



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Efecto del silenciamiento de ZO-2 en la regulación de la tensión célula-célula
y célula-sustrato”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. DIANA CRISTINA PINTO DUEÑAS

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directora de la tesis

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

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 el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria de CONACYT No. 615643).

“For a woman to succeed, she must have a room of her own and 500 pounds a year”

(Mina J. Bissell, 1981).

Agradecimientos

A la Dra. Lorenza González-Mariscal por permitirme realizar un proyecto de investigación bajo su tutela, además quiero agradecerle profundamente por la dedicación prestada a mi enseñanza y desarrollo profesional.

A la Q.F. B. María de Lourdes Alarcón Mortera, a la M. en C. Dolores Martín Tapia y al Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra su apoyo técnico necesario para la realización de mi proyecto y por su disposición cada vez que se me presentó alguna dificultad a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A Arturo Raya Sandino por asesorarme y enseñarme a realizar las técnicas necesarias para mi proyecto y un agradecimiento muy especial a todos mis compañeros del laboratorio por su disposición y ayuda cada vez que lo necesito.

A mi comité tutorial la Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido y el Dr. Michael Schnoor por la revisión de mi trabajo de tesis y por sus observaciones para mejorar el proyecto.

A mis padres por todo su apoyo durante mi vida y especialmente a mi mamá por su esfuerzo para que salga adelante y cumpla todas mis metas. Quiero agradecer también a mis tíos, tías, primos y primas por estar al pendiente de mí y por su apoyo.

A Aldo Adrián Lara Holguín por este año que hemos compartido y por tu apoyo durante la realización de este trabajo. También a todos mis amigos especialmente a Karina, Dany, Argel y Luis.

Y por último a todos mis maestros que participaron en mi educación a lo largo de toda mi vida ya que hoy estoy aquí por su esfuerzo y entrega.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	7
Abstract	8
Lista de abreviaturas	9
I) Introducción	11
1) Epitelios	11
2) Uniones estrechas (UE)	12
2.1) Organización molecular de la UE	14
2.2) El dominio PDZ y las proteínas citosólicas de la UE	14
3) ZO-2	17
4) El citoesqueleto	18
4.1) El citoesqueleto de actomiosina	18
4.2) Las proteínas Rho y su relación con el anillo cortical de actomiosina	20
4.3) Relación de las proteínas periféricas de la UE con el citoesqueleto	21
4.4) Efecto del silenciamiento y la activación de las proteínas Rho sobre la UE	24
4.5) Cambios inducidos en la organización del citoesqueleto apical por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2	26
4.6) Cambios inducidos en la tensión apical celular por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2	27
4.7) Cambios inducidos en la tensión célula-célula por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2	28
4.8) Cambios en la conformación de ZO-1 inducidos por la ausencia de ZO-2 y la disminución de la tensión del anillo cortical de actina	28
4.9) Adhesiones al sustrato	29
4.10) Cambios inducidos en las fibras de estrés al silenciar o noquear a ZO-1 y/o ZO-2	29
4.11) Cambios inducidos en el anillo cortical de actomiosina y las fibras de estrés al bloquear o activar a las proteínas Rho	31
5) El microambiente celular	31
5.1) La rigidez celular	32
5.2) Transición epitelio-mesénquima	33
5.3) La rigidez del sustrato modifica la actividad de YAP y twist	34
5.4) La morfología y la cantidad de fibras de estrés cambia de acuerdo a la rigidez del sustrato	37
5.5) La rigidez del sustrato modula la migración celular	38
5.6) La tensión aumenta la proliferación celular	39

II)	Planteamiento del Problema	40
III)	Objetivo general	40
IV)	Objetivos experimentales	40
V)	Hipótesis	40
VI)	Material y Métodos	41
	6) Cultivo celular	41
	7) Construcciones empleadas	41
	8) Transfección del biosensor de E-cadherina	42
	9) Determinación de la longitud de onda adecuada para medir la emisión del fluoróforo YFP en los experimentos de FRET	42
	10) Análisis de FRET en el borde celular de las monocapas de las células MDCK parentales y ZO-2 KD	42
	11) Preparación de sustratos de diferente tensión	43
	11.1) Preparación de cubreobjetos aminosilanizados	44
	11.2) Preparación de cubreobjetos clorosilanizados	44
	11.3) Preparación de hidrogeles con diferente grado de rigidez	45
	11.4) Unión covalente de fibronectina a hidrogeles con diferente grado de rigidez	45
	12) Ensayo de adhesión	46
VII)	Resultados	47
	1) La emisión máxima de FRET ocurre a una longitud de onda de 526 nm	47
	2) La mayoría de las células parentales tienen valores de FRET entre 70-90, mientras que estos valores bajos de FRET sólo los exhiben una minoría de células ZO-2 KD	48
	3) La ausencia de ZO-2 aumenta la sensibilidad de las células a la rigidez del sustrato	50
VIII)	Discusión	52
XI)	Bibliografía	54

Resumen

La unión estrecha (UE) regula el tránsito de iones y moléculas por la ruta paracelular de los epitelios. Está constituida por proteínas transmembranales que establecen el contacto célula-célula y proteínas citoplasmáticas que funcionan como una plataforma a la que se asocia el citoesqueleto de actomiosina y proteínas de señalización. La proteína adaptadora de la UE, ZO-2, se une al citoesqueleto de actomiosina y lo regula a través de las proteínas Rho. En las células MDCK que tienen silenciada (KD) la expresión de ZO-2 se activa RhoA y disminuye la adhesión célula-célula y célula-sustrato. Pero por otro lado, proliferan las fibras de estrés y RhoA no responde a la estimulación con el ácido lipofosfatídico, lo que sí sucede cuando se restablece la expresión de ZO-2. Por ello nos preguntamos si la ausencia de ZO-2 además de actuar sobre la actina basal altera la tensión del anillo cortical de actomiosina. Para probar este punto empleamos un biosensor de E-cadherina que se asocia al citoesqueleto de actomiosina a través de las cateninas α y β , de tal manera que cuando se tensa el anillo de actomiosina disminuye la señal de FRET porque los fluoróforos TFP y YFP presentes en la porción citosólica de la E-cadherina se distancian entre sí. Aquí encontramos que la eficiencia del FRET en un rango de 70 a 90 es más frecuente en las células parentales que en las células ZO-2 KD, lo que indica que en ausencia de ZO-2 disminuye la tensión del anillo cortical de actomiosina. Para estudiar la importancia de ZO-2 en la adhesión célula-sustrato, las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron sobre sustratos con diferente grado de rigidez que van desde 5 a 60 kPa. Al observar al microscopio la cantidad de células que se adhieren a los sustratos encontramos que las células MDCK ZO-2 KD son más sensibles que las parentales a la disminución de la rigidez del sustrato. En conjunto estos resultados nos indican que ZO-2 es importante para mantener la tensión del anillo cortical de actomiosina y para que las células puedan adherirse a sustratos con baja rigidez.

Abstract

Tight junctions (TJs) regulate the transit of ions and molecules through the paracellular route of epithelia. TJs are constituted by transmembrane proteins that establish cell-cell contact and cytoplasmic proteins that function as platforms to which the actomyosin cytoskeleton and signaling proteins are associated. ZO-2 is a cytoplasmic TJ protein that binds and regulate the actomyosin cytoskeleton through activation of Rho proteins. In ZO-2 knock down (KD) MDCK cells RhoA is activated, cell-cell and cell-substrate adhesion diminishes and stress fibers proliferate. However in these cells RhoA cannot respond to further stimulation with lipophosphatidic acid until ZO-2 expression is reestablished. Therefore, we wondered if the lack of ZO-2 besides affecting basal actin also alters the contraction of the apical ring of actomyosin. For this purpose, we employed an E-cadherin biosensor that associates with the actomyosin cytoskeleton through α and β catenins. Hence, when the actomyosin ring contracts, FRET signal decreases as TFP and YFP fluorophores present in the cytosolic portion of the E-cadherin, distance themselves from each other. Here we found that FRET efficiency in the range of 70 to 90 is more frequent in parental than in the ZO-2 KD cells, thus indicating that the lack of ZO-2 decreased the contraction of the cortical ring of actomyosin. To study the importance of ZO-2 in cell-substrate adhesion, we plated parental and ZO-2 KD MDCK cells on substrates with different degree of stiffness, ranging from 5 to 60 kPa, and found that ZO-2 KD cells were more sensitive than parental MDCK cells to the decrease of substrate rigidity. Altogether, these results indicate that ZO-2 is important to maintain the contraction of the cortical ring of actomyosin and to allow cells to adhere to substrates with low rigidity.

Lista de abreviaturas

β -Pix.- Factor intercambiador de los nucleótidos de guanina de la proteína Rho 7

AF. - Adhesiones focales

Af-6.- Afadina

Arp2/3.- Proteínas 2 y 3 relacionadas con la actina

bp.- bipartita

CD2AP.- Proteína asociada a CD2

Cdc42.- Homólogo de la proteína 42 que controla la división celular

C/EBP.- Factor de transcripción que interactúa en la secuencia CCAAT

CK II.- Cinasa de caseína 2

DAPK3.- Proteína cinasa 3 asociada a la muerte

Dlg1.- Proteína supresora tumoral del disco largo de Drosophila

DOCK180.- Dedicado a la citocinesis

ELC.- Cadena ligera esencial de la miosina

EMT.- Transición epitelio-mesénquima

EpCAM.- Molécula de adhesión celular epitelial

FAK.- Cinasa de las adhesiones focales

GAP.- Proteína activadora de GTPasas

GEF.- Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GUK.- Guanilato cinasa

JAM.- Molécula de adhesión de las uniones estrechas

LASP-1.- Proteína con dominio LIM y SH3

Lats.- Cinasa larga supresora de tumores

LSR.- Receptor de lipoproteínas que estimula la lipólisis

MAGIs.- MAGUK invertida

MAGUK.- Proteína asociada a la membrana y homóloga a la cinasa de guanilato

MDCK.- Células de riñón de perro aisladas por Madin y Darby

MEC.- Matriz extracelular

MET.- Transición mesénquima-epitelio

MHC.- Cadena pesada de la miosina

MLCK.- Cinasa de la cadena ligera de la miosina

mTOR.- Proteína presente en los mamíferos que es blanco de la rapamicina

MUPP1.- Proteína con múltiples dominios PDZ 1

MYPT1.- Proteína blanco de la subunidad 1 de la fosfatasa
NES.- Señal de exportación nuclear
NLS.- Señal de localización nuclear
NM II.- Miosina no muscular 2
PAK2.- Cinasa de serinas y treoninas
PATJ.- Proteína asociada a las uniones estrechas
PKA.- Proteína cinasa A
PKC.- Proteína cinasa C
PP1.- Fosfoproteína fosfatasa 1
PTEN.- Fosfatasa de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.
Rac1.- Sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada a Ras 1
RLC.- Cadena ligera regulatoria
ROCK.- Proteína cinasa asociada a Rho
SH3.- Homólogo de Src 3
SNAIL.- Proteína con dedos de zinc
TAMP.- Proteína marvel asociada a la union estrecha
TEAD.- Factor potenciador transcripcional TEF-1
TER.- Resistencia eléctrica transepitelial
TGF-β.- Factor transformante del crecimiento beta
UA.- Unión adherente
UE.- Unión estrecha
YAP.- Proteína asociada a Yes
ZO-1.- Zonula occludens 1
ZO-2.- Zonula occludens 2
ZO-3.- Zonula occludens 3
ZONAB.- Proteína de unión a ácidos nucleicos asociada a ZO-1

I) INTRODUCCION

1) Epitelios

Los epitelios cubren la superficie del cuerpo, las cavidades y los ductos de los organismos multicelulares. Las células epiteliales tienen dos características distintivas: 1) están polarizadas, lo significa que tienen una membrana apical y otra basolateral morfológica y bioquímicamente distintas, y 2) poseen uniones estrechas (UE) [Para revisiones ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Tortora 2011)].

Los epitelios de acuerdo a su organización se clasifican en:

- 1) Simples. Forman una capa única de células o monocapa.
- 2) Estratificados. Tienen dos o más capas de células y se localiza en regiones expuestas a alto estrés mecánico y químico (e.g. piel, cornea, vagina, tráquea).
- 3) Pseudoestratificados. Se denominan así porque aparentan tener varias capas celulares. Esto sucede por la posición dispereja que tienen los núcleos en estos tejidos debido a que algunas células no llegan hasta la región apical. En realidad, estos epitelios son simples ya que todas las células están en contacto con la membrana basal (e.g. tracto respiratorio).

Los epitelios de acuerdo a la forma de sus células se clasifican como:

- 1) Escamosos. Las células tienen poca altura y asemejan escamas (e.g. pulmón).
- 2) Cúbicos. Las células tienen forma cúbica o hexagonal (e.g. riñón).
- 3) Columnar. Las células son más altas que anchas (e. g. intestino).
- 4) De transición. Las células cambian de forma escamosa a cúbica dependiendo de la condición del órgano (e.g. vejiga) (Figura 1) [Para revisiones ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Tortora 2011)].

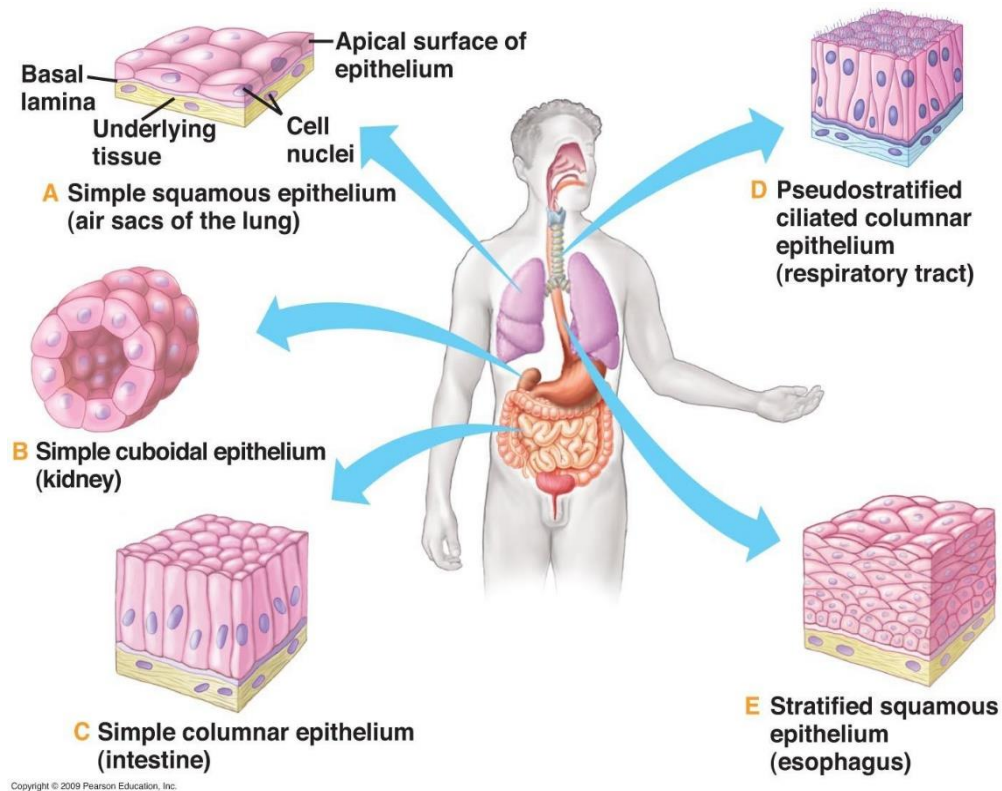


Figura 1. Tipos de epitelios presentes en el cuerpo humano. Se esquematiza la morfología de las células epiteliales según su tipo. A) Epitelio escamoso simple presente en los alveolos pulmonares. B) Epitelio simple cuboidal de los túbulos renales. C) Epitelio simple columnar del intestino. D) Epitelio columnar pseudoestratificado ciliado de la tráquea y E) Epitelio estratificado escamoso del esófago (Tortora., 2011).

2) Uniones estrechas (UE)

Las UEs permiten a los epitelios actuar como barreras al tránsito paracelular de iones y moléculas entre el exterior y el interior del organismo. Las UEs son estructuras de adhesión entre células adyacentes, que se localizan en el límite entre las membranas apical y basolateral. Las UEs también se llaman oclusoras porque originalmente se vio que impedían el paso de sustancias por la ruta paracelular. Sin embargo, posteriormente se encontró que hay epitelios laxos o permeables que transportan una gran cantidad de agua y solutos por la ruta paracelular. Esto hizo que las UEs dejaran de ser vistas como una especie de cemento inerte entre las células y pasaran a ser consideradas como una estructura cuyo grado de sellado varía en respuesta a múltiples factores fisiológicos, patológicos y experimentales [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Larre et al., 2014)].

Con la técnica de criofractura se observó que la UE circunda a las células por debajo de las microvellosidades apicales y forma una red de filamentos entrecruzados (Figura 2) (Staehelin et al., 1973). Por inmunofluorescencia en el plano lateral, la UE se observa como puntos en la porción superior de la membrana lateral mientras que, vista desde arriba o en fase la UE aparece en los bordes de las células, formando un patrón de “malla de gallinero” [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Larre et al., 2014) (Cereijido et al., 2001)].



Figura 2. Unión estrecha vista por criofractura en las células del intestino delgado de ratón. La UE se observa como una red de filamentos que circunda a la célula por debajo de las microvellosidades apicales (flecha) en la porción superior de la membrana lateral (asterisco) [Para revisión ver (Cereijido et al., 2001)].

Una de las principales funciones de la UE es regular el flujo de agua, iones y moléculas a través de la vía paracelular. Ésta función se denomina de compuerta y se evalúa midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER) o el tránsito de moléculas que sólo pueden atravesar al epitelio por la vía paracelular (e.g. dextrán) [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

Otra función canónica de las UEs es mantener la polaridad de la membrana plasmática al evitar el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana de la región apical a la basolateral y viceversa. Ésta función se puede evaluar observando la migración a la membrana basolateral de lípidos fluorescentes insertados en la membrana apical. También se puede estudiar analizando la distribución polarizada de

una proteína de membrana marcada con biotina [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

2.1) Organización molecular de la UE

La UE está formada por un complejo de proteínas que incluye a proteínas transmembranales y citoplasmáticas (Figura 3). Las proteínas transmembranales establecen el contacto célula-célula en el espacio intercelular y se dividen en 2 grupos:

- 1) Las proteínas de un solo dominio transmembranal, a las que pertenecen las proteínas angulinas/LSR y JAM, que son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Éstas proteínas son las primeras en aparecer en la región de la UE y marcan el sitio donde se establecerán las uniones tricelulares y bicelulares respectivamente [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].
- 2) Las proteínas con cuatro dominios transmembranales, que incluyen a las claudinas y a la familia de proteínas TAMP (Tight junction associated Marvel proteins). A esta última familia pertenecen ocludina, tricelulina y marvelD3. Se han identificado 27 diferentes tipos de claudinas que funcionan como poros o barreras que determinan la selectividad iónica paracelular de los epitelios [Para revisión ver (Günzel et al., 2013)]. La ocludina junto con las claudinas se polimerizan en la membrana y forman los filamentos que se observan por criofractura. La tricelulina se ubica en las uniones tricelulares y tanto ella como MarvelD3 tienen una función redundante con la ocludina [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

2.2) El dominio PDZ y las proteínas citosólicas de la UE

Muchas proteínas citosólicas de la UE poseen dominios PDZ (Figura 4). Este dominio se denomina así por el nombre de las tres proteínas donde esta región se describió por primera vez: PSD95, DIg1 y ZO-1. Los dominios PDZ interactúan de forma homotípica con dominios PDZ presentes en otras proteínas y de manera heterotípica con motivos de unión a dominios PDZ presentes en el extremo carboxilo terminal de diversas proteínas. Las proteínas de la UE con dominios PDZ se clasifican en: MAGUKs

(membrane associated guanylate kinase homologues), MAGIs (MAGUK invertidas) y proteínas con múltiples dominios PDZ.

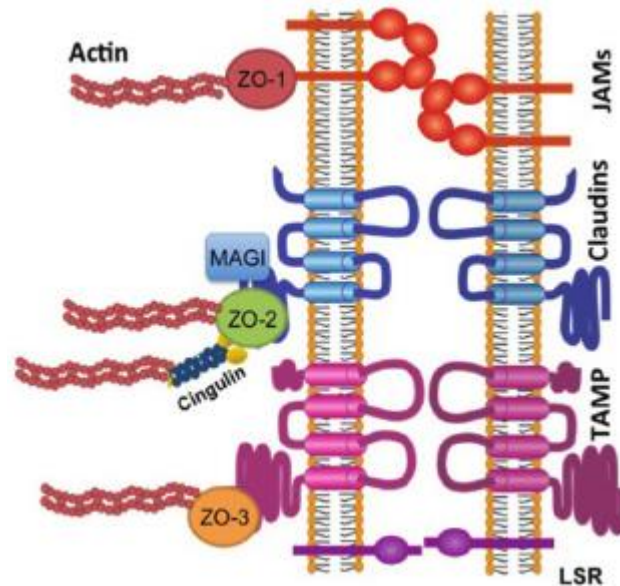


Figura 3. Proteínas que componen a la UE. Las proteínas transmembranales de la UE pertenecen a 3 familias: 1) A la superfamilia de las inmunoglobulinas pertenecen las proteínas JAM y angulinas/LSR. 2) La familia de las claudinas con alrededor de 27 miembros, dependiendo de la especie y 3) TAMP que incluye a las proteínas tricelulina, ocludina y marvelD3. Las proteínas periféricas que tienen dominios PDZ se clasifican en 4 familias: 1) MAGUK que incluye a ZO-1, -2 y -3. 2) Proteínas MAGUK invertidas como MAGI-1, -2, y -3. 3) Proteínas con múltiples dominios PDZ donde se ubican PATJ y MUPP1 y 4) Proteínas con dominios PDZ que no pertenecen a los grupos anteriores como Par-3, Par-6 y AF6. También en la UE se encuentran algunas proteínas sin dominios PDZ que se unen al citoesqueleto de actina y regulan la actividad de las proteínas Rho, como cingulina y paracingulina (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

Las proteínas MAGUK tienen dominios PDZ, SH3 y guanilato cinasa (GUK). Los dos últimos también son dominios de unión proteína-proteína. Las proteínas MAGUK presentes en las UE son: ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals 1 (Figura 4).

En las proteínas MAGI, como su nombre lo indica, la mayoría de los dominios PDZ se encuentran en el segmento carboxilo al revés de lo que sucede con las proteínas MAGUK. Además, en lugar de un dominio SH3 tiene al módulo WW. Tanto los dominios SH3 como WW interactúan con sitios ricos en prolina, siendo PPXP y PPXY los motivos canónicos respectivos. A esta familia pertenecen las proteínas MAGI-1, -2 y -3 (Figura 4).

Las proteínas con múltiples dominios PDZ son MUPP1 y PATJ. Además, en la UE se localizan las proteínas PAR-3, PAR-6 y AF-6 que contienen dominios PDZ, pero no pertenecen a los grupos anteriormente descritos (Figura 4).

Cingulina y paracingulina son proteínas citosólicas de la UE que carecen de dominios PDZ. Su estructura es similar a la miosina, sin embargo, no actúan como motores dependientes de actina. Cingulina y paracingulina tienen una cabeza amino globular, un cuerpo que al homodimerizarse forma una espiral y una cola globular pequeña en el extremo carboxilo terminal. La cingulina interactúa con actina, miosina, afadina, ocludina, ZO-1, -2 y -3, JAM-A y con la miosina no muscular y activa a la proteína Rho a través de GEF-H1. La paracingulina tiene un 40% de identidad de secuencia con la cingulina, activa a Rac1 y se asocia tanto a la UE como a la unión adherente (UA) (Figura 3) [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

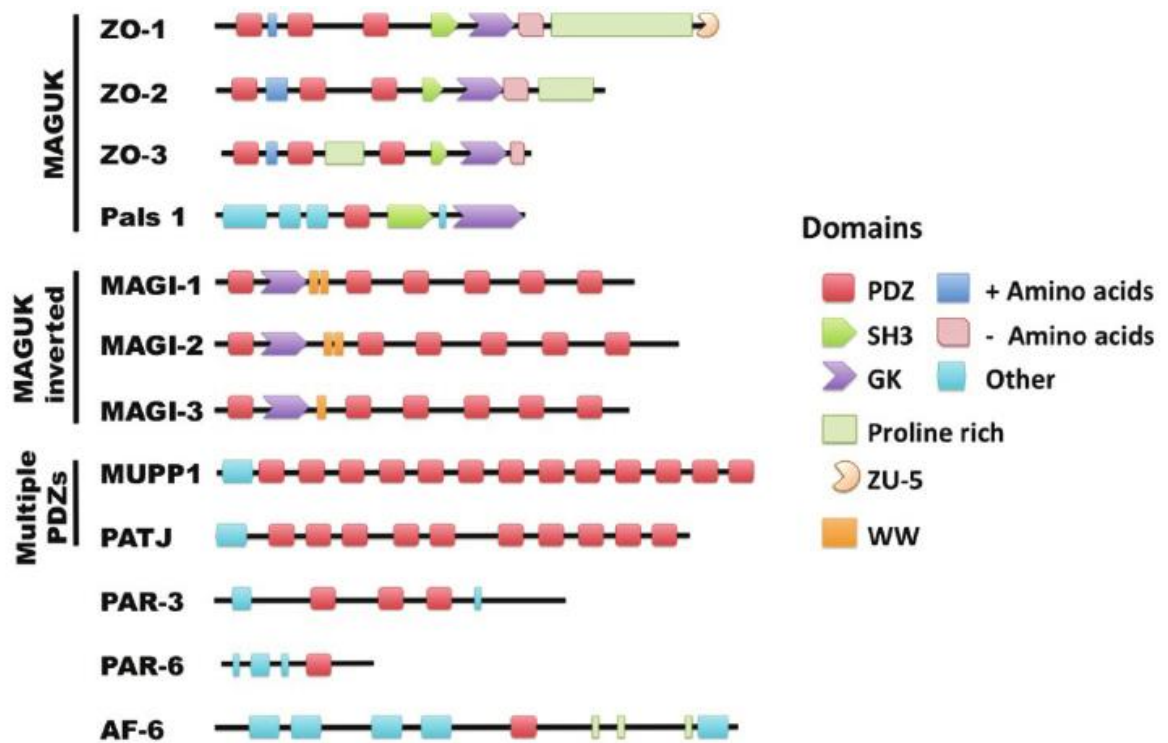


Figura 4. Esquema de las proteínas de la UE con dominios PDZ. Las proteínas de la familia MAGUK tienen dominios PDZ, SH3 y GUK (GK). Las proteínas MAGUK invertidas concentran sus dominios PDZ en el extremo carboxilo terminal, al revés que las proteínas MAGUK, y en lugar de poseer un dominio SH3 tiene un dominio WW. El resto de las proteínas que tienen dominios PDZ en la UE carecen de los módulos SH3 y GUK (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

3) ZO-2

ZO-2 es una proteína de 160 kDa que se descubrió en un co-inmuno-precipitado de ZO-1 (Gumbiner et al., 1991). ZO-2 pertenece a la familia MAGUK (Itoh et al., 1999) ya que tiene 3 dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK. Además, ZO-2 posee una región de aminoácidos cargados positivamente y una región rica en prolina donde se encuentra el sitio de unión a actina. Los dominios de ZO-2 están separados por regiones únicas (U). ZO-2 interacciona con una gran variedad de proteínas: Por ejemplo, coimmunoprecipita con proteínas nucleares como lámina B1 (Jaramillo et al., 2004), interactúa con los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP y Myc (Betanzos et al., 2004), con cinasas como PKA, SRPK y PKC (Avila-Flores et al., 2001) (Quiros et al., 2013), con el fosoinositido PtdIns (4,5) P2 (Meerschaert et al., 2009), con la proteína supresora de tumores hScrib (Métais et al., 2005), con la oncoproteína LASP-1 (Mihlan et al., 2012), con proteínas del citoesqueleto como actina (Wittchen et al., 1999) y con proteínas de los contactos celulares como la β -catenina de la UA (Itoho et al., 1999), ocludina, ZO-1, JAMs y claudinas de la UE y con las conexinas 30, 32, 36 y 43 de las uniones comunicantes (Figura 5) [Para revisión ver (González-Mariscal et al., 2017)].

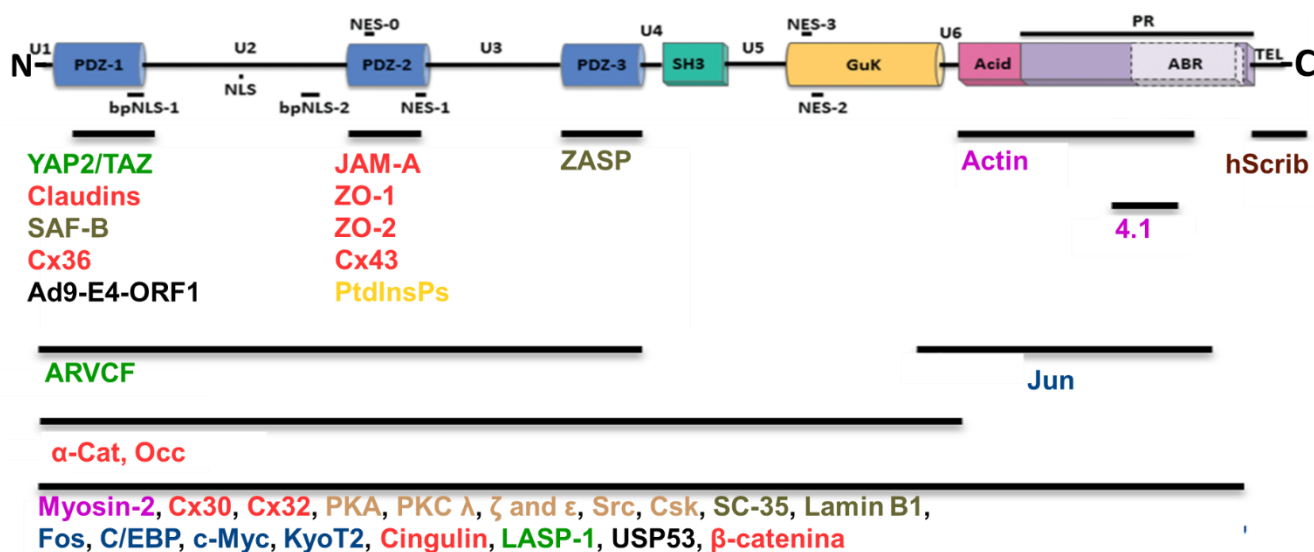


Figura 5. Dominios de ZO-2 y su asociación con otras proteínas. El esquema muestra los dominios de ZO-2, los segmentos únicos (U,1-6), la región rica en prolinas (PR), la zona de unión a actina (ABR), la región ácida (Acid) y las señales de localización (NLS) y de exportación nuclear (NES). También se indican las proteínas a las que se une ZO-2: proteínas de los contactos celulares (rojo), proteínas del citoesqueleto (morado), oncoproteínas (verde), proteínas supresoras tumorales (café), cinasas (crema), ubiquitin peptidasas (negro) factores nucleares (verde olivo), factores de transcripción (azul), proteínas virales y lípidos (amarillo). Modificado de (González-Mariscal et al., 2017) y (González-Mariscal et al., 2016).

ZO-2 es una proteína que se encuentra tanto en las UEs como en el núcleo. El movimiento intracelular de ZO-2 se regula por modificaciones postransduccionales. Para entrar al núcleo ZO-2 cuenta con señales de localización nuclear (NLS) y para salir tiene señales de exportación nuclear (NES). En la región U2, ZO-2 tiene dos NLS bipartitas (bp), una NLS monopartita y 16 repetidos de serina-arginina que al fosforilarse direccionan a ZO-2 a los moteados nucleares. ZO-2 posee también 4 NES (González-Mariscal et al., 2006). Para que ZO-2 salga del núcleo es necesario que se fosforile la NES-1 por la PKC ϵ (Chamorro et al., 2009) y que la bp NLS-2 se inactive por O-GlcNAcetilación (Quiros et al., 2013). Cuando ZO-2 llega a la membrana plasmática se fosforila por la PKC ζ en la S257 localizada en la bpNLS-2 y esto permite que la UE madure (Figura 5) (Quiros et al., 2013).

4) El citoesqueleto

El citoesqueleto está constituido por una red de proteínas filamentosas organizadas en 3 dimensiones que regulan la forma y organización interna de las células. El citoesqueleto se extiende por toda la célula, se ancla a la membrana y a los organelos internos y puede percibir fuerzas externas aplicadas a la célula y las propiedades mecánicas del ambiente. El citoesqueleto genera señales que producen cambios morfológicos y en la expresión de genes. A este proceso se le denomina mecanotransducción [Para revisión ver (Díaz-Chiguer et al., 2015)]. El citoesqueleto está formado por: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. (Lodish, 2016).

4.1) El citoesqueleto de actomiosina

La actina es una proteína monomérica (G-actina, o actina globular) que se polimeriza espontáneamente en filamentos estables que tienen una conformación de hélice (F-actina o actina filamentosa). Este proceso depende de la concentración de G-actina y de cationes como el Mg² y tiene tres fases: la primera de nucleación, seguida por la fase de elongación hasta que finalmente se alcanza la fase del estado estacionario. Los filamentos de actina están polarizados y todos los monómeros se orientan en la misma dirección. Esto hace que el filamento se polimerice más rápidamente hacia el lado

+, que hacia el -, en un proceso dependiente de ATP. Así, la G-actina unida al ATP se asocia al extremo + y el ATP se hidroliza a ADP y P. El P se libera lentamente de las subunidades del filamento, generando un gradiente en el filamento con subunidades de ATP-actina en el extremo +, una región con ADP-P-actina en medio y subunidades de ADP-actina hacia el extremo - (Lodish, 2016).

Existen más de 100 proteínas que regulan el ensamble de nuevos filamentos de actina, la disponibilidad de los monómeros, el inicio de la polimerización, la longitud de los filamentos y la formación de redes o manojos de actina [Para revisión ver (Pollard & Cooper, 2009)].

Las miosinas son proteínas motoras que “caminan” sobre los filamentos de actina produciendo tensión, a través de un mecanismo dependiente de ATP. La mayoría de las miosinas, incluyendo a la miosina no muscular II (NM II), pertenecen a la clase II. Éstas miosinas se caracterizan porque tienen: dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras regulatorias y dos cadenas ligeras esenciales. Poseen también un dominio globular de “cabeza”, donde se localizan los sitios de unión al ATP y a la actina. El “cuello” de la miosina está formado por las cadenas ligeras esenciales y regulatorias, mientras que el “cuerpo” se integra por las cadenas pesadas que forman una espiral que termina en una “cola” no enrollada. La actividad de ATPasa de la cabeza promueve un cambio conformacional en la molécula que permite el movimiento antiparalelo sobre los filamentos de actina. A los filamentos bipolares de miosina que interactúan con los filamentos de actina para producir tensión o generar movimiento se les conoce como filamentos de actomiosina (Figura 6) (Holmes et al., 2007) [Para revisión ver (Vicente-Manzanares et al., 2009)].

La miosina NM II se activa por la fosforilación de la cadena ligera regulatoria en la serina 19 y en la treonina 18 por las cinasas MLCK, ROCK, ZIPK/DAPK3 y MRCK. Esto promueve un cambio conformacional en la miosina y aumenta su actividad de ATPasa. ROCK por su parte también inhibe a la fosfatasa de la miosina NM II, a PP1 y a MYPT1 y, por lo tanto, aumenta la activación de la miosina. La miosina NM II se inhibe por la fosforilación por las cinasas PKC, CK II y TRPM7 que actúan tanto en la cadena ligera regulatoria como en el dominio enrollado y en la cola [Para revisión ver (Vicente-Manzanares., 2009)].

4.2) Las proteínas Rho y su relación con el anillo cortical de actomiosina

La superfamilia de GTPasas Ras comprende a más de 150 proteínas agrupadas en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf. Estas pequeñas proteínas G se caracterizan porque intercambian el GDP por GTP e hidrolizan al GTP, y porque se activan cuando están unidas al GTP y se inactivan cuando tienen GDP. El citoesqueleto de actomiosina se regula por la familia de proteínas Rho integrada por las proteínas: RhoA, Rac1 y Cdc42. [Para revisión ver Quiros et al., 2014] (Citi et al., 2014)].

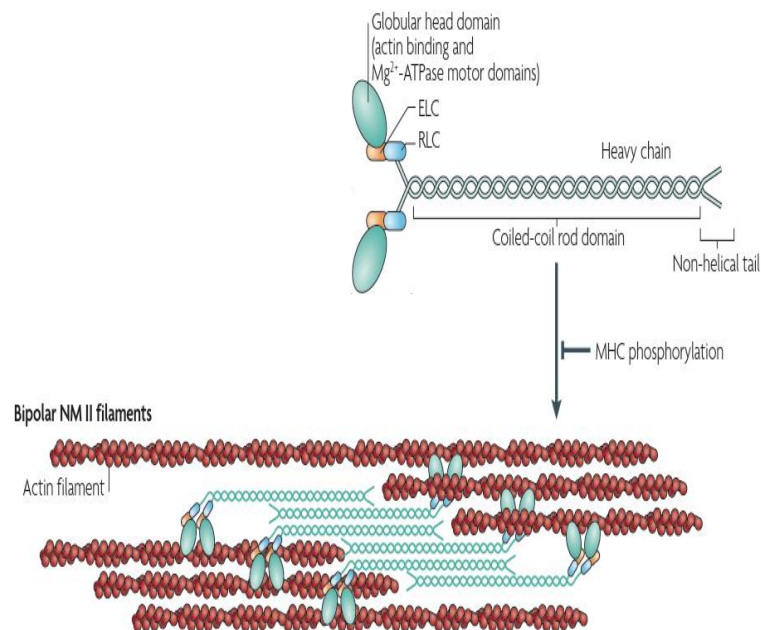


Figura 6. Estructura de la miosina no muscular II y su orientación sobre los filamentos de actina. En la cabeza globular de la miosina se encuentra el sitio de unión a actina y la región que cataliza la actividad de ATPasa. El cuello consta de dos cadenas ligeras una esencial (ELC) y otra reguladora (RLC). El cuerpo lo forma una cadena pesada organizada en espiral (*coiled-coil rod domain*) que finaliza en una cola no enrollada. La fosforilación de la cadena pesada de la miosina (MHC) inhibe la formación bipolar de los filamentos de miosina. En la parte inferior del esquema se muestra la organización de la miosina NM II con los filamentos de actina. Los filamentos bipolares de la miosina NM II que se orientan uno a la derecha y el otro a la izquierda, unen a los filamentos de actina en manojos. [Modificado de (Vicente-Manzanares et al., 2009)].

Las proteínas Rho se regulan positiva y negativamente por proteínas GEFs (guanine nucleotide exchange factor) y GAPs (GTPase activating proteins),

respectivamente. Las proteínas GEF facilitan el intercambio de GDP por GTP. En cambio, las proteínas GAP favorecen la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP al GDP. A su vez las proteínas GEFs y GAPs interactúan con proteínas adaptadoras para su modulación y reclutamiento (Figura 8) [Para revisión ver (Citi et al., 2014)]. Las proteínas GEF-H1 y p114Rho-GEF son específicas para RhoA y se reclutan a la UE por la cingulina. En el caso de GEF-H1 su asociación con cingulina disminuye su actividad [Para revisión ver (Itoh, 2013)].

En términos generales se sabe que RhoA regula la formación de fibras de estrés y de los manojos de actina que se forman en las lamelas. Rac 1 regula la formación de lamelipodios y Cdc42 los filopodios. Los lamelipodios forman el borde exterior de las lamelas y miden de 1 a 2 μm de ancho. Están conformados por una red de filamentos de actina ramificada por acción del factor nucleador de actina, Arp2/3. Las lamelas son extensiones celulares que se encuentran por detrás de los lamelipodios y se caracterizan por la presencia de manojos de filamentos de actina largos y contráctiles. Los filopodios son protrusiones de la membrana con forma de dedos presentes en el frente de migración y que contactan a las células vecinas (Lodish, 2016).

El citoesqueleto de actina junto con la miosina forma en la región apical de las células epiteliales un cinturón que se asocia al complejo de unión apical formado por la UE y la UA. El anillo cortical de actina al contraerse (Mooseker., 1976) regula la función de barrera de los epitelios pues si aumenta mucho la tensión abre las UEs (Turner et al., 2000). La contracción del anillo cortical de actomiosina se induce por RhoA que activa a la cinasa ROCK que fosforila a la cadena ligera de la miosina [Para revisión ver (Vicente-Manzanares et al., 2009)].

4.3) *Relación de las proteínas periféricas de la UE con el citoesqueleto*

ZO-1 y ZO-2 se unen a la actina a través de un segmento que se localiza en su porción carboxilo terminal, en la región rica en prolinas. El sitio de unión a actina en ZO-1 humana se ubica entre los aminoácidos 1151 y 1371 (Fanning et al., 2002) y en ZO-2 canina entre los aminoácidos 940 y 1166 (dato no publicado) (Figura 4 y 5).

Varias proteínas periféricas del complejo de unión apical, conformado por la UE y la UA, interactúan directamente con las proteínas Rho, GEFs y GAPs para regular el citoesqueleto de actina. Por ejemplo:

- 1) GEF-H1 se secuestra en la UE por un complejo constituido por el factor de transcripción ZONAB, y por cingulina. Este complejo restringe la activación de RhoA (Figura 8) (Nie, Aijaz, Leefa Chong San, Balda & Matter, 2009).
- 2) ZO-1 al asociarse en la UE con RhoGEF11 promueve la función de barrera de la UE y la organización del complejo de unión apical vía la activación de RhoA (Figura 8) (Itoh, Tsukita, Yamazaki & Sugimoto, 2012).
- 3) ZO-1 en la UE se une y activa a tuba, una GEF específica de Cdc42 (Figura 8) (Otani, Ichii, Aono & Takeichi, 2006).

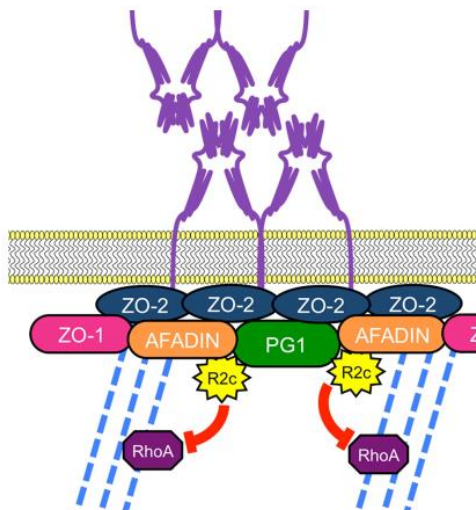


Figura 7. ZO-2 inhibe la contracción del anillo cortical de actomiosina. JAM-A (morado) interacciona directamente con ZO-2, a quien se unen afadina y GEF1 (PG1). Ésta última activa a su efector Rap2c (R2c) que inhibe a RhoA. De ésta manera ZO-2 inhibe la contracción del citoesqueleto y controla la función de barrera de la UE (Monteiro., 2013).

- 4) Las proteínas GAP SH3BP1, (SH3 domain-binding protein 1) y MgcRacGAP presentes en las UEs, se asocian a la paracingulina. SH3BP1 además se une

con la proteína plataforma CD2AP para promover la señalización de Cdc42 que lleva a la formación de las UEs (Elbediwy et al., 2012). MgcRacGAP se une también a la cingulina para inhibir a Rac1 (Figura 8) (Guillemot et al., 2014).

- 5) ZO-2 se une a afadina y a GEF1. La proteína GEF1 activa a su efector Rap2c que inhibe a RhoA y de esta manera ZO-2 bloquea la contracción del anillo cortical de actomiosina (Figura 7) (Monteiro et al., 2013).
- 6) Rac1 estimula la polimerización de la actina y estabiliza y agrupa a la E-cadherina favoreciendo la formación de nuevos contactos celulares [Para revisión ver (Vicente-Manzanares et al., 2009)].
- 7) La paracingulina recluta a TIAM (T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein) y a GEF-H1 para activar a Rac1 y RhoA en la membrana lateral (Figura 8) (Guillemot, Paschoud, Jond, Foglia & Citi, 2008).
- 8) En ausencia de ZO-2, GEF1-H1 se concentra en la UE por cingulina. Esto hace que aumente la cantidad de RhoA activa y de ROCKII, lo que lleva a un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y a la formación de fibras de estrés (Raya-Sandino., 2017). Sin embargo, desconocemos el efecto que esto tiene sobre la contracción del anillo cortical de actomiosina.
- 9) En ausencia de ZO-2 aumenta Rac1-GTP. Esto disminuye el nivel de cofilina fosforilada y promueve la formación de lamelas, lo que favorece la migración celular. Sin embargo, se forman varias lamelas por célula, por lo que el movimiento se vuelve desordenado (Raya-Sandino., 2017).
- 10) La falta de ZO-2 también aumenta el nivel de Cdc42 activo y esto junto con el incremento de RhoA activo despolariza al uso mitótico promoviendo que las células crezcan unas encima de otras y en cultivos en 3 dimensiones induce la formación de quistes con múltiples lúmenes (Raya-Sandino et al., 2017).

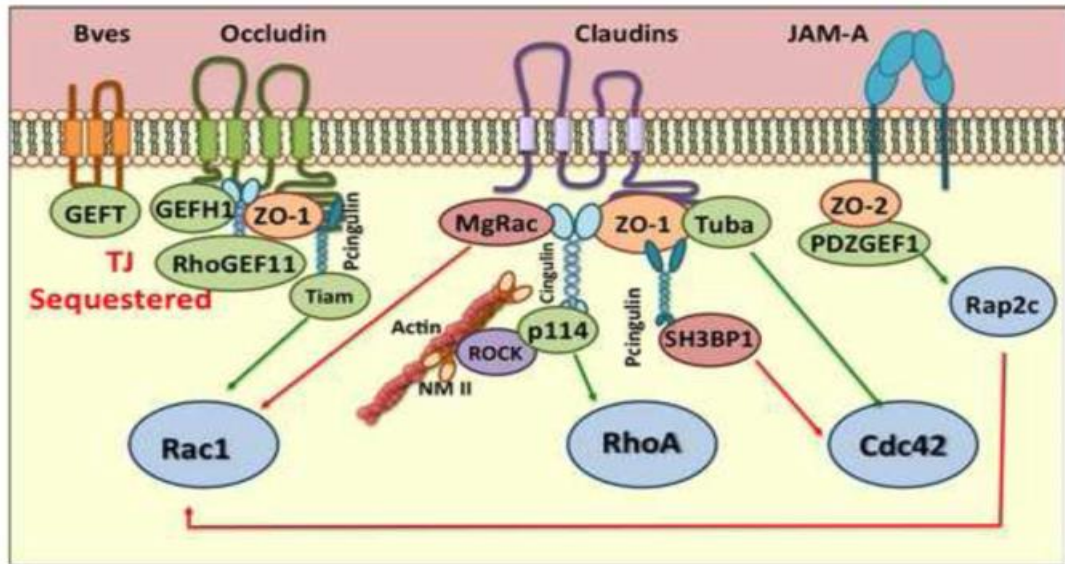


Figura 8. Proteínas plataforma que interactúan con GEFs y GAPs en la UE. Las GEFs se representan en color verde y las GAPs en color rojo. GEFH1, RhoGEF11 y Tiam se reclutan a la UE por ZO-1, cingulina y paracingulina. Esto promueve la activación localizada de Rac1. MgcRacGAP (MgRac) se asocia con cingulina en el borde celular para inactivar a Rac1. Cingulina se asocia con p114RhoGEF para inhibir a RhoA y a su efector ROCK. La asociación de ZO-1 con Tuba activa a Cdc42, mientras que la asociación de ZO-1 con paracingulina activa a SH3BP1 e inactiva a Cdc42. ZO-2 se asocia a PDZGEF1 y recluta a Rap2c, que inhibe a RhoA (Monteiro., 2013) y a Rac1. [Imagen tomada de (Quiros et al., 2014)].

4.4) Efecto del silenciamiento y la activación de las proteínas Rho sobre la UE

La inhibición de RhoA en las células epiteliales genera efectos contradictorios. Así, algunos han visto que no afecta la forma ni la distribución de las proteínas de la UE (Bruewer et al., 2004) (Jou et al., 1998), mientras que otros han observado que disminuye la localización de los componentes de la UE (Gopalakrishnan et al., 1998). RhoA constitutivamente activa favorece la acumulación de las proteínas de la UE en la membrana plasmática y protege a la UE durante la depleción de ATP (Gopalakrishnan et al., 1998), pero también puede inducir la desorganización de los filamentos de la UE y provocar la deslocalización de ocludina, ZO-1, JAM y las claudinas -1 y -2 (Jou et al., 1998) (Bruewer et al., 2004). Por lo que se piensa que tanto la sobreactivación como el silenciamiento de RhoA son dañinos para la UE y que más bien se necesita un equilibrio entre la cantidad de Rho activa e inactiva para la formación y mantenimiento de la UE. Algo similar se observa en Rac1 y Cdc42, ya que Rac1 constitutivamente activa disminuye la expresión de las claudinas -1 y -2 del borde celular y Rac1 dominante

negativa disminuye la cantidad de JAM del borde celular y redistribuye a las claudinas -1 y -2 al citoplasma. (Bruewer et al., 2004). Así mismo, Cdc42 constitutivamente activa elimina a ocludina, ZO-1 y JAM del borde celular, y desplaza a las claudinas -1 y -2 al citoplasma y la dominante negativa de Cdc42 mueve a la claudina-2 del borde celular al citoplasma (Bruewer et al., 2004).

En las células MDCK ZO-2 KD hay una mayor cantidad de RhoA activa en comparación con las células parentales. Sin embargo, la transfección de hZO-2 no susceptible al silenciamiento, incrementa cinco veces la actividad de RhoA (Figura 9, 1). Además, cuando se utiliza al ácido lisofosfatídico (LPA) como activador de RhoA, se observa que en las células parentales sube tres veces la actividad de RhoA, mientras que las células ZO-2 KD no responden a esta activación a menos que se les transfecte hZO-2 (Figura 9, 2-6). Esto sugiere que ante la ausencia de ZO-2, las células sobreactivan a RhoA, tal vez para mantener selladas las UEs. Pero que este esfuerzo es máximo, porque las células pierden la capacidad de respuesta a la estimulación de RhoA con LPA. Sabemos que la activación de RhoA por ausencia de ZO-2 genera fibras de estrés, pero no sabemos si induce una mayor contracción del anillo cortical de actomiosina.

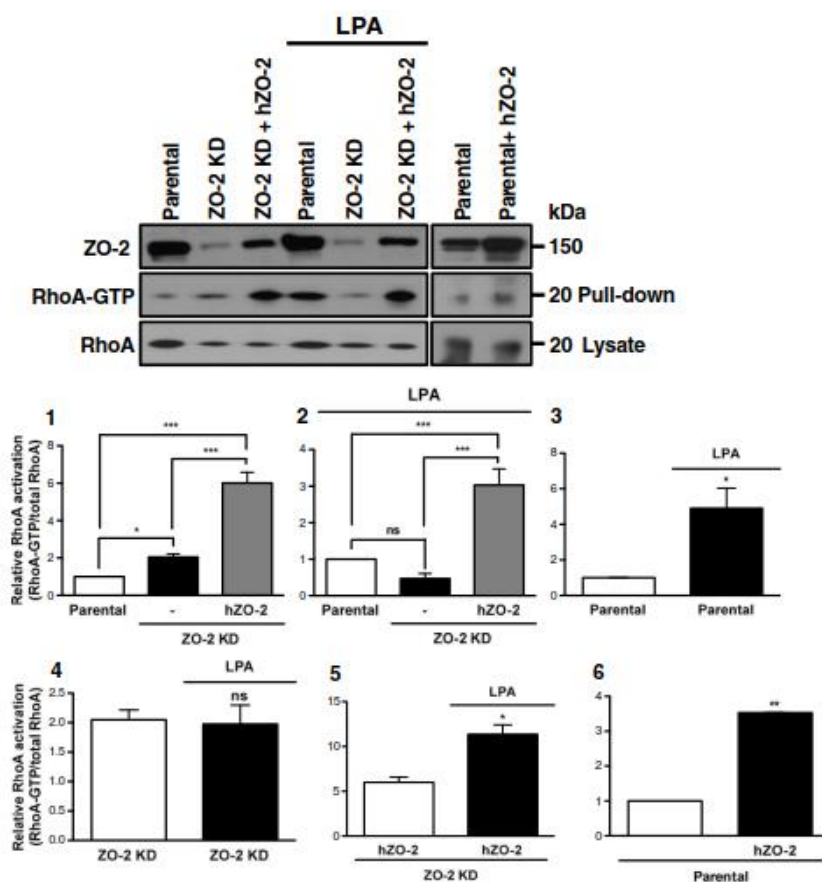


Figura 9. La ausencia de ZO-2 aumenta la activación de RhoA pero evita que responda a estímulos como el LPA. Determinación de RhoA mediante un ensayo de arrastre donde se emplea una proteína que contiene el dominio de unión a las proteínas Rho (RBD), en las células MDCK parentales, ZO-2 KD y ZO-2 KD transfectadas con hZO-2 no susceptible al silenciamiento. Cuando se silencia a ZO-2 sube la actividad de RhoA por arriba del nivel presente en las células parentales, pero RhoA pierde la capacidad de responder a su activador, el ácido lipofosfatídico (LPA).

4.5) Cambios inducidos en la organización del citoesqueleto apical por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2

Por microscopía electrónica de transmisión se observa que el doble silenciamiento (KD) de ZO-1 y ZO-2 en las células MDCK, hace que los filamentos de actina se concentren en el complejo de unión apical y corran paralelos al borde de los contactos célula-célula. Por inmunofluorescencia se observa que ROCK1 y la cadena ligera de la miosina fosforilada también se acumulan en el complejo de unión apical (Fanning et al., 2012).

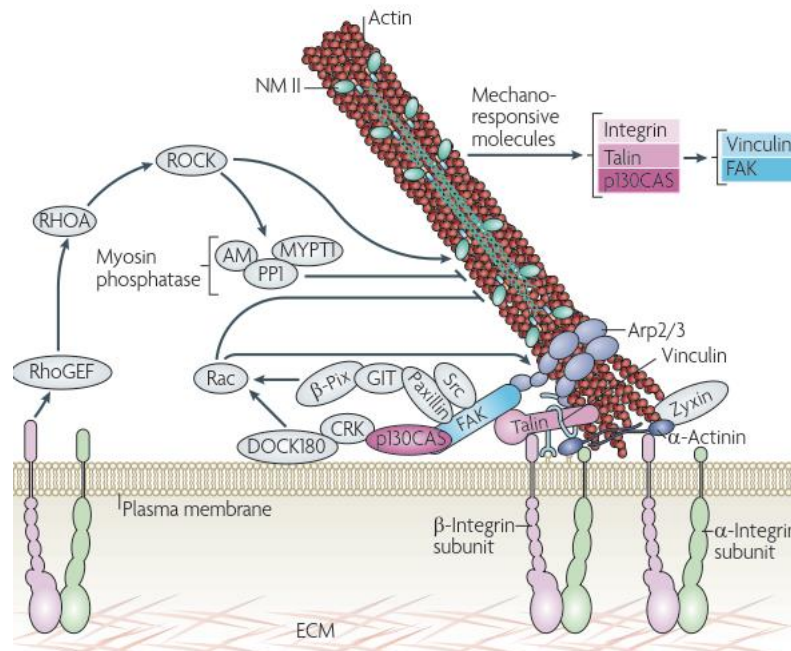


Figura 10. Componentes de las adhesiones focales. La adhesión de la célula al sustrato se establece con las integrinas, unas proteínas transmembranales que se unen a la actina a través de α -actinina, talina y vinculina. Las cinasas FAK y Src se unen a este complejo y activan a Rac por una vía de señalización en la que participa la paxilina, β -Pix y GIT. Por otro lado, estas cinasas activan a p130CAS que es sustrato de CRK y que activa a DOCK180 y finalmente a Rac. Rac induce la activación de Arp2/3 que promueve la polimerización de la actina. La adhesión focal crece cuando las integrinas activan a RhoGEF que a su vez activa a RhoA/ROCK. Ésta cinasa fosforila a la cadena ligera reguladora de la miosina e inhibe a las fosfatasas de la miosina promoviendo de esta manera el ensamble de los filamentos de actomiosina y la formación de las fibras de estrés (Vicente-Manzanares et al., 2009).

En las células mamarias epiteliales EpH4 ZO-1 KO + ZO-2 KD se forman manojos de filamentos de actina desorganizados en la porción apical y disminuye la activación de Rac1 lo que retarda la polarización celular (Ikenouchi et al., 2007).

4.6) *Cambios inducidos en la tensión apical celular por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2*

El doble silenciamiento de ZO-1 y ZO-2 en las células MDCK, aumenta la tensión de la superficie apical de la célula de acuerdo a lo revelado con el microscopio de fuerza atómica (Cartagena-Rivera, Van Itallie, Anderson & Chadwick, 2017). Cuando se restaura ZO-1, la tensión celular no regresa al nivel basal, lo que sugiere que se requiere tanto de ZO-1 como de ZO-2 para mantener la tensión normal de la célula. Cuando se inhibe la actividad de la miosina NM II con blebistatina, disminuye la tensión en las células control y con doble KD lo que sugiere que la tensión de la superficie apical de la célula se regula por las fibras de actomiosina (Cartagena-Rivera, Van Itallie, Anderson & Chadwick, 2017).

Cuando se silencia a ZO-1 y ZO-2 en las células MDCK, el borde celular deja de ser sinuoso y se lineariza, lo que sugiere que sin las proteínas ZO aumenta la tensión en el borde celular. Pero al reintroducir a ZO-1, el borde celular vuelve a ser sinuoso, lo que indica que la presencia de ZO-1 es suficiente para disminuir la tensión (Fanning et al., 2012). Así mismo cuando en las células MDCK se silencia a ZO-1 el borde se vuelve lineal (Van Itallie, Fanning, Bridges & Anderson, 2009). El silenciamiento de ZO-2 en cambio, no hace que el contorno celular pase de sinuoso a lineal (Van Itallie, Fanning, Bridges & Anderson, 2009) y (Raya-Sandino et al., 2017). Esto sugiere que ZO-1 es más fuerte que ZO-2 para regular la tensión celular y que en las células ZO-2 KD tal vez no aumente la tensión de la superficie apical porque probablemente no varíe la contracción del anillo cortical de actomiosina.

4.7) *Cambios inducidos en la tensión célula-célula por el silenciamiento de ZO-1 y ZO-2*

En las células endoteliales de la microvasculatura de la dermis humana HDMEC, el silenciamiento de ZO-1 KD disminuye la tensión del anillo cortical de actina (Tornavaca et al., 2015), y en las células MDCK ZO-2 KD se desconoce qué pasa con la tensión del anillo cortical de actomiosina, pero se sabe que su apariencia no cambia (Raya-Sandino et al., 2017).

4.8) *Cambios en la conformación de ZO-1 inducidos por la ausencia de ZO-2 y la disminución de la tensión del anillo cortical de actina*

En las células epiteliales Eph4 que carecen de ZO-3, ZO-1 tiene una conformación “estirada” y forma un heterodímero con ZO-2 a través de la interacción homotípica entre los dominios PDZ2 de estas proteínas. En esta condición ZO-1 a través de su dominio SH3 interactúa con el factor de transcripción ZONAB; por medio del dominio PDZ3 interactúa con JAM-A; y mediante el dominio GUK se asocia con ocludina. Además, las regiones de unión a actina presentes en ZO-1 y ZO-2 se asocian al citoesqueleto de actomiosina. Cuando las células Eph4 no expresan a ZO-2, o cuando se tratan con blebistatina, un inhibidor de la miosina, ZO-1 mantiene una conformación “estirada” que le permite interactuar con ZO-2, ZONAB, JAM-A y ocludina. En cambio, cuando se inhibe a la miosina y se silencia a ZO-2, ZO-1 se pliega sobre sí misma y deja de interactuar con JAM-A, ocludina y ZONAB. Entonces, el factor de transcripción ZONAB queda libre en el citoplasma y si en esta condición además se inhibe la degradación de proteínas en el proteosoma, ZONAB viaja al núcleo y promueve la proliferación celular al aumentar la transcripción de la ciclina D1 (Figura 11) (Spadaro et al., 2017). Con estas observaciones se concluye que ZO-2 y la tensión del cinturón de actomiosina mantienen a ZO-1 estirada lo que le permite interactuar con proteínas de la UE y secuestrar al factor de transcripción ZONAB en el borde celular.

4.9) *Adhesiones al sustrato*

Los contactos de la célula con la matriz extracelular (MEC) se llaman adhesiones focales (AF) y están mediados por integrinas y por proteínas adaptadoras que conectan a las integrinas con el citoesqueleto de actomiosina basal ("Focal adhesion - Latest research and news | Nature", 2018).

Las integrinas son proteínas integrales que interactúan con diversos grados de afinidad, con proteínas de la MEC, como el colágeno y la fibronectina (Nishizaka., 2000). Esta interacción promueve la activación de Rac1 que recluta a la talina, vinculina y α -actinina. Estas proteínas sirven como puente entre los filamentos de actina y las integrinas (Nishizaka., 2000). Posteriormente se recluta a la cinasa de las adhesiones focales (FAK) que a su vez recluta a más talina, a la proteína plataforma paxilina y a la cinasa Src. Esta última promueve la polimerización de la actina por la activación de Arp2/3 por la vía de β -Pix y GIT. (Figura 10) [Para revisión ver (Vicente-Manzanares et al., 2009)].

Las fibras de estrés son microfilamentos contráctiles que se adhieren al sustrato a través de las AF (Lodish, 2016) y su formación se regula por la vía RhoA/ROCK (Chrzanowska-Wodnicka., 1996). La cinasa ROCK fosforila a la cadena regulatoria de la miosina NM II e inhibe a las fosfatasas de la miosina. La miosina NM II induce la contracción de la actina y promueve cambios conformacionales en la talina que permiten su unión a la vinculina. Las fibras de estrés tienen baja tensión y en cambio presentan zyxina que refuerza la adhesión (Figura 10) [Para revisión ver (Geiger et al., 2009) y (Vicente-Manzanares et al., 2009)].

4.10) *Cambios inducidos en las fibras de estrés al silenciar o noquear a ZO-1 y/o ZO-2*

Las células MDCK ZO-1 KD + ZO-2 KD a pesar de sufrir una reorganización del citoesqueleto apical, no muestran cambios en la organización de las fibras de estrés (Fanning et al., 2012). En cambio, en las células endoteliales HDMEC al silenciar a ZO-1 se induce la formación de fibras de estrés y las proteínas vinculina, paxilina, PAK2 y paracingulina, presentes en las adhesiones célula-célula, se redistribuyen hacia las fibras de estrés para aumentar la activación de FAK. Éste fenotipo depende de la activación de ROCK (Tornavaca et al., 2015).

En las células MDCK el silenciamiento de ZO-2 hace que aparezcan áreas de la monocapa que no contactan al sustrato y además facilita que las células se despeguen de las cajas de cultivo después de un tratamiento con tripsina. Esto correlaciona con una disminución en la expresión de claudina-7 e integrina β -1 con respecto a las células parentales. La claudina-7 es importante para la adhesión de las células al sustrato porque se expresa a lo largo de la membrana basolateral donde forma complejos con la integrina β 1 (Raya-Sandino et al., 2017). En las células MDCK ZO-2 KD, además, se observa que en los sitios de contacto célula-sustrato que aún quedan, se refuerza la adhesión mediante la aparición de una gran cantidad de fibras de estrés y el reclutamiento de la vinculina (Raya-Sandino et al., 2017).

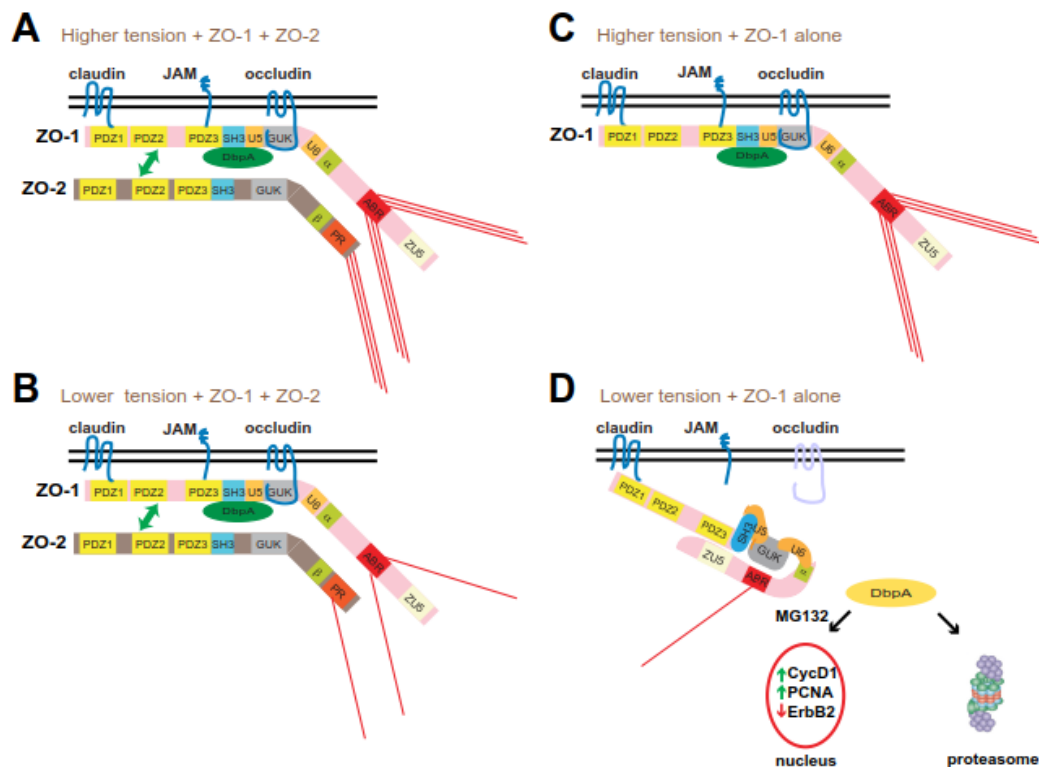


Figura 11. La conformación de ZO-1 depende de la tensión del citoesqueleto y de la presencia de ZO-2. **A)** Cuando el citoesqueleto de actomiosina se une a ZO-1 en la región ABR genera tensión que permite a ZO-1 unirse con claudina, JAM-A, occludina, ZONAB y ZO-2. **B)** En la condición de baja tensión inducida al inhibir a la miosina con blebistatina, ZO-1 aún puede unirse a las proteínas de la UE y a ZONAB. **C)** Cuando se silencia a ZO-2, la actomiosina todavía se une a ZO-1 y genera tensión, y ZO-1 mantiene su unión a claudina, JAM-A, occludina y ZONAB. **D)** Sin embargo, cuando se inhibe a la miosina con blebistatina y se silencia a ZO-2 la tensión baja, ZO-1 se pliega sobre sí misma y ya no interactúa con JAM-A, occludina y ZONAB. Al inhibir al proteosoma, ZONAB citosólica libre de ZO-1 viaja al núcleo y promueve la proliferación celular al aumentar el nivel de ciclina D1 y PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) y disminuir el nivel de ErbB2. Por lo tanto, en la condición de baja tensión, ZO-2 funciona como una plataforma que permite a ZO-1 conservar una conformación estirada (Spadaro et al., 2017).

4.11) *Cambios inducidos en el anillo cortical de actomiosina y las fibras de estrés al bloquear o activar a las proteínas Rho*

En las células MDCK mediante un sistema de selección con tetraciclina, se expresaron de manera regulada construcciones dominantes negativas (DN) y constitutivamente activas (CA) de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42. RhoA DN disminuye la F-actina del anillo cortical de actomiosina y de las fibras de estrés. RhoA CA aumenta las fibras de estrés y concentra la F-actina en el anillo cortical de actomiosina. Rac1 DN reduce la concentración de F-actina del anillo cortical de actomiosina, pero Rac1 CA induce la agregación de la F-actina en el anillo cortical y disminuye la densidad de las fibras de estrés. Cdc42 DN induce la formación de acúmulos de fibras de estrés y disminuye la marca de la F-actina apical cuya señal difunde a la cara basal. Cdc42 CA no induce cambio alguno (Bruewer et al., 2004).

5) El microambiente celular

El microambiente celular está constituido por la MEC, las células adyacentes, los factores solubles como citocinas y hormonas, la topografía del medio y las fuerzas mecánicas provocadas por el movimiento del organismo o de los fluidos (Barthes et al., 2014). De acuerdo al modelo de reciprocidad mecánica, la MEC regula la expresión génica a través de la mecanotransducción. En este proceso la célula percibe su entorno a través de receptores transmembranales y se adapta al ambiente al modificar su citoesqueleto y activar la transcripción de genes [Para revisión ver (Maman & Witz, 2018) y (Díaz-Chinguer et al., 2015)].

En los tejidos malignos el microambiente cambia continuamente y se remodela. Una característica asociada con el desarrollo tumoral y su agresividad es el aumento de la rigidez en la MEC. Esto ocurre por el confinamiento tumoral y por la deposición de componentes a la MEC incluyendo a varios tipos de colágeno, proteoglicanos de heparán sulfato y fibronectina [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015) (Bissell & Radisky, 2011)]. Así, se ha observado que la MEC se vuelve rígida y menos elástica al aumentar el contenido de fibronectina (Williams, Engler, Slone, Galante & Schwarzbauer, 2008).

5.1) La rigidez celular

La rigidez de una célula depende de la contracción del citoesqueleto y de fuerzas del microambiente como la compresión, la gravedad, la tensión y las fuerzas cortantes (e.g. una herida) [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015)].

La tensión se define como la resistencia de un material al ser sometido a una fuerza. En la curva de esfuerzo/deformación en el eje de las “y” se grafica el esfuerzo (σ), que corresponde a la fuerza aplicada al material en pascales (donde $1 \text{ Pa} = \text{kg/m}^2$) y en el eje de las “x” se grafica la deformación del material (ϵ), que equivale al cambio de la longitud respecto a la longitud original en m/m (Figura 12) (Askeland, 1998).

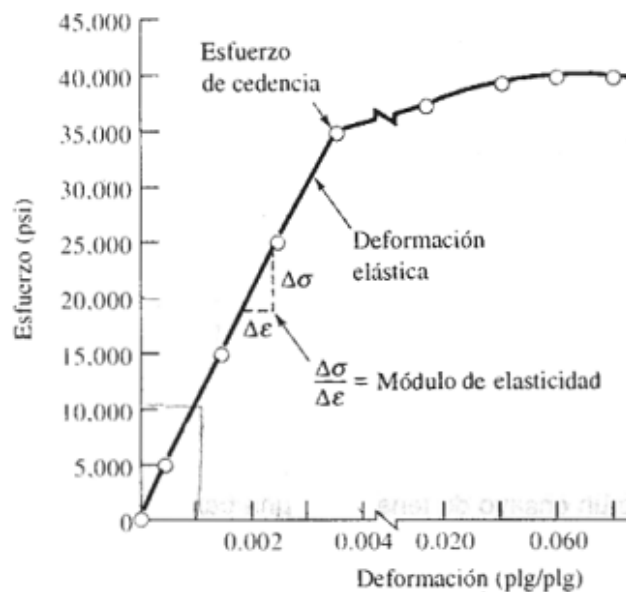


Figura 12. Curva de esfuerzo/deformación. Al incrementar la fuerza se incrementa la deformación del material. Dependiendo de las propiedades de cada material, la curva tiene mayor o menor inclinación lo que quiere decir que, si un material es muy rígido se necesitará más fuerza para deformarlo y su pendiente será más inclinada. El módulo de elasticidad, corresponde a la parte de la curva en la cual el material puede regresar a su estado original después de la aplicación de una fuerza. El esfuerzo de cedencia corresponde al punto a partir del cual el material se deforma y no regresa a su estado basal. Modificado de (Askeland, 1998).

La pendiente de la curva esfuerzo-deformación constituye una medida de la rigidez de un material y se define como $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$ donde E es la tensión, σ es la fuerza aplicada y ϵ es la deformación. Al incrementar la fuerza aplicada se incrementa la deformación del material, aunque éste puede inicialmente regresar a su forma original. Sin embargo,

existe una región en la curva donde la deformación es tan grande que el material ya no puede regresar a su forma original. A este esfuerzo se le llama de cedencia. Posteriormente llega hasta un último punto denominado esfuerzo de ruptura donde el material cede a la fuerza y se rompe (Askeland, 1998).

En el cuerpo de los vertebrados cada tejido y órgano tiene una rigidez específica (Figura 13). Por ejemplo, el hueso tiene una alta rigidez porque su función es la de proveer estructura al cuerpo y protegerlo, en cambio, los órganos como el intestino, el corazón, los riñones y el cerebro son menos rígidos. [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015)].

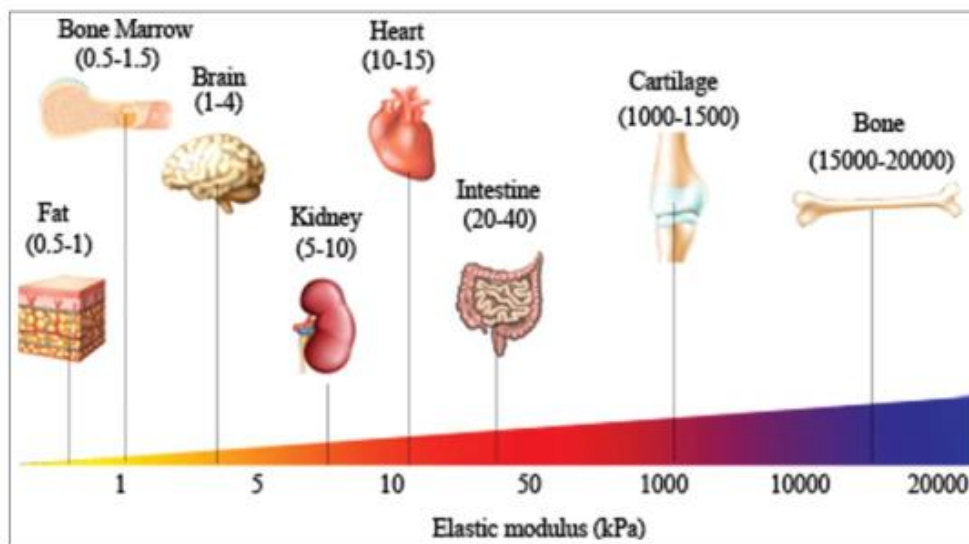


Figura 13. Rango de rigidez de los distintos órganos del cuerpo humano. El color amarillo representa una baja tensión, y el color azul indica alta tensión (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015).

5.2) Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso en el cual las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales. Así las células dejan de ser poligonales y adquieren una forma alargada, aumenta su motilidad e invasividad, y presentan resistencia a la apoptosis. Este proceso que ocurre de manera fisiológica durante el desarrollo embrionario también se presenta en el cáncer [Para revisión ver (Thiery, Aclouque, Huang & Nieto, 2009)]. El proceso se denominó transición

en lugar de transformación porque exhibe estados transitorios [Para revisión ver (Nieto, Huang, Jackson & Thiery, 2016)].

Los estados transitorios de la EMT son metaestables, ya que en ellos las células pueden inducir o revertir el proceso. Así se observa que hay un gradiente de variación en la expresión de distintos marcadores epiteliales como E-cadherina, ocludina y citoqueratinas y en la presencia de los marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina (Figura 14) [Para revisión ver (Nieto, Huang, Jackson & Thiery, 2016)].

En las primeras etapas de la EMT las células epiteliales pierden su polaridad y remodelan las uniones celulares perdiendo a las uniones célula-célula y reforzando la adhesión célula-sustrato. La pérdida de las uniones célula-célula asemeja bajar un cierre, porque se inicia con la pérdida de la UE, después de la UA y termina con la desestabilización de los desmosomas. Para que las células epiteliales lleguen a ser células mesenquimales, necesitan la participación de algunos factores de transcripción como SNAIL 1/2, ZEB, TWIST1, GRHL2, OVOL 1/2 y PRRX1 y de varios reguladores postranscripcionales como los miRNAs 200 y 34a (Figura 14) [Para revisión ver (Nieto, Huang, Jackson & Thiery, 2016) y (Nieto, 2017)].

5.3) La rigidez del sustrato modifica la actividad de YAP y twist

La vía Hippo que regula el tamaño celular, está constituida por una cascada de cinasas de serina y treonina y proteínas plataforma. En los mamíferos, Mst-1 y -2 son cinasas que fosforilan y activan a las cinasas Lats-1 y -2 quienes a su vez fosforilan al activador transcripcional YAP. Cuando YAP se fosforila en la serina 127 por Lats (Basu, Totty, Irwin, Sudol & Downward, 2003) se convierte en blanco de la proteína 14-3-3 que lo retiene secuestrado en el citoplasma. En cambio, cuando YAP se fosforila por Lats en la serina 381 se ubiquitina y degrada en el proteosoma.

Cuando la vía Hippo se apaga, YAP viaja al núcleo e interacciona con el factor de transcripción TEAD, promoviendo la transcripción de genes involucrados en la proliferación y la EMT. YAP también induce la transcripción de la subunidad catalítica de PI3K y del miR-29 que bloquea la traducción de PTEN. De esta manera aumenta la concentración de PIP3 y se activa la vía de mTOR lo que, finalmente, lleva a que se

fosforile a la proteína ribosomal S6, se promueva la traducción de proteínas y se produzca hipertrofia celular (Domínguez-Calderón et al., 2016).

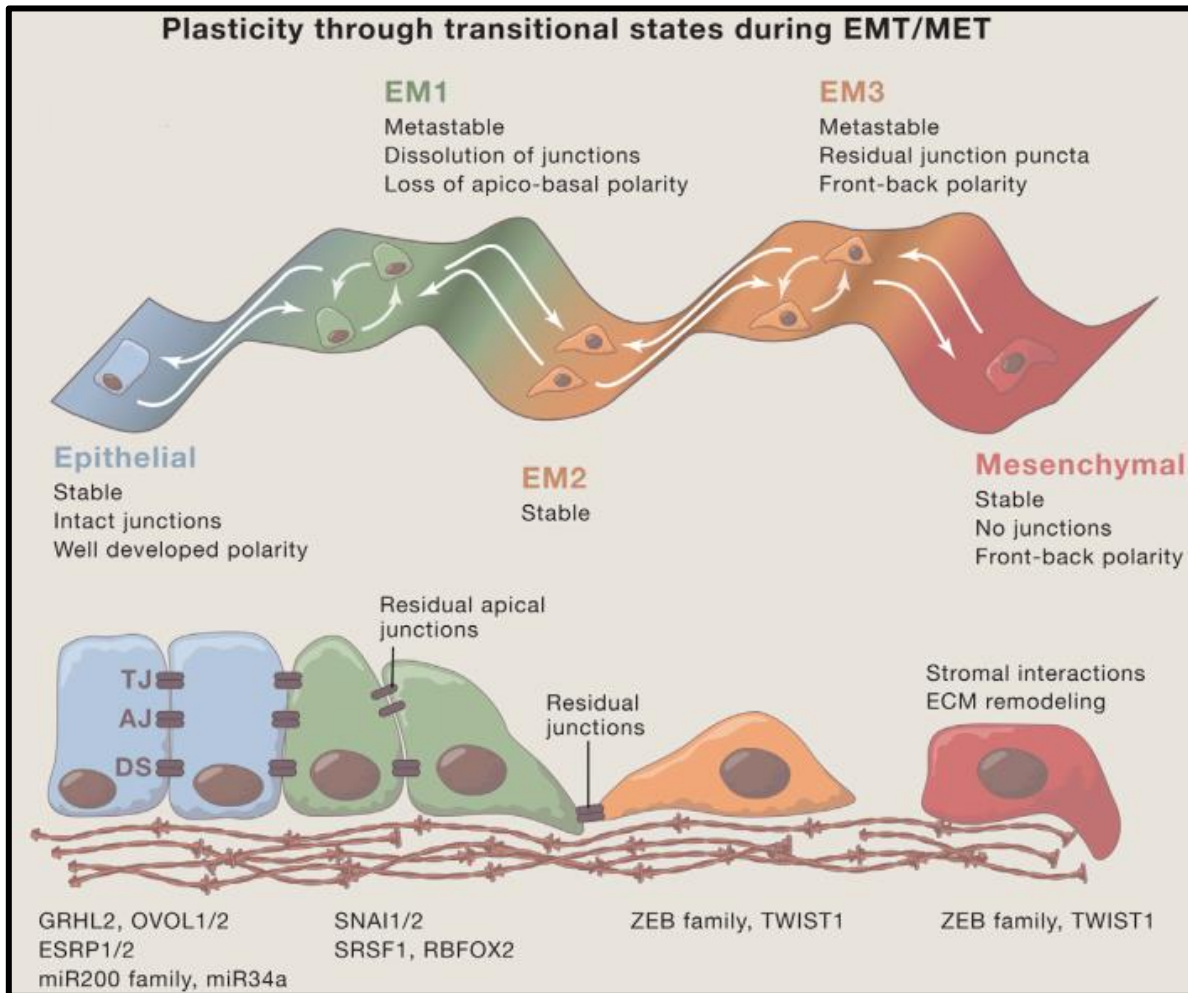


Figura 14. Modelo de la transición epitelio a mesénquima y de los estados intermedios. En los epitelios (azul) las células exhiben una polaridad apical-basal y presentan uniones celulares bien desarrolladas constituidas por uniones estrechas (TJ), uniones adherentes (AJ) y desmosomas (DS). Se ejemplifican tres estados intermedios (EM1-EM3) en la EMT (color verde a amarillo) en los cuales las células son metaestables, pierden la polaridad apical-basal y las uniones celulares, y en cambio adquieren una polaridad con referencia a su frente de migración. Las células mesenquimales (rojo) son estables, no poseen uniones celulares y su polaridad se basa en la migración. Las células mesenquimales remodelan la MEC promoviendo su rigidez. Durante el desarrollo embrionario, los estados transitorios de la EMT son reversibles (flechas blancas), sin embargo, en los adultos es probable que exista un punto de no retorno en la EMT. Los reguladores de la MET y la EMT son factores de transcripción que se expresan en cada etapa, aunque también hay reguladores epigenéticos como los miRNAs. Modificado de (Nieto, Huang, Jackson & Thiery, 2016).

Las proteínas plataforma que se requieren para la activación de la vía Hippo son LAST y Mob1, y las proteínas que se asocian a la membrana que actúan como

activadores río arriba de la vía Hippo son WWC1 y NF2 [Para revisión ver (Gumbiner & Kim, 2014)].

La expresión génica de las células epiteliales mamarias cambia dependiendo de la rigidez del sustrato sobre el que se cultivan. En los sustratos rígidos, YAP se concentra en el núcleo, aumenta su actividad transcripcional y aparecen fibras de estrés. Los mismos cambios se observan en las células de cáncer de ovario (McKenzie et al., 2018) y pancreático independientemente de si su fenotipo es epitelial, intermedio o mesenquimal (Rice et al., 2017). Estos cambios se regulan a través de Rho y de la tensión del citoesqueleto de actina (Figura 15) (Dupont et al., 2011).

Las proteínas twist -1 y -2 son factores de transcripción que pertenecen a la familia hélice-bucle-hélice básica (bHLH) ya que tienen un dominio HLH que reconoce a la caja E y otro que reconoce a la secuencia consenso 5'-CANNTG-3', (donde N es cualquier nucleótido). Twist se necesita en la embriogénesis y en las personas adultas se expresa en las células madre donde induce un estado no diferenciado. Twist promueve la EMT ya que induce la pérdida de la UE, la UA y la polaridad epitelial. En múltiples carcinomas la actividad de twist aumenta y esto promueve la metástasis (Onder et al., 2008). El knockdown de las claudinas-3 y -4 en las células de cáncer de ovario promueve la EMT al disminuir el nivel de E-cadherina y aumentar la expresión de twist (Lin, Shang, Manorek & Howell, 2013) [Para revisión ver (Bastid, Ciancia, Puisieux & Ansieau, 2010)].

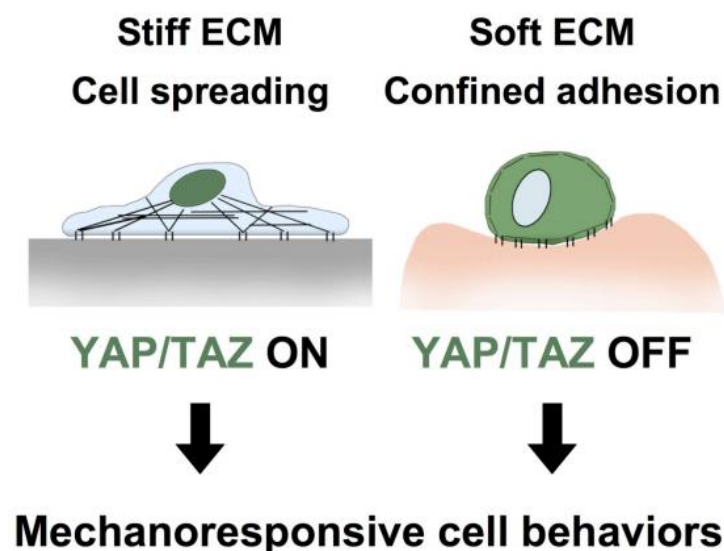


Figura 15. Regulación de YAP/TAZ en respuesta a la rigidez del sustrato. Las células que crecen sobre sustratos rígidos exhiben un citoesqueleto de actina tenso (líneas negras dentro de la célula), lo que induce la formación de fibras de estrés y la concentración de YAP/TAZ (verde) en el núcleo para transcribir genes de respuesta a la tensión mecánica del microambiente. Por otro lado, las células que crecen sobre sustratos suaves no desarrollan alta tensión en el citoesqueleto y la actina se organiza en adhesiones focales y en el anillo cortical. En esta condición YAP/TAZ se localiza en el citoplasma y no se transcriben los genes de respuesta al microambiente tenso (Dupont et al., 2011).

Cuando las células mamarias se siembran sobre sustratos suaves, forman ductos acinares polarizados rodeados por una membrana basal, donde twist 1 permanece en el citoplasma, secuestrada por la proteína activadora de GTPasas (GAP), G3BP2. En cambio, las células sembradas sobre sustratos rígidos, pierden la polaridad y en ellas twist 1 se fosforila en la tirosina 107 lo que lo libera de G3BP2 e induce su concentración en el núcleo. En los sustratos rígidos, el viaje de twist al núcleo se bloquea con anticuerpos anti-integrinas $\beta 1$. Esto sugiere que la activación y el agrupamiento de las integrinas induce el ingreso de twist al núcleo (Wei et al., 2015).

5.4) *La morfología y la cantidad de fibras de estrés cambia de acuerdo a la rigidez del sustrato*

Las células son sensibles a la tensión del sustrato en el que se cultivan y en respuesta modifican su forma, estructuras de adhesión y comportamiento motriz. Si la MEC es rígida, las células perciben resistencia y forman fibras de estrés [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015)].

Las células epiteliales renales (Pelham & Wang, 1997), y cancerosas de ovario (McKenzie et al., 2018), páncreas (Rice et al., 2017), y colon (Ali, Chuang & Saif, 2014), así como las endoteliales, los fibroblastos, (Yeung et al., 2005) y las células derivadas de los gliomas (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009), cuando se siembran sobre sustratos suaves, exhiben una forma esférica y no se expanden (Pelham & Wang, 1997). Las células epiteliales mamarias incluso forman acinos cuando se siembran sobre sustratos suaves en 3D (Wozniak, Desai, Solski, Der & Keely, 2003). En cambio, cuando las células epiteliales renales y mamarias, así como las cancerosas de ovario o de glioma se cultivan en sustratos rígidos, forman adhesiones focales con fibras de estrés (Pelham & Wang,

1997) y una alta expresión de vinculina (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009) (Paszek et al., 2005) (Wozniak, Desai, Solski, Der & Keely, 2003), paxilina (McKenzie et al., 2018) y FAK (Wozniak, Desai, Solski, Der & Keely, 2003). Estos cambios son sensibles a los inhibidores de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Pelham & Wang, 1997) y de ROCK (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009). Además, cuando las células se siembran sobre los sustratos rígidos, se activa la cinasa ERK como respuesta a la agrupación de las integrinas (Paszek et al., 2005). ERK fosforila a la laminina (LAD1) que interacciona con las filaminas y junto con $14-3-3\sigma$ induce migración celular, adherencia e invasión (Roth et al., 2018).

Existen excepciones a estas observaciones. Por ejemplo, los fibroblastos de riñón de mono tienen la misma forma y cantidad de fibras de estrés cuando se siembran en sustratos suaves de 104 y 391 Pa que en sustratos rígidos de 7×10^7 kPa (Ali, Chuang & Saif, 2014). Por ello se concluye que las células epiteliales son más sensibles que los fibroblastos a la tensión del sustrato.

5.5) La rigidez del sustrato modula la migración celular

La MEC rígida provee más tracción que la MEC suave para la migración. En los tumores, las fibras de colágeno se vuelven más gruesas y se alinean de forma perpendicular con respecto a los límites del tumor y esto genera vías de migración que favorecen la invasividad [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015)].

Las células mamarias sembradas sobre sustratos suaves migran menos y se agregan unas con otras, mientras que, cuando se siembran sobre sustratos rígidos migran más y no forman contactos célula-célula (Guo, Frey, Burnham & Wang, 2006). A este respecto cabe mencionar que las células individuales migran más rápido que las células agrupadas (Shebanova & Hammer, 2012). Además, cuando se aumenta la rigidez del sustrato subiendo la concentración de fibronectina, aumenta la motilidad (Shebanova & Hammer, 2012).

Las células MDCK también migran más sobre los sustratos rígidos y si se cultivan sobre una superficie con un gradiente de tensión migran hacia la región de mayor tensión (Saez, Ghibaudo, Buguin, Silberzan & Ladoux, 2007).

En los sustratos suaves las células derivadas de los gliomas y las células madre migran menos y sólo extienden filopodios, (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009) (Skardal, Mack, Atala & Soker, 2013) En cambio, cuando las células se siembran sobre sustratos rígidos migran más rápido y desarrollan lamelipodios grandes. Sorprendentemente, la motilidad sobre los sustratos suaves aumenta cuando se inhibe a la miosina NM II o a ROCK (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009). En contraste con lo que se observa en las células epiteliales y las células madre, los fibroblastos presentan menor motilidad sobre los sustratos rígidos (Pelham & Wang, 1997).

5.6) *La tensión aumenta la proliferación celular*

La tensión célula-célula y célula-sustrato es un regulador importante del ciclo celular. Así cuando sube la tensión célula-célula, aumenta la probabilidad de que la célula pase de la fase G1 a la fase S (Uroz et al., 2018).

El aumento en la rigidez de la MEC inclina la balanza diferenciación/proliferación de las células y lleva a una activación de los oncogenes que promueven la proliferación, lo que induce la progresión de los tumores [Para revisión ver (Handorf, Zhou, Halanski & Li, 2015)]. Por ello, en los sustratos rígidos, las células madre, las derivadas de los gliomas y las células epiteliales mamarias proliferan más que cuando se siembran sobre los sustratos suaves (Ulrich, de Juan Pardo & Kumar, 2009) (Skardal, Mack, Atala & Soker, 2013) (Wozniak, Desai, Solski, Der & Keely, 2003).

II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los cultivos de células MDCK ZO-2 KD disminuye la adhesión célula-célula y el área de la monocapa que se adhiere al sustrato, pero se activan RhoA, Rac y CDC42 y aumenta la formación de fibras de estrés (Raya-Sandino et al., 2017). Por ello ahora nos preguntamos si ZO-2 regula la tensión del anillo cortical de actomiosina y si la ausencia de esta proteína altera la adhesión de las células a sustratos de diferente rigidez.

III) OBJETIVO GENERAL

Explorar si la ausencia de ZO-2 altera la tensión del anillo cortical de actina y la adhesión en las células epiteliales MDCK a sustratos de diferente rigidez.

IV) OBJETIVOS EXPERIMENTALES

- A través de un biosensor de E-cadherina que interactúa con el anillo cortical de actomiosina evaluar si la tensión célula-célula se altera por la falta de ZO-2.
- Analizar la adhesión de las células MDCK parentales y ZO-2 KD a sustratos de diferente rigidez.

V) HIPÓTESIS

La ausencia de ZO-2 en las células epiteliales altera la tensión del anillo cortical de actomiosina y vuelve más sensibles a las células a la disminución de la tensión en el sustrato.

VI) MATERIAL Y MÉTODOS

6) Cultivo celular

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD fueron donadas generosamente por el Dr. Alan Fanning de la Universidad de Carolina del Norte, en Chapel Hill (Van Itallie., 2009). Las células se cultivaron en medio Dulbeco modificado por Eagle (DMEM), bajo en glucosa, como se describió previamente (Gonzalez-Mariscal., 1985).

7) Construcciones empleadas

La construcción del biosensor de E-cadherina lo donó amablemente el Dr. Alexander R. Dunn de la universidad de Stanford, en California. Éste biosensor contiene la secuencia canina de la E-cadherina y codifica para: la región extracelular que establece el contacto con la E-cadherina de la célula vecina; la región transmembranal y la región citoplasmática. Para realizar el FRET a la secuencia de E-cadherina, después de la región transmembranal se le incorporó la secuencia de dos fluoróforos: TFP que funciona como donador de energía y YFP que actúa como aceptor. La secuencia de estos fluoróforos se une entre sí por una secuencia correspondiente a una proteína elástica de la tela de araña. En el biosensor de E-cadherina, después de los fluoróforos en la porción citoplasmática de la E-cadherina se localiza el sitio de unión a la β -catenina. La presencia de este sitio permite al biosensor unirse a la β -catenina que, a su vez, se une a la α -catenina que interacciona con el anillo cortical de actomiosina. Por lo tanto, si el anillo cortical de actomiosina está tenso, los fluoróforos se distanciarán y no se producirá FRET. En cambio, si el anillo se encuentra distendido, los fluoróforos estarán lo suficientemente cerca para realizar el FRET (Figura 16). Como control negativo de FRET, se emplea a un biosensor de E-cadherina sin la secuencia del fluoróforo TFP (F-TFP). Por lo tanto, este biosensor no podrá donar energía al fluoróforo YFP y no generará FRET (Borghini et al., 2012).

La construcción de hZO-2 no sensible al shRNA contra ZO-2 (Van Itallie., 2009) la donó generosamente el Dr. Alan Fanning de la Universidad de Carolina del Norte, en Chapel Hill.

8) Transfección del biosensor de E-cadherina

Las células MDCK ZO-2 KD y parentales se cultivaron en cubreobjetos o placas de plástico de 24 pozos, a una densidad de 1.5×10^5 células/cm². Después de 24 horas las monocapas se transfectaron con las construcciones del biosensor de E-cadherina con o sin el fluoróforo TFP empleando Lipofectamina® 2000 (Invitrogen®Cat.#11668019 Carlsbad, CA) y 2 de µg DNA/pozo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

9) Determinación de la longitud de onda adecuada para medir la emisión del fluoróforo YFP en los experimentos de FRET

Las células transfectadas con el biosensor de E-cadherina y aquellas que además se transfectaron con una construcción de hZO-2 no susceptible al silenciamiento, porque carece de los sitios de unión al shRNA contra ZO-2, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con PFA al 4% (Sigma-Aldrich Cat.# P-6148, Alemania), durante 30 minutos y se lavaron con PBS. La intensidad de la fluorescencia se midió con el fluorímetro Infinite® 200 PRO (TECAN, Suecia) en el modo fluorescence top reading, con una ganancia manual de 100 y en la posición 20,000 en z. El fluoróforo TFP se excitó a una longitud de onda de 462 nm y su emisión se detectó a 490 nm. La emisión de YFP se midió en un rango de 492 a 585 nm (Day et al., 2008). El FRET se calculó con el cociente de YFP/TFP.

10) Análisis de FRET en el borde celular de las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD transfectadas con el biosensor de E-cadherina silvestre o con el biosensor que carece de la secuencia de TFP (F-TFP), se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 30 minutos (Sigma-Aldrich Cat.# P-6148, Alemania). Luego de un lavado final, las células se montaron con VectaShield (Vector Cat.# H-1000 California, EUA). Se tomaron fotos de 10 campos representativos por condición, en el microscopio confocal Leica sp2 LSC Lite. El FRET se calculó con el programa Image J siguiendo un protocolo previamente descrito (Kardash et al.,2011).

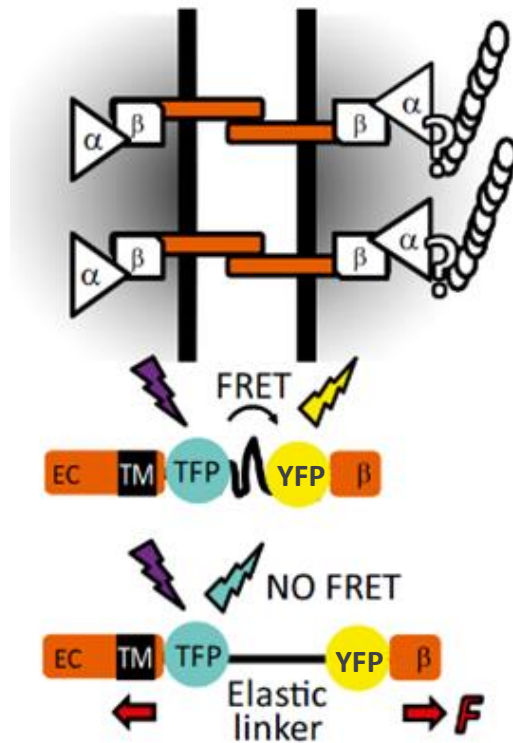


Figura 16. Biosensor de E-cadherina. La E-cadherina tiene una región extracelular (EC) que establece la unión célula-célula, una región transmembranal (TM) y una porción citoplasmática que contiene al sitio de unión a la β -catenina (β). La β -catenina se une a la α -catenina que a su vez se une al anillo cortical de actomiosina. El biosensor para realizar el FRET, cuenta con los fluoróforos TFP y YFP que se localizan después de la región transmembranal, antes del sitio de unión a la β -catenina. Los fluoróforos están unidos entre sí por una liga elástica que les permite acercarse cuando no hay tensión y alejarse cuando sí la hay. Por lo tanto, con baja tensión del anillo cortical de actomiosina habrá más FRET mientras que con alta tensión habrá menos FRET (Borghi et al., 2012).

Se restaron los valores de FRET de las células transfectadas con la construcción F-TFP a los valores de FRET obtenidos en las células parentales y ZO-2 KD transfectadas con el biosensor de E-cadherina silvestre.

11) Preparación de los sustratos de diferente tensión

Para mimetizar el grado de tensión de los sustratos fisiológicos del cuerpo humano, se utilizaron hidrogeles de poli(acrilamida), en los que al variar la concentración de acrilamida y bis-acrilamida se generan sustratos de diferente rigidez. Su realización asemeja la organización de un sándwich, donde la base es un cubreobjeto aminosilanizado, el relleno es el hidrogel y la tapa es un cubreobjeto clorosilanizado que permite la polimerización del gel sin adherirse a él. Finalmente, la superficie del hidrogel

se recubre con una proteína de la MEC que en este caso fue fibronectina (Cretu, Castagnino & Assoian, 2010), (Klein, Yung, Castagnino, Kothapalli & Assoian, 2007), (Syed, Karadaghy & Zustiak, 2015) y (Tse & Engler, 2010).

11.1) *Preparación de cubreobjetos aminosilanizados*

Se colocó una parrilla eléctrica dentro de la campana de extracción y sobre ella se colocaron cubreobjetos estériles de 1.5 X1.5 cm. Se les agregaron 200 µl de una solución 0.1 M de NaOH (J. T. Baker #1310-73-2, EUA.) para cubrir toda la superficie del vidrio. La parrilla se calentó a ~80°C y los cubreobjetos se dejaron sobre la parrilla hasta que se evaporó el líquido, evitando que la solución llegara a ebullición. Para que los cubreobjetos quedaran uniformemente cubiertos con NaOH una vez que se vaporó la solución de NaOH, se agregaron 200 µl de agua destilada y los cubreobjetos permanecieron sobre la parrilla caliente por el tiempo necesario hasta que se evaporó el líquido. Este paso se repitió varias veces hasta que se obtuvo una capa uniforme de NaOH sobre los cubreobjetos. Después se agregaron 100 µl de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (Sigma Aldrich, #440140-100 EUA.) durante 5 minutos. En seguida los cubreobjetos se sumergieron en agua destilada para asegurar que no quedaran restos de APTES en ambas caras. Posteriormente los cubreobjetos se lavaron dos veces en agitación en una caja Petri por 5 minutos con agua destilada y se secaron con papel absorbente cuidando de no tocar la superficie activada. Los cubreobjetos finalmente se sumergieron en una solución de glutaraldehído en PBS al 0.5% durante 30 minutos y se lavaron una vez más con agua destilada en agitación por 5 minutos, permitiendo después que se secan al aire.

11.2) *Preparación de cubreobjetos clorosilanizados*

En la campana de extracción se colocaron cubreobjetos estériles de 1.5 X 1.5 cm sobre papel parafilm y se les agregaron 100 µl de diclorodimetilsilano (DCDMS) (Sigma Aldrich, # 440248, EUA.) durante 5 minutos. En seguida se lavaron en una caja Petri por 1 minuto en agitación constante, permitiendo posteriormente que se secan al aire.

11.3) *Preparación de hidrogeles con diferente grado de rigidez*

Se prepararon soluciones estériles de acrilamida (Bio Rad # 161-0107 California.) al 40% en agua; bis-acrilamida (Bio Rad # 161-0201, California.) al 2% en agua; N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, #130672-54, EUA.), disolviendo 5.6 mg de NHS en 70 μ l de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich, D2650, EUA.) y de persulfato de amonio (APS) (Bio Rad # 161-0700 California) al disolver 0.1 g de APS en 1 mL de agua destilada. También se utilizaron PBS y tetrametiletilenediamina (TEMED) estériles (Sigma Aldrich, T9281, EUA.). En la campana de flujo laminar se colocaron los cubreobjetos aminosilanizados sobre un papel parafilm. Por otra parte, en un tubo eppendorf de 500 μ l se hizo la mezcla de los reactivos que se indican en la Tabla 1 en el orden siguiente: acrilamida, bis-acrilamida, PBS, TEMED, APS y NHS. Este procedimiento se hizo rápidamente para evitar que el gel polimerizara. En seguida, 90 μ l de la mezcla se colocaron sobre cada cubreobjeto aminoilanizado y encima del gel se puso el cubreobjeto clorosilanizado. Por capilaridad se formó una superficie homogénea (Tabla 1) y se permitió su polimerización por 30 minutos aproximadamente. Finalmente, el cubreobjeto clorosilanizado se retiró con unas pinzas estériles.

11.4) *Unión covalente de fibronectina a los hidrogeles con diferente grado de rigidez*

Se preparó una dilución madre estéril de sulfosuccinimidil 6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-SANPHA) (Sigma Aldrich, 803332, EUA.), al diluir 50 mg de sulfo-SANPHA en 500 μ l de DMSO. En seguida se preparó la solución de trabajo con 30 μ l de la solución madre de sulfo-SANPHA, 600 μ l de HEPES 50 mM a pH de 8.5 (Thermo Fisher, 16926, EUA.) y 11.37 mL de agua destilada.

En la campana de flujo laminar se transfirieron los hidrogeles obtenidos en el punto 11.3 a placas de cultivo con 12 pozos. Se añadieron 200 μ l de la solución de sulfo-SANPHA por pozo para cubrir la superficie de los hidrogeles. En seguida, estos se expusieron a la luz UV a una longitud de onda de 365 nm, a una distancia de la lámpara de 6.2, cm durante 5 minutos (UVP CL-1000L, California).

Elasticidad (kPa)	5	14.5	20	60
Acrilamida (μl)	34.37	46.875	50	62.5
Bis-acrilamida (μl)	18.75	18.75	33	62.5
PBS (μl)	193.4	181	163.5	121.5
TEMED (μl)	1.5	1.5	1.5	1.5
APS (μl)	2.5	2.5	2.5	2.5
NHS (μl)	3.75	3.75	3.75	3.75
TOTAL (μl)	254.25	254.25	254.25	254.25

Tabla 1. Reactivos empleados para generar hidrogeles con diferente grado de rigidez (Tse & Engler, 2010).

Posteriormente, los hidrogeles se lavaron 3 veces con la solución de HEPES. Se añadieron después 5 μg/mL de fibronectina de plasma de bovino (Sigma Aldrich F1141, EUA) a cada pozo de la placa de cultivo con el gel. Después de una noche de incubación a 4°C los cubreobjetos con los geles se lavaron 3 veces con la solución de HEPES. En seguida las placas de cultivo con los geles en solución de HEPES se irradiaron durante 1 hora con luz UV en la campana de cultivo para asegurar su esterilidad. Finalmente se retiró el HEPES y se procedió al cultivo celular.

12) Ensayo de adhesión

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/cm² en placas de 12 pozos que contenían a los hidrogeles con diferente grado de tensión. Después de 6 horas las células se lavaron dos veces con PBS y en seguida se tomaron imágenes representativas en campo claro de cada condición en el microscopio invertido (Nikon TMS 214566, Japón).

VII) RESULTADOS

1) La emisión máxima de FRET ocurre a una longitud de onda de 526 nm

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se transfectaron con el biosensor de E-cadherina. A un grupo de células ZO-2 KD además se les transfectó una construcción de ZO-2 humana no sensible al silenciamiento por el shRNA contra ZO-2. El experimento se realizó midiendo la intensidad de la fluorescencia de las células en suspensión en un fluorímetro. Para calcular el FRET como el cociente TFP/YFP se midió la intensidad de la fluorescencia de los fluoróforos TFP y YFP después de excitar al fluoróforo TFP a 462 nm. Se observó que la mayor eficiencia de FRET en el rango de emisión del fluoróforo YFP de 492 a 585 nm, correspondió a los 526 nm tanto en las células parentales como en las células ZO-2 KD. En las células ZO-2 KD co-transfectadas con hZO-2 se obtiene el mismo nivel de eficiencia de FRET a las longitudes de onda de 526 y 532 nm. Por estos resultados se eligió a la longitud de onda de 526 nm como la óptima para el experimento de FRET en las monocapas observadas en el microscopio confocal (Figura 17).

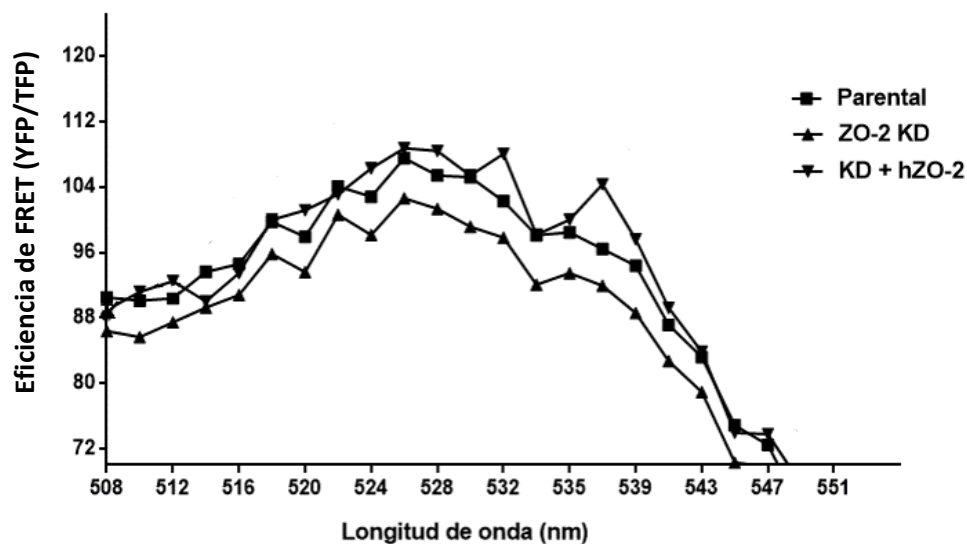


Figura 17. Rango de emisión de YFP. Se excitó al fluoróforo TFP a 462 nm y se midió su emisión y la emisión de YFP en un rango de 492 a 585 nm. Se cuantificó el ratio de YFP/TFP para obtener el FRET, los datos se normalizaron con referencia al primer punto donde se detectó la emisión de YFP.

2) La mayoría de las células parentales tienen valores de FRET entre 70-90, mientras que estos bajos valores de FRET sólo los exhiben una minoría de células ZO-2 KD

En el experimento de FRET hecho en el microscopio confocal en las monocapas confluentes, además de las células transfectadas con el biosensor de E-cadherina silvestre se incluyó como control negativo a monocapas que se transfectaron con el biosensor F-TFP. Los valores de FRET obtenidos en las células transfectadas con esta construcción, constituyen la señal de fondo y se restaron a los obtenidos con las células transfectadas con el biosensor de E-cadherina. En las monocapas observamos un gradiente de FRET, ya que hay células cuyos bordes celulares exhiben alto FRET, mientras que otros bordes celulares tienen medio o bajo FRET (Figura 18 A). Un alto FRET indica baja tensión del anillo cortical de actomiosina, ya que, los dos fluoróforos TFP y YFP están cerca. En los experimentos realizados obtuvimos valores de eficiencia de FRET en el borde celular en un rango de 30 a 190 y notamos que en el 54% de las células parentales estos valores caen entre 70 y 90, mientras que, en este rango sólo el 19% de células MDCK ZO-2 KD presentan FRET. Así mismo, en el rango de eficiencia de FRET de 120 a 150 sólo encontramos al 20% de las células parentales y en cambio, en esta región se concentra el 42% de las células ZO-2 KD. En conjunto, estas observaciones sugieren que en ausencia de ZO-2 disminuye la tensión del anillo cortical de actomiosina. Estos resultados se obtuvieron con dos experimentos independientes en los que se analizaron los bordes de 22 y 39 células parentales y 47 y 21 células ZO-2 KD respectivamente. Faltaría, sin embargo, hacer un experimento más para realizar las pruebas de significancia en cada valor de eficiencia de FRET entre los grupos parentales y ZO-2 KD (Figura 18 B).

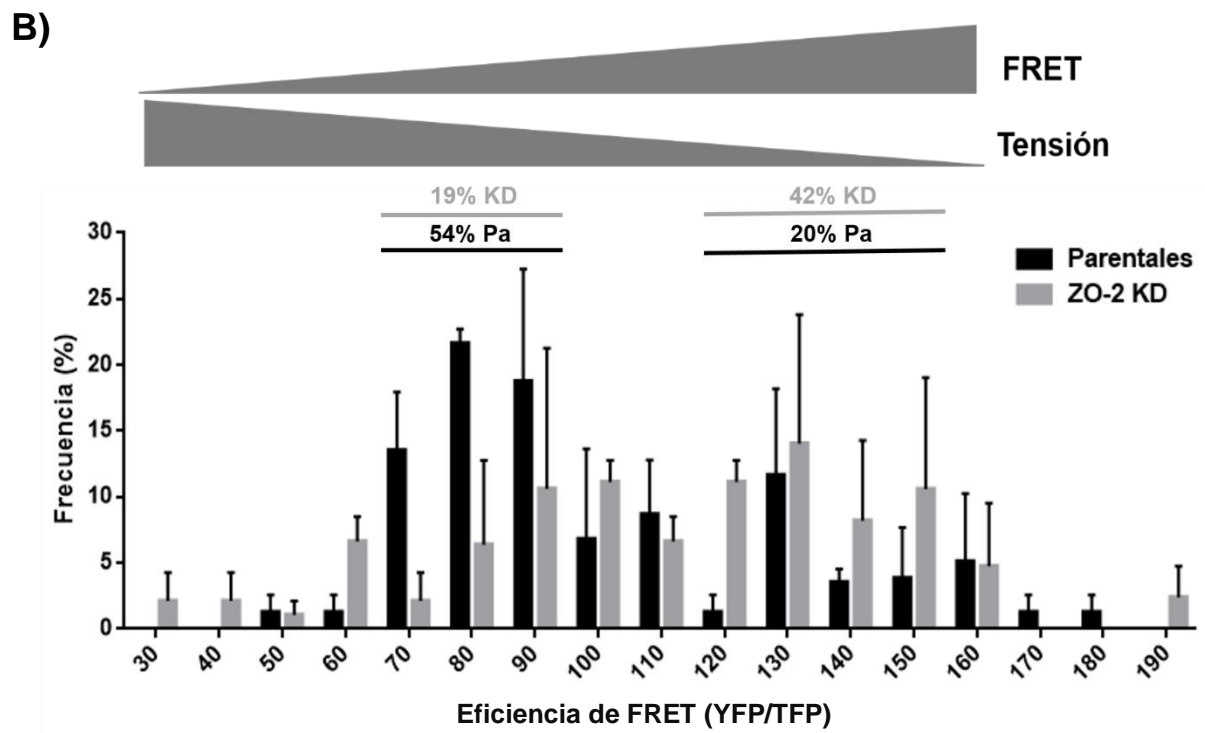
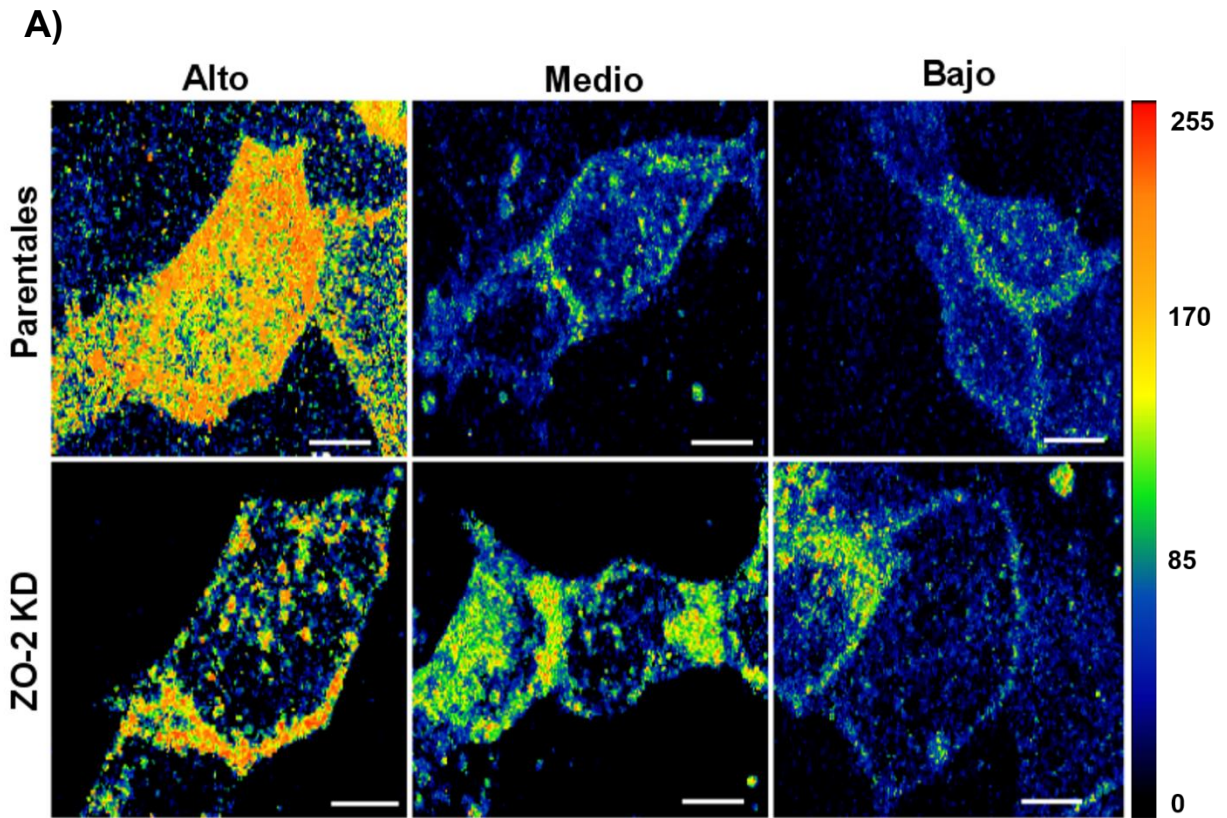


Figura 18. En las células ZO-2 KD disminuye la tensión del anillo cortical de actomiosina. A) Imágenes representativas de FRET de baja, media y alta intensidad en el borde célula-célula de monocapas epiteliales MDCK parentales y ZO-2 KD. En el microscopio confocal se analizaron 10 campos por cada condición y el FRET del borde celular se cuantificó con Image J. El código de colores indica la intensidad del FRET que va de valores bajos con los colores fríos (azul) hasta valores altos con los colores cálidos (rojo). Barra, 10 μm . **B)** Histograma de frecuencias del FRET en el borde célula-célula de monocapas MDCK parentales y ZO-2 KD transfectadas con el biosensor de E-cadherina. El valor de eficiencia de FRET obtenido en las monocapas transfectadas con la construcción que carece de la secuencia del fluoróforo TFP se restó a cada uno de los valores de eficiencia de FRET de las monocapas transfectadas con el biosensor de E-cadherina silvestre. El histograma muestra el porcentaje de células que exhibió cada nivel de eficiencia de FRET. En el rango de eficiencia de FRET de 70 a 90, se ubicaron el 54% de las células MDCK parentales y tan sólo un 19 % de las ZO-2 KD. Así mismo, en el rango de 120 a 150 sólo encontramos al 20% de las células parentales y en cambio, en esta zona se concentra el 42% de células ZO-2 KD. Esto indica que en ausencia de ZO-2 se genera menor tensión. Datos de dos experimentos graficados con el error estándar.

3) La ausencia de ZO-2 aumenta la sensibilidad de las células a la rigidez del sustrato.

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron sobre sustratos con diferente grado de rigidez (60, 20, 14.5 y 5 kPa). A medida que disminuyó la rigidez del sustrato, se adhirieron menos las células parentales. En el caso de las células ZO-2 KD esto fue mucho más acentuado y desde los 60 kPa se notó una reducción drástica en el número de células que se adhirieron al sustrato (Figura 19).

Las células MDCK parentales no cambiaron su forma en los sustratos con distinto grado de rigidez y siguieron exhibiendo un patrón de “empedrado” característico de las células epiteliales. Sin embargo, las células que carecen de ZO-2 cambiaron drásticamente su forma y se volvieron ahusadas con prolongaciones similares a los fibroblastos (Figura 19).

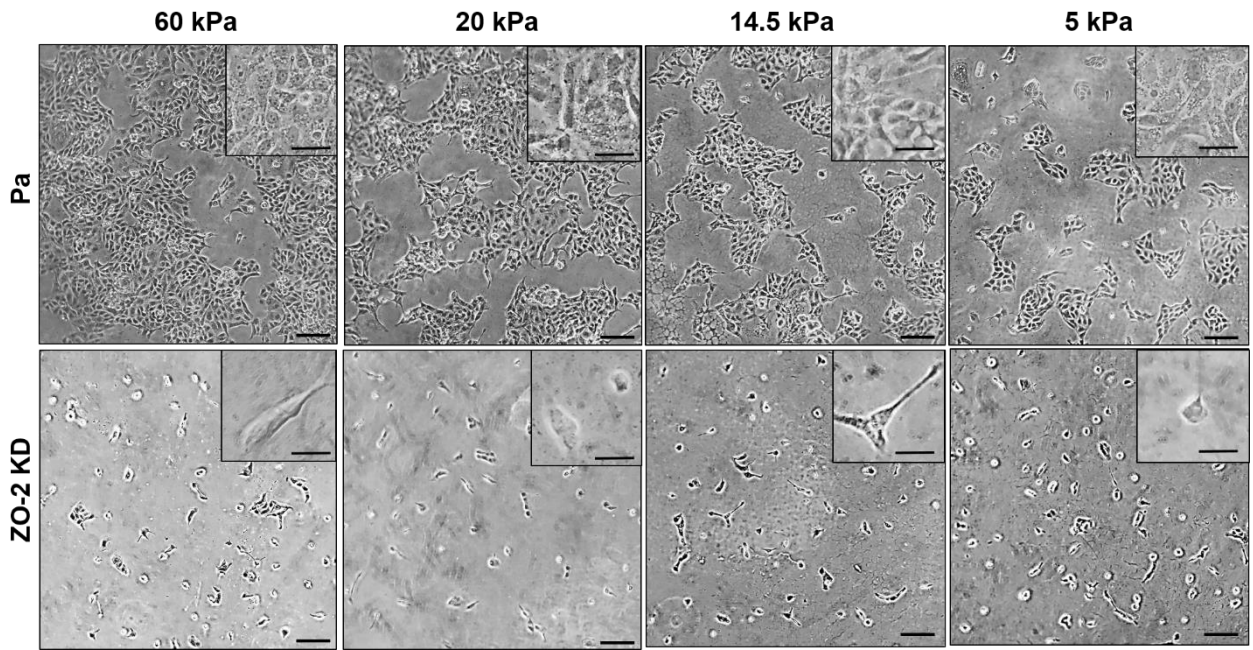


Figura 19. Las células ZO-2 KD son más sensibles que las parentales a la disminución de la rigidez del sustrato. En las células que carecen de ZO-2 disminuye drásticamente la adhesión a sustratos con una rigidez de 60 a 5 kPa. Este efecto también se observa en las células parentales, pero con mucho menor intensidad. Imágenes de campo claro representativas. La barra de escala corresponde a 30 μm en el recuadro pequeño y 100 μm en el recuadro grande.

VIII) DISCUSIÓN

La tensión celular depende del citoesqueleto de actomiosina y regula la forma y la migración de las células. La proteína ZO-2 de las UEs es un regulador del citoesqueleto y en su ausencia, las células se adhieren menos entre sí y al sustrato y exhiben fibras de estrés en abundancia. Además, en estas células las proteínas RhoA, Rac y Cdc42 están más activas que en las células parentales (Raya-Sandino., 2017). Sin embargo, al transfectar a ZO-2 a las células ZO-2 KD, RhoA se activa mucho más, lo que no sucede cuando a las células ZO-2 KD se les trata con LPA, un activador de RhoA. Por lo que nos preguntamos si la activación de RhoA en las células ZO-2, se traduce además de en la formación de fibras de estrés, en la contracción del anillo cortical de actomiosina. En esta tesis empleando un biosensor de E-cadherina, encontramos que en ausencia de ZO-2 disminuye la contracción del anillo cortical de actomiosina.

Nuestras observaciones concuerdan con lo observado en células endoteliales, donde, la ausencia de ZO-1 disminuyó la tensión del anillo cortical de actomiosina (Tornavaca et al., 2015). Además, nuestros resultados coinciden con que la ausencia de ZO-2 no cambia el patrón del borde celular de sinuoso a lineal (Raya-Sandino., 2017), (Van Itallie, Fanning, Bridges & Anderson, 2009) como sucedería si aumentara la tensión de la superficie apical.

En contraste, el doble KD de ZO-1 y ZO-2, aumenta la tensión apical y cambia el perfil celular de sinuoso a lineal. Sin embargo, la re-expresión de ZO-1 no es suficiente para recuperar la tensión basal, lo que indica que ZO-2 también juega un papel en el desarrollo de la rigidez celular (Cartagena-Rivera, Van Itallie, Anderson & Chadwick, 2017). Por ello sería conveniente en el futuro hacer una medición de la tensión apical mediante el microscopio de fuerza atómica, en las células MDCK parentales y ZO-2 KD.

Por otra parte, es necesario que tengamos un experimento más de FRET para poder realizar el análisis estadístico de la diferencia de frecuencia de FRET entre las células parentales y ZO-2 KD en cada intensidad de FRET. Así mismo, sería conveniente incluir un grupo de células ZO-2 KD a las que se les transfecte hZO-2 no susceptible al silenciamiento, para demostrar que la disminución de la tensión del anillo cortical de actomiosina se debe específicamente a la ausencia de ZO-2. Finalmente, también nos gustaría explorar que pasa en la tensión cortical de actomiosina en las células parentales

y ZO-2 KD cuando se debilita el sistema. Para ello usaríamos blebistatina que bloquea a la miosina o IFN- γ y TNF- α que desensamblan al citoesqueleto de actomiosina al aumentar la expresión de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Wang et al., 2005). El objetivo sería ver si el efecto sobre la tensión cortical es mayor en las células que carecen de ZO-2.

En cuanto a la tensión célula-sustrato, las células epiteliales cultivadas en sustratos de mayor rigidez se adhieren más y a medida que disminuye la rigidez disminuye la adhesión (Pelham & Wang, 1997), (McKenzie et al., 2018), (Paszek et al., 2005) y (Wozniak, Desai, Solski, Der & Keely, 2003). Por ello, y como era de esperarse, las células MDCK parentales se adhirieron menos en los sustratos más suaves. Sin embargo, observamos que la ausencia de ZO-2 volvió mucho más sensibles a las células a la disminución de la rigidez del sustrato. En estos experimentos no pudimos hacer un análisis cuantitativo porque ya casi no había células ZO-2 KD sobre los sustratos suaves. Por ello, será conveniente repetir estos experimentos, pero ahora sembrando los hidrogeles con mayor densidad de células. Además, también valdrá la pena analizar la adhesión a sustratos con una rigidez superior a los 60 kPa pero inferior a la del plástico o vidrio.

Pensamos que la alta sensibilidad de las células ZO-2 KD a la disminución de la rigidez del sustrato fortalece la idea de que estas células se encuentran en un estado incipiente de la EMT. Esta idea se apoya en que: 1) Las células epiteliales tumorales prefieren los sustratos duros; 2) Las células ZO-2 KD presentan fibras de estrés en abundancia y esta característica es necesaria para la transformación celular (Tavares et al., 2017); y 3) En las células ZO-2 KD a diferencia de las parentales, YAP se concentra en el núcleo donde promueve la EMT (Domínguez-Calderón et al., 2016).

En cuanto a la forma celular observamos que las células ZO-2 KD sembradas sobre sustratos suaves asemejan a células que atraviesan una EMT (Paszek et al., 2005), ya que son alargadas como fibroblastos. Sin embargo, esto también puede deberse a la baja densidad a la que se encuentran, ya que, incluso las células parentales al sembrarse a estas diluciones adquieren una forma ahusada.

En conjunto, nuestras observaciones indican que ZO-2 contribuye a mantener la tensión del anillo cortical de actomiosina y facilita la adhesión a sustratos suaves.

IX) BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M., Chuang, C., & Saif, M. (2014). Reprogramming cellular phenotype by soft collagen gels. *Soft Matter*, 10(44), 8829-8837. doi: 10.1039/c4sm01602e
- Askeland, D. (1998). *Ciencia e ingeniería de los materiales* (3rd ed., pp. 130-138). International Thomson Editores, S. A. de C. V. ISBN 968-7529-36-9.
- Avila-Flores, A., Rendón-Huerta, E., Moreno, J., Islas, S., Betanzos, A., Robles-Flores, M., & González-Mariscal, L. (2001). Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochemical Journal*, 360(2), 295-304. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3600295>
- Barthes, J., Özçelik, H., Hindié, M., Ndreu-Halili, A., Hasan, A., & Vrana, N. (2014). Cell Microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: The Recent Advances. *Biomed Research International*, 2014, 1-18. doi: 10.1155/2014/921905
- Bastid, J., Ciancia, C., Puisieux, A., & Ansieau, S. (2010). Role of TWIST proteins in cancer progression. *Atlas Of Genetics And Cytogenetics In Oncology And Haematology*, (9). doi: 10.4267/2042/44856
- Basu, S., Totty, N., Irwin, M., Sudol, M., & Downward, J. (2003). Akt Phosphorylates the Yes-Associated Protein, YAP, to Induce Interaction with 14-3-3 and Attenuation of p73-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell*, 11(1), 11-23. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00776-1
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., & González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 292(1), 51-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.08.007>
- Bissell, M., & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 46-54. doi: 10.1038/35094059
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O., Weis, W., Pruitt, B., Nelson, W., & Dunn, A. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(31), 12568-12573. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1204390109>
- Brewer, M., Hopkins, A., Hobert, M., Nusrat, A., & Madara, J. (2004). RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 287(2), C327-C335. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00087.2004>

- Cartagena-Rivera, A., Van Itallie, C., Anderson, J., & Chadwick, R. (2017). Apical surface supracellular mechanical properties in polarized epithelium using noninvasive acoustic force spectroscopy. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01145-8
- Cereijido, M., & Anderson, J. (2001). *Tight junctions* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., Gonzalez-Aguilar, H., & Robles-Flores, M. et al. (2009). Phosphorylation of Zona Occludens-2 by Protein Kinase C Regulates Its Nuclear Exportation. *Molecular Biology Of The Cell*, 20(18), 4120-4129. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1129>
- Chrzanowska-Wodnicka M, and Burrige K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 1996; 133(6):1403-15.
- Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., & Shah, J. (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small Gtpases*, 5(4), e973760. <http://dx.doi.org/10.4161/21541248.2014.973760>
- Cretu, A., Castagnino, P., & Assoian, R. (2010). Studying the Effects of Matrix Stiffness on Cellular Function using Acrylamide-based Hydrogels. *Journal Of Visualized Experiments*, (42). doi: 10.3791/2089
- Day, R., Booker, C., & Periasamy, A. (2008). Characterization of an improved donor fluorescent protein for Förster resonance energy transfer microscopy. *Journal Of Biomedical Optics*, 13(3), 031203. <http://dx.doi.org/10.1117/1.2939094>
- Díaz-Chiguer, D., Rodríguez-Hernández, A., Buendía-Padilla, M., Reynoso-Ducoing, O., Fernández-Retana, J., & Ambrosio, J. (2015). Mecanotransducción: Cómo la célula percibe los estímulos. *Revista Tamé*, 4(11), 396-401.
- Domínguez-Calderón, A., Ávila-Flores, A., Ponce, A., López-Bayghen, E., Calderón-Salinas, J., & Luis Reyes, J. et al. (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Molecular Biology Of The Cell*, 27(10), 1581-1595. doi: 10.1091/mbc.e15-08-0598
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., & Cordenonsi, M. et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179-183. doi: 10.1038/nature10137
- Elbediwy, A., Zihni, C., Terry, S., Clark, P., Matter, K., & Balda, M. (2012). Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. *The Journal Of Cell Biology*, 198(4), 677-693. doi: 10.1083/jcb.201202094
- Even-Ram, S. (2009). *Extracellular matrix protocols* (3rd ed., pp. 203-210). New York, NY: Humana Press.
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 273, 29745–29753.

- Fanning, A., Ma, T., & Anderson, J. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *The FASEB Journal*, 16(13), 1835-1837. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0121fje>
- Fanning, A., Van Itallie, C., & Anderson, J. (2012). Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Molecular Biology Of The Cell*, 23(4), 577-590. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0791>
- Focal adhesion - Latest research and news | Nature*. (2018). *Nature.com*. Retrieved 21 January 2018, from <https://www.nature.com/subjects/focal-adhesion>
- Geiger, B., Spatz, J., & Bershadsky, A. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 21-33. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2593>
- Gonzalez-Mariscal, L., Chávez de Ramírez, B., & Cereijido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *The Journal Of Membrane Biology*, 86(2), 113-125. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01870778>
- González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 729-756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018
- González-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcón, L., & Jaramillo, B. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Experimental Cell Research*, 312(17), 3323-3335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.006>
- Gonzalez-Mariscal Lorenza, Miguel Quiros, M. D.-C. and P. B. (2012). Tight Junctions. In *Tight Junctions, Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, Prof. Stevo Najman*. InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-and-perspectives-in-cell-0A%0Abiology/tight-junctions>
- Gonzalez-Mariscal, L., Miranda, J., Ortega-Olvera, J., Gallego-Gutierrez, H., Raya-Sandino, A., & Vargas-Sierra, O. (2016). Zonula Occludens Proteins in Cancer. *Current Pathobiology Reports*, 4(3), 107-116. doi: 10.1007/s40139-016-0109-3
- 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. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1397(1), 35-53. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13334>
- Gopalakrishnan, S., Raman, N., Atkinson, S., & Marrs, J. (1998). Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 275(3), C798-C809. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.3.c798>

- Guillemot, L., Paschoud, S., Jond, L., Foglia, A., & Citi, S. (2008). Paracingulin Regulates the Activity of Rac1 and RhoA GTPases by Recruiting Tiam1 and GEF-H1 to Epithelial Junctions. *Molecular Biology Of The Cell*, 19(10), 4442-4453. doi: 10.1091/mbc.e08-06-0558
- Guillemot, L., Guerrero, D., Spadaro, D., Tapia, R., Jond, L., & Citi, S. (2014). MgcRacGAP interacts with cingulin and paracingulin to regulate Rac1 activation and development of the tight junction barrier during epithelial junction assembly. *Molecular Biology Of The Cell*, 25(13), 1995-2005. doi: 10.1091/mbc.e13-11-0680
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., & Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 88(8), 3460-3464. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.8.3460>
- Gumbiner, B., & Kim, N. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *Development*, 141(6), e607-e607. doi: 10.1242/dev.109108
- Guo, W., Frey, M., Burnham, N., & Wang, Y. (2006). Substrate Rigidity Regulates the Formation and Maintenance of Tissues. *Biophysical Journal*, 90(6), 2213-2220. doi: 10.1529/biophysj.105.070144
- Günzel, D., & Yu, A. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525-569. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Handorf, A., Zhou, Y., Halanski, M., & Li, W. (2015). Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis*, 11(1), 1-15. doi: 10.1080/15476278.2015.1019687
- Hawk, M., Gorsuch, C., Fagan, P., Lee, C., Kim, S., & Hamann, J. et al. (2018). RIPK1-mediated induction of mitophagy compromises the viability of extracellular-matrix-detached cells. *Nature Cell Biology*, 20(3), 272-284. doi: 10.1038/s41556-018-0034-2
- Holmes, K. C. in *Myosins* (ed. Coluccio, L. M.) 35–54 (Springer, The Netherlands, 2007).
- Huang, R., Guilford, P., & Thiery, J. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal Of Cell Science*, 125(19), 4417-4422. doi: 10.1242/jcs.099697
- Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* 176, 779–786
- Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and α Catenin. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(9), 5981-5986. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.9.5981>

- Itoh, M., Tsukita, S., Yamazaki, Y., & Sugimoto, H. (2012). Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-Myosin II signaling. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(25), 9905-9910. doi: 10.1073/pnas.1115063109
- Itoh, M. (2013). ARHGEF11, a regulator of junction-associated actomyosin in epithelial cells. *Tissue Barriers*, 1(2), e24221. doi: 10.4161/tisb.24221
- Jaramillo, B., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., & Gonzalez-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 297(1), 247-258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.021>
- Jou, T., Schneeberger, E., & James Nelson, W. (1998). Structural and Functional Regulation of Tight Junctions by RhoA and Rac1 Small GTPases. *The Journal Of Cell Biology*, 142(1), 101-115. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.142.1.101>
- Klein, E., Yung, Y., Castagnino, P., Kothapalli, D., & Assoian, R. (2007). Cell Adhesion, Cellular Tension, and Cell Cycle Control. *Methods In Enzymology*, 426, 155-175. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)26008-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)26008-2)
- Kardash, E., Bandemer, J., & Raz, E. (2011). Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nature Protocols*, 6(12), 1835-1846. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.395>
- Larre, I., Ponce, A., Franco, M., & Cereijido, M. (2014). The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 36, 149-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.010>
- Lin, X., Shang, X., Manorek, G., & Howell, S. (2013). Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *Plos ONE*, 8(6), e67496. doi: 10.1371/journal.pone.0067496
- Lodish, H. (2016). *Molecular cell biology* (7th ed., pp. 773-817). New York: W. H. Freeman.
- Maman, S., & Witz, I. (2018). A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer*, 18(6), 359-376. doi: 10.1038/s41568-018-0006-7
- McKenzie, A., Hicks, S., Svec, K., Naughton, H., Edmunds, Z., & Howe, A. (2018). The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-25589-0
- Meerschaert, K., Tun, M., Remue, E., De Ganck, A., Boucherie, C., & Vanloo, B. et al. (2009). The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 66(24), 3951-3966. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0156-6>

- Métais, J., Navarro, C., Santoni, M., Audebert, S., & Borg, J. (2005). hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Letters*, 579(17), 3725-3730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.062>
- Mihlan, S., Reiß, C., Thalheimer, P., Herterich, S., Gaetzner, S., & Kremerskothen, J. et al. (2012). Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene*, 32(16), 2107-2113. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.216>
- Monteiro, A.C., R. Sumagin, C.R. Rankin, et al. 2013. JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* 24: 2849–2860.
- Mooseker MS (1976). Brush border motility. Microvillar contraction in triton-treated brush borders isolated from intestinal epithelium. *J Cell Biol* 71, 417–433.
- Nie, M., Aijaz, S., Leefa Chong San, I., Balda, M., & Matter, K. (2009). The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription. *EMBO Reports*, 10(10), 1125-1131. doi: 10.1038/embor.2009.182
- Nieto, M., Huang, R., Jackson, R., & Thiery, J. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028
- Nishizaka T, Shi Q, and Sheetz MP. Position-dependent linkages of fibronectin- integrin-cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97(2):692-7.
- Nusrat, A., Giry, M., Turner, J., Colgan, S., Parkos, C., & Carnes, D. et al. (1995). Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 92(23), 10629-10633. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.23.10629>
- Onder, T., Gupta, P., Mani, S., Yang, J., Lander, E., & Weinberg, R. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Research*, 68(10), 3645-3654. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2938
- Otani, T., Ichii, T., Aono, S., & Takeichi, M. (2006). Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *The Journal Of Cell Biology*, 175(1), 135-146. doi: 10.1083/jcb.200605012
- Paszek, M., Zahir, N., Johnson, K., Lakins, J., Rozenberg, G., & Gefen, A. et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3), 241-254. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.010
- Pelham, R., & Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 94(25), 13661-13665. doi: 10.1073/pnas.94.25.13661
- Pollard, T., & Cooper, J. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science*, 326(5957), 1208-1212. doi: 10.1126/science.1175862

- Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T., & 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. *Molecular Biology Of The Cell*, 24(16), 2528-2543. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e13-04-0224>
- Quiros, M., & Nusrat, A. (2014). RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the Epithelial Apical Junctional Complex. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 36, 194-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.003>
- Raya-Sandino, A., Castillo-Kauil, A., Domínguez-Calderón, A., Alarcón, L., Flores-Benitez, D., & Cuellar-Perez, F. et al. (2017). Zonula occludens-2 regulates Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(10), 1714-1733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.016>
- Rice, A., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B., Karim, S., Morton, J., & del Río Hernández, A. (2017). Matrix stiffness induces epithelial–mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 6(7), e352. doi: 10.1038/oncsis.2017.54
- Roth, L., Srivastava, S., Lindzen, M., Sas-Chen, A., Sheffer, M., & Lauriola, M. et al. (2018). SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. *Science Signaling*, 11(515), eaan0949. doi: 10.1126/scisignal.aan0949
- Saez, A., Ghibaudo, M., Buguin, A., Silberzan, P., & Ladoux, B. (2007). Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104(20), 8281-8286. doi: 10.1073/pnas.0702259104
- Shebanova, O., & Hammer, D. (2012). Biochemical and mechanical extracellular matrix properties dictate mammary epithelial cell motility and assembly. *Biotechnology Journal*, 7(3), 397-408. doi: 10.1002/biot.201100188
- Skardal, A., Mack, D., Atala, A., & Soker, S. (2013). Substrate elasticity controls cell proliferation, surface marker expression and motile phenotype in amniotic fluid-derived stem cells. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 17, 307-316. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.10.001
- Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J., & Citi, S. (2017). Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Current Biology*, 27(24), 3783-3795.e8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>
- Staehelin, L. A. 1973. Further observations of the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.*, 13:763–786
- Syed, S., Karadaghy, A., & Zustiak, S. (2015). Simple Polyacrylamide-based Multiwell Stiffness Assay for the Study of Stiffness-dependent Cell Responses. *Journal Of Visualized Experiments*, (97). doi: 10.3791/52643

- Tapia, R., M. Huerta, S. Islas, et al. 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.
- Thiery, J., Acloque, H., Huang, R., & Nieto, M. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thompson, E., & Nagaraj, S. (2018). Transition states that allow cancer to spread. *Nature*, 556(7702), 442-444. doi: 10.1038/d41586-018-04403-x
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2011). *Principios de anatomía y fisiología* (11th ed., pp. 109-123). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L., Conway, D., & Randi, A. et al. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *The Journal Of Cell Biology*, 208(6), 821-838. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201404140>
- Tse, J., & Engler, A. (2010). Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols In Cell Biology*, 47(1), 10.16.1-10.16.16. doi: 10.1002/0471143030.cb1016s47
- Turner JR. ‘Putting the squeeze’ on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11:301-8; PMID:10966864; <http://dx.doi.org/10.1006/scdb.2000.0180>
- Ulrich, T., de Juan Pardo, E., & Kumar, S. (2009). The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. *Cancer Research*, 69(10), 4167-4174. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4859
- Uroz, M., Wistorf, S., Serra-Picamal, X., Conte, V., Sales-Pardo, M., & Roca-Cusachs, P. et al. (2018). Regulation of cell cycle progression by cell–cell and cell–matrix forces. *Nature Cell Biology*, 20(6), 646-654. doi: 10.1038/s41556-018-0107-2
- Van Itallie, C., Fanning, A., Bridges, A., & Anderson, J. (2009). ZO-1 Stabilizes the Tight Junction Solute Barrier through Coupling to the Perijunctional Cytoskeleton. *Molecular Biology Of The Cell*, 20(17), 3930-3940. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0320>
- Vicente-Manzanares., M., Ma, X., Adelstein, R., & Horwitz, A. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(11), 778-790. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2786>
- Wang, F., Graham, W., Wang, Y., Witkowski, E., Schwarz, B., & Turner, J. (2005). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American Journal Of Pathology*, 166(2), 409-419. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62264-x

- Wei, S., Fattet, L., Tsai, J., Guo, Y., Pai, V., & Majeski, H. et al. (2015). Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nature Cell Biology*, 17(5), 678-688. doi: 10.1038/ncb3157
- Williams, C., Engler, A., Slone, R., Galante, L., & Schwarzbauer, J. (2008). Fibronectin Expression Modulates Mammary Epithelial Cell Proliferation during Acinar Differentiation. *Cancer Research*, 68(9), 3185-3192. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2673
- Wittchen, E.S., J. Haskins & B.R. Stevenson. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.* 274: 35179–35185.
- Wozniak, M., Desai, R., Solski, P., Der, C., & Keely, P. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *The Journal Of Cell Biology*, 163(3), 583-595. doi: 10.1083/jcb.200305010
- Yeung, T., Georges, P., Flanagan, L., Marg, B., Ortiz, M., & Funaki, M. et al. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility And The Cytoskeleton*, 60(1), 24-34. doi: 10.1002/cm.20041