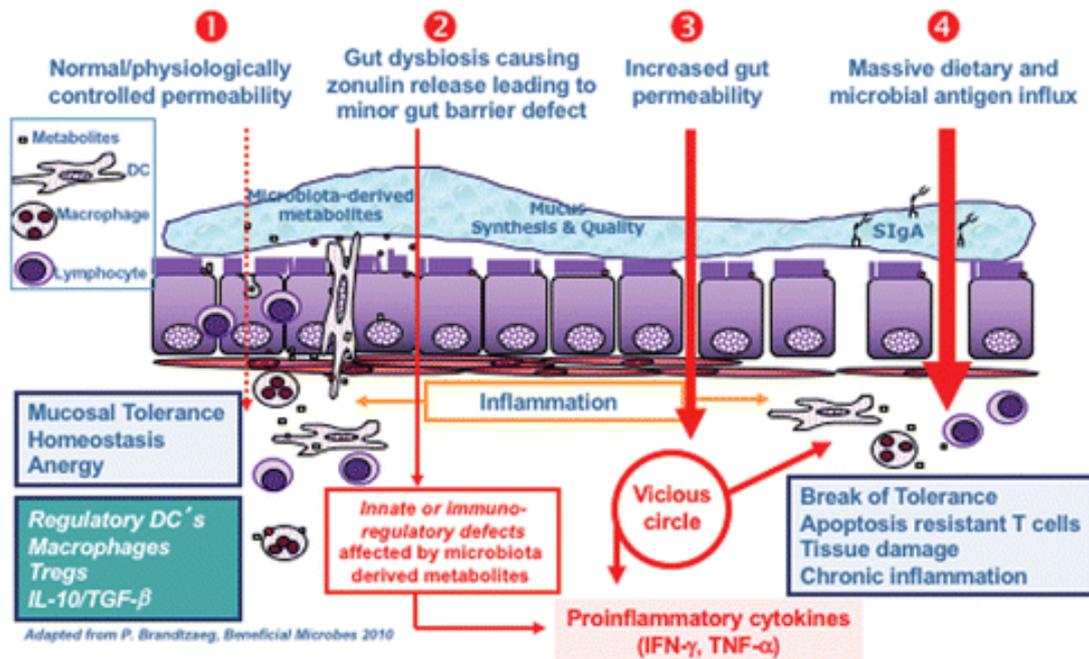


Figura 11. Mecanismo propuesto por el que la zonulina afecta a la función de la barrera intestinal y conduce al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (Fasano, 2011).

4.5. Implicación de las uniones estrechas en las enfermedades intestinales

Como ya hemos indicado anteriormente, la regulación de las uniones estrechas es esencial para mantener la homeostasis de la barrera entre el medio interno y el medio externo. La mayor parte de la investigación sobre la regulación de las uniones estrechas intercelulares se ha centrado en la disfunción mediada por citoquinas en el contexto de la inflamación crónica, particularmente aquellos procesos que afectan a la mucosa intestinal (Noth y cols., 2012).

4.5.1. Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la inflamación crónica que compromete la función de la barrera intestinal y aumenta la permeabilidad al paso de patógenos. En el hombre se diferencian dos tipos: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, que se diferencian principalmente por la zona del intestino a la que afectan, la primera puede aparecer a lo largo del tracto gastrointestinal, si bien afecta

principalmente al íleon y la segunda aparece fundamentalmente en el colon y recto; además la enfermedad de Crohn produce granulomas y fístulas, que no aparecen en la colitis ulcerativa y, mientras que en la enfermedad de Crohn, la inflamación penetra en toda la pared intestinal, de manera que queda engrosada, en la colitis ulcerosa solo afecta a la parte más profunda de la pared intestinal (Kazuo, 2010).

La enfermedad inflamatoria intestinal muestra una etiología multifactorial susceptible a factores medioambientales y desregulación inmune. Esta enfermedad está caracterizada por la inflamación intestinal (**Figura 12**) que compromete la integridad de la barrera epitelial, importante para aumentar la permeabilidad y la infiltración de patógenos. Tanto la **enfermedad de Crohn** como la **colitis ulcerativa**, tienen en común factores como la rotura del epitelio, la reducción de las uniones estrechas y la atrofia glandular. La disfunción de la barrera está causada mayoritariamente por el daño epitelial incluyendo la apoptosis, erosión y ulceración que son característicos en la inflamación intestinal. Las citoquinas inflamatorias están asociadas con la inflamación intestinal ya que cambian la permeabilidad, a través de sus efectos sobre las uniones estrechas (Landy y cols., 2016).

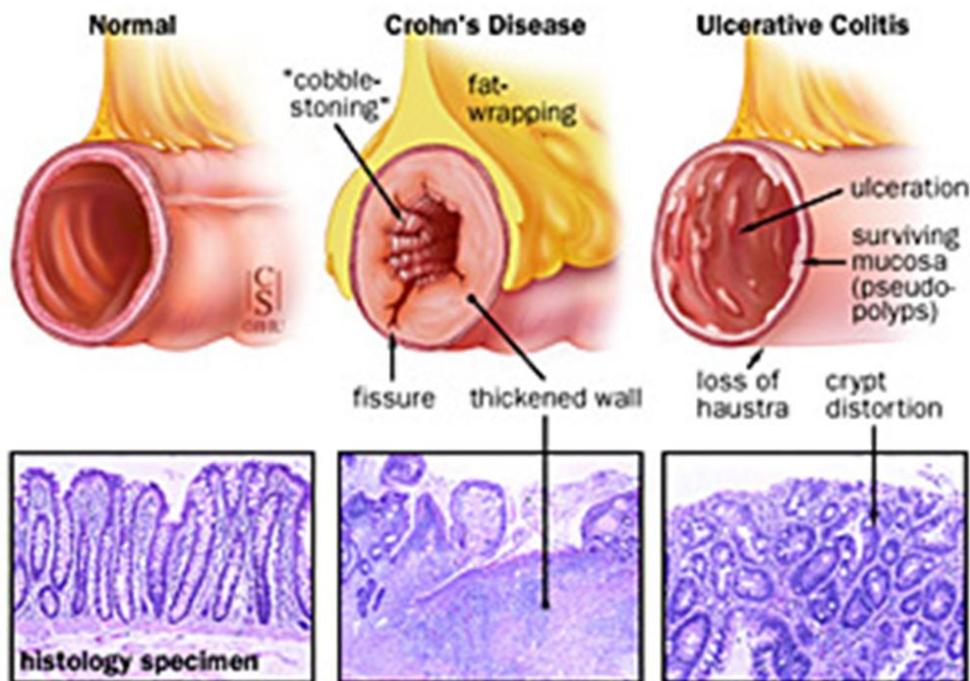


Figura 12. Esquema (parte superior) e histología (parte inferior) comparando la mucosa del colon de pacientes normales, con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerativa (Johns Jopkins Medicine, 2017).

Colitis ulcerativa

Varios estudios se han centrado en estudiar la implicación de las claudinas en pacientes con esta enfermedad, demostrando una mayor expresión de claudina 2 en muestras de colon de pacientes con colitis ulcerativa. Además, el aumento en la formación de poros en las uniones estrechas y en los niveles de expresión de claudina 2, tanto a nivel de proteína como de ARNm, se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y con la reducción del tamaño de las uniones estrechas. Sin embargo, los niveles de expresión de las claudinas 3, 4 y 7 disminuyen en la superficie del epitelio en pacientes con colitis ulcerativa (Oshima y cols., 2008).

Por otro lado, Poritz y cols. (2011), encontraron un aumento de claudina 1 y ocludina, en muestras de colon de pacientes con colitis ulcerativa en comparación con controles sanos. La gravedad de la enfermedad, determinada por el grado de inflamación, en este estudio es directamente proporcional al aumento de claudina 1 y ocludina y a las alteraciones observadas en la estructura de las uniones estrechas. Existe otro estudio que también demuestra un aumento de los niveles de claudina 1 en el colon de pacientes con colitis ulcerativa comparado con controles sanos, pero no se correlacionó con la gravedad de la enfermedad (Zwiers y cols., 2008).

También se ha demostrado una regulación positiva de la claudina 12 y de la claudina 18, pero no se correlacionaron con la gravedad de la inflamación (Zwiers y cols., 2008).

En otro estudio se observó un cambio en el lugar de expresión de las claudinas durante la inflamación. Así, la expresión de claudina 1 fue desregulada en ambos tipos de pacientes, tanto con la colitis ulcerativa como con la enfermedad de Crohn y la localización de la claudina 1 no se limitaba a la unión estrecha, sino que se expresaba en la membrana lateral. La expresión de claudina 2 fue la más abundante en la región de la unión estrecha y en el citoplasma apical (Weber y cols., 2008).

Enfermedad de Crohn

En esta enfermedad, la permeabilidad intestinal es considerada un factor predictivo para la susceptibilidad y recaída de la enfermedad (D'Inca y cols., 1999). Los pacientes con esta enfermedad, presentan una pérdida de función de barrera de las uniones estrechas.

Se ha descrito una alteración en la distribución de la expresión de la claudina 2 en biopsias de colon de pacientes con enfermedad de Crohn, que se ha asociado a la rotura de las uniones estrechas (Landy y cols., 2016).

4.5.2. Síndrome del intestino irritable

El síndrome del intestino irritable, es un trastorno gastrointestinal funcional común. Se caracteriza por dolor o malestar intestinal, alteración de los hábitos intestinales y alivio de los síntomas tras la defecación. Puede presentarse con estreñimiento, diarrea o una mezcla de ambos (Mizukami y cols., 2017).

La fisiopatología que conduce al desarrollo del síndrome del intestino irritable es desconocida, pero se ha informado de que los pacientes con esta enfermedad tienen un aumento de la permeabilidad intestinal (Camilleri y Gorman, 2007).

Datos recientes muestran que los pacientes con síndrome del intestino irritable con diarrea asociada tienen aumentados los niveles de zonulina sérica. Se ha sugerido que el receptor PAR2 está implicado en el aumento de la permeabilidad detectada en pacientes con síndrome del intestino irritable (Bueno, 2008).

En conjunto, estos datos sugieren que la señalización de la zonulina a través de PAR2 puede estar involucrada en la patogénesis del síndrome de intestino irritable.

Por otro lado, se ha descrito que pacientes con síndrome del intestino irritable que llevan el genotipo HLA-DQ2 o DQ8 (marcadores de susceptibilidad genética en celíacos) presentan aumentada la permeabilidad intestinal y disminuida la expresión de las proteínas de las uniones estrechas (Vazquez-Roque y cols., 2012).

4.5.3. Enfermedades neoplásicas

El tránsito de antígenos y metabolitos a través de la barrera intestinal promueve la inflamación crónica y el cáncer colorrectal. En general, las claudinas están asociadas con diferentes tipos de neoplasias, quizás también están involucradas en la progresión de la metástasis y en el aporte de una señalización desfavorable en el camino entre el medio externo e interno (Mullin, 1997).

Se ha realizado un estudio utilizando una combinación de muestras obtenidas de plasma de ratón y humano, de 52 afectados de cáncer colorrectal. Los autores aplicaron análisis proteómicos para validar la expresión de los biomarcadores de este tipo de cáncer en ratones y pacientes humanos. El perfil proteómico de las muestras del plasma de ratón indicó que las haptoglobinas estaban desreguladas en los ratones con esta enfermedad. Las muestras de plasma mostraron un nivel significativamente más alto de haptoglobina en las muestras de ratones enfermos que en los controles. La expresión de estas proteínas en humanos mostró

una estrecha correlación entre el aumento del nivel de haptoglobina y las diferentes etapas de la enfermedad (Lai y cols., 2010).

Mees y cols. (2009) analizaron la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en pacientes con cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerativa. Las claudinas 1, 3, 4 y la β -catenina de las uniones adherentes están desreguladas en el tejido con cáncer colorrectal en comparación con los controles. Por el contrario, la expresión de la claudina 2, la ocludina o la ZO-1 no varía significativamente en las distintas muestras. Sin embargo, otros autores han demostrado una elevación de las claudinas 1 y 2 en el cáncer colorrectal asociado a la inflamación intestinal (Dharwan y cols., 2011).

Se ha sugerido que los cambios en la expresión de las uniones estrechas en la displasia asociada a enfermedad inflamatoria intestinal, pueden estar relacionados con la gravedad y longevidad de la inflamación histológica, por lo que podrían utilizarse como marcadores de la progresión neoplásica en la enfermedad (Gupta y cols., 2007).

4.5.4. Enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca es una enteropatía autoinmune desencadenada por la ingesta de granos que contienen gluten en individuos genéticamente susceptibles. La enfermedad celiaca es un trastorno genético complejo en el que se han identificado muchas asociaciones de genes. Se ha identificado que el alelo HLA representa hasta un 40% de la carga genética. La presencia de los haplotipos DQ2 o DQ8 son necesarios pero no suficientes para desarrollar la enfermedad ya que aproximadamente el 40% de la población general también los tienen.

La ingesta de gluten en pacientes con enfermedad celiaca causa la destrucción de las vellosidades intestinales a través de un mecanismo solo parcialmente establecido.

El diagnóstico se basa en la detección serológica de autoanticuerpos frente a la enzima transglutaminasa tisular, seguida de una endoscopia superior con biopsia duodenal que muestra la típica enteropatía autoinmune celiaca caracterizada por la presencia de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de criptas y acentuación de las vellosidades.

Las opciones terapéuticas actualmente se limitan a la restricción dietética de gluten de la dieta, es decir, al consumo de una dieta libre de gluten. Esto permite que la mucosa intestinal se cure y la arquitectura de las vellosidades vuelva a su situación normal. Aunque el diagnóstico se basa en la biopsia intestinal, la enfermedad celíaca es una enfermedad

sistémica que puede afectar a muchos órganos diferentes y causar varios síntomas extra-intestinales (Sturgeon y Fasano, 2016).

El **gluten** es una molécula compleja que consiste en gliadina y glutenina (**Figura 13**). La gliadina es una subunidad de la proteína del gluten que se encuentra en el trigo, centeno y cebada. A través de una extensa investigación se han identificado al menos 50 epítomos tóxicos. Sus efectos incluyen citotoxicidad, inmunomodulación y disrupción de la barrera. El fragmento de α -gliadina ha sido mapeado con dominios específicos que ejercen diferentes efectos sobre el cuerpo. Así: el péptido 31-43 ejerce un efecto citotóxico, el 57-89 (denominado 33mer) ejerce un efecto inmunomodulador, los 111-130 y 151-170 son capaces de unirse al receptor intestinal de quimiocinas CXCR3, y los péptidos 261-277 producen la liberación de la interleuquina-8. La unión de la gliadina al receptor CXCR3 aumenta la liberación de zonulina (Sturgeon y Fasano, 2016).

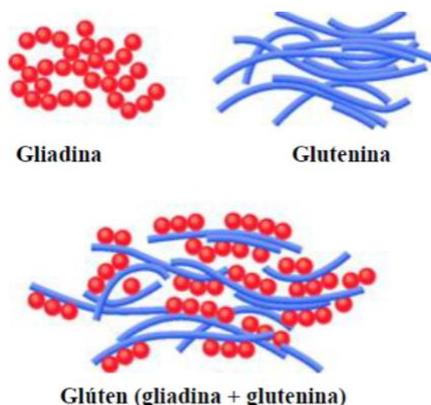


Figura 13. Composición del gluten, mostrando la estructura de sus componentes principales: la gliadina y la glutenina (Fasano, 2011)

La enfermedad celiaca se ha utilizado como un modelo para estudiar el efecto de la zonulina ya que su participación en el desarrollo y la patogénesis de la enfermedad ha sido bien documentada (Fasano y Shea-Donohue, 2005). En los pacientes con enfermedad celiaca, la zonulina se produce después de la ingesta de gluten. Se ha demostrado que la exposición de biopsias intestinales a fragmentos de gliadina digeridos con tripsina “in vitro” causó un aumento en la liberación de zonulina (**Figura 14**). Se han medido los niveles de zonulina en pacientes con enfermedad celiaca en remisión y en controles sanos. En los controles sanos el nivel de liberación de zonulina fue bajo y estrictamente regulado, sin embargo, en los pacientes con enfermedad celiaca la liberación de zonulina fue mucho mayor y prolongada después de la estimulación con gliadina, seguida por un aumento significativo en la

permeabilidad intestinal. Además, en pacientes con enfermedad celiaca en remisión completa sin estimulación con gliadina, los niveles de zonulina estaban constitutivamente aumentados en el intestino, lo que se correlacionó con el aumento de la permeabilidad intestinal en comparación con controles sanos (Grago y cols., 2006).

La liberación de zonulina y el consiguiente aumento de la permeabilidad intestinal se bloqueó usando el antagonista de la zonulina: AT-1001. El AT1001, ahora denominado acetato de Larazotide, es un péptido sintético de 8 aminoácidos que antagoniza la vía de la zonulina (Sturgeon y Fasano, 2016). Ensayos preclínicos han demostrado que este acetato de larazotide es capaz de prevenir la actividad de la zonulina sobre la permeabilidad intestinal (Watts y cols., 2005).

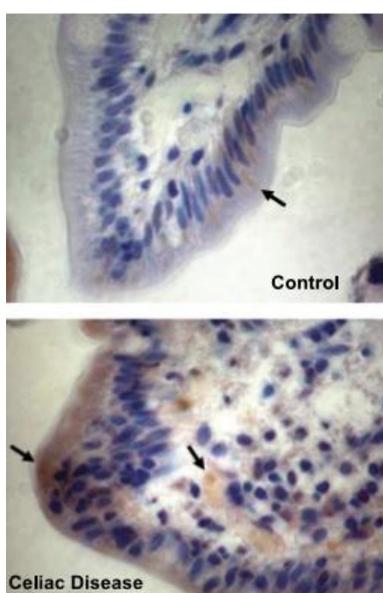


Figura 14. Microfotografías de tejidos de intestino delgado de un control sano y de un paciente con la enfermedad celiaca activa teñidas con anticuerpos anti-Zot. Las flechas indican la presencia de zonulina que se sobreexpresa en los pacientes celiacos en comparación con los controles sanos (Fasano, 2011).

El acetato de larazotide está actualmente en ensayos clínicos como tratamiento para la enfermedad celiaca. Los resultado de los ensayos clínicos de fase II han demostrado que después de la administración de gluten en pacientes hospitalizados, el acetato es capaz de disminuir la permeabilidad intestinal, disminuyendo los síntomas gastrointestinales y los extraintestinales (Paterson y cols., 2007).

Además, un estudio realizado en pacientes que presentaban síntomas persistentes a pesar de seguir una dieta libre de gluten estricta mostró que el larazotide era capaz de reducir sus

síntomas (Leffler y cols., 2015). El acetato de larazotide está entrando ahora en ensayos clínicos de fase III en pacientes con enfermedad celiaca.

5. Conclusiones

1. En condiciones normales, las uniones estrechas regulan la permeabilidad paracelular del epitelio y mantienen la homeostasis intestinal.
2. La alteración de las uniones estrechas está implicada en el desarrollo de enfermedades intestinales.
3. La zonulina aumenta la permeabilidad intestinal mediante el desensamblaje de las uniones estrechas.
4. La claudina 2 parece estar aumentada en la colitis ulcerativa y en la enfermedad de Crohn.
5. En la colitis ulcerativa se ha demostrado una disminución de las claudinas 3,4 y 7 y un aumento de la claudina 1.
6. En el síndrome del intestino irritable con diarrea asociada se produce un aumento de los niveles de zonulina sérica.
7. En el cáncer colorrectal hay un aumento de la permeabilidad de las uniones estrechas, sin embargo, no existe consenso en si puede deberse a un aumento de la zonulina o a un cambio en la expresión de determinadas claudinas.
8. En la enfermedad celiaca, el aumento de permeabilidad del epitelio intestinal se debe a un aumento de los niveles de zonulina. El uso terapéutico de un antagonista de la zonulina, el acetato de Larazotide, parece mejorar las alteraciones propias de la enfermedad y, actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III.

6. Bibliografía

Alberts B, Bray D, Hopkin k, Johnson A, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Walter P. Introducción a la biología celular. 3ª Ed. Madrid: Editorial medica panamericana; 2011

Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:411-20.

Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, Enav B, Shehadeh N, Kanter Y, Lache O, y cols. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003; 92: 1193-200.

Bevins C, Salzman N. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 356-68.

Bueno L. Protease activated receptor 2: a new target for IBS treatment. *Eur Rev Med PharmacolSci*. 2008; 12 Suppl 1: 95-102.

Camilleri M, Gorman H. Intestinal permeability and irritable bowels syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2007; 19: 545-52.

Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*. 2000; 164: 966-72.

Coelho AM, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J, Bueno L. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*. 2002; 122: 1035-47.

Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, Yeatman TJ, Harris RC, Washington MK, Wilson KT, Beauchamp RD, Singh AB. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene*. 2011; 30: 3234-3247

D'Inca R, Di Leo V, Corrao G, Martines D, D'Odorico A, Mestriner C, Venturi C, Longo G, Sturniolo GC. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2956-2960.

Drago S, El AR, Di PM, Grazia CM, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41: 408 – 419.

Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 715-720.

Fasano A. Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications of Zonulin-Mediated Intestinal Barrier Modulation. November 2008. Volume 173, Issue 5, Pages 1243–1252

Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.* 2011; 91(1):151-75

Fleming TP, Ghassemifar MR, Sheth B. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Semin Reprod Med.* 2000; 18: 185–193.

Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 181–188.

Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology.* 2001; 121: 1320-1328.

Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124: 3-20.

Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C, Ullman T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2007; 133: 1099-1105; quiz 1340-1341.

Johns Hopkins Medicine. Gastroenterology and Hepatology, 2017 (https://www.halstedurgery.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Disease_ID=2A4995B2-DFA5-4954-B770-F1F5BAFED033&GDL_DC_ID=D03119D7-57A3-4890-A717-CF1E7426C8BA)

Kazuo J. Enfermedad inflamatoria intestinal. Aspectos básicos y clínicos. 1ª Ed: Editorial Alil, Mexico; 2010

Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK, Bunnett NW. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. Proc Natl AcadSci U S A. 1997; 94: 8884-9

Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. Semin Cell Dev Biol. 2014; 36: 166-176

Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. Am J Pathol. 2001; 159: 2001-2009.

Lai CH, Chang NW, Lin CF, Lin CD, Lin YJ, Wan L, Sheu JJ, Chen SY, Huang YP, Sing YT, Tao TW, Lai CK, Tsai MH, Chan HL, Jou YJ, Lin CW. Proteomics-based identification of haptoglobin as a novel plasma biomarker in oral squamous cell carcinoma. ClinChimActa. 2010; 411: 984–991.

Landy J, Ronde E, English N, Clark S, Hart A, Knight S, Ciclitira P, Al-Hassi H. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2016 ; 22(11): 3117-3126

Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. CurrOpinGastroenterol.2006; 22: 85– 89.

Leffler DA, Kelly CP, Green PH, Fedorak RN, DiMarino A, Perrow W, Rasmussen H, Wang C, Bercik P, Bachir NM, y cols. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. Gastroenterology. 2015; 148: 1311-9 e6.

Madara JL, Dharmasathaphorn K. Occluding junction structurefunction relationships in a cultured epithelial monolayer. J Cell Biol. 1985; 101: 2124–2133.

Mees ST, Mennigen R, Spieker T, Rijcken E, Senninger N, Haier J, Bruewer M. Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin. Int J Colorectal Dis. 2009; 24: 361-368.

Mizukami T, Sugimoto S, Masaoka T, Suzuki H, Kanai T. Colonic dysmotility and morphological abnormality frequently detected in Japanese patients with irritable bowel syndrome; 2017

Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool*. 1997; 279: 484-489.

Noth R, Stuber E, Hasler R, Nikolaus S, Kuhbacher T, Hampe J, Bewig B, Schreiber S, Arlt A. Los anticuerpos anti-TNF- α mejoran la función de barrera intestinal en la enfermedad de Crohn. *J Crohns Colitis*. 2012; 6: 464-9.

Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23 Suppl 2: S146-S150.

Pascual S, Martínez J, Pérez-Mateo M. The intestinal barrier: Functional disorders in digestive and non-digestive diseases. *Gastroenterol Hepatol*. 2001; 24:256-67.

Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26: 757-66.

Poritz LS, Harris LR, Kelly AA, Koltun WA. Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig Dis Sci*. 2011; 56: 2802-2809.

Qin X, Caputo F, Xu D, y cols. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. *Shock*. 2008; 29: 372-6.

Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2011; 32:256-64.

Salzman N, Hung K, Haribhai D, y cols. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010; 11(1):7683.

Sarker S, Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut*. 1992; 33(7):987-93.

Shan M, Gentile M, Yeiser J, y cols. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*. 2013; 342: 447-53.

Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci.* 2006; 119: 2095-106.

Shen L, Weber CR, Turner JR. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol.* 2008; 181: 683-695.

Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Journal. Tissue Barriers* 2016 4

Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalis TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as preheparin-binding protein-2. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2009; 106: 16799-804.

Turner J. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:799-809.

Ugolev A, De Laey P. Membrane digestion. A concept of enzyme hydrolysis on cell membranes. *BiochimBiophysActa.* 1973; 300: 10528.

Vazquez-Roque MI, Camilleri M, Smyrk T, Murray JA, O'Neill J, Carlson P, Lamsam J, Eckert D, Janzow D, Burton D, et al. Association of HLA-DQ gene with bowel transit, barrier function, and inflammation in irritable bowel syndrome with diarrhea. *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.* 2012; 303: G1262-9

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 24: 4435-40.

Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, Fasano A. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2005; 102: 2919-21.

Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest.* 2008; 88: 1110-1120

Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 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: 61-7257.

Zwiers A, Fuss IJ, Leijen S, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. Increased expression of the tight junction molecule claudin-18 A1 in both experimental colitis and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 1652-1659.