



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de las proteínas asociadas a los filamentos
intermedios de vimentina en fibroblastos embrionarios de
ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida con
rigidez controlada**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Mariana Hernández Juárez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Genaro Vázquez Victorio
Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2024**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Análisis de las proteínas asociadas a los filamentos intermedios de vimentina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida con rigidez controlada

realizado por **Mariana Hernández Juárez** con número de cuenta **108002434** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Propietario Dr. Genaro Vázquez Victorio
Tutor

Suplente Dr. Yair Romero López

Suplente Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 26 DE JUNIO DE 2023

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*A papá y mamá,
que extendieron sus alas y
emprendieron el vuelo al amanecer*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme desde los 12 años, por brindarme tantas oportunidades de crecimiento en distintos ámbitos y ser el lugar de encuentro de personas maravillosas que continúan en mi camino.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) por brindar el espacio y las herramientas necesarias durante este proyecto.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio por el apoyo y asesoría en el desarrollo de este trabajo. Gracias por impulsar la formación de nuevas generaciones y por permitirme conocer el otro lado de la investigación, donde la creatividad, innovación, responsabilidad y trabajo arduo no se interpone con el bienestar personal.

Al Dr. Alejandro Cabrera Wrooman por la donación de los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y los fibroblastos inmortalizados BJ.

Al Dr. Jorge Carretero Ortega por el entrenamiento en la técnica de inmunoblot y su gran interés en transmitir su conocimiento a los demás. Gracias por los consejos, por tu entusiasmo y por tu apoyo en mi formación.

A la Dra. Nathalia Serna Márquez y la Dra. Beatriz Díaz Bello por la experiencia transmitida en cultivo celular e inmunofluorescencia.

A la Biol. Alejandra Jiménez Escobar por su apoyo en la realización de hidrogeles y por su amistad.

A los proyectos de CONACYT 304023 y PAPIIT 219721 por los apoyos en la realización de este trabajo de tesis.

A *Silvia*, por dejarme ser libre desde pequeña, por acompañarme amorosamente en mis decisiones, por abrazarme, apoyarme y amarme. Gracias por tu fortaleza cuando la ausencia tocó la puerta.

A *Marcos, Marisela y Jorge*, por ser mi núcleo, por su protección, amor y compañía. Por ser mi ejemplo de responsabilidad y valores.

A *Regina*, por traer alegría a una casa llena de adultos, por recordarnos la magia de lo cotidiano y por permitir la entrada de Luna a nuestras vidas.

A *Rubén*, por estar presente en todos los sentidos, por los viernes de café, las escapadas a pueblitos y por tu apoyo en todo momento.

A *Yael*, por los 2 meses convertidos en más de 120. Por compartir tu ser conmigo y construir a mi lado un amor basado en libertad, respeto e independencia. Por elegirme todos los días.

A *Lizet y Andrea*, por ser mis hermanas desde hace 15 años. Gracias por dejarme crecer en compañía de su amistad. Que nadie les corte las alas para alcanzar sus sueños.

A *Lalo*, por no dejarme en el olvido cuando cambie de rumbo, por creer en mí y escuchar con atención mis proyectos académicos. No te rindas nunca.

A *Ale, Brenda, Alex y María*, por hacer del laboratorio un lugar bello, por recordarme que el trabajo se disfruta mejor en compañía y por la sororidad. ¡Son grandes!

A *Anaiza, Natalia, Ari y Karol*, por acompañarme en mi primer acercamiento en la investigación y ser una inspiración de mujeres haciendo ciencia.

A *Vilchis, Tena y Abigail*, por compartir su tiempo conmigo durante la carrera. Por seguir presentes después de tanto tiempo. Los quiero y admiro.

En especial, gracias a *Pepe y Munda*, por cobijarme con su inmenso amor y cuidarme toda la vida. Los llevo conmigo en cada paso que doy.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Mecanobiología.....	11
1.2 Mecanotransducción.....	12
1.3 Características de los Filamentos Intermedios.....	32
2. ANTECEDENTES.....	43
3. JUSTIFICACIÓN.....	49
4. HIPÓTESIS.....	50
5. OBJETIVOS.....	50
5.1 Objetivo General.....	50
5.2 Objetivos Particulares.....	50
6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	51
6.1 Cultivo celular.....	51
6.2 Fabricación de hidrogeles de poliacrilamida.....	52
6.3 Inmunofluorescencia.....	55
6.4 Lisis celular y Enriquecimiento de Filamentos Intermedios.....	56
6.5 Cuantificación y precipitación de proteína.....	58
6.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	60
6.7 Tinción azul de Coomassie.....	63

6.8 Inmunoblot.....	63
7. RESULTADOS.....	66
7.1 Caracterización de los FI de vimentina por inmunofluorescencia e inmunoblot en fibroblastos.....	66
7.2 Enriquecimiento de la fracción de FI de vimentina a partir de MEFs sembrados en cultivo estándar.....	69
7.3 Posibles interacciones de vimentina en MEFs cultivados bajo condiciones de cultivo estándar.....	72
8. DISCUSIÓN.....	74
9. CONCLUSIONES.....	83
10. ANEXO 1. SOLUCIONES.....	84
11. REFERENCIAS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los filamentos intermedios y su localización.....	33
Tabla 2. Fosforilación de vimentina <i>in vivo</i>	39
Tabla 3. Interacciones proteicas de vimentina.....	47
Tabla 4. Elaboración de hidrogeles de PAA para inmunofluorescencia.....	54
Tabla 5. Curva patrón de albúmina para la cuantificación de proteínas.....	59
Tabla 6. Elaboración de hidrogel de PAA al 12% para inmunoblot.....	61
Tabla 7. Diluciones de anticuerpos utilizados en la técnica inmunoblot.....	65
Tabla 8. Buffer de lisis celular TNTE.....	84
Tabla 9. Enriquecimiento de FI basado en Battaglia <i>et al.</i> , 2017.....	84
Tabla 10. Buffer de corrida, transferencia y TBS tween.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tipos de esfuerzos físicos que afectan a las células y tejidos.....	14
Figura 2. Propiedades mecánicas de los tejidos.....	19
Figura 3. Activación de integrinas.....	26
Figura 4. Respuesta mecánica producida por el modelo de clutch.....	28
Figura 5. Estructura y ensamblado de FI.....	35
Figura 6. Mapa de los sitios de fosforilación de vimentina observados <i>in vivo</i> y sus respectivas cinasas.....	41
Figura 7. Ilustración de los componentes de un gel de PAA para inmunoblot.....	62
Figura 8. Caracterización de la expresión de filamentos intermedios de vimentina en fibroblastos.....	68
Figura 9. Enriquecimiento de filamentos intermedios de vimentina en MEFs.....	71
Figura 10. Posibles interacciones de vimentina en MEFs bajo condiciones de cultivo estándar detectadas por inmunoblot.....	73

ABREVIATURAS

AF, Adhesiones focales

FI, Filamentos intermedios

kPa, Kilopascales

MEC, Matriz extracelular

MEFs, Fibroblastos embrionarios de ratón

PAA, Poliacrilamida

PTM, Modificaciones postraduccionales

ULF, Filamentos de longitud unitaria

RESUMEN

Los filamentos intermedios (FI) de vimentina son uno de los tres componentes que conforman al citoesqueleto de células de origen mesenquimal, como los fibroblastos, los cuales participan en la localización y organización de organelos tales como la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, vesículas, entre otros. Además, se ha demostrado la importancia de los FI en mantener la integridad de las células cuando éstas se ven sometidas a fuerzas mecánicas externas que las deforman. Esta característica de los FI es de suma importancia ya que todas las células dentro de los tejidos del cuerpo se ven sometidos a fuerzas externas provenientes de la matriz extracelular, del confinamiento celular y, en algunos tipos celulares, del flujo laminar ejercido por la sangre o aire. De tal forma que al presentar filamentos altamente flexibles como los son los FI de vimentina, la célula es capaz de soportar deformaciones mecánicas sin sufrir daños en su estructura.

Por otro lado, se ha visto que las propiedades mecánicas del sustrato, principalmente la rigidez, influyen en el estado de ensamblado de los FI de vimentina, cambiando las proporciones de fragmentos solubles e insolubles dentro de la célula, lo cual consideramos que podría alterar las interacciones de vimentina con otras proteínas. Debido a lo anterior, el actual proyecto tuvo como objetivo determinar si cambios en la rigidez del sustrato podría inducir cambios en las asociaciones proteicas de vimentina. Para lo cual, se caracterizó la expresión de vimentina en nuestro modelo de estudio de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) a través de inmunofluorescencia e inmunoblot en sustrato de cultivo estándar (vidrio y poliestireno). Además, se observaron los cambios morfológicos y de reticulación de vimentina en los MEFs al modificar la rigidez del sustrato (sembrados en hidrogeles de poliacrilamida de 0.5, 1 y 5 kPa). También, se estandarizó en el laboratorio el enriquecimiento de filamentos intermedios. Por último, se observó la posible interacción de vimentina con actina y con la integrina $\beta 1$ en sustrato rígidos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mecanobiología

Desde hace décadas se ha visto que los seres vivos perciben, interaccionan y responden a fuerzas físicas que hay en su entorno. Si pensamos en el esqueleto, es un componente estructural que proporciona soporte ante la fuerza de gravedad que actúa constantemente sobre los seres vivos. La piel, por su parte, es sometida a fuerzas de estiramiento y compresión, capaz de mantenerse como una barrera protectora a pesar de recibir dichos estímulos mecánicos (fuerza y movimiento). También, los músculos esqueléticos, ligamentos y tendones se ven sometidos a esfuerzos de tracción y compresión continuamente cuando hacemos algún movimiento. Otro ejemplo, son las cuerdas vocales que vibran para producir sonidos al hablar. Incluso la respiración y circulación son funciones fisiológicas que requieren de generar esfuerzos (fuerza sobre área) para poder introducir aire al cuerpo y bombear sangre [1,2].

Aunque son ejemplos a nivel de órganos o sistemas, con el avance de nuevas técnicas y metodologías experimentales que permiten medir y manipular fuerzas físicas en modelos *in vitro*, este campo se ha ampliado a estudiar las respuestas moduladas por estímulos mecánicos a nivel celular y tisular. De ahí surge y toma mayor fuerza un nuevo campo de estudio interdisciplinario, llamado mecanobiología, donde convergen la biología, la física y la bioingeniería [3]. La base de la mecanobiología es el concepto de homeostasis tensional (*tensegrity*), el cual se refiere al equilibrio entre las fuerzas extracelulares y las fuerzas intracelulares; de esta forma los órganos, tejidos y células responden a cambios en su exterior, manteniendo un nivel homeostático de tensión en su interior [4,5]. Esto ha llevado a establecer que las fuerzas físicas tienen un papel relevante en regular procesos durante la embriogénesis, en el remodelamiento de la matriz extracelular (MEC) y la reparación de tejido lesionado durante la cicatrización de heridas. Así mismo, las fuerzas contráctiles generadas en las células son importantes para el ensamblaje del citoesqueleto y la organización de la célula, lo que induce la activación de vías de señalización, la transcripción de genes y cambios en la adhesión celular,

migración, proliferación, diferenciación y apoptosis [2]. El estudio en mecanobiología establece la importancia de las señales mecánicas a las que están expuestos los tejidos y células; sin embargo, conocer los mecanismos que permite a la células transducir la información física en bioquímica ha sido una interrogante abordada por la mecanotransducción y ha permitido entender que la regulación de la respuesta celular no depende únicamente de factores bioquímicos y genéticos, sino también de las propiedades físicas del su entorno.

1.2 Mecanotransducción

El paso entre tener un estímulo mecánico y generar una respuesta requiere en primer lugar que las células perciban las señales mecánicas, proceso conocido como *mechanosensing* o mecanorrecepción. Las propiedades físicas del exterior se transportan al interior de la célula como fuerzas a través de proteínas transmembranales, llamadas mecanorreceptores, como son las integrinas y los canales iónicos. También, se han descrito a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), por ejemplo, el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) [6] y receptores de factores de crecimiento (GFR, por su siglas en inglés) como sensibles a señales mecánicas [3,7].

Posteriormente, los mecanorreceptores transmiten los estímulos mecánicos a lo largo del citoesqueleto y comienza la transducción de la fuerza recibida a señales bioquímicas, generando una serie de cambios en la célula, que incluyen: modificaciones postraduccionales, despliegue de proteínas, activación del transporte celular, generación de nuevas interacciones entre proteínas, activación de genes, cambios en el estado de polimerización de actina, activación de miosina, deformación nuclear, entre otras [8]. Al final, la cascada de señalización activada desde que se percibe el estímulo mecánico, culmina en una respuesta celular que regula tanto respuestas fisiológicas y homeostáticas como fisiopatológicas, tal es el caso del cáncer y la fibrosis.

A nivel tisular, las señales mecánicas son fuerzas que estiran o aplastan de forma perpendicular la superficie de las células, o bien, fuerzas que se aplican paralelamente a su superficie y generan el desplazamiento de una región del tejido (**Figura 1**). Las fuerzas que impactan los tejidos provienen de la tensión o compresión producida por las propias células a través de la acción contráctil del aparato de actomiosina, del confinamiento celular, el flujo de fluidos o aire y la presión hidrostática/osmótica, los cuales son resistidos en diferentes grados debido a las propiedades físicas del tejido [9,10]. La aplicación de una fuerza, induce esfuerzos (σ) sobre los tejidos que los alargan o comprimen y son definidos como una medida de intensidad de la fuerza y se expresan de la siguiente forma

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

donde F es la fuerza aplicada sobre el tejido, dada en Newtons (N); y A es el área del tejido que se deformó, dada en metros cuadrados (m^2). La magnitud de σ se reporta en unidad de Pascal (Pa) [11].

Los tipos de esfuerzos físicos generados en los tejidos son: esfuerzo de tensión, que se induce al aplicar dos fuerzas en sentido opuesto sobre la célula y tiende a estirar y alargarla. El esfuerzo de compresión, generado por la aplicación de fuerzas hacia el centro de la célula, que tienden a acortarla. Por último, el esfuerzo cortante, que se produce cuando dos fuerzas opuestas son aplicadas tangencialmente sobre la superficie celular, generando un desplazamiento de una parte del tejido [12].

Para entender mejor el proceso de mecanotransducción y sus implicaciones, se abordará el tema dividiéndolo en tres componentes: las propiedades físicas del microambiente extracelular conformada por la matriz extracelular y las uniones celulares; los mecanorreceptores conformados por las integrinas; y los componentes intracelulares que participan en la transmisión del estímulo mecánico como es el caso del citoesqueleto y la vía de proteínas G pequeñas, como la proteína RhoA.

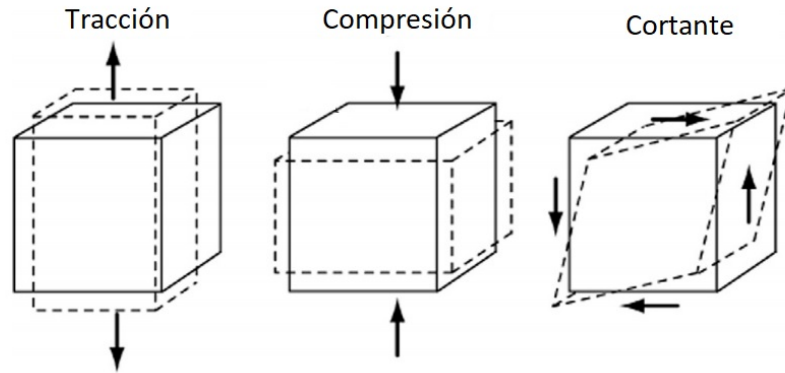


Figura 1. Tipos de esfuerzos físicos que afectan a las células y tejidos. Las flechas representan la dirección en que se aplica la fuerza y las líneas punteadas como se deforman al aplicar dicha fuerza (Imagen modificada de Morgan E. *et al.*, 2013).

1.2.1 Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de macromoléculas (retículo) que forman el microambiente estromal acelular en todos los tejidos y órganos, proporcionando un sustrato de anclaje y soporte para las células [13]. Actualmente, la MEC se considera como un componente dinámico y versátil por su constante remodelamiento y reorganización que induce el desarrollo, funcionamiento y reparación de los órganos [14]. Existen dos tipos de matrices en los tejidos: la membrana basal (MB), la cual interaccionan directamente con el epitelio y endotelio, y la matriz intersticial que constituye la mayor parte de la MEC en el cuerpo [15]. Existe una relación recíproca entre las células y la MEC. Por un lado, las células secretan los componentes de la MEC y metaloproteinasas que favorecen su reorganización, y por otro lado, la MEC incorpora moléculas que actúan como señales que reciben las células y dirigen su comportamiento [16]. La composición de la MEC consta de proteínas, polisacáridos, agua y factores solubles como: citocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas y otras moléculas que son secretadas por las células [12,13]. A continuación, se describirán las características de los principales componentes de la MEC.

Colágena. Es la proteína fibrosa más abundante de la MEC intersticial, aunque también forma parte de la membrana basal. Existen 28 diferentes tipos de colágena y cada una se compone de tres cadenas α de polipéptidos que contienen una secuencia repetida de los aminoácidos Glicina-X-Y (G-X-Y), donde “X” generalmente es Prolina e “Y” Hidroxiprolina [17]. La secuencia de estos aminoácidos forma una estructura de triple hélice que caracteriza a la familia de la colágena. Los tipos de colágenas más estudiadas son: colágena tipo I, II, III y V, las cuales son producidas principalmente por fibroblastos, forman fibras y son esenciales en la estructura de la matriz intersticial. Por otro lado, la colágena tipo IV es uno de los componentes de la membrana basal, producida generalmente por células epiteliales y cuya organización espacial es reticular plana [18]. De forma general, la colágena favorece la integridad y resistencia del tejido ante estímulos mecánicos [13]. En comparación con la elastina, las fibras de colágena son casi 100 veces más rígidas y prácticamente no se extienden, dándole mayor rigidez a la MEC [19]. Además, es una proteína muy utilizada en el cultivo celular como proteína promotora de adhesión que permite el anclaje de las células a sustratos inertes como hidrogeles.

Fibronectina. Es la segunda proteína más abundante en la MEC de la mayoría de los tejidos. Consiste de dos subunidades con un peso aproximado de 250 kDa cada una, las cuales están unidas covalentemente por puentes de disulfuro y puede unirse con otros dímeros de fibronectina, con colágena, heparina y receptores celulares. [20,21]. La fibronectina puede presentarse en forma insoluble, formando parte de la MEC como fibras; o de forma soluble en el plasma. Al igual que la colágena, la fibronectina es usada en cultivos celulares para permitir la adhesión celular, a través de la secuencia de aminoácidos rica en Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD), lo que le permite unirse con la integrina $\alpha_5\beta_1$ de las células [22]. Además de su papel en la adhesión celular, la fibronectina es importante en la migración, invasión y proliferación celular [23].

Elastina. La elastina es un polímero que se forma por la unión de su precursor monomérico tropoelastina, la cual es secretada como una proteína de 60 kDa por fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales, condrocitos y queratinocitos. La elastina es el componente principal de las fibras elásticas, responsable de la elasticidad reversible que presenta la MEC en los tejidos, ya que puede estirarse de 2 a 3 veces su tamaño [19,24]. Se han descrito como fibras muy estables, con baja tasa de recambio y muy importantes en los tejidos de pulmones, vasos sanguíneos, en el corazón, piel, vejiga, ligamentos y cartílagos elásticos, los cuales están sometidos a estiramientos constantemente [20,25].

Lamininas. Son glicoproteínas heterotriméricas conformadas por la unión de una cadena α , una β y una γ , formando el principal componente de la lámina basal, donde se une a la red de colágena tipo IV y nidógeno. Se han identificado a las lamininas con un papel esencial en el desarrollo embrionario y en la organogénesis del riñón, pulmón, nervios periféricos, cerebro, páncreas y placenta [20,26,27].

Glucosaminoglucanos (GAG). Son polímeros formados de la repetición de varias unidades de disacáridos. Existen 6 tipos de GAG: ácido hialurónico, sulfato de heparán, heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y sulfato de queratán. Los GAG difieren en su composición química, su estructura y su papel como componente de la MEC [20,28].

Proteoglucanos (PG). Son componentes estructurales y funcionales muy importantes de la MEC, formados a partir de la unión covalente entre una proteína con una o más cadenas de GAG. Se ha descrito que los PG interactúan con factores de crecimiento, citocinas, receptores celulares y otros componentes de la MEC. Se les ha asociado con proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y adhesión celular en cáncer [20,29].

La composición de la MEC y sus propiedades varían de un tejido a otro, lo que permite mantener las características morfológicas y funcionales de las células que residen en cada tejido. Por ejemplo, las válvulas cardíacas que dirigen el flujo de la sangre en una sola dirección a través del corazón, presentan tres capas que difieren en la composición de la MEC. La capa fibrosa se compone principalmente de colágena, permitiendo soportar el estrés y proporcionando resistencia durante la diástole. La capa esponjosa está formada predominantemente de PG y GAG como el ácido hialurónico, lo que le permite soportar efectos de compresión. Por último, la capa ventricular es rica en elastina, favoreciendo que la válvula pueda extenderse durante la diástole y retroceder durante la sístole. [30].

Así mismo, se ha visto que la diferenciación de células troncales y el mantenimiento de un fenotipo celular depende de las características de su microambiente. Por ejemplo, Marininkovic *et al.* demostraron que la composición, organización, topografía y propiedades mecánicas de la MEC varían dependiendo si es producida por células estromales derivada de tejido adiposo o médula ósea, lo cual influye en la diferenciación de células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) hacia adipocitos y osteoblastos, respectivamente [31]. De igual forma, Mao y colaboradores observaron que las células troncales mesenquimales humanas (hMSC, por sus siglas en inglés) pueden diferenciarse hacia condrocitos y osteoblastos, dependiendo de la composición de la MEC e independientemente de la presencia de factores químicos inducibles de dichos fenotipos [32]. También se ha visto que células troncales embrionarias de ratón son capaces de mantener su fenotipo indiferenciado en cultivos celulares con sustrato recubierto de colágena tipo I y IV, pero se diferencian en presencia de laminina o fibronectina [33]

Actualmente, se reconoce que la diversidad estructural, bioquímica y funcional de los componentes de la MEC le confiere propiedades físicas y mecánicas únicas de cada tejido, tales como porosidad, topografía, rigidez y viscoelasticidad [14]. Particularmente se ha estudiado como modulador de la respuesta celular a la rigidez y viscoelasticidad de los tejidos, así como el confinamiento celular, como se verá a continuación.

Elasticidad y rigidez. La elasticidad es la propiedad que tienen algunos materiales de regresar a su forma y tamaño original después de dejar de ejercer la fuerza que lo deformó. Por el contrario, la rigidez que presentan todos los materiales es la capacidad de resistir la aplicación de una fuerza sin deformarse [12]. La elasticidad de los materiales es medida a través del módulo elástico de Young (E), el cual se expresa como la fuerza aplicada sobre un área determinada del material (*esfuerzo*, σ) dividido por la deformación (*strain*, ε) que sufrió el material al aplicar dicho esfuerzo (**Figura 2A**).

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

El módulo de Young se expresa en Pa y es una propiedad que presentan los materiales sólidos que son sometidos a esfuerzos de compresión o tensión. En cambio, cuando se aplica una fuerza cortante sobre un material sólido, la resistencia a la deformación es descrita por el módulo elástico cortante (G) que también se expresa en unidades de Pa y es tres veces menor que E [1,9].

Viscosidad y viscoelasticidad. La viscosidad es una propiedad que presentan los líquidos, cuyo desplazamiento es constante en el tiempo y disipa energía después de sufrir una deformación por un esfuerzo determinado. La velocidad del flujo de un líquido es cuantificada por su viscosidad [1]. Sin embargo, existen materiales que presentan un comportamiento mixto, con propiedades similares a un sólido (elástico) y a un líquido (viscoso) y por lo tanto su comportamiento depende del tiempo. Generalmente, cuando se aplica un esfuerzo que deforma el material por un corto periodo, el material viscoelástico tiende a comportarse como elástico, regresando a su estado original, sin disipación de energía. Mientras que al aplicar una fuerza que deforma el material por tiempo prolongado, entonces presenta un comportamiento viscoso, asumiendo una pérdida de la energía, por lo cual el material no regresa a su estado original completamente (**Figura 2B**) [11,12]. Actualmente, se ha descrito a la MEC como un material viscoelástico más que uno elástico.

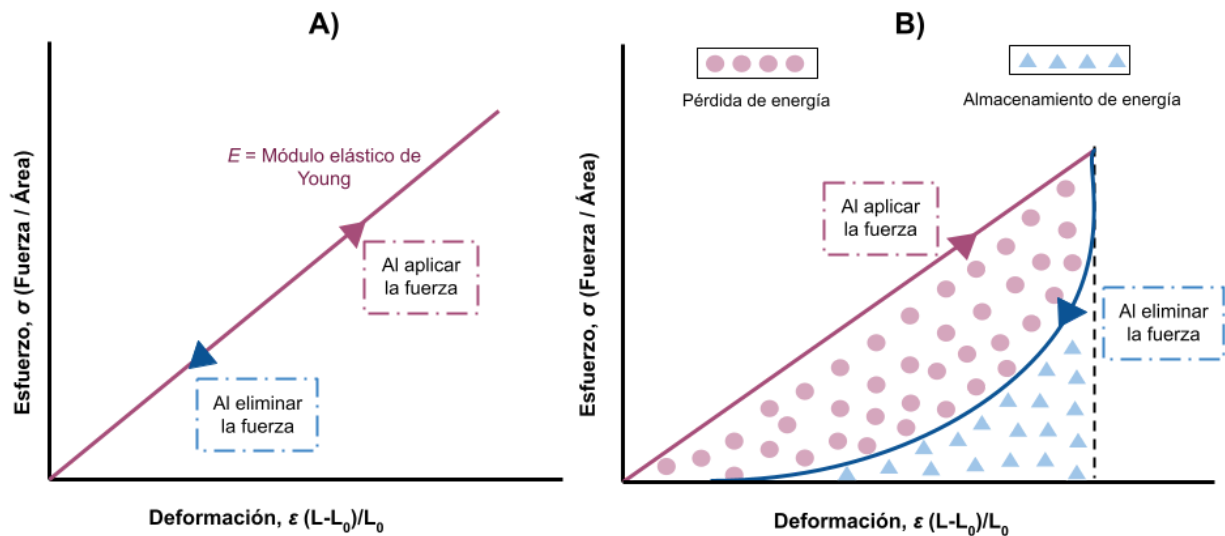


Figura 2. Propiedades mecánicas de los tejidos. **A)** Se muestra la relación entre el esfuerzo (eje de la X) con la deformación (eje de la Y) que sufre un material elástico, cuyo cociente es el módulo elástico de Young (E) que refleja la resistencia de un material a deformarse. La flecha rosa muestra la deformación del material al aplicar la fuerza, que una vez eliminada, el material regresa exactamente a su forma original, representado por la flecha azul. **B)** Se muestra el comportamiento de materiales viscoelásticos, donde al aplicar una fuerza se deforma el material dependiendo de E (flecha rosa). Sin embargo, al eliminar dicha fuerza, el material no regresará a su forma original completamente (flecha azul). Por lo cual se dice que hay una pérdida de energía (puntos rosas) y almacenamiento de energía (triángulos azules).

Estas propiedades mecánicas varían de un tejido a otro al ser medidas con la misma escala de deformación y tiempo, y esto depende de la composición, el grado de reticulación y la densidad de los componentes de la MEC [10]. A manera de ejemplos, el cerebro se ha descrito como un tejido suave con un módulo elástico de 100 Pa, al igual que el hígado con 400-600 Pa. Por otro lado, el músculo es considerado un tejido más rígido que los anteriores con un módulo elástico de 10 kPa y el hueso es el tejido más rígido con 100 kPa o más dependiendo de la estructura que se estudie [9].

La rigidez del tejido es capaz de impactar la forma celular, el anclaje de la célula a su sustrato y la activación de vías de señalización que regulan respuestas celulares como embriogénesis, cicatrización de heridas, mantenimiento de la homeostasis

celular y el desarrollo de enfermedades [3,34]. En ese sentido, Engler *et al.* demostraron por primera vez que las células troncales mesenquimales pueden diferenciarse a neuronas en sustratos suaves de 0.1-1 kPa, semejante a la rigidez del cerebro; mientras que en sustratos medianamente rígidos de 8-17 kPa, que mimetizan la elasticidad del músculo estriado, adquieren un fenotipo de mioblastos; y en un sustrato de 25-40 kPa (intentado simular los 100 kPa del hueso) presentan características de osteoblastos. Es importante destacar que la diferenciación observada es independiente de los factores del suero presentes en el medio [35].

En cuanto a condiciones fisiopatológicas, el aumento en la rigidez de la MEC es un factor importante para inducir fibrosis. Normalmente durante el proceso de cicatrización de heridas, la activación de miofibroblastos es esencial para generar y depositar los componentes de la MEC y así reparar el tejido dañado. Un factor químico fuertemente implicado en la diferenciación hacia miofibroblastos es el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) que favorece la expresión de la isoforma alfa de actina de músculo liso (α -SMA) [36]. Para evitar la acumulación excesiva de MEC, los miofibroblastos son regulados por apoptosis o son inactivados. Sin embargo, en algunas ocasiones el mantenimiento activo del fenotipo celular ocasiona la acumulación de fibras de colágena, fibronectina y proteoglicanos en la MEC que inducen el desarrollo de fibrosis [37]. En un modelo *in vivo* de fibrosis hepática, se demostró que la rigidez del tejido aumenta antes de considerarse un estadio temprano de fibrosis y se asoció con un aumento en la expresión de la enzima entrecruzadora de fibras de colágena, la lisil oxidasa (LOX). Los cambios en la rigidez de la MEC preceden al incremento en la expresión de α -SMA en las células, las cuales sólo adquirieron su fenotipo de miofibroblastos en sustratos rígidos [38]. Esta diferenciación asociada a la rigidez se ha estudiado en células pulmonares y cardíacas, donde los sustratos rígidos incrementan la expresión de α -SMA [39], fibronectina y fibras de estrés (actomiosina), así como un incremento en la producción de colágena [40]. Por lo cual, el aumento en la rigidez del sustrato incrementa la expresión de la α -SMA, favoreciendo la diferenciación hacia miofibroblastos y posteriormente, el desarrollo de fibrosis.

Por otro lado, el desarrollo del cáncer está relacionado con las características del microambiente tumoral, el cual aporta los recursos necesarios para su progresión. Debido a esto, las propiedades del microambiente de un tejido sano son muy diferentes a uno patológico y en el caso específico del cáncer, los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son los principales modificadores de la MEC. Entre los cambios producidos en el microambiente se incluyen las propiedades físicas de la MEC, que se generan de la interacción multidireccional entre las células tumorales, los CAFs y células del sistema inmune [41]. Paszeck *et al.* midieron el módulo elástico del tejido normal mamario, el cual es muy suave (~167 Pa) en comparación con la matriz adyacente a células tumorales e incluso a la masa tumoral inducida en ratones transgénicos (~918 Pa y ~4000 Pa, respectivamente). También, observaron en el tejido mamario que el cambio en la rigidez de la MEC se relaciona con la pérdida en la organización típica del tejido. Con un incremento ligero en la rigidez del sustrato, de 167 Pa a 170 Pa, las células no tumorales del epitelio mamario (MCF10A) incrementaron su crecimiento en comparación con un sustrato suave. Este cambio comprometió la organización normal de acinos polarizados y una notable reducción del lumen [42]. Además, se ha relacionado el incremento en la rigidez del sustrato con un aumento en el crecimiento e invasión celular en un modelo *in vitro* de adenocarcinoma pulmonar [43].

1.2.2 Uniones celulares

Si bien, la MEC es una fuente importante de estímulos químicos y físicos, las células no solo se encuentran ancladas a ella, sino también a otras células como es el caso de los tejidos epiteliales, siendo las células vecinas parte de su microambiente. Las uniones célula-célula son importantes en la homeostasis del tejido que favorece la dinámica colectiva de las células en procesos morfogénicos durante la embriogénesis, la reparación de heridas y en la invasión de células tumorales [44]. Las fuerzas mecánicas ejercidas por la unión entre células juegan un papel importante en la organización de estos tejidos. Por ejemplo, durante la migración colectiva de una monocapa celular, se requiere de una excelente coordinación entre las células y la transmisión de fuerzas físicas que, se logra a través de las uniones adherentes y la organización del citoesqueleto de actina en cada una de las células

vecinas [44]. Sin embargo, las uniones adherentes no son el único tipo de unión célula-célula, pero sí uno de los más estudiados en el proceso de mecanotransducción.

Uniones adherentes

Son las estructuras más importantes en la percepción y transmisión de fuerzas tensiles entre células vecinas. La unión es dependiente de Ca^{2+} y se forman por la interacción de las proteínas transmembranales de la familia de las cadherinas. Existen diferentes tipos de cadherinas dependiendo del tejido: las E-cadherinas y P-cadherinas se expresan en células epiteliales; las VE-cadherinas se encuentran en células endoteliales; y las N-cadherinas en tejidos no epiteliales como las neuronas. A través del dominio extracelular N-terminal de las cadherinas se unen las células vecinas, mientras que, su extremo intracelular C-terminal está unido al citoesqueleto de actina por medio de proteínas de la familia de las cateninas.[45,46].

La unión entre cateninas y los filamentos de actina son dependientes de la tensión, ya que generan cambios conformacionales en las cateninas y exponen el residuo de valina (V796) que es importante en la interacción con la actina. La activación mecánica de α -catenina favorece el reclutamiento de otras proteínas como vinculina, afadina, forminas y α -actinina, reforzando la unión de cadherina-catenina con el citoesqueleto de actina y favorece la organización de los filamentos de actina y actomiosina. Además, se ha visto un reclutamiento de proteínas de la familia ajuba, como LIMD1 que regulan la señalización de la vía Hippo, al secuestrar e inhibir a LATS, lo que favorece la translocación de YAP/TAZ al núcleo celular [45]. YAP/TAZ son cofactores transcripcionales cuya activación está relacionada con la detección de fuerzas mecánicas recibidas en las células y la transcripción de genes relacionados a la proliferación (como se verá en el apartado de *Efectores mecanosensibles*). [47]. Ibar *et al.* detectaron que la unión entre LIMD1 y LATS se da en cultivos con baja densidad celular, mientras que con alta densidad la interacción se pierde, lo cual se relaciona con la disminución de la proliferación por contacto celular en cultivos confluentes [48]. También α -catenina y la proteína 14-3-3

secuestran a YAP en las uniones adherentes de forma dependiente a la tensión generada por el incremento en la densidad celular [49].

Desmosomas

Son uniones que se caracterizan por conectar los filamentos intermedios de células vecinas a través de un complejo proteico. Están conformados por dos tipos de cadherinas: desmogleína y desmocolina, las cuales se unen a las proteínas placoglobina y placofilina en el citoplasma celular y, a su vez, se une a los filamentos intermedios por medio de la proteína desmoplaquina [45]. Las uniones de este tipo son muy fuertes y se encuentran enriquecidas en células que soportan fuerzas mecánicas constantemente como el flujo sanguíneo en las células endoteliales de vasos sanguíneos y fuerzas de estiramiento y compresión a las que están expuestos los queratinocitos de la piel [50]. Recientemente, Price *et al.* observaron que los desmosomas presentaban poca o nula tensión cuando las células se encontraban en su estado basal (sin la aplicación de fuerzas externas), pero al aplicar deformaciones mecánicas en las células, los desmosomas se someten a tensión mecánica. Con estas observaciones, los autores sugieren que los desmosomas son complejos de adhesión que absorben los esfuerzos de tensión [51]. Por otro lado, Baddman *et al.* demostraron que la cadherina desmogleína-2 experimenta tensión cuando las células se encuentran en estado basal [52]. Aunque parecen contradictorios estos estudios, se ha sugerido que las tensiones que experimentan las cadherinas en los desmosomas en estado basal pueden ser transmitidas a los filamentos de actina a través de una comunicación entre ambos tipos de adhesiones [51,53]. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que dirigen o transmiten estas fuerzas tensiles a través de los desmosomas.

Uniones estrechas

Son uniones que sellan a las monocapas epiteliales y endoteliales, por lo cual el paso de iones y solutos se ve limitado. Además, mantienen separadas las proteínas y lípidos de las membranas apicales y laterales de las células. Se ubican en el lado más apical de la membrana lateral de las células que forman el tejido epitelial [54].

Están formadas por complejos multiproteicos que incluyen proteínas transmembranales (claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de unión) y proteínas citoplasmáticas (por ejemplo, ZO-3, MAGGI, MUPP1). Las uniones estrechas están conectadas con el citoesqueleto de actina y los microtúbulos a través de las proteínas de la familia ZO y cingulina, respectivamente, las cuales favorecen la regulación y transmisión de esfuerzos [45,54]. Particularmente ZO-1 y ZO-2 regulan la organización de actomiosina; de tal forma que si están depletadas estas proteínas, hay un incremento en la contractilidad de la actomiosina y un incremento en las fuerzas de contracción intercelulares [45].

1.2.3 Integrinas como mecanorreceptores

La transmisión de las propiedades mecánicas de la MEC a la célula tiene lugar en la membrana celular, principalmente por las proteínas heterodiméricas llamadas integrinas. Estas proteínas transmembranales forman una unión directa entre las células y su microambiente, al unirse con sus ligandos que forman parte de la MEC y asociarse con el citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras en el interior celular. Las integrinas se conforman por una subunidad α y una β , las cuales se componen de un multidominio extracelular de gran tamaño, la región transmembranal y una cola citoplasmática, generalmente corta. En humanos existen 24 diferentes tipos de integrinas que se producen por la combinación de 18 tipos de la subunidad α y 8 tipos de la subunidad β . De tal forma que, la especificidad de las integrinas por sus ligandos y las vías de señalización que activan en la célula dependen de la combinación entre las subunidades α y β [55].

La activación de las integrinas está dada por el grado de afinidad que presenta por sus ligandos y está regulada por señalización proveniente del interior de la célula (*inside-out signaling*) y del exterior (*outside-in signaling*) [56]. En su estado de baja afinidad (inactivo), las integrinas tienen forma de V doblada con la región de la cabeza cercana a la membrana plasmática y reciben el nombre de “doblado-cerrado”. En su estado intermedio, existe un cambio conformacional en el dominio extracelular, permitiendo que la V-doblada se extienda y se le denomina

“extendido-cerrado”. Por último, en el estado de alta afinidad hay una separación de las subunidades α y β en su dominio citoplasmático y recibe el nombre de “extendido-abierto” como se muestra en la **Figura 3** [55,57].

La activación *inside-out signaling* de las integrinas consiste en la unión de la proteína adaptadora talina a la cola citoplasmática de la subunidad $\beta 1$, lo que genera el paso entre una conformación “doblada-cerrada” a “extendida-abierta”, de tal forma que se incrementa la afinidad de las integrinas por sus ligandos. Esta activación inicial se ve reforzada por el reclutamiento de otras proteínas que permiten la formación de complejos de adhesión en las células. [10,55]. Se ha sugerido que la acción de la GTPasa pequeña Rap1 induce la activación de talina a través de las proteínas RIAM, al menos en leucocitos [58,59]. De igual forma, la proteína kindlin es importante en la activación de integrinas por este mecanismo y favorece el esparcimiento celular al reclutar otras proteínas como paxilina [10,55].

Por otro lado, la activación *outside-in signaling*, consiste en la unión entre los componentes de la MEC con las integrinas, lo que induce un estado conformacional “extendido-abierto” en las integrinas y favorece el reclutamiento de proteínas adaptadoras y de señalización en el dominio citoplasmático, así como la formación de adhesiones celulares [56].

Las integrinas activadas inducen la formación de adhesiones nacientes, las cuales se han descrito como agrupamiento de integrinas con un tamaño menor a 1 μm y cuya formación se ha descrito independiente de la aplicación de fuerzas [10]. Las adhesiones nacientes pueden disociarse o dar origen a las adhesiones focales (AF) maduras, las cuales se forman por la tensión generada de la contractilidad de la actomiosina (también llamadas fibras de estrés) o de fuerzas externas, lo cual implica el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se unen al dominio citoplasmático de las integrinas y las conectan con el citoesqueleto de actina [10,60]. La interacción dinámica que se genera entre las integrinas unidas a la MEC y el citoesqueleto genera fuerzas que actúan sobre los componentes de la célula y permiten activar vías de señalización. El cómo se generan estas fuerzas es explicado por el modelo de clutch molecular.

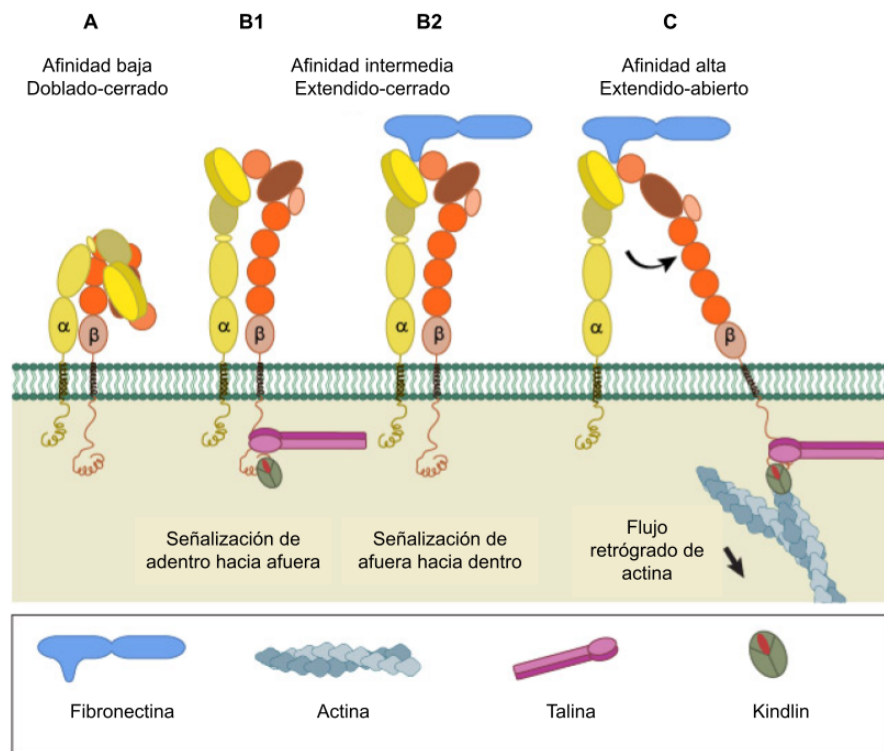


Figura 3. Activación de integrinas. En el estado A, se observa la conformación “doblado cerrado” de las integrinas cuando están inactivas y cuya configuración espacial le confiere una baja afinidad por sus ligandos. En el estado B1 y B2, las integrinas adquieren un cambio conformacional en el que el dominio de la cabeza se extiende y adquiere una configuración de “extendido-cerrado”. La diferencia entre B1 y B2 está dada por el tipo de señal que induce el cambio conformacional, B1 se forma por la señalización interna de talina y kindlin, mientras que B2 se da por señalización externa con la unión del ligando. En el estado C, las integrinas adquieren una alta afinidad por su sustrato al adquirir la configuración “extendido-abierto” con la separación citoplasmática entre la subunidad α y β (Imagen modificada de National University of Singapore, 2018) [146].

1.2.4 Modelo de clutch molecular

En 1988 se propuso el modelo de clutch molecular por Tim Mitchison y Marc Kirschner en el que explica como la conexión entre las integrinas con los filamentos de actina ejercen tensión entre la actomiosina y el sustrato, debido al flujo retrógrado de la actina [61]. El flujo retrógrado se refiere al movimiento de actina desde el borde de la célula, donde se forman las adhesiones nacientes, hacia el centro de la célula, el cual es impulsado por la contractilidad de la miosina tipo II y la polimerización de actina que empuja contra la membrana [62]. Cuando las

adhesiones celulares se conectan con los filamentos de actina, se produce un esfuerzo de tracción generado por el flujo retrógrado de actina y la unión de las integrinas a la MEC [56].

El esfuerzo induce cambios conformacionales que exponen sitios de unión y fosforilación en proteínas responsivas a estímulos mecánicos que forman parte de las AF. Entre estas proteínas está la proteína talina, que una vez unida a la integrina y a los filamentos de actina, se ve sometida a estiramiento mecánico que induce su despliegue y expone el sitio de unión a vinculina (*Binding Site Vinculin*, BSV por sus siglas en inglés). Estos cambios conformacionales favorecen la unión de vinculina tanto con talina como con los filamentos de actina y fortalece la adhesión [56]. De esta forma, las integrinas y las AF transmiten y responden a fuerzas mecánicas [55].

El modelo de clutch molecular establece un equilibrio mecánico entre la resistencia mecánica del exterior celular dada por la MEC (rigidez) y la contractilidad intracelular (tensión interna o pre-estrés), el cual se ajusta y es esencial para detectar la rigidez de la MEC [63,64]. Si bien esta característica es un parámetro pasivo que no es percibido directamente por las células, es a través de su citoesqueleto de actomiosina que pueden detectar indirectamente esta propiedad, al deformar la MEC de su alrededor por medio de las uniones formadas por las integrinas [10]. En sustratos rígidos, la carga mecánica recibida en la proteína talina y la tensión producida por la conexión entre el sustrato y los filamentos de actomiosina son lo suficientemente fuertes para inducir su despliegue y exponer su VBS. Como se mencionó anteriormente, la unión de vinculina refuerza la adhesión y aumenta la transmisión de fuerza. Sin embargo, en sustratos suaves, que se deforman fácilmente, la tasa baja de carga mecánica recibida en talina no es suficiente para desplegar su estructura, por lo cual no hay un reforzamiento de la adhesión mediada por vinculina y la transmisión de la fuerza será más baja que una MEC rígida [56,64]. Por lo tanto, la fuerza aplicada para deformar la MEC dependerá de su rigidez, entre mayor rigidez del sustrato mayor fuerza generada en la AF (**Figura 4**).

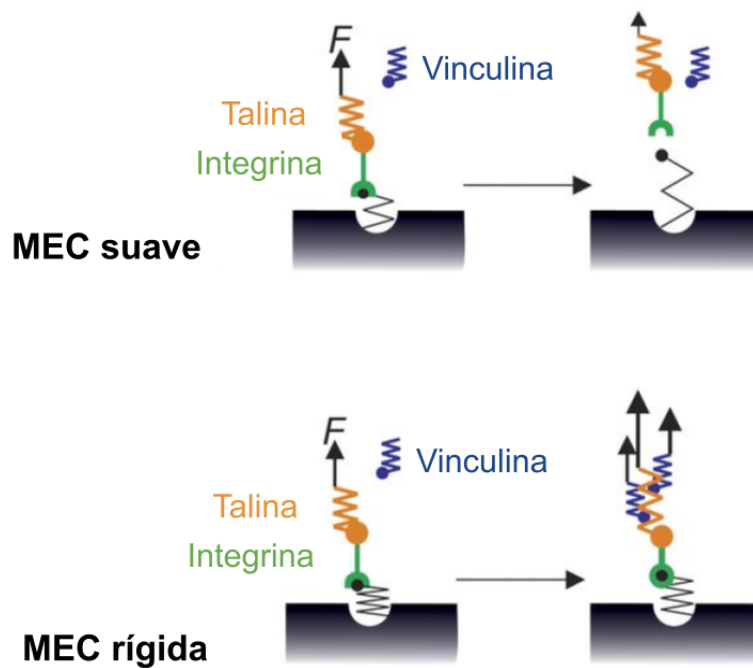


Figura 4. Respuesta mecánica producida por el modelo de clutch. En sustratos suaves la carga mecánica generada por la contractilidad celular (F) no induce el desplegamiento de talina, por lo cual vinculina no se une a talina y eventualmente se produce la ruptura de unión entre las integrinas con el sustrato. En cambio, en sustratos rígidos, la alta carga mecánica induce el desplegamiento de talina, exponiendo su VBS y por ende la unión de talina. Esto fortalece la unión de entre integrinas con el sustrato y la transmisión de fuerzas (imagen modificada de Sun *et al.*, 2016).

1.2.5 Efectores mecanosensibles

A través de la formación de AF las células son capaces de organizar su citoesqueleto para responder a propiedades físicas de su microambiente. Las AF inducen la polimerización de los filamentos de actina y la formación de fibras de estrés o actomiosina, que son haces de fibras de actina asociadas con la proteína miosina tipo II, y lo hace por medio de la activación de la GTPasa RhoA. Esta proteína actúa por dos vías, por un lado favorece la formación del citoesqueleto de actina al activar a la formina mDia. Por otro lado, RhoA activa a la cinasa ROCK (*Rho-associated protein kinase*, por su siglas en inglés) que a su vez activa a la miosina tipo II, indispensable para la formación de fibras de estrés y la transmisión de fuerzas tensiles. Además, ROCK activa a la cinasa LIM, la cual fosforila a la

proteína cofilina e inhibe su unión con los filamentos de actina y así evita su efecto en la despolimerización del citoesqueleto de actina [64,65]

La formación de fibras de estrés afecta la localización nuclear de los cofactores transcripcionales responsivos a estímulos mecánicos MRTFA (*Myocardin related transcriptional factor A*, por sus siglas en inglés) y YAP/TAZ (*Yes associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*, por sus siglas en inglés). También conectan mecánicamente a la MEC e integrinas con el núcleo a través del complejo enlazador del núcleoesqueleto y citoesqueleto (complejo LINC) que tiene una implicación muy importante en la transmisión de la fuerza desde la MEC hasta el núcleo. Esta conexión induce cambios en el tamaño del poro nuclear, lo cual favorece la translocación nuclear de YAP/TAZ; el remodelamiento de la cromatina; y cambios en el despliegue, fosforilación y accesibilidad de proteínas nucleares. En conjunto, todos estos cambios modulan la organización y expresión del genoma inducido por la transmisión de fuerzas [10].

Los cofactores transcripcionales YAP/TAZ no presentan el dominio de unión al DNA, sin embargo, pueden controlar la expresión génica a través de unirse al factor transcripcional TEAD. De forma general, se les ha asociado con la proliferación celular, supervivencia, el mantenimiento del destino de células troncales durante la diferenciación celular, regeneración del tejido y regulación del tamaño de órganos [63,66]. La activación de ambos cofactores está asociado con la vía de señalización Hippo. Cuando esta vía está encendida, entonces las cinasas MST1/2 (*Mammalian sterile 20-like kinase 1/2*, por sus siglas en inglés) fosforilan a las cinasas LATS 1/2 (*Large tumor suppressor kinase 1/2*, por sus siglas en inglés), que a su vez fosforilan a las proteínas YAP/TAZ y evitan su translocación al núcleo. La inhibición de YAP/TAZ inducen su acumulación en el citoplasma al ser secuestrada por la proteína 14-3-3 o promueven su degradación por el proteosoma. Cuando la vía Hippo está inactiva, entonces YAP/TAZ no se encuentran fosforilados y por ende pueden translocar al núcleo, donde favorece la transcripción de genes blanco [63].

YAP/TAZ han sido ampliamente estudiados como efectores mecanosensibles ya que en condiciones de rigidez controlada se ha visto un incremento de YAP/TAZ nuclear

en un sustrato rígido (40 kPa) en comparación con un suave (0.7 kPa), así como una mayor transcripción de sus genes blanco, como *ctgf* y *ankrd1*. De igual forma, la geometría celular dada por el esparcimiento celular regula la actividad de ambos cofactores transcripcionales, de modo que en células esparcidas existe una mayor proporción nuclear de YAP/TAZ, mientras que en células confinadas y con menor esparcimiento, los cofactores se ubican predominantemente en el citoplasma. Además, la actividad nuclear de ambos cofactores depende de la activación de RhoA y la formación de fibras de estrés [67]. En un modelo de fibrosis cardiaca provocada por infarto al miocardio, Niu *et al.* demostraron un incremento en la expresión del GPCR AT1R (*angiotensin type 1 receptor*, por sus siglas en inglés), α -SMA y YAP nuclear en comparación con fibroblastos provenientes de ratones sin afectación cardiaca. Además, la inducción del fenotipo de miofibroblastos por la rigidez del sustrato está relacionada con la activación de AT1R, que a su vez induce la translocación de YAP al núcleo y produce fibrosis [68].

Los cambios producidos a partir de estímulos mecánicos regulan las actividad de YAP/TAZ por varios mecanismos, además de la deformación nuclear. La formación de AF y fibras de estrés incrementan la activación de las cinasas FAK (*focal adhesion kinase*, por sus siglas en inglés) y SRC que regulan la vía de señalización de Hippo. Por un lado, FAK promueve la asociación entre YAP con la fosfatasa 1A (PP1A), lo cual remueve la fosforilación inhibitoria de YAP en la serina 397. Por otro lado, tanto FAK como SRC fosforila directamente a YAP en residuos que parecen estimular la unión entre YAP con TEAD y por ende favorece la transcripción de genes blanco de este complejo. Además, en células endoteliales de mama, se vio que la activación de FAK y SRC inhiben a LATS 1/2 a través de la acción de las cinasas PI3K y PDK1 [66].

Por otro lado, MRTFA también ha sido asociado como un cofactor transcripcional responsivo de estímulos mecánicos y está asociado con funciones celulares como el crecimiento celular, la apoptosis, migración, adhesión y diferenciación celular [69]. MRTFA se encuentra unido a los monómeros de actina (también llamados G-actina) en el citoplasma, lo que impide la polimerización de filamentos de actina y su translocación al núcleo. Como ya se mencionó anteriormente, cuando la célula se ve

sometida a esfuerzos mecánicos, se ve promovida la polimerización de actina y la contracción de actina al formar fibras de estrés a través de RhoA y ROCK. Estos cambios inducen la liberación de MRTFA de su unión con G-actina, permitiendo su translocación al núcleo y su unión al factor transcripcional SRF (factor de respuesta al suero) [70]. La translocación nuclear de MRTFA se mantiene únicamente mientras las células experimentan esfuerzos mecánicos, pero cuando la fuerzas externas e internas llegan a un equilibrio, entonces la localización de MRTFA es predominantemente en el citoplasma [69]. Huang *et al.* demostraron que la diferenciación hacia miofibroblastos y el desarrollo de fibrosis está asociado con cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina y la translocación de MRTFA al núcleo. El aumento en la rigidez de la MEC favorece la asociación de monómeros de actina para formar filamentos por la vía de señalización RhoA-ROCK. El incremento en la polimerización de filamentos de actina, favorece que MRTFA entre al núcleo, se una a SRF y favorezca la transcripción del gen α -SMA [39].

Como se ha mencionado, se ha comprobado y aceptado la participación del citoesqueleto de actina como transmisor de esfuerzos mecánicos del exterior al interior de la célula y viceversa, lo cual favorece la mecanotransducción y la respuesta celular ante estímulos físicos. Sin embargo, los filamentos de actina no son los únicos componentes del citoesqueleto celular, por lo cual se ha planteado la posibilidad de que los microtúbulos y los filamentos intermedios también participen en la mecanotransducción. Aunque los microtúbulos son importantes en la generación de fuerzas internas en la célula que controlan la alineación y segregación de los cromosomas durante la mitosis [71]; participan en el recambio de las AF durante la migración celular; y al mismo tiempo favorecen la maduración de AF al incrementar la fuerza de tracción durante su despolimerización [3], aún se desconoce qué tanto y cómo participan ante fuerzas mecánicas externas.

Por otro lado, los filamentos intermedios son uno de los componentes del citoesqueleto que han comenzado a ser estudiados como posibles efectores mecanosensibles dadas sus características físicas, la interacción directa con proteínas de las AF, su reorganización en el estado de ensamblado dado por el

grado de elasticidad del sustrato, su importancia para mantener la integridad nuclear y su participación durante la migración celular.

1.3 Características de los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios (FI) son unos de los tres componentes del citoesqueleto que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas [72]. Forman homopolímeros o heteropolímeros con un diámetro de 10 nm y se extienden a lo largo del citoplasma, conectando la membrana celular con organelos intracelulares como el núcleo. Las proteínas que forman los FI se clasifican en 6 familias y se codifican por 70 genes diferentes [73]. La familia I y II se compone de queratinas; la familia III incluye vimentina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y periferina; la familia IV se compone de neurofilamentos (NF), α -internexina y nestina; la familia V se forma de láminas; y la familia VI presenta filensina y faquinina. Dependiendo del tipo celular se expresa una u otra proteína de los FI, excepto las láminas, cuya expresión es ubicua y se localiza en el núcleo celular (**Tabla 1**) [74]. Además, la expresión de algunas proteínas de FI es regulada durante el desarrollo embrionario y diferenciación celular [75]. Por ejemplo, vimentina es una proteína expresada normalmente en células mesenquimales, sin embargo, se ha registrado un incremento en su expresión en cánceres epiteliales y es usado como un marcador de la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) [76].

De forma general, la estructura de las proteínas de los FI se conforma por el dominio de la cabeza (extremo N-terminal), un dominio central *ROD* y el dominio de la cola (extremo C-terminal). Los dominios de la cabeza y cola son los que más varían entre las diferentes proteínas, sin embargo, el dominio *ROD* es un dominio de alfa hélice y es el más conservado, responsable del ensamblado lateral de los FI [74]. En el caso de vimentina, el dominio ROD está compuesto a su vez por 4 estructuras secundarias de alfa hélices, llamados 1A, 1B, 2A y 2B, las cuales se encuentran unidas por estructuras denominados L1, L12 y L2 [72,77].

Tabla 1. Clasificación de los filamentos intermedios y su localización

Clasificación	Proteínas	Tipo celular
Familia I	Queratinas ácidas (K9-K20)	Células epiteliales
Familia II	Queratinas básicas y neutras (K1-K8)	Células epiteliales
Familia III	Vimentina Desmina GFAP Periferina	Células mesenquimales Células musculares Astrocitos Neuronas periféricas
Familia IV	NF-L, NF-M, NF-H α -Internexina Nestina	Neuronas Células troncales neurales
Familia V	Laminas A,C,B1,B2	Núcleo celular
Familia VI	Filensina Faquinina	Células del cristalino

La unión de dos proteínas de FI forma un dímero, cuyos extremos N-terminal de ambas proteínas están orientadas en la misma dirección. Por lo general, las queratinas pueden formar heterodímeros, mientras que las demás proteínas forman homodímeros. Posteriormente, se asocian dos dímeros de forma antiparalela, es decir, los extremos N-terminal de un dímero quedan orientados hacia los extremos

C-terminal del otro dímero. Esta asociación forma un tetrámero que carece de polaridad. Los tetrámeros se asocian lateralmente para formar un octámero de tetrámeros (ocho tetrámeros) que corresponde a los filamentos de longitud unitaria (ULFs, por sus siglas en inglés). Los ULFs tienen un tamaño aproximado de 60-80 nm con un diámetro de 16 nm, que al unirse con otros ULFs sufren una compactación radial y presentan un diámetro de 10 nm (**Figura 5**) [72]. El ensamblado de los FI no es dependiente de la unión con moléculas de ATP o GTP como es el caso de los filamentos de actina y los microtúbulos, respectivamente. Se ha propuesto que su estado de ensamblado depende de modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) como la fosforilación [74], lo cual podría explicar por qué en modelos *in vitro* los FI son muy estables y parecen no sufrir despolimerizaciones con el tiempo; mientras que en modelos *in vivo* se ha observado que son altamente dinámicos y están en constante variación de un estado polimerizado-despolimerizado [78].

Los FI participan en la localización y organización de organelos como la mitocondria, el aparato de Golgi (AG), vesículas, lisosomas, melanosomas, centrosomas, ribosomas y gotas lipídicas [79,80], cuya alteración puede inducir o predisponer el desarrollo de enfermedades. De acuerdo con la base de datos *Human Intermediate Filaments* y su última actualización en 2019, las mutaciones de FI se han relacionado con 119 enfermedades humanas, entre las cuales se incluyen enfermedades de la piel como epidermólisis bullosa; distrofias musculares como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; esclerosis lateral amiotrófica; enfermedades del hígado; pancreatitis, entre otras [81]. Por ejemplo, la mutación de los NF-L que afecta su ensamblado, perturba el transporte axonal de las mitocondrias e induce su acumulación en el cuerpo de la neurona. Este cambio en la localización de las mitocondrias produce un deterioro en el suministro de energía en las zonas más distales de los axones y causa la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth caracterizada por la degeneración de axones periféricos largos [79].

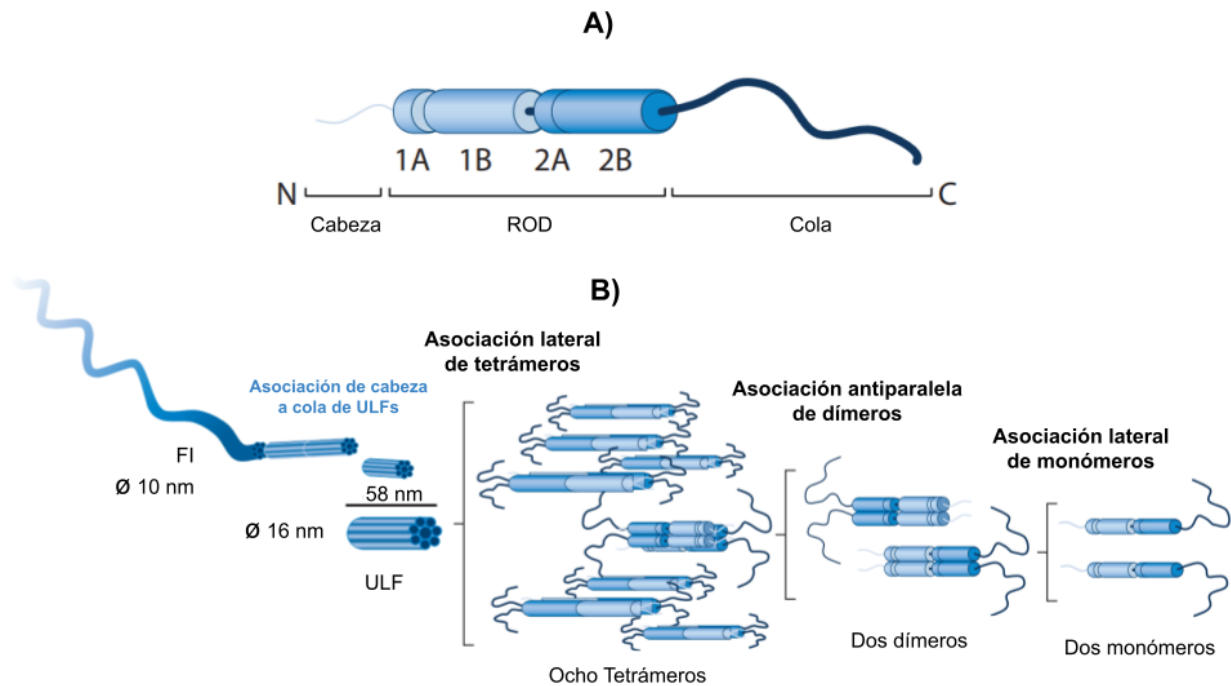


Figura 5. Estructura y ensamblado de FI. **A)** Las proteínas de la familia I-V presentan tres dominios principales, el dominio de la cabeza, el dominio central ROD y el dominio de la cola. **B)** El ensamblado de los FI inicia con la asociación lateral de dos monómeros (lado derecho de la imagen) formando un dímero. La asociación antiparalela de dos dímeros forma un tetrámero, el cual se asocia con ocho tetrámeros y forman un ULF con un diámetro de 16 nm y una longitud de 58-80 nm. Los ULFs se asocian unos con otros, sufren una compactación radial y construyen a los FI con un diámetro de 10 nm (Imagen modificada de Etienne, 2018).

1.3.1 Propiedades físicas de los FI de vimentina

Particularmente, los FI de vimentina han comenzado a ser estudiados como componentes importantes en la mecanotransducción debido a su localización en células mesenquimales como fibroblastos, células endoteliales y células estromales multipotentes. Este tipo de células se encuentran sujetas constantemente a fuerzas de tracción, compresión y estrés cortante (*shear stress*) que acompañan a la motilidad celular, o el esfuerzo cortante generado por la sangre o el flujo de aire [82]. Por lo cual, se cree que los FI de vimentina le dan resistencia mecánica a la célula.

En 1991, Janmey *et al.* caracterizaron las propiedades viscoelásticas de los tres sistemas del citoesqueleto y concluyeron que los FI de vimentina se deforman fácilmente con la aplicación de esfuerzos menores, en comparación con los filamentos de actina y microtúbulos, sin perder sus propiedades elásticas. Es muy probable que la flexibilidad de los FI de vimentina le permite a la célula mantener su integridad, favoreciendo una deformación moderada sin producir un citoplasma demasiado rígido o quebradizo [83]. Posteriormente Qin y colaboradores (2009) proponen que la flexibilidad de los FI de vimentina se extiende hasta el 300% de su tamaño inicial [77]. Por otro lado, los filamentos de actina muestran la mayor resistencia a deformarse cuando se le aplica un esfuerzo, hasta llegar a un punto crítico donde hay ruptura de los filamentos y se pierden sus propiedades elásticas, llegando a estirarse tan solo el 20%, aproximadamente. Por lo cual, Janmey y colaboradores (1991) han sugerido que los filamentos de actina se ubican en la corteza celular, donde se aplica el mayor esfuerzo proveniente del ambiente celular y le permite a la célula soportar estas fuerzas físicas. Finalmente, consideran que la alta rigidez de los microtúbulos, en comparación con los otros dos filamentos, ayudan a estabilizar la red del citoesqueleto, más que a las propiedades viscoelásticas de la célula [83].

Además, se ha calculado la longitud de persistencia (l_p) de los tres componentes del citoesqueleto, magnitud que indica la rigidez a la flexión de un polímero. Los FI de vimentina tienen una l_p entre 0.4-2 μm , lo cual los hace el filamento más flexible del citoesqueleto. Los filamentos de actina tienen una l_p de 18 μm , considerado un polímero semi-flexible; mientras que los microtúbulos son considerados rígidos por su l_p entre 1000-5000 μm [84].

La alta flexibilidad de los FI de vimentina es explicado a través del análisis nanomecánico propuesto por Qin *et al.*, 2009 en el cual plantean que cada nivel de ensamblado aporta mecanismos de deformación específicos que le permite a los FI soportar deformaciones extremas. En su modelo, proponen que la formación de enlaces de hidrógeno entre aminoácidos proporciona la máxima resistencia mecánica a un costo mínimo y favorece la formación de estructuras secundarias de alfa hélice. Ésto permite que la proteína pueda estirarse 150% su tamaño original a

través de la ruptura de los giros alfa helicoidales. Posteriormente, con la generación de dímeros se forma el dominio coiled-coil (interacción de dos alfa hélices), el cual proporciona una mayor resistencia e incrementa la capacidad de deformabilidad mayor del 150%. Los dímeros de vimentina al someterse a fuerzas de tracción, rompen sus enlaces de hidrógeno que forman las alfa hélices y en su lugar se forman hojas beta plegadas, las cuales son altamente resistentes a fuerzas de tracción. Al formarse los tetrámeros, existe una región en la cual se sobrelapan los dímeros, la cual comienza a deslizarse al incrementar la fuerza de tracción arriba de un porcentaje de 170 el tamaño original de la proteína, lo cual junto con la transición de alfa hélice a hoja beta plegada, permite a los FI soportar una deformación del 300% su tamaño original sin fallas catastróficas [77].

También, se ha observado que la ausencia de los FI de vimentina induce una disminución en la rigidez celular en comparación con las células control que sí expresan vimentina. Este resultado se corroboró con la interrupción selectiva de los FI de vimentina al administrar 4 mM de acrilamida, lo cual ocasionó una disminución en la rigidez celular de fibroblastos y células endoteliales [85]. De igual forma, la sobreexpresión de vimentina en la línea celular de cáncer de mama MCF7 indujo un incremento en la rigidez celular, la cual se midió a través de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) [86].

1.3.2 Modificaciones Postraduccionales de Vimentina

Fosforilación

Previo a los trabajos realizados por el grupo de investigación de Inagaki, se había demostrado que la vimentina puede estar en estado fosforilado, sin embargo, poco se sabía sobre su efecto en el ensamblado de los FI. Con la investigación *in vitro* realizada por Inagaki y colaboradores, se demostró que la fosforilación de los FI de vimentina por la proteína cinasa A (PKA) o la proteína cinasa C (PKC) inducía el desensamble de los FI [87]. De forma general, se ha visto que la fosforilación de residuos de serina/treonina en el dominio de la cabeza de las proteínas de FI son

importantes para su estado de ensamblado [88]. Esto se debe a la composición alta de residuos básicos que están cargados positivamente en el dominio de la cabeza que, al ser fosforilado, se genera un cambio en su carga y favorece el desensamblado de FI e incrementa su solubilidad [74]. Además, la fosforilación de los FI también se ha asociado con el intercambio de subunidades, lo que implica que una subunidad de FI puede incorporarse en cualquier lugar a lo largo de las redes de FI [89].

El efecto de la fosforilación de vimentina se relaciona con la reorganización de los FI durante la mitosis, donde hay una hiperfosforilación de vimentina (**Tabla 2**) [90]. A partir de estas observaciones, se identificaron a las cinasas Cdk1, ROCK, CaMKII, PKC, Aurora-B y Plk1 como importantes reguladoras de vimentina durante las diferentes etapas de la mitosis [91–96]. Particularmente, la fosforilación por ROCK, PKC y Aurora-B son esenciales para la correcta segregación de los FI durante la citocinesis. Al inhibir la fosforilación realizada por estas cinasas se observa la formación de un puente formado de FI entre las células hijas, indicativo de una división celular incompleta [91,92]. Plk1 es una cinasa que también se ha visto asociada a vimentina durante la metafase y hasta el término de la mitosis, participando en la segregación de FI durante la citocinesis en coordinación con ROCK y Aurora B. Se ha visto que la fosforilación de vimentina por Plk1 está regulada por la previa fosforilación de la ser55 inducida por Cdk1[96].

La fosforilación de vimentina por PKC ϵ también está relacionada con el tráfico vesicular de las integrinas hacia la membrana plasmática, las cuales son importantes para la adherencia y motilidad celular [97]. Además, se ha visto un incremento en el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo de sarcoma de tejido suave cuando vimentina es fosforilada por AKT1 (también llamado PKB). Esta fosforilación en particular, parece proteger a vimentina de la degradación por caspasas [98].

Tabla 2. Fosforilación de vimentina *in vivo*.

Cinasa	Residuo fosforilado	Efecto	Referencia
PKC	Ser-4,6,7,8,9	-Regula el transporte endocítico de la integrina $\beta 1$ y la motilidad celular	[97,99]
	Ser-33		[100]
	Ser-50	-Induce el desensamble de los FI	[101]
	Ser-6,33,38,50	-Reorganización de FI durante la mitosis	[91]
PKA	Ser-38,71,72	Induce el desensamble de FI	[99]
ROCK	Ser-71, 38	-Pérdida de la habilidad para formar FI (<i>in vitro</i>) -Reorganización de FI durante la mitosis en etapas tardías	[95]
Cdk1	Ser-55	-Induce el desensamble de FI -Reorganización de FI durante la mitosis en etapas tempranas	[94,99,102]
CaMKII	Ser-82		[100]
	Ser-38	Reorganización de FI	[91]
Aurora B	Ser-72	-Controla la segregación de FI durante la citocinesis -Inhibe la formación de FI (<i>in vitro</i>)	[92]
PAK1	Ser-55 (Ser-56)	-Reorganización de FI	[103]

		-Induce el desensamble de FI	
Plk1	Ser-82	-Controla la segregación de FI durante la citocinesis	[96]
AKT1	Ser-38 (Ser-39)	-Incrementa el crecimiento del tumor y la metástasis -Protege a vimentina de la degradación por caspasas	[96,98]

Sin embargo, no todas las fosforilaciones de vimentina inducen la despolimerización de FI. En condiciones *in vitro*, se ha detectado la fosforilación de vimentina en los residuos Ser-38, Ser-50, Ser-55, Ser-82 por la proteína cinasa 2 activada por MAPK (MAPKAP-K2), lo cual no induce la pérdida de vimentina para formar filamentos, en contraste con otras cinasas [104]. Además, la fosforilación en conjunto con la desfosforilación de vimentina actúa para mantener el equilibrio en la organización de los filamentos. Se ha visto que la inhibición de fosfatasas, como PP2A, induce un estado hiperfosforilado de vimentina y ocasiona el desensamblado de FI [105]. En la **Figura 6** se muestran los sitios de fosforilación, así como las cinasas responsables de dicha MPT en vimentina.

Sumoilación

La sumoilación es una modificación que consiste en la unión covalente y reversible de una proteína pequeña llamada SUMO (modificador pequeño similar a la ubiquitina) a los residuos de lisina de una proteína blanco. Generalmente se ha descrito a la sumoilación en proteínas nucleares, como las láminas nucleares [89]. Sin embargo, la sumoilación también se ha observado en otros FI como vimentina en un modelo *in vitro* [106] y recientemente, se ha identificado a PIAS1, una ligasa

SUMO de tipo E3, como la responsable de la sumoilación de vimentina en los residuos de Lys-439 y Lys-445. La sumoilación de vimentina parece ser necesaria en el desensamblado de vimentina y favorece la migración en células cancerosas HeLa [107]. Aunque no se sabe mucho sobre los efectos biológicos que tiene la sumoilación de vimentina, es importante destacar este tipo de MPT como un regulador de la localización de las proteínas blanco mediante la alteración de interacciones entre proteínas [108].

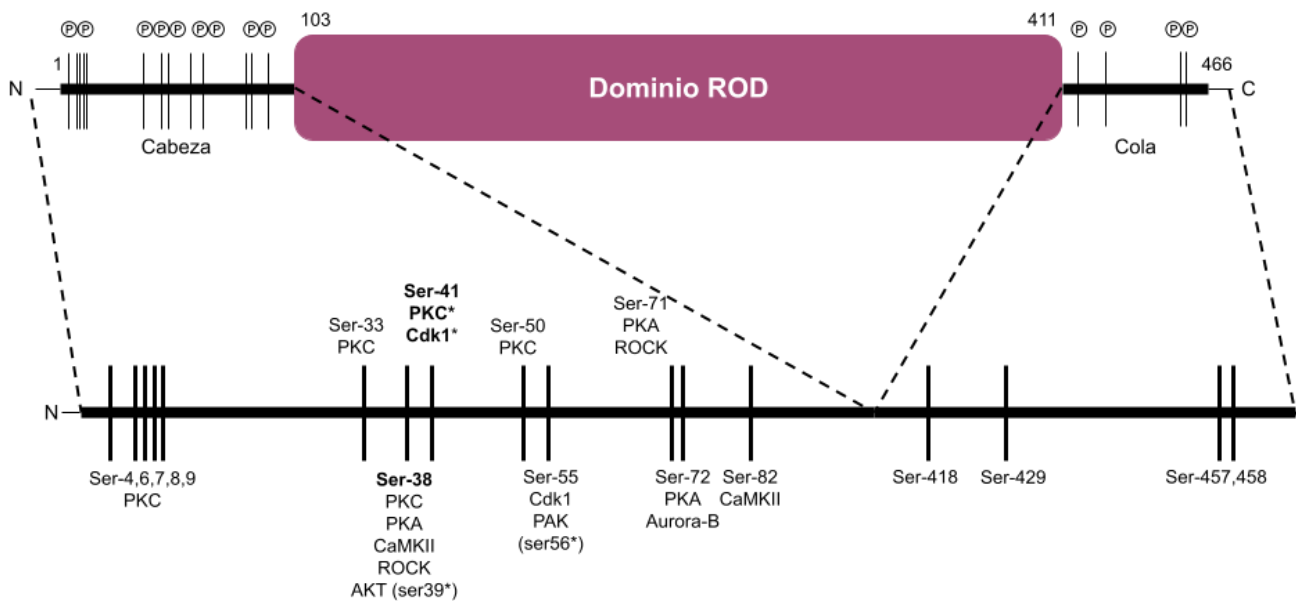


Figura 6. Mapa de los sitios de fosforilación de vimentina observados *in vivo* y sus respectivas cinasas (basado en la publicación de Eriksson *et al.*, 2004 y la tabla 2). La Ser-41 se encuentra fosforilada *in vivo*, sin embargo, solo se ha detectado fosforilada por PKC y Cdk1 *in vitro*. Se ha tomado a la Ser-39 y Ser-56 como similares a Ser-38 y 55, respectivamente. Los aminoácidos del dominio de la cola de vimentina (Ser-418, Ser-429, Ser-457, Ser-458) se han reportado como sitios de fosforilación *in vivo*, pero no se conocen las cinasas responsables.

Glicosilación

La glicosilación implica la adición de la molécula N-acetilglucosamina (GlcNAc) a los residuos de serina y treonina de las proteínas mediante la acción de la enzima N-acetilglucosamina transferasa, mientras que la eliminación del azúcar es catalizado por la enzima N-acetilglucosaminidasa. Vimentina es uno de los FI que se

han descrito como sustrato de la glicosilación en los residuos de Ser-55, Ser-7, Ser-33 y Ser-34 [109,110]. Esta MPT se ha observado durante la mitosis y parece formar un complejo regulatorio junto con las fosforilaciones para permitir la segregación correcta de FI al finalizar la citocinesis [111].

Glicación, S-glutationilación y ADP-ribosilación

Otras MPT descritas para vimentina es la glicación, en la cual se forman productos finales de la glicación avanzada (AGEs) como resultado de la reacción producida por un azúcar reductor y un grupo amino. La glicación se observó en los residuos de lys presentes en la región L1 y L12, lo cual indujo la redistribución de vimentina hacia la zona perinuclear en forma de agregados y una pérdida de la capacidad contráctil de los fibroblastos de piel humana [112]. Por otro lado, la S-glutationilación se da al añadir el grupo glutatión a un residuo de Cys, a través de su grupo funcional tiol (SH). Se ha descrito al residuo Cys-328 como el responsable de S-glutationilación de vimentina, lo cual bloquea el ensamblado longitudinal de los ULFs para formar los FI extendidos e induce la fragmentación de los filamentos preformados [78]. Finalmente, la producción de la enzima SpyA (una ADP-ribosiltransferasa) por la bacteria *Streptococcus pyogenes*, induce la ADP-ribosilación de vimentina en los residuos de Arg-44 y Arg-49 e inhibe la formación de FI *in vitro*. Además, en células HeLa induce el colapso del citoesqueleto de vimentina [113].

2. ANTECEDENTES

La respuesta de las células a esfuerzos mecánicos ha sido estudiada principalmente desde el enfoque de la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación del sistema de actomiosina, lo cual induce la generación de fuerzas tensiles en el interior de la célula. Además, la directa interacción entre los mecanorreceptores de las integrinas con los filamentos de actina, a través de la formación de AF, favorece una respuesta rápida ante estímulos mecánicos. Sin embargo, actualmente se reconoce que, además de los filamentos de actina, los FI de vimentina juegan un papel importante en la mecánica interna de las células y en la respuesta inducida por esfuerzos mecánicos externos.

En el estudio realizado por Guo *et al.* en 2013, se estudió si la rigidez de la corteza y el citoplasma variaba dependiendo de la expresión o ausencia de vimentina en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés). La rigidez del citoplasma fue medida con la técnica de pinzas ópticas sobre partículas de poliestireno, las cuales fueron endocitados previamente por las células. Se observó que la presencia de los FI de vimentina incrementa dos veces la rigidez del citoplasma en comparación con los MEFs sin vimentina, obteniendo valores de 10 Pa y 5 Pa, respectivamente. Por otro lado, la rigidez de la corteza celular se midió con citometría de torsión magnética óptica (OMTC, por sus siglas en inglés) y no se observó diferencia significativa entre los MEFs con y sin vimentina. Esto sugiere la importancia que tienen los FI en la mecánica del citoplasma, mientras que la corteza está dominada principalmente por la densa red de filamentos de actina y su asociación con miosina [114].

Además, en el trabajo realizado por Mendez & Janmey en 2014, se determinó la contribución de vimentina en el mantenimiento de las propiedades mecánicas de las células. Para lo cual, se utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) que aplicó un esfuerzo repetitivo a través de la indentación constante a 2 Hz durante 10 minutos en los MEFs con y sin la expresión de vimentina. Posteriormente, se calculó el módulo elástico de Young y se observó que los MEFs que expresan vimentina presentaron una menor desviación estándar en el

módulo elástico en comparación con las células que no expresan vimentina. Es decir, la expresión de vimentina parece tener un papel importante en mantener constante la propiedad mecánica de rigidez en los fibroblastos [82].

Por otro lado, se ha visto que la expresión de vimentina es importante en mantener la integridad y proteger contra el daño nuclear cuando las células se ven sometidas a deformaciones mecánicas, como puede ser en procesos de migración celular durante la cicatrización de herida o en la metástasis. [115]. Si las células migran a través de espacios confinados, se pueden formar burbujas nucleares (*nuclear blebs*), lo cual puede inducir la ruptura de la envoltura nuclear y daño en el DNA [116]. En el 2019, Patteson *et al.* observaron que los MEFs que no expresan vimentina presentan un mayor porcentaje de migración a través de membranas Transwell en comparación con los fibroblastos que expresan vimentina. Durante el proceso de migración, se midió la relación de aspecto del núcleo y se encontró que los MEFs sin vimentina presentaron núcleos más alargados y, por tanto, una mayor deformación de éste después de haber atravesado los poros de la membrana; así como un incremento en la formación de burbujas nucleares. También, se observó un incremento en la muerte por necrosis celular en MEFs sin la expresión de vimentina, en comparación con el control, cuando éstos fueron sometidos a compresión mecánica en un cultivo 3D [117]. Estos hallazgos son importantes ya que podría explicar la importancia de la expresión de vimentina durante la EMT en células que presentan un fenotipo migratorio y que posteriormente se mueven hacia otros órganos, como las células tumorales.

Ante la evidencia del papel de vimentina en las propiedades mecánicas internas de las células, Murray *et al.* en 2014, estudiaron la influencia de la rigidez del sustrato en el estado de ensamblaje de los FI de vimentina. En dicho artículo trabajaron con las células troncales mesenquimales humanas (hMSC), células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC, por sus siglas en inglés) y la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón NIH-3T3, todas de origen mesenquimal que expresan vimentina. Los autores reportaron un comportamiento bifásico, en donde a sustratos suaves (0.1 kPa) y rígidos (30 kPa y en plástico) existe un bajo porcentaje de FI solubles en detergente, lo que corresponde a tetrámeros o pequeños

oligómeros de vimentina. Sin embargo, a una rigidez intermedia de 1 kPa y 5 kPa se incrementó la solubilidad de FI [118]. Con estos resultados, podemos interpretar que las condiciones mecánicas del exterior de las células influyen en la organización interna de los FI de vimentina, lo cual podría estar generado por nuevas interacciones proteicas con vimentina (modificaciones postraduccionales) o bien, podría inducirlas.

Hasta la fecha se han registrado diferentes proteínas que se asocian con vimentina (**Tabla 3**), aunque ninguna estudiada bajo condiciones controladas de la rigidez del sustrato. Entre las interacciones reportadas se encuentra la integrina $\beta 1$, cuya unión está mediada por el residuo de Ser38 de vimentina. Dicha interacción favorece la unión de la integrina con su ligando de fibronectina y la migración celular [119]. También se ha asociado a vimentina con la integrina $\beta 3$, favoreciendo la migración y metástasis en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) [120].

Por otro lado, se ha visto la interacción de vimentina con los filamentos de actina, ya sea de forma directa o a través de la proteína plectina. La unión directa ha sido descrita mediante ensayos *in vitro*, en donde se estimuló el ensamblaje de los filamentos de actina y vimentina, observando la formación de filamentos con ambas proteínas en una proporción 3:1 de vimentina y actina. Dichos filamentos fueron caracterizados a través de métodos de reometría, llegando a la conclusión de presentar una mayor rigidez y menor elasticidad que los filamentos de actina y vimentina por separado [121]. Por su parte, la interacción de vimentina y actina a través de plectina ha sido descrita en células primarias de cáncer de vejiga, específicamente en la región de invadopodios. La formación de este complejo proteico favorece la migración y metástasis al inducir la degradación de matrigel y la formación de invadopodios [122].

Una de las asociaciones proteicas de vimentina que está presente en la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1 diferenciados hacia adipocitos es el receptor activado de proliferación de peroxisomas (PPAR γ , por sus siglas en inglés). Dicha proteína es un factor transcripcional, lo cual implica que su principal actividad

está asociada con la regulación en la transcripción de genes en el núcleo de las células. Sin embargo, Tsai *et al.* en 2013 observaron que, a nivel citoplasmático, había una interacción de PPAR γ con vimentina, lo cual se asocia con la disminución de la tasa de degradación de PPAR γ . Esta asociación es importante debido a su posible importancia en la transcripción de genes blancos de este factor transcripcional [123].

Así mismo, en los fibroblastos 3T3-L1 se ha visto la asociación de vimentina con la aminopeptidasa sensible a la insulina (IRAP, por sus siglas en inglés). Dicha proteína está presente en las vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSV, por sus siglas en inglés), las cuales se translocan a la membrana plasmática en respuesta a los niveles de insulina. En el artículo publicado por Hirata *et al.* en 2011 observaron que el extremo amino de IRAP que se orienta hacia la región citoplasmática, se asocia con vimentina y favorece la translocación de las vesículas de almacenamiento a la región de la membrana plasmática, lo cual se ve afectado cuando se elimina la expresión de vimentina en las células [124].

Como ya se mencionó anteriormente, vimentina es una proteína que sufre modificaciones postraduccionales importantes que modifica su estado de ensamblado en FI. En el 2010 Zhu *et al.* reportaron la fosforilación de vimentina en su residuo de serina 39 por la cinasa AKT-1. Su estudio se basó en células de sarcomas de tejidos blandos derivados del mesénquima en donde se observó que esta interacción protege a vimentina de la proteólisis mediada por caspasas. De igual forma, la fosforilación de vimentina indujo un incremento en la motilidad e invasión celular, así como un aumento en el crecimiento de tumores y la metástasis en un modelo *in vivo* [98,124]. El estado de fosforilación de vimentina es importante en la interacción con otras proteínas, como se vio en el artículo de Tzivion *et al.* en 2000, donde la proteína vimentina fosforilada se asocia con la proteína 14-3-3 en la línea celular de fibroblastos de riñón de mono, COS7. Dicha asociación desplaza interacciones previas de 14-3-3 como lo es Raf-1, lo cual podría alterar la señalización celular. Por ejemplo, en la vía de señalización Hippo, se ha visto que 14-3-3 se asocia con los cofactores transcripcionales YAP/TAZ fosforilados, favoreciendo la retención de éstos en el citoplasma [63]. De tal forma que, la posible

unión de vimentina con 14-3-3 podría afectar la localización intracelular de YAP/TAZ y por ende su actividad en la regulación de genes.

Tabla 3. Interacciones proteicas de vimentina

Proteína Asociada	Modelo	Tipo de estudio	Respuesta biológica	Referencia
Integrina $\beta 1$ Ser38	Células CHO	Pull Down	Favorece la unión entre integrina $\alpha 5 \beta 1$ y su ligando (fibronectina) Favorece la migración celular en presencia de fibronectina.	[119]
Integrina $\beta 3$	Células CHO	Pull Down MS Inmunoblot	La interacción entre vimentina-integrina favorece la migración (ensayo transwell) y la metástasis (realizado en ratones)	[120]
Plectina	Cultivo primario de cáncer de vejiga	CoIP Co-localización	El complejo vimentina-plectina- F-actina en invadopodios favorece la migración y metástasis en células de cáncer de vejiga	[122]
Actina	-	Ensayo <i>in vitro</i> Reometría	-	[121]
AKT1	Sarcomas de tejidos blandos	IP MS CoIP	AKT1 fosforila a vimentina en serina 39 Inducir la motilidad e invasión	[98]

	derivados del mesénquima		Protege a vimentina de la proteólisis por caspasa Mejora el crecimiento de tumores y metástasis <i>in vivo</i>	
PPARγ Receptor y activado por proliferadores de peroxisomas	3T3-L1 diferenciadas a adipocitos	IP MS CoIP	La vimentina puede desempeñar un papel importante en la regulación de la tasa de degradación de la proteína PPAR γ después del tratamiento con su ligando.	[123]
14-3-3	Células COS7	Pull Down Co-IP	Asociación dependiente de vimentina fosforilada Desplaza la interacción de 14-3-3 con otras proteínas como Raf-1	[125]
IRAP Aminopeptidasa sensible a la insulina	3T3-L1	Pull Down	La unión de vimentina con IRAP parece retener la ubicación de GSV en la zona perinuclear y favorecer su translocación a la membrana plasmática	[124]

IP, inmunoprecipitación; CoIP, co-inmunoprecipitación; MS, espectrometría de masas; GSV, vesículas de almacenamiento de GLUT4

3. JUSTIFICACIÓN

Las propiedades mecánicas del microambiente celular son importantes fuentes de estímulos para inducir respuestas celulares con relevancia tanto a nivel fisiológico como patológico. Entre estas propiedades se encuentra la rigidez del sustrato, lo cual favorece un incremento en la contractilidad, proliferación y activa procesos de diferenciación celular. Siendo éste último muy importante, ya que dentro de los laboratorios de investigación generalmente se trabaja con cajas de cultivo estándar, hechos de poliestireno, las cuales presenta un sustrato para las células con un módulo elástico de Young no natural, calculado en el orden de los gigapascuales (GPa). Esto representa una dificultad en el estudio de procesos fisiológicos o en el mantenimiento fenotípico de células de diferentes órganos. Por lo cual establecer y trabajar en condiciones similares a las presentes en los tejidos (biomiméticas) favorece un incremento en la veracidad de los resultados.

La organización de los filamentos de actina es uno de los cambios más evidentes y estudiado en las células cuando son sometidas a diferentes estímulos mecánicos. Ante sustratos rígidos, se ha visto la formación de fibras de estrés en las células, relacionado con la transmisión de fuerzas tensiles al núcleo, acompañada de su deformación. Esto parece facilitar la entrada de factores transcripcionales al núcleo y por ende regular la transcripción de genes ante un estímulo físico. Esta transmisión y deformación del núcleo no depende únicamente de los filamentos de actina, se ha estudiado que los FI de vimentina participan activamente y son suficientes para transmitir esfuerzos al núcleo. Además, los FI son importantes componentes de soporte mecánico en la célula, porque son capaces de incrementar la rigidez de la célula y proteger al núcleo de fuerzas compresivas.

Sin embargo, poco se conoce sobre cómo los filamentos intermedios de vimentina participan en el proceso de mecanotransducción. Aunque se ha visto que la solubilidad y posiblemente su estado de ensamblado son sensibles a la rigidez del sustrato, no se conoce si estos cambios favorecen la interacción con otras proteínas, lo que permite activar una vía de señalización sensible a la mecánica. Por lo cual es importante identificar diferencias en las proteínas asociadas a los

filamentos intermedios de vimentina dependiendo la rigidez del sustrato, usando hidrogeles de poliacrilamida y un modelo celular sensible a estímulos mecánicos como los fibroblastos embrionarios de ratón.

4. HIPÓTESIS

Los filamentos intermedios de vimentina son componentes del citoesqueleto que participan en la respuesta de las células a los cambios mecánicos extracelulares, principalmente, por cambios en su ensamblaje. Por lo cual, se espera ver cambios en las proteínas asociadas a éstos en respuesta a sustratos con diferentes valores de rigidez.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

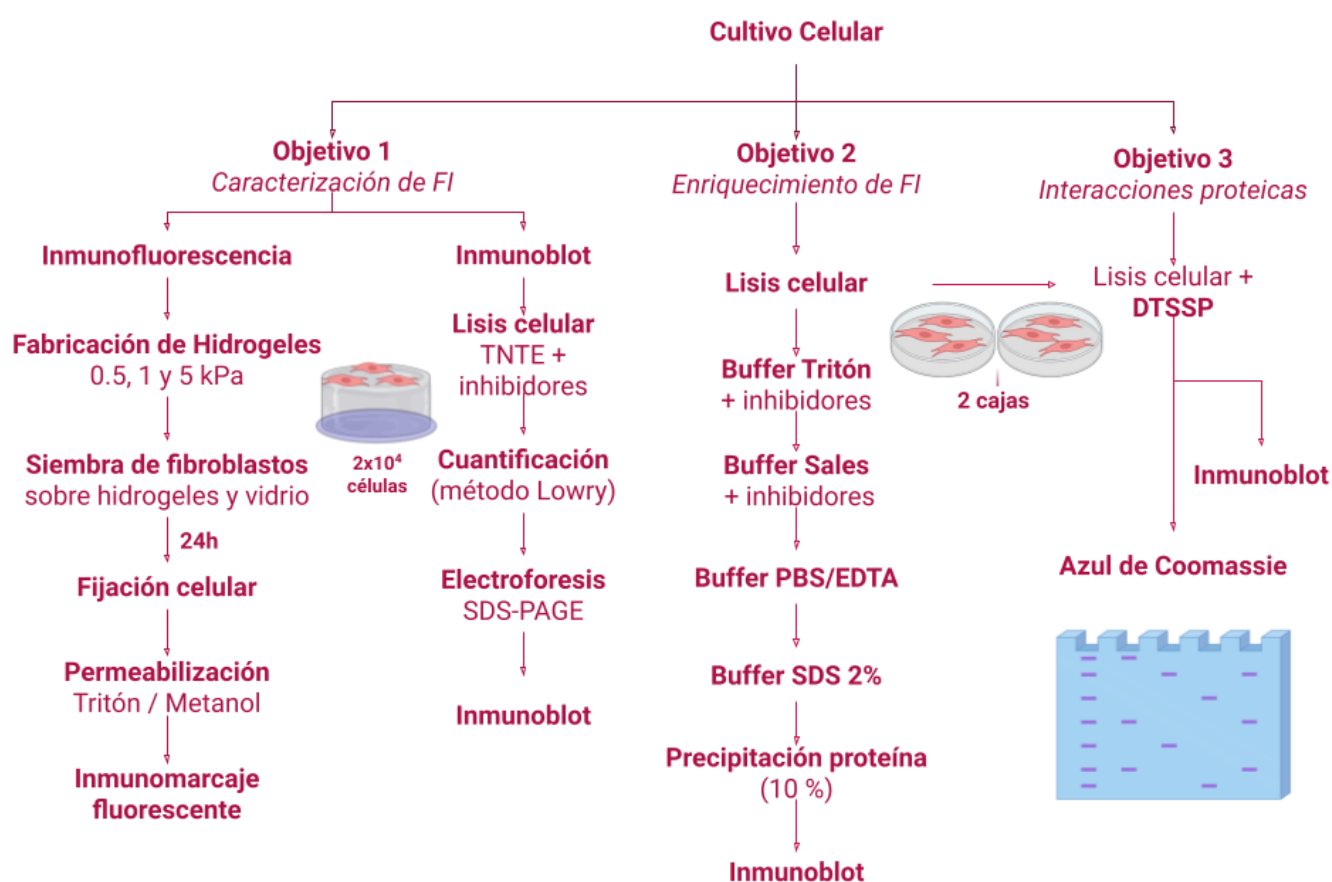
Caracterizar las proteínas asociadas a los filamentos intermedios de vimentina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida con diferentes condiciones de rigidez.

5.2 Objetivos Particulares

1. Caracterizar la expresión de vimentina en fibroblastos embrionarios de ratón en sustratos de hidrogeles de poliacrilamida suaves y rígidos mediante inmunofluorescencia.
2. Estandarizar el enriquecimiento de filamentos intermedios de vimentina en fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones de cultivo estándar.
3. Caracterizar las posibles interacciones proteicas con los filamentos intermedios de vimentina mediante el uso del entrecruzador proteico 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP), bajo condiciones de rigidez distinta.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

La elaboración del proyecto se logró a través del cultivo celular de MEFs, así como las líneas inmortalizadas BJ y los fibroblastos de ratón inmortalizados, 3T3-L1. Además, se implementaron las técnicas experimentales de inmunofluorescencia, electroforesis SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie e inmunoblot para detectar la expresión de los FI de vimentina y posibles proteínas asociadas a ellos. En el siguiente diagrama de flujo se resume la estrategia experimental:



6.1 Cultivo celular

Se utilizó el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) extraídos con 13.5 días de gestación, los cuales fueron donados por el Dr. Alejandro Cabrera Wrooman. Los fibroblastos fueron cultivados en cajas de poliestireno de 100 mm recubiertas con gelatina de piel porcina tipo A (Sigma-Aldrich, G2500) al 1% en

agua desionizada. La gelatina se disolvió y esterilizó usando un equipo de autoclave (121°C / 15 Psi / 15 minutos). El recubrimiento con gelatina se realizó una noche anterior a la siembra de fibroblastos, con un volumen de 5 mL y se dejó incubar a 37°C. Posteriormente, se desechó la gelatina y se procedió a sembrar las células. También se utilizaron las líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1 y los fibroblastos de piel humana BJ, ambas cultivadas sin recubrimiento.

Para el mantenimiento del cultivo celular de MEFs y BJ, se utilizó medio DMEM alto en glucosa (Gibco 12800-017); mientras que la línea celular 3T3-L1 se mantuvo en medio DMEM bajo en glucosa (Gibco, 31600-034). Ambos medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich F2442), 1% GlutaMax (Gibco 35050-061) y 1% de Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina (Gibco 15240-062). Para la resiembra celular se utilizó tripsina al 0.25% (Sigma-Aldrich T4799-25G). El cultivo se mantuvo en condiciones de cultivo estándar a 37°C, 5% de CO₂ y 99% de humedad.

6.2 Fabricación de hidrogeles de poliacrilamida

La caracterización de los filamentos intermedios dependiente de la rigidez del sustrato fue realizada a través de la elaboración de hidrogeles de poliacrilamida (HG de PAA) con una rigidez de 0.5 kPa, 1 kPa y 5 kPa. La fabricación de hidrogeles consta de varias etapas en las que se requiere limpiar la superficie del cubreobjeto; funcionalizar con el compuesto silano 3-metacrilato trimetoxisilil propilo (TMSPMA) para permitir la adhesión del vidrio con el hidrogel; la elaboración del hidrogel con una rigidez específica; el fotoentrecruzamiento con el compuesto sulfo-SANPAH para permitir la funcionalización del hidrogel con la proteína colágena tipo I y así favorecer la adhesión de las células al hidrogel.

6.2.1 Limpieza de cubreobjetos

Los cubreobjetos fueron lavados dentro del sonicador durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), dos veces con etanol al 96% y un lavado con agua

desionizada. La limpieza de los cubreobjetos permite eliminar partículas de polvo o grasa a través de vibraciones de alta frecuencia (40 KHz) y así, favorecer su funcionalización con TMSPMA; así como oxidar la superficie para favorecer la reacción del vidrio con el silano.

6.2.2 Funcionalización de cubreobjetos

Dentro de la campana de extracción se preparó una mezcla al 2% del silano TMSPMA (Sigma-Aldrich 440159) y de ácido acético glacial (Meyer 0040) al 1% , disuelto en etanol absoluto (Meyer 0390). Dicha mezcla se colocó en una caja Petri recubierta con parafilm junto con los cubreobjetos y se dejó incubar por 10 minutos en agitación a TA. Posteriormente, se sumergieron los cubreobjetos en etanol al 96% para realizar un lavado. Finalmente, se dejaron secar sobre una caja petri recubierta con parafilm dentro de la campana de extracción.

6.2.3 Fabricación de hidrogeles de poliacrilamida

Para la elaboración de hidrogeles se trabajó con las soluciones de acrilamida al 40% (Sigma-Aldrich A4058) y bis-acrilamida al 2% (Sigma-Aldrich M1533) previamente desgasificadas en el laboratorio con la finalidad de favorecer su polimerización quitando el oxígeno que agota los radicales libres indispensables para el proceso de polimerización. En la **Tabla 4**, se muestran las cantidades utilizadas de acrilamida, bis-acrilamida, agua desionizada, APS y TEMED para cada una de las rigideces utilizadas (0.5 kPa, 1 kPa y 5 kPa).

Una vez hecha la mezcla para la primera rigidez de 0.5 kPa, se mezcló con vortex y se colocaron 100 μ L de ésta sobre un portaobjetos silanizado con diclorodimetilsilano, que repele la acrilamida. Sobre la gota se colocó el cubreobjeto previamente funcionalizado con TMSPMA y se dejó polimerizar por 20 minutos. Se tomó el cubreobjetos con la ayuda de una pinza de relojero y se colocó en una caja de 12 pozos con agua desionizada. Se repitió el procedimiento con la rigidez de 1 kPa y 5 kPa.

Tabla 4. Elaboración de hidrogeles de PAA para inmunofluorescencia

	0.5 kPa	1 kPa	5 kPa
Acrilamida 40%	37.5 μ L	37.5 μ L	62.5 μ L
Bis-acrilamida 2%	15 μ L	25 μ L	37.5 μ L
Agua desionizada	443.5 μ L	437.5 μ L	450 μ L
APS	5 μ L		
TEMED	0.5 μ L		

* El volumen de cada reactivo está basado en la publicación de Tse J & Engler A., 2010. [126]

** Las cantidades mencionadas son para 500 μ L, es decir, 4 cubreobjetos por rigidez, considerando un exceso.

6.2.4 Entrecruzamiento con sulfo-SANPAH y recubrimiento con colágena

Los cubreobjetos con los hidrogeles fueron lavados por 5 minutos con HEPES (Gibco 15630-080) al 50 mM y pH 8.2. Posteriormente, se preparó una mezcla al 1 mM de sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoato (sulfo-SANPAH; Sigma 803332) en 75 % de HEPES (50 mM, pH 8.2) y 25% de DMSO (Sigma-Aldrich D8418). Se colocaron 100 μ L de la mezcla por cada cubreobjetos sobre una caja petri recubierta con parafilm y se colocó el hidrogel en contacto con la gota. Se expuso con luz ultravioleta (365 nm) durante 15 minutos. Este paso es importante para permitir que la proteína de adhesión se entrecruce al hidrogel, de lo contrario no se adherirá a éste.

Después de la incubación, se realizaron tres lavados en agitación con HEPES (50 mM pH 8.2), cada uno de 5 minutos. Finalmente, se dejó incubar los hidrogeles en una solución de colágena tipo I al 0.1 mg/mL en HEPES (50 mM, pH 8.2) durante toda la noche a 4°C.

6.3 Inmunofluorescencia

Para la caracterización de vimentina en el modelo de estudio MEFs, se realizó la técnica de marcaje por inmunofluorescencia. Las células fueron despegadas de un cultivo confluyente (confluencia aproximada del 80%) con tripsina al 0.25% y se contaron mediante el uso de la cámara de Neubauer. Se sembraron 20,000 células en cada cubreobjeto de 20 mm de diámetro (Velab), previamente esterilizados. En el caso de las células sembradas directamente en vidrio, la esterilización se realizó con 3 lavados de etanol estéril al 70%, seguido de 3 lavados con DPBS 1X estéril (D5652-10X1L). Posteriormente, los cubreobjetos fueron recubiertos con colágena tipo I (Corning, 354236) a una concentración 1 mg/mL. Por otro lado, los cubreobjetos con hidrogel de poliacrilamida (HG de PAA) de rigidez controlada, se esterilizaron con 3 lavados de DPBS estéril 1X suplementado con 1% de antibióticos estreptomicina y penicilina (Gibco, 15140-122).

Se dejaron adherir las células por 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se retiró el medio, se hicieron tres lavados con DPBS 1X previamente calentado a baño maría y se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, P6148-500G) a 37°C por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de fijación, se realizaron 3 lavados con DPBS 1X en agitación y se añadió tritón X-100 (Sigma-Aldrich, X100-500ML) al 0.1% durante 20 minutos a 37°C para permeabilizar la membrana celular y permitir la entrada de los anticuerpos al citoplasma celular. Como alternativa al proceso de permeabilización, se utilizó metanol absoluto a -20°C, el cual se añadió a los cubreobjetos y se dejó incubar a -20°C durante 6 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 mL de DPBS 1X, se mezcló y se retiró el volumen, esto con la finalidad de hidratar el metanol y evitar la deshidratación de las muestras. Después de ambos procesos de permeabilización, se realizaron tres lavados con DPBS 1X en agitación y se dejó incubar con suero de caballo al 10% durante 1 hora.

Al finalizar el bloqueo, se dejó incubar toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de vimentina a una dilución 1:100 en solución de bloqueo (anticuerpo monoclonal de ratón V9 Santa Cruz, sc-6260; anticuerpo policlonal de conejo Cell

Signaling, D21H3). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con DPBS 1X en agitación y se colocó el anticuerpo secundario durante 1:30 hora a TA, protegiendo las muestras de la luz. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo: Alexa Fluor-594 anti-ratón (Invitrogen A11005) a una dilución 1:500 cuando se usó los anticuerpos primarios monoclonales y Alexa Fluor-568 anti-conejo (Invitrogen, A11011) a una dilución 1:250 en las muestras incubadas con el anticuerpo policlonal de vimentina.

Después de la incubación, se realizaron 3 lavados con DPBS 1X en agitación y se incubaron las muestras con DAPI 1 mg/mL a una dilución 1:1000 por 10 minutos. Finalmente se lavaron los cubreobjetos con agua desionizada y se realizó el montaje en portaobjetos con Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, 81381) añadiendo 80 µl en las muestras sembradas en vidrio y 120 µl en los HG de PAA. Se dejaron secar durante una noche antes de continuar con la toma de fotografías. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ni-L y en el microscopio THUNDER de la marca Leica. Finalmente, las imágenes fueron procesadas con el software de acceso libre ImageJ.

6.4 Lisis Celular y Enriquecimiento de Filamentos Intermedios

Para continuar con la caracterización de los FI y el estudio de sus posibles interacciones proteicas por inmunoblot, se realizó la ruptura de la membrana celular con la finalidad de extraer la fracción proteica de los fibroblastos.

La lisis celular del cultivo primario de MEFs y la línea inmortalizada 3T3-L1 se obtuvo a partir de dos cajas petri de 100 mm, con una confluencia aproximada del 80%. Ambas cajas se colocaron sobre una cama de hielo, se les retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con DPBS 1X. Posteriormente se retiró el DPBS y se añadió 1 mL del buffer de lisis TNTE (ver anexo 1) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche 11697498001) e inhibidores de fosfatasa NaF, NaPPi, Na_3VO_4 . Se raspó la caja petri con un gendarme para desprender mecánicamente las células. El volumen obtenido se transfirió a un microtubo de centrifuga de 1.5 mL

y se dejó incubar por 1 hora en agitación a 4°C. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 13,300 rpm a 4°C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo de centrífuga y se almacenó a -70°C.

Por otro lado, el enriquecimiento de los FI se implementó por primera vez en el laboratorio, siguiendo el procedimiento de Battaglia *et al.*, 2017 [127]. Al igual que la lisis celular con el buffer TNTE, se partió de dos cajas petri de 100 mm con el cultivo primario de MEFs (al 80% de confluencia, aproximadamente). Una vez colocadas las cajas petri sobre hielo y haber realizado el lavado con DPBS 1X, se colocó 1 mL del *buffer de lisis Tritón X-100* suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se desprendieron mecánicamente las células con el gendarme y el volumen se transfirió a un microtubo para centrifugar la muestra a 17,000 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se almacenó a -70°C. El precipitado se disolvió en el segundo *buffer con alto contenido de sales* suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se dejó agitando por 1 hora a 4°C. Después de la incubación, se centrifugó a 17,000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y congeló a -70°C, mientras que el precipitado se disolvió en el tercer *buffer de PBS/EDTA* frío y se centrifugó nuevamente a 17,000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un nuevo microtubo, se almacenó a -70°C y el precipitado se resuspendió en el último *buffer de SDS al 2%* previamente calentado. Finalmente, la muestra se calentó a 95°C por 5 minutos para ayudar a su disolución y se almacenó a -70°C.

En algunos experimentos se usó el entrecruzador proteico DTSSP (Thermo Fisher, 21578), el cual se añadió después de realizar la lisis celular con Tritón X-100 y se incubó a 4°C por dos horas. Posteriormente se siguió con el procedimiento de enriquecimiento de FI como se mostró anteriormente. La concentración final del entrecruzador utilizado fue de 50 mM.

Para ver el contenido de cada uno de los buffers empleados en el enriquecimiento de FI se puede consultar el Anexo I.

6.5 Cuantificación y precipitación de proteína

Posterior a la obtención de muestras proteicas es importante su cuantificación para determinar la concentración de proteínas totales en los extractos y continuar con su análisis a través de la técnica de inmunoblot. El método utilizado en el presente trabajo está basado en el ensayo colorimétrico Lowry por su alta tolerancia a detergentes; por lo cual, se usó el kit de ensayo proteico DC, Bio Rad (DC Protein Assay, Bio Rad). El método consiste en dos reacciones, en la primera, las proteínas forman una unión con el cobre dado por el tartrato de cobre en un solución alcalina. Posteriormente, el reactivo de Folin es reducido por las proteínas tratadas con cobre, al perder 1, 2 o 3 átomos de oxígeno, lo cual produce una o varias especies reducidas que se caracterizan por presentar un color azul con un máximo de absorbancia de 750 nm y un mínimo de 450 nm.

La primera parte del método consiste en la elaboración de una curva de concentración de la proteína albúmina de suero bovino (BSA), como se observa en la **Tabla 5**, lo que nos permitirá extrapolar los datos y calcular las concentraciones de nuestras muestras. La dilución parte de una concentración de 1.5 mg/mL de BSA. Posteriormente, se añadió 5 μ L de cada punto de la curva de BSA y de las muestras a cuantificar en una caja de 96 pozos; cada punto por triplicado. Después se añadió 25 μ L de la solución A (solución alcalina de tartrato de cobre) en los pozos que contienen la curva de BSA y 25 μ L de la solución A' (a un 1 mL de solución A se añadió 25 μ L de la solución S) en los pozos con las muestras a cuantificar. Finalmente, se añadió 200 μ L de la solución B (reactivo de Folin), se esperó 15 minutos de incubación a TA, en la cual se da la reacción de reducción. La placa se leyó en un espectrofotómetro a 750 nm.

Tabla 5. Curva patrón de albúmina para la cuantificación de proteínas

Concentración de BSA [mg/mL]	Volumen de DPBS μL	Volumen de BSA 1.5 mg/mL μL
0.00	0	50
0.25	8	42
0.50	16	34
1.00	33	17
1.50	50	0

Con los datos obtenidos se hizo un promedio de absorbancia de cada punto de la curva de BSA y se graficó absorbancia vs concentración. Se obtuvo la ecuación de la gráfica $[Abs]=m[Conc]+b$, en la cual se despejó $[Conc]$ de la siguiente forma: $[Conc]=([Abs]-b)/m$. Se sustituyó $[Abs]$ con los promedios de absorbancia de cada una de las muestras y de esta forma, se calcularon las concentraciones de proteínas totales de los extractos obtenidos.

Debido a las dimensiones de los pozos para la electroforesis y la concentración de proteína que se tenga en la muestra, en muchas ocasiones es necesario precipitar una concentración específica de proteína por un método de separación de fases, la cual se resuspende en un volumen menor. Para la precipitación, se añadió el volumen deseado del extracto proteico (para tener la proteína total deseada) a un microtubo de centrifuga y la misma cantidad de metanol:acetona a una proporción 5:1. Se mezcló con vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a TA. Se descartó la fase superior sin tocar la interfase conformada por las proteínas. Se añadió 1 mL de metanol absoluto, se mezcló con vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a TA. Después, se descartó el sobrenadante, evitando tocar el precipitado de proteínas y se dejó secar a 50°C. Finalmente se resuspendió el precipitado con el volumen deseado de buffer de

carga Laemmli 2X, se calentó la muestra a 90°C por 5 minutos y se almacenó la muestra a -20°C.

En el caso particular del enriquecimiento de FI, fue difícil su cuantificación por el método de Lowry debido al alto contenido de sales en algunas fracciones. Por lo cual se decidió precipitar el 10% de cada una de las fracciones, calculado a partir del volumen total de cada fracción.

6.6 Electroforesis SDS-PAGE

Para caracterizar el enriquecimiento de FI de vimentina y sus posibles interacciones proteicas, se realizó la separación de proteínas dependiendo de su peso molecular a través del método de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). A través de esta técnica, se crea un campo eléctrico, en el cual las proteínas migran del polo negativo (ánodo) al polo positivo (cátodo) a través de la red conformada de la polimerización de acrilamida. De esta forma, las proteínas con mayor peso se ubicaran en la parte superior del gel, al no poder atravesar rápidamente la red. Por otro lado, las proteínas de menor peso seguirán migrando a la parte inferior del gel. Dependiendo del porcentaje de acrilamida:bisacrilamida que se use al realizar los geles, se observarán proteínas de mayor o menor peso molecular.

En este caso, se trabajó con geles separadores al 12% que nos permite observar tanto proteínas de alto peso (210 kDa) como de bajo peso (20 kDa); mientras que el gel concentrador se realizó al 5%. En la **Tabla 6** se observan los reactivos y cantidades utilizadas en el proyecto.

Tabla 6. Elaboración de hidrogel de PAA al 12% para inmunoblot

	Gel separador (12%)	Gel concentrador (5 %)
Agua desionizada	8.2 mL	4.1 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (proporción 29:1)	10.0 mL	1.0 mL
Tris-HCl	6.3 mL (pH 8.8)	0.75 mL (pH 6.8)
SDS 10%	0.25 mL	0.06 mL
APS 10%	0.25 mL	0.06 mL
TEMED	0.01 mL	0.006 mL
Volumen Total	25 mL	6 mL

Datos tomado de Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) [128].

Primero se montó el sistema de vidrios para fabricar geles de PAA de 1 mm de grosor. Una vez verificado la ausencia de fugas en el sistema con agua desionizada, se realizó la polimerización del gel separador durante 25 minutos. Después, sobre el gel separador polimerizado, se colocó la mezcla del gel concentrador con el molde de los pozos. Este orden se realiza para que las muestras entren en contacto primero con el gel concentrador, que está fabricado con Tris-HCl a pH 6.8, lo cual induce que la glicina se encuentre en su estado protonado y pierda la mayoría de su carga. Esto favorece un movimiento más lento de la glicina desde el cátodo (electrodo negativo) hasta el ánodo (electrodo positivo), permitiendo la formación de un gradiente, donde la muestra se coloca intermedio entre la glicina y el cloro. Lo anterior ayuda al empaquetamiento (*stacking*) de las muestras y que corran al mismo tiempo. Posteriormente, el pH del Tris-HCl sube a 8.8, de tal forma que la glicina se desprotona y adquiere una carga negativa. Este cambio en la carga de

glicina induce su movimiento hasta el frente de corrida, junto con el cloro, dejando que la muestra de proteína comience a separarse por su peso a lo largo del gel separador.

Una vez polimerizado el gel de PAA, se colocó en un cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X (Ver anexo 1) y se colocaron los volúmenes requeridos de las muestras. Se conectó la cámara a una fuente de poder que crea el campo eléctrico y se configuró para que el gel corriera con un voltaje constante de 100 volts durante aproximadamente 2 horas, o 20 volts, en caso de dejarlo toda la noche.

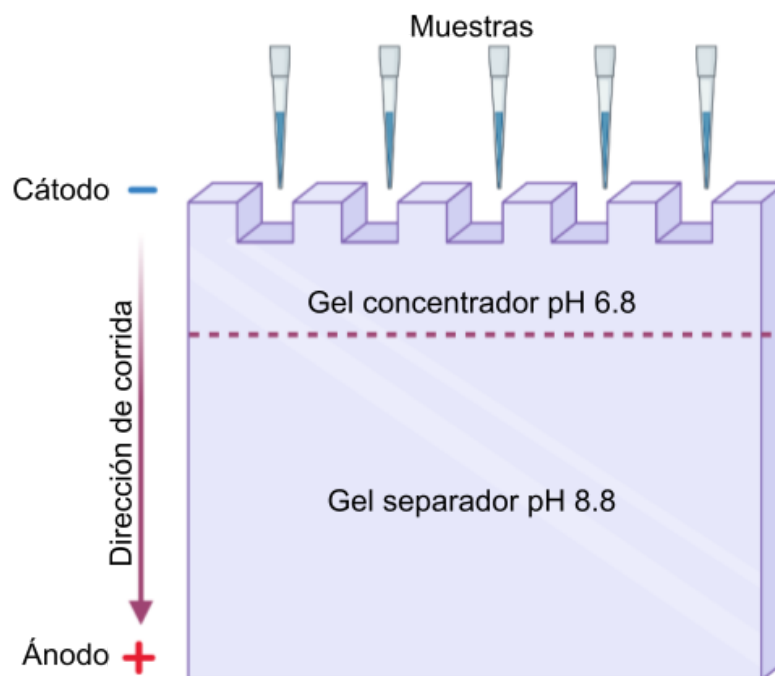


Figura 7. Ilustración de los componentes de un gel de PAA para inmunoblot. Las muestras corren del cátodo (electrodo negativo) hacia el ánodo (electrodo positivo) a un voltaje constante. Las muestras se alinean en una misma línea en el gel concentrador y posteriormente se separan por su peso molecular a través del gel separador.

6.7 Tinción azul de Coomassie

Posterior a la electroforesis, se procedió a teñir el gel con el colorante azul de Coomassie (Sigma-Aldrich, 27816-25G). El colorante fue disuelto en la solución desteñidora que consta de 450 mL de metanol:agua a una proporción 1:1, más 50 mL de ácido acético glacial. Los componentes de la solución permiten fijar las proteínas en el gel y el colorante se une a aminoácidos básicos protonados (lisina, arginina e histidina) a través de interacciones electrostáticas, así como a aminoácidos aromáticos por medio de interacciones hidrofóbicas.

El gel se colocó en un recipiente de plástico junto con el colorante y se dejó teñir toda la noche en agitación a TA. Posteriormente, se retiró el colorante con la solución desteñidora (mencionada previamente) haciendo recambios de la solución cada 20 minutos, aproximadamente. Una vez alcanzado el contraste deseado, se retiró la solución desteñidora y se agregó agua desionizada. Las fotos del gel fueron tomadas en el equipo ChemiDoc XRS de BioRad.

6.8 Inmunoblot

6.8.1 Transferencia y bloqueo

Para realizar el marcaje de proteínas a través de la técnica de inmunoblot es necesario transferir las proteínas separadas durante la electroforesis a una membrana que permita su manipulación. La membrana que se utilizó fue de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y fue activada en metanol absoluto por dos minutos en agitación, mientras se armaba el equipo de transferencia. Se colocó la membrana de PVDF encima del gel dentro de un cassette específico para realizar la transferencia de tipo húmeda y se eliminaron las posibles burbujas entre el gel y la membrana. Se cerró el cassette, se colocó dentro de la cámara de transferencia con buffer de transferencia (ver anexo 1) y se dejó correr a un amperaje constante de 320 mA durante 2:30 h.

Posteriormente, se colocó la membrana de PVDF en un recipiente y se añadió la solución de bloqueo al 5% (leche en polvo bajo en grasas). Se dejó incubar durante 1 hora en agitación. Se realizaron 3 lavados con TBS tween 0.1% (ver anexo 1) de 5 minutos cada uno en agitación. Este paso es importante para evitar la unión no específica del anticuerpo a la membrana de PVDF.

6.8.2 Marcaje con anticuerpos

Para el marcaje de la membrana de PVDF, los anticuerpos primarios fueron diluidos en TBS-tween 0.1% a una dilución 1:1000, excepto el anticuerpo policlonal de vimentina Cell Signaling, el cual se utilizó 1:2000 (**Tabla 7**). Las membranas de PVDF se dejaron incubar con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C en agitación dentro de bolsas de plástico, las cuales fueron selladas térmicamente. Después, se realizaron 3 lavados con TBS-tween 0.1% de 5 minutos cada uno en agitación. Al finalizar los lavados, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) diluido en solución de bloqueo. La dilución del anticuerpo secundario varió entre 1:10,000 y 1:5,000 dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Al terminar el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con TBS-tween 0.1% por 5 minutos en agitación.

6.8.3 Revelado en placas fotográficas

Para el revelado se utilizó la reacción quimioluminiscente producida por la enzima HRP acoplada a los anticuerpos secundarios y el sustrato de quimioluminiscencia conformado por luminol y peróxido de hidrógeno (Millipore, WBKLS0500). Durante la reacción, el luminol es oxidado por la enzima HRP en presencia del peróxido de hidrógeno, induciendo un estado excitado del luminol y la emisión de luz.

La proporción del luminol:peróxido utilizado fue 1:1 y dependiendo la intensidad de la marca se realizó una dilución del sustrato con TBS-tween al 0.1%. La señal lumínica producida por la reacción en la membrana de PVDF fue plasmada en placas fotográficas sensibles a la luz azul al ponerlas en contacto por tiempos variables, dependiendo la intensidad del marcaje obtenido.

El revelado consistió en sumergir las placas en solución de revelado por 1 minuto, realizar un lavado con agua durante 1 minuto y colocarlas en solución de fijación por 1 minuto. Finalmente se sumergen en agua las placas durante 1 minuto. Al ser placas sensibles a la luz azul, el proceso se realizó en un cuarto oscuro, para evitar velar la placa antes de pasar por la solución de fijación.

Tabla 7. Diluciones de anticuerpos utilizados en la técnica inmunoblot

Anticuerpo	Marca	Dilución
α -vimentina	V9 Santa Cruz, sc-6260	1:1000
	Sigma Aldrich, V6389	1:1000
	Cell Signaling, D21H3	1:2000
α -actina	Santa Cruz, sc-47778	1:2000
α -integrina β 1	Santa Cruz, sc-374429	1:1000
α -PPAR γ	Santa Cruz, sc-7273	1:1000
α -14-3-3	Santa Cruz, sc-133233	1:1000
α -mouse HRP	Jackson ImmunoResearch	1:10,000 / 1:5,000
α -rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	1:10,000

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de los FI de vimentina por inmunofluorescencia e inmunoblot en fibroblastos

Con la finalidad de determinar las interacciones proteicas de vimentina, es indispensable caracterizar nuestro modelo de estudio y asegurar que expresan vimentina como se ha descrito anteriormente [117]; además de evaluar su organización. Dicha caracterización se realizó a través del inmunomarcaje en la línea celular y cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1 y MEFs, respectivamente; así como en la línea celular de fibroblastos de piel humana BJ (utilizados como control positivo). El marcaje de vimentina se realizó con el anticuerpo monoclonal derivado de la clona V9 (Santa Cruz sc-6260). Como se observa en la **Figura 8A** las células BJ presentan la distribución reticular de los FI de vimentina a lo largo del citoplasma. Sin embargo, tanto la línea 3T3-L1 y MEFs, ambos de origen murino, no presentaron dicha organización de los FI, siendo muy tenue la marca de vimentina en el citoplasma con presencia en el núcleo. Derivado de dichas observaciones, se decidió comparar los resultados obtenidos con otra forma de permeabilizar las células para evaluar la presentación de los epítopes, para lo cual se utilizó metanol absoluto. Como se observa en la **Figura 8B**, no se muestran diferencias entre ambos tipos de permeabilización.

Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre el sitio de reconocimiento del anticuerpo de la clona V9 utilizado en el proyecto y se encontró que el residuo de Asp 417 es indispensable para el reconocimiento del anticuerpo [129]. Por lo cual, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de vimentina en humano (H), ratón (M) y rata (R), a través de la plataforma libre de Clustal Omega. Como se muestra en la **Figura 8C**, solo en la secuencia de ratón existe un cambio de Asparagina (N) por Treonina (T) en el residuo 417, indicado con un recuadro rojo. Probablemente este cambio sea la razón de la falta de reconocimiento del anticuerpo primario en las inmunofluorescencias de las células 3T3-L1 y de MEFs observadas en la **Figura 8A y B**.

En la **Figura 8D** se realizó la caracterización de los MEFs como células responsivas a la mecánica externa, Para lo cual se sembraron las células sobre HG de PAA con rigidez de 0.5, 1 y 5 kPa y se realizó el inmunomarcaje de vimentina usando el anticuerpo policlonal de Cell signaling D21H3. Como se puede observar, el cambio del anticuerpo primario permitió observar la distribución perinuclear de vimentina en sustratos suaves (0.5 kPa) y su proyección hacia el citoplasma en forma reticular en sustratos más rígidos (5 kPa). Además, podemos notar el aumento en el esparcimiento celular de los fibroblastos conforme se incrementa la rigidez del sustrato. Esto es un indicativo de la sensibilidad del modelo de estudio para percibir estímulos mecánicos de su exterior, importantes para el presente proyecto.

Para finalizar la caracterización del modelo, en la **Figura 8E** se llevó a cabo la detección de vimentina por la técnica de inmunoblot, realizando una curva de concentración del extracto proteico obtenidos del cultivo de los fibroblastos 3T3-L1 y MEFs en condiciones de cultivo estándar. Se probaron las cantidades de 20, 40, 60, 80 y 90 μg de proteína y en ambos tipos celulares se detectó claramente el marcaje de vimentina a partir de 40 μg . Corroborando así, la presencia de vimentina en los MEFs y la línea 3T3-L1.

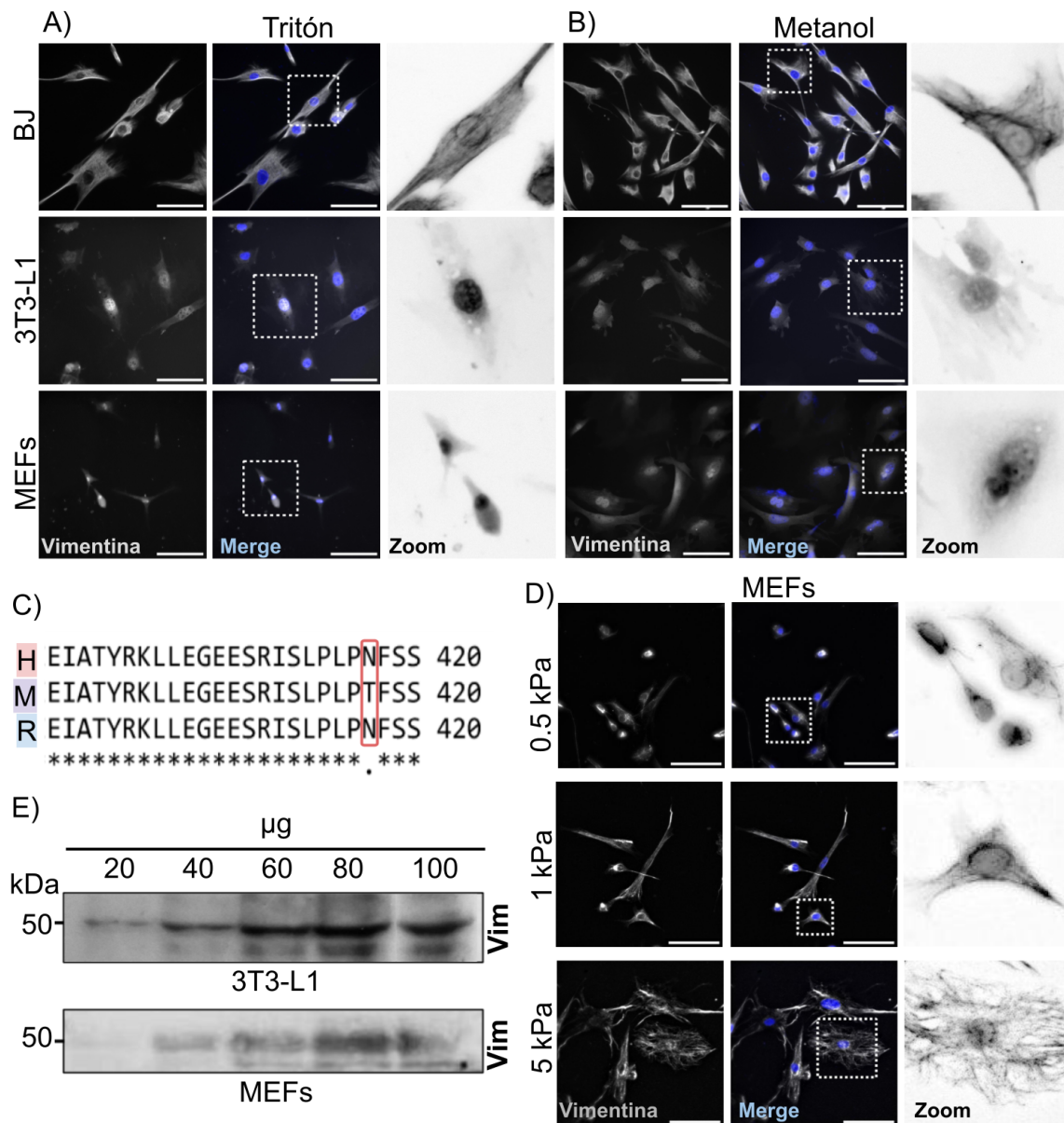


Figura 8. Expresión de filamentos intermedios de vimentina en fibroblastos. **A)** y **B)** Marcaje inmunofluorescente contra vimentina en la línea celular BJ (control positivo), 3T3-L1 y el cultivo primario de MEFs utilizando el anticuerpo primario V9. Se muestran dos métodos de permeabilización celular con tritón y metanol en condiciones de rigidez alta (vidrio). **C)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de vimentina en humano (H), ratón (M) y rata (R) usando la plataforma Clustal Omega. El recuadro rojo indica el sitio de variación de Asparagina (N) por Treonina (T) en el aminoácido 417 de vimentina en ratón. **D)** Marcaje de vimentina en MEFs sembrados sobre sustratos de PAA de diferentes rigidez usando el anticuerpo policlonal para vimentina, permeabilizadas con tritón al 0.1%. **E)** Detección de vimentina por inmunoblot a diferentes cantidades de proteína en fibroblastos 3T3-L1 y MEFs. Todos los resultados mostrados fueron colectados de dos experimentos independientes. La barra de error equivale a 100 µm.

7.2 Enriquecimiento de la fracción de FI de vimentina a partir de MEFs sembrados en cultivo estándar

Con la finalidad de obtener una mayor proporción de los FI de vimentina y poder caracterizar las interacciones proteicas en un futuro, se realizó la estandarización del método de enriquecimiento de FI de vimentina tomado de Battaglia *et al.*, 2017. Dicho procedimiento consiste en el lisado celular utilizando el detergente no iónico Tritón X-100. Posteriormente, se centrifuga y la fracción insoluble se resuspende en el siguiente buffer con alto contenido en sales, el cual se vuelve a centrifugar y su fracción insoluble se resuspende en una mezcla de PBS/EDTA. Finalmente, se vuelve a centrifugar y resuspender en el detergente iónico SDS al 2% para analizar el enriquecimiento de FI por inmunoblot. Como se muestra en la **Figura 9A** se hizo una comparación utilizando un procedimiento de lisis convencional con el buffer TNTE (ver anexo), el cual también contiene Tritón X-100. Se comparó tanto de la fracción soluble (S) como insoluble (I) obtenida de dicha lisis. Dado que la proteína vimentina forma una densa red de filamentos en la célula, éstos son localizados en su mayoría en la fracción insolubles, tal cual se muestra en los resultados obtenidos. Además, podemos observar que la marca de vimentina es mayor después de realizar el procedimiento de enriquecimiento de FI en comparación con la lisis total con TNTE. La cantidad de proteína utilizada en cada condición fue el 10% del total obtenido en cada paso.

Posteriormente, se realizó el tratamiento con el entrecruzador DTSSP, el cual es una molécula que en ambos extremos reacciona con aminas primarias de las proteínas a través de la formación de un enlace amida. Este experimento se realizó con el propósito de determinar si había algún cambio con el uso del entrecruzador que afectara el resultado en el enriquecimiento de FI, ya que el siguiente objetivo es la detección de interacciones proteicas. Como se puede notar en la **Figura 9B**, no parece haber cambios con (+) o sin (-) el uso del entrecruzador al detectar vimentina en las fracciones obtenidas del buffer de tritón, sales y PBS.

Por último se realizó la tinción de azul de Coomassie de los extractos obtenidos en el proceso de enriquecimiento de FI, comprando el patrón de proteínas obtenidas

con o sin el uso del entrecruzador. Esto se realizó con la finalidad de observar cualitativamente si existía un incremento o cambio en el patrón proteico cuando se usa DTSSP. En la **Figura 9C** se muestra un patrón y niveles de proteína muy similares en el buffer de tritón, sales y SDS al comparar el uso o no del entrecruzador. Únicamente en el buffer PBS se nota un ligero cambio en los niveles de proteína. En cada una de las condiciones se cargó el 10% de la proteína total. La cabeza de flecha roja indica la banda de proteína alrededor de los 50 kDa y que tuvo un posible enriquecimiento, por lo cual es probable que sea vimentina. Las cabeza de flechas color negro, son proteínas que se mantienen en la fracción enriquecida de FI y que probablemente sea proteínas asociadas a vimentina.

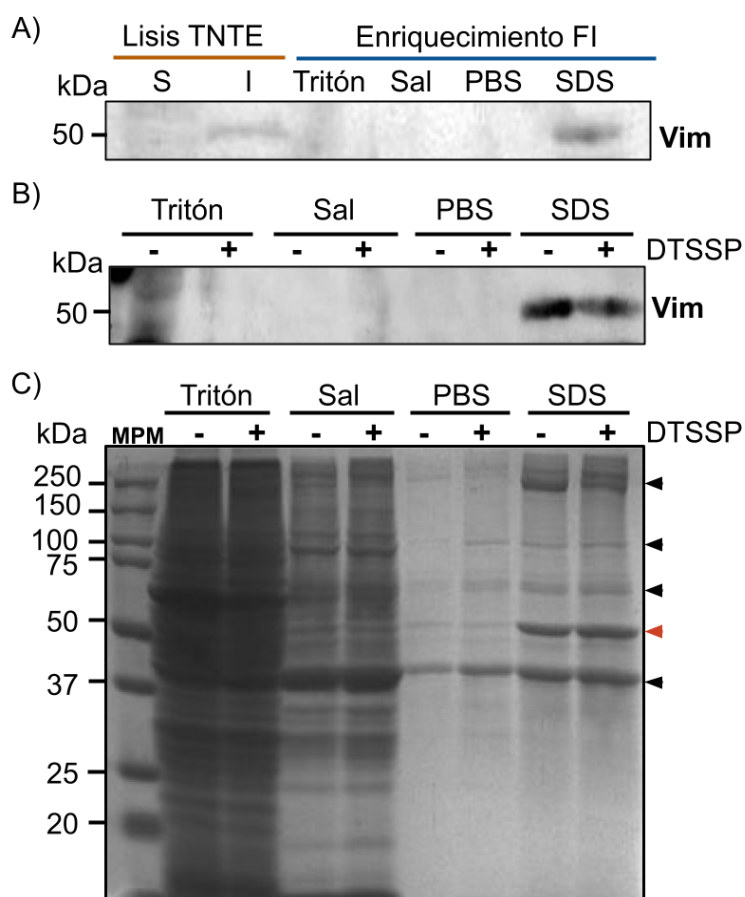


Figura 9. Enriquecimiento de filamentos intermedios de vimentina en MEFs. **A)** Detección de vimentina por inmunoblot comparando la fracción soluble (S) e insoluble (I) obtenidas de la extracción proteica con el buffer TNTE (lisis estándar) y del procedimiento utilizado para enriquecer los FI de vimentina. **B)** y **C)** Uso del entrecruzador DTSSP durante el enriquecimiento de FI para mantener las posibles interacciones de vimentina con otras proteínas, detectado mediante inmunoblot y tinción de azul de Coomassie, respectivamente. El signo de + indica la adición del entrecruzador y el signo - es el control. Las cabezas de flecha negras indican posibles proteínas asociadas con vimentina, la cabeza de flecha roja indica el enriquecimiento de vimentina. Gel de acrilamida al 12%. En cada condición se cargó el 10% del precipitado total obtenido. Todos los resultados mostrados fueron colectados de dos experimentos independientes. MPM: Marcador de Peso Molecular.

7.3 Posibles interacciones de vimentina en MEFs cultivados bajo condiciones de cultivo estándar

Como parte del último objetivo del proyecto es determinar posibles interacciones de vimentina tanto en condiciones de cultivo estándar como en condiciones de menor rigidez, por ejemplo, en sustratos suaves de 0.5 kPa. A través de dichos resultados se puede deducir y profundizar en un futuro sobre el tipo de señalización que puede inducir en las células dependiendo de su contexto mecánico. Sin embargo, por la contingencia sanitaria generada por la pandemia de COVID-19 fue complicado abordar el último objetivo.

En la **Figura 10** se muestran probables asociaciones proteicas de vimentina bajo condiciones de cultivo estándar en caja de poliestireno. En la **Figura 10A** se muestra el inmunoblot para actina usando los extractos del enriquecimiento de FI, así como el uso del entrecruzador DTSSP. Al igual que en procedimientos anteriores de electroforesis e inmunoblot, se cargó el 10% de la proteína total en cada condición. Se puede observar que actina aparece en todas las fracciones, incluso en la fracción SDS, donde se ubica la mayor proporción de vimentina. Siendo actina, una de las proteínas reportadas previamente que interacciona con vimentina.

Por otro lado, en la **Figura 10B** se muestra el marcaje contra la integrina $\beta 1$, presente en mayor abundancia en la fracción soluble de Tritón-X100 que en otras fracciones. Se realizó una comparación en el tiempo de revelado de las placas (exposición alta y exposición baja) y se puede observar que integrina $\beta 1$ está presente en la fracción enriquecida de FI (SDS), aunque en menor proporción que en el buffer de sales y Tritón X-100, por lo cual también puede estar asociada a vimentina en condiciones de alta rigidez como los son la cajas de cultivo de poliestireno.

Finalmente, fue de interés conocer si la proteína 14-3-3 podría estar asociada a vimentina en dichas condiciones de rigidez, lo cual podría relacionarse con la translocación nuclear de YAP/TAZ visto en MEFs y otras células cuando incrementa la rigidez del sustrato. Sin embargo, su detección no fue evidente en la fracción

enriquecida de FI, solo en la fracción soluble de Tritón y en el buffer de alto contenido de sales, mostrado en la **Figura 10C**.

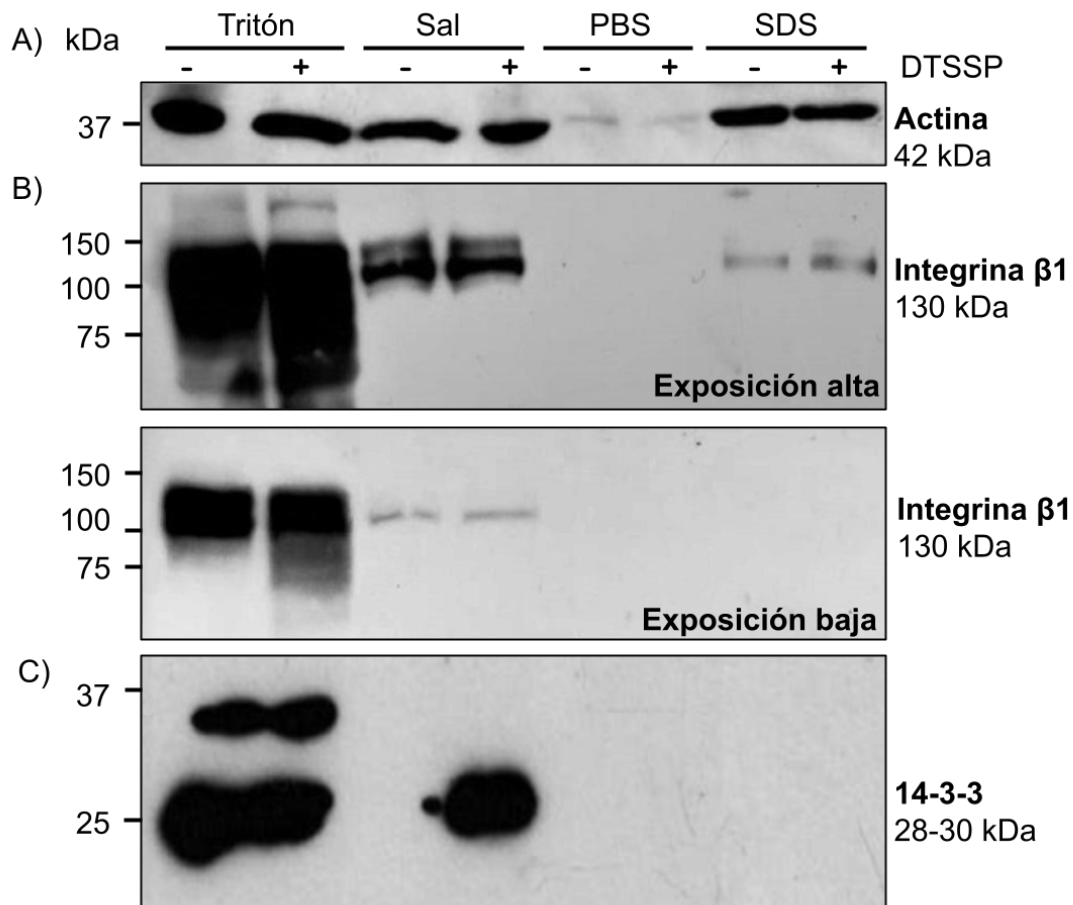


Figura 10. Posibles interacciones de vimentina con integrina $\beta 1$ en condiciones de cultivo estándar detectadas por inmunoblot. A) Marcaje de actina, la cual es visible en todos los extractos usados en el enriquecimiento de FI. **B)** Detección de integrina $\beta 1$ en la fracción enriquecida de FI de vimentina al usar un mayor tiempo de exposición en el revelado de placas (Exposición alta), en contraste con una baja exposición. **C)** Detección de la proteína 14-3-3 en la fracción soluble de Tritón y en el buffer alto contenido de sales, pero no en el enriquecimiento de FI de vimentina. Se usó el entrecruzador DTSSP para evitar la pérdida de interacciones proteicas. Todos los resultados mostrados fueron colectados de dos experimentos independientes. Cada condición se realizó con el 10% del volumen total de cada fracción.

8. DISCUSIÓN

Los filamentos intermedios de vimentina son un tipo de citoesqueleto presente en células de origen mesenquimal, como lo son los fibroblastos, los cuales han sido descritos previamente con una organización reticular de vimentina en el citoplasma celular en sustratos rígidos, como lo es el cultivo en caja de poliestireno. Particularmente, en los MEFs se ha visto que forman una red alrededor del núcleo, descrita similar a una jaula, la cual se extiende hacia la periferia de la célula. Patteson *et al.* en 2019 describieron su gran importancia en la protección contra daño nuclear ante la deformación mecánica que sufren las células en un proceso migratorio [117].

Sin embargo, las primeras inmunofluorescencias realizadas para la caracterización del modelo de estudio (**Figura 8A**) usando el anticuerpo monoclonal V9 (Santa Cruz, sc-6260), las células derivadas de ratón (MEFs y 3T3-L1) no presentaron la distribución reticular de vimentina. No obstante, la detección de vimentina en ambos tipos celulares se logró a través de la técnica de inmunoblot (**Figura 8E**). Por lo cual, se realizó una comparación entre la permeabilización con tritón al 0.1% y metanol absoluto (ver métodos). El uso de detergentes, como el tritón X-100, son ampliamente usados en la permeabilización celular ya que remueven lípidos de la membrana, permitiendo la entrada de anticuerpos a la célula. Sin embargo, el detergente Tritón X-100 no es selectivo y puede extraer proteínas junto con los lípidos y crear poros de diferente tamaño. Por otro lado, los solventes orgánicos, entre ellos el metanol, separan los lípidos de la membrana y en combinación con la fijación rápida del paraformaldehído puede favorecer el marcaje de proteínas del citoesqueleto [144,145]. Sin embargo, no hubo un cambio en el marcaje fluorescente de vimentina en los fibroblastos 3T3-L1 ni MEFs al cambiar el tipo de permeabilización (**Figura 8A y B**). Por el contrario, la línea celular de fibroblastos de piel humana (BJ), usado como control positivo, presenta el marcaje de vimentina en forma reticular en ambas condiciones. Esto sugiere que ni las condiciones de permeabilización utilizadas ni cualquier otro paso técnico realizado durante la

inmunofluorescencia fueron la causa del marcaje difuso, o relativamente nuclear, de vimentina en los MEFs y la línea celular 3T3-L1.

La única diferencia evidente es el origen de los fibroblastos utilizados, mientras que las células BJ son de origen humano, 3T3-L1 y MEFs son de ratón. Si bien la hoja técnica del anticuerpo sugiere el uso en ambas especies, Tomiyama *et al.* en 2017 observaron que el reconocimiento de vimentina no se daba en la línea celular de fibroblastos embrionario de ratón NIH-3T3 (similares a la línea 3T3-L1), pero sí en células cancerígenas pancreáticas de humano (PaCa-2). Al realizar la delección del extremo carboxilo terminal de vimentina, notaron interferencia en la unión del anticuerpo y mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos en diferentes especies, notaron que en el residuo 417 había un cambio de asparagina (N) por treonina (T) en ratón. Posteriormente, comprobaron la importancia de este aminoácido al intercambiarlo en la secuencia de aminoácidos [129]. Con este antecedente, se realizó la alineación de las secuencias de vimentina en humano, rata y ratón en la plataforma libre de Clustal Omega y se corroboró el cambio de dicho aminoácido en ratón (ver **Figura 8C**). Por lo cual, se decidió hacer uso del anticuerpo primario policlonal de la marca Cell signaling (D21H3). Una de las ventajas en la elección de este tipo de anticuerpos es su heterogeneidad, ya que proceden de múltiples clones de células B que reconocen diferentes epítopes del mismo antígeno. Ésto es aprovechado al trabajar con los fibroblastos de ratón donde vimentina puede ser reconocida en múltiples sitios de su secuencia de aminoácido sin depender únicamente de la región carboxilo terminal.

Como se observa en la **Figura 8D** el cambio en el anticuerpo primario permitió detectar el arreglo reticular y citoplasmático de vimentina en los MEFs mediante inmunofluorescencia. Además, se verificó la respuesta del modelo de estudio a estímulos mecánicos al ser sembrados sobre HG de PAA de diferente rigidez. De forma cualitativa, se nota el cambio en el esparcimiento celular y la disposición de los FI de vimentina al cambiar la rigidez del sustrato. Previamente, Murray *et al.* en 2014 describieron en células endoteliales, epiteliales y fibroblastos NIH-3T3 la disposición perinuclear de los FI de vimentina al ser sembradas en HG de PAA suaves (0.2 kPa). Por otro lado, al incrementar la rigidez del sustrato a 5 kPa y 30

kPa, los FI se ocuparon el 63% y 78% del citoplasma, respectivamente [118]. En las inmunofluorescencias realizadas, logramos visualizar el cambio en la disposición de los FI, donde en sustratos suaves (0.5 kPa) se encuentran densamente alrededor del núcleo y en un sustrato de 1 y 5 kPa la red se extiende a lo largo del citoplasma. Como se ha mencionado previamente, la red de FI en el citoplasma participa en la transmisión de esfuerzos desde el exterior celular hasta el núcleo. Desde 1997 Maniotis y colaboradores mostraron que los FI eran suficientes para deformar el núcleo al aplicar fuerzas sobre la corteza celular usando micropipetas o manipulando microesferas unidas a la superficie de células endoteliales de capilares de bovinos [130]. En contraparte, la red de FI perinuclear parece tener más un efecto protector ante la deformación y ruptura nuclear, así como de daño al DNA. Por lo cual, Patterson y colaboradores sugieren que el arreglo citoplasmático de los FI transmite fuerzas al núcleo y la red perinuclear resiste ante dicha fuerza [117,131].

Además, logramos observar un cambio en la morfología de las células conforme se incrementa la rigidez del sustrato. En los hidrogeles de 0.5 kPa las células son más redondeadas; mientras que en 1 kPa, las células se vuelven más alargadas (fusiformes) y en sustratos más rígidos de 5 kPa y vidrio, las células presentan una morfología mixta, con algunas células fusiformes y otras radiales. Estos cambios morfológicos se han reportado previamente en células troncales mesenquimales humanas, HUVEC y NIH-3T3. Aunque los valores de rigidez del sustrato son diferentes a los utilizados en este proyecto, la tendencia se mantiene [118].

En cuanto al cambio en el esparcimiento celular, previamente en el laboratorio, se ha reportado que en la línea celular 3T3-L1 presenta un área promedio de 1,500 μm^2 cuando son cultivados en sustratos de rigidez de 0.5 kPa, mientras que en sustratos de 5 kPa el área de esparcimiento celular alcanza los 4,000 μm^2 [146]. Constantemente se ha observado la misma tendencia en el incremento del área celular conforme se incrementa la rigidez del sustrato, aunque los valores en el área celular pueden variar ya sea por el tipo celular utilizado, el tipo de sustrato para sembrar las células, la densidad y tipo de proteína usada como sistema de adhesión. Estas variaciones se relacionan con la forma que tienen las células de

percibir los estímulos externos mecánicos a través de las integrinas. Excepto en algunos casos, como en neuronas del sistema nervioso central, en células troncales embrionarias de ratón y líneas celulares de algunos tipos de cáncer, el esparcimiento celular parece ser insensible a la rigidez o ser mayor en sustratos suaves [132].

Por otra parte, el proyecto estuvo enfocado en las interacciones de vimentina con otras proteínas, por lo cual fue de gran relevancia estandarizar un método para el enriquecimiento de la fracción de dichos FI (**Figura 9A**). De ahí que se utilizará como base el procedimiento publicado por Battaglia *et al.*, 2017, el cual fue realizado para la extracción de FI en tejidos. Su extracción se basa en la resuspensión consecutiva del lisado celular en cuatro tipos de buffers. En primer lugar se utilizó el detergente suave no iónico Tritón X-100, el cual es utilizado para lisar las células y recuperar sus contenido proteico. El mecanismo general de acción de los detergentes radica en su naturaleza química, ya que son moléculas anfipáticas, como los fosfolípidos de la membrana celular, es decir tiene una cadena de hidrocarburo no polar hidrofóbico (cola) y un grupo polar hidrofílico en su extremo (cabeza). La similitud en las estructuras moleculares permite que el detergente penetre en las bicapas de fosfolípidos y, por lo tanto, romper las membranas celulares. Los detergentes no iónicos tienen la ventaja de romper interacciones proteína-lípido y lípido-lípido, pero normalmente no lo hacen con las asociaciones proteína-proteína y, en general, no desnaturalizan las proteínas [133]. Siendo de importancia utilizar este tipo de detergentes si se quiere estudiar interacciones proteicas.

El paso más importante en el aislamiento de FI realizado en este proyecto, es el uso de buffer con alto contenido de sales, el cual contenía 1.5 M de KCl (ver anexo), ya que favorece la precipitación de FI y que ha sido usado previamente por otros autores [134,135]. Se han descrito diferentes tipos de métodos complementarios a la extracción de FI con soluciones de alto contenido de sales, como es el usar urea a una concentración de 8 M. Sin embargo, la urea es un agente desnaturizante que irrumpe la organización de los FI, dejando fragmentos de éstos en forma monomérica y así favorecer su solubilidad en urea. Si bien su reconstrucción *in vitro*

es posible con un buffer de fosfatos o bien al bajar la concentración de urea a 5 M para formar tetrámeros sin afectar sus propiedades físicas, el realizar este procedimiento implica la pérdida de interacciones proteicas [136,137] . Por lo cual, no se consideró realizar este paso, dado el objetivo principal del proyecto.

Finalmente, la fracción obtenida a partir de la solución rica en sales es poco soluble, por lo cual se utilizó el detergente iónico SDS a una concentración 2% m/v, que a diferencia del Tritón X-100, está cargado negativamente y tiende a desnaturalizar las proteínas [133]. Si bien el uso de SDS puede romper las interacciones proteicas, en este punto del procedimiento, se requiere la desnaturalización de las proteínas, ya que el paso siguiente es separarlas por su peso molecular a través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE. De tal forma que, aquellas proteínas que permanecen en la fracción de SDS al 2% probablemente mantenían una interacción con los filamentos de vimentina.

Como se puede observar en la **Figura 9A**, el método utilizado para enriquecer los FI favorece la detección de vimentina en la fracción SDS a diferencia de la lisis convencional usando el buffer TNTE. De igual forma, se analizaron ambas fracciones de la lisis con TNTE (fracción soluble e insoluble), confirmando la detección, únicamente, en la fracción insoluble. Este resultado está sustentado en reportes previos, donde se ha descrito a los FI de vimentina altamente insolubles en detergentes [138,139]. Sin embargo, desde 1985, Soellner *et al.* mostraron que existen fragmentos más pequeños que los FI de vimentina (tetrámeros), los cuales son solubles en detergente y han sido caracterizados por Blikstad y Lazarides (1983) como agentes precursores en el ensamblaje de FI [140]. Aunque en la **Figura 9A** no se detecta vimentina en la fracción soluble a TNTE, esto puede deberse a la cantidad de proteína utilizada, la cual corresponde al 10% del volumen total de cada fracción. Sin embargo, en la **Figura 8E** se trabajó con las proporciones solubles de la lisis celular y se logró su detección a partir de 40 µg de proteína.

Por otro lado, se usó el entrecruzador soluble en agua DTSSP (Thermo Fisher, 21578) con la finalidad de preservar las interacciones proteicas en el proceso de enriquecimiento de los FI de vimentina. En la **Figura 9B y C** no se observaron

diferencias, a nivel cualitativo, en el patrón y nivel de proteínas entre usar o no el entrecruzador. De acuerdo a su hoja técnica, puede ser utilizado tanto en muestras en solución como en muestras provenientes de cultivo celular, siempre y cuando se remueva soluciones como Tris y glicina, las cuales contienen aminas primarias en su estructura que pueden competir por la unión del entrecruzador. Como ya se mencionó anteriormente, la lisis celular se realiza con el buffer Tritón X-100 más EDTA (ver anexo), evitando dicho problema.

Además, se sugiere lavar el cultivo celular con PBS y posteriormente añadir el entrecruzador antes de lisar las células. Pero en sus indicaciones, también se precisa que el uso de DTSSP permite entrecruzar moléculas de la superficie celular ya que es insoluble en la membrana. Por lo cual, el realizar la lisis primero, como se realizó en el proyecto, permite la extracción proteica sin importar la solubilidad del entrecruzador. Además, como se mencionó anteriormente, el detergente Tritón X-100 es suave y generalmente no interrumpe las interacciones proteína-proteína. Por lo tanto, se disminuye el riesgo de interrumpir las interacciones antes de añadir el entrecruzador DTSSP. Pero no podemos descartar que el realizar en este orden el enriquecimiento de FI, se haya perdido ciertas interacciones débiles con vimentina y por ende no se observan diferencias al usar o no el entrecruzador.

Finalmente, la detección de posibles interacciones proteicas de vimentina bajo condiciones de cultivo estándar son mostradas en la **Figura 10**. Si bien el proyecto tenía como objetivo principal determinar las interacciones de vimentina bajo condiciones de rigidez variable, la emergencia sanitaria a nivel mundial provocada por el virus SARS-CoV-2 impidió la realización de los hidrogeles de menor rigidez y la exploración de dichas interacciones al verse detenida las actividades de investigación en el laboratorio donde se realizó este proyecto.

En la figura **10A y B** se muestra la presencia de actina e integrina $\beta 1$ en la fracción enriquecida de vimentina. Como se ha mencionado previamente, las integrinas son los principales mecanorreceptores que permiten el flujo de información mecánica desde el exterior hacia el interior celular, y viceversa. Dependiendo de la combinación entre las subunidades α y β se determina el tipo de ligando de las

integrinas y su relación con la señalización celular que desencadena. Generalmente la subunidad α da la especificidad por el ligando, mientras que la subunidad β es importante en la interacción con el ambiente citoplasmático [10,141].

Particularmente, la integrina $\beta 1$ juega un papel importante en la activación de TGF- β latente, lo que favorece la transformación de fibroblastos a miofibroblastos. Se ha descrito que ante un daño en el tejido, los fibroblastos comienzan a tener uniones más fuertes con la MEC, a través de las integrinas, a una fuerza estimada en ~40 pN. Esta fuerza es ejercida sobre el péptido asociado a la latencia (LAP, por sus siglas en inglés) que está unido a TGF- β inactivo. Dicha unión y fuerza ejercida sobre LAP induce el despliegue de sus dominios, induciendo la liberación de TGF- β . La activación del fibroblasto por TGF- β . favorece la transcripción de genes como α -SMA y colágena, induciendo el depósito de proteínas de la MEC y el desarrollo de fibrosis [142].

Además, la integrina $\beta 1$ se ha asociado con la invasión de células de cáncer de mama (MDA-MB-231), ya que al unirse a uno de sus ligandos (fibronectina) sobrerregula la expresión de la metaloproteínasa-9 (MMP-9), lo cual induce la degradación de la MEC. La relación entre la integrina $\beta 1$ y la invasión celular se ha visto en otros modelos de cáncer como melanoma, osteosarcoma, glioma y carcinoma hepatocelular [143]. De igual forma, la expresión de vimentina está asociada con el proceso de EMT, por lo cual la interacción entre ambas proteínas es relevante ante un contexto cancerígeno, en el que también se ha descrito un incremento en la rigidez del microambiente extracelular.

Por otro lado, la interacción de la proteína 14-3-3 con los FI de vimentina podría ser relevante para la regulación del estado de ensamblaje de los FI. Previamente se describió que, entre las MPT que sufren los FI, las fosforilaciones son relevantes en el desensamblado de los FI, por lo cual la unión de la proteína 14-3-3 podría modificar las redes preexistentes de FI al favorecer la unión o la sustracción de proteínas de FI. Recientemente, Mariani y colaboradores en 2020 describieron que la interacción entre los FI de queratina 19 (K19) y la proteína 14-3-3 regula la reorganización de los FI y favorecen su localización en las uniones célula-célula en

el mesodermo de *Xenopus laevis* como respuesta a la fuerza de tracción generada por las interacciones célula-célula [144]. Además, entre los antecedentes citados, se describió la interacción de vimentina con 14-3-3 en condiciones inhibitorias de fosfatasas, lo cual podría regular las vías de señalización en las que participa la proteína 14-3-3, ya que regula su disponibilidad y afecta su unión con otras proteínas. Particularmente, Tzivion y colaboradores en 2000 observaron que la fosforilación de vimentina y su unión con 14-3-3 interrumpe la interacción entre 14-3-3 y Raf-1, lo que podría inducir cambios en la regulación del ciclo celular. [125]. En ese sentido, es interesante probar la interacción de vimentina con 14-3-3 en condiciones de rigidez controlada, lo cual podría afectar el estado y localización de vimentina en la célula, así como el desplazar interacciones entre 14-3-3 y otras proteínas importantes en mecanotransducción, tales como los cofactores transcripcionales YAP y TAZ. Sin embargo, al realizar el enriquecimiento de lo FI de vimentina en los MEFs bajo condiciones de alta rigidez, no se observó el marcaje de la proteína 14-3-3 (**Figura 10C**). Esto podría ser explicado por el bajo porcentaje de FI solubles presentes en las células ya que, de acuerdo con Murray *et al.*, 2014, el aumento en la rigidez del sustrato mayor a 30 kPa induce un incremento en la proporción insoluble de FI [118]. Esto habla de la formación de redes densas de FI de vimentina en la célula, lo cual disminuye la posibilidad de encontrar a vimentina en su estado precursor de FI y por ende fosforilado. Por lo cual, sería interesante realizar el enriquecimiento de FI en sustratos suaves para observar si el incremento en la solubilidad de vimentina favorece su asociación con la proteína 14-3-3, lo cual podría favorecer su localización perinuclear observada en las inmunofluorescencias de HG de PAA con rigidez de 0.5 kPa y 1 kPa (**Figura 8D**).

Por último, se probó la presencia del receptor nuclear y factor transcripcional PPAR γ en el enriquecimiento de FI de vimentina en los MEFs (**Datos no mostrados**), el cual no se detectó en ninguna de las fracciones de la técnica. Es importante destacar que dicha proteína es relevante en la regulación de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y por ende se encuentra altamente expresada en tejido adiposo y en el hígado. De igual forma, PPAR γ controla la expresión de genes implicados en la diferenciación,

mantenimiento y función de adipocitos y células del sistema inmune, como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T [145].

Si bien, se ha detectado la interacción de vimentina con PPAR γ en los fibroblastos 3T3-L1, es relevante señalar que dicha interacción se observó al estimular la línea celular con insulina, dexametasona y metilisobutilxantina, induciendo la diferenciación de fibroblastos hacia adipocitos [123]. Esto podría explicar la ausencia de PPAR γ en los MEFs sembrados en condiciones de rigidez alta. Aunque, es relevante destacar que en este proyecto no se realizó alguna prueba de funcionalidad del anticuerpo para PPAR γ , por lo cual puede ser un motivo de la ausencia del marcaje.

A pesar de solo detectar la proteína integrina β 1 en la fracción enriquecida de los FI de vimentina mediante inmunoblot en condiciones de alta rigidez, en el gel teñido con azul de Coomassie se aprecian más bandas que podrían formar asociaciones con vimentina, como la banda cuyo peso molecular es aproximado a 250 kDa. Estas proteínas podrían ser identificadas posteriormente por espectrometría de masas. Además, dicho trabajo abre la perspectiva de comparar el patrón proteico obtenido de MEFs sembrados en hidrogeles de PAA suave, así como su identificación, lo cual sería relevante en la señalización estimulada por factores mecánicos en la organización de vimentina.

9. CONCLUSIONES

Se caracterizó la expresión de vimentina en los fibroblastos de ratón en la línea celular 3T3-L1 y en el cultivo primario MEFs a través del marcaje por inmunoblot e inmunofluorescencia, corroborando la importancia del cambio de aminoácido asparagina por treonina en vimentina de ratón para su reconocimiento del anticuerpo monoclonal V9. Así mismo, se observó un aumento en el área celular y la reorganización de los FI de vimentina al incrementar la rigidez de los HG de PAA donde fueron sembrados los MEFs.

Además, se estandarizó el enriquecimiento de FI de vimentina en células 3T3-L1 y MEFs, el cual estuvo basado en el protocolo publicado por Battaglia *et al.*, 2017, lo cual permitió estudiar la probable interacción de vimentina con la integrina $\beta 1$ bajo condiciones de alta rigidez (cultivo estándar), pero no de la proteína 14-3-3.

10. ANEXO 1. SOLUCIONES

Tabla 8. Buffer de lisis celular TNTE

Reactivos	Concentración
Tris-HCl SigmaAldrich, T1503-1KG	50 mM
NaCl Sigma-Aldrich, S7653-1KG	150 mM
Tritón X-100 Sigma Aldrich, X100-500ML	0.5 %
EDTA Sigma Aldrich, E6758-500G	1 mM

Tabla 9. Enriquecimiento de FI basado en Battaglia *et al.*, 2017.

Reactivos	Concentración
Buffer Tritón X-100	
Tritón X-100 Sigma Aldrich, X100-500ML	1%
EDTA Sigma Aldrich, E6758-500G	5 mM
Disuelto en DPBS 1X pH 7.4 Sigma Life Science, D5652-10X1L	
Buffer alto en sales	
Tris-HCl SigmaAldrich, T1503-1KG	10 mM
NaCl Sigma-Aldrich, S7653-1KG	140 mM
KCl J.T. Baker, 3040-01	1.5 M

EDTA Sigma Aldrich, E6758-500G	5 mM
Tritón X-100 Sigma Aldrich, X100-500ML	0.5 %
Disuelto en agua desionizada	
Buffer PBS/EDTA	
EDTA Sigma Aldrich, E6758-500G	5 mM
Disuelto en DPBS 1X pH 7.4 Sigma Life Science, D5652-10X1L	
Buffer SDS	
SDS Sigma Aldrich, L5750-500G	2%
Disuelto en agua desionizada	

Tabla 10. Buffer de corrida, transferencia y TBS tween

Reactivos	Concentración
Buffer de Corrida	
Trizma-Base Sigma Aldrich, T1503-500G	25 mM
Glicina Sigma Aldrich, G8898	250 mM
SDS Sigma Aldrich, L5750-500G	0.1%
Buffer de Transferencia	
Trizma-Base Sigma Aldrich, T1503-500G	48 mM
Glicina Sigma Aldrich, G8898	39 mM

Metanol Meyer, 5420	20%
TBS Tween	
NaCl Sigma-Aldrich, S7653-1KG	14 mM
Trizma-Base Sigma Aldrich, T1503-500G	25 mM
KCl J.T. Baker, 3040-01	3 mM
Tween 20 Sigma Aldrich, SLBS4701	0.1%

11. REFERENCIAS

1. Moeendarbary E, Harris AR. Cell mechanics: principles, practices, and prospects. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2014;6: 371–388.
2. Li L, Eyckmans J, Chen CS. Designer biomaterials for mechanobiology. *Nat Mater*. 2017;16: 1164–1168.
3. Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EHJ, Koenderink GH. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853: 3043–3052.
4. Stamenović D, Smith ML. Tensional homeostasis at different length scales. *Soft Matter*. 2020;16: 6946–6963.
5. Kang I, Weaver VM. Tensional Homeostasis. *Encyclopedia of Cancer*. pp. 2937–2940. doi:10.1007/978-3-540-47648-1_5727
6. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Gudermann T. AT1 receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11: 112–116.
7. Lim CT, Bershadsky A, Sheetz MP. Mechanobiology. *J R Soc Interface*. 2010;7 Suppl 3: S291–3.
8. Martino F, Perestrelo AR, Vinarský V, Pagliari S, Forte G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Frontiers in Physiology*. 2018. doi:10.3389/fphys.2018.00824
9. Wells RG. Tissue mechanics and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013. pp. 884–890. doi:10.1016/j.bbadis.2013.02.007
10. Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20: 457–473.
11. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15: 802–812.
12. Argentati C, Morena F, Tortorella I, Bazzucchi M, Porcellati S, Emiliani C, et al. Insight into Mechanobiology: How Stem Cells Feel Mechanical Forces and Orchestrate Biological Functions. *Int J Mol Sci*. 2019;20. doi:10.3390/ijms20215337
13. Muncie JM, Weaver VM. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. *Curr Top Dev Biol*. 2018;130: 1–37.
14. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840: 2506.

15. Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen A-C, et al. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev Technol.* 2013;11: 70–92.
16. Benders KEM, van Weeren PR, Badylak SF, Saris DBF, Dhert WJA, Malda J. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol.* 2013;31: 169–176.
17. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010;339: 247–257.
18. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017. pp. 43–56. doi:10.1016/j.addr.2017.07.014
19. Black LD, Allen PG, Morris SM, Stone PJ, Suki B. Mechanical and Failure Properties of Extracellular Matrix Sheets as a Function of Structural Protein Composition. *Biophys J.* 2008;94: 1916.
20. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97: 4–27.
21. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma.* 2014;23: S20–3.
22. Badylak SF, Brown BN, Gilbert TW. Tissue Engineering with Decellularized Tissues. *Biomaterials Science.* 2013. pp. 1316–1331. doi:10.1016/b978-0-08-087780-8.00140-6
23. Ou Y-C, Li J-R, Wang J-D, Chang C-Y, Wu C-C, Chen W-Y, et al. Fibronectin Promotes Cell Growth and Migration in Human Renal Cell Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi:10.3390/ijms20112792
24. Vindin H, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin architecture. *Matrix Biology.* 2019. pp. 4–16. doi:10.1016/j.matbio.2019.07.005
25. Green EM, Mansfield JC, Bell JS, Winlove CP. The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface Focus.* 2014;4: 20130058.
26. Yao, Yao Y. Laminin: loss-of-function studies. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017. pp. 1095–1115. doi:10.1007/s00018-016-2381-0
27. Miner JH, Yurchenco PD. LAMININ FUNCTIONS IN TISSUE MORPHOGENESIS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2004. pp. 255–284. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.094555

28. Freudenberg U, Liang Y, Kiick KL, Werner C. Glycosaminoglycan-Based Biohybrid Hydrogels: A Sweet and Smart Choice for Multifunctional Biomaterials. *Adv Mater.* 2016;28: 8861–8891.
29. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2011. pp. 1013–1031. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x
30. Wiltz D, Alexander C, R. L, Blancas AA, C. M, Zhang X, et al. Extracellular Matrix Organization, Structure, and Function. *Calcific Aortic Valve Disease.* 2013. doi:10.5772/52842
31. Marinkovic M, Block TJ, Rakian R, Li Q, Wang E, Reilly MA, et al. One size does not fit all: developing a cell-specific niche for in vitro study of cell behavior. *Matrix Biology.* 2016. pp. 426–441. doi:10.1016/j.matbio.2016.01.004
32. Mao Y, Hoffman T, Wu A, Goyal R, Kohn J. Cell type-specific extracellular matrix guided the differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D polymeric scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2017. doi:10.1007/s10856-017-5912-9
33. Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, Ohnuma K, Myoishi Y, Fukuhara Y, et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells.* 2007;25: 3005–3015.
34. Vogel V. Unraveling the Mechanobiology of Extracellular Matrix. *Annu Rev Physiol.* 2018;80: 353–387.
35. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126: 677–689.
36. Yong KW, Li Y, Huang G, Lu TJ, Safwani WKZW, Pingguan-Murphy B, et al. Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309: H532–42.
37. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016;142: 56–70.
38. Georges PC, Hui J-J, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293: G1147–54.
39. Huang X, Yang N, Fiore VF, Barker TH, Sun Y, Morris SW, et al. Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47: 340–348.

40. Zhao H, Li X, Zhao S, Zeng Y, Zhao L, Ding H, et al. Microengineered in vitro model of cardiac fibrosis through modulating myofibroblast mechanotransduction. *Biofabrication*. 2014;6: 045009.
41. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem*. 2019;120: 2782–2790.
42. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8: 241–254.
43. Alonso-Nocelo M, Raimondo TM, Vining KH, López-López R, de la Fuente M, Mooney DJ. Matrix stiffness and tumor-associated macrophages modulate epithelial to mesenchymal transition of human adenocarcinoma cells. *Biofabrication*. 2018;10: 035004.
44. Chen T, Saw TB, Mège R-M, Ladoux B. Mechanical forces in cell monolayers. *Journal of Cell Science*. 2018. p. jcs218156. doi:10.1242/jcs.218156
45. Angulo-Urarte A, van der Wal T, Huveneers S. Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862: 183316.
46. Meng W, Takeichi M. Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009. pp. a002899–a002899. doi:10.1101/cshperspect.a002899
47. Boopathy GTK, Hong W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7: 49.
48. Ibar C, Kirichenko E, Keepers B, Enners E, Fleisch K, Irvine KD. Tension-dependent regulation of mammalian Hippo signaling through LIMD1. *J Cell Sci*. 2018;131. doi:10.1242/jcs.214700
49. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, et al. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell*. 2011;144: 782–795.
50. Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*. 2013;23: 537–546.
51. Price AJ, Cost A-L, Ungewiß H, Waschke J, Dunn AR, Grashoff C. Mechanical loading of desmosomes depends on the magnitude and orientation of external stress. *Nat Commun*. 2018;9: 5284.

52. Baddam SR, Arsenovic PT, Narayanan V, Duggan NR, Mayer CR, Newman ST, et al. The Desmosomal Cadherin Desmoglein-2 Experiences Mechanical Tension as Demonstrated by a FRET-Based Tension Biosensor Expressed in Living Cells. *Cells*. 2018;7. doi:10.3390/cells7070066
53. Broussard JA, Jaiganesh A, Zarkoob H, Conway DE, Dunn AR, Espinosa HD, et al. Scaling up single-cell mechanics to multicellular tissues – the role of the intermediate filament–desmosome network. *Journal of Cell Science*. 2020. p. jcs228031. doi:10.1242/jcs.228031
54. Garcia MA, James Nelson W, Chavez N. Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018. p. a029181. doi:10.1101/cshperspect.a029181
55. Kadry YA, Calderwood DA. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862: 183206.
56. Isomursu A, Lerche M, Taskinen ME, Ivaska J, Peuhu E. Integrin signaling and mechanotransduction in regulation of somatic stem cells. *Exp Cell Res*. 2019;378: 217–225.
57. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*. 2002;110: 599–511.
58. Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*. 2019;35: 347–367.
59. Zhu L, Plow EF, Qin J. Initiation of focal adhesion assembly by talin and kindlin: A dynamic view. *Protein Sci*. 2021;30: 531–542.
60. Wehrle-Haller B, Imhof BA. Focal Adhesions. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. pp. 588–593. doi:10.1007/3-540-29623-9_3920
61. Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1988. pp. 761–772. doi:10.1016/0896-6273(88)90124-9
62. Elosegui-Artola A, Trepap X, Roca-Cusachs P. Control of Mechanotransduction by Molecular Clutch Dynamics. *Trends Cell Biol*. 2018;28: 356–367.
63. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13: 591–600.
64. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *Journal of Cell Biology*. 2016. pp. 445–456. doi:10.1083/jcb.201609037
65. Burridge K, Guilly C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res*. 2016;343: 14–20.

66. Dasgupta I, McCollum D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J Biol Chem*. 2019;294: 17693–17706.
67. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474: 179–183.
68. Niu L, Jia Y, Wu M, Liu H, Feng Y, Hu Y, et al. Matrix stiffness controls cardiac fibroblast activation through regulating YAP via AT R. *J Cell Physiol*. 2020;235: 8345–8357.
69. Reed F, Larsuel ST, Mayday MY, Scanlon V, Krause DS. MRTFA: a critical protein in normal and malignant hematopoiesis and beyond. *J Biol Chem*. 2021; 100543.
70. Janmey PA, Wells RG, Assoian RK, McCulloch CA. From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation*. 2013. pp. 112–120. doi:10.1016/j.diff.2013.07.004
71. Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J Biochem*. 2017;161: 245–254.
72. Etienne-Manneville S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2018. pp. 1–28. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062534
73. van Bodegraven EJ, Etienne-Manneville S. Intermediate filaments against actomyosin: the david and goliath of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2020;66: 79–88.
74. Nishimura Y, Kasahara K, Inagaki M. Intermediate filaments and IF-associated proteins: from cell architecture to cell proliferation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2019;95: 479–493.
75. Omary MB, Bishr Omary M. “IF-pathies”: a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2009. pp. 1756–1762. doi:10.1172/jci39894
76. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. pp. 3033–3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1
77. Qin Z, Kreplak L, Buehler MJ. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS One*. 2009;4: e7294.
78. Kaus-Drobek M, Mücke N, Szczepanowski RH, Wedig T, Czarnocki-Cieciura M, Polakowska M, et al. Vimentin S-glutathionylation at Cys328 inhibits filament elongation and induces severing of mature filaments in vitro. *The FEBS Journal*. 2020. pp. 5304–5322. doi:10.1111/febs.15321

79. Schwarz N, Leube RE. Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells*. 2016;5. doi:10.3390/cells5030030
80. Toivola DM, Tao G-Z, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol*. 2005;15: 608–617.
81. Human Intermediate Filament Database. [cited 11 May 2021]. Available: <http://www.interfil.org/index.php>
82. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J*. 2014;107: 314–323.
83. Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*. 1991;113: 155–160.
84. Sanghvi-Shah R, Weber GF. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017. doi:10.3389/fcell.2017.00081
85. Wang N, Stamenović D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279: C188–94.
86. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6: 15966–15983.
87. Inagaki M, Nishi Y, Nishizawa K, Matsuyama M, Sato C. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature*. 1987;328: 649–652.
88. Traub P, Vorgias CE. Involvement of the N-terminal polypeptide of vimentin in the formation of intermediate filaments. *J Cell Sci*. 1983;63: 43–67.
89. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15: 163–177.
90. Evans RM, Fink LM. An alteration in the phosphorylation of vimentin-type intermediate filaments is associated with mitosis in cultured mammalian cells. *Cell*. 1982;29: 43–52.
91. Yasui Y, Goto H, Matsui S, Manser E, Lim L, Nagata K-I, et al. Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process. *Oncogene*. 2001. pp. 2868–2876. doi:10.1038/sj.onc.1204407

92. Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem*. 2003;278: 8526–8530.
93. Chou YH, Bischoff JR, Beach D, Goldman RD. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell*. 1990;62: 1063–1071.
94. Chou YH, Ngai KL, Goldman R. The regulation of intermediate filament reorganization in mitosis. p34cdc2 phosphorylates vimentin at a unique N-terminal site. *J Biol Chem*. 1991;266: 7325–7328.
95. Goto H, Kosako H, Tanabe K, Yanagida M, Sakurai M, Amano M, et al. Phosphorylation of Vimentin by Rho-associated Kinase at a Unique Amino-terminal Site That Is Specifically Phosphorylated during Cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. pp. 11728–11736. doi:10.1074/jbc.273.19.11728
96. Yamaguchi T, Goto H, Yokoyama T, Silljé H, Hanisch A, Uldschmid A, et al. Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J Cell Biol*. 2005;171: 431–436.
97. Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J*. 2005;24: 3834–3845.
98. Zhu Q-S, Rosenblatt K, Huang K-L, Lahat G, Brobey R, Bolshakov S, et al. Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene*. 2011;30: 457–470.
99. Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén A-S, Hellman J, Chou Y-H, et al. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci*. 2004;117: 919–932.
100. Ogawara M, Inagaki N, Tsujimura K, Takai Y, Sekimata M, Ha MH, et al. Differential targeting of protein kinase C and CaM kinase II signalings to vimentin. *J Cell Biol*. 1995;131: 1055–1066.
101. Takai Y, Ogawara M, Tomono Y, Moritoh C, Imajoh-Ohmi S, Tsutsumi O, et al. Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. *J Cell Biol*. 1996;133: 141–149.
102. Tsujimura K, Ogawara M, Takeuchi Y, Imajoh-Ohmi S, Ha MH, Inagaki M. Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1994. pp. 31097–31106. doi:10.1016/s0021-9258(18)47395-4

103. Tang DD, Bai Y, Gunst SJ. Silencing of p21-activated kinase attenuates vimentin phosphorylation on Ser-56 and reorientation of the vimentin network during stimulation of smooth muscle cells by 5-hydroxytryptamine. *Biochem J.* 2005;388: 773–783.
104. Cheng T-J, Tseng Y-F, Chang W-M, Chang MD-T, Lai Y-K. Retaining of the assembly capability of vimentin phosphorylated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *J Cell Biochem.* 2003;89: 589–602.
105. Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell.* 1999;10: 1997–2015.
106. Snider NT, Weerasinghe SVW, Iñiguez-Lluhí JA, Herrmann H, Omary MB. Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation. *J Biol Chem.* 2011;286: 2273–2284.
107. Li C, McManus FP, Plutoni C, Pascariu CM, Nelson T, Alberici Delsin LE, et al. Quantitative SUMO proteomics identifies PIAS1 substrates involved in cell migration and motility. *Nat Commun.* 2020;11: 834.
108. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8: 947–956.
109. Wang Z, Pandey A, Hart GW. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6: 1365–1379.
110. Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, Compton PD, Sakabe K, Cheung WD, et al. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal.* 2010;3: ra2.
111. Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell.* 2008;19: 4130–4140.
112. Kueper T, Grune T, Prah S, Lenz H, Welge V, Biernoth T, et al. Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem.* 2007;282: 23427–23436.
113. Icenogle LM, Hengel SM, Coye LH, Streifel A, Collins CM, Goodlett DR, et al. Molecular and biological characterization of Streptococcal SpyA-mediated ADP-ribosylation of intermediate filament protein vimentin. *J Biol Chem.* 2012;287: 21481–21491.
114. Guo M, Ehrlicher AJ, Mahammad S, Fabich H, Jensen MH, Moore JR, et al. The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics. *Biophys J.* 2013;105: 1562–1568.

115. Peng Q, Vermolen FJ, Weihs D. A formalism for modelling traction forces and cell shape evolution during cell migration in various biomedical processes. *Biomech Model Mechanobiol*. 2021;20: 1459–1475.
116. Raab M, Gentili M, de Belly H, Thiam HR, Vargas P, Jimenez AJ, et al. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science*. 2016;352: 359–362.
117. Patteson AE, Vahabikashi A, Pogoda K, Adam SA, Mandal K, Kittisopikul M, et al. Vimentin protects cells against nuclear rupture and DNA damage during migration. *J Cell Biol*. 2019;218: 4079–4092.
118. Murray ME, Mendez MG, Janmey PA. Substrate stiffness regulates solubility of cellular vimentin. *Mol Biol Cell*. 2014;25: 87–94.
119. Kim J, Jang J, Yang C, Kim EJ, Jung H, Kim C. Vimentin filament controls integrin $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell adhesion by binding to integrin through its Ser38 residue. *FEBS Lett*. 2016;590: 3517–3525.
120. Kim J, Yang C, Kim EJ, Jang J, Kim S-J, Kang SM, et al. Vimentin filaments regulate integrin-ligand interactions by binding to the cytoplasmic tail of integrin $\beta 3$. *Journal of Cell Science*. 2016. doi:10.1242/jcs.180315
121. Esue O, Carson AA, Tseng Y, Wirtz D. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J Biol Chem*. 2006;281: 30393–30399.
122. Sutoh Yoneyama M, Hatakeyama S, Habuchi T, Inoue T, Nakamura T, Funyu T, et al. Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. *Eur J Cell Biol*. 2014;93: 157–169.
123. Tsai Y-C, Tsai S-H, Chang EY-C, Hee S-W, Chen W-H, Lee S-C, et al. Cytoskeletal protein vimentin interacts with and regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma via a proteasomal degradation process. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. pp. 1559–1567. doi:10.1002/jcb.24497
124. Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Le CTK, Jambaldorj B, Teshigawara K, et al. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405: 96–101.
125. Tzivion G, Luo ZJ, Avruch J. Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275: 29772–29778.
126. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol*. 2010;Chapter 10: Unit 10.16.

127. Battaglia RA, Kabiraj P, Willcockson HH, Lian M, Snider NT. Isolation of Intermediate Filament Proteins from Multiple Mouse Tissues to Study Aging-associated Post-translational Modifications. *J Vis Exp*. 2017. doi:10.3791/55655
128. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989.
129. Tomiyama L, Kamino H, Fukamachi H, Urano T. Precise epitope determination of the anti-vimentin monoclonal antibody V9. *Mol Med Rep*. 2017;16: 3917–3921.
130. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94: 849–854.
131. Patteson AE, Vahabikashi A, Goldman RD, Janmey PA. Mechanical and Non-Mechanical Functions of Filamentous and Non-Filamentous Vimentin. *Bioessays*. 2020;42: e2000078.
132. Janmey PA, Fletcher DA, Reinhart-King CA. Stiffness Sensing by Cells. *Physiological Reviews*. 2020. pp. 695–724. doi:10.1152/physrev.00013.2019
133. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods*. 2013. doi:10.13070/mm.en.3.163
134. Goldman RD, Cleland MM, Murthy SNP, Mahammad S, Kuczmarski ER. Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J Struct Biol*. 2012;177: 14–23.
135. Ku N-O, Toivola DM, Zhou Q, Tao G-Z, Zhong B, Bishr Omary M. Studying Simple Epithelial Keratins in Cells and Tissues. *Intermediate Filament Cytoskeleton*. 2004. pp. 489–517. doi:10.1016/s0091-679x(04)78017-6
136. Aynardi MW, Steinert PM, Goldman RD. Human epithelial cell intermediate filaments: isolation, purification, and characterization. *J Cell Biol*. 1984;98: 1407–1421.
137. Herrmann H, Aebersold U. *Intermediate Filaments: Structure and Assembly*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8. doi:10.1101/cshperspect.a018242
138. Osborn M, Weber K. The detergent-resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the nucleus and the microfilament bundles. *Experimental Cell Research*. 1977. pp. 339–349. doi:10.1016/0014-4827(77)90179-3
139. Soellner P, Quinlan RA, Franke WW. Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82: 7929–7933.

140. Blikstad I, Lazarides E. Vimentin filaments are assembled from a soluble precursor in avian erythroid cells. *J Cell Biol.* 1983;96: 1803–1808.
141. Lal H, Guleria R, Foster D, Lu G, Watson L, Sanghi S, et al. Integrins: Novel Therapeutic Targets for Cardiovascular Diseases. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry.* 2007. pp. 109–132. doi:10.2174/187152507780363223
142. Leask A. Integrin 1: A Mechanosignaling Sensor Essential for Connective Tissue Deposition by Fibroblasts. *Adv Wound Care.* 2013;2: 160–166.
143. Howe GA, Addison CL. $\beta 1$ integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *Cell Adh Migr.* 2012;6: 71–77.
144. Mariani RA, Paranjpe S, Dobrowolski R, Weber GF. 14-3-3 targets keratin intermediate filaments to mechanically sensitive cell–cell contacts. *Mol Biol Cell.* 2020 [cited 1 Aug 2023]. doi:10.1091/mbc.E18-06-0373
145. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol .* 2021;12: 624112.
144. Cell Signaling Technology. 2017. *A guide to successful immunofluorescence.* <https://media.cellsignal.com/www/pdfs/resources/product-literature/application-if-brochure.pdf>
145. Jamur, M.C., Oliver, C. (2010). Permeabilization of Cell Membranes. In: Oliver, C., Jamur, M. (eds) *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 588. Humana Press
145. Jiménez Escobar, A. (2021). *Aislamiento de adhesiones focales en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en sustratos de rigidez variable.* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
146. National University of Singapore. (2018). How is integrin activated? <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-is-integrin/how-is-integrin-activated/>