



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**

**“La ausencia de ZO-2 favorece la entrada a la senescencia  
de las células epiteliales de riñón”**

**T E S I S**

Que presenta

**LBM BALDUINO BARRALES FUENTES**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

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

Directora de la Tesis

**Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel**

**Ciudad de México**

**Agosto 2018**

**Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel profesora titular del laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario de CONACYT No. 615645)**

## Agradecimientos

*A la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por permitirme formar parte de su laboratorio y por educarme en este camino de la investigación, siempre se lo agradeceré.*

*Al Dr. Porfirio Nava Domínguez y al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por su apoyo y dedicación en la revisión de esta tesis.*

*A mis compañeros de laboratorio: Misael, Mario, Perla, Paco, Elida, Cristina, Jael y Christian, por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio además de su apoyo y amistad.*

*A la Q.F.B. María de Lourdes Alarcón Mortera y a la M. en C. Dolores Martín Tapia por su apoyo para la realización de éste trabajo de tesis. Sus consejos y enseñanzas siempre las recordare. Al Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra por proporcionarme siempre a tiempo y en excelentes condiciones el material que necesite para mi trabajo. A Alicia Teudosio Díaz por su invaluable trabajo.*

*A la Dra. Ruth Abigail Pacheco Rivera por su apoyo invaluable para la realización de esta tesis, gracias por los consejos, reactivos y las charlas.*

*A mis compañeros de maestría, fue un placer coincidir con ustedes en el posgrado, Enrique, Marilyn, Cristina, Karen, Toño, Narek, cada uno de ustedes se merece mi respeto, mi amistad y en lo que necesiten, ahí estaré.*

*A mis amigos, Mary, Laura, Alan, Octavio, Felipe, Helios, gracias a ustedes por sus consejos, por los momentos de diversión, por los momentos de tristeza, por ser mi familia en la Ciudad de México.*

*A mi familia, que son una parte esencial del ánimo que tengo por hacer lo que me apasiona. Gracias a mis hermanas y a mi nuevo hermano, que siempre me han apoyado Citlali, Lisbeth, Selene y Emmanuel.*

*Pero sobre todo agradezco a mis padres. Ustedes son mi fortaleza, ustedes son mi ánimo para seguir adelante cumpliendo mis sueños. Gracias por tanto, porque mis logros también son suyos, los amo.*

## INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
I. Introducción.....	5
1.1 Senescencia celular.....	5
1.2 Estados desencadenantes de la senescencia celular.....	5
1.3 Marcadores de senescencia celular.....	6
1.4 La senescencia en las células epiteliales.....	9
1.5 La senescencia y la regulación del ciclo celular.....	11
1.6 La radiación ultravioleta induce senescencia celular.....	12
2. Uniones estrechas.....	13
3. ZO-2.....	14
3.1) Localización y tráfico de ZO-2.....	15
3.2) Función de ZO-2.....	16
3.2.1) Función en la membrana plasmática.....	16
3.2.2) Función en el núcleo.....	17
4. Observaciones que sugieren que la ausencia de ZO-2 induce senescencia en las células epiteliales.....	17
II. Planteamiento del problema.....	18
III. Hipótesis.....	18
IV. Objetivo.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos experimentales.....	18

V) Metodología.....	19
5.1 Cultivo celular.....	19
5.2 Irradiación con luz UV.....	19
5.3 Ensayo de $\beta$ -galactosidasa.....	19
5.4 Western Blot.....	20
5.5 Inmunoensayo para citocinas.....	21
VI. Resultados.....	22
6.1 La ausencia de ZO-2 promueve la aparición de la $\beta$ -galactosidasa.....	22
6.2 En ausencia de ZO-2 disminuye de manera más pronunciada la expresión de lámina B1.....	24
6.3 La ausencia de ZO-2 aumenta la secreción de GM-CSF y disminuye la IL-12 .....	25
VII. Discusión.....	27
VIII. Bibliografía.....	29

## Resumen

La senescencia es un estado de arresto de la proliferación de células metabólicamente activas. Constituye un fenotipo estable y resistente a la apoptosis que evita la proliferación de las células dañadas. Previamente se demostró en las células epiteliales MDCK que la ausencia de ZO-2, una proteína periférica de las uniones estrechas, induce hipertrofia, retrasa el tránsito de las fases G1 a S del ciclo celular y provoca la acumulación de YAP en el núcleo donde induce la transcripción de un miRNA que inhibe la traducción de la fosfatasa PTEN. Estas observaciones sugerían que la ausencia de ZO-2 podría desencadenar senescencia. En esta tesis analizamos si esto sucede en células MDCK parentales y ZO-2 KD expuestas a 5 radiaciones consecutivas de luz UV-C. Analizamos en estas condiciones el fenotipo secretor de citocinas y la expresión de dos marcadores clásicos de la senescencia: el incremento de  $\beta$ -galactosidasa y la disminución de lámina B1. Encontramos que la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa sube conforme aumentan los días de irradiación con luz UV-C en las células ZO-2 KD con respecto a las parentales y que, la expresión de lámina B1 disminuye a partir del tercer día de irradiación con luz UV-C tanto en las células MDCK parentales como en las ZO-2 KD. Sin embargo notamos que esta disminución es más pronunciada en las células ZO-2 KD que en las parentales, al quinto día de irradiación. Además, vemos un aumento en la secreción de la citocina proinflamatoria GM-CSF y una disminución en la citocina anti inflamatoria IL-12, en las células ZO-2 KD con respecto a las parentales, al quinto día de irradiación con luz UV-C. En conjunto estos resultados indican que la ausencia de ZO-2 favorece el ingreso de las células a la senescencia ante la presencia de estímulos dañinos como la luz UV.

## **Abstract**

Cellular senescence, is a process that induces proliferative arrest of damaged cells that yet remain metabolically active and resistant to apoptosis. Previously, we demonstrated that in epithelial MDCK cells the absence of the tight junction peripheral protein, ZO-2, induces cell hypertrophy, delays cell-cycle transition from G1 to S phase, and triggers a nuclear accumulation of YAP, an oncogenic protein that induces the transcription of a miRNA that blocks the translation of phosphatase PTEN. These observations suggested that the absence of ZO-2 might trigger cellular senescence. Here, we analyzed the increased expression of  $\beta$ -galactosidase and lamin B1 silencing, as markers of senescence, as well as the secretion of cytokines in parental and ZO-2 KD MDCK cells exposed to UV-C light ( $2 \text{ J/m}^2$ ). We found that in ZO-2 KD cells,  $\beta$ -galactosidase expression increased with days of UV-C irradiation, while the enzyme expression is barely detectable in parental cells. Lamin B1 expression decreased since the third day of UV-C irradiation in both ZO-2 KD and parental cells. However, the reduction in lamin B1 expression was more pronounced in ZO-2 KD cells after 5 days of UV-C irradiation, than in parental cells. In addition, we observed an increase secretion of proinflammatory cytokine GM-CSF; and decreased of the anti-inflammatory IL-12, in MDCK ZO-2 KD cells in comparison to parental cells after 5 days of UV-C irradiation. Altogether these results indicate that the absence of ZO-2 favors the entry into senescence of cells subjected to a damaging agent like UV light.

## **Lista de abreviaturas**

<b>ABR</b>	Región de unión a actina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Akt</b>	Serina/treonina cinasa
<b>ATM</b>	Cinasa de serinas y treoninas mutada en la ataxia telangiectasia
<b>ATR</b>	Cinasa de serinas y treoninas relacionada a la ataxia telangiectasia y a rad 3
<b>BHT</b>	Barrera hematotesticular
<b>CDK2</b>	Cinasa dependiente de ciclina 2
<b>CDK4</b>	Cinasa dependiente de ciclina 4
<b>CDKN1</b>	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1
<b>CHK1</b>	Cinasa del punto de control 1 del ciclo celular
<b>CHK2</b>	Cinasa del punto de control 2 del ciclo celular
<b>CXCL1</b>	Ligando de quimiocinas con motivos C-X-C 1
<b>DDR</b>	Respuesta al daño al ADN
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EMT</b>	Transición de epitelio a mesénquima
<b>HDACS</b>	Desacetilasa de histonas
<b>HP1</b>	Proteína de la heterocromatina 1
<b>IGFBP-II</b>	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>JAM</b>	Molécula de adhesión de la unión estrecha
<b>MAGI</b>	MAGUK invertida
<b>MAGUK</b>	Proteína asociada a la membrana y homologa a la cinasa de guanilato
<b>MCP1</b>	Proteína 1quimioatrayente de monocitos
<b>MDCK</b>	Células de riñón de perro aisladas por Madin y Darby



<b>MDM2</b>	Ubiquitin ligasa de murino doble minuto 2
<b>mTORC1</b>	Diana de la rapamicina en células de mamífero
<b>NES</b>	Señal de exportación nuclear
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>OIS</b>	Senescencia inducida por oncogenes
<b>PDK1</b>	Cinasa de piruvato deshidrogenasa 1
<b>PH</b>	Dominios homólogos de plectrina
<b>PIP3</b>	Fosfatidil inositol 3, 4,5 trifosfato
<b>PKC<math>\epsilon</math></b>	Proteína cinasa C épsilon
<b>PR</b>	Región rica en prolinas
<b>PTEN</b>	Homólogo de tensina y fosfatasa
<b>Rb</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SIPS</b>	Senescencia prematura inducida por estrés
<b>SRPK</b>	Proteína cinasa específica de los repetidos de serina y arginina
<b>TAMP</b>	Proteína MARVEL asociada a las uniones estrechas
<b>TEAD</b>	Factor potenciador de la transcripción de TEF-1
<b>TIS</b>	Senescencia inducida por terapia
<b>UA</b>	Unión adherente
<b>UE</b>	Unión estrecha
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>YAP</b>	Proteína asociada a Yes
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens 1
<b>ZO-2</b>	Zonula occludens 2
<b>ZO-3</b>	Zonula occludens 3
<b><math>\beta</math>-gal</b>	Beta-galactosidasa

## **I. Introducción**

El envejecimiento es una característica común de todos los seres vivos y se caracteriza por una pérdida progresiva del funcionamiento de los tejidos.

En los mamíferos, la degeneración relacionada a la edad, eleva la posibilidad de padecer diversas patologías como diabetes mellitus tipo II, aterosclerosis, falla cardíaca y osteoporosis, así como diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. El envejecimiento celular también puede llevar a las células a proliferar de manera descontrolada generando hiperplasia, lo que provoca inestabilidad genómica e incrementa la posibilidad de que las células se conviertan en cancerosas (Hanahan D et al., 2011).

### **1.1 Senescencia celular**

La senescencia es un estado de arresto de la proliferación de células metabólicamente activas a pesar de la presencia de estímulos mitogénicos. La senescencia constituye un fenotipo estable y resistente a la apoptosis que disminuye la función de los órganos (Marcotte et al., 2005).

El arresto del ciclo celular en la senescencia responde a un rango amplio de estímulos incluidos el estrés, la falta de protección de los telómeros, el daño al ADN y la activación de oncogenes (Campisi et al., 2007).

### **1.2 Estados desencadenantes de la senescencia celular**

La primera descripción de senescencia se refiere a la replicativa, donde se observa que los fibroblastos en cultivo después de un número finito de divisiones celulares entran en arresto celular (Hayflick et al., 1961). Cada división celular conduce a un acortamiento gradual de los telómeros en las células somáticas. Así, en promedio se pierden entre 30 y 200 pares de bases por división celular, lo que eventualmente conduce al arresto del ciclo celular. A este fenómeno se le denomina senescencia por acortamiento de los telómeros (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

Existe también otro estado de senescencia originado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se denomina senescencia prematura inducida por

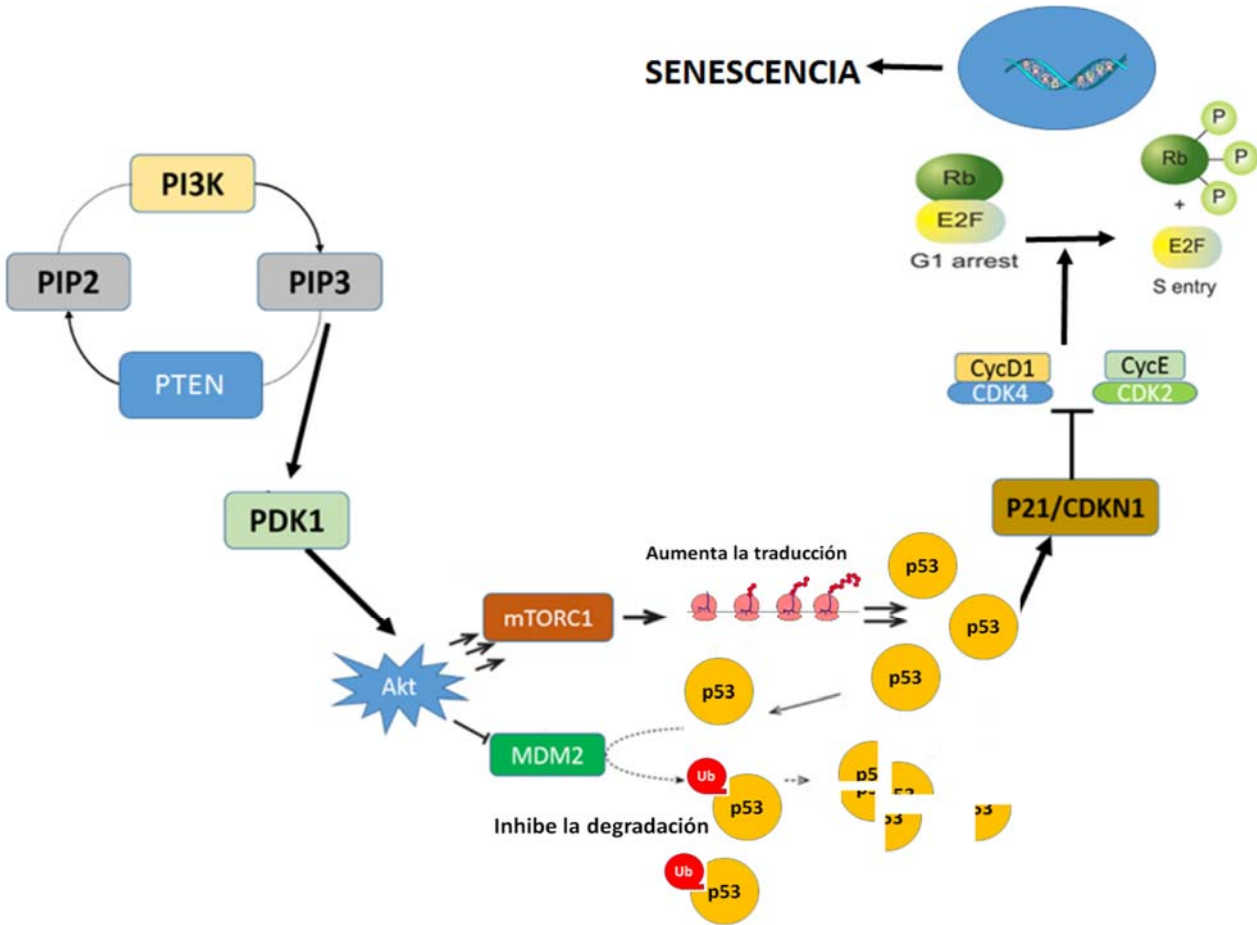
estrés o SIPS por sus siglas en inglés. Por otra parte, la sobreactivación de oncoproteínas como por ejemplo Ras, desencadena la senescencia inducida por oncogenes u OIS y los daños físicos o químicos al ADN por la quimio o radio terapia contra el cáncer inducen la senescencia inducida por terapia o TIS (Abbadie et al., 2017). Es relevante destacar que estas condiciones patológicas, clínicas o experimentales que inducen senescencia encienden mecanismos similares a nivel celular.

### 1.3 Marcadores de senescencia celular

Se han propuesto 7 marcadores de senescencia aunque estos no siempre están presentes al mismo tiempo:

- a) El alargamiento celular, que produce un incremento en la extensión de las células sobre el sustrato.
- b) La presencia de células multinucleadas que se originan por fallas en la mitosis. Si se producen defectos en la mitosis por acción de los oncogenes, o se altera la expresión de los genes que regulan la mitosis se producen células multinucleadas que entran en senescencia por arresto del ciclo celular. (Dikovskaya et al., 2015).
- c) La inactivación aguda de PTEN, el homólogo de tensina y fosfatasa, provoca un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, que puede ser prolongado o irreversible y se asocia a la aparición de células multinucleadas. Al disminuir el contenido de PTEN aumenta la concentración de PIP3 en la membrana y en consecuencia Akt y PDK1 se reclutan a la membrana a través de sus dominios homólogos de plectrina (PH) con alta afinidad al PIP3. En la membrana PDK1 fosforila a Akt en la T308 y la activación de Akt estimula a mTORC1 lo que aumenta la traducción de p53, e inhibe a la ubiquitin ligasa MDM2 que marca a p53 para su degradación (Aistle et al., 2012). El incremento de p53 induce la activación de p21/CDKN1 que bloquea a los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina D-CDK4 lo cual induce un arresto del ciclo celular que desencadena senescencia (Chen Z. et al., 2005) **Figura 1.**

- d) El incremento en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal. En las células senescentes es mayor el contenido de  $\beta$ -galactosidasa y la actividad de esta enzima se detecta aún en un pH cercano al neutro y no en un pH ácido como ocurre en las células sanas (Kurz et al., 2000).
- e) Los cambios en la organización de la heterocromatina. La heterocromatina corresponde a regiones compactas del ADN asociadas a histonas que no se pueden replicar y que por estar muy empaquetadas se tiñen fuertemente con colorantes para el ADN como el DAPI. En las células senescentes aparecen focos de heterocromatina por la metilación en la K9 de la histona 3 (H3). La metilación de la H3 compacta al ADN e induce el silenciamiento de genes regulados por sitios E2F. A estos sitios también se reclutan las proteínas Rb y la proteína de la heterocromatina 1 (HP1) (Narita et al., 2003).
- f) Los cambios en la composición del secretoma. Se manifiestan por la secreción de citocinas proinflamatorias y factores remodeladores de la matriz extracelular como las interleucinas 6 y 8 (IL-6 y IL-8), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) y el ligando de quimiocinas CXC 1 (CXCL1). Ésta secreción sirve para comunicar el daño a las células vecinas, reparar el tejido o estimular al sistema inmune para eliminar a las células senescentes (Campisi et al., 2013).
- g) La pérdida de la expresión de lámina B1. Esta proteína interacciona con la envoltura nuclear y regula el tamaño, la forma y la estabilidad mecánica del núcleo. En los fibroblastos humanos el silenciamiento de lámina B1 retrasa la proliferación e induce senescencia prematura (Shimi et al., 2011) y en los fibroblastos derivados de pacientes con progeria de Hutchinson-Gilford, un síndrome de envejecimiento acelerado, disminuye la expresión de lámina B1 (Chojnowski et al., 2015). La pérdida de lámina B1 también se utiliza para cuantificar la senescencia inducida por la exposición a los rayos UV en los queratinocitos humanos (Shimei Wang et al., 2017).



**Figura 1. Al disminuir PTEN se induce la senescencia a través de p53.** La disminución de PTEN aumenta la concentración de PIP3 y activa a la enzima Akt que bloquea la degradación de p53 porque inhibe la acción de la ubiquitin ligasa MDM2 y aumenta la traducción de p53 a través de mTORC1. El incremento de p53 induce la activación de p21/CDKN1 que bloquea a los complejos CycD1/CDK4 y CycE/CDK2, induciendo así un arresto del ciclo celular y la senescencia (Imagen tomada y modificada de Astle et al., 2012; Rufini et al., 2013)

#### **1.4 La senescencia en las células epiteliales**

Los fibroblastos han sido el modelo más estudiado de senescencia celular. Sin embargo, la senescencia también está presente en los epitelios.

Los epitelios en los organismos multicelulares recubren al cuerpo y a las cavidades y los ductos, y protegen al cuerpo de microorganismos, toxinas, trauma mecánico, radiaciones y de la evaporación del agua. Los epitelios también regulan el intercambio de sustancias entre el medio externo o el contenido de las cavidades del organismo, y los tejidos subyacentes. Esto lo hacen por la vía transcelular a través de bombas, acarreadores y canales, y por la vía paracelular a través del espacio entre las células adyacentes donde el tránsito se regula por las uniones estrechas (UEs) (González-Mariscal et al., 2012).

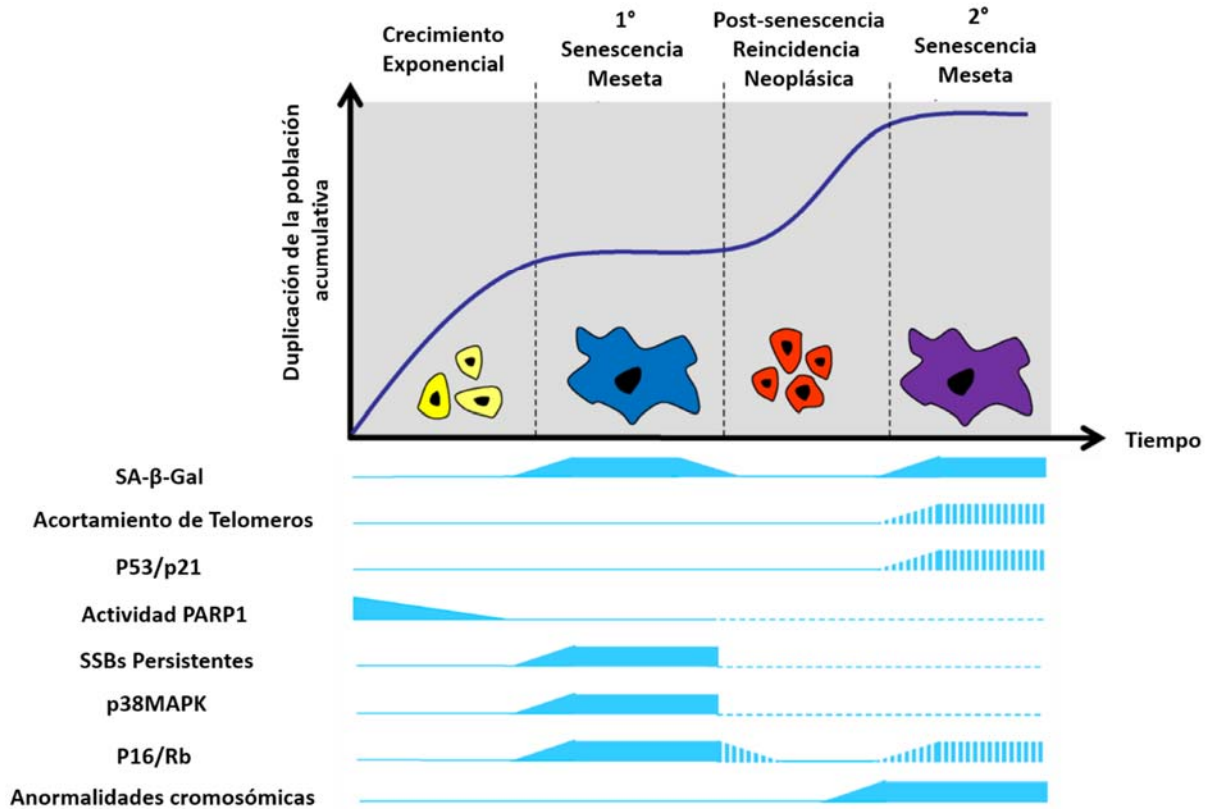
Las células epiteliales por estar en contacto directo con el medio externo y en constante replicación son muy susceptibles al cáncer. Por ello en los epitelios la senescencia es muy importante, pues evita la proliferación de las células dañadas.

En los epitelios en cultivo, la senescencia ocurre espontáneamente en dos etapas. Así, las células que se encontraban creciendo de forma exponencial entran en una fase de arresto después de 10 a 20 pasajes. En esta primera meseta denominada senescencia temprana, las células se extienden sobre el sustrato y adquieren una morfología aplanada, exhiben actividad de  $\beta$ -gal, un secretoma inflamatorio, y aparecen células con múltiples núcleos. El arresto del ciclo celular ocurre principalmente en la fase G1 (Abbadie et al 2015) y es casi irreversible, ya que solo alrededor de 1 en 10,000 células se escapa espontáneamente de este estado de senescencia, pierde la actividad de  $\beta$ -gal y entra nuevamente al ciclo celular. Estas células, pueden desencadenar una neoplasia al sobreexpresar a proteínas antiapoptóticas como MCL1 y BCL-XL (de Carné Trécesson et al., 2011)

#### **Figura 2.**

Las células post-senescentes entran posteriormente a una segunda meseta denominada agonescencia. En esta fase las células son tetraploides, su morfología es alargada y aplanada, exhiben actividad de  $\beta$ -galactosidasa y expresan a

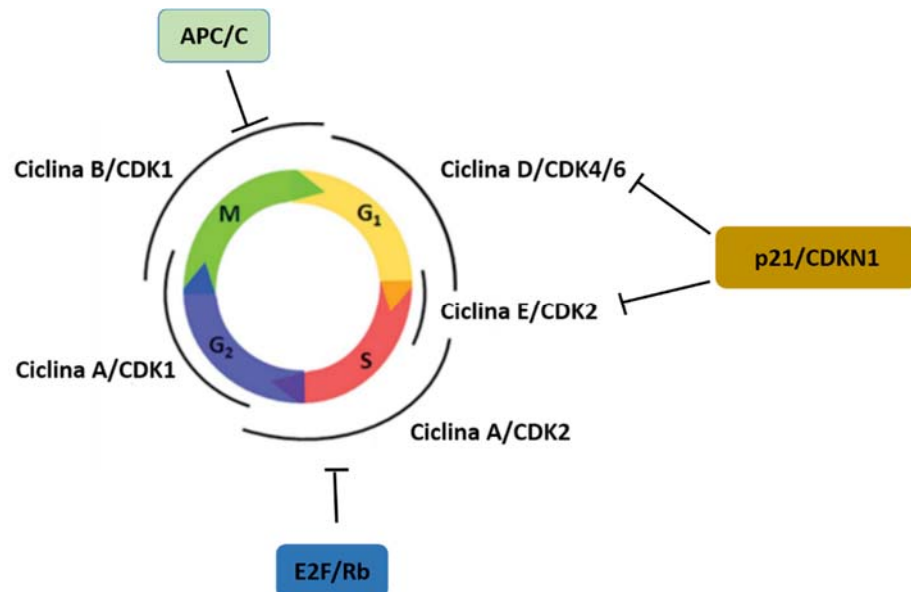
citosinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, a la proteína 2 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP-II), al inhibidor del activador del plasminogeno 1, a MCP1 y a CXCL1 (**Figura 2**) (Coppé et al., 2010).



**Figura 2. Características de la senescencia en las células epiteliales mamarias y en los queratinocitos.** Las células epiteliales mamarias y los queratinocitos, se caracterizan por presentar dos estados subsecuentes de senescencia. Los rectángulos llenos representan eventos comunes en ambas estirpes celulares. Los rectángulos discontinuos representan eventos específicos de cada tipo celular. Las líneas punteadas representan fases aun no estudiadas (Imagen tomada de Abbadie et al., 2017).

### 1.5 La senescencia y la regulación del ciclo celular

El ciclo celular se regula por cinasas que se activan por ciclinas (Cdk). Las Cdk/ciclinas regulan la transición entre las diferentes fases del ciclo celular. La progresión del ciclo celular de G1 a S se bloquea por p21/CDKN1 que inhibe a los complejos CDK4, 6/Ciclina D1 y CDK2/ciclina E (**Figura 3**). En la fase de síntesis, los principales reguladores son las enzimas que controlan la replicación del ADN como E2F y Rb. El complejo de proteínas que promueven la anafase (APC/C) promueve la progresión del ciclo celular entre M y G1, por la degradación en el proteosoma de la ciclina B mediante ubiquitinación.

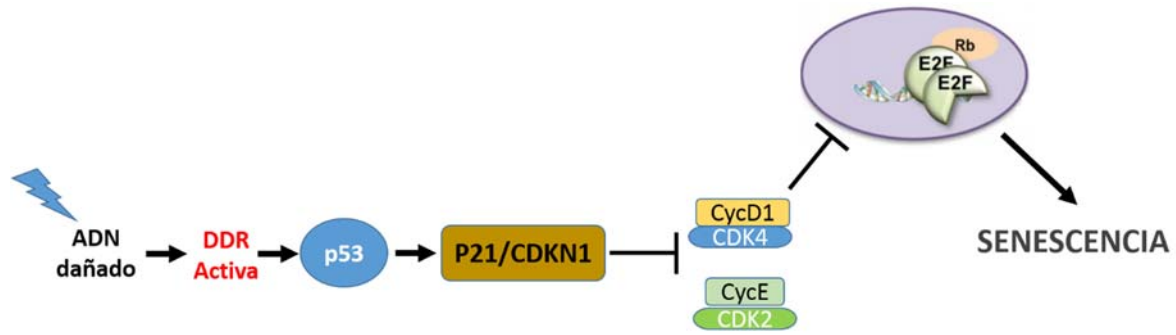


**Figura 3. Modelo clásico del control del ciclo celular.** Los complejos CDKs/ciclina regulan la transición entre las distintas fases del ciclo celular. La progresión del ciclo celular de G1 a S se regula por p21/CDKN1 que arresta a los complejos CDK4, 6/ciclina D y CDK2/ciclina E. La fase de síntesis se regula por acción de las enzimas que controlan la replicación del ADN. Mientras que la fase de mitosis se regula por el complejo de proteínas que controlan la anafase (APC/C).

En la senescencia, p53 se activa como consecuencia del daño al ADN y activa a p21/CDKN1 que evita la progresión del ciclo celular. Además actúa indirectamente sobre la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb). Esta proteína se hiperfosforila por la cinasa CDK4 y libera al factor de transcripción E2F,



lo que permite la transcripción de las enzimas necesarias para la síntesis de ADN. Rb hipofosforilado en cambio se une a E2F y reprime la actividad transcripcional y la progresión del ciclo celular por ende desencadena el fenotipo senescente (**figura 4**) (Ben-Porath et al., 2005).



**Figura 4. Regulación del ciclo celular por p21.** p53 se activa como consecuencia del daño al ADN e induce la actividad de p21 que evita la progresión del ciclo celular al inhibir a los complejos de ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2. Rb se hiperfosforila por la cinasa CDK4 y libera al factor de transcripción E2F, que induce la transcripción de enzimas necesarias para la síntesis de ADN. Rb hipofosforilado se une a E2F y reprime la actividad transcripcional y la progresión del ciclo celular induciendo un estado de senescencia (Imagen tomada y modificada de Rufini et al., 2013).

### 1.6 La radiación ultravioleta induce senescencia celular.

La radiación ultravioleta (UV) es una radiación electromagnética con una longitud de onda entre los 400 y los 15 nm. Existen tres tipos de rayos UV: A, de 320-400 nm; B, de 280-320 nm y C, de 200-280 nm (Hockberger P., 2002). La radiación UV-C, no llega a la tierra porque la absorben el oxígeno y el ozono de la atmósfera. La mayoría de la radiación UV/B y A se absorbe también en la capa de ozono y solo es mínima la cantidad que llega a la tierra (Batista L. et al., 2009).

La luz UV daña al ADN y por ello es responsable de los efectos dañinos del sol, incluyendo el cáncer de piel (Batista L. et al., 2009). La irradiación UV provoca hasta 100,000 lesiones al ADN por hora por célula expuesta (Jackson S.P. et al., 2009). Para reparar el daño originado, las células exhiben una respuesta denominada reparación al ADN dañado o DDR (Damage DNA Response) (Rouse J. et al., 2002). En ella, se reclutan las cinasas ATM y ATR, que al asociarse con las cinasas CHK1 y CHK2 reducen la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas CDKs. De esta manera retardan la progresión del ciclo celular y dan tiempo para la reparación del ADN antes de la replicación o la mitosis (Harrison JC. et al., 2006).

Si la reparación al ADN dañado es efectiva, la DDR se inactiva. Sin embargo, si el daño no se subsana, la señalización DDR se vuelve crónica y puede originar senescencia (Jackson S.P. et al., 2009).

## **2. Uniones estrechas**

Las células epiteliales tienen dos características que las distinguen: están polarizadas y poseen UEs. La polaridad celular se refiere a que su membrana plasmática cuenta con dos regiones morfológica y bioquímicamente diferentes: la apical en contacto con el medio exterior o el lumen de las cavidades y ductos y la basolateral en contacto con el medio interno.

Las UEs regulan el paso de iones, agua y moléculas a través de la vía paracelular y se localizan en la porción superior de la membrana lateral por encima de las uniones adherentes (UA). Por inmunofluorescencia se observa que las proteínas de la UE rodean el borde celular dando un patrón que recuerda a una malla de gallinero [Para revisión ver (González-Mariscal et al., 2012)]. Por microscopía electrónica de transmisión, las UEs se observan como un conjunto de puntos donde las membranas exoplasmáticas de las células adyacentes parecen fusionarse (Farquhar and Palade, 1963). Por criofractura, las UEs se observan como una red de filamentos que rodea a las células por debajo de las microvellosidades apicales (González-Mariscal et al., 2012).

Las UEs, tienen dos funciones canónicas: de compuerta y de cerca. La función de compuerta indica que las UEs regulan el paso de iones moléculas y agua a través de la vía paracelular, mientras que la función de cerca restringe el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, de la superficie apical a la basolateral, lo que mantiene el estado polarizado de la membrana plasmática.

La UE está compuesta por proteínas integrales que interaccionan en el espacio intercelular y regulan la selectividad iónica paracelular del epitelio (Gonzalez-Mariscal et al., 2014). Existen dos tipos de proteínas integrales en las UEs: las de cuatro dominios transmembranales o tetraspan y las que atraviesan una sola vez la membrana plasmática. Las proteínas tetraspan incluyen a las claudinas y a las proteínas de la familia TAMP que son ocludina, tricelulina y marvelD3. Las proteínas de la UE que cruzan una sola vez la membrana son las JAMS y las angulinas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

En las UEs también se localizan diversas proteínas periféricas que funcionan como un puente que une a las proteínas integrales de la UE con el citoesqueleto de actina. Estas proteínas tienen una función de plataforma ya que concentran en la UE a una gran variedad de proteínas señalizadoras como cinasas, fosfatasas, proteínas G y factores de transcripción (González-Mariscal et al., 2014). La función de plataforma de la mayoría de las proteínas periféricas de la UE, se debe a que poseen dominios PDZ. Estos dominios establecen interacciones homotípicas con dominios PDZ presentes en otras proteínas y asociaciones heterópicas con motivos de unión a dominios PDZ presentes en el extremo carboxilo terminal de diversas proteínas.

Entre las proteínas de la UE que cuentan con dominios PDZ encontramos a las proteínas de la familia MAGUK (membrane associated guanylate kinase homologue) ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals1. Estas proteínas se caracterizan porque además de los dominios PDZ tienen a los dominios SH3 y guanilato cinasa (Guk). También en la UE se encuentran proteínas MAGI o MAGUK invertidas que se caracterizan porque en ellas la mayoría de sus dominios PDZ están orientados hacia la región carboxilo de la proteína. Además, estas proteínas tienen un dominio WW

en lugar de SH3 (González-Mariscal et al., 2012). Tanto los dominios WW como los SH3 se caracterizan por asociarse a motivos ricos en prolinas de diversas proteínas.

### 3. ZO-2

La proteína zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína con un peso de 160 kDa que se identificó inicialmente por su co-inmunoprecipitación con ZO-1 (Gumbiner et al., 1991). ZO-2 se expresa en la UE de las células epiteliales y en la UA de las células no epiteliales como los fibroblastos.

ZO-2 posee tres dominios PDZ organizados en tándem seguidos por un dominio SH3 y un dominio GuK. En el segmento carboxilo de ZO-2 está presente una región acida y un dominio rico en prolina dentro del cual se haya una secuencia de unión a actina. El extremo carboxilo de ZO-2 termina con un motivo de unión a dominios PDZ, con la secuencia TEL. Los segmentos que unen a los distintos módulos de ZO-2 se denominan secuencias únicas y se enumeran del 1 al 6. En la **figura 5** podemos observar a detalle una representación esquemática de ZO-2.



**Figura 5. Representación esquemática de ZO-2.** Se indica la localización de los dominios PDZ, SH3 y GuK, la región rica en prolinas (PR), la zona acida (Acid), la región de unión a actina (ABR) y las regiones U. También se indica la ubicación de las señales de localización nuclear (NLS) y de exportación (NES) de ZO-2 canina (Imagen tomada de González-Mariscal et al., 2017).

#### 3.1 Localización y tráfico intracelular de ZO-2

En los cultivos subconfluentes de las células epiteliales MDCK, ZO-2 se localiza en el borde celular y en el núcleo, mientras que en los cultivos confluentes ZO-2 se concentra en la UE (Islas et al., 2002). ZO-2 entra al núcleo al final de la

fase G1 y sale del núcleo durante la fase M. Por ello, ZO-2 no se encuentra en el núcleo de los cultivos confluentes y solo está presente en el núcleo de los cultivos en proliferación (Tapia et al., 2009).

ZO-2 por su tamaño no puede difundir libremente a través de los poros nucleares y por ello cuenta con señales de localización (NLS) (González Mariscal et al., 2006) y de exportación nuclear (NES) (Jaramillo et al., 2004). Además, ZO-2 en la región U2, posee dieciséis repetidos de serina y arginina (SR) (Jaramillo et al., 2004) que son blanco de la cinasa SRPK. En presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y a través de una cadena de señalización en la que participan EGFR y Akt, se activa la SRPK que al fosforilar a ZO-2 induce su entrada al núcleo y acumulación en los moteados nucleares (Quiros et al., 2013).

El movimiento intracelular de ZO-2 también se regula por modificaciones post-traduccionales. Así, la fosforilación por la PKC $\epsilon$  de la S369 ubicada dentro de la NES-1 activa la señal de exportación y permite la salida de ZO-2 del núcleo (Chamorro et al., 2009). Por otra parte, tanto la inhibición de la NLS-2 por la O-GlcNAcilación de la S257, como la sumoilación de la lisina 730 inducen la exportación de ZO-2 del núcleo (Wetzel et al., 2017).

### **3.2 Función de ZO-2**

La proteína ZO-2 ejerce distintas funciones dependiendo de su localización. En la membrana plasmática ZO-2 es crucial para la formación de las UEs mientras que en el núcleo, se asocia con factores nucleares e inhibe la transcripción de genes.

#### **3.2.1 Función de ZO-2 en la membrana plasmática**

La importancia de ZO-2 para las UEs se demostró cuando, por recombinación homóloga y ARN de interferencia se inhibió la expresión de ZO-1 y ZO-2 respectivamente, y se observó que no se formaron los filamentos de la UE constituidos por claudinas y ocludina. Como la reintroducción independiente de cualquiera de las dos proteínas ZO provocó la reaparición de los filamentos de la UE se concluyó que estas proteínas constituyen una plataforma esencial para la

polimerización de las claudinas y que ZO-1 y ZO-2 son redundantes (Umeda et al., 2006).

En el desarrollo embrionario del ratón, ZO-2 tiene un papel crucial, pues su ausencia es letal y se manifiesta por una disminución de la proliferación celular en el día embrionario 6.5 (E6.5) y un aumento en la apoptosis en E7.5 (Xu et al., 2008). Sin embargo, ZO-2 es esencial solo para el desarrollo de los tejidos extraembrionarios y no para el embrión *per se*, ya que si a la blástula de ZO-2  $+/+$  se les cambian las células de la masa celular interna por células ZO-2  $-/-$  se generan quimeras viables. Sin embargo, los ratones macho quimeras tienen un problema de fertilidad, porque sus testículos desarrollan túbulos seminíferos anormalmente pequeños que exhiben una barrera hematotesticular (BHT) permeable. Por ello, se concluye que ZO-2 es esencial para el desarrollo de la BHT (Xu et al., 2009).

En el hígado ZO-2 es fundamental para el sellado por las UEs de los hepatocitos y colangiocitos que forman los ductos biliares intrahepáticos. Así, se ha visto que las mutaciones en ZO-2 que impiden la expresión de la proteína, producen colestasis. Esta condición se caracteriza por la fuga de la bilis hacia el parénquima hepático y el plasma, y este daño con el tiempo evoluciona a cirrosis no alcohólica y a hepatocarcinoma (Jaquotot et al., 2013).

### **3.2.2 Función de ZO-2 en el núcleo**

ZO-2 inhibe la transcripción de la ciclina D1 al formar un complejo con c-Myc y la desacetilasa de histonas HDAC1 que se asocia a la caja E del promotor de ciclina D1 (Huerta et al., 2007). ZO-2 interacciona también con los factores de transcripción Jun y Fos e inhibe la actividad transcripcional de promotores sintéticos regulados por sitios AP-1 (Betanzos et al. 2004). Así mismo, ZO-2 inhibe la actividad transcripcional de YAP1 (Yes-associated protein 1), la proteína blanco de la vía Hippo, que se une a sitios TEAD en la región promotora de varios genes incluyendo a CTGF (Domínguez-Calderón et al., 2016).

#### **4. Observaciones que sugieren que la ausencia de ZO-2 induce senescencia en las células epiteliales.**

La ausencia de ZO-2 en las células MDCK induce algunas características de las células senescentes. Por ejemplo, el silenciamiento (KD) de ZO-2: 1) incrementa el nivel de ciclina D1 e induce un retraso en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular; 2) induce hipertrofia celular (Domínguez-Calderón et al., 2016) y 3) aumenta la expresión nuclear de YAP que induce la transcripción del miRNA29 que inhibe la traducción de PTEN y en consecuencia aumenta el contenido celular de PIP3 (Domínguez-Calderón et al., 2016).

## **II. Planteamiento del problema**

El ciclo celular no se arresta en las células ZO-2 KD. Sin embargo el silenciamiento de ZO-2 induce algunas características que sugieren la adquisición incipiente del fenotipo senescente, como el aumento del tamaño celular, el retraso en la transición de la fase G1 a S y el bloqueo en la traducción de la fosfatasa PTEN. Por ello se sospecha que en ausencia de ZO-2 será más fácil que las células entren a senescencia.

## **III. Hipótesis**

La ausencia de ZO-2 favorece el ingreso de las células epiteliales a la senescencia

## **IV. Objetivo:**

### **4.1 Objetivo general**

Analizar si la ausencia de ZO-2 facilita el desarrollo de la senescencia en las células epiteliales.

## 4.2 Objetivos experimentales

Analizar si en las células ZO-2 KD irradiadas con luz UV:

1. Aumenta la expresión de  $\beta$ -galactosidasa
2. Disminuye la expresión de lámina B1
3. Se altera la secreción de citocinas

## V. Metodología

### 5.1 Cultivo celular

Las células epiteliales de riñón de perro MDCK (Madin Darby Canine Kidney) parentales y ZO-2 KD donadas generosamente por el Dr. Alan Fanning (University of North Carolina, Chapel Hill, Carolina del Norte) se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), bajo en glucosa (31600-083, Gibco TM Invitrogen), suplementado con suero bovino fetal (S1650-500, biowest, San Marcos TX) con 10000 U/ug/ml de solución de penicilina/estreptomicina (InVitro) y 1% de insulina.

Se utilizó la clona IC5 de ZO-2 KD, que expresa establemente a tres shRNAs contra ZO-2 en el vector de clonación pSuper, y a las células parentales que solo expresan al vector vacío. La clona IC5 se aisló con base a su resistencia a una combinación de los antibióticos zeocina y puromicina

### 5.2 Irradiación con luz UV

Se sembraron células MDCK ZO-2 KD y parentales sobre cubreobjetos de vidrio y se irradiaron con luz UV, a una intensidad de  $2 \text{ J/m}^2$  por 2 s cada 24 h durante 5 días, empleando una lámpara de UV tipo C (254 nm, modelo G8T5 PHILIPS, Amsterdam, Países Bajos) (Mirzayans R, et al., 2007).

### 5.3 Ensayo de $\beta$ -galactosidasa

Se sembraron células MDCK ZO-2 KD y parentales sobre cubreobjetos de vidrio y después de la exposición a la luz UV, se trataron de la siguiente manera:

Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 10 minutos. Después se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS). En seguida los cultivos se incubaron por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en un ambiente sin  $\text{O}_2$  con



una solución amortiguadora de fosfato de sodio/ácido cítrico 0.4 M, pH 6, con ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 M y X-gal 1 mg/ml (Pacheco-Rivera R, et al., 2016).

Después de 24 horas, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.25% por 15 minutos. En seguida, las muestras se incubaron por 1 h con una solución de bloqueo de suero de albumina de bovino libre de IgGs al 2%. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-ZO-1 (Cat. 617300, dilución 1:300, Invitrogen™ Carlsbad, CA.) por 8 h a 4°C, y después con el anticuerpo secundario de cabra contra conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Cat. A-11008, dilución 1:1000, Invitrogen™ Carlsbad, CA.) por 2 h, a temperatura ambiente. Las muestras se montaron en un portaobjetos con medio de montaje con DAPI (Cat. H-1200, VECTOR Laboratories Inc, Burlingame CA).

La detección de la actividad de la enzima β-galactosidasa se realizó por fluorescencia como se reportó previamente (Levistky et al., 2013). Se usó el microscopio confocal Leica TCS SP8 equipado con un láser de argón al 20%. Las imágenes se tomaron con el objetivo 63X de inmersión en aceite. Las muestras se excitaron a 633 nm y las imágenes de β-galactosidasa se tomaron en un rango de emisión de 650-760 nm. Para adquirir las imágenes de ZO-1 las muestras se excitaron a 488 nm y se tomaron en un rango de emisión de 498-520 nm y para detectar la tinción de los núcleos con DAPI las muestras se excitaron con la luz UV a 405 nm y las imágenes se tomaron a 423-470 nm.

#### **5.4 Western blot**

Se prepararon geles desnaturalizantes al 10% de acrilamida. Se cargaron los carriles con 30 µg de proteína en solución amortiguadora de muestra (Tris base 0.35 M, SDS al 5%, β-mercaptoetanol 0.16 M, glicerol al 7.5%, azul de bromofenol al 0.4%) por triplicado para cada condición. Los extractos se separaron en los geles por electroforesis, utilizando una solución amortiguadora de corrida (tris base 0.25 M, glicina 1.9 M, SDS al 0.5%) y una corriente constante de 80 mA, hasta que el azul de bromofenol llegó al final del gel.

Las proteínas separadas y embebidas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Cat. IPVH00010, Millipore, Billerica, MA), con la solución amortiguadora de transferencia ( $\text{NaPO}_4$  0.1 M, pH 6.8, SDS al 0.5%, metanol al 20%) en una cámara de transferencia húmeda durante 2.5 h, con una corriente constante de 450 mA.

La inmunodetección se realizó con anticuerpos policlonales contra: ZO-2 (Cat. 71-1400, dilución 1:1000, Invitrogen™ Carlsbad, CA.); lamina B1 (Cat. 33-2000, dilución 1:2000, Invitrogen™ Carlsbad, CA.) y actina (generosamente donado por el Dr. José Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, dilución 1:2000).

Se utilizaron anticuerpos secundarios anti conejo (Cat, 62-6520, dilución 1: 20,000, Invitrogen™ Carlsbad, CA.) y anti ratón (Cat, A5278, dilución 1; 10,000, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO.) acoplados a peroxidasa de rábano. Para revelar las membranas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Immobilion Western Chemiluminescent HRP substrate (Cat. WBKLS0500, Millipore Corporation, Burlington, MA) que revela la señal luminiscente emitida por la dimerización del luminol al reaccionar con el  $\text{O}_2$  producido por la acción enzimática de la peroxidasa.

### **5.5 Inmunoensayo para citocinas**

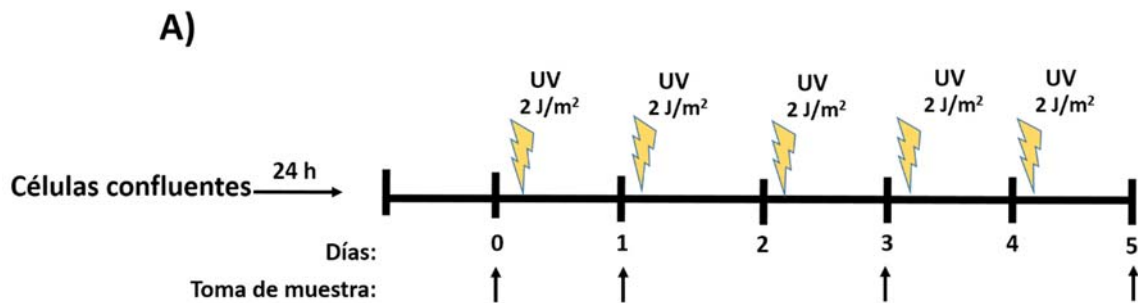
La inmunodetección de citocinas presentes en el medio condicionado derivado del cultivo de células MDCK parentales y ZO-2 KD que previamente recibieron irradiación en 5 días consecutivos de luz UV-C, se hizo mediante perlas magnéticas acopladas a anticuerpos contra las distintas citocinas con el estuche Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex (Cat. M500KCAF0Y, BIO-RAD, Hércules, CA.) siguiendo las instrucciones del proveedor. De esta manera se detectaron las siguientes citocinas: eotaxina, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), interleucinas  $1\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 y 17, el antagonista del receptor de interleucina 1 ( $\text{IL-1ra}$ ), la proteína 10 inducida por el interferón gamma (IP-10), la proteína inflamatoria de macrófagos alfa y beta ( $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), la quimiocina que se expresa y secreta por los linfocitos T y regula su sobreactivación

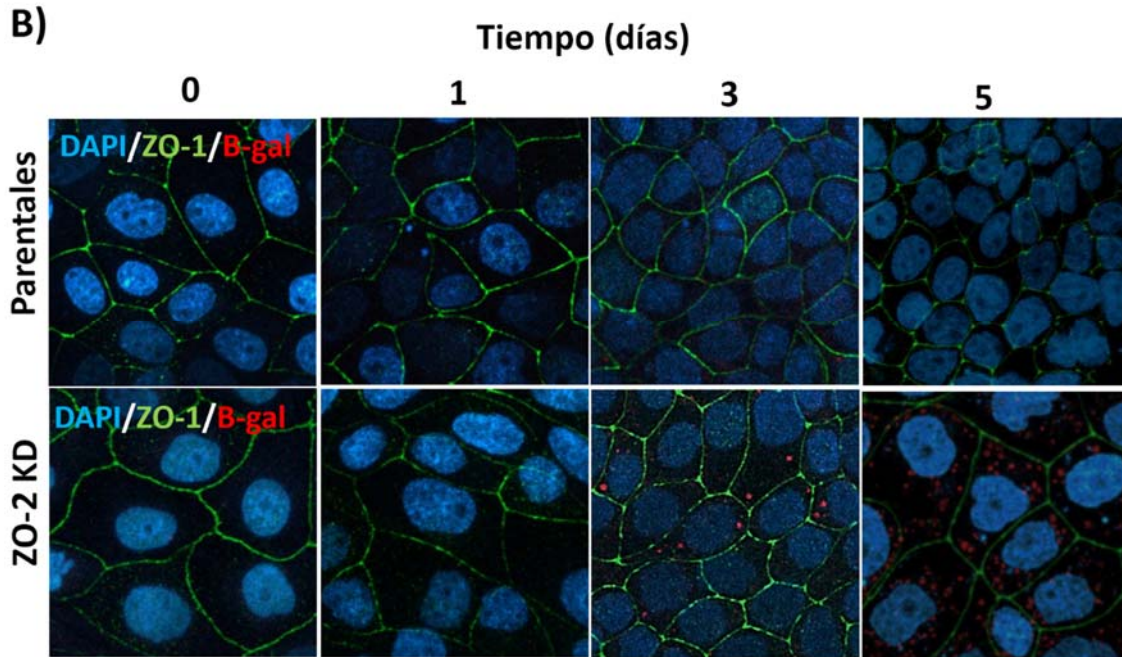
(RANTES), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF básico), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1).

## VI. Resultados

### 6.1 La ausencia de ZO-2 promueve la aparición de la $\beta$ -galactosidasa

Para averiguar si la ausencia de ZO-2 induce senescencia, se estudió la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en el microscopio confocal en monocapas de células MDCK ZO-2 KD y parentales que recibieron un tratamiento de luz UV de 2 J/m<sup>2</sup> a lo largo de 5 días de acuerdo al esquema descrito en la figura 6A. En la figura 6B se observa que el porcentaje de células con marca de  $\beta$ -galactosidasa aumenta tanto en las células parentales como ZO-2 KD conforme se acumulan los días de irradiación de luz UV. Sin embargo, este aumento es mucho más pronunciado en las células ZO-2 KD que en las parentales, llegando incluso al 100% al quinto día de tratamiento (Tabla 1). Por lo tanto se concluye que la ausencia de ZO-2 predispone a las células a entrar a senescencia.





**Tabla 1. Porcentaje de células positivas para  $\beta$ -galactosidasa.**

Condición	Tiempo (días)			
	0	1	3	5
Parental	0 % (3)	0 % (3)	$8 \pm 0.62$ % (3)	$15 \pm 1.87$ % (3)
ZO-2 KD	0 % (3)	$2 \pm 0.68$ % (3)	$39 \pm 3.34$ % (3)	100% (3)

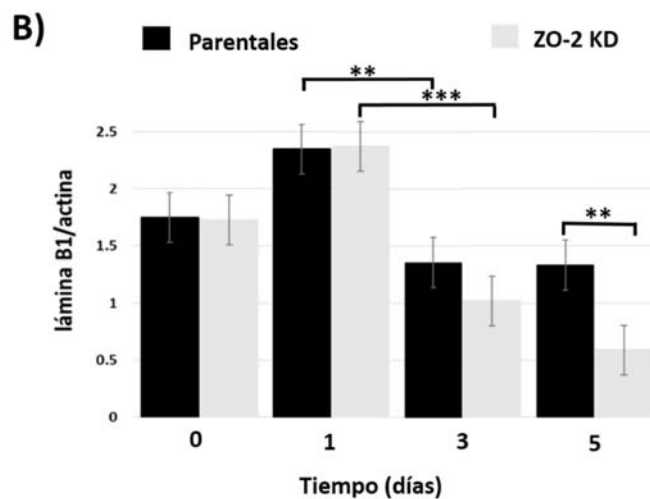
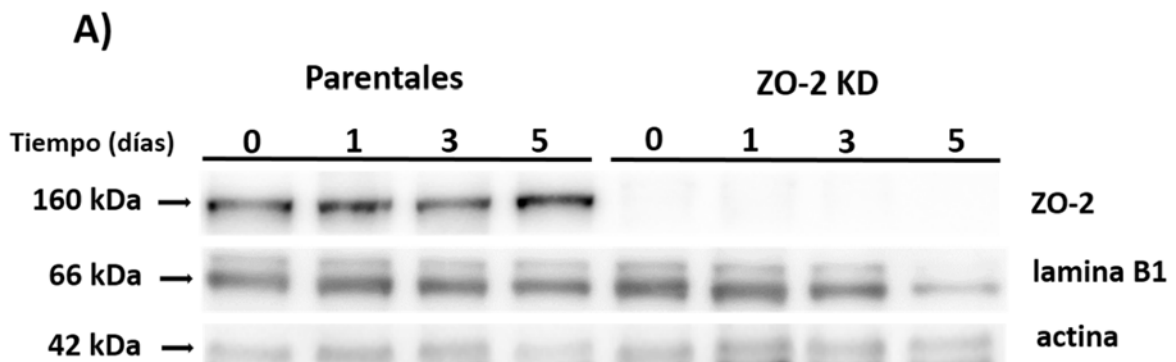
Resultado de 3 experimentos independientes. Se analizaron 100 células por cada condición, en cada experimento.

**Figura 6. Las células MDCK ZO-2 KD presentan mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa que las células parentales.** A) Esquema del tratamiento con la luz UV. Con las flechas se indican los días en los que se hicieron las observaciones, de tal manera que en la muestra del día 0, las células no se irradiaron; la muestra del día 1, tiene 24 h de haber recibido 1 radiación; la muestra del día 3 ha recibido 3 radiaciones consecutivas, la última 24 h antes; y la muestra del día 5, ha recibido 5 radiaciones consecutivas, donde la última el día anterior. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia. Se observa a la  $\beta$ -galactosidasa en rojo y a los núcleos en azul. El borde celular se tiñó con un anticuerpo contra ZO-1. El porcentaje indica el número de células por campo con marca contra  $\beta$ -galactosidasa. Las observaciones se hicieron con un objetivo de 63 X y se contaron 100 células por cada

condición en cada experimento y considerando 3 experimentos independientes.

## 6.2 En ausencia de ZO-2 disminuye más rápidamente la expresión de lámina B1

En seguida exploramos mediante un Western blot (Fig. 7A) la expresión de lámina B1 conforme avanzan los días de irradiación con luz UV. Encontramos que, el contenido celular de lámina B1 disminuye desde el tercer día de irradiación con luz UV en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Sin embargo ésta disminución es más pronunciada en las células ZO-2 KD con respecto a las parentales, al quinto día de irradiación  $**p<0.05$  (Fig.7B). Por lo tanto concluimos que, la ausencia de ZO-2 favorece el ingreso de las células a la senescencia.



**Figura 7. En las células MDCK ZO-2 KD la disminución de lámina B1 al quinto día de irradiación con luz UV-C es mayor que en las células parentales.** Western blot representativo (A) y análisis cuantitativo (B) de la expresión de lámina B1 en las células MDCK parentales y ZO-2 KD tras la irradiación con luz UV-C. Los valores densitométricos de las bandas de lámina B1 se normalizaron con los valores de las bandas de actina en cada carril. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student's, \*\**p*<0.05. Resultado de 3 experimentos independientes.

### 6.3 La ausencia de ZO-2 aumenta la secreción de GM-CSF y disminuye la IL-12

En el medio condicionado derivado de las células MDCK parentales y ZO-2 KD analizamos la expresión de citocinas después de 5 días consecutivos de irradiación con luz UV-C. Encontramos que en las células ZO-2 KD aumenta el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), una citocina proinflamatoria, mientras que disminuye la secreción de la interleucina IL-12, una citocina anti inflamatoria (Tabla 2). En cambio, no se altera la expresión de las otras 22 citocinas exploradas (Tabla 3). Cabe resaltar que TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IP-10, no se secretan por las células epiteliales, por lo que su presencia en el medio condicionado es probable que se deba a que provienen del suero bovino fetal en el que se cultivaron las células (Blankestain et al., 2003; Antonelli et al., 2014; Van Horsen et al., 2006).

**Tabla 2. La ausencia de ZO-2 aumenta la secreción de GM-CSF y disminuye la interleucina IL-12**

Citocina	Parental	vs	ZO-2 KD
GM-CSF	22 $\pm$ 2.2 (2)	<	27 $\pm$ 2.2 (3)
IL-12	172 $\pm$ 8 (2)	>	149 $\pm$ 9 (3)

GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; IL-12. Concentración en pg/mL.

**Tabla 3. La ausencia de ZO-2 no altera la expresión de estas citocinas**

<b>Citocina</b>	<b>Parental</b>	<b>ZO-2 KD</b>
IL-1ra	71 ± 26 (2)	78 ± 1.9 (2)
IL-2	6 ± 0.2 (2)	7 ± 7 (2)
IL-4	1 ± 0.26 (2)	1 ± 0.6 (3)
IL-6	3 ± 0.2 (2)	3 ± 0.44 (3)
IL-7	7 ± 2 (2)	6 ± 0.9 (3)
IL-8	2 ± 0.8 (2)	2 ± 0.2 (3)
IL-9	36 ± 4 (2)	37 ± 2 (3)
IL-10	10 ± 1 (2)	9 ± 1 (3)
IL-13	14 ± 8 (2)	11 ± 0.8
IL-17	2 ± 0.3 (2)	1 ± 0.05 (3)
PDGF-BB	206 ± 9 (2)	225 ± 7 (2)
MIP-1α	2 (1)	1 ± 0.5
MIP-1β	7 (1)	4 ± 1 (2)
RANTES	8 ± 1 (2)	7 ± 0.4 (3)
*TNF-α	21 ± 1.6 (2)	21 ± 1 (3)
VEGF	20776 ± 3719 (2)	24357 ± 4469 (2)
Eotaxina	64 ± 4 (2)	67 ± 3 (3)
G-CSF	20 ± 0.6 (2)	20 ± 3 (3)
*IFN-γ	112 ± 2	118 ± 7 (3)
*IP-10	75 ± 9 (2)	77 ± 9 (3)
MCP-1(MCAF)	968 ± 121 (2)	1488 ± 296 (3)

IL-1ra, antagonista del receptor de interleucina 1; interleucinas 1β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 17; PDGF-BB, factor de crecimiento derivado de plaquetas; MIP-1α, MIP-1β, proteína inflamatoria de macrófagos alfa y beta; RANTES, quimiocina que se expresa y secreta por los linfocitos T y regula su sobreactivación; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa; VEGF, factor de crecimiento endotelial; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; IFN-γ, interferón gamma; IP-10, proteína 10 inducida por el interferón; MCP1, proteína quimioatrayente de monocitos. \*Estas citocinas no las producen las células epiteliales, sino que provienen del suero bovino fetal presente en el medio de cultivo.

## VII. Discusión

El envejecimiento es una característica en común de todos los seres vivos que eleva la posibilidad de padecer enfermedades como cáncer, diabetes mellitus tipo II, osteoporosis y neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Hanahan D et al., 2011). Por ello, es relevante estudiar las condiciones que conducen al envejecimiento, como la senescencia.

Previamente se demostró que en las células MDCK parentales y ZO-2 KD no existen diferencias en proliferación celular y que en ambas este proceso se inhibe con rapamicina, un bloqueador de mTORC1. Por lo tanto, como el ciclo celular no se encuentra arrestado en las células ZO-2 KD, podemos decir que no son senescentes estas células. Sin embargo, se pensó que las células ZO-2 KD podrían ser más sensibles para entrar en senescencia ante la presencia de un estímulo deletéreo, como la exposición a la luz UV, porque son hipertróficas, exhiben un retraso en el tránsito de las fases G1 a S del ciclo celular y acumulan a YAP en el núcleo y en consecuencia tienen una baja expresión de PTEN (Domínguez-Calderón et al., 2016). Ahora en esta tesis encontramos que la marca de  $\beta$ -galactosidasa sube en las células MDCK ZO-2 KD conforme aumentan los días de irradiación con luz UV-C. Así, después de cinco días de radiaciones consecutivas todas las células ZO-2 KD tienen marca de  $\beta$ -galactosidasa, mientras que solo el 15% de las células control la presentan (Fig. 6). Esto indica que la ausencia de ZO-2 en las células MDCK facilita el desarrollo de senescencia cuando las células reciben un estímulo que daña al ADN.

Con respecto al marcador de senescencia tardía lamina B1, encontramos que disminuye significativamente al quinto día de irradiación con luz UV-C en las células ZO-2 KD con respecto a las parentales. Esto nos sugiere que la ausencia de ZO-2 favorece el desarrollo de la senescencia (Fig. 7A y B).

En síntesis, observamos que en las células ZO-2 KD no cambia notoriamente el fenotipo secretor ya que de 27 citocinas analizadas tan solo dos, el GM-CSF y la IL-12 varían. El incremento en la expresión de GM-CSF previamente se observó en



células epiteliales de próstata y en fibroblastos de pulmón con senescencia inducida por radiación ionizante (Coppé JP, et al., 2008). Con respecto a la IL-12 hasta ahora nadie ha reportado cambios en su expresión en la senescencia y solo se sabe que la IL-12 minimiza el daño inducido por radiación ionizante en el intestino de monos y ratones al promover la hematopoyesis y la recuperación de la función del sistema inmune (Basile et al., 2012). Por ello, dada la naturaleza de GM-CSF y el IL-12, concluimos que la ausencia de ZO-2 favorece el desarrollo de un estado inflamatorio.

Nos preguntamos qué importancia fisiológica podría tener el aumento en senescencia al silenciar a ZO-2. Para ello es importante mencionar que en los hepatocitos hipertróficos de ratas obesas que con el tiempo experimentan EMT, disminuye la expresión de ZO-2 (Tesis doctoral en proceso de Laura González González), y que en el cáncer de hígado, inducido por la administración crónica de dietilnitrosamina, aumenta el número de hepatocitos senescentes (Pacheco-Rivera R, et al., 2016). Estas observaciones sugieren que la ausencia de ZO-2, que favorece el ingreso a la senescencia ante la presencia de estímulos que dañan al ADN, podría ser un mecanismo de protección por suprimir la EMT.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbadie C, Pluquet O, Pourtier A. (2017). Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell Mol Life Sci.* 74(24):4471-4509.
2. Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD, Pearson RB.(2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Open.* 31, 1949-1962.
3. Batista,L.F.Z.;Kaina,B.;Meneghini,R.;Menck,C.F. (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures : insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res.* 681:197–208.
4. Ben-Porath I, Weinberg RA. (2005).The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* (5): 961-76.
5. Betanzos, A., Huerta, M., Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J. And Gonzalez-Mariscal L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res;* 292(1):51–66.
6. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(9):729-40.
7. Campisi J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 75:685-705.
8. Chamorro, D. et al. (2009). Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4120–4129.
9. Chen Z, Carracedo A, Lin KH, Koutcher J.A, Behrendt N, Egia A, Alimonti A, Carver B.S, Gerald W, Teruya-Feldstein J, Loda M, Pandolfi Pier Paolo. (2010).Differential p53-independent Outcomes of p19Arf Loss in Oncogenesis. *Sci Signal.* 2(84): 1-10.

10. Chojnowski A. et al. (2015). Progerin reduces LAP2 $\alpha$ -telomere association Hutchinson-Gilford Progeria. *Elife*. 4:1-21.
11. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, Campisi J. (2010). A human-like senescence associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. 12; 5(2):e9188.
12. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol*. Vol. 5 p. 99-118.
13. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. (2008) Senescence associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. Vol. 6 p.2853-68.
14. d'Adda di Fagagna F. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *426(6963):194-8*.
15. de Carné Trécesson S, Guillemin Y, Bélanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, Gamelin E, Juin P, Barré B, Coqueret O. (2011) Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins. *J Biol Chem*. Vol 15 p. 12825-38.
16. Dikovskaya D, Cole J, Mason S, Nixon C, Karim S, McGarry L, Clark W, Hewitt R, Sammons M, Zhu J, Athineos D, Leach J, Marchesi F, van Tuyn J, Tait S, Brock C, Morton J, Wu H, Berger J, Blyth K, Adams P. (2015) Mitotic Stress Is an Integral Part of the Oncogene-Induced Senescence Program that Promotes Multinucleation and Cell Cycle Arrest. *Cell Reports* Vol. 12 p. 1483–1496.
17. Dominguez, A., Avila, A., Ponce, A., Lopez, E., Calderon, J.V., Reyes, J.L., Chavez, B., Segovia J., Angulo, C., Ramirez, L., Gallego, H., Alarcon, L., Martin, D., Bautista, P. and Lorenza González-Mariscal. (2016). ZO-2

- silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *MboC*, Vol 27; 1581-1595.
18. Farquhar MG, Palade GE. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.
  19. González-Mariscal L, Domínguez-Calderón A, Raya-Sandino A, Ortega-Olvera JM, Vargas-Sierra O, Martínez-Revollar G. (2014) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol.* Vol. 36:213-23.
  20. González-Mariscal L, Miranda J, Raya-Sandino A, Domínguez-Calderón A, Cuellar-Perez F. (2017) ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Jun;1397(1):35-53.
  21. González-Mariscal, L. et al., (2014). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology.*
  22. Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L., and Jaramillo, B. E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* 312, 3323–3335.
  23. González-Mariscal, L., Quiros, M., Diaz-Coranguez, M., and Bautista, P. (2012). Tight Junctions. In: *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, ed. P. S. Najman, InTech, 4–30.
  24. Gumbiner, B., T. Lowenkopf & D. Apatira. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3460–3464.
  25. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74.
  26. Harrison JC, Haber JE. (2006) Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. *Annu Rev Genet.* Vol. 40 p .209–235
  27. Hayflick L, Moorhead PS, (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25:585-621.
  28. Hockberger, P.E. (2002) A history of ultraviolet photobiology for humans, animal and microorganisms. *Photochem. Photobiol.* 76:561–579.

29. Huerta M, et al. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*; 18(12):4826–36.
30. Islas, S., Vega, J., Ponce, L., and González-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 274, 138–148.
31. Jackson S.P., Bartek J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, p. 1071-1078.
32. Jaquotot, M., Casanova, L., Oliveira, A., Castillo, P., Alvarez, L., Jara, P. and Gea, F. (2013). Clinical variability of mutations in the ABCB11 gene: A case report. *REV ESP ENFERM DIG.* Vol. 105, N.º 1, pp. 52-54, 2013
33. Jaramillo BE, et al. (2004) Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res*; 297(1):247–58.
34. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. (2000) Senescent-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Physiol*; 183: 3613-22.
35. Levitsky KL, Toledo-Aral JJ, Lopez-Barneo J, Villadiego J. (2013) Direct confocal acquisition of fluorescence from X-gal staining on thick tissue sections. *Sci Reports*, 14; 3:2937.
36. Marcotte R, Chen JM, Huard S, Wang E. (2005). C-Myc creates an activation loop by transcriptionally repressing its own functional inhibitor, hMad4, in young fibroblasts, a loop lost in replicatively senescent fibroblasts. *J Cell Biochem* 1; 96(59):1071-85.
37. Mizrayans R, Scott A, Andrais B, Pollock S, Murray D. (2007) Ultraviolet light exposure triggers nuclear accumulation of p21(WAF1) and accelerated senescence in human normal and nucleotide excision repair-deficient fibroblast strains. *J Cell Physiol.* Vol 215(1):55-67.
38. Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703-16.

39. Pacheco-Rivera R, Fattel-Fazenda S, Arellanes-Robledo J, Silva-Olivares A, Alemán-Lazarini L, Rodríguez-Segura M, Pérez-Carreón J, Villa-Treviño S, Shibayama M, Serrano-Luna J. (2016). Double staining of  $\beta$ -galactosidase with fibrosis and cancer markers reveals the chronological appearance of senescence in liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Toxicol Lett.* Vol. 22 p.241:19-31
40. Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T., and Gonzalez-Mariscal, L. (2013). The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Mol. Biol. Cell* 24, 2528–2543.
41. Rouse J, Jackson SP. (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science.* Vol. 297:547–551.
42. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. (2013) Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene.* 24;32(43):5129-43
43. Shimei Wang A., Fern Ong P., Chojnowski A., Clavel C., Dreesen O. (2017) Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Scientific Reports.* 1-8.
44. Shimi T, Butin-Israeli V, Adam S.A, Hamanaka R.B, Goldman A.E, Lucas C.A, Shumaker D.K, Kosak S.T, Chandel N.S, Goldman R.( 2011) The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *GENES & DEVELOPMENT.* 25: 2579-2593.
45. Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Ávila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 20, 1102–1117.
46. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in Tight-Junction strand formation. *Cell* 126, 741–754.

47. Wetzels F, Mittag S, Cano-Cortina M, Wagner T, Krämer OH, Niedenthal R, González-Mariscal L, Huber O. (2017). SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cell Mol Sci.* 74(2):373-392.
48. Xu, J., Kausalya, J., Phua, D., Mohamed Ali, S., Hossain, Z. And Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but not ZO-3, reveals critical and non-redundant roles for individual Zonula Occludens proteins in mammalian development. *Molecular and Cellular Biology.* Vol. 28, No.5 p. 1669–1678.
49. Xu J, Anuar F, Ali SM, Ng MY, Phua DC, Hunziker W.(2009) Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Mol Biol Cell.* Vol. (20):4268-77.
50. Basile LA, Ellefson D, Gluzman-Poltorak Z, Junes-Gill K, Mar V, Mendonca S, Miller JD, Tom J, Trinh A, Gallaher TK.(2012) HemaMax™, a recombinant human interleukin-12, is a potent mitigator of acute radiation injury in mice and non-human primates. *PLoS One.* 7(2).