



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento de adhesiones focales en
fibroblastos embrionarios de ratón
cultivados en sustratos de rigidez variable**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Alejandra Jiménez Escobar

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Genaro Vázquez Victorio
Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi mamá por siempre creer en mí, por darme todo para que yo pueda estar en donde estoy, por siempre apapacharme, escucharme, y no dejar de sorprenderse por todo lo que voy recorriendo: ¡Mamá, este logro también es tuyo!

A mi padre por el poco o mucho, pero valioso tiempo que pudiste darme, porque aunque ya no estés, también hiciste posible que yo continuara mi camino. Ojalá pudieras ver lo que estoy logrando.

A Jessi y Jenni, hermanas, gracias por todo el amor y el apoyo incondicional sin importar la hora o la situación; son mi pilar de vida, ustedes me dan la fuerza para superarme sin olvidar mi bienestar.

A Alexis y Héctor, que son mi inspiración y motivación. Estaré para ustedes siempre, los amo con cada microgramo de mi ser.

A mi abuela Martha y mis tíos Ramón y Javier, por todo el apoyo desde el primer momento en que supieron de mi existencia

A Rafa por enseñarme desde muy pequeña que no existe un sueño demasiado grande

A Isaac, por ser mi compañero de vida este tiempo y apoyarme desde cada pequeño experimento, hasta los retos más complicados; por darme tanta paz y felicidad. Te amo. También agradezco mucho a tu bella familia por cobijarme en esta recta final para que yo pudiera continuar.

A mis amigas, Anaiza, Maheju, Karol, Ari, Nat, Vero, Sagrario y Stephie. A su lado la ciencia se disfruta más, gracias por motivarme, compartir conmigo este camino y aprender juntas, son increíbles.

A Mariel por creer en mí desde que tengo memoria, aunque ni yo misma creía que podía.

A Fausto, Lana y Luna, por darme el amor y cariño más sincero en los momentos más difíciles, por recibirme con la felicidad más sincera cada que volvía a casa.

A mis tutores, Genaro y Mathieu, infinitas gracias por todo el apoyo académico y motivacional para poder iniciar mi formación académica, por inspirarme al ser grandes humanos y científicos desde que los conozco y compartirme sus grandes conocimientos, ideas y enseñanzas. Por crear un lugar increíble en donde una puede soñar grandes cosas y hacerlas realidad.

A tod@s l@s integrantes de mi segundo hogar, LaNSBioDyT. Gracias por enseñarme que la ciencia no se tiene que sufrir y las grandes cosas que se pueden alcanzar en equipo. Me siento muy afortunada de poder pertenecer aquí.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras-----	6
Abreviaturas-----	7
Resumen-----	8
1. Introducción-----	9
1.1 Mecanobiología y mecanotransducción-----	9
1.2 Estímulos mecánicos que perciben las células-----	9
1.3 Componentes de la matriz extracelular-----	12
1.3.1 Proteínas fibrilares-----	13
1.3.2 Proteoglicanos-----	14
1.3.3 Lamininas-----	15
1.3.4 Fibronectina-----	16
1.4 Uniones intercelulares-----	17
1.4.1 Uniones ocluyentes o estrechas-----	18
1.4.2 Uniones comunicantes-----	20
1.4.3 Uniones adherentes-----	21
1.4.4 Desmosomas-----	22
1.5 Adhesiones focales-----	24
1.5.1 Integrinas-----	26
1.5.2 Componentes citoplasmáticos y maduración de AFs-----	29
1.5.2.1 Talina-----	33
1.5.2.2 Vinculina-----	34
1.5.2.3 Paxilina-----	35
1.6 Adhesiones focales y la respuesta celular a la mecánica-----	37
1.6.1 YAP/TAZ-----	38
2. Antecedentes-----	42
3. Justificación-----	47

4. Hipótesis-----	47
5. Objetivos-----	48
5.1 Objetivo general-----	48
5.2 Objetivos particulares-----	48
6. Diseño experimental y métodos-----	49
6.1 Caracterizar los cultivos con fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones de rigidez controlada (suave y rígido)-----	49
6.2 Identificación de las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en condiciones de cultivo estándar-----	51
6.3 Detección de las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada-----	53
6.3 Métodos-----	54
6.4.1 Cultivo celular-----	54
6.4.2 Hidrogeles de poliacrilamida con rigidez controlada-----	54
6.4.3 Funcionalización de cubreobjetos-----	55
6.4.4 Silanización de portaobjetos-----	55
6.4.5 Polimerización de HGs de PAA-----	55
6.4.6 Fotoentrecruzamiento de proteína-----	57
6.4.7 Caracterización mecánica por microindentación-----	57
6.4.8 Inmunofluorescencia-----	57
6.4.9 Cuantificación del área de esparcimiento celular-----	58
6.4.10 Cuantificación del número y tamaño de adhesiones focales-----	59
6.4.11 Lisis celular, cuantificación de proteínas e inmunoprecipitación (IP)	60
6.4.12 Electroforesis de proteínas e inmunoblot-----	61
6.4.13 Tinción de nitrato de plata (AgNO ₃)-----	62
7. Resultados-----	63
7.1 Los fibroblastos embrionarios de ratón son responsivos a la rigidez del sustrato en el que son cultivados-----	63

7.2 Detección de las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos cultivados en condiciones estándar de cultivo celular-----	66
7.3 Marcaje de vinculina en fibroblastos cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada-----	69
7.4 Las proteínas con dominios LIM como estructuras mecanosensibles bajo esfuerzos celulares-----	71
8. Discusión-----	75
9. Conclusiones-----	82
10. Bibliografía-----	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los tejidos del cuerpo están expuestos a fuerzas de compresión, tensión y estrés cortante-----	9
Figura 2. Gráficas representativas de los comportamientos elásticos y viscoelásticos de los materiales-----	11
Figura 3. Esquema representativo de los componentes de la matriz extracelular (MEC)-----	16
Figura 4. Esquema representativo de las uniones intercelulares y sus principales componentes-----	23
Figura 5. Modelo esquemático de la organización de los complejos de adhesiones focales-----	25
Figura 6. Esquema representativo de las subunidades de integrinas α y β en su conformación plegada (estado inactivo) y en su conformación extendida (estado activo)-----	27
Figura 7. Resumen esquematizado de la maduración de los complejos de adhesiones focales-----	31
Figura 8. Mapa de dominios y motivos de las proteínas talina, vinculina y paxilina con los sitios de unión reportados a otros componentes de adhesiones focales-----	36
Figura 9. Vía de señalización Hippo y su regulación a los cofactores transcripcionales YAP/TAZ-----	40
Figura 10. Esquema del proceso de elaboración de hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada-----	55
Figura 11. Los fibroblastos embrionarios de ratón 3T3L1 responden a la rigidez del sustrato-----	64
Figura 12. Detección de adhesiones focales en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en cubreobjetos de vidrio y cajas de poliestireno-----	67
Figura 13. Marcaje de vinculina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida en sustratos rígidos (20 kPa) y suaves (1 kPa)-----	69

ABREVIATURAS

MEC	Matriz extracelular
Pa	Pascales
kPa	Kilopascales
HGs de PAA	Hidrogeles de poliacrilamida
PDMS	Polidimetilsiloxano
AF	Adhesiones focales

RESUMEN

Las adhesiones focales permiten a las células comunicarse con el medio extracelular a través de una red de integrinas que conecta la matriz extracelular (MEC) con el aparato de esfuerzos tensiles de las células, el aparato de actomiosina, gracias al acoplamiento de numerosas proteínas citoplasmáticas. Estos complejos son capaces de transducir los estímulos mecánicos del exterior, generados por la composición del sustrato y su entrecruzamiento o reticulación (rigidez y elasticidad). En consecuencia, estos estímulos reorganizan el citoesqueleto de actina, continuando con la transducción de señales intracelulares que tienen un impacto en procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación y supervivencia. La composición de los complejos de adhesión focal ha sido estudiada ampliamente. Sin embargo, no se conoce cómo cambian estos complejos cuando varían únicamente las propiedades mecánicas de la MEC, debido a que siempre se ha explorado la formación de estos complejos proteicos en condiciones de alta rigidez o en geles de MEC sin un control adecuado de sus propiedades mecánicas. A fin de conocer la modulación de estos complejos, en el presente trabajo se estableció como objetivo el aislar las proteínas vinculina, paxilina y talina, proteínas mecanotransductoras dentro de las adhesiones focales, y estudiar los posibles cambios en los complejos proteicos de adhesión focal en condiciones de cultivo con diferente rigidez. Primeramente, se estandarizó la detección de las proteínas de adhesiones mediante inmunofluorescencia e inmunoblot, en el modelo de fibroblastos embrionarios de ratón. Posteriormente, se cultivaron en hidrogel de poliacrilamida con módulos de elasticidad de 1 kPa (suave) y 20 kPa (rígido) para evaluar la respuesta de los fibroblastos a condiciones de rigidez distintas mediante el estudio de su esparcimiento y activación de las proteínas YAP/TAZ. Asimismo, se evaluó el efecto de la rigidez en la formación de adhesiones focales y la co-inmunoprecipitación de proteínas con las proteínas de adhesión focal. Finalmente, se propone en el presente trabajo a las proteínas con dominios LIM como proteínas modelo para investigar los cambios en el reclutamiento de los complejos de adhesiones focales debido a que responden a las estructuras contráctiles reguladas por las propiedades mecánicas extracelulares.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Mecanobiología y mecanotransducción*

La mecanobiología es una rama emergente de la biología que surge a partir de la necesidad de integrar a este campo diversas áreas de estudio, como la física y la ingeniería, con el objetivo de dilucidar el papel de los estímulos físicos, en los sistemas biológicos (Jansen et al., 2015; Martino et al., 2018). Su estudio abarca los distintos niveles de organización biológica, desde niveles moleculares hasta órganos y sistemas completos en una gran variedad de contextos fisiopatológicos; por ejemplo, en enfermedades cardiovasculares y pulmonares en las cuales se estudia la relación de los estímulos físicos como los latidos del corazón y la expansión y contracción pulmonar, con el desarrollo de dichas patologías (Humphrey et al., 2014).

Las células transforman los estímulos físicos a los que están expuestas, en respuestas celulares mediante el proceso de mecanotransducción (Vogel & Sheetz, 2006). Esto es posible debido a que las células cuentan con moléculas, principalmente proteínas, caracterizadas como *mecanosensibles*, las cuales al percibir los estímulos físicos responden a través de diferentes mecanismos tales como el despliegue de sus dominios, por medio de modificaciones post-traduccionales, de su reclutamiento intracelular o de sus interacciones con otras proteínas a través del reconocimiento especial. Estos cambios a su vez repercuten en vías de señalización que regulan diferentes procesos celulares como la proliferación y migración celular (Martino et al., 2018).

1.2 *Estímulos mecánicos que perciben las células*

Las células dentro de los tejidos que conforman al cuerpo están sujetas a diferentes estímulos mecánicos provenientes principalmente de la mecánica de la matriz extracelular, del confinamiento celular, de su exposición al flujo laminar derivado de algunos fluidos como la sangre, entre otros. De tal forma que las células están constantemente en contacto con fuerzas perpendiculares a su superficie como de compresión y de tensión o por fuerzas paralelas a la superficie de las células como de esfuerzo cortante (**Figura 1**) (Wells, 2013). Dichos estímulos, ejercen un esfuerzo ($\sigma = stress$, por su traducción al inglés) en las células, definido como la fuerza aplicada por área y se reporta en unidades de Newton por m^2 (N/m^2), lo que equivale a Pascales (Pa) (*por tanto* $1 pN/\mu m^2 = 1 kPa$). En consecuencia,

estas fuerzas generan una deformación ($\epsilon = \textit{strain}$, por su traducción al inglés) en los tejidos o las células que se usa como una medida normalizada de los cambios en la longitud o en los ángulos del material en cuestión (Humphrey et al., 2014).

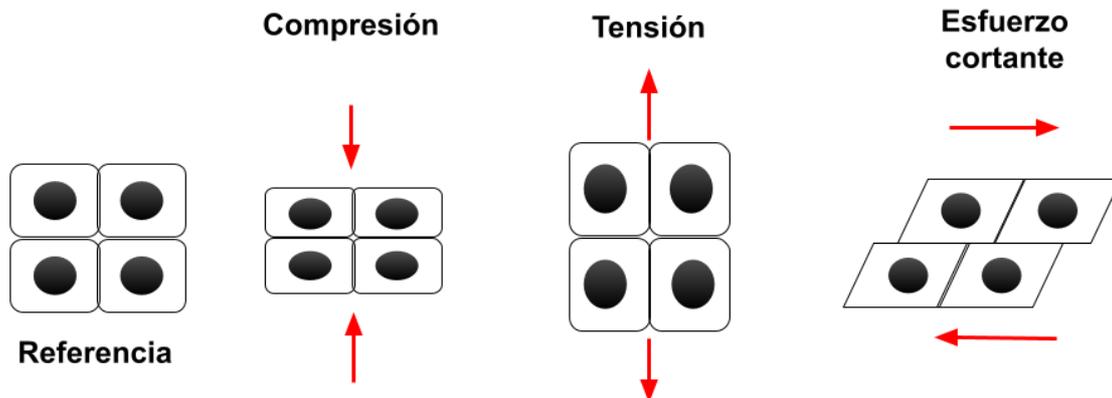


Figura 1. Los tejidos del cuerpo están expuestos a fuerzas de compresión, tensión y estrés cortante. Existen fuerzas paralelas a la superficie celular como de compresión y tensión; en la compresión los esfuerzos se ejercen en dirección hacia la superficie de las células (representado por las flechas rojas), mientras que en la tensión se direccionan a los lados opuestos de esta superficie. Por otra parte, los esfuerzos de tipo cortante deforman de manera paralela a la superficie de las células y se ejercen en direcciones opuestas esta superficie (Modificada de Wells, 2013).

Para el caso de las células en contacto directo con fluidos, destaca su exposición a los esfuerzos de tipo cortante. Estos provienen de las fuerzas de fricción que ejercen los fluidos de forma paralela a la superficie del material (Baeyens & Schwartz, 2016). Por lo que el esfuerzo cortante se define como las fuerzas tangenciales (F) ejercidas al área de la superficie (A) del material al que son aplicadas ($\tau = F/A$). Este depende entonces de diferentes factores como las propiedades del flujo, así como de las características geométricas de la superficie; al conocer la naturaleza del sistema y la aplicación de mecánica de fluidos, se puede determinar la fuerza ejercida del fluido al material (Roux et al., 2020).

Por otra parte, existen células sujetas constantemente a esfuerzos de tensión extrínsecos, como los cardiomiocitos o los neumocitos. Los cardiomiocitos y el resto de las células del músculo esquelético, cuentan con sarcómeros (su unidad estructural contráctil) los cuales se estiran longitudinalmente generando las fuerzas tensiles de la misma magnitud en cada latido del corazón, así como los neumocitos tras la entrada de aire a los pulmones (Enoka y Duchateau, 2019). Además de los esfuerzos externos, las células generan esfuerzos

internos debidos a la organización basal de su aparato contráctil (aparato de actomiosina), o *pre-stress*, y que responde al tejido en el que residen las células o a las condiciones de cultivo (Ingber, 2018). La relación entre la tensión intracelular y la rigidez de la matriz extracelular es uno de los factores físicos más explorados en la mecanobiología. La rigidez se puede definir como la resistencia de un material a la deformación al aplicar un esfuerzo y es una propiedad intrínseca de cada material. El parámetro físico que describe la rigidez de un material elástico es el módulo de elasticidad o módulo de Young ($E = \sigma/\epsilon$) y se reporta en Pa (Figura 2B). Un módulo de Young bajo, presente en un material suave, refleja que se deforma más bajo cierto esfuerzo comparado con un módulo alto de un material rígido en el que, aplicando el mismo esfuerzo, se deforma mucho menos (Akhtar et al., 2011).

Los materiales elásticos tienen la capacidad de regresar a su posición original una vez liberado el esfuerzo, siempre y cuando se realice dentro de su región elástica, ya que si este esfuerzo la sobrepasa, el material puede presentar un comportamiento plástico en donde la deformación será irreversible y puede llegar al grado de la ruptura del material. Sin embargo, los tejidos del cuerpo no son enteramente elásticos, sino que presentan comportamientos viscoelásticos. La viscoelasticidad es la propiedad de los materiales que poseen características viscosas además de las elásticas. La deformación del material depende del tiempo en el que se aplique el esfuerzo ya que a diferencia de los materiales puramente elásticos, existe un rearrreglo distinto del material al haber disipación de energía (Jafari et al., 2016) (**Figura 2B**). Derivados de sus características viscoelásticas existen efectos conocidos como la relajación del esfuerzo (*stress relaxation*) y la deformación por fluencia lenta (*creep*) (Zhang et al., 2019).

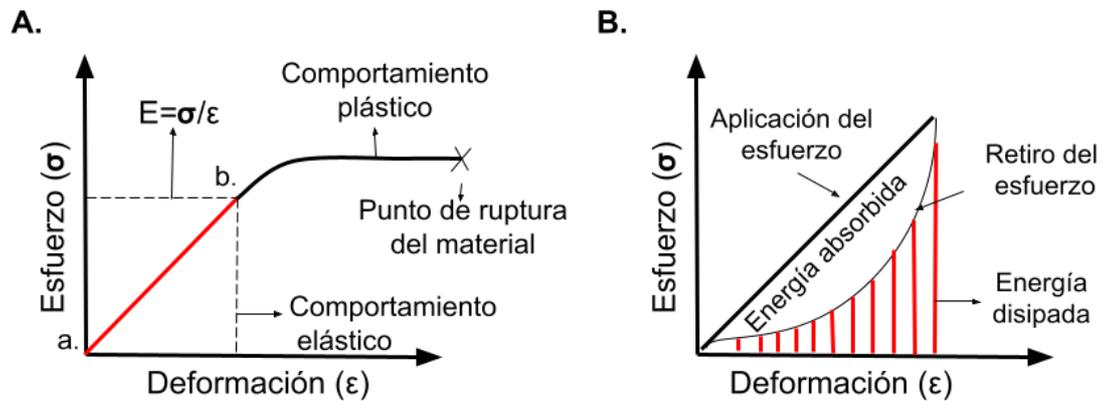


Figura 2. Gráficas representativas de los comportamientos (A) elásticos y (B) viscoelásticos de los materiales. (A) En un material con comportamiento elástico, al aplicar un esfuerzo dentro del rango de su región elástica (del punto “a” al “b”), se deforma su superficie y esta se caracteriza por regresar a su posición original al retirar dicha fuerza. Si el esfuerzo aplicado excede la magnitud tolerable de su comportamiento elástico, la deformación será irreversible (comportamiento plástico) y si esta se excede lo suficiente, se puede llegar a la ruptura del material. **(B)** Por otra parte, en los materiales con comportamientos viscoelásticos, la deformación depende del tiempo en que se aplique el esfuerzo. Al existir absorción y disipación de la energía aplicada, se genera un diferente rearrreglo del material al liberar el esfuerzo (Modificado de Lavocat. 2014 y Cheung & Zhang, 2006).

Además de los mencionados, cabe destacar que los tejidos del cuerpo son anisotrópicos en sus propiedades físicas, tales como la elasticidad y viscoelasticidad, lo que significa que la resistencia a la deformación dependerá de la dirección en la que se aplique el esfuerzo (Jansen et al., 2015). Todas estas propiedades físicas de los tejidos, en particular la elasticidad y viscoelasticidad, son atribuidas en gran medida a la composición y organización de la matriz extracelular, sus componentes y arquitectura resultan elementos importantes para explicar la respuesta a los estímulos mecánicos.

1.3 Componentes de la matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional, específica de cada tejido, compuesta de proteínas fibrilares, proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Figura 1). Esta red provee soporte físico a las células y su mantenimiento es dependiente de las mismas células que sostiene. Adicional a las proteínas fibrilares y proteoglicanos (PGs), la MEC también está constituida por otro tipo de moléculas como agua, iones y citocinas (Mouw et al., 2014). A continuación se describen las características de algunos de los componentes principales que conforman la MEC.

1.3.1 Proteínas fibrilares

Las colágenas constituyen el grupo de las proteínas fibrilares y son uno de los principales componentes de la MEC (Figura 3A). Están constituidas por una triple hélice de cadenas polipeptídicas alfa agrupadas en homotrímeros o heterotrímeros que cuentan con motivos ricos en glicina y prolina dentro de su secuencia (Mouw et al., 2014). A la fecha, han sido descritos 28 tipos de colágenas, las cuales se pueden dividir en colágenas fibrilares, reticulares y tipo FACIT, que por sus siglas en inglés, *Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple hélices*, hacen referencia a las colágenas asociadas a fibrillas con triple hélices interrumpidas (Yue, 2014).

Las colágenas fibrilares abarcan a las colágenas tipo I, II, III, V, entre otras, y están ampliamente distribuidas en el cuerpo de los vertebrados destacando su localización en la piel, huesos, tendones y ligamentos. La longitud de estas moléculas varía de los 75 nm hasta los 425 nm. Tras ensamblarse en trímeros, se asocian con una periodicidad de 67 nm, formando fibrillas las cuales tienen un diámetro que va de los 15 nm a los 500 nm aproximadamente. A la vez, las fibrillas se asocian paralelamente formando fibras presentes principalmente en los tendones (Mouw et al., 2014). Dentro de las colágenas reticulares, se encuentra principalmente la colágena tipo IV y se caracteriza por formar parte de la membrana basal que delimita a los tejidos epiteliales del tejido conectivo. Tienen una longitud de 400 nm y se asocian formando dímeros o tetrámeros que a la vez forman una red delgada de 30 nm de ancho con ramificaciones cada 20 nm. En esta clasificación también se incluyen a las colágenas VIII y X las cuales forman hexámeros en el cartílago principalmente (Bachinger, 2010; Yang, 2008). Por otra parte, las colágenas tipo FACIT, como sus siglas lo indican, no se asocian en fibras, sino que se incorporan a las colágenas fibrilares, como las tipo IX, XII, XIV; ejemplo de estas son las las colágenas tipo IX asociadas a las fibrillas que se ubican en el cartílago compuestas principalmente por colágena tipo II (Ricard-Blum, 2011).

Las funciones de las diferentes colágenas han sido estudiadas principalmente por la capacidad estructural que confieren a las células que sostienen; aportan a la arquitectura específica de cada tejido y al mismo tiempo contribuyen a las propiedades mecánicas tales como la rigidez y la viscoelasticidad dentro de cada tejido. Adicionalmente, las colágenas al interactuar con los receptores membranales de las adhesiones focales, las integrinas, participan en la regulación de distintos procesos celulares importantes como la

diferenciación y migración celular (Ricard-Blum, 2011). Por lo que defectos en su estructura o depósito dentro de la MEC pueden conllevar a diversas enfermedades. Existen mutaciones en los genes que codifican a las moléculas de colágena asociadas a enfermedades como la osteogénesis imperfecta, un trastorno hereditario ocasionado por mutaciones que afectan la colágena I que provocan algunas fracturas o cientos de ellas que pueden ocurrir sin causa aparente; así como el síndrome Ehlers–Danlos, un grupo de trastornos hereditarios que afectan el tejido conjuntivo debido a defectos en la síntesis de colágeno provocando piel frágil e hipermovilidad de las articulaciones. Por otra parte, el excesivo depósito de estas proteínas es característico de enfermedades fibróticas que pueden ser desencadenadas por múltiples factores, como por cuadros inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes o por la exposición a radiación o algunas toxinas. Durante la fibrosis, los miofibroblastos, encargados de producir los componentes de la MEC, depositan la colágena continuamente y al mismo tiempo, disminuye su degradación, la cual es realizada por algunas enzimas como las metaloproteasas; de forma que existe un incremento de colágena con el tiempo, lo que consecuentemente altera la homeostasis del tejido en cuestión (Wynn, 2008).

Por otra parte, existen otras proteínas fibrilares aparte de las colágenas, como las elastinas. Estas proteínas son polipéptidos con características hidrofóbicas que forman fibras a través del entrecruzamiento de varios monómeros de tropoelastina, el cual es el precursor soluble de la elastina (**Figura 3A**). Como su nombre lo indica, estas fibras confieren al tejido alta capacidad de elasticidad; son de las principales proteínas estructurales que conforman las arterias y los ligamentos elásticos (Mithieux & Weiss, 2005). La tropoelastina y sus productos de degradación, también interactúan con las integrinas o indirectamente con ayuda de otras proteínas de la MEC como la proteína de unión a elastina. Se ha reportado que su interacción con las células interviene en procesos celulares como la adhesión celular, la quimiotaxis en monocitos, así como en la migración y proliferación de fibroblastos (Almine et al., 2012; P. Lee et al., 2014).

1.3.2 Proteoglicanos (PG)

Los PGs son macromoléculas de la MEC presentes en la mayoría de los tejidos de los vertebrados y pueden ser componentes dominantes como en el tejido cartilaginoso. Están compuestos por una proteína central unida covalentemente a cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAGs) (Couchman & Pataki, 2012). Los GAGs son cadenas de polisacáridos compuestas por disacáridos repetidos con cargas negativas debido a que

están sulfatadas o cuentan con grupos carboxílicos en la mayor parte de la molécula (**Figura 3B**). En la estructura general de estos disacáridos, uno de los carbohidratos es un aminoazúcar, como la N-acetilgalactosamina y el segundo es usualmente un ácido urónico, como el ácido glucurónico (Kusindarta & Wihadmadyatami, 2018). Los principales glicosaminoglicanos son el keratan sulfato, heparán sulfato, dermatán sulfato, hialuronano y condroitín sulfato. Dentro de los PGs también se encuentran los SLRPs (por sus siglas en inglés *Small Leucine-Rich Proteoglycans*), que como su nombre lo indica, son proteoglicanos ricos en el aminoácido leucina y son moléculas pequeñas; sus proteínas centrales tienen un peso de 40-60 kDa, como decorina y lumican (Figura 3B) (Hultgårdh-Nilsson et al., 2015).

Los PGs principalmente proveen agua al ser moléculas altamente hidrofílicas. Asimismo, aportan resistencia compresiva a los tejidos al contar con una gran cantidad de cargas negativas que permita retener moléculas como agua y cationes divalentes así como para generar alta presión osmótica (Yue, 2014). En cuanto al aporte bioquímico, los PGs interaccionan con factores de crecimiento así como con receptores celulares, participando en procesos de señalización que intervienen en algunos procesos celulares como la angiogénesis, la adhesión celular, la migración y la proliferación (Frantz et al., 2010). De manera destacada, los SLRPs intervienen en el ensamblaje de las colágenas fibrilares (Mouw et al., 2014).

1.3.3 Lamininas

Las lamininas son un grupo de glicoproteínas ubicadas diferencialmente durante el desarrollo embrionario, como la laminina 111, así como en los tejidos maduros en los que principalmente forman parte de la membrana basal (MB) de los tejidos epiteliales como la laminina 511 que se encuentra en la MB de los pulmones y riñones (Kruegel & Miosge, 2010)

Estas proteínas son de gran tamaño, con un peso molecular que abarca de los 400-800 kDa debido a su glicosilación. Su estructura se compone por tres subunidades polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, denotadas como α , β y γ , dispuestas en un arreglo triple helicoidal que genera una estructura en forma de cruz y se han encontrado hasta el momento menos de 16 combinaciones heterotriméricas (**Figura 3C**) (Aumailley et al., 2005).

En cuanto a las funciones de las lamininas, destaca el extremo N-terminal de las subunidades, ya que permite la interacción con otros componentes de la MEC presentes en la membrana basal como colágena IV; mientras que el extremo C-terminal de las mismas, se asocia con proteínas de la membrana plasmática de las células tales como integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$. Por tanto, sirven como puente entre las colágenas y los epitelios. Se ha destacado su importancia en el ensamblaje y estabilidad de la matriz extracelular así como en la señalización de las células con el medio extracelular (Aumailley, 2013; Kruegel & Miosge, 2010).

1.3.4 Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína que existe principalmente como homodímero de 250 kDa cada subunidad (**Figura 3C**). Existe de manera soluble principalmente en el plasma sanguíneo e insoluble en la matriz extracelular en donde se ensambla en estructuras fibrilares (Pankov & Yamada, 2002). Cada subunidad de fibronectina consta de tres módulos que tienen distintas estructuras, denotados como I, II y III. Los módulos I y II pueden formar un par de enlaces disulfuros cercanos al extremo C-terminal que estabilizan el dímero, mientras que el módulo III carece de estos enlaces (Schwarzbauer & DeSimone, 2011).

Las formas insolubles son el grupo de fibronectinas más abundantes y heterogéneas; existen isoformas específicas generadas por splicing alternativo dependiendo de la especie, el tipo celular, así como la etapa del desarrollo (Pankov & Yamada, 2002). Las fibronectinas están involucradas en funciones celulares importantes como adhesión, migración y diferenciación. Cada módulo de la fibronectina cuenta con diferentes dominios que le permiten a la fibronectina la formación de estructuras fibrilares así como la interacción con otras proteínas de la MEC o receptores celulares (Singh et al., 2010).

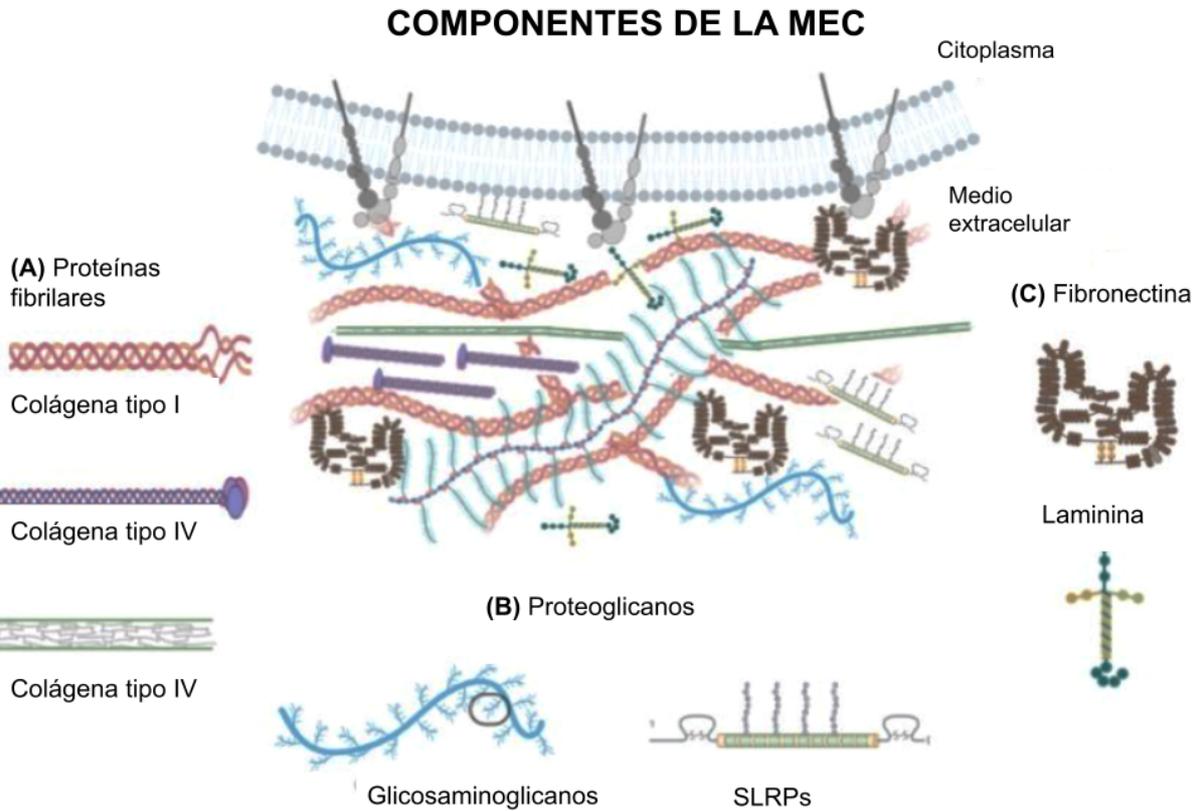


Figura 3. Esquema representativo de los componentes de la matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta principalmente por proteínas fibrilares, proteoglicanos (PG), otras moléculas de adhesión como fibronectina o laminina, así como por agua, iones y citocinas. **(A)** Dentro de las proteínas fibrilares, las colágenas son los componentes principales, tienen un arreglo trimérico de alfa hélices. En la figura se encuentra representada la colágena I, que es la de tipo fibrilar más abundante, así como la colágena IV, la cual es la más representativa de las de tipo reticulares. Asimismo, la elastina es un polipéptido formador de fibras a través del entrecruzamiento de tropoelastina. **(B)** Por otra parte, los PG están formados por proteínas fibrosas unidas covalentemente a glicosaminoglicanos (disacáridos con cargas negativas). Esta clasificación también incluye a los SLRPs. **(C)** La MEC también está constituida por otras moléculas de adhesión como las glicoproteínas fibronectina, existente principalmente como homodímero, y las lamininas, que tienen un arreglo triple helicoidal. *(Imagen creada en Biorender.com)*

1.4 Uniones intercelulares

Las células además de estar en contacto con los diferentes componentes de la matriz extracelular también interactúan y se comunican con otras células cercanas dentro de los tejidos (Angulo-Urarte et al., 2020). Las uniones intercelulares se pueden clasificar principalmente en 3 diferentes categorías dependiendo de las proteínas involucradas y de sus funciones celulares: 1) las uniones ocludentes o estrechas, 2) las uniones comunicantes

y 3) las uniones de anclaje que comprenden a las uniones adherentes y desmosomas, las cuales se describirán en los siguientes apartados (**Figura 4**) (Alberts, 2002).

1.4.1 Uniones estrechas

Las uniones estrechas son complejos proteicos presentes entre células de tejidos epiteliales y endoteliales como la epidermis, próstata y cerebro, caracterizados por formar conexiones semipermeables con las células adyacentes y por mantener la polarización de las células al delimitar la porción membranal apical de la basolateral (Zihni et al., 2016). Los componentes principales de estas uniones son tres proteínas transmembranales: las claudinas, las proteínas JAM (por sus siglas en inglés, *Junctional Adhesion Molecule*) y las proteínas con dominios MARVEL (occludinas, trucelulina, y marvelD3). Dentro del citoplasma, se reconoce una placa intracelular formada por un complejo proteico en donde resalta la proteína citoplasmática zonula occludens (ZO) (**Figura 4A**) (Vermette et al., 2018).

De manera destacada, las claudinas son las proteínas indispensables para la formación de uniones estrechas y su respectiva función de barreras. Estas proteínas tienen un peso molecular de 27 kDa y están agrupadas en una familia de genes integrada por 26 componentes. Estas proteínas cuentan con un dominio citoplasmático con los extremos amino y carboxilo terminal en la porción intracelular, cuatro dominios transmembranales y dos dominios extracelulares que facilitan su interacción con las claudinas de células adyacentes de manera homotípica y heterotípica (Morrow et al., 2010). Están principalmente involucradas en la permeabilidad selectiva de iones entre células, por lo que existe especificidad en su función dependiendo del tipo de claudina; por ejemplo, la claudina-5 facilita la estrechez de las uniones y la claudina-2 reduce esta función mediante la formación de poros (Vermette et al., 2018).

Por otra parte, las occludinas tienen un peso aproximado de 65 kDa y pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios transmembranales MARVEL. De manera similar a las claudinas, cuentan con cuatro dominios transmembranales, dos extracelulares con los que interactúan con occludinas de células adyacentes y tres citoplasmáticos con los extremos amino y carboxilo terminal en la región intracelular (Morrow et al., 2010). Cabe destacar que existen excepciones en las que uniones claudina-occludina entre células también pueden ocurrir. La función de las occludinas se ha asociado principalmente al reclutamiento de otras proteínas a estos complejos como a las proteínas ZO y además,

unen directamente al citoesqueleto de actina, por lo que tiene un papel importante en el mantenimiento de las uniones estrechas (Blasig et al., 2011).

Las proteínas JAM pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios tipo inmunoglobulinas (Ig), siendo JAM-A, JAM-B, JAM-C las principales en las uniones estrechas de células epiteliales y endoteliales; no obstante, también se encuentran en algunas células del sistema inmune como linfocitos. Están conformadas por un dominio extracelular en donde se ubica el extremo amino terminal caracterizado por dos dominios tipo Ig, un pase transmembranal y en su porción citoplasmática está el extremo carboxilo terminal que cuenta con un motivo de unión al dominio PDZ (Ebnet et al., 2004). Las proteínas JAM son capaces de formar uniones homotípicas y heterotípicas con otras JAM o con otras proteínas como integrinas. Están involucradas en la permeabilidad de moléculas en las uniones estrechas así como en otras funciones como la migración de leucocitos y angiogénesis (Mandell & Parkos, 2005).

Las proteínas ZO (*Zona Occludens*) pertenecen a la familia MAGUK (por sus siglas en inglés *membrane associated guanylate kinase protein*) siendo las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 las proteínas características de las uniones estrechas. Constan de diversos dominios y motivos proteicos como los dominios PDZ, SH3, GUK que les permite interactuar con diferentes proteínas como las claudinas, otras proteínas ZO, algunas cinasas y reguladores transcripcionales; así como con el aparato de actomiosina (González-Mariscal et al., 2000).

Su composición e interacciones posibilita el papel de las uniones estrechas en diferentes vías de señalización; tal es el caso de la asociación de ZO-1 con el factor transcripcional ZONAB el cual regula genes que intervienen en la proliferación celular (Garcia et al 2018). Además, Oka en 2010 reportó que ZO-2 forma un complejo con la isoforma 2 del cofactor transcripcional YAP (YAP-2) al interactuar a través de su dominio de unión a PDZ. El grupo también reportó que la proteína ZO-2 silvestre (comparada con una mutante que no puede entrar al núcleo) aumenta la translocación nuclear de YAP-2 en donde ambas proteínas co-localizan y adicionalmente encontraron que ZO-2 promueve la apoptosis y proliferación dependiente de YAP (Oka et al 2010).

Por otra parte, cabe resaltar que se ha reportado que ZO-1 tiene una conformación desplegada al estar activa y una plegada al estar inactiva en respuesta a la contractilidad del aparato de actomiosina así como por los esfuerzos, ejercidos mediante pinzas

magnéticas, lo que sugiere el papel de esta proteína de uniones estrechas en la percepción y respuesta de los esfuerzos mecánicos; sin embargo, hacen falta estudios para conocer el mecanismo mediante el cual este proceso sucede (Spadaro et al 2017).

1.4.2 Uniones comunicantes

Este tipo de uniones están ampliamente distribuidas en las células del cuerpo humano con excepción de eritrocitos, células del músculo esquelético y espermatozoides maduros. Están constituidos por hexámeros, denominados conexones, de la proteína conexina en vertebrados (e innexina en invertebrados), los cuales permiten la unión entre células contiguas así como el intercambio iones y metabolitos (**Figura 4D**) (Nielsen et al., 2012).

Las conexinas conforman una familia de 21 genes cuyas proteínas están agrupadas en cinco grupos (α , β , γ , δ y ϵ) dependiendo de su identidad en secuencia. Están constituidas por tres pasajes transmembranales, dos dominios extracelulares con los extremos amino y carboxilo terminales en la región citoplasmática. Los conexones pueden tener un arreglo homomérico o heteromérico dependiendo del tipo de conexinas presentes. Estos hexámeros pueden formar hemicanales al no interactuar con conexinas adyacentes, sin embargo, en las uniones comunicantes, los dominios extracelulares permiten que células adyacentes puedan interactuar a través de puentes disulfuro de manera homotípica o heterotípica. Por tanto existen cuatro combinaciones posibles de la estructura de las uniones comunicantes dependiendo de la compatibilidad de las conexinas, lo que refleja su variedad de funciones (Meşe et al., 2007).

La comunicación celular mediante este tipo de uniones es esencial principalmente para el transporte de iones, aminoácidos y nucleótidos. Se sabe que todas las moléculas mayores a 1 kDa son incapaces de atravesar los conexones y actualmente también se sabe que estos canales son sensibles al voltaje, la conductancia y el pH, por lo que además del tamaño, existe una permeabilidad selectiva de las moléculas que se transportan (Nielsen et al., 2012). Esta función es esencial en grandes agregados celulares como en la epidermis en donde existe un patrón espacio temporal de expresión de conexinas (Meşe et al., 2007). También tienen un papel importante en células excitables como neuronas y células de músculo liso y cardíaco al permitir su sincronización y la rápida transmisión eléctrica. Por ello, se ha reportado que mutaciones en las conexinas pueden causar diversas patologías, tal es el caso de desórdenes en la piel o en la desmielinización del sistema nervioso periférico (Goodenough & Paul, 2009).

1.4.3 Uniones adherentes

Las uniones adherentes son complejos proteicos indispensables para mantener la comunicación entre células, la cohesión de los tejidos y la polaridad celular. Esto se logra por medio del anclaje de proteínas de un cruce transmembranal dependientes de calcio llamadas cadherinas con el aparato de actomiosina (**Figura 4B**) (Harris & Tepass, 2010).

La superfamilia de las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} dividida en tres familias: la familia de cadherinas mayores, distribuida principalmente en las uniones célula-célula; la familia de protocadherinas, involucradas en el reconocimiento de células neuronales; y la familia de proteínas relacionadas a cadherinas, la cual tiene componentes con funciones diversas como de proteínas chaperonas (Gul et al., 2017). Las proteínas de la familia de cadherinas mayores están involucradas en la formación de uniones adherentes y desmosomas. Para el caso de las uniones adherentes, algunas cadherinas se han asociado a ciertos tejidos, aunque no de manera exclusiva: E-cadherina y P-cadherina se encuentran principalmente en los epitelios, VE-cadherina en las células de la vasculatura (endoteliales), mientras que N-cadherina predominantemente en células no epiteliales como en células neuronales y musculares (Angulo-Urarte et al., 2020).

La estructura de las cadherinas consiste en un ectodominio compuesto de dos o más dominios extracelulares arreglados en tándem cuyo número varía dependiendo de la proteína. Estos dominios cuentan con motivos de unión a Ca^{2+} que le permiten formar uniones con las cadherinas de células adyacentes, principalmente de manera homofílica, con excepciones heterofílicas (Halbleib & Nelson, 2006). De manera particular, las cadherinas clásicas, como E-cadherina, cuentan con 5 dominios extracelulares en su ectodominio que forman uniones homofílicas, tienen un pase transmembranal y en su porción citoplasmática cuentan con dominios de unión a un grupo de proteínas llamadas cateninas, formando un centro proteico cadherina-catenina. Al interactuar con cateninas como β -catenina y p120 catenina, se recluta a la α -catenina, que secuencialmente se asocia con otras proteínas como vinculina para unir los filamentos de actina a este complejo proteico; lo que finalmente formaliza las uniones adherentes entre las células (Harris & Tepass, 2010).

Las uniones adherentes además de ser estructuras que permiten la unión entre células adyacentes, son complejos altamente dinámicos por lo que constantemente se están

degradando los sitios de adhesión existentes y generando nuevos. Este tipo de uniones son reguladas por numerosas fosfatasas, GTPasas y cinasas, como por las de la familia de la GTPasa de Rho o por proteínas del complejo regulador de polaridad celular. De modo que las cadherinas también están involucradas en el establecimiento de la polaridad celular gracias a su interacción con los complejos que delimitan la porción apical (Complejo Par3/Crumbs/Patj/Pals1/Par-6/aPKC), y basolateral (Complejo Scrib/ Dlg/Lgl/Par-1). Estos complejos se localizan de manera excluyente gracias a zonas establecidas por las uniones adherentes para posteriormente delimitar las regiones apical y basolateral (Baum & Georgiou, 2011). La interacción de las uniones adherentes con estos complejos contribuye a la localización y estabilidad de otros componentes celulares así como para el tráfico ordenado de moléculas (Coopman & Djiane, 2016).

También se ha reportado que algunas de las proteínas reclutadas en estos complejos son capaces de percibir los esfuerzos que cada célula adyacente ejerce sobre otra (señales mecánicas). Esto es logrado a través del despliegue de la molécula para el caso de α -catenina y del subsecuente reclutamiento de vinculina. Al establecerse la unión cadherina-cadherina se transmiten los esfuerzos lo que permite la activación de las proteínas mecanosensibles. Por tanto, los cambios en las señales mecánicas repercuten en la formación y funcionamiento de las uniones adherentes afectando su papel en la regulación de las vías de señalización en las que están involucradas (Angulo-Urarte et al., 2020). La formación de las uniones adherentes entre diferentes estratos celulares permite el establecimiento de los distintos niveles de organización entre ellos. Por ejemplo, en el caso de la formación del tubo neural y el neuroectodermo se establece por la expresión diferencial de las uniones celulares entre células que expresan E-cadherina y N-cadherina donde las células con mayor cohesión (E-cadherina) desplazan al interior las células con una menor cohesión (N-cadherina) (Hashimoto 2019).

1.4.4 Desmosomas

Los desmosomas son uniones intercelulares características de las células de tejidos que están constantemente expuestos a esfuerzos de compresión y tensión como la epidermis o la musculatura del corazón (Angulo-Urarte et al., 2020). Son uniones dependientes de Ca^{2+} derivadas de las uniones adherentes ya que también están conformadas por cadherinas; sin embargo, las proteínas transmembranales que las constituyen son las desmocolinas y desmogleínas. Además, estas proteínas conectan a los filamentos intermedios y no al aparato de actomiosina, de modo que proveen la resistencia adecuada a los esfuerzos a los

que se exponen las células en las que se encuentran (Saito et al 2012). En su porción intracelular interactúan con proteínas de la familia armadillo como placoglobina o placofilina, así como de la familia plaquina, como desmoplaquina que facilitan el reclutamiento de los filamentos intermedios (**Figura 4C**) (Dusek et al., 2007).

Además del papel en la adhesión celular, las proteínas de desmosomas, intervienen en la señalización celular a través de vías de señalización como en la ruta Wnt. Adicionalmente, algunos grupos de trabajo han demostrado que desmogleína-2 es responsiva a ciertos rangos de fuerza alrededor de los 1.5 pN, (similar a lo observado en E-cadherina) (Baddam et al., 2018). Esta proteína permite la generación de fuerzas tensiles gracias al citoesqueleto y los filamentos a los que se asocia, en respuesta a la aplicación de esfuerzos como en la contracción de cardiomiocitos o a deformaciones externas del sustrato, como en aquellos muy suaves (menores a 2 kPa) (Price et al., 2018). Sin embargo aún hacen falta estudios que permitan explicar los mecanismos a través de los cuales las proteínas de desmosomas perciben y responden a los estímulos mecánicos.

UNIONES INTERCELULARES

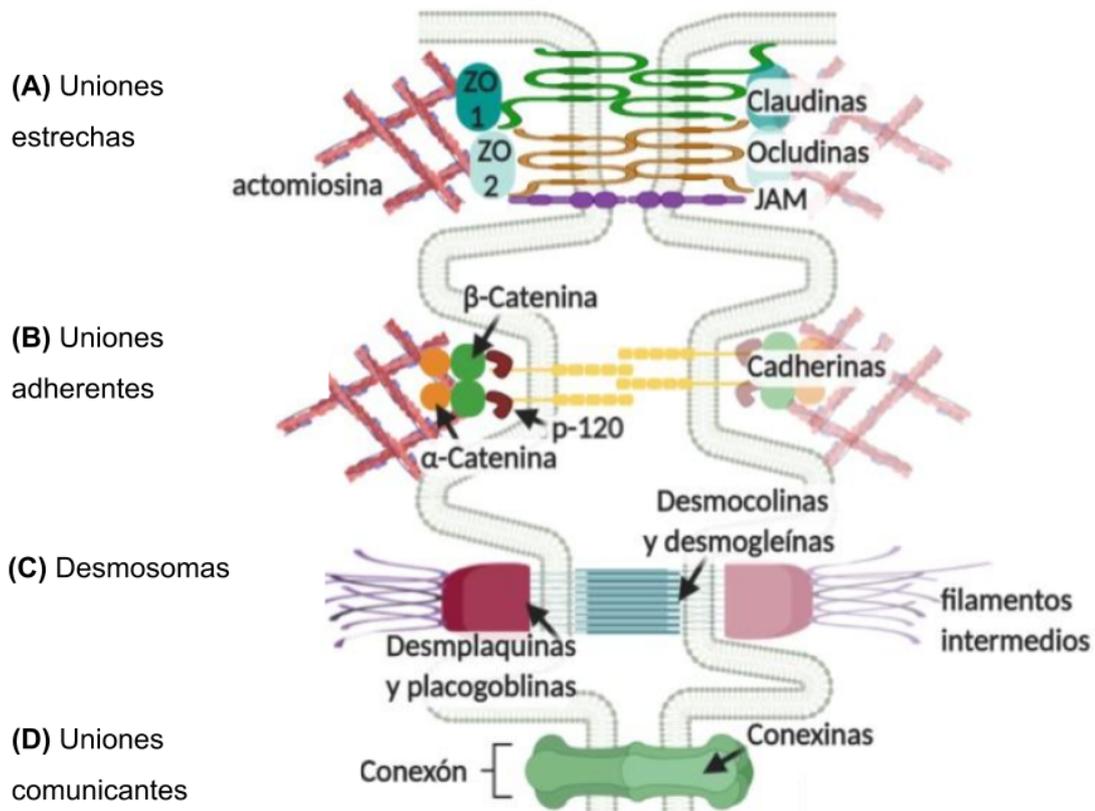


Figura 4. Esquema representativo de las uniones intercelulares y sus principales componentes. (A) Las uniones estrechas principalmente están compuestas por las proteínas transmembranales: ocludinas, claudinas así como por las proteínas JAM y en el citoplasma se asocian las proteínas ZO que ayudan a conectar el aparato de actomiosina. Por otra parte, (B) las uniones adherentes están constituidas por la agrupación de cadherinas y otras proteínas citoplasmáticas, como α y β catenina que conectan al aparato de actomiosina. (C) Los desmosomas también están conformados por cadherinas llamadas desmocolinas y desmogleínas así como por desmoplaquinas y placoglobinas que conectan a los filamentos intermedios. (D) Por último, las uniones comunicantes están formadas por hexámeros de la proteína conexina, llamados conexones (Imagen creada en Biorender.com).

1.5 Adhesiones focales (AF)

Las adhesiones focales son estructuras multiprotéicas especializadas en la adhesión y la comunicación con el medio extracelular. Están conformadas por una red de integrinas que conecta los componentes de la MEC con el aparato de actomiosina gracias al acoplamiento de numerosas proteínas citoplasmáticas tales como vinculina y talina (**Figura 5**) (Burrige, 2017). Todos sus componentes se agrupan en estructuras discernibles en las zonas de

anclaje celular, observadas como áreas electrodensas por microscopía electrónica; por lo que fueron nombradas en un principio *placas de adhesión*, (Abercrombie, 1971) las cuales se sabe tienen un tamaño aproximado de 0.1-10 μm (Kuo et al., 2011).

Además de las AF, existen otras estructuras de anclaje dependientes de integrinas (derivadas de los desmosomas que fueron anteriormente descritos en el apartado 1.4.4) llamadas hemidesmosomas. Estas estructuras conectan los componentes de la MEC con los filamentos intermedios en el interior celular en lugar del aparato de actomiosina. A diferencia de las AF que se distribuyen de manera ubicua, los hemidesmosomas son característicos de los epitelios del cuerpo, permitiendo el anclaje de estas células con la membrana basal y por tanto contribuyen a mantener su integridad. Estos complejos, al interactuar con los componentes de la membrana basal (sobretudo colágena IV y laminina) se conforman principalmente de integrinas tipo $\alpha 6\beta 4$. En el citoplasma cuentan con dos placas formadas por las proteínas plectinas que acoplan los filamentos intermedios a estas estructuras (Walko et al., 2015).

Por su parte, la composición de las AF varía, dado que son estructuras dinámicas cuyo estado de madurez, localización celular y funciones cambian dependiendo del contexto fisiopatológico en el que se encuentran las células. Hasta la fecha, se han identificado más de 180 proteínas asociadas a AF que comprenden el metaadhesoma celular (Zaidel-Bar & Geiger, 2010). De manera general, debido al arreglo que tienen los componentes en estos complejos, se pueden distinguir: A) las porciones extracelulares de las integrinas las cuales anclan los componentes de la MEC anteriormente descritos; B) la región transmembranal y citoplasmática de las integrinas; y por último C) el resto de los componentes citoplasmáticos que conectan directamente al aparato de actomiosina (**Figura 5**). En seguida serán descritos sus principales componentes.

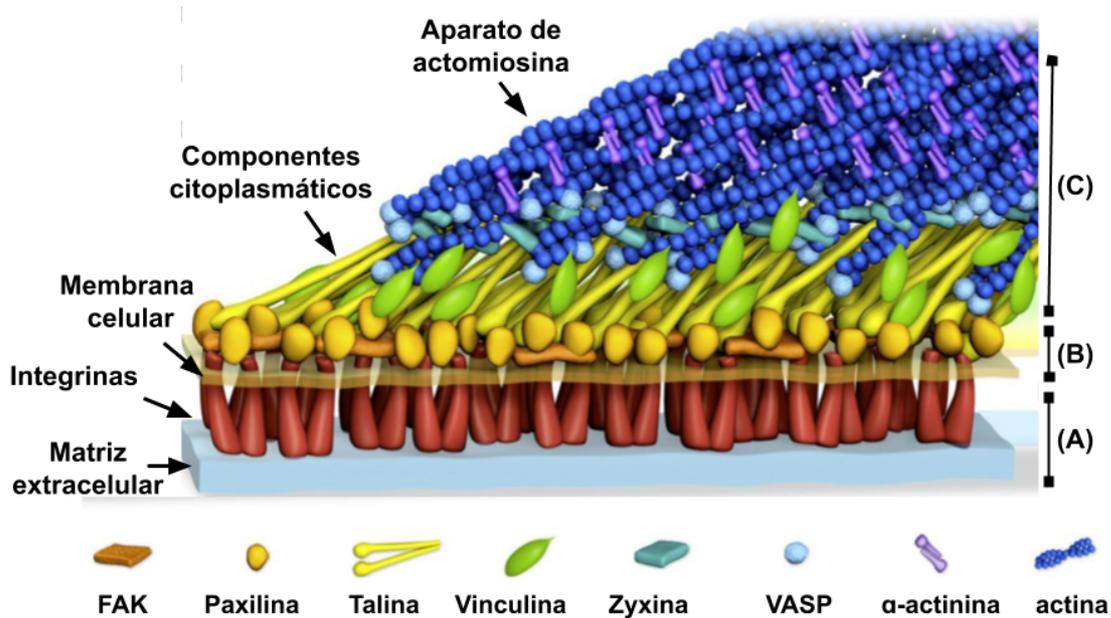


Figura 5. Modelo esquemático de la organización de los complejos de adhesiones focales. (A) Las AF están compuestas por la agrupación de integrinas que en su porción extracelular interactúan con los componentes de la MEC, al mismo tiempo **(B)** atraviesan la membrana celular permitiendo la adhesión celular y en su porción citoplasmática interactúan con múltiples **(C)** proteínas citoplasmáticas, como vinculina, talina y paxilina, que promueven el anclaje con el aparato de actomiosina y la señalización con el medio extracelular (Modificado de Kanchanawong, 2010).

1.5.1 Integrinas

Las integrinas son una superfamilia de receptores membranales heterodiméricos compuestos por dos subunidades glicoproteicas asociadas de forma no covalente, conocidas como subunidad α y β . En vertebrados se han identificado hasta el momento, 18 subunidades α y 8 subunidades β , que generan una combinación de 24 subtipos de integrinas (Barczyk et al., 2010). Las subunidades α y β son muy distintas entre sí y no presentan homología. Algunas subunidades son indispensables para el desarrollo tal es el caso de la subunidad $\beta 1$, cuya eliminación es letal en ratones. También existen subunidades tejido específicas como la $\beta 2$ que es exclusiva de leucocitos, o la combinación de subunidades $\alpha 6\beta 4$ en queratinocitos, por mencionar algunos ejemplos (Takada et al., 2007).

Las subunidades α y β tienen una longitud de 1000 y 750 aminoácidos, respectivamente. Cuentan con un solo pase transmembranal de hélice alfa, mientras que sus extremos amino y carboxilo terminal se localizan en la porción extracelular e intracelular, respectivamente (**Figura 6**). Ambas subunidades cuentan con dominios proteicos con regiones flexibles entre dominios que les permiten tener plegamientos distintos que son funcionalmente relevantes

(Campbell & Humphries, 2011). El ectodominio de la subunidad α se puede dividir en 4 dominios principales y dos regiones flexibles, dentro de los que, de manera destacada, se encuentran dominios de unión a Ca^{2+} y un motivo de adhesión dependiente de ión metal (MIDAS, por sus siglas en inglés *metal-ion-dependent adhesion site*) que permite la unión a Mg^{2+} , los cuales son indispensables para la unión de la integrina con sus ligandos (**Figura 6**) (Campbell & Humphries, 2011).

Por otra parte, la porción extracelular de la subunidad β presenta 7 dominios principales que cuentan con un mayor número de regiones flexibles (**Figura 6**). Dentro de éstos, resaltan 4 módulos del factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*) ricos en cisteínas y un dominio adyacente al motivo MIDAS (ADMIDAS, por sus siglas en inglés *adjacent-metal-ion-dependent adhesion site*). El sitio ADMIDAS también es muy importante en el reconocimiento de ligandos; al unirse el ión Mn^{2+} permite la completa activación de las integrinas (Campbell & Humphries, 2011). La porción intracelular de ambas subunidades es generalmente corta, de aproximadamente 75 aa, (a excepción de la integrina $\beta 4$ que cuenta con 1000 aa). En contraste con la subunidad α , la β cuenta con múltiples sitios de unión a proteínas citoplasmáticas como talina y kindlina, las cuales también regulan la afinidad de los ligandos desde el interior celular (Kim et al., 2011; Takada et al., 2007).

Para el reconocimiento y afinidad de las integrinas con sus ligandos (proteínas de la MEC), es necesaria su asociación con algunos iones divalentes ya que permiten un cambio alostérico que expone sus sitios de unión. A fin de que las subunidades α y β adquieren un estado activo, pasan de una conformación plegada a una extendida de manera vertical (**Figura 6**). Durante su activación, atraviesan dos cambios conformacionales, primero sus dominios extracelulares de unión a ligando dejan de estar orientados hacia la membrana plasmática y posteriormente, sus dominios transmembranales y citoplasmáticos dejan de interactuar entre sí, lo que permite una conformación de alta afinidad al ligando (Ginsberg, 2014).

También, desde el interior de las células, existe la activación de las integrinas a una conformación activa de alta afinidad a sus ligandos promovida. Esto es posible gracias a la unión de proteínas citoplasmáticas tales como talina y kindlina las cuales, tras unirse a las integrinas que interactúan con sus respectivos ligandos, pueden favorecer la activación de integrinas adyacentes que aún están en una conformación plegada. También, la talina

puede ser reclutada a la membrana celular por otros mecanismos y favorecer la activación de integrinas para que puedan asociarse con los componentes de la MEC; sin embargo, no se conoce con exactitud la secuencia de estos eventos (Klapholz & Brown, 2017). Cabe resaltar que además de la conformación plegada y extendida, se han postulado otros estados de conformación intermedios con diferente estado de activación y afinidad (Takada et al., 2007).

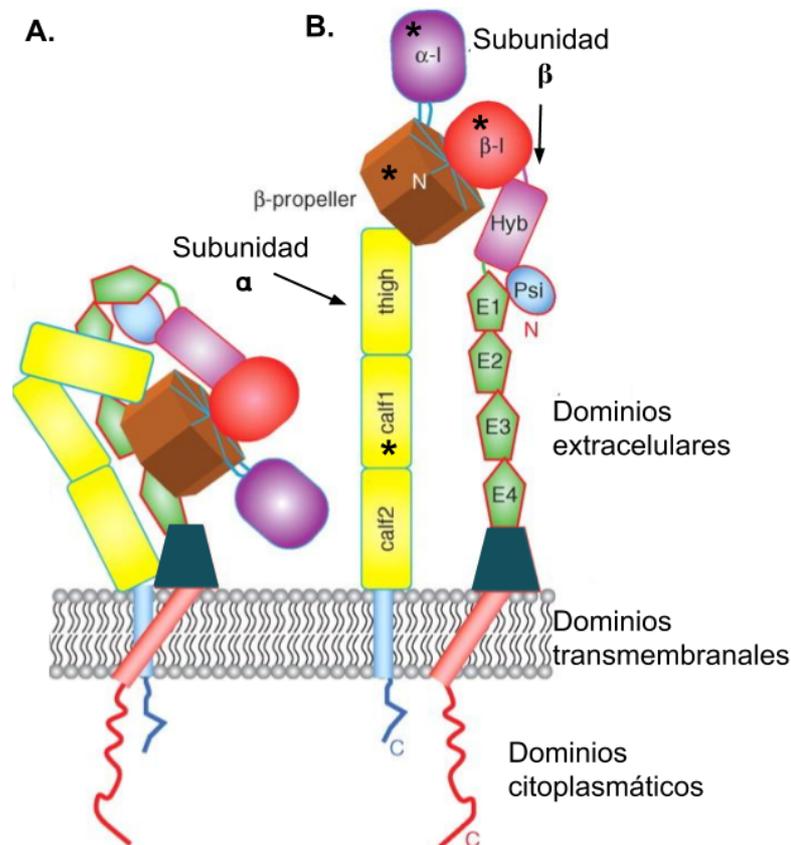


Figura 6. Esquema representativo de las subunidades de integrinas α y β en su (A) conformación plegada (estado inactivo) y en su (B) conformación extendida (estado activo). La porción extracelular de la subunidad α está conformado por un barril β de 7 plegamientos (*B propeller*, por su traducción al inglés), un dominio "cadera" (*thigh*, por su traducción al inglés), dos dominios "pantorrilla" (*calf*, por su traducción al inglés) y un dominio α -I. Por otra parte, la subunidad β cuenta con 7 dominios en su porción extracelular: un dominio β -I, un dominio híbrido, un dominio Psi (por sus siglas en inglés, *plexin-semaphorin-integrin*) y 4 dominios EGF (por sus siglas en inglés, *epidermal-growth-factor*). Ambas subunidades tienen regiones citoplasmáticas cortas; sin embargo la β cuenta con diversos dominios de unión a proteínas como a talina y kindlina. Los asteriscos representan los principales sitios de unión a iones divalentes. (Modificada de Campbell y Humphries, 2011)

Una vez en su conformación activa, las integrinas principalmente interactúan con proteínas de la MEC. La secuencia arginina, glicina y ácido aspártico (RGD) es reconocida como el motivo universal de unión a integrinas, no obstante, se sabe que existe especificidad dependiendo de la combinación de subunidades (Barczyk et al., 2010). Según al ligando al que se unen, las integrinas pueden clasificarse en cuatro grupos: receptores de unión a la secuencia RGD (presente en fibronectina y vitronectina): la combinación de la subunidad αV en combinación de diferentes subunidades β (1, 3, 5 etc) es un ejemplo clásico de reconocimiento al motivo RGD; de unión a colágena (en la secuencia de aminoácidos GFOGER) como sucede para las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$; de unión a laminina tal como se da en la combinación de subunidades $\alpha 6\beta 1$; y finalmente los receptores específicos de leucocitos para las subunidades $\alpha L\beta 2$ (Ginsberg, 2014).

Además de su interacción con la MEC, el estado activo de las integrinas permite la interconexión física de las proteínas extracelulares con el citoesqueleto de actina gracias a la asociación directa de los componentes asociados a adhesiones focales en sus colas citoplasmáticas. Esto es posible principalmente mediante modificaciones postraduccionales de los dominios citoplasmáticos de la subunidad β así como por la afinidad con sitios de unión con otras proteínas citoplasmáticas (Morse et al., 2014).

1.5.2 Componentes citoplasmáticos de AF

Debido a que las integrinas carecen de actividad enzimática que permita la transducción de la unión con sus ligandos, las proteínas de adhesiones focales con las que interactúan en el citoplasma resultan elementos indispensables para internalizar y amplificar las señales del exterior, así como para afianzar el aparato de actomiosina a las zonas de adhesión, posibilitando también la transmisión de los esfuerzos (Kim et al., 2011). Son diversos los componentes citoplasmáticos que se han asociado a las AF, estos incluyen principalmente receptores de adhesión, proteínas de andamiaje, proteínas adaptadoras, de citoesqueleto, chaperonas y de señalización, como cinasas, fosfatasas, proteasas, GTPasas y sus respectivos reguladores (J. C. Kuo, 2014). Además, se sabe que estos componentes y su respectiva señalización cambia de acuerdo a la etapa del proceso de maduración por el cual se forman los complejos de adhesión.

La formación de adhesiones inicia en zonas ricas en polimerización de actina libres de miosina, como en las prolongaciones celulares (lamelipodia y filopodia), en donde hay una gran movilidad de los filamentos de actina en dirección hacia el centro celular, generada por

la resistencia de la membrana celular a esta polimerización (flujo retrógrado de actina) (**Figura 7A**) (Alexandrova et al., 2008; Parsons et al., 2010). Inicialmente, los sitios de adhesión se denominan adhesiones nacientes y son zonas muy pequeñas en comparación con las adhesiones focales, y por tanto sólo pueden ser vistas mediante técnicas de microscopía que permitan visualizar regiones limitadas de la muestra como por microscopía de reflexión interna total, o TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*, por sus siglas en inglés) (Alexandrova et al., 2008). Están conformadas por la agrupación de integrinas que recién entraron en contacto con los componentes de la MEC, a estas proteínas se acoplan los filamentos de actina (libres de miosina) a través de otros componentes como α -actinina, vinculina, talina y kindlina. También son reclutadas otras proteínas adaptadoras como paxilina, β -pix, p130CAS (también conocida como BCAR1), y de señalización como la cinasa de adhesiones focales (FAK, por sus siglas en inglés *focal adhesion kinase*) y la cinasa Src, las cuales se caracterizan por tener una alta fosforilación en las tirosinas que conforman su cadena polipeptídica en esta etapa, indicativo de la alta señalización de los complejos desde esta etapa inicial (Vicente-Manzanares & Horwitz, 2011). Asimismo, hay una alta actividad de las GTPasas de la familia de Rho, Rac y Cdc42, favoreciendo la alta polimerización de actina que caracteriza esta zona celular (Figura 7A) (Parsons et al., 2010).

La tasa de desensamblaje es muy alta en las adhesiones nacientes, por lo que tienen periodos cortos de vida en el orden de 60 segundos aproximadamente (Vicente-Manzanares & Horwitz, 2011; Parsons et al., 2010). Esto ocurre a través de proteínas con actividad proteolítica o por medio de la despolimerización de los filamentos de actina en los límites existentes entre el lamelipodio y la lamela tras desplazarse las prolongaciones celulares hacia adelante de donde se formaron las adhesiones nacientes, sobre todo en células migratorias (**Figura 7A**) (Parsons 2010). Por tanto, las adhesiones nacientes tienen dos caminos posibles; ser desensambladas o madurar a complejos focales (J. C. Kuo, 2014). Los complejos focales son estructuras un poco más grandes que las adhesiones nacientes (1 μm aprox. de diámetro) y persisten en periodos en el orden de minutos (Vicente-Manzanares & Horwitz, 2011). Se caracterizan por el aumento del reclutamiento de α -actinina al iniciar su maduración ya sea para favorecer la polimerización o para reorganizar los filamentos con los que conectan (Figura 7B) (J. C. Kuo, 2014).

Por otra parte, la culminación del proceso de maduración de complejos focales a adhesiones focales maduras se sitúa más hacia la lamela la cual es una zona rica en

miosina. Su maduración es dependiente del acoplamiento de miosina activa, principalmente mediante su fosforilación por la cinasa ROCK (**Figura 7C**) (Parsons et al., 2010). La miosina al deslizarse por la actina permite el empaquetamiento de estos filamentos, de modo que se forman fibras de estrés que confieren contractilidad a las fibras de actina y en consecuencia generan esfuerzos de tensión en las células. Sus componentes son muy similares a los de los complejos focales, sin embargo, en esta etapa las proteínas Src, FAK y paxilina tienen niveles más bajos de fosforilación y hay un destacable aumento en la acumulación de varias de las proteínas asociadas, como vinculina, FAK y α -actinina (Hirata et al., 2014). Además, en esta etapa son reclutadas otras proteínas adaptadoras como zyxina y tensina (**Figura 7C**) (R. Zaidel-Bar et al., 2004). La tasa de desensamblaje de las AF maduras es más lenta que las adhesiones nacientes, en el orden de varios minutos. En consecuencia al reclutamiento y estabilidad, su tamaño aumenta en comparación con las AF nacientes. Estas tienen 2 μm de ancho y 3-10 μm de largo, por lo que se vuelven plataformas físicas que consecuentemente hacen lento el flujo retrógrado de actina (**Figura 7C**) (Parsons et al., 2010).

Una vez formadas las adhesiones focales maduras, pueden ser precursores de adhesiones fibrilares, características de células que se encuentran en una MEC rica en fibronectina y su formación es indispensable para su remodelación (R. Zaidel-Bar et al., 2004). Son estructuras con una gran asociación a actina y miosina por lo que son muy estables, tienen tasas de desacoplamiento en el orden de 1 hora aproximadamente. Además, se caracterizan por tener altos niveles de tensina y zyxina (J. C. Kuo, 2014). A pesar de las diferencias en componentes, los complejos focales, las AF maduras y las adhesiones fibrilares, son reflejo de un mismo espectro de estructuras producto del proceso de maduración, más que por distintas clases de adhesiones (Parsons et al., 2010). Desde las etapas iniciales hasta las más estables, comparten la mayoría de sus componentes, lo que resalta su importancia en su formación y señalización. Tal es el caso de las proteínas talina, vinculina, paxilina, las cuales serán descritas a detalle a continuación.

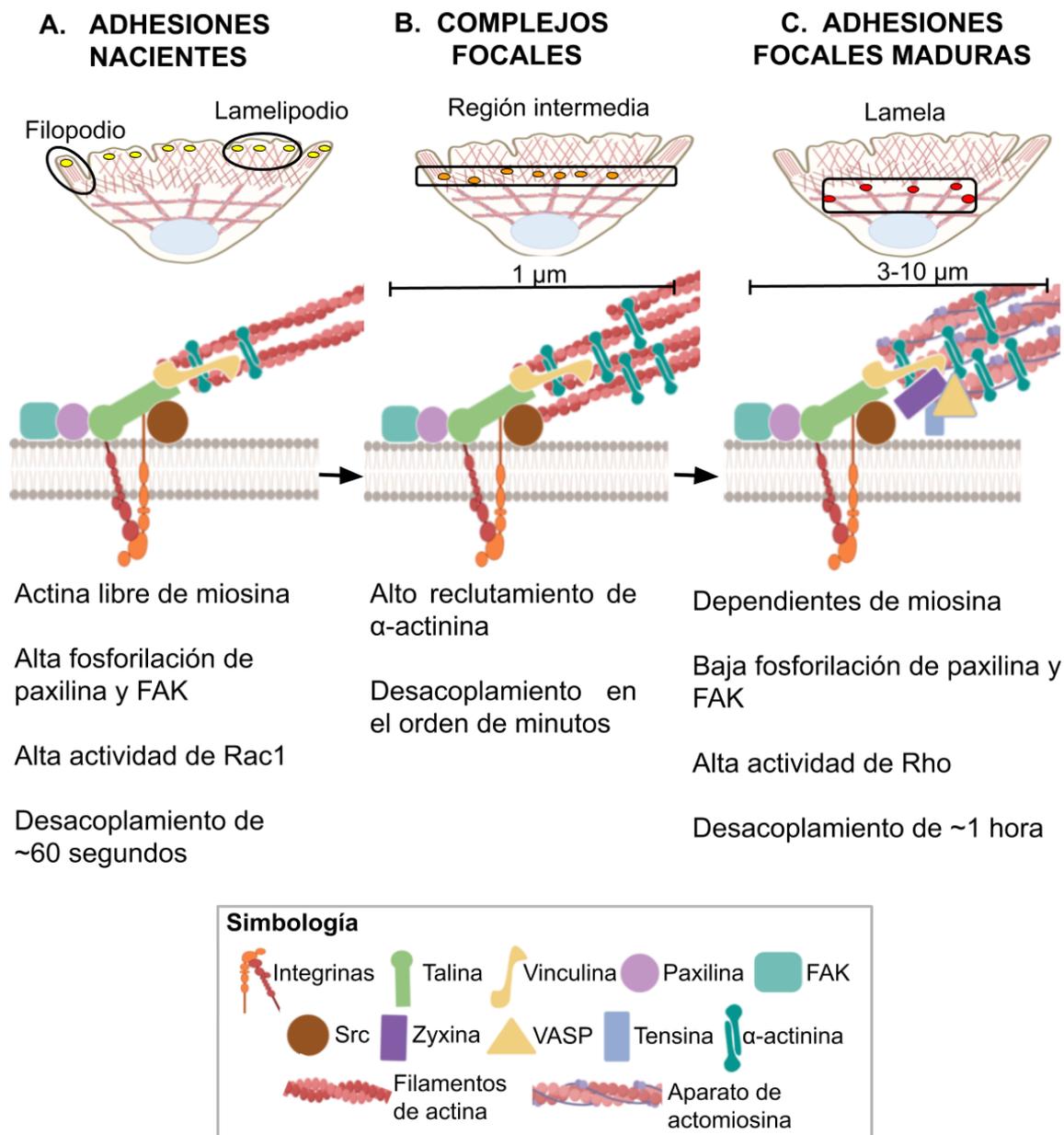


Figura 7. Resumen esquematizado de la maduración de los complejos de adhesiones focales. (A) Inicialmente, los sitios de adhesión celular a la MEC son denominados adhesiones nacientes y se localizan en la periferia de las prolongaciones celulares (lamelipodia y filopodia). Están conformadas por integrinas, proteínas adaptadoras, como talina y vinculina que reclutan filamentos de actina libres de miosina, así como paxilina y FAK con altos niveles de fosforilación. Los caracteriza una alta tasa de desacoplamiento, en caso de que no se desacoplen, maduran a complejos focales. (B) Este se refiere a un estado intermedio entre las adhesiones nacientes y las adhesiones focales maduras, carentes de miosina. Se localizan en la región intermedia entre las prolongaciones y la lamela. Tienen un tamaño aproximado de 1 µm, son más estables que las adhesiones nacientes y los caracteriza la acumulación de α-actinina. Estas adhesiones continúan el proceso a (C) AF maduras, las cuales tienen un tamaño de 3-10 µm, son dependientes de miosina y se caracterizan por el

reclutamiento de zyxina, bajos niveles de fosforilación de paxilina y FAK, y la alta actividad de Rho. Su tasa de desacoplamiento es muy baja, en el orden de 1 h aproximadamente. Las AF maduras pueden continuar el proceso a adhesiones fibrilares en matrices ricas en fibronectina (esquema no mostrado) (*Imagen creada en Biorender.com*).

1.5.2.1 Talina

La talina es una proteína indispensable para la formación y funcionamiento de las adhesiones focales ya que al asociarse con las integrinas favorece su activación, promueve el reclutamiento de otros componentes importantes, como la vinculina y conecta directamente a los filamentos de actina a los sitios de adhesión siendo la proteína responsable de la transmisión de los esfuerzos que perciben las AF (Critchley & Gingras, 2008).

En vertebrados existen dos genes que codifican para esta proteína ubicados en diferentes cromosomas, denominados talina-1 y talina-2 que comparten el 76% de similitud en secuencia; el gen que codifica para talina-1 tiene una secuencia de 30 kilobases (kb) y talina-2 cuenta con 190 kb al tener intrones de mayor tamaño (Gough & Goult, 2018). Su distribución y algunas funciones son diferentes ya que talina-1 se distribuye de manera ubicua en los diferentes tejidos del cuerpo mientras que talina-2 se encuentra restringida en el cerebro, músculo cardíaco y riñón. Ambas tienen un peso molecular y estructura similar,, tienen un peso aproximado de 270 kDa y tienen un arreglo dimérico antiparalelo (Gough & Goult, 2018).

Estructuralmente en su extremo amino terminal, tiene un dominio globular nombrado “cabeza talina” (*talin head* o TH, por sus siglas en inglés) de 50 kDa. En seguida, cuenta con una región conectora de 80 aa con un peso aproximado de 20 kDa, que a la vez conecta a un dominio de gran tamaño, 200 kDa, denominado tipo “varilla” (*rod*, por su traducción en inglés), el cual conforma al dominio “cola talina” (*talin tail* o TT, por sus siglas en inglés) (Chakraborty et al., 2019) (**Figura 8A**). La región TH la conforma un dominio FERM (cuyas siglas hacen referencia a las proteínas 4.1 [por sus siglas en inglés, *four decimal point one*], ezrin, radixin, moesin) que se subdivide en F0 a F3, y son ricos en sitios de unión a otros componentes de adhesiones focales como a las β -integrinas (IBS1, por sus siglas en inglés, *integrin binding site 1*), FAK, lailina, así como un sitio para actina (ABS1, por sus siglas en inglés, *actin binding site 1*). La región conectora es una zona importante durante el desacoplamiento de los complejos de AF ya que es el sitio en el que

principalmente es cortada talina por enzimas proteolíticas (proteína calpaina). Finalmente, el dominio rod, se subdivide en 13 dominios enumerados como R1-R13, los cuales son muy importantes para la interacción con los componentes de adhesiones focales, cuenta con muchos sitios de unión a vinculina, alrededor de 11, así como para paxilina, otro sitio de unión a integrina (IBS2), y otros dos sitios adicionales de unión a actina (ABS2 y ABS3) (Klapholz & Brown, 2017) (**Figura 8A**).

De manera similar al despliegue de las integrinas, durante su activación talina adquiere una conformación activa cuando el dominio F3 deja de interactuar con sus dominios tipo rod (principalmente el subdominio R9) en el extremo C-terminal. Por tanto, sus dominios FERM 2 y FERM 3 quedan expuestos para poder interactuar con la región citoplasmática de las integrinas y así localizarse en las zonas de adhesión para luego promover el reclutamiento de los demás componentes, tales como vinculina y la unión con el aparato de actomiosina (Zeng et al., 2015)

1.5.2.2 Vinculina

Vinculina también es una proteína muy importante en la formación de AF ya que permite el acoplamiento de los filamentos del aparato de actomiosina, promueve el reclutamiento de otros componentes y la transmisión de los esfuerzos. Al igual que talina-1, se ha reportado que su ausencia es letal en ratones (Peng et al., 2011). En humanos, existen dos principales isoformas producidas por splicing alternativo de un mismo gen conocidas como vinculina de 1066 aa que tiene un peso molecular de 116 kDa y metavinculina de 1134 aa que tiene un peso molecular de 145 kDa (cuenta con un exón más en la región 3'), cuya distribución está restringida a músculo liso y cardíaco (H. T. Lee et al., 2019).

De manera general, su estructura consta de un dominio nombrado “cabeza vinculina” (*vinculin head* o VH, por sus siglas en inglés) que tiene un peso molecular aproximado de 90 kDa localizado en el extremo amino terminal, seguido por una región conectora de 70 aa que une a un tercer y último dominio nombrado “cola vinculina” (*vinculin tail* o VT, por sus siglas en inglés) que tiene un peso de 27 kDa (**Figura 8B**). La región VH está conformada por 4 dominios proteicos organizados como D1-D4 que cuentan con varios sitios de unión a proteínas de AF como talina, integrinas y α -actinina. La región conectora también se reconoce como un dominio flexible ya que permite el plegamiento de la molécula y a la vez cuenta con motivos ricos en prolinas que posibilita su interacción con vinexina, VASP y Arp 2/3. La región VT cuenta con un dominio, nombrado D5, y es importante para la interacción

con paxilina, actina, PKC α , así como con el segundo mensajero PIP2 (Ziegler et al., 2006; Peng et al., 2011)

(Figura 8B).

A diferencia de las uniones intercelulares en donde vinculina interactúa con α -catenina para ser reclutada a las uniones adherentes, vinculina se asocia con talina para poder integrarse a las AF. De manera consecuente a esta asociación, atraviesa un cambio conformacional en el que sus dominios D1 y VT dejan de asociarse por lo que la molécula adquiere una conformación desplegada en la que muchos de sus sitios de unión, como los de unión a actina, dejan de estar ocultos y así pueda contribuir a la formación de AF (Hirata et al., 2014).

1.5.2.3 Paxilina

Paxilina es otra de las primeras proteínas adaptadoras en ser reclutadas a los complejos de AF. Juega un papel importante en la señalización que llevan a cabo ya que al igual que las dos proteínas anteriores, se ha reportado que su ausencia en ratones es letal en las primeras etapas de desarrollo embrionario (Turner, 2000).

Esta proteína pertenece a la familia de proteínas, denominada paxilina, que también incluye a las proteínas Hic-5 y leupaxina. Sus características estructurales y sitios de unión son similares entre sí. Sin embargo, presentan diferencias en su distribución y algunas funciones; la expresión de leupaxina está restringida en leucocitos y la proteína Hic-5 se distribuye principalmente en células del sistema vascular (López-Colomé et al., 2017). Por su parte, paxilina se distribuye de manera ubicua en los tejidos del cuerpo humano, cuenta con cuatro isoformas producidas por splicing alternativo de un mismo gen denominadas alfa (proteína canónica), beta, gamma y delta que se diferencian por secuencias adicionales que tienen en el extremo N-terminal (López-Colomé et al., 2017).

De manera general, paxilina es una proteína pequeña, que tiene un peso de 68 kDa; no obstante, cuenta con numerosos dominios proteicos importantes para su asociación con proteínas de AF así como para la respuesta celular de estos complejos a las señales externas (Schaller, 2001). En el extremo amino terminal, cuenta con cinco motivos LD ricos en leucinas (cuya secuencia consenso es LDXLLXXL, donde X puede ser cualquier aminoácido) con los que le es posible asociarse a vinculina, FAK, y actopaxina, así como Src y CSK. Además tiene 4 dominios tipo LIM (dominios que cuentan con dos dedos de

unión a Zn^{2+} , cuyas siglas provienen de las primeras proteínas en las que fueron encontrados estos dominios: **Lin-11**, **Isl-1**, **Mec-3**), estos son necesarios para que paxilina pueda ser reclutada a los complejos de adhesiones focales, así como para su interacción con actina, tubulina y la fosfatasa PTP-PEST (Turner, 2000) (**Figura 8C**).

Paxilina se incorpora a los complejos al unirse directamente con vinculina así como con FAK, en donde es blanco de cinasas de tirosinas, principalmente de FAK, Src y Crk; esta señalización es importante para la formación y desacoplamiento de AF. Como se mencionó anteriormente, su nivel de fosforilación cambia según el estado de madurez de los complejos, teniendo un mayor número de fosforilaciones en sus residuos de tirosina en las primeras etapas de formación de los complejos y menor fosforilación en adhesiones focales maduras. Se sabe que al estar fosforilada regula indirectamente de manera positiva a Rac y de manera negativa a Rho al interactuar con los complejos reguladores de estas GTPasas CrkII-DOCK180-ELMO y p120RasGAP, respectivamente (Deakin & Turner, 2008).

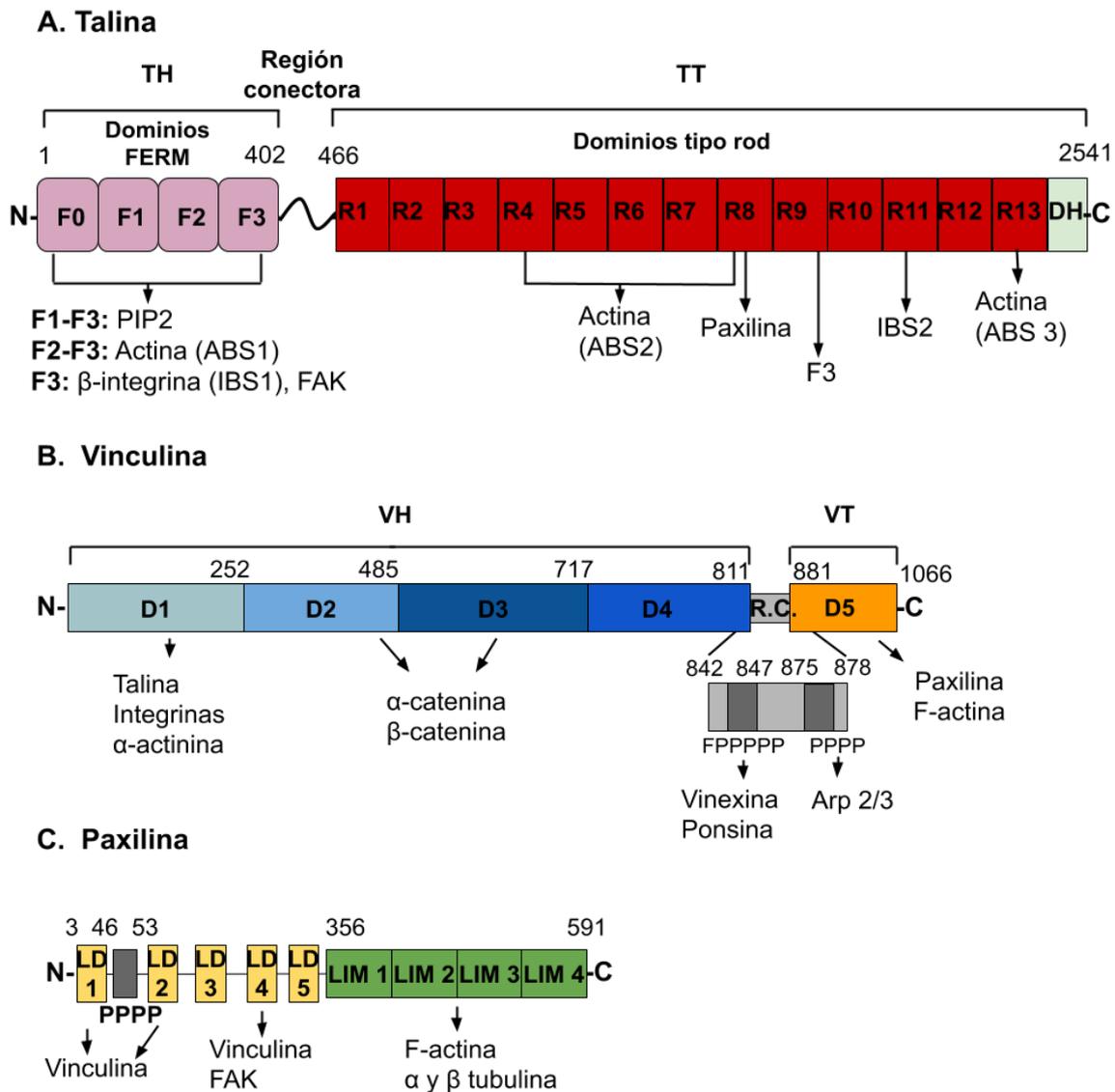


Figura 8. Mapa de dominios y motivos de las proteínas talina, vinculina y paxilina con los sitios de unión reportados a otros componentes de adhesiones focales. A) Talina está conformada por un dominio globular llamado cabeza talina (TH, por sus siglas en inglés *talin head*) compuesto por un dominio FERM, una región conectora y flexible de 80 aa que conecta a un dominio tipo rod (*varilla*, por su traducción al inglés) subdividido en 13 dominios (R1-R13). Cuenta con dos sitios de unión a integrina, al menos 11 a vinculina y 3 a actina (ABS1, ABS2, ABS3), entre otros. **B)** Vinculina está compuesta por un dominio cabeza (VH, por sus siglas en inglés *vinculin head*) dividido en 4 dominio (D1-D4) que tienen sitios de unión a talina, integrinas y cateninas, seguido de una región conectora (R.C.) flexible de 70 aa que tiene sitios de unión para vinexina y Arp 2/3; a la vez conecta a un dominio cola (VT, por sus siglas en inglés *vinculin tail*) compuesto por un dominio (D5) que tiene sitios de unión a F-actina y paxilina. **C)** Paxilina cuenta con 5 dominios LD en su extremo amino terminal que tienen sitios de unión a vinculina y FAK, así como 4 dominios LIM en su extremo carboxilo terminal con sitios de unión a F-actina.

1.6 Adhesiones focales y la respuesta celular a la mecánica

Los complejos de adhesiones focales transmiten y amplifican las señales físicas (mecánicas) y químicas (composición) extracelulares al interior citoplasmático, generando respuestas biológicas a través de diferentes vías de señalización que regulan procesos celulares importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular (Wozniak et al., 2004). Las respuestas celulares pueden ser desencadenadas por señales bioquímicas, como los componentes de la MEC, así como por señales mecánicas, como la relación entre la contractilidad del aparato de actomiosina y la rigidez del sustrato permitiendo el proceso de mecanotransducción (J. C. Kuo, 2014). Este proceso es logrado gracias a diferentes vías de señalización y proteínas responsivas a las señales mecánicas; principalmente se ha resaltado el papel de la vía Hippo que regula negativamente a los cofactores transcripcionales mecanosensibles YAP/TAZ, la cual será descrita a continuación (Dasgupta, 2019).

1.6.1 YAP/TAZ

Las proteínas YAP (*Yes Associated Protein*, por sus siglas en inglés) y TAZ (*WW Domain Containing Transcription Regulator 1*) son un par de cofactores transcripcionales homólogos. Referidos colectivamente como YAP/TAZ ya que se sabe su regulación es similar (mediante modificaciones post-traduccionales) y son en gran medida redundantes en funciones, aunque se han identificado algunas funciones independientes. Al ser cofactores transcripcionales, interactúan indirectamente con el DNA a través de su asociación con factores transcripcionales, principalmente gracias a los factores TEAD (por sus siglas en inglés, *Transcriptional Enhanced Associate Domain*) (Dasgupta & McCollum, 2019). Son coactivadores de genes que favorecen la proliferación celular y supervivencia celulares así como el destino celular de las células madre; ejemplo de ellos es el gen que codifica para el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, *por sus siglas en inglés connective tissue growth factor*) cuya proteína está involucrada en la remodelación de la MEC en condiciones patofisiológicas (Pocaterra et al., 2020).

YAP y TAZ son regulados principalmente por la vía de señalización de Hippo la cual consiste en una red de cinasas activadas secuencialmente. Las principales cinasas involucradas son las MST1/2, SAV1, MOB1A/B y LATS 1/2 (**Figura 9**). La vía culmina en la fosforilación de LATS1/2 la cual fosforila a YAP en la serina 127, creando un sitio de unión a proteínas de la familia 14-3-3 evitando su translocación al núcleo y favoreciendo su ubiquitinación para posterior degradación vía proteosoma. La fosforilación de TAZ en la

serina 89 también genera sitios de unión para la proteína 14-3-3; sin embargo, se ha resaltado el papel de la ubiquitinación en la regulación de esta proteína (Finch-Edmondson & Sudol, 2016). Por tanto, la vía Hippo al evitar la actividad transcripcional de YAP/TAZ, tiene un papel importante en el control del crecimiento de órganos, con un rol central en el hígado, así como en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular debido al control que tienen sobre sus efectores YAP/TAZ (Finch-Edmondson & Sudol, 2016).

Existen diferentes mecanismos que regulan la actividad de las cinasas de la vía Hippo. Se han identificado diversas proteínas involucradas en el establecimiento de las uniones intercelulares y la polaridad celular como reguladoras de la vía Hippo: tal es el caso de las proteínas Crumbs y Scribble (proteínas que determinan la polaridad apical y basolateral) que interactúan y activan a las cinasas LATS 1/2 y de α -catenina que secuestra a YAP/TAZ al estar en las uniones adherentes impidiendo su actividad transcripcional (Yu et al., 2015). También se ha reportado que la contractilidad del citoesqueleto juega un papel importante en su regulación, los filamentos de actina, conocida como la F-actina, inhiben a las cinasas LATS1/2 y por tanto promueve la translocación de YAP/TAZ y su actividad transcripcional (Dasgupta & McCollum, 2019).

Además de la vía Hippo, YAP/TAZ también pueden ser regulados por otras vías de señalización como por la vía Wnt y por los receptores asociados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés *G protein-coupled receptors*) (Totaro et al., 2018) Por otra parte, también pueden ser regulados por otras señales como la deformación de los poros nucleares, la aplicación de esfuerzos a estas estructuras conlleva a su estiramiento reduciendo la resistencia mecánica a su transporte molecular, por lo que aumenta su translocación (Elosegui-Artola et al., 2017). A nivel nuclear también hay regulación de YAP/TAZ, ejemplo de ello es el complejo regulador de cromatina SWI/SNF el cual retiene a YAP/TAZ impidiendo su actividad y este complejo a la vez es regulado negativamente por la F-actina (Chang et al., 2018).

Debido a su actividad transcripcional y su respectiva regulación, YAP/TAZ son mediadores importantes de las señales mecánicas. El aumento de su actividad transcripcional se ha asociado a células cultivadas en sustratos rígidos, en condiciones de baja confluencia, así como en condiciones de alta contractilidad del aparato de actomiosina (Aragona et al., 2013). Por lo tanto, YAP/TAZ es un eje importante en la respuesta celular a la mecánica

debido a que es el mecanismo principal de percepción a los efectos de deformación sobre la célula misma.

Los complejos de adhesiones focales también regulan a los factores YAP/TAZ favoreciendo su actividad transcripcional en sustratos rígidos de manera indirecta al promover la contractilidad de actomiosina al madurar los complejos o de manera directa a través de la fosforilación que llevan a cabo FAK y SRC promoviendo su translocación y actividad transcripcional (Dasgupta & McCollum, 2019). Estas proteínas llevan a cabo dicha regulación a partir de diferentes mecanismos, como a través de la activación de fosfatasa PP1A por FAK que remueve la fosforilación de YAP e impide su translocación o a través de fosforilar directamente a YAP o a sus cinasas reguladoras LATS1/2 y Mob1, inactivándolas (Lachowski et al., 2018). La cinasa Src también fosforila directamente a YAP favoreciendo su actividad transcripcional al facilitar su interacción con TEAD y también regula directamente proteínas de la vía Hippo, fosforila a LATS 1/2 inhibiendo su actividad sobre YAP (John et al., 2018).

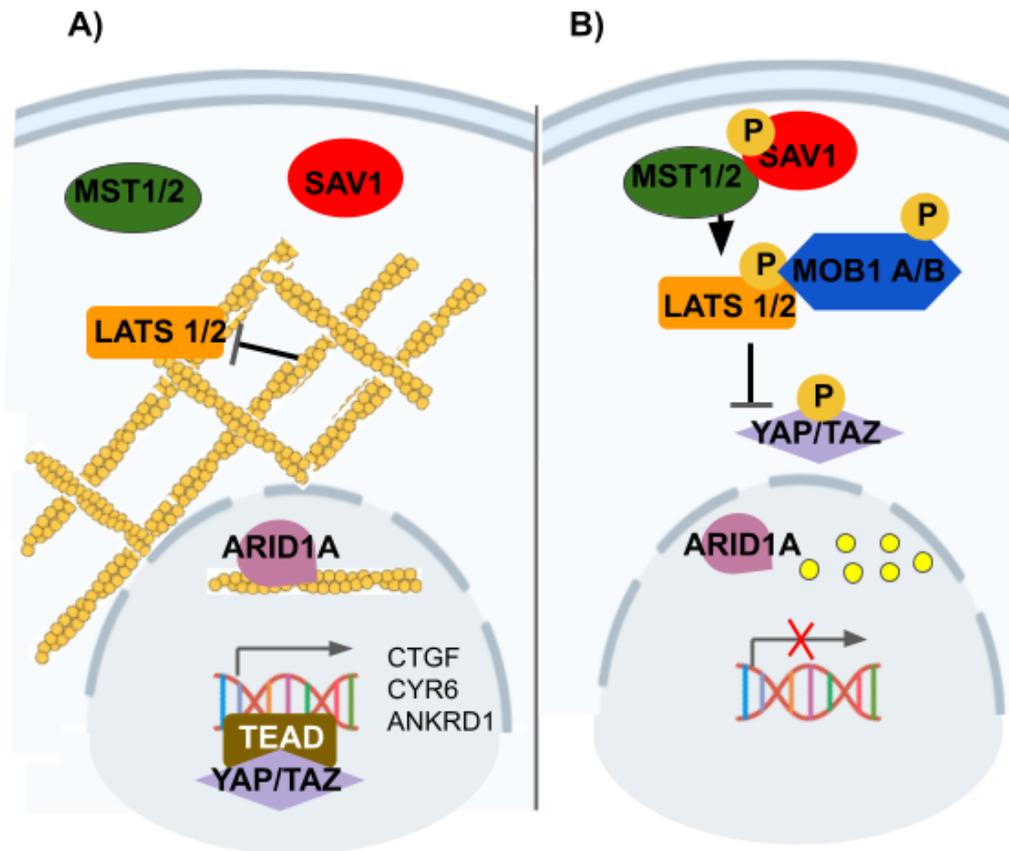


Figura 9. Regulación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ. (A) En condiciones de alta contractilidad del aparato de actomiosina (como sucede en el cultivo celular sobre sustratos rígidos, en cultivos de baja confluencia celular, o mediante un fármaco que estimule la contractilidad del aparato de actomiosina) la vía de Hippo se encuentra apagada, ya que no están fosforiladas las cinasas de esta vía; de modo que los cofactores YAP/TAZ pueden entrar al núcleo e interactuar con los factores transcripcionales TEAD y por tanto promover la transcripción de genes dependientes de esta maquinaria como CTGF, CYR61 y ANKRD1. (B) Por otra parte, en condiciones en las que la vía Hippo está inactiva (como sucede en el cultivo sobre sustratos suaves, cultivos confluentes, o mediante un inhibidor de la contractilidad del citoesqueleto), sus principales componentes, las cinasas MST1/2, SAV1, MOB1A/B y LATS1/2 generan una cascada de fosforilaciones que culmina en la fosforilación de los cofactores YAP/TAZ los cuales en consecuencia son retenidos en el citoplasma y posteriormente degradados evitando su actividad transcripcional. (Imagen creada en Biorender.com)

2. ANTECEDENTES

Las adhesiones focales permiten a las células percibir las propiedades físicas y bioquímicas del medio extracelular a través del reclutamiento de sus diferentes componentes y del despliegue de sus respectivos dominios que son sensibles a los esfuerzos (Burrige, 2017). Se ha reportado en diferentes estudios de proteómica que el consenso de proteínas asociadas a adhesiones focales consta de aproximadamente 60 componentes, dentro de los que destacan diferentes tipos de integrinas y proteínas de unión a actina como vinculina y talina (Horton et al, 2015). No obstante, en su mayoría, estos estudios se han realizado en condiciones estándar de cultivo. Esto es, en cajas de poliestireno, las cuales tienen una rigidez muy alta (no fisiológica), en el orden de los GPa, que no asemejan las condiciones de los tejidos *in vivo*, los cuales tienen un valor mucho menor dependiendo del órgano en cuestión (por ejemplo, 500 Pa en hígado y 200 Pa en pulmón) (Wells, 2013). De modo que se conoce muy poco sobre la modulación de los complejos de adhesiones focales en cuanto a los estímulos mecánicos como a la rigidez. Sin embargo, se ha explorado su modulación por diferentes proteínas de la MEC y la regulación de las señales mecánicas en algunos de los componentes de estos complejos.

Algunos de los componentes de adhesiones focales que se han estudiado por su respuesta a la mecánica son las proteínas vinculina, talina y paxilina (ver **Tabla 1**). Se ha destacado a la proteína talina como la principal responsable de percibir las propiedades mecánicas extracelulares como la rigidez, la viscoelasticidad y el flujo laminar. Utilizando técnicas como microscopía de fuerza atómica, se ha demostrado que al aplicar fuerzas menores a 10 pN, talina adquiere una conformación activa (Zeng et al., 2015). Del mismo modo, aplicando fuerzas de 5 pN, a través de pinzas magnéticas, se ha reportado que los 13 dominios tipo “rod” con los que cuenta talina en su extremo C-terminal pueden ser desplegados debido a la deformación aplicada por los esfuerzos internos en respuesta a la rigidez del sustrato mediante la unión de las integrinas a algún componente de la MEC (Haining et al., 2016; Yao et al., 2016). El despliegue de sus dominios rod expone diferentes sitios de unión a otras proteínas asociadas a adhesiones focales como vinculina y los filamentos de actina, de manera que este cambio conformacional en respuesta a la mecánica del medio extracelular resulta indispensable para que el resto de componentes puedan ser reclutados, como es el caso de vinculina (Austen et al 2015). En consecuencia a esta unión, la vinculina también atraviesa un cambio conformacional, facilitando el reclutamiento de más proteínas de AF así como el acoplamiento del aparato de actomiosina.

Se ha observado en algunos trabajos mediante microscopía de fuerza de tracción que la mutante activa de vinculina (T12, que mantiene constantemente activa a la molécula en su conformación desplegada) (Cohen, 2005), además de permitir su reclutamiento a las AF, facilita la generación de los esfuerzos de tracción que ejercen las células sobre el sustrato ya que en comparación con la proteína silvestre, las fuerzas aumentan en un 40% (Dumbauld et al., 2013). De manera similar, Mierke en 2008 reportó en células embrionarias de ratón, que la energía de deformación (calculada como el producto de las fuerzas de tracción con la deformación del sustrato) ejercida en HGs de PAA aumenta en un 63% cuando se expresa una mutante de vinculina en donde sólo se tiene el dominio Vt. Aunado a ello, encontraron que la rigidez de las células aumenta cuando se expresa a la mutante T12; contrastando a lo observado en la proteína silvestre (Mierke et al., 2008).

Además de los cambios conformacionales derivados de la deformación dependiente de esfuerzos, se ha demostrado que el reclutamiento de algunas proteínas de adhesiones focales es regulado por la rigidez, utilizando cultivos de células sobre materiales elásticos con valores de rigidez controlada como el polidimetilsiloxano (PDMS), hidrogeles de poli(acrilamida) (PAA) o policaprolactona (PCL). Por ejemplo, en células madre de médula ósea y en fibroblastos embrionarios de ratón primarios se ha encontrado que hay un mayor reclutamiento de vinculina en la periferia celular de cultivos sobre sustratos de PDMS, PAA y PCL con mayor rigidez: 1,014 kPa en comparación de 46 kPa; 14 en comparación de 3 kPa y 133 en comparación de 0.9 MPa, respectivamente (Van Tam et al., 2012; Yamashita et al., 2014; C. Zhou et al., 2019). De manera similar, el grupo de Zhou en 2020 mostró un aumento para la proteína FAK en un modelo de células madre de papila apical cultivadas en sustratos de PMDS de 1 MPa en comparación de 500 kPa (C. Zhou et al., 2020). Asimismo, el reclutamiento de la integrina $\beta 1$ incrementó en células epiteliales de glándula mamaria cultivadas en hidrogeles de PAA de 2 kPa en comparación de 0.2 kPa (Yeh et al., 2017). Sin embargo, aún no se tiene claro si el reclutamiento de otras proteínas como paxilina también es sensible a la rigidez. El grupo de Zhou también reporta un mayor reclutamiento de paxilina en el mismo modelo en que describió el aumento de FAK (C. Zhou et al., 2020); mientras que en otros estudios no se han observado cambios en su reclutamiento, como en fibroblastos embrionarios de ratón primarios comparando sustratos de PDMS de 3 y 14 kPa, así como en células madre de médula ósea cultivadas en PLC de 0.9 y 133 MPa (Van Tam et al., 2012; D. W. Zhou et al., 2017). De manera contraintuitiva, a pesar del despliegue de talina causado por los esfuerzos mecánicos, no se han reportado cambios en su reclutamiento de acuerdo a los esfuerzos (Van Tam et al., 2012; Yamashita

et al., 2014). Todos estos resultados muestran que hay un mayor reclutamiento de ciertas proteínas en las zonas de adhesiones focales, como vinculina, FAK e integrina $\beta 1$ en comparación de cultivos sobre sustratos menos rígidos. No obstante, hasta el momento se ha encontrado que no todas las proteínas de adhesiones focales cuentan con un reclutamiento sensible a la rigidez, como sería el caso para la paxilina y talina.

Conforme a lo descrito anteriormente, algunas publicaciones también han mostrado diferencias en la estabilidad de las proteínas de las AF conforme al módulo elástico del sustrato en que se cultivan las células utilizando la técnica de microscopía de FRAP (por sus siglas en inglés *Fluorescence Recovery after Photobleaching*). Esta técnica consiste en el blanqueamiento del marcaje fluorescente de interés usando un haz de láser de alta potencia para posteriormente analizar la recuperación de fluorescencia generado por el reclutamiento de nuevas moléculas. En fibroblastos embrionarios de ratón, la fracción inmóvil de vinculina, que representa a los complejos proteicos estables dentro de las zonas de adhesiones focales, es más alta en cultivos sobre sustratos de silicón y PAA de 25 kPa en comparación con aquellos de 3.8 kPa (Omachi et al., 2017; Yamashita et al., 2014). Otro de los valores que se utiliza para conocer la estabilidad de las proteínas mediante FRAP es la mitad del tiempo requerido para recuperar el marcaje fluorescente de interés tras el blanqueamiento que se realiza ($t_{1/2}$): a mayor $t_{1/2}$, mayor es la estabilidad de la proteína en la zona blanqueada. De manera similar a lo anterior, se ha reportado que el $t_{1/2}$ de talina es mayor en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados sobre HGs de PAA de 100 kPa en contraste con los de 8 kPa (Stutchbury et al., 2017). Estas observaciones sugieren que hay una mayor estabilidad de vinculina y talina en las zonas de adhesión focal dependiendo de la rigidez del sustrato: entre mayor rigidez mayor estabilidad. Lo anterior puede estar asociado a la formación de diferentes complejos proteicos o cambios postraduccionales en los componentes de las AF. Finalmente, para el caso de paxilina, Yamashita en 2014 reportó que su fracción inmóvil es mayor en sustratos suaves de 3.9 kPa lo que implicaría una menor estabilidad en sustratos rígidos (Yamashita et al 2014). Sin embargo, otros autores no reportan cambios en su dinámica con la rigidez (Stutchbury et al., 2017; D. W. Zhou et al., 2017).

Adicional a los cambios en el reclutamiento, algunas de las interacciones que realizan las proteínas de adhesiones focales (principalmente talina, vinculina y paxilina) pueden cambiar de acuerdo con las condiciones de rigidez extracelular. El grupo de Yamashita en 2014, reportó que la interacción de vinculina con la proteína vinexina- α , en un modelo de

fibroblastos embrionarios de ratón, disminuye en células cultivadas sobre hidrogeles de PAA de 3.8 kPa en comparación de sustratos más rígidos de 43 kPa. Cabe resaltar que al eliminar a vinculina- α , el reclutamiento de vinculina y la fracción inmóvil determinada por FRAP dejan de ser sensibles a los cambios de rigidez. Además el cofactor transcripcional mecanosensible YAP/TAZ disminuye su translocación nuclear, sugiriendo que esta interacción es indispensable para la transmisión de los estímulos mecánicos y la respuesta celular a ellos (Hino et al., 2019; Yamashita et al., 2014).

Otra de las evidencias de la modulación de proteínas asociadas a las AF es mostrada por el trabajo de Lee y colaboradores (2019) utilizando la línea celular epitelial de mama MCF710A. Este grupo reportó que YAP se asocia diferencialmente con la subunidad β 1 de las integrinas en condiciones de bajo confinamiento, en donde las células se pueden esparcir, generar mayores esfuerzos y formar más adhesiones focales (un mecanismo dependiente de actomiosina); mientras que YAP se asocia con la subunidad β 4 en condiciones de alto confinamiento celular en donde no se presentan todas las condiciones previamente mencionadas. Dichas asociaciones promueven su translocación al núcleo independientemente de su relación con el esparcimiento celular; por lo tanto muestran que su translocación puede ser mediada por diferentes proteínas de AF dependiendo del contexto celular (J. Y. Lee et al., 2019).

Por otra parte, también se han observado cambios en la regulación de los niveles de proteína, de algunos componentes de las AF en células cultivadas sobre sustratos rígidos. Al igual que en el reclutamiento de vinculina, diversos autores reportan en fibroblastos embrionarios de ratón, así como en células madre de médula ósea, que sus niveles de proteína totales aumentan en los cultivos realizados sobre sustratos más rígidos como en PDMS de 1014 kPa o hidrogeles de PAA de 43 kPa (Yamashita et al., 2014; C. Zhou et al., 2019). Este aumento se relaciona con la actividad del cofactor transcripcional MRTF ya que el gen de la proteína vinculina (VCL) es un gen blanco de esta maquinaria transcripcional (Philippart et al., 2004). Al aumentar su actividad transcripcional ante la contractilidad del citoesqueleto en respuesta a la rigidez, los monómeros de actina disponibles disminuyen y estos son los que normalmente bloquean su actividad transcripcional (Olson & Nordheim, 2010).

Tabla 1. Respuesta de vinculina, paxilina y talina a la rigidez del sustrato.

Proteína	Células	Sustrato	Cambios conforme a la rigidez	Referencias
Vinculina	BMSC, MEFs	PDMS (46 kPa vs 1,014 kPa); PAA (3.8 vs 43 kPa)	Regulación de los niveles de proteína: Aumento en los niveles de proteína en lisados celulares totales.	(Yamashita et al., 2014; Zhang et al., 2019)
	BMSC, MEFs, hMSCs	PDMS (46 kPa vs 1,014 kPa); PAA (3 vs 14 kPa); PCL (0.9 vs. 133 MPa)	Mayor reclutamiento en la periferia celular	(Van Tam et al., 2012; Yamashita et al., 2014; C. Zhou et al., 2019; D. W. Zhou et al., 2017)
	MEFs, 3T3L1	PAA (3.8 vs 25 kPa); (8 vs 100 kPa)	Tasa de recuperación de fluorescencia más alta (FRAP)	(Stutchbury et al., 2017; D. W. Zhou et al., 2017)
	MEFs	Micropostes de PDMS para microscopía de fuerzas de tracción	Conformación activa de la molécula (despliegue de Vh con Vt) aumenta las fuerzas de tracción ejercidas al sustrato	(Dumbauld et al., 2013)
	MEFs	PAA (18 kPa vs vidrio)	Fosforilación en Y100/1065 indispensable para su completa activación y transmisión de esfuerzos	(Omachi et al., 2017)
Paxilina	hSCAPs	PDMS (1000 vs 500 kPa)	Regulación de los niveles de proteína: Aumento en los niveles de proteína en lisados celulares totales.	(C. Zhou et al., 2020)
	MEFs	PAA (3.8 vs 25 kPa)	Sin regulación de los niveles de proteína.	(Yamashita et al., 2014)
	hSCAPs	PDMS (1000 vs 500 kPa)	Mayor reclutamiento en la periferia celular	(C. Zhou et al., 2020)
	MEFs, hMSCs	PDMS (3 vs 14 kPa); PCL (0.9 vs. 133 MPa)	Sin cambios en el reclutamiento	(D. W. Zhou et al., 2017; Stutchbury et al., 2017)
	MEFs	PAA (3.8 vs 25 kPa)	Tasa de recuperación de fluorescencia más baja (FRAP)	(Yamashita et al., 2014)
	MEFs, 3T3	PDMS (3 vs 14 kPa); PAA (8 vs 100 kPa)	Sin cambios en la tasa de recuperación de fluorescencia	(Stutchbury et al., 2017; D. W. Zhou et al., 2017)
	3T3	PAA (8 vs 100 kPa)	Aumenta el radio de p-paxilina/paxilina total	(Stutchbury et al., 2017)
Talina	MEFs, hMSCs	PDMS (3 vs 14 kPa); PCL (0.9 vs. 133 MPa)	Sin cambios en el reclutamiento en la periferia celular	(Yamashita et al., 2014; Van Tam et al., 2012)
	3T3	PAA (8 vs 100 kPa)	Tasa de recuperación de fluorescencia más alta (FRAP)	(Stutchbury et al., 2017)
	HEK239	PAA (0.5 vs 25 kPa)	Regulación conformacional: Despliegue de la molécula y de sus 13 dominios tipo rod.	(Austen et al., 2015; Yao et al., 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría del conocimiento recabado, relacionado con el reconocimiento de las células a su matriz extracelular circundante, ha sido obtenido en condiciones totalmente ajenas a las propiedades físicas (mecánicas) y bioquímicas presentes en los diferentes tejidos del cuerpo humano. El desarrollo embrionario, la organogénesis, la homeostasis y el envejecimiento son procesos fisiológicos que se basan en la relación intrínseca de las células y su MEC circundante. Las adhesiones focales ayudan a mantener esta comunicación; internalizan y propagan las señales bioquímicas y mecánicas del medio en diferentes respuestas intracelulares. Cualquier anomalía en la comunicación con el exterior, puede estar relacionada con la falta de control en la quiescencia celular, la reparación de tejidos, la proliferación de células progenitoras y la regulación de procesos inflamatorios que podrían participar en la generación de patologías tales como el cáncer, la fibrosis o enfermedades autoinmunes. Debido a la insuficiencia de estudios de los complejos de AF en modelos con características fisicoquímicas y fisiopatológicas, hace falta identificar los componentes reclutados en las AF dependiendo de las propiedades de la matriz extracelular en la que se encuentran las células como la rigidez, la cual es específica, de acuerdo al tejido y que puede cambiar en el tiempo. Conocer estos cambios ayudará a entender con mayor claridad las respuestas celulares ante las señales mecánicas del medio, en contextos sanos y patológicos, donde se ven alteradas. A su vez, esclarecer los mecanismos de mecanotransducción de señales ayudará a elaborar mejores modelos biomiméticos que permitan el desarrollo de estrategias terapéuticas.

4. HIPÓTESIS

Se sabe que las adhesiones focales son complejos proteicos mecanosensibles que conectan la matriz extracelular con el interior de las células activando el reclutamiento de diferentes proteínas intracelulares que regulan distintos procesos celulares. Por lo tanto, cambios en las propiedades mecánicas del medio extracelular, como la rigidez, fomentarán diferentes complejos proteicos que le permitan regular de manera particular los diferentes procesos celulares.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Identificar los complejos proteicos asociados a las proteínas vinculina, talina y paxilina, en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles rígidos (20 kPa) y suaves (1 kPa) para conocer los cambios en los complejos de adhesiones focales mediados por estímulos mecánicos.

5.2 *Objetivos particulares*

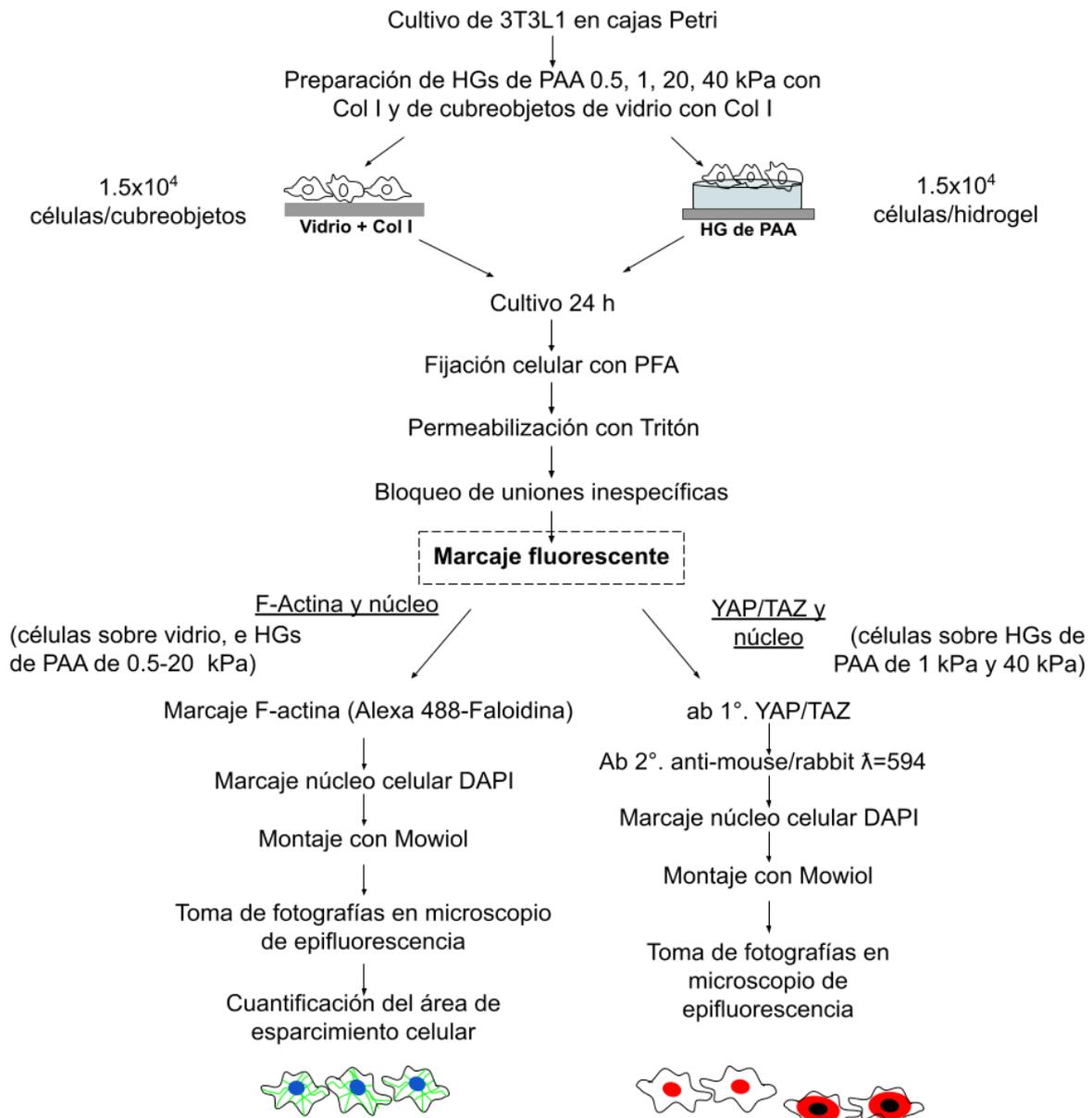
1. Caracterizar los cultivos con fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones de rigidez controlada (suave y rígido).
2. Identificar las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón.
3. Detectar las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida rígidos (20 kPa) y suaves (1 kPa).
4. Realizar la búsqueda bibliográfica de dominios y motivos de proteínas de adhesiones focales mecanosensibles con potencial de interacción a adhesiones focal o citoesqueleto de actina.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

6.1 *Caracterizar los cultivos con fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones de rigidez controlada (suave y rígido).*

Se establecieron los cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones de rigidez controlada (suave y rígido) a través del siguiente diseño experimental (Diagrama 1).

Diagrama 1. Diseño experimental para resolver el objetivo particular 1.



Se utilizaron fibroblastos embrionarios de la línea inmortalizada 3T3-L1 y se mantuvieron en cajas petri. Posterior a ello, se recubrieron cubreobjetos de vidrio con colágena I en la superficie y se fabricaron hidrogeles de poliacrilamida (HG de PAA) con un módulo elástico de 0.5, 1, 5, 20 y 40 kPa recubiertos con colágena I sobre cubreobjetos de vidrio redondos (20 mm de diámetro) previamente tratados en su superficie para con el objetivo que la poliacrilamida quede adherida covalentemente al cubreobjetos (ver métodos).

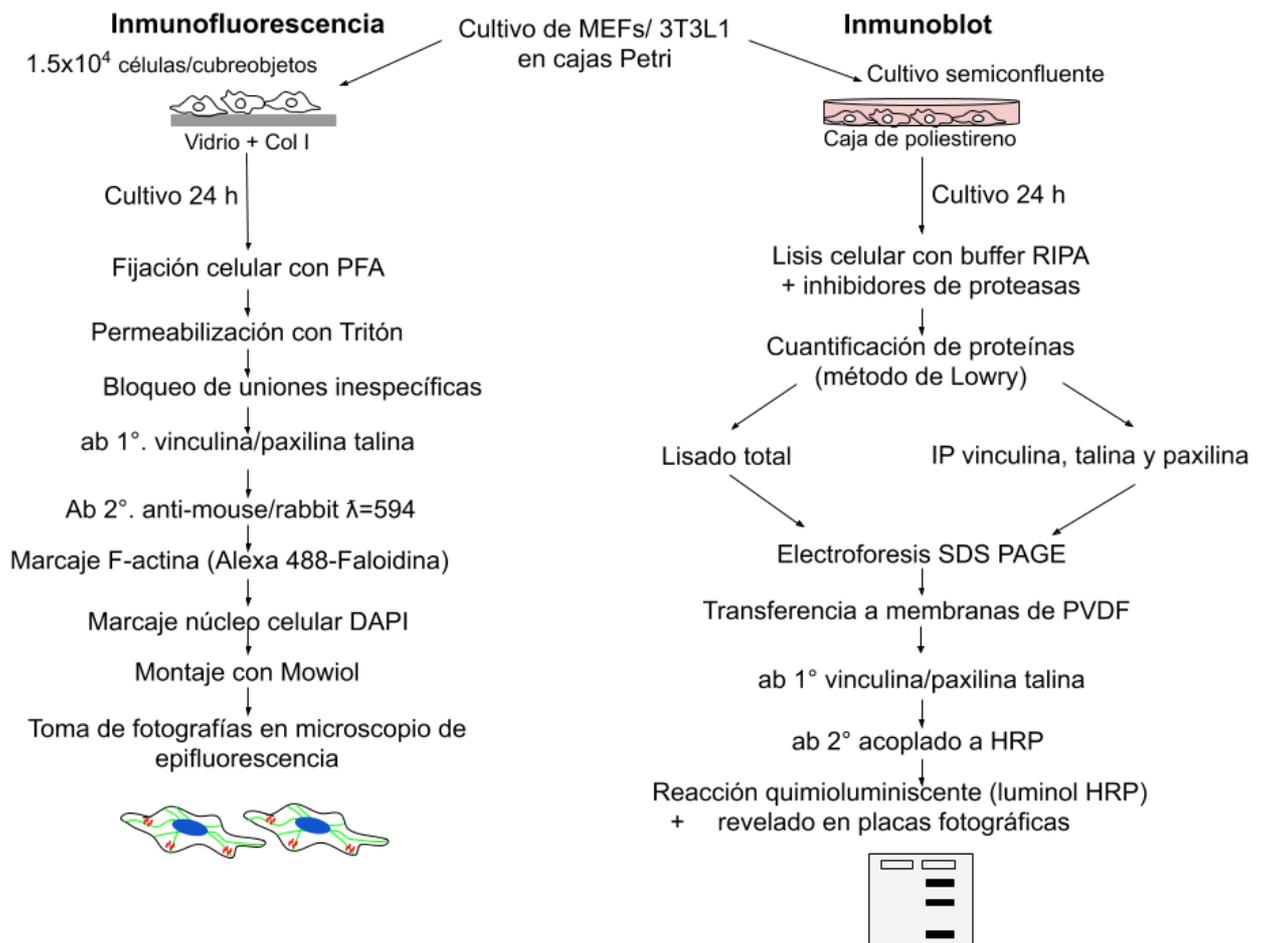
En ambos tipos de sustratos (cubreobjetos de vidrio e HG de PAA) se cultivaron 1.5×10^4 fibroblastos, y se mantuvieron por 24 h de cultivo. Después de este tiempo, los fibroblastos fueron fijados al sustrato con paraformaldehído (PFA 4%), se realizó posteriormente la permeabilización de su membrana celular y el bloqueo de uniones inespecíficas. En el caso del marcaje fluorescente de la F-actina y el núcleo celular, se incubaron las células con Alexa-488-Faloidina y posteriormente con DAPI. Tras la obtención del marcaje, las células fueron montadas para su posterior observación y toma de fotografías en microscopía de epifluorescencia. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron utilizadas para la cuantificación del área de esparcimiento y circularidad celular.

Por otra parte, para el marcaje fluorescente de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ, se utilizaron las células, fijadas con PFA cuya membrana fue permeabilizada, cultivadas sobre HG de PAA de 1 kPa (suave) y 40 kPa (rígido). Estas fueron incubados con un anticuerpo primario específico para YAP/TAZ y posteriormente al anticuerpo secundario acoplados a un fluorocromo. Las muestras fueron montadas para su posterior observación y toma de fotografías en microscopía de epifluorescencia.

6.2 Identificación de las proteínas vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en condiciones de cultivo celular estándar.

La identificación de las proteínas vinculina, talina y paxilina, en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en placas de poliestireno cargadas negativamente se realizó a través del siguiente diseño experimental:

Diagrama 2. Diseño experimental para resolver el objetivo particular 2.



Se cultivaron 1.5X10⁴ fibroblastos embrionarios de ratón primarios y de la línea inmortalizada 3T3-L1 en los medios de cultivo correspondientes (ver métodos) sobre cubreobjetos redondos de vidrio (20 mm de diámetro) recubiertos con colágena tipo I en la superficie para la detección por inmunofluorescencia. En el caso de la detección por inmunoblot, se utilizaron cultivos de fibroblastos confluentes (aproximadamente de un 80%) en cajas petri de poliestireno tratado (TCPD, por sus siglas en inglés) de 100 mm de diámetro.

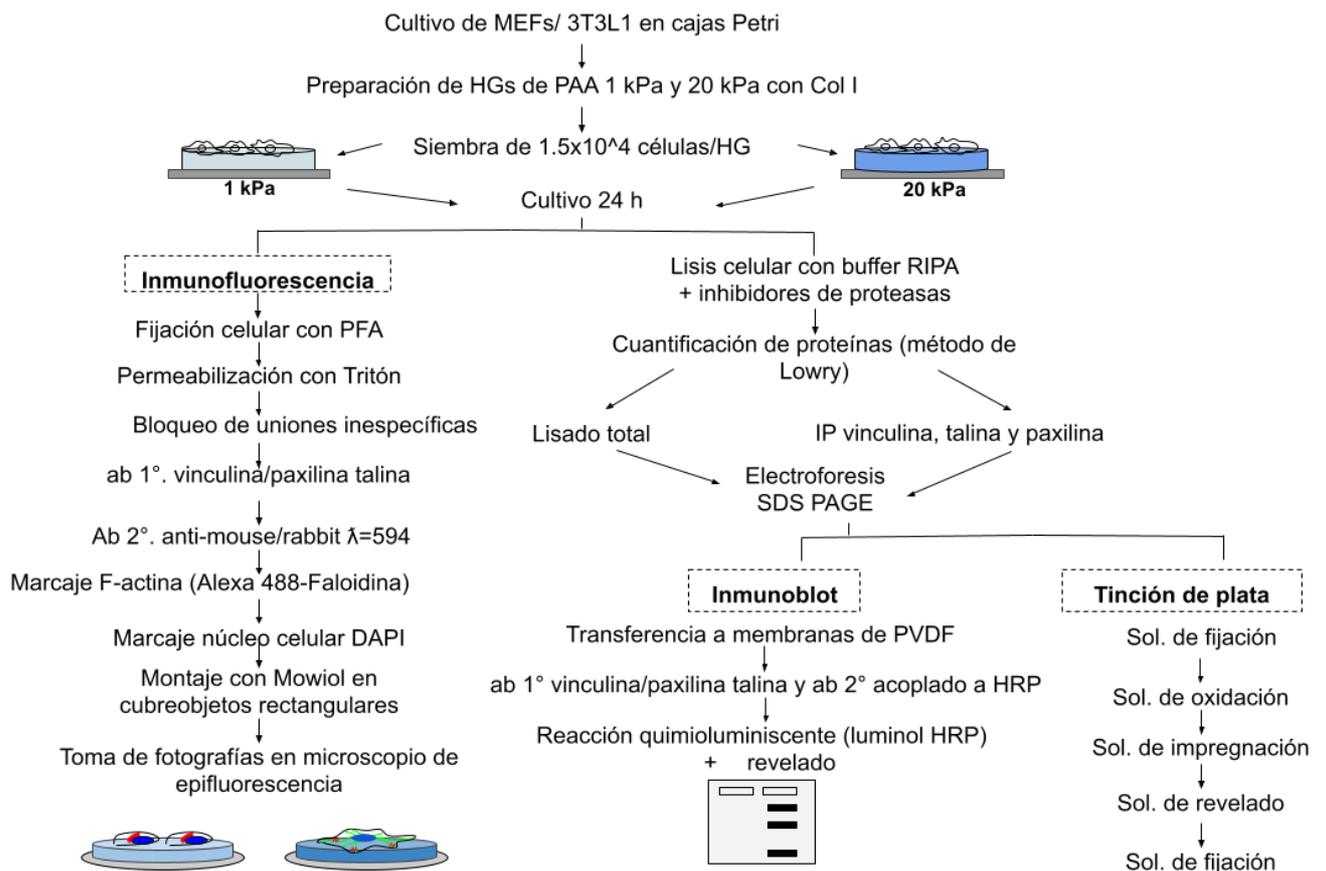
En el caso de la detección de las proteínas de adhesiones focales por inmunofluorescencia, los fibroblastos cultivados fueron fijados al cubreobjetos, de modo que se permitió la permeabilización de su membrana celular y el bloqueo de uniones inespecíficas para luego poder incubar con los anticuerpos primarios específicos y los secundarios acoplados a un fluorocromo. Asimismo, se realizó el marcaje de fibras de estrés de actina y el núcleo celular. Las muestras fueron montadas para su posterior observación y toma de fotografías en microscopía de epifluorescencia.

Para realizar el inmunoblot, se utilizaron lisados celulares totales provenientes de las cajas de poliestireno. Estos fueron cuantificados por el método de Lowry. Los lisados totales se resolvieron por electroforesis de proteínas. La detección de las proteínas se hizo por anticuerpos específicos contra vinculina, talina y paxilina, y anticuerpos secundarios acoplados a la proteína peroxidasa de rábano (HRP) para la detección de las proteínas específicas por quimioluminiscencia.

6.3. Detectar las proteínas vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada.

La detección de vinculina, talina y paxilina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida, con 1 kPa y 20 kPa de rigidez, se llevó a cabo a través del siguiente diseño experimental:

Diagrama 3. Diseño experimental para resolver el objetivo particular 3.



Para controlar la rigidez del sustrato, se elaboraron hidrogeles de poliacrilamida descritos previamente. Para la detección de proteínas por inmunofluorescencia las células fueron tratadas de la misma manera que en la detección en cubreobjetos (arriba descrito). Por lo que fueron fijadas con paraformaldehído y se permeabilizó su membrana celular con tritón para poder agregar los anticuerpos y marcadores de F-actina así como de núcleo. Al finalizar se montaron en cubreobjetos rectangulares debido al grosor de los hidrogeles; esto

para que fuera posible su observación al microscopio en objetivos mayores a 40x debido a que la distancia de trabajo está ajustada al grosor de cualquier cubreobjetos.

Por otra parte, para la detección por inmunoblot se utilizaron 4 HGs de PAA para la obtención de un lisado celular por condición, esto debido a que la cantidad de proteína es mínima por cubreobjeto. Una vez obtenido, se realizó el mismo proceso descrito en la detección en cajas de poliestireno (descrito previamente).

6.4 Métodos

6.4.1 Cultivo celular

Se obtuvo la línea celular de fibroblastos inmortalizados embrionarios de ratón 3T3-L1 de la *American Type Culture Collection* (ATCC® CL-173™) para detectar las proteínas de adhesiones focales. Además se utilizaron fibroblastos embrionarios primarios de ratón (MEFs) de 13.5 días de gestación donados por el Dr. Alejandro Cabrera Wrooman del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Los fibroblastos 3T3-L1 fueron cultivados en medio DMEM bajo en glucosa (Gibco, 31600-034), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, F2442) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 15140-122). Los MEFs se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (Gibco, 12800-017) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 2% de anfotericina 0.25 mg/mL (Gibco, 15290-026), también se le adicionó 1% de L-glutamina [2 mM]. Los fibroblastos 3T3-L1 se mantuvieron en cajas Petri de poliestireno de 100 mm de diámetro tratadas para cultivo celular. Se sembraron cada tercer día a una dilución 1:4. Por otra parte, los MEFs se preservaron en las mismas cajas de cultivo, pero recubiertas con gelatina porcina (Sigma Aldrich, no. G2500) al 0.5% en agua desionizada. Estas placas fueron recubiertas con gelatina, estéril por autoclave, durante 30 min a 37°C antes de su siembra. Los cultivos de MEFs se re-sembraron cada cuatro días a una dilución 1:3. La resiembra se realizó con tripsina al 0.25% (Sigma Aldrich, T4799-25G) en medio DMEM bajo en glucosa. Ambos tipos celulares se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y 99% de humedad.

6.4.2 Hidrogeles de poli(acrilamida) con rigidez controlada

Se elaboraron hidrogeles de poli(acrilamida) (HG de PAA) con rigidez controlada para detectar los complejos de adhesiones focales que se forman en células cultivadas en sustratos rígidos y suaves. El procedimiento requiere de cuatro etapas distintas: la

funcionalización de cubreobjetos que permita la adherencia del HG al vidrio, la silanización de portaobjetos para evitar que se peguen los HGs a esta superficie durante el proceso y propiamente la polimerización de los HGs. Al finalizar estos pasos, se realiza el fotoentrecruzamiento de la proteína colágena I al hidrogel de poliacrilamida para permitir la adhesión celular.

6.4.3 Funcionalización de cubreobjetos

Basándose en el procedimiento publicado por Cretu y colaboradores en 2010 (Cretu, Castagnino, & Assoian, 2010) se funcionalizaron cubreobjetos de vidrio de 20 mm de diámetro para permitir la adherencia de los HGs a los cubreobjetos de vidrio. A cada cubreobjeto se le añadió 1 mL de NaOH 0.1 M durante 3 min, terminado el tiempo, se añadieron 300 μ L de APTES (3-Aminopropyl)triethoxysilane (Sigma-Aldrich, 440140) durante 3 min adicionales. Al finalizar estos tiempos se realizaron 3 enjuagues y 3 lavados de 10 min con agua destilada. Posteriormente, se añadió 1 mL de glutaraldehído (Sigma-Aldrich G7651) 0.5% en agua desionizada durante 30 min. De este modo, el APTES reacciona con la superficie del cubreobjetos de vidrio oxidada por el NaOH para dejar un grupo amino libre (NH_2) que posteriormente reacciona con uno de los dos grupos aldehídos (CHO) del glutaraldehído, el cual a su vez genera un segundo grupo aldehído libre que reaccionará con los grupos amida (CONH_2) del HG de PAA. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 min con agua destilada y se secaron por completo. Se guardaron para su uso hasta máximo 1 semana.

6.4.4 Silanización de portaobjetos

Los portaobjetos de vidrio fueron tratados con diclorodimetilsilano (DCDMS) (Sigma-Aldrich, 440272-100ML) para generar una superficie hidrofóbica en donde posteriormente se permita la elaboración de los HGs en los cubreobjetos preparados.. El vidrio fue previamente limpiado con isopropanol y secado para después tratarlo *overnight* con el DCDMS mediante evaporación. Pasado el tiempo y con la ventilación adecuada, se dejaron secar previamente a su uso.

6.4.5 Polimerización de HGs de PAA

Para la elaboración de HGs, se siguió el procedimiento publicado por Tse y Engler en 2010 en los cubreobjetos previamente funcionalizados (Tse & Engler, 2010). Para obtener la rigidez deseada, se utilizaron diferentes cantidades de agua desionizada, acrilamida al 40%, que es el monómero de esta polimerización (Sigma Aldrich, A4058-100ML), así como de la

bisacrilamida al 2% (Sigma Aldrich, no. M1533-100ML), que funciona como entrecruzador de los monómeros de acrilamida en la reacción. Ambas fueron desgasificadas durante 15 min al vacío ya que el oxígeno puede inhibir la reacción. La polimerización de los HGs se llevó a cabo con persulfato de amonio (APS) (Sigma Aldrich, A3678) al 10%, quien confiere los radicales libres y TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) al 0.1% (Sigma-Aldrich, T7024) que se encarga de acelerar la reacción al fomentar la formación de los radicales libres. Tras realizar la mezcla con las cantidades dependiendo de la rigidez deseada (Tabla 2), se tomaron 100 μ L de cada solución y se colocó en el portaobjetos silanizado e inmediatamente se colocó encima de la gota un cubreobjeto funcionalizado. La polimerización se realizó durante 20 min como mínimo, finalizado este tiempo, se despegaron cuidadosamente de los portaobjetos silanizados (**Figura 10**). Los HGs elaborados se mantuvieron sumergidos en DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, por sus siglas en inglés) 1x para su posterior uso hasta máximo una semana.

Tabla 2. Cantidades de reactivos utilizadas para la elaboración de hidrogeles de PAA de rigidez controlada tomadas del trabajo de Tse y Engler en 2010.

Rigidez	Acrilamida de stock al 40%	Bis-acrilamida de stock al 2%	Agua desionizada	APS al 10%	TEMED
0.5 kPa	75 μ L	30 μ L	895 μ L	100 μ L	1 μ L
20 kPa	200 μ L	132 μ L	668 μ L	100 μ L	1 μ L

(Volúmenes para 1 mL de mezcla necesarios para 10 HGs).

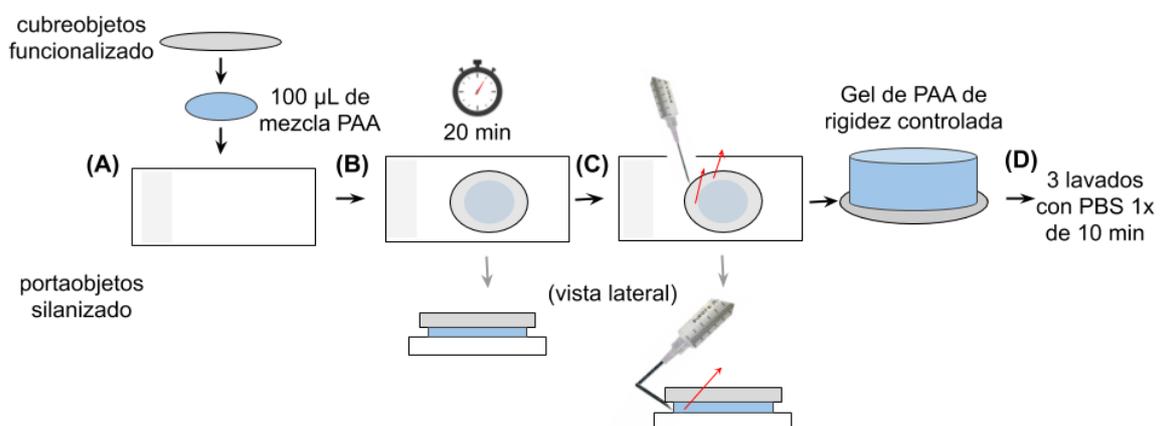


Figura 10. Esquema del proceso de elaboración de hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada. (A) Primero se colocan 100 μ L de la mezcla de poliacrilamida (PAA) a utilizar (de acuerdo a la Tabla 2), en un portaobjetos previamente silanizado; inmediatamente después, se coloca el cubreobjetos con el lado funcionalizado en contacto con la gota de PAA. (B) La mezcla se

deja polimerizar durante 20 min. **(C)** Pasado el tiempo, con ayuda de una jeringa con la punta doblada 90°, se despegan los hidrogel polimerizado del portaobjetos cuidadosamente. En el esquema se muestra la vista lateral de este paso (las flechas rojas indican la dirección a la cual la aguja de la jeringa empuja el cubreobjetos) **(D)** Finalmente, se realizan 3 lavados de PBS 1x de 10 minutos cada lavado.

6.4.6 Fotoentrecruzamiento de proteína

Por último, se realizó el fotoentrecruzamiento de proteína y esterilización de los HG's de PAA para realizar el cultivo celular. Se utilizaron como proteínas de adhesión la colágena I de cola de rata (Corning, 354236) disuelta en 20 mM en ácido acético diluida al 0.1%. Para entrecruzar la proteína se mezcló la proteína con el fotoiniciador Irgacure 2959 (Sigma-Aldrich, 410896) a una concentración de 0.1 g/mL en DMSO y NHS-éster-acrilato (Sigma-Aldrich, 130672) al 0.02 g/mL en DMSO. La mezcla consistió en 150 μ L de proteína de interés, 20 μ L de Irgacure y 15 μ L de NHS, de los cuales se tomaron 100 μ L por HG. El Irgacure genera radicales libres a partir de las moléculas del agua para que permitan el entrecruzamiento de la poli(acrilamida) y el NHS acrilato con la proteína de adhesión. El entrecruzamiento se llevó a cabo a través de la incubación de la mezcla en la lámpara UV UVP® CL-1000® Ultraviolet Crosslinkers ($\lambda = 365$ nm, con 5 lámparas de 8 watts cada una). Para la esterilización se hicieron enjuagues con DPBS 1x combinado con penicilina/estreptomicina (Gibco, 15140-122) al 1%. Los HGs sin proteína se almacenaron en DPBS 1x hasta máximo 1 semana; mientras que los conjugados con la proteína, en PBS 1x penicilina/estreptomicina hasta máximo 3 días.

6.4.7 Caracterización mecánica por micro-indentación

Los HGs de PAA elaborados con el método antes descrito fueron medidos en nuestro grupo de trabajo a fin de corroborar los valores de rigidez esperados con un microindentador Femto Tools, MTA-03 system y una punta FT-200 con una resolución de 200 uN (Pérez-Calixto et al., 2019). Los geles se midieron mediante microindentación y relajación para los valores de 1 kPa, (3.37 ± 0.17 kPa y 1.63 ± 0.39 kPa respectivamente), 4 kPa (12.60 ± 0.42 kPa y 6.41 ± 0.44 kPa) y 23 kPa.

6.4.8 Inmunofluorescencia

Para localizar a las proteínas de las AF, se realizó la técnica de inmunodetección por fluorescencia. Para ello, se utilizaron cultivos confluentes de MEFs y 3T3-L1 en cajas de poliestireno de 10 cm que fueron despegadas y contadas mediante el conteo por cámara de Neubauer. Se sembraron 15,000 células por cubreobjetos de vidrio o hidrogel de PAA.

Después de 24 h de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma Aldrich, P6148-500G) al 4% en DPBS 1x durante 20 min a 37°C y se hicieron 3 enjuagues con DPBS 1X posteriormente. Las células se permeabilizaron con Tritón diluido al 0.1% en DPBS 1x durante 10 min. Al término, se hicieron 3 lavados con DPBS 1x por 5 min. Esto con el fin de inmovilizarlas para poder realizar la técnica así como para permitir la entrada de los anticuerpos a utilizar, respectivamente. Asimismo, se evitó el pegado inespecífico de proteínas con una solución de suero de caballo al 10% junto con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% en DPBS 1X durante 1 h en agitación. La inmunodetección se realizó con anticuerpos primarios IgG contra vinculina (ratón, Santa Cruz Biotechnology, sc73614), talina (ratón, Santa Cruz Biotechnology, sc-365875) y paxilina (conejo, Cell Signaling, no. 2542) diluidos 1:100 en solución de bloqueo. Se utilizaron 100 µL de anticuerpo y se incubaron toda la noche a 4°C. Para el marcaje fluorescente, se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch, no. 715-586-150) y Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch, no. 711-586-152). Se utilizaron 100 µL de una dilución 1:500 en solución de bloqueo y se incubaron 2 h a TA. Asimismo, se tiñeron las fibras de estrés del citoesqueleto de actina utilizando 100 µL de Faloidina-Alexa 488 diluida 1:200 en DPBS 1X durante 30 min a TA. Se tiñó también el núcleo celular utilizando 100 µL de DAPI 1:200 durante 5 min a TA. Al finalizar cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con DPBS 1x.

Finalmente, los HGs se montaron en cubreobjetos rectangulares usando medio de montaje Mowiol (Sigma Aldrich, no. 81381), 80 µL en cubreobjetos de vidrio y 100 µL de Mowiol en HGs, con el fin de obtener el grosor necesario en las muestras obtenidas para hacer las observaciones del marcaje en el microscopio de epifluorescencia (*Nikon ECLIPSE CI-L con lámpara de mercurio lámpara de mercurio C-HGFI*). Simultáneamente a la observación del marcaje, se capturaron al menos 4 fotografías de diferentes campos de cada muestra (duplicado) con el objetivo de hacer posteriormente el análisis del marcaje.

6.4.9 Cuantificación del área de esparcimiento celular

El análisis de imágenes se llevó a cabo con el software libre *Fiji*, la versión completa del programa *ImageJ*. Se utilizaron fotografías del marcaje fluorescente de los filamentos de actina (F-actina) en fibroblastos embrionarios de ratón primarios y de la línea celular 3T3-L1 cultivados sobre cubreobjetos de vidrio o hidrogeles de PAA y se usaron al menos 4 campos diferentes por muestra (duplicado). En primer lugar, se transformó cada fotografía con extensión *.tiff* y formato RGB, en imagen binaria de 8 bits (Image-> Type-> 8 bit) y se

duplicó para posteriores pasos. Luego, se ajustó la escala del programa de acuerdo con la calibración hecha por el laboratorio, la cual equivale a 4.43 píxeles/ μm para el lente objetivo de amplificación de 400 veces (40x). Para una de las dos copias de las imágenes binarias, se definió un umbral de manera automática de los límites inferiores y superiores de la escala de grises (Image -> Adjust -> Threshold-> Auto -> Apply). Luego se ajustaron los parámetros para redirigir la cuantificación a la imagen sin el umbral, de modo que se hiciera con respecto a dicha imagen; asimismo se verificaron los parámetros morfométricos deseados (Analyze -> Set measurements -> Area -> Redirecting). Finalmente se indicó que la cuantificación se realizaría a las partículas mayores a 50 μm para excluir al marcaje no asociado a los filamentos de actina, adicionalmente, se seleccionaron las casillas correspondientes para mostrar los resultados finales y para resaltar las áreas de interés cuantificadas (Analyze -> Analyze Particles -> 50 μm -infinity -> Outlines -> Display results). Los resultados arrojados se copiaron a una hoja de cálculo para posteriores análisis.

Dada la morfología fusiforme de los fibroblastos, no se puede obtener bajo este procedimiento una cuantificación precisa del número de células. Por lo tanto se realizó una corrección de este valor, para ello se utilizaron las fotografías de tinción de DAPI correspondientes y se realizó el mismo proceso de cuantificación de área con umbral hecho para los filamentos de actina. No obstante, esta vez se recuperó el número de partículas contado por el programa y se sustituyó por el número de partículas cuantificado anteriormente en el área celular; de este modo se obtuvo un promedio del área de esparcimiento celular más certero.

6.4.10 Cuantificación del número y tamaño de adhesiones focales

Al igual que en la cuantificación del área de esparcimiento, el cálculo de la circularidad celular se realizó en el programa Fiji con las fotografías, obtenidas de la inmunotinción de vinculina realizada en fibroblastos embrionarios de ratón primarios y de la línea celular 3T3-L1. Se siguió el protocolo publicado por Horzum en 2014 para la cuantificación de adhesiones focales en la línea celular MDA-MD-231 (Horzum et al., 2014). Se utilizaron al menos 3 imágenes por cubreobjetos (duplicado), así como un mínimo de 3 campos por cada fotografía. Primero se transformó cada fotografía con extensión *.tiff* y formato RGB, en imagen binaria de 16 bits (Image-> Type-> 16 bit). Tras ajustar la escala que corresponde a las imágenes, se cortaron campos aleatorios de 60x40 μm^2 en la periferia de distintas células. Luego, se eliminó el fondo local de la imagen usando los parámetros publicados (Subtract background -> 50+paraboloide). Posteriormente se utilizó el complemento del

programa CLAHE (por sus siglas en inglés *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization*) para aumentar el contraste local de la imagen (Plugins ->CLAHE-> Parámetros: Tamaño de bloque=19, Histograma=256, Pendiente máxima=6,). A diferencia del protocolo citado, no se aplicó la función "EXP" que minimiza el ruido del fondo y finalmente se ajustaron los parámetros de contraste y brillo de toda la imagen (Image -> Adjust -> Brightness & Contrast -> Auto). Para propiamente la cuantificación, se duplicaron las imágenes para poder definir un umbral y cuantificar el área tal y como se explicó en el apartado anterior, con la diferencia de que los parámetros de medición esta vez fueron de $1\mu\text{m}^2$ a infinito (Analyze -> Analyze Particles -> 50 μm -infinity -> Outlines -> Display results).

6.4.11 Lisis celular, cuantificación de proteínas e inmunoprecipitación (IP)

Se utilizaron lisados de fibroblastos 3T3L1 o MEFs, cultivadas en cajas petri o HGs, obtenidos con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P40, 0.5% desoxicolato de sodio y 0.1% SDS complementado con los inhibidores de proteasas y de fosfatasa NaF, NaPPI, Na₃VO₄ y cOmplete). La lisis en cajas de cultivo se realizó con 1 mL de buffer por caja desprendiendo las células mecánicamente con ayuda de un gendarme; mientras que la lisis para los HGs se realizó con 500 μL de buffer por HG desprendiendo las células con la resuspensión del volumen usando una micropipeta de 1000 μL . Para un lisado celular en estas condiciones se utilizaron 500 μL en 4 cubreobjetos, transfiriendo el volumen al siguiente HG terminada la resuspensión. Se incubaron durante 2h a 4°C y se recuperó el sobrenadante de la centrifugación a 13,300 RPM durante 10 min.

Para cuantificar las proteínas del sobrenadante obtenido, se utilizó el método colorimétrico de Lowry utilizando un kit comercial (BIORAD, 500-0116) y un espectrofotómetro. En este protocolo las proteínas del lisado reaccionan con la solución de cobre y el reactivo de folina, lo que genera especies reducidas que tienen un color característico azul al absorber a una longitud de onda máxima de 750 nm. Se utilizaron 25, 50 y 100 μg de proteína obtenida. Para la primera IP, se incubaron en rotación toda la noche a 4°C con 1 μg de los anticuerpos contra vinculina, talina y paxilina utilizados para la inmunofluorescencia. Por otra parte, para realizar un segundo IP que permitiera posteriormente conocer la interacción de estas proteínas se incubaron en rotación una segunda vez con los anticuerpos de interés 2 h. Para recuperar las proteínas unidas a los anticuerpos se utilizaron 75 μL de proteína G sefarosa que se incubaron durante 1 h, se centrifugaron 5 min a 13,300 RPM y se realizaron 3 lavados con buffer TNTE. Finalmente se quitó el excedente de buffer hasta que se retiró

todo líquido, se les añadió 20 µL de Laemmli 2x y se calentó a 100°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas.

6.4.12 Electroforesis de proteínas e inmunoblot

Para evaluar y comparar la expresión de proteínas de adhesiones focales, se realizó la metodología de *western blot* o inmunoblot. Primero se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% y un concentrador al 5% a 100 volts; de modo que el campo eléctrico generado permite la separación de proteínas de acuerdo con el tamaño, del polo negativo al positivo, gracias a los poros resultantes de la polimerización del gel de poliacrilamida. Se utilizaron lisados totales (TCL) así como inmunoprecipitaciones de lisados previamente obtenidos.

Posteriormente, se transfirieron las proteínas separadas en el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno o PVDF, a 320 mA por 2:30 h a temperatura ambiente. En este paso las proteínas migran gracias al campo eléctrico del polo negativo (gel de PAA) hacia el positivo (membrana de PVDF), para posteriormente poder marcar las proteínas con los anticuerpos de interés.

Se bloquearon las membranas con leche baja en grasa (Nestlé Svelty bajo en grasa descremada) al 5% en buffer TBS-T (8 g de NaCl, 3 g de Trizma base, 0.2 g de KCl, 1 mL de Tween 20 aforado a 1 L con agua desionizada pH=7.6) durante 1 h en agitación para evitar pegado inespecífico del anticuerpo. Al finalizar, se lavó la membrana 1 vez con agua desionizada y luego se incubaron con los anticuerpos primarios, utilizados en la inmunofluorescencia, diluidos 1:1000 en TBS-T dentro de bolsas de plástico selladas térmicamente, toda la noche en agitación a 4°C. Por otra parte, para los anticuerpos secundarios, se utilizaron los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Estos se incubaron en una dilución 1:10,000 en leche baja en grasa al 5% por 1 h a temperatura ambiente en agitación.

Se utilizaron los reactivos luminol de sustrato de HRP y peróxido de hidrógeno de sustrato HRP en proporción 1:1 durante 1 min. La reacción de la enzima HRP proveniente de los anticuerpos secundarios con estos sustratos emite una señal lumínica a 428 nm la cual es capturada posteriormente en placas sensibles a la luz azul. Por lo que, en total oscuridad, se expusieron las membranas de PDVF a placas fotográficas durante 30 seg, 1 min y 3 min

dependiendo de la intensidad de la señal. Se utilizó el revelador GBX (Carestream dental, 190 0943) así como el GBX (Carestream dental, 190 1875) para poder observar las bandas obtenidas en la inmunotransferencia. También se utilizó el equipo ChemiDoc (BIORAD ChemiDoc MP) para revelar las membranas y obtener digitalmente imágenes de las bandas de proteína.

6.4.13 Tinción de nitrato de plata (AgNO_3)

Con el objetivo de identificar cambios en las interacciones de los componentes de adhesiones focales, se realizó la tinción de nitrato de plata del gel de electroforesis en el cual se corrieron las inmunoprecipitaciones de vinculina de células cultivadas sobre HGs de PAA de 20 y 1 kPa. En la tinción de nitrato de plata, las proteínas desnaturalizadas del gel de electroforesis se unen a los iones de plata y debido a una reacción de reducción, es posible teñir las bandas de proteína obtenidas (Kumar et al., 2018). Primero, se lleva a cabo una reacción de fijación con el fin de inmovilizar las proteínas, así como para deshacerse de compuestos que puedan interferir con la reacción. Para ello, tras obtener el gel de electroforesis con las muestras de interés, el gel se colocó en un contenedor protegido de la luz y se incubó en solución de fijación (50% v/v metanol, 12% v/v ácido acético glacial, 0.5% v/v formaldehído 37%, en agua desionizada) durante 1.5 h y se realizaron lavados con agua destilada 2 min, seguidos de 3 lavados con metanol al 50% durante 10 min cada uno, y finalmente, con agua destilada durante 2 min, dichos lavados son importantes para evitar la interferencia de otros compuestos en el gel.

Posteriormente, con el objetivo de incrementar la sensibilidad de las bandas de proteína para reaccionar con el nitrato de plata, se agregó solución de oxidación (1:4 v/v de 0.2 g/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en agua desionizada). Tras ello, se incubó el gel con solución de impregnación (AgNO_3 , 750 μL de formaldehído 37% y agua desionizada) por 4 min y enseguida, se realizaron 2 lavados con agua destilada durante 20 s, en cada paso. Después, se agregó la solución de revelado (6 g de Na_2CO_3 y agregar 500 μL de 0.2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, agua H_2O , 500 μL de formaldehído 37%) durante unos segundos hasta la visualización de las bandas con el contraste deseado e inmediatamente se lavó 2 veces con agua destilada durante 1 min. Finalmente, se agregó solución de fijación durante 10 min para detener la reacción de revelado y para evitar la intensidad de señal del fondo. Por último se almacenó el gel teñido obtenido en agua destilada a 4°C

7. RESULTADOS

7.1 Los fibroblastos embrionarios de ratón son responsivos a la rigidez del sustrato en el que son cultivados.

Con la finalidad de evaluar el papel de la rigidez del sustrato en el que se encuentran las células en los componentes de adhesiones focales, primero se realizaron los controles pertinentes para la fabricación de los sustratos con rigidez controlada. De acuerdo con las concentraciones publicadas en el trabajo de Tse y Engler en 2010 (Tse & Engler, 2010), se fabricaron hidrogeles de poliacrilamida (HG de PAA) entrecruzados con colágena tipo I sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro para obtener sustratos con rigidez controlada, los cuales bajo el procedimiento antes descrito coinciden con los valores esperados de acuerdo a las mediciones realizadas por nuestro grupo de trabajo (descritos en la sección de *Métodos*).

Para el cultivo celular, se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón provenientes de la línea celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™). Tras 24 h de cultivo estándar, se observaron diferencias en el marcaje fluorescente de la F-actina de acuerdo con la rigidez del sustrato en el que las células fueron cultivadas. En la Figura 11A se puede ver que en condiciones estándar de cultivo celular, es decir utilizando cubreobjetos de vidrio (los cuales tienen una rigidez en el orden de los GPa) se pueden distinguir una gran cantidad de fibras de estrés de actina a lo largo del citoplasma las cuales también son discernibles, aunque con menor claridad, en los HG de PAA de 20 kPa y 5 kPa. Por el contrario, sobre los HG de 1 kPa y 0.5 kPa la marca de F-actina está distribuida de manera uniforme en el citoplasma sin poder distinguir las fibras de estrés. También se pudo apreciar una morfología más extendida a mayor rigidez de cultivo (**Figura 11A**), de manera que se realizaron las cuantificaciones del área de esparcimiento y circularidad celular con ayuda del software *ImageJ*.

En las gráficas se puede apreciar que las células cuentan con una mayor área conforme aumenta la rigidez (**Figura 11B**). En condiciones estándar de cultivo, las células tienen un área promedio cercana a los 7,000 μm^2 , mientras que las células cultivadas sobre los HG de PAA cuentan con una área estadísticamente significativa menor: a los 20 kPa, las células disminuyeron casi 3 veces de cambio su área promedio, con un valor cercano a los de 4,500 μm^2 . En los sustratos con menores valores de rigidez (5 kPa 1 kPa y 0.5 kPa), el área disminuyó 4, 5 y 5.5 veces (con un área promedio cercana a los 3,000, 2000 y 1,500 μm^2) respectivamente, en comparación de las condiciones estándar de cultivo (**Figura 11B**).

Además de los cambios en el área de esparcimiento, se cuantificaron las diferencias de la morfología comparando la circularidad de las células, es decir utilizando el radio normalizado entre el área y perímetro celular. A diferencia del área celular, se puede apreciar que la circularidad disminuye conforme aumenta la rigidez del sustrato, los sustratos más rígidos (vidrio e HG de 20 kPa y 5 kPa) cuentan con un radio promedio similar cercano a 0.2, en contraste, los sustratos más suaves, de 1 kPa y 0.5 kPa tienen una circularidad estadísticamente menor cercana a 0.4 (Figura 11B).

Finalmente, para conocer la respuesta celular debida al cultivo en diferentes valores de rigidez, se comparó la localización de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en los fibroblastos 3T3-L1 entre sustratos rígidos y suaves, considerando 40 kPa como rígido y 1 kPa como suave. Se puede observar que YAP/TAZ tiene una localización predominantemente nuclear en células cultivadas en sustratos rígidos, mientras que se encuentra distribuida a lo largo de toda la célula, citoplasma y núcleo celular en los sustratos suaves (**Figura 11C**). Por tanto, se encontró que los fibroblastos 3T3-L1, responden a la rigidez del sustrato en el que se encuentran; teniendo mayor área de esparcimiento celular y una menor circularidad conforme aumenta la rigidez del sustrato, así como la localización nuclear de YAP/TAZ en sustratos rígidos. Una vez obtenidos estos controles, fue posible comenzar la detección de los componentes de adhesiones focales.

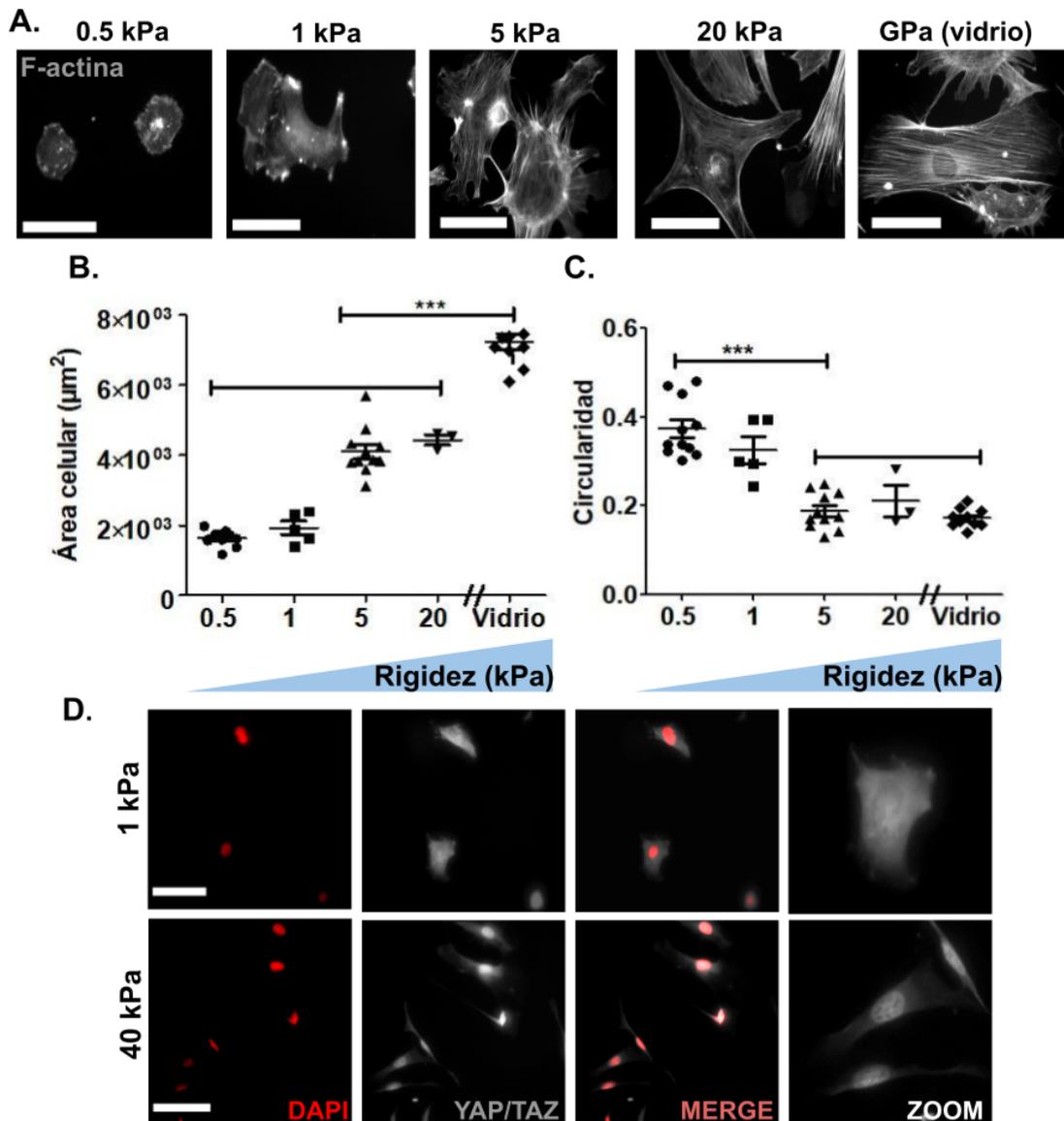


Figura 11. Los fibroblastos embrionarios de ratón 3T3L1 responden a la rigidez del sustrato. (A) Marcaje fluorescente de F-actina (escala de grises) en fibroblastos embrionarios de ratón 3T3L1 cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida (0.5, 1, 5 y 20 kPa) y cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena tipo I. La barra de escala equivale a 100 μm (Imágenes representativas n=3). (B) Cuantificación del área celular total (**p<0.05 comparados contra los valores en vidrio; t de student no pareada n=3) y (C) circularidad, definida como el radio normalizado del área/perímetro (**p<0.05 comparados contra los valores en vidrio, 20 y 5 kPa; t de student no pareada n=3). (D) Marcaje fluorescente del núcleo (rojo) y del cofactor transcripcional YAP/TAZ (escala de grises) en células 3T3L1 cultivadas en hidrogeles de poliacrilamida recubiertos con colágena tipo I de 1 y 40 kPa. Co-inmunolocalización (merge) del marcaje de núcleo y YAP/TAZ. La barra de escala equivale a 100 μm .

7.2 Detección de las proteínas de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos cultivados en condiciones estándar de cultivo celular.

A fin de lograr la identificación de los componentes de adhesiones focales para poder posteriormente compararlos, primero se estandarizó la detección de proteínas de adhesiones focales en fibroblastos 3T3-L1 cultivados en condiciones estándar, es decir sobre cubreobjetos de vidrio o cajas de poliestireno cargadas negativamente. Inicialmente se detectaron los componentes de los complejos mediante la técnica de inmunotinción de la proteína vinculina, la cual como se muestra en la (**Figura 12A**), se puede observar con un patrón punteado en la periferia celular de los fibroblastos. La microscopía de epifluorescencia fue suficiente para poder distinguir el patrón característico de estos complejos y también se detectó señal citoplasmática en las células, principalmente alrededor del núcleo. Por otra parte, las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal permitieron mejorar la resolución del marcaje de vinculina (**Figura 12A**). Aunado a ello, se pudo apreciar que la señal de F-actina se encuentra en contacto con el marcaje de vinculina.

Aparte de la inmunotinción, se estandarizó el método de detección de los niveles de proteína de los componentes de adhesiones focales vinculina, paxilina y talina mediante la técnica de inmunoblot, las cuales coincidieron con los pesos moleculares reportados (talina=270 kDa, vinculina 116 kDa y paxilina=68 kDa) (**Figura 12B**). Se utilizaron diferentes concentraciones del lisado celular total (TCL) y se encontró que a partir de 25 µg se pueden detectar las proteínas por esta técnica, por lo que se tomó la decisión de utilizar 50 µg de TCL para futuros experimentos que permitan poder evaluar diferencias de acuerdo con la rigidez del sustrato en el que se encuentran las células. Como controles de carga de las diferentes concentraciones de TCL se utilizó la tinción de azul de Coomassie).

Por otra parte, se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón primarios de 13.5 días de gestación (MEFs, por sus siglas en inglés *mouse embryonic fibroblasts*) para la detección de los complejos de AF. En este modelo, la inmunotinción de vinculina mostró un marcaje de mayor resolución utilizando microscopía de epifluorescencia a comparación de la línea celular 3T3-L1, de modo que se pudo apreciar un enriquecimiento del marcaje (**Figura 12C**), por tanto, se realizó la cuantificación del número y tamaño de AF, basada en el marcaje de vinculina y con base en el protocolo reportado por Horzum en 2014 (Horzum et al., 2014). En las gráficas de la (**Figura 12C**) se muestran los resultados de la cuantificación, en la cual se encontró que la línea celular 3T3-L1 tiene un menor número y

tamaño de AF en contraste con los fibroblastos primarios; los MEFs tienen casi el doble de marcas puntuadas por área cuantificada (con un promedio de 20 adhesiones en contraste con 10 en 3T3-L1) y más del doble del promedio del tamaño de cada marca ($6 \mu\text{m}^2$ en comparación con $2 \mu\text{m}^2$ en 3T3L1) (**Figura 12C**). Con estos experimentos se obtuvieron las condiciones óptimas para la detección de las proteínas de adhesiones focales mediante inmunotinción e inmunoblot en la línea celular 3T3L1, así como en células primarias para poder enriquecer el marcaje fluorescente de los complejos. Posteriormente se planea detectar y comparar los complejos bajo el cultivo en sustratos de rigidez variable ya que no fue posible en este proyecto debido a la contingencia sanitaria por la pandemia de COVID-19.

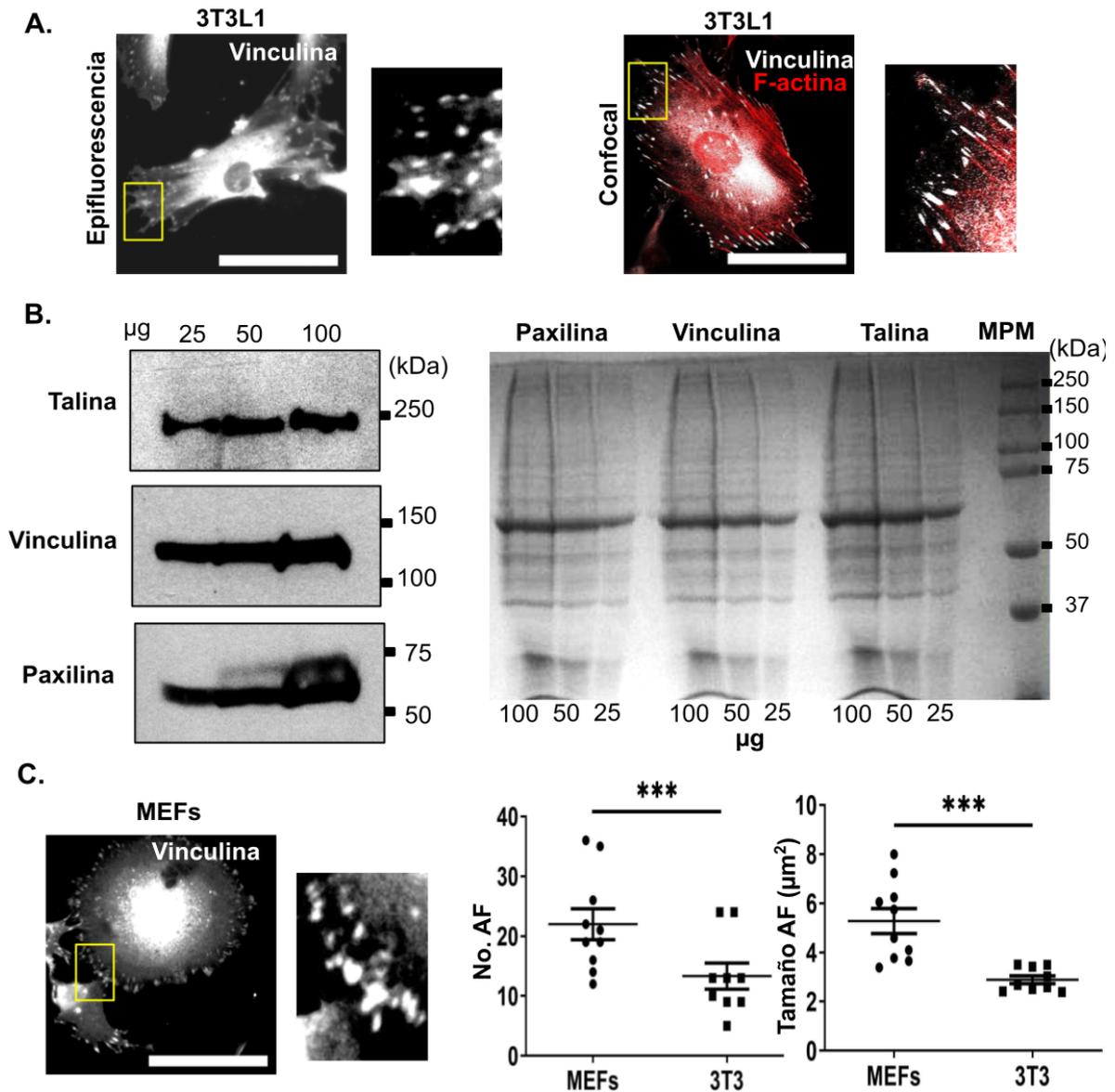


Figura 12. (A) Marcaje fluorescente de la proteína **Detección de adhesiones focales en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en cubreobjetos de vidrio y cajas de poliestireno** vinculina (escala de grises) y F-actina (rojo) en fibroblastos embrionarios de ratón 3T3L1 cultivados sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena tipo I. Arriba: Fotos obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Abajo: Fotos obtenidas mediante microscopía confocal. La barra de escala equivale a 100 μm . (Imágenes representativas n=3). (B) Derecha: Niveles de las proteínas vinculina, talina y paxilina en lisados totales de fibroblastos 3T3L1 cultivados sobre cajas de poliestireno para cultivo celular. (Membranas representativas de n=2) Izquierda: Tinción de azul de coomassie como control de carga para las diferentes cantidades de proteína cargada. (C) Marcaje fluorescente de vinculina (escala de grises) en fibroblastos embrionarios primarios de ratón (MEFs) cultivados sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena tipo I. Fotos obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (experimento único). (D) Cuantificación del tamaño y número de AF presentes en fibroblastos embrionarios de ratón; comparación de células primarias con la línea celular 3T3L1 (**p < 0.05, t de student no pareada; experimento único).

7.3 Marcaje de vinculina en fibroblastos cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada.

Para poder detectar los componentes de adhesiones focales en células cultivadas en sustratos de rigidez controlada, se realizó la inmunotinción de vinculina en fibroblastos 3T3-L1 cultivados en HG de PAA de rigidez de 1 kPa (sustrato suave) y 20 kPa (sustrato rígido). Se pudo observar mediante microscopía de epifluorescencia que a 20 kPa, una rigidez menor a las condiciones estándar de cultivo, aún son visibles las marcas punteadas de vinculina en la periferia así como la señal perinuclear. Mientras que en los cultivos sobre sustratos suaves, deja de ser visible el patrón punteado de vinculina; en su lugar, se ve una señal fluorescente que cubre completamente el citoplasma de las células (**Figura 13A**).

Por otra parte, se estandarizó por primera vez en el grupo de trabajo la obtención de los lisados celulares totales en células cultivadas sobre los HGs de PAA. Tras encontrar los parámetros adecuados de extracción (descritos en la sección de *Métodos*), se corrió un inmunoblot, en donde se pudo detectar la señal de vinculina, desde los 50 µg de proteína del lisado celular total (**Figura 13B**), la cual no pareció cambiar en las diferentes condiciones de rigidez. Con el fin de identificar cambios en las interacciones formadas por las proteínas de adhesiones focales en células cultivadas sobre sustratos con diferente módulo elástico, se realizó la tinción de plata en gel de electroforesis en donde se corrieron inmunoprecipitaciones de vinculina realizadas en fibroblastos 3T3-L1 cultivados sobre HGs de PAA de 20 kPa y 1 kPa. En este experimento se observaron cambios en el patrón de bandas recuperadas en los cultivos celulares, al menos en dos bandas estos cambios fueron evidentes (**Figura 13C, representado por flechas**); esto sugiere que existen cambios en las interacciones que forma vinculina cuando las células se encuentran en sustratos con diferente rigidez. Estos resultados preliminares servirán para futuros ensayos que permitan identificar cambios en las interacciones de los componentes de adhesiones focales con base en la rigidez en la que las células son cultivadas.

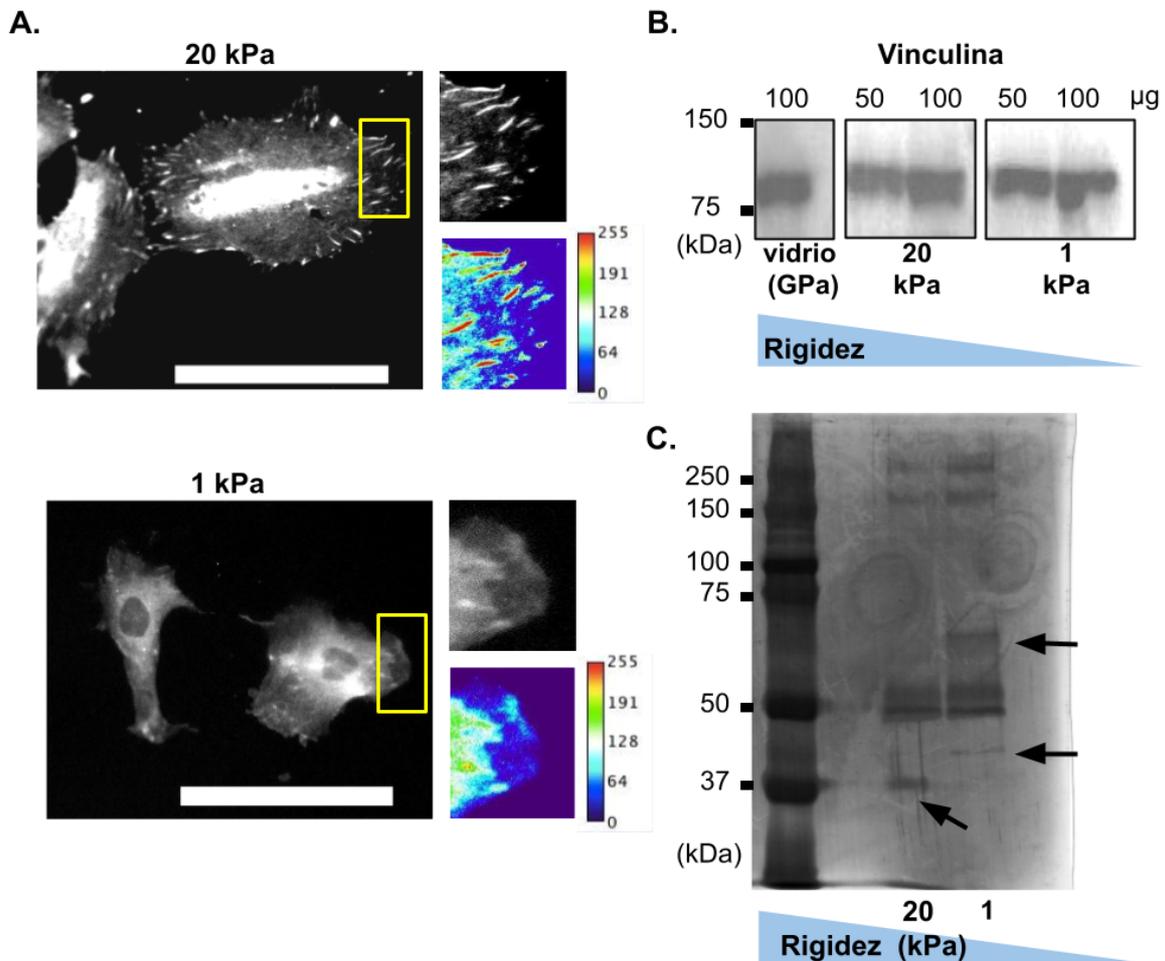


Figura 13. Marcaje de vinculina en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida en sustratos rígidos (20 kPa) y suaves (1 kPa). (A) Marcaje fluorescente de la proteína vinculina (escala de grises) en fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1 cultivados sobre hidrogeles de acrilamida de 20 kPa y 1 kPa recubiertos de colágena tipo I. Fotos obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. La barra de escala equivale a 100 μm . (Imágenes representativas n=2) (B) Niveles de vinculina en lisados totales de fibroblastos 3T3-L1 cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa y 20 kPa recubiertos de colágena tipo I, así como en cubreobjetos de vidrio como grupo control. (Experimento único). (C) Tinción con nitrato de plata del gel de electroforesis de la inmunoprecipitación de vinculina obtenida en los fibroblastos 3T3-L1 cultivados sobre hidrogeles de 1 y 20 kPa. (Experimento único). Diferencias en las proteínas obtenidas marcadas con flechas negras.

7.4 Las proteínas con dominios LIM como estructuras mecanosensibles bajo esfuerzos celulares

Debido a la pandemia por COVID-19, experimentalmente dentro del laboratorio sólo se pudo estandarizar el cultivo celular de fibroblastos sobre sustratos de rigidez controlada y detectar a las proteínas asociadas a los complejos de adhesiones focales: vinculina, talina y paxilina. No obstante, con el objetivo de investigar si existe una modulación de los complejos desencadenada por las señales mecánicas que las células perciben, se revisó en la literatura el listado de proteínas asociadas a adhesiones focales y citoesqueleto de actina cuya señalización estuviera modulada por los esfuerzos derivados de las condiciones mecánicas extracelulares. En esta búsqueda, se encontró que dentro de las proteínas reportadas como mecanosensibles se encuentran las proteínas con dominios LIM. Estas proteínas son de interés para el proyecto ya que están asociadas a las fibras de estrés de actina y a la vez están estrechamente relacionadas con las funciones que llevan a cabo los complejos proteicos de unión al citoesqueleto, como las uniones intercelulares o las adhesiones focales. Sus funciones se relacionan principalmente por ser proteínas de andamiaje regulando algunas vías de señalización como la ruta Hippo y NF- κ B. Sin embargo, también están involucradas en otras funciones celulares tales como la regulación transcripcional de algunos genes, principalmente mediante su unión a factores de transcripción; por lo que las proteínas con dominios LIM son elementos importantes para la transducción de las señales extracelulares relacionadas con la generación de esfuerzos dentro de la célula (Koch et al., 2012).

Los dominios LIM son un acrónimo que hace referencia a las primeras proteínas en las que fueron identificados (Lin-11 en *Caenorhabditis elegans*, Isl1 en *Rattus norvegicus* y Mec-3 en *Caenorhabditis elegans*). Tienen una longitud de 50-65 aminoácidos y su estructura está constituida por dos dedos de zinc ricos en cisteínas e histidinas separados por una región conectora, *linker*, hidrofóbica. Son ocho residuos de cisteínas quienes coordinan los iones Zn^{2+} de manera conservada, (Kadmas et al., 2004). Debido a la gran variedad y la baja conservación en secuencia de las proteínas con dominios LIM, se han agrupado en una superclase de proteínas que se divide en 14 clases diferentes nombradas por su miembro más representativo, como zyxina, paxilina y FHL, de las cuales a su vez se subdividen en diferentes familias (Koch et al., 2012; Sun 2020).

El listado de proteínas que contienen dominios LIM es extenso, en humanos hay alrededor de 70 genes que codifican para estas proteínas (Winkelman et al., 2020) y al menos 26 están asociadas a los complejos de AF (Smith et al., 2014). De estas proteínas asociadas, 21 fueron identificadas como responsivas a la contractilidad del citoesqueleto de acuerdo con el trabajo de Schiller en 2012. Este grupo de trabajo realizó un análisis de proteómica cuantitativo de los componentes de AF en un modelo de fibroblastos embrionarios de ratón y encontraron que la inhibición de la contractilidad del citoesqueleto, bajo la inhibición de miosina por el uso del fármaco blebistatina, afectaba el reclutamiento de algunas proteínas, particularmente y de manera significativa, a aquellas con dominios LIM; por lo que fueron propuestas como moléculas sensibles a la tensión celular (Schiller et al., 2011). Además de este trabajo y posterior a ello, han aumentado las publicaciones que reportan su respuesta a los cambios en los esfuerzos, las cuales en su mayoría coinciden con las proteínas identificadas en el trabajo de Schiller. En la *Tabla 3* se enlistan algunas de las proteínas con dominios LIM asociadas a adhesiones focales que se han encontrado como sensibles a la mecánica por medio de distintas aproximaciones; impidiendo la contractilidad del citoesqueleto de actina al inhibir el ATP que utilizan las miosinas (Sun, X., 2020), con inhibidores de miosina como blebistatina (Schiller et al., 2012), así como mediante el cultivo de células en sustratos de diferente rigidez o a través de la aplicación de estiramiento uniaxial como estímulo mecánico (Nakazawa et al., 2016; Sun, X., 2020).

Una de las proteínas con dominios LIM asociadas a AF más exploradas por su respuesta a la mecánica es la proteína FHL2; en 2016 se reportó que su localización es sensible a la rigidez del sustrato en el que se encuentran las células. Esta proteína se localiza en el núcleo en células cultivadas sobre sustratos suaves, mientras que se retiene en adhesiones focales y en las fibras de estrés de actina en células cultivadas sobre sustratos rígidos. No obstante, este mecanismo se anula cuando está comprometida la contractilidad del aparato de actomiosina (Nakazawa et al., 2016; Sun, X., 2020). Aunado a ello, recientemente, Sun y colaboradores demuestran que los dominios LIM por sí solos son suficientes para su acumulación en las zonas de esfuerzos y que contrario a lo reportado por Steele en 2012, su disposición en tándem en las proteínas favorece esta acumulación: a mayor número de dominios LIM, mayor es el reclutamiento de estas proteínas. De manera destacada, este grupo de trabajo propuso un mecanismo conservado de respuesta a la mecánica presente en las diferentes clases de proteínas LIM (Sun, X., 2020). En él muestran que los esfuerzos contráctiles del citoesqueleto son responsables de retener a estas proteínas en las fibras de estrés de actina, por medio de la unión de ciertos residuos de fenilalanina (F) que tienen los

dominios LIM. Mientras que, en sustratos suaves, se pierden los sitios de anclaje, lo que favorece su translocación al núcleo. A la vez, encuentran un residuo de fenilalanina necesario para el reclutamiento de las proteínas FHL2 y Hic-5 a los complejos de AF (Sun, X., 2020); sin embargo, es dependiente del grado de tensión de los filamentos actina. Por tanto, toda la evidencia recopilada sugiere que las proteínas con dominios LIM son un grupo de proteínas sensibles a la mecánica que serían de gran utilidad para evaluar si existe una modulación de los componentes de adhesiones focales mediado por los esfuerzos y que posiblemente controlen el aparato transcripcional de la células, siendo este un mecanismo directo de mecanotransducción a partir de los cambios de contractibilidad derivados de la mecánica exterior dirigido a cambiar la regulación transcripcional sin la participación de proteínas efectoras intermedias.

Tabla 3. Proteínas con dominios LIM asociadas a AF sensibles a los esfuerzos.

Proteína	Asociación con otras vías de señalización	Mecanotransducción	Ref
Zyxina	Regula negativamente la vía Hippo al promover la ubiquitinación de las cinasas LATS1 mediante su interacción; así como de la vía SHH al interactuar y activar a su regulador negativo Zic1.	Su reclutamiento disminuye al evitar la contractilidad del citoesqueleto por medio de la inhibición de ATP (*), miosina (#) así como en el cultivo celular en sustratos rígidos (!) y bajo estiramiento uniaxial (/)	(Ma et al 2016)
	Coactivador transcripcional de los factores transcripcionales Zic1 y Gli		(Martynova et al 2018)
LIMD1	Regula negativamente la vía de Hippo al unirse a las cinasas LATS1 en los complejos de uniones adherentes.	!#	(Ibar et al 2018; Wang et al 2019)
LPP	Su expresión es dependiente de la vía de señalización Wnt, TGFβ. Además de que sus funciones son dependientes de las cinasas Src y ROCK	# /	(Vervenne et al 2008)
AJUBA	Regula negativamente la vía de Hippo al unirse a las cinasas LATS1 en los complejos de uniones adherentes.	#	(Jagannathan et al 2016)
FHL2	Participa en diferentes vías de señalización como la reguladora del receptor de andrógenos, NF-κB, Wnt, TGFβ	! # /	(Phillipar 2004; Labalette 2004; Morlon 2003; Dahan 2017; Johannsen 2006)
	Cofactor transcripcional de una gran variedad de genes involucrados en proliferación, diferenciación y apoptosis (c-myc, SRF, β-catenin/TCF, AP1, SKI, receptor de andrógenos, TGFβ1, ciclina D1)		
FHL3	Activa la vía de TGFβ al interactuar y fosforilar a las proteínas Smad2/3. También participa en la activación de la vía NF-κB al interactuar con angiogenina	*/#	(Niu et al., 2011; Xia et al 2015; Fimia et al 2000)
	Coactivador transcripcional de CREB así como correpressor de CtBP2 y PLZF.		
PDLIM1	Regula positivamente la vía de Hippo al controlar el crecimiento de la F-actina y regula negativamente la vía de NF-κB evitando su translocación nuclear	#/	(Huang et al 2019; Ono et al 2015)

(Proteínas sensibles a los esfuerzos de acuerdo a los trabajos de Schiller et al 2011; Ibar et al 2018 y Sun et al, 2020) *Cada color representa una clase de proteínas con dominio LIM de acuerdo a la clasificación de Koch et al., 2012*

8. DISCUSIÓN

Las células perciben el medio extracelular a través de sus complejos de adhesiones focales al conectar directamente los componentes de la MEC con el aparato de actomiosina en el interior celular; de este modo, las células son capaces de percibir y responder a los cambios en la composición química y propiedades mecánicas de la matriz extracelular o del sustrato en el que se encuentran *in vitro*. No obstante, hace falta dilucidar los mecanismos bioquímicos (formación de complejos proteicos mediante cambios conformacionales y modificaciones postraduccionales) por los cuales las células perciben las diferencias en la mecánica del sustrato. Es por ello que en los estudios de mecanotransducción ha sido de interés estudiar los componentes que conforman los complejos de adhesiones focales. Los estudios de proteómica han reportado que estos complejos están conformados por alrededor de 180 componentes, los cuales en conjunto se conocen como el meta-adhesoma celular (R. Zaidel-Bar et al., 2004). Asimismo, se ha propuesto un adhesoma consenso conformado por 60 componentes, tras el análisis proteómico y bioinformático de los adhesomas de diferentes tipos celulares (Horton et al., 2015). De manera destacada, se ha encontrado que dicho adhesoma cambia cuando el citoesqueleto de actomiosina tiene un diferente estado contráctil (Schiller et al., 2011); al utilizar un inhibidor de la miosina, blebistatina (que impide la contractilidad de la actomiosina) la cantidad de proteínas reclutadas disminuye la presencia a 40 de las 87 proteínas detectadas asociadas a adhesiones focales (asemejando el estado del citoesqueleto de células cultivadas en sustratos suaves, así como cuando las células no están en un cultivo confluyente *in vitro*) (Schiller et al., 2011). No obstante, hace falta investigar de manera directa si los componentes de adhesiones focales cambian dependiendo de la rigidez, por lo que el presente trabajo tuvo el objetivo de investigar los componentes de adhesiones focales en fibroblastos embrionarios de ratón cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada.

Bajo condiciones estándar de cultivo como las placas de poliestireno cargadas negativamente, las células están en contacto con sustratos con rigidez en el orden de magnitud de GPa, una condición completamente anormal para las células ya que en los tejidos del cuerpo, los valores son mucho menores y varían dependiendo el tejido en cuestión; por ejemplo el hígado de ratón (sano) tiene una rigidez reportada de 150 Pa (Desai et al 2016). Particularmente, en este proyecto se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón como modelo de estudio ya que es un tipo celular constantemente utilizado en estudios de mecanotransducción al ser células mesenquimales caracterizadas por presentar

una expresión robusta de proteínas de AF que permitía evaluar los objetivos del proyecto. El tejido embrionario de ratón, ambiente en el que estas células se encuentran *in vivo*, tiene una rigidez reportada que va de los 100 a los 1000 Pa, dependiendo de la zona muestreada (Kolahi et al 2012). En este estudio se utilizó un valor cercano a este ambiente, ya que como sustratos suaves (condición de MEC sana) se fabricaron HGs de PAA de 0.5 kPa, y 1 kPa.

Se ha reportado que los cambios en los valores de rigidez de los materiales en los que se encuentran las células repercuten en diferentes procesos celulares, como la diferenciación, proliferación, apoptosis, y de manera evidente, afectan la adhesión celular (Wells, 2008). De acuerdo con las mediciones del proyecto, los fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1 aumentaron su área de esparcimiento de acuerdo a la rigidez; siendo los cultivos realizados sobre los HGs de PAA (0.5 kPa-20 kPa) los que presentaron un área celular significativamente menor comparada con el cultivo sobre cajas de poliestireno, teniendo hasta 5.5 veces menos área de esparcimiento celular en los sustratos más suaves (7,000 μm^2 en vidrio en contraste con 1500 μm^2 en el HG de PAA de 0.5 kPa). En comparación, otros grupos de trabajo en las últimas décadas han reportado la misma tendencia utilizando diferentes tipos celulares (epiteliales, endoteliales, miocitos, entre otros) y sustratos con rigidez controlada como los hidrogeles de poliacrilamida recubiertos de colágena I utilizados en este proyecto, así como en sustratos hechos de otro tipo de materiales como el polidimetilsiloxano (PDMS) (Janmey et al 2020).

Por ejemplo, el grupo de trabajo de Janmey en 2007 reportó que los fibroblastos 3T3 presentan un área de esparcimiento 3 veces menor en los sustratos suaves, de 2 kPa, en contraste con las células cultivadas sobre 10 kPa (500 μm y 1500 μm , respectivamente). Y encontraron que a partir del cultivo sobre 10 kPa, las células alcanzan su mayor área de esparcimiento (Janmey 2007). No obstante, en este trabajo encontramos que los fibroblastos utilizados presentan cambios significativos entre los cultivados sobre HGs de PAA en su valor más alto utilizado de 20 kPa y las cajas de poliestireno. Los valores del área que se obtienen pueden variar dependiendo del tipo celular, ya que en el artículo de Janmey utilizaron los fibroblastos NIH-3T3, mientras que en este proyecto se trabajó con los fibroblastos NIH-3T3-L1, los cuales son una clona de la línea que ellos utilizaron, obtenida por un método similar, pero que tiene la capacidad de diferenciarse a adipocitos bajo ciertas condiciones, lo que pudiera estar relacionado. Asimismo también influye el método de fabricación empleado para la fabricación de los HGs, así como el recubrimiento de proteína

utilizado. Janmey y colaboradores utilizaron el mismo método de fabricación, pero recubrieron los sustratos con fibronectina 0.2 mg/mL, mientras que en este proyecto se utilizó colágena de rata tipo I al 0.1 mg/mL. Esto podría ser resultado del tipo de integrinas que son reclutadas en los complejos de adhesiones focales, ya que existe especificidad de acuerdo con las proteínas que conforman el sustrato; tal es el caso de la combinación de la subunidades de integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ que reconocen colágena, mientras que la combinación αV de junto con las subunidades $\beta 1, 3, 5$, son un ejemplo clásico de reconocimiento a fibronectina. Las integrinas al estar en contacto con los filamentos de actina podrían favorecer diferencias en esparcimiento, ya que se han reportado diferencias dependiendo del recubrimiento utilizado en estudios *in vitro* (Lee et al 2019). Asimismo, se ha encontrado que el aumentar la densidad de proteínas (ligandos de integrinas) incrementa también el área de esparcimiento, sin embargo, aunque se lleve a la saturación de la proteína de recubrimiento en sustratos suaves, éstas no alcanzan el área celular lograda en sustratos muy rígidos (vidrio) (Engler et al., 2004). En este trabajo, al haber utilizado la concentración de 0.1 mg/mL se puede descartar el efecto debido a la concentración de la proteína de recubrimiento de los sustratos, ya que se ha reportado que a dicha concentración ocurre la saturación del recubrimiento de colágena en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada (Stanton et al., 2019), por lo que la morfología observada sería el área máxima de esparcimiento que pueden presentar en cada valor de rigidez.

Por otra parte, además de evaluar los cambios en el área de esparcimiento, también se realizó un análisis de circularidad ya que este parámetro no sólo es un descriptor de los aspectos más generales de la forma celular como el área celular, sino que enfatiza la presencia de prolongaciones en la membrana celulares; células con mayor número de prolongaciones cuentan con números más bajos de circularidad. Conocer estos datos, es de utilidad para evaluar procesos celulares en donde las prolongaciones son un referente importante como en la adhesión celular, migración o en el estudio de la respuesta a la rigidez como es el caso de este trabajo. En la línea celular 3T3-L1, la circularidad disminuyó en los sustratos de mayor rigidez, de manera inversa al área celular, enfatizando el número de prolongaciones que presentaron las células en las cajas de poliestireno y los HGs de mayor rigidez. Esta tendencia coincide con lo reportado en la literatura como es el caso del cultivo de fibroblastos humanos de pulmón en geles de colágena de rigidez controlada (Asano et al., 2017).

Como último aspecto para evaluar la respuesta celular a la mecánica de nuestro modelo, se comprobó la localización de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ, la cual de acuerdo a la literatura su localización subcelular es regulada por los cambios en la rigidez donde se cultivan las células. La regulación de YAP por la mecánica se ha ido dilucidando y se ha reconocido a diferentes niveles; a nivel de estabilidad de proteína (vía proteosomal gracias a la vía Hippo), así como mediante modificaciones postraduccionales que regulan su translocación, principalmente mediante fosforilación en la Serina 127, y por tanto, su activación como factor transcripcional (Pocaterra et al 2020). También se ha reportado que su regulación es desencadenada por las señales mecánicas tales como la rigidez en la que se encuentren las células ya que las cinasas LATS1/2 de la vía Hippo son reguladas negativamente por la contractilidad del citoesqueleto de actina, por lo que bajo sustratos rígidos, se favorece la translocación y activación transcripcional de YAP/TAZ. Asimismo, se ha encontrado que las células cultivadas en sustratos rígidos favorecen la apertura de los poros nucleares que promueve la translocación de YAP/TAZ (Elosegui-Artola et al., 2017). Y a nivel nuclear la F-actina también regula negativamente su actividad transcripcional mediante otros complejos proteicos como el regulador de cromatina SWI/SNF (Chang et al 2018). Debido a todos estos mecanismos regulatorios, YAP/TAZ ha sido reconocido como uno de los complejos mecanosensibles que ayudan a evaluar las señales mecánicas.

En este estudio se encontró que los fibroblastos embrionarios de ratón tienen una localización de YAP/TAZ sensible a la mecánica del sustrato; siendo nuclear en sustratos rígidos y mayormente citoplasmática en sustratos suaves, tal y como se ha reportado en esta línea celular así como en otros tipos celulares (Pocaterra et al 2020). Dada la capacidad de las células de responder a los cambios en las condiciones mecánicas, como se pudo observar en los cambios del área de esparcimiento, circularidad y localización de los cofactores YAP/TAZ, dependiendo de los sustratos en los que se encuentran, los hidrogeles de PAA resultaron un excelente modelo de cultivo de rigidez controlada para evaluar la a modulación de los complejos de AF, ya que estos permiten el contacto directo con los sustratos y cuyos componentes son capaces de responder directamente a los cambios en la rigidez, como es el caso de talina.

En este proyecto, las primeras observaciones de los componentes de adhesiones focales se hicieron con microscopía de epifluorescencia con la que se observó un patrón punteado en la periferia celular característico de estos complejos proteicos (D. W. Zhou et al., 2017). Posteriormente, con ayuda de la microscopía confocal se pudo apreciar con más detalle que

la marca de AF, a través de la proteína vinculina, está en contacto directo con los filamentos de actina y que, además, como se había reportado anteriormente, están alineados en la misma dirección (J. Y. Lee et al., 2019). Además de la detección espacial de los complejos, los niveles de proteína de los componentes de estos complejos se pudieron detectar siguiendo protocolos estándar; sin embargo, al ser proteínas acopladas a las integrinas, las cuales se recuperan en la porción insoluble de los lisados, es recomendable utilizar metodologías especializadas en la recuperación de estos componentes para mejorar la detección de las proteínas como es el uso de protocolos de extracción fuertes tales como el uso del buffer de lisis RIPA (SDS al 0.1).

Por otra parte, es de destacar que en este proyecto se pudieron hacer las primeras aproximaciones para detectar los complejos de adhesiones focales en fibroblastos primarios, los cuales ofrecen un modelo adecuado para investigar la modulación de las AF ya que cuentan con una presencia robusta de estas proteínas. En las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia se notó de manera evidente el aumento en el marcaje de esta proteína, por lo que después de investigar en la literatura, se seleccionó un procedimiento reportado por Horzum y colaboradores en 2014 en el que con herramientas de imagenología utilizando el software libre de ImageJ se realizó la cuantificación del número y área de adhesiones focales determinado por el marcaje de vinculina (Horzum et al, 2014) (véase Métodos). La cuantificación confirmó el aumento del número de AF en los fibroblastos primarios; asimismo, estas arrojaron una mayor área, cuyos valores coinciden con lo reportado en la literatura, ya que Wirtz en 2013 reportó que el área de adhesiones focales se encuentra cercano a los $3 \mu\text{m}^2$ en fibroblastos embrionarios primarios de ratón; mientras que en la cuantificación de este proyecto se encontraron valores promedio de $3 \mu\text{m}^2$ para la línea celular 3T3-L1 y $5.5 \mu\text{m}^2$ para los fibroblastos primarios (D. H. Kim & Wirtz, 2013). Aunado a ello, Wirtz también reportó que el tamaño de las adhesiones focales es el mismo al utilizar inmunomarcaje de distintas proteínas tales como talina, vinculina y FAK, de modo que de acuerdo a lo reportado, resulta válido haber utilizado el inmunomarcaje de vinculina para determinar el área de AF en este trabajo. Por tanto, la estandarización de esta cuantificación resultará de ayuda para futuros experimentos en los que se pretenda comparar el marcaje de los complejos de adhesiones focales en células cultivadas en sustratos de rigidez controlada. Además, sería pertinente utilizar imágenes en microscopía confocal que permitan hacer la cuantificación de adhesiones focales en las células completas y no sólo en cuadrantes del mismo tamaño lo cual no es posible al utilizar imágenes obtenidas por epifluorescencia. A la vez, debido a la heterogeneidad de la

población de fibroblastos, lo ideal también sería hacer una relación del número de adhesiones focales y el tamaño celular para descartar que los cambios se debieran a ello.

En la detección de componentes de adhesiones focales en fibroblastos 3T3-L1 cultivados en sustratos de rigidez controlada se pudo observar una disminución en el marcaje fluorescente de vinculina (en AF) en células cultivadas en sustratos suaves (1 kPa). Esta tendencia coincide con lo reportado en la literatura; en fibroblastos embrionarios de ratón y células madre de médula ósea se ha reportado una disminución del reclutamiento de vinculina de acuerdo con la rigidez del sustrato en el que fueron cultivadas (Yamashita et al 2014; Zhou et al., 2019). Asimismo, mediante técnica de FRAP, se ha observado que el marcaje de vinculina en las adhesiones focales es más estable en fibroblastos primarios de ratón cultivados en HGs de PAA de 17 kPa en contraste de 5 kPa (D. W. Zhou et al., 2017); esta tendencia es dependiente de la contractilidad del aparato de actomiosina ya que al usar el inhibidor blebistatina, este aumento ya no se observa. Como se mencionó anteriormente en los antecedentes, para talina sí existe evidencia que muestra un mayor reclutamiento en las AF de acuerdo a la rigidez, lo cual coincide con su conformación activa que es favorecida ante la adherencia de las células en sustratos rígidos (Haining et al., 2016); mientras que existen datos contradictorios del aumento de paxilina conforme a la rigidez (D. W. Zhou et al., 2017; C. Zhou et al., 2020 Van Tam et al., 2012) por lo que es necesario hacer experimentos que permitan dilucidar si existen cambios en su reclutamiento de acuerdo a la rigidez del sustrato en el que se encuentran las células.

Es de destacar que en este trabajo se realizaron las primeras aproximaciones metodológicas para la detección mediante inmunoblot en el grupo de trabajo gracias a la obtención de lisados celulares totales en HGs de PAA. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de proteína obtenidos dependiendo del sustrato en el que se encontraban; mientras que la literatura muestra que estos niveles disminuyen en fibroblastos embrionarios primarios de ratón, así como en células troncales de médula ósea cultivadas en sustratos de poliacrilamida y PDMS con menor módulo de Young (Yamashita et al 2014; C. Zhou et al., 2019) por lo que sería necesario hacer experimentos de confirmación de lo observado preliminarmente y de ser el caso encontrar una explicación al mantenimiento de los niveles de proteína y a posibles mecanismos de regulación de la localización subcelular de las proteínas asociadas a AF. Mientras que para paxilina, al igual que en el marcaje fluorescente, la evidencia que muestra diferencias en los niveles de proteína es contradictoria ya que en MEFs no se observa un aumento en los niveles, pero sí

se ha reportado en células troncales de papila apical cultivadas en sustratos de PDMS de 1000 kPa en comparación de 500 kPa (Yamashita et al., 2014; C. Zhou et al., 2020).

Por otra parte, de acuerdo a las diferencias en el patrón de bandas obtenido de la tinción de plata del gel de electroforesis en el que se corrieron las inmunoprecipitaciones de vinculina en células cultivadas en sustratos de rigidez controlada, se sugiere que existen asociaciones diferentes de vinculina dependiendo de la rigidez en la que se encuentran las células. En él se observaron diferencias evidentes en al menos una banda entre los 75 y 50 kDa y dos entre los 50 y 37 kDa. La primera banda cercana a los 75 kDa, pudiera deberse a la proteína vinexina- α , la cual ha sido reportada que interacciona directamente con vinculina y cuya asociación cambia dependiendo de la rigidez del sustrato, aumentando a mayor rigidez (Yamashita et al., 2014). Sin embargo, es pertinente hacer otras repeticiones del experimento, a la vez sería interesante aislar la porción asociada a la membrana para especificar que este cambio de asociaciones ocurre en las proteínas localizadas en las adhesiones focales, como mediante técnicas de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial, con ayuda de soluciones hipotónicas o por medio de la aplicación del entrecruzador reversible, DTSSP, antes mencionado y así determinar si la vinculina y el resto de proteínas de adhesiones focales en esta zona tiene asociaciones diferenciales o se pierden algunas interacciones por los procedimientos de extracción con (0.1% SDS). Una vez recuperados estos complejos es de gran interés realizar la secuenciación de los complejos aislados para dilucidar si sí existe la modulación de los complejos mediada por la rigidez del sustrato.

Finalmente, debido a la pandemia no se pudo continuar con las exploraciones experimentales, sin embargo a fin de continuar con este proyecto, se buscaron proteínas asociadas a adhesiones focales que pudieran asociarse diferencialmente dependiendo de la rigidez del sustrato e indudablemente, las proteínas con dominios LIM resultaron un modelo interesante para utilizar a futuro, ya que al momento de la elaboración de esta búsqueda, se publicó que los esfuerzos contráctiles del citoesqueleto de actina son responsables de retener a los dominios LIM de proteínas como FHL2, FHL3 y zyxina en las fibras de estrés de actina (gracias a cierto residuo de fenilalanina) (Sun et al., 2020), las cuales además de interactuar con el citoesqueleto, se localizan en las adhesiones focales, por lo que tras este antecedente que muestra su respuesta a la mecánica celular (contractilidad de actomiosina), las proteínas LIM resultan un modelo interesante para evaluar cambios en las

asociaciones de los complejos de adhesiones focales de acuerdo a la rigidez en la que se encuentran las células

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizó el cultivo de fibroblastos primarios de ratón así como de la línea celular inmortalizada 3T3-L1 en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez controlada. Los fibroblastos 3T3-L1 responden a los diferentes valores de rigidez mediante el cambio en su esparcimiento y circularidad, así como a los cambios en la localización de los cofactores transcripcionales mecanosensibles YAP/TAZ. A mayor rigidez, mayor área de esparcimiento celular, menor circularidad y mayor marcaje nuclear de YAP/TAZ, mientras a menor rigidez presentan menor área, mayor la circularidad y el marcaje de YAP/TAZ es predominantemente citoplasmático.
- Se caracterizó la detección de las proteínas (immunoblot) de adhesiones focales vinculina, talina y paxilina en fibroblastos 3T3-L1 en condiciones de cultivo estándar (placas de poliestireno cargadas negativamente). Asimismo, se caracterizó el marcaje fluorescente de vinculina en la periferia celular en fibroblastos primarios así como en fibroblastos 3T3-L1 mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.
- También se caracterizó la detección de los niveles de proteína (immunoblot) y el marcaje fluorescente de vinculina en fibroblastos 3T3-L1 cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida rígidos (20 kPa) y suaves (1 kPa).
- Se observaron posibles cambios en las interacciones proteicas de vinculina en fibroblastos 3T3-L1 de acuerdo con la rigidez en la que se cultivaron las células, lo que sugiere que existen diferencias en las asociaciones de proteínas de adhesiones focales dependiendo de la mecánica del sustrato.
- Se encontró en la literatura que las proteínas con dominios LIM (FHL2, zyxina, PDLMI1) son un modelo de interés para evaluar la modulación de los complejos de adhesiones focales.

10. REFERENCIAS

- Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M., & Pegrum, S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2), 359–367. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90420-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90420-4)
- Akhtar, R., Sherratt, M. J., Cruickshank, J. K., & Derby, B. (2011). Characterizing the elastic properties of tissues. In *Materials Today* (Vol. 14, Issue 3, pp. 96–105). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70059-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70059-1)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Cell Junctions*.
- Alexandrova, A. Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J. M., Meister, J. J., Bershadsky, A. D., & Verkhovsky, A. B. (2008). Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: Formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE*, 3(9), 3234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003234>
- Almine, J. F., Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2012). Elastin signaling in wound repair. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 96(3), 248–257. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21016>
- Angulo-Urarte, A., van der Wal, T., & Huveneers, S. (2020). Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1862, Issue 9, p. 183316). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183316>
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., & Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*, 154(5), 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
- Asano, S., Ito, S., Takahashi, K., Furuya, K., Kondo, M., Sokabe, M., & Hasegawa, Y. (2017). Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiological Reports*, 5(9), e13281. <https://doi.org/10.14814/phy2.13281>
- Aumailley, M. (2013). The laminin family. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 7, Issue 1, pp. 48–55). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C. R., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., ... Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. In *Matrix Biology* (Vol. 24, Issue 5, pp. 326–332). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.05.006>
- Austen, K., Ringer, P., Mehlich, A., Chrostek-Grashoff, A., Kluger, C., Klingner, C., Sabass, B., Zent, R., Rief, M., & Grashoff, C. (2015). Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nature Cell Biology*, 17(12), 1597–1606. <https://doi.org/10.1038/ncb3268>
- Bächinger, H. P., Mizuno, K., Vranka, J. A., & Boudko, S. P. (2010). Collagen formation and structure. In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (Vol. 5, pp. 469–530). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00698-5>
- Baddam, S., Arsenovic, P., Narayanan, V., Duggan, N., Mayer, C., Newman, S., Abutaleb, D., Mohan, A., Kowalczyk, A., & Conway, D. (2018). The Desmosomal Cadherin Desmoglein-2 Experiences Mechanical Tension as Demonstrated by a FRET-Based Tension Biosensor Expressed in Living Cells. *Cells*, 7(7), 66. <https://doi.org/10.3390/cells7070066>

- Baeyens, N., & Schwartz, M. A. (2016). Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 27, Issue 1, pp. 7–11). American Society for Cell Biology. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1522>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Baum, B., & Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 192, Issue 6, pp. 907–917). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009141>
- Blasig, I. E., Bellmann, C., Cording, J., Vecchio, G. Del, Zwanziger, D., Huber, O., & Haseloff, R. F. (2011). Occludin protein family: Oxidative stress and reducing conditions. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 15, Issue 5, pp. 1195–1219). Antioxid Redox Signal. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3542>
- Burridge, K. (2017). Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *The FEBS Journal*, 284(20), 3355–3361. <https://doi.org/10.1111/febs.14195>
- Campbell, I. D., & Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 1–14). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>
- Chakraborty, S., Banerjee, S., Raina, M., & Haldar, S. (2019). Force-Directed “mechanointeractome” of Talin-Integrin. In *Biochemistry* (Vol. 58, Issue 47, pp. 4677–4695). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00442>
- Chang, L., Azzolin, L., Di Biagio, D., Zanconato, F., Battilana, G., Lucon Xiccato, R., Aragona, M., Giulitti, S., Panciera, T., Gandin, A., Sigismondo, G., Krijgsveld, J., Fassan, M., Brusatin, G., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2018). The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nature*, 563(7730), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0658-1>
- Cheung, J. T., & Zhang, M. (2006). Mechanics of the human skin and underlying soft tissues. In *Biomechanical Engineering of Textiles and Clothing* (pp. 111–124). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9781845691486.2.111>
- Cohen, D. M., Chen, H., Johnson, R. P., Choudhury, B., & Craig, S. W. (2005). Two distinct head-tail interfaces cooperate to suppress activation of vinculin by talin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17109–17117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414704200>
- Coopman, P., & Djiane, A. (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 18, pp. 3535–3553). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2260-8>
- Couchman, J. R., & Pataki, C. A. (2012). An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(12), 885–897. <https://doi.org/10.1369/0022155412464638>
- Cretu, A., Castagnino, P., & Assoian, R. (2010). Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *Journal of Visualized Experiments*, 42. <https://doi.org/10.3791/2089>
- Critchley, D. R., & Gingras, A. R. (2008). Talin at a glance. *Journal of Cell Science*, 121(9), 1345 LP – 1347. <https://doi.org/10.1242/jcs.018085>
- Dahan, J., Levillayer, F., Xia, T., Nouët, Y., Werts, C., Fanton d'Andon, M., Adib-Conquy, M., Cassard-Doulcier, A.-M., Khanna, V., Chen, J., Tordjmann, T., Buendia, M.-A., Jouvion, G., & Wei, Y.

- (2017). LIM-Only Protein FHL2 Is a Negative Regulator of Transforming Growth Factor β 1 Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 37(10), 636–652. <https://doi.org/10.1128/mcb.00636-16>
- Dasgupta, I., & McCollum, D. (2019). Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 294, Issue 46, pp. 17693–17706). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007963>
- Deakin, N. O., & Turner, C. E. (2008). Paxillin comes of age. *Journal of Cell Science*, 121(15), 2435–2444. <https://doi.org/10.1242/jcs.018044>
- Desai, S. S., Tung, J. C., Zhou, V. X., Grenert, J. P., Malato, Y., Rezvani, M., Español-Suñer, R., Willenbring, H., Weaver, V. M., & Chang, T. T. (2016). Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology*, 64(1), 261–275. <https://doi.org/10.1002/hep.28450>
- Dumbauld, D. W., Lee, T. T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C. A., Zamir, E. A., Fu, J., Chen, C. S., Curtis, J. E., Craig, S. W., & García, A. J. (2013). How vinculin regulates force transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9788–9793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216209110>
- Dusek, R. L., Godsel, L. M., & Green, K. J. (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 45, Issue 1, pp. 7–21). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.10.006>
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., & Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): More molecules with dual functions? *Journal of Cell Science*, 117(1), 19–29. <https://doi.org/10.1242/jcs.00930>
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E. M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalka, A. J., Oria, R., Kechagia, J. Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A. L., Shanahan, C. M., Trepas, X., Navajas, D., Garcia-Manyes, S., & Roca-Cusachs, P. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*, 171(6), 1397–1410.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.008>
- Engler, A. J., Richert, L., Wong, J. Y., Picart, C., & Discher, D. E. (2004). Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surface Science*, 570(1–2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2004.06.179>
- Enoka, R. M., & Duchateau, J. (2018). Muscle Function: Strength, Speed, and Fatigability. *Strength, Speed, and Fatigability*. In *Muscle and Exercise Physiology* (pp. 129–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814593-7.00007-4>
- Fimia, G. M., De Cesare, D., & Sassone-Corsi, P. (2000). A Family of LIM-Only Transcriptional Coactivators: Tissue-Specific Expression and Selective Activation of CREB and CREM. *Molecular and Cellular Biology*, 20(22), 8613–8622. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.22.8613-8622.2000>
- Finch-Edmondson, M., & Sudol, M. (2016). Framework to function: Mechanosensitive regulators of gene transcription. In *Cellular and Molecular Biology Letters* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0028-7>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. In *Journal of Cell Science* (Vol. 123, Issue 24, pp. 4195–4200). Company of Biologists. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>

- Garcia, M. A., Nelson, W. J., & Chavez, N. (2018). Cell–cell junctions organize structural and signaling networks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>
- Ginsberg, M. H. (2014). Integrin activation. In *BMB Reports* (Vol. 47, Issue 12, pp. 655–659). The Biochemical Society of the Republic of Korea. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.12.241>
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Ávila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(4), 315–324. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0178>
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2009). Gap junctions. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002576>
- Gough, R. E., & Goult, B. T. (2018). The tale of two talins - two isoforms to fine-tune integrin signalling. *FEBS Letters*, 592(12), 2108–2125. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13081>
- Gul, I. S., Hulpiau, P., Saeys, Y., & van Roy, F. (2017). Evolution and diversity of cadherins and catenins. In *Experimental Cell Research* (Vol. 358, Issue 1, pp. 3–9). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.001>
- Haining, A. W. M., Lieberthal, T. J., & Hernández, A. del R. (2016). Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *The FASEB Journal*, 30(6), 2073–2085. <https://doi.org/10.1096/fj.201500080R>
- Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. In *Genes and Development* (Vol. 20, Issue 23, pp. 3199–3214). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.1486806>
- Harris, T. J. C., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: From molecules to morphogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 7, pp. 502–514). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2927>
- Hino, N., Ichikawa, T., Kimura, Y., Matsuda, M., Ueda, K., & Kioka, N. (2019). An amphipathic helix of vinexin α is necessary for a substrate stiffness-dependent conformational change in vinculin. *Journal of Cell Science*, 132(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.217349>
- Hirata, H., Sokabe, M., & Lim, C. T. (2014). Molecular mechanisms underlying the force-dependent regulation of actin-to-ECM linkage at the focal adhesions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 126, pp. 135–154). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00006-3>
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., & Humphries, M. J. (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*, 17(12), 1577–1587. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>
- Horzum, U., Ozdil, B., & Pesen-Okvur, D. (2014). Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX*, 1(1), 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.06.004>
- Huang, Z., Zhou, J. K., Wang, K., Chen, H., Qin, S., Liu, J., Luo, M., Chen, Y., Jiang, J., Zhou, L., Zhu, L., He, J., Li, J., Pu, W., Gong, Y., Li, J., Ye, Q., Dong, D., Hu, H., ... Peng, Y. (2020). PDLIM1 Inhibits Tumor Metastasis Through Activating Hippo Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 71(5), 1643–1659. <https://doi.org/10.1002/hep.30930>

- Hultgårdh-Nilsson, A., Borén, J., & Chakravarti, S. (2015). The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 278, Issue 5, pp. 447–461). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/joim.12400>
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., & Schwartz, M. A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 802–812). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>
- Ibar, C., Kirichenko, E., Keepers, B., Enners, E., Fleisch, K., & Irvine, K. D. (2018). Tension-dependent regulation of mammalian Hippo signaling through LIMD1. *Journal of Cell Science*, 131(5), 1–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.214700>
- Ingber, D. E. (2018). From mechanobiology to developmentally inspired engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1759), 20170323. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0323>
- Jafari, L., Gaudreault, N., & Langelier, E. (2016). Viscoelasticity, viscoplasticity and mechanobiological response of fibrous tissues: Current concepts. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 20(1), 147–148. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2015.07.025>
- Jagannathan, R., Schimizzi, G. V., Zhang, K., Loza, A. J., Yabuta, N., Nojima, H., & Longmore, G. D. (2016). AJUBA LIM Proteins Limit Hippo Activity in Proliferating Cells by Sequestering the Hippo Core Kinase Complex in the Cytosol. *Molecular and Cellular Biology*, 36(20), 2526–2542. <https://doi.org/10.1128/mcb.00136-16>
- Janmey, P. A., Fletcher, D. A., & Reinhart-King, C. A. (2020). Stiffness sensing by cells. *Physiological Reviews*, 100(2), 695–724. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2019>
- Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H. J., & Koenderink, G. H. (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1853, Issue 11, pp. 3043–3052). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.007>
- Johannessen, M., Møler, S., Hansen, T., Moens, U., & Van Ghelue, M. (2006). The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 63, Issue 3, pp. 268–284). Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5438-z>
- John, X., Lamar, M., Xiao, Y., Norton, E., Jiang, Z.-G., Gerhard, G. M., Kooner, S., Warren, J. S. A., Richard, X., & Hynes, O. (2018). SRC tyrosine kinase activates the YAP/TAZ axis and thereby drives tumor growth and metastasis. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004364>
- Kadmas, J. L., & Beckerle, M. C. (2004). The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 920–931). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1499>
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323), 580–584. <https://doi.org/10.1038/nature09621>
- Kim, C., Ye, F., & Ginsberg, M. H. (2011). Regulation of integrin activation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 321–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104104>
- Kim, D. H., & Wirtz, D. (2013). Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *FASEB Journal*, 27(4), 1351–1361. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220160>

- Klapholz, B., & Brown, N. H. (2017). Talin-the master of integrin adhesions. <https://doi.org/10.1242/jcs.190991>
- Koch, B. J., Ryan, J. F., & Baxevanis, A. D. (2012). The Diversification of the LIM Superclass at the Base of the Metazoa Increased Subcellular Complexity and Promoted Multicellular Specialization. *PLoS ONE*, 7(3), e33261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033261>
- Kolahi, K. S., Donjacour, A., Liu, X., Lin, W., Simbulan, R. K., Bloise, E., Maltepe, E., & Rinaudo, P. (2012). Effect of substrate stiffness on early mouse embryo development. *PLoS ONE*, 7(7), 41717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041717>
- Kruegel, J., & Miosge, N. (2010). Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, Issue 17, pp. 2879–2895). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0367-x>
- Kuo, J.-C., Han, X., Yates, J. R., & Waterman, C. M. (2011). Isolation of Focal Adhesion Proteins for Biochemical and Proteomic Analysis. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 757, pp. 297–323). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_19
- Kuo, J. C. (2014). Focal adhesions function as a mechanosensor. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 126, pp. 55–73). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00003-8>
- Kusindarta, D. L., & Wihadmadyatami, H. (2018). The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. In *Tissue Regeneration*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75728>
- Labalette, C., Nouët, Y., Levillayer, F., Armengol, C., Renard, C. A., Soubigou, G., Xia, T., Buendia, M. A., & Wei, Y. (2008). The LIM-only protein FHL2 mediates Ras-induced transformation through cyclin D1 and p53 pathways. *PLoS ONE*, 3(11), e3761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003761>
- Lachowski, D., Cortes, E., Robinson, B., Rice, A., Rombouts, K., & Del Río Hernández, A. E. (2018). FAK controls the mechanical activation of YAP, a transcriptional regulator required for durotaxis. *The FASEB Journal*, 32(2), 1099–1107. <https://doi.org/10.1096/fj.201700721R>
- Lee, H. T., Sharek, L., Timothy O'Brien, E., Urbina, F. L., Gupton, S. L., Superfine, R., Burrige, K., & Campbell, S. L. (2019). Vinculin and metavinculin exhibit distinct effects on focal adhesion properties, cell migration, and mechanotransduction. *PLoS ONE*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221962>
- Lee, J. Y., Dominguez, A. A., Nam, S., Stowers, R. S., Qi, L. S., & Chaudhuri, O. (2019). Identification of cell context-dependent YAP-associated proteins reveals β 1 and β 4 integrin mediate YAP translocation independently of cell spreading. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53659-4>
- Lee, P., Bax, D. V., Bilek, M. M. M., & Weiss, A. S. (2014). A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin α v β 5. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1467–1477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518381>
- López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., & López, E. (2017). Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0418-y>
- Ma, B., Cheng, H., Gao, R., Mu, C., Chen, L., Wu, S., Chen, Q., & Zhu, Y. (2016). Zyxin-Siah2-Lats2 axis mediates cooperation between Hippo and TGF- β signalling pathways. *Nature Communications*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms11123>
- Mandell, K. J., & Parkos, C. A. (2005). The JAM family of proteins. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Issue 6, pp. 857–867). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.005>

- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: From tension to function. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue JUL, p. 824). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>
- Martynova, N. Y., Parshina, E. A., Ermolina, L. V., & Zarausky, A. G. (2018). The cytoskeletal protein Zyxin interacts with the zinc-finger transcription factor Zic1 and plays the role of a scaffold for Gli1 and Zic1 interactions during early development of *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(1), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.164>
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap junctions: Basic structure and function. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 127, Issue 11, pp. 2516–2524). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770>
- Mierke, C. T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D. P., Smith, J., Fabry, B., & Goldmann, W. H. (2008). Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophysical Journal*, 94(2), 661–670. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108472>
- Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2005). Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9)
- Morlon, A., & Sassone-Corsi, P. (2003). The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3977–3982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0735923100>
- Morrow, C. M. K., Mruk, D., Cheng, C. Y., & Hess, R. A. (2010). Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1546, pp. 1679–1696). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0025>
- Morse, E. M., Brahme, N. N., & Calderwood, D. A. (2014). Integrin cytoplasmic tail interactions. In *Biochemistry* (Vol. 53, Issue 5, pp. 810–820). Biochemistry. <https://doi.org/10.1021/bi401596q>
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014a). Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
- Nakazawa, N., Sathe, A. R., Shivashankar, G. V., & Sheetz, M. P. (2016). Matrix mechanics controls FHL2 movement to the nucleus to activate p21 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(44), E6813–E6822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608210113>
- Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N. H. (2012). Gap junctions. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 1981–2035. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110051>
- Niu, C., Yan, Z., Cheng, L., Zhu, J., Zhang, H., Xu, X., Lin, J., & Ye, Q. (2011). Downregulation and antiproliferative role of fhl3 in breast cancer. *IUBMB Life*, 63(9), 764–771. <https://doi.org/10.1002/iub.502>
- Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G. D., Sidhu, S. S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., & Sudol, M. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochemical Journal*, 432(3), 461–472. <https://doi.org/10.1042/BJ20100870>
- Olson, E. N., & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 5, pp. 353–365). *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>

- Omachi, T., Ichikawa, T., Kimura, Y., Ueda, K., & Kioka, N. (2017). Vinculin association with actin cytoskeleton is necessary for stiffness-dependent regulation of vinculin behavior. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175324>
- Ono, R., Kaisho, T., & Tanaka, T. (2015). PDLIM1 inhibits NF- κ B-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF- κ B in the cytoplasm. *Scientific Reports*, 5(1), 18327. <https://doi.org/10.1038/srep18327>
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrm2957>
- Peng, X., Nelson, E. S., Maiers, J. L., & DeMali, K. A. (2011). New Insights into Vinculin Function and Regulation. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 287, pp. 191–231). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0>
- Philippar, U., Schrott, G., Dieterich, C., Müller, J. M., Galgóczy, P., Engel, F. B., Keating, M. T., Gertler, F., Schüle, R., Vingron, M., & Nordheim, A. (2004). The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Molecular Cell*, 16(6), 867–880. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.039>
- Pocaterra, A., Romani, P., & Dupont, S. (2020). CELL SCIENCE AT A GLANCE YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. <https://doi.org/10.1242/jcs.230425>
- Price, A. J., Cost, A. L., Ungewiß, H., Waschke, J., Dunn, A. R., & Grashoff, C. (2018). Mechanical loading of desmosomes depends on the magnitude and orientation of external stress. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07523-0>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Roux, E., Bougaran, P., Dufourcq, P., & Couffignal, T. (2020). Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Frontiers in Physiology*, 11, 861. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00861>
- Saito, M., Tucker, D. K., Kohlhorst, D., Niessen, C. M., & Kowalczyk, A. P. (2012). Classical and desmosomal cadherins at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(11), 2547–2552. <https://doi.org/10.1242/jcs.066654>
- Schaller, M. D. (2001). Paxillin: A focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20(44 REV. ISS. 5), 6459–6472. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204786>
- Schiller, H. B., Friedel, C. C., Boulegue, C., & Fäsignssler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Reports*, 12(3), 259–266. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.5>
- Schwarzbauer, J. E., & DeSimone, D. W. (2011). Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 3, Issue 7, pp. 1–19). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041>
- Seadler, B. D., Kaushik, R., & Sharma, S. (2020). Physiology, Alveolar Tension. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Singh, P., Carraher, C., & Schwarzbauer, J. E. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 397–419. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104020>
- Smith, M. A., Hoffman, L. M., & Beckerle, M. C. (2014). LIM Proteins in Actin Cytoskeleton Mechanoresponse. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.009>

Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J., & Citi, S. (2017). Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Current Biology*, 27(24), 3783-3795.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>

Stanton, A. E., Tong, X., & Yang, F. (2019). Varying solvent type modulates collagen coating and stem cell mechanotransduction on hydrogel substrates. *APL Bioengineering*, 3(3). <https://doi.org/10.1063/1.5111762>

Stutchbury, B., Atherton, P., Tsang, R., Wang, D. Y., & Ballestrem, C. (2017). Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *Journal of Cell Science*, 130(9), 1612–1624. <https://doi.org/10.1242/jcs.195362>

Sun, X., Phua, D. Y. Z., Axiotakis, L., Smith, M. A., Blankman, E., Gong, R., Cail, R. C., Espinosa de los Reyes, S., Beckerle, M. C., Waterman, C. M., & Alushin, G. M. (2020). Mechanosensing through Direct Binding of Tensed F-Actin by LIM Domains. *Developmental Cell*, 55(4), 468-482.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.022>

Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. In *Genome Biology* (Vol. 8, Issue 5, p. 215). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>

Totaro, A., Castellan, M., Di Biagio, D., & Piccolo, S. (2018). Crosstalk between YAP/TAZ and Notch Signaling. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 28, Issue 7, pp. 560–573). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.001>

Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. In *Current Protocols in Cell Biology* (Issue SUPPL. 47). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>

Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology*, 2(12), E231–E236. <https://doi.org/10.1038/35046659>

Van Tam, J. K., Uto, K., Ebara, M., Pagliari, S., Forte, G., & Aoyagi, T. (2012). Mesenchymal stem cell adhesion but not plasticity is affected by high substrate stiffness. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13(6). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/13/6/064205>

Vermette, D., Hu, P., Canarie, M. F., Funaro, M., Glover, J., & Pierce, R. W. (2018). Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Medicine Experimental*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0203-4>

Vervenne, H. B. V. K., Crombez, K. R. M. O., Delvaux, E. L., Janssens, V., Van de Ven, W. J. M., & Petit, M. M. R. (2009). Targeted disruption of the mouse Lipoma Preferred Partner gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.074>

Vicente-Manzanares, M., & Horwitz, A. R. (2011). Adhesion dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(23), 3923–3927. <https://doi.org/10.1242/jcs.095653>

Walko, G., Castañón, M. J., & Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 360, Issue 2, pp. 363–378). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2061-z>

Wang, Y. X., Wang, D. Y., Guo, Y. C., & Guo, J. (2019). Zyxin: A mechanotransductor to regulate gene expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(1), 413–425. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16790

Wells, R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. In *Hepatology* (Vol. 47, Issue 4, pp. 1394–1400). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/hep.22193>

- Wells, R. G. (2013). Tissue mechanics and fibrosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1832, Issue 7, pp. 884–890). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.007>
- Winkelman, J. D., Anderson, C. A., Suarez, C., Kovar, D. R., & Gardel, M. L. (2020). Evolutionarily diverse LIM domain-containing proteins bind stressed actin filaments through a conserved mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25532–25542. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004656117>
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1692, Issues 2–3, pp. 103–119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.007>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In *Journal of Pathology* (Vol. 214, Issue 2, pp. 199–210). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Xia, W., Fu, W., Cai, X., Wang, M., Chen, H., Xing, W., Wang, Y., Zou, M., Xu, T., & Xu, D. (2015). Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF- κ B signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116983>
- Yamashita, H., Ichikawa, T., Matsuyama, D., Kimura, Y., Ueda, K., Craig, S. W., Harada, I., & Kioka, N. (2014). The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin α in sensing the stiffness of the extracellular matrix. *Journal of Cell Science*, 127(9), 1875–1886. <https://doi.org/10.1242/jcs.133645>
- Yang, L. (2008). MECHANICAL PROPERTIES OF COLLAGEN FIBRILS AND ELASTIC FIBERS EXPLORED BY AFM.
- Yao, M., Goult, B. T., Klapholz, B., Hu, X., Toseland, C. P., Guo, Y., Cong, P., Sheetz, M. P., & Yan, J. (2016). The mechanical response of talin. *Nature Communications*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11966>
- Yeh, Y. C., Ling, J. Y., Chen, W. C., Lin, H. H., & Tang, M. J. (2017). Mechanotransduction of matrix stiffness in regulation of focal adhesion size and number: Reciprocal regulation of caveolin-1 and β 1 integrin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14932-6>
- Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. In *Cell* (Vol. 163, Issue 4, pp. 811–828). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix: An Overview NIH Public Access. *J Glaucoma*, 20–23. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000108>
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., & Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions*, 32(3), 416–420. <https://doi.org/10.1042/BST0320416>
- Zaidel-Bar, Ronen, & Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. In *Journal of Cell Science* (Vol. 123, Issue 9, pp. 1385–1388). Company of Biologists. <https://doi.org/10.1242/jcs.066183>
- Zeng, Y., Zhang, Y., Song, X. Q., Ji, Q. H., Ye, S., Zhang, R. G., & Lou, J. Z. (2015). The conformational states of talin autoinhibition complex and its activation under forces. *Science China Life Sciences*, 58(7), 694–703. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4873-9>
- Zhou, C., Wang, Q., Zhang, D., Cai, L., Du, W., & Xie, J. (2019). Compliant substratum modulates vinculin expression in focal adhesion plaques in skeletal cells. *International Journal of Oral Science*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0052-3>

Zhou, C., Zhang, D., Du, W., Zou, J., Li, X., & Xie, J. (2020). Substrate mechanics dictate cell-cell communication by gap junctions in stem cells from human apical papilla. *Acta Biomaterialia*, 107, 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.032>

Zhou, D. W., Lee, T. T., Weng, S., Fu, J., & Garcia, A. J. (2017). Effects of substrate stiffness and actomyosin contractility on coupling between force transmission and vinculin-paxillin recruitment at single focal adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, 28(14), 1901–1911. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0116>

Ziegler, W. H., Liddington, R. C., & Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 16, Issue 9, pp. 453–460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.07.004>

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 564–580). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>