



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA RIGIDEZ DE LA MATRIZ EN FIBROBLASTOS
PULMONARES DE RATÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANDREA MAGALI GONZÁLEZ MORA

DIRECTOR DE TESIS:

BIÓL. MIGUEL ÁNGEL NEGREROS AMAYA

2015

Ciudad Universitaria, D. F.





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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
González
Mora
Andrea Magali
5517298424
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307148036
2. Datos del tutor
Biól.
Miguel Ángel
Negreros
Amaya
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Annie
Pardo
Cemo
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez
5. Datos del sinodal 3
Dr.
José Guadalupe
Cisneros
Lira
6. Datos del sinodal 4
Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la rigidez de la matriz en fibroblastos pulmonares de ratón.

54 p.

2015

Agradecimientos

A la UNAM, que me ha brindado la oportunidad de tener una formación integral y de conocer a excelentes profesores, que han dejado marca en mí, ya que además de transmitirme los conocimientos de sus respectivas áreas, guiándome por el camino que tomé, también me ayudaron a crecer como persona.

Al Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo y a la M en C. Itzel Marisol Garnica Palafox del Laboratorio de mecánica y micromecánica de sólidos, del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), UNAM, su apoyo, disposición y asesorías para el desarrollo de las pruebas mecánicas en el Miniprobador mecánico para ensayos de tracción uniaxial.

A mi tutor, el Biól. Miguel Negreros, por todo el esfuerzo, dedicación, paciencia, el buen sentido del humor, y por no renunciar a pesar de todo. Aprendí mucho siendo su alumna.

Agradezco todo el apoyo recibido en el Laboratorio de Bioquímica, desde mi ingreso al taller hasta la finalización de este trabajo. Muchas gracias a la Dra. Annie Pardo, por haberme aceptado en el grupo de investigación, por el apoyo, la orientación y facilidades que me dio durante la realización de mi tesis. Me es muy grato el ser su alumna y el poder aprender de una persona con una trayectoria científica y académica tan impresionante. También le agradezco a la M. en C. Remedios Ramírez, al Dr. Jorge Antonio García Álvarez y al M. en C. David Medina por apoyarme tan de cerca durante el término de mi tesis y muchas gracias por las palabras de aliento y consejos, especialmente al Dr. Jorge. También agradezco a la Dra. Sandra Cabrera, la M. en C. Jazmín Calyeca, y a todos los miembros del laboratorio, por todas las enseñanzas, consejos, ayuda, amistad y paciencia.

Al Dr. Moisés Selman, por el apoyo recibido como su becario, por sus comentarios y observaciones, los cuales siempre son excelentes oportunidades para aprender, y que junto con la Dra. Annie Pardo poseen una gran calidad humana.

En el laboratorio de Fibrosis Pulmonar, INER, tuve una corta estancia, donde conocí a grandes investigadores que me apoyaron, aconsejaron y me enseñaron cuando lo requería. Gracias al Dr. José Cisneros, a la Dra. Iliana Herrera, a la Dra. Martha Montaña, a la Dra. Criselda Mendoza Milla, a la Dra. Carina Becerril, al M. en C. Luis Plácido, a la Biól. Mariel Bonilla, a los Biólogos Fernanda Toscano y Marco Espina, al Q.F.B. Luis F. Ávila, y a todos en el laboratorio, por su compañerismo, apoyo y amistad.

Dedicatorias

A mi madre, Martha Mora, la persona más importante en mi vida y principal motor para seguir adelante, a quien le debo el donde estoy y gran parte de lo que soy ahora. Muchas gracias por todo el esfuerzo, apoyo y amor, nunca tendré las palabras exactas para expresar toda mi gratitud, todo mi amor y la dicha que me provoca el ser la hija de una mujer tan maravillosa.

A mi abuelita Andrea por cuidar de mí desde que era una niña hasta hoy, por todos los consejos, el cariño, apoyo y los buenos deseos. A mi abuelita Isabel, a mis tías, primos y primas, por el apoyo que me han dado.

A Monse, Mariana, Andrea y Mical, a quienes conocí en el primer semestre de la carrera y que permanecieron conmigo a lo largo de ésta, desde que las conocí entendí que había llegado al lugar correcto. He recibido mucho de ustedes, gracias por su tiempo, su compañía, cariño y por todas las cosas que aprendí a su lado. Me siento muy afortunada por haberlas conocido. Gracias especialmente a Mical, una persona excepcional, de quién he recibido una amistad muy especial, como pocas personas tienen el placer de poder recibir. Muchas gracias por todo.

A Isabel, Erika, Vero, Tanya, Diego, Ulises, y a todos mis amigos, que a pesar de que tomamos caminos diferentes seguimos frecuentándonos cuando tenemos la oportunidad, y que me brindan una sonrisa y un abrazo de alegría cada vez que nos encontramos. Todos han dejado algo en mí y siempre los llevo conmigo. Gracias por ser mis amigos, darme su apoyo incondicional y por permanecer a mi lado a pesar del tiempo y la distancia.

A Gustavo, a quien conocí en la última etapa de la carrera y quien me ha mostrado un nuevo panorama. Gracias por el tiempo juntos, por la paciencia, por apoyarme cuando lo necesito, por todos los consejos y por llenar mis días con tanto amor, alegría y complicidad.

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas.....	1
Introducción	
Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI).....	2
Matriz extracelular (MEC).....	4
Fibroblastos y miofibroblastos.....	7
Mecánica de la MEC.....	10
Integrinas en la mecanotransducción.....	12
Alteraciones mecánicas de la MEC en FPI.....	15
Alfa actina del músculo liso (α -SMA).....	17
Ciclooxigenasa 2 (COX-2).....	19
Hidrogeles de poliacrilamida en el estudio de la FPI	21
Objetivos.....	24
Justificación.....	24
Método	
Obtención de fibroblastos de ratón.....	25
Módulos de rigidez.....	26
Preparación de cubreobjetos.....	27
Fabricación de hidrogeles.....	27
Comprobación de los módulos de rigidez.....	29
Conteo celular.....	32
Siembra de fibroblastos sobre los hidrogeles.....	32
Extracción de proteínas.....	33
Western Blot.....	34
Análisis estadístico.....	35

Resultados

Validación de los módulos de rigidez de los hidrogeles.....	36
Estandarización de cultivo de fibroblastos en hidrogeles de poliacrilamida.....	37
Número de fibroblastos en diferentes módulos de rigidez.....	40
Western blot de α -SMA y COX-2.....	40
Discusión y conclusiones.....	43
Referencias.....	51

TABLA DE ABREVIATURAS

BMP	Proteínas morfogenéticas de hueso
CEAs	Células Epiteliales Alveolares
COX-2	Ciclooxigenasa-2
EGF	Factores de Crecimiento Epidérmicos
FAK	Cinasas de adhesiones focales
FC	Factores de crecimiento
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
FRS	Factor de respuesta al suero
IGF	Factores de Crecimiento parecidos a la Insulina
LOX	Lisil oxidasa
MEC	Matriz Extracelular
MKL1	Leucemia megacarioblástica 1
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MRTF-A	Factor de transcripción relacionado a miocardina A
PDGF	Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
ROCK	Rho cinasa
SFA	Antígeno de superficie de fibroblastos
TEM	Transición epitelio-mesenquima
TEndoM	Transición Endotelio mesénquima
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante- β
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
VEGF	Endotelio Vascular
α -SMA	α -actina del músculo liso

INTRODUCCIÓN

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad progresiva, irreversible, y letal de etiología desconocida. Es una enfermedad asociada al envejecimiento. Se ha reportado una prevalencia de 13 a 20 casos por cada 100 000 habitantes en individuos mayores de 50 años y aumenta en mayores de 75 años a 227 por 100,000. Se presenta con una mayor predominancia en hombres que en mujeres (1.5-1.7:1) (Selman y Pardo, 2002; King *et al.*, 2011). En cuanto a sus características clínicas, la FPI se caracteriza por una disnea progresiva, con o sin exacerbaciones agudas, volúmenes del pulmón reducidos, un intercambio gaseoso afectado, señales histopatológicas de neumonía intersticial usual y también, en aproximadamente un 50% de los pacientes se presenta acropaquia (dedos en palillo de tambor), un padecimiento que involucra el engrosamiento de los tejidos suaves de la cama del lecho ungueal. Actualmente se carece de un tratamiento efectivo contra la FPI y la mayoría de los pacientes muere alrededor de 5 años después del diagnóstico (Selman, *et al.*, 2007; Nalysnik *et al.*, 2012; Tully, Trayes y Studdiford, 2012). Los factores de riesgo más importantes para desarrollar este padecimiento son el tabaquismo, la exposición al polvo de metales o madera, aspiración gastroesofágica silenciosa crónica, y se considera que las infecciones virales, principalmente infecciones por virus del herpes, también pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad. Con una menor frecuencia, se cuenta el factor genético (aproximadamente el 0.5-3.7% de los pacientes), con una transmisión vertical autosómica dominante en donde no se suele presentar todos los síntomas de la FPI, debido a que muestra una penetrancia reducida (King *et al.*, 2011).

Para realizar un diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza una tomografía de alta resolución de los pulmones, en donde se revela la presencia de una zona de fibrosis alternada con áreas de tejido pulmonar normal. La zona de fibrosis se

distingue por una panalización, preferencialmente en el parénquima periférico subpleural; es decir, existen espacios aéreos revestidos por epitelio bronquiolar, los cuales son llenados por mucina y un número variable de células inflamatorias. Además de focos de fibroblastos responsables de un depósito excesivo de moléculas de matriz extracelular (King *et al.*, 2011; Gross y Hunninghake, 2001; Nalysnik *et al.*, 2012).

Una de las características de la FPI es la presencia de células epiteliales alveolares (AECs) tipo II hiperplásicas e hipertónicas (Willis *et al.*, 2005), mientras que el número de las AECs tipo I, células que cubren más del 90% de la superficie alveolar y a través de las cuales se realiza el intercambio gaseoso, sufre una reducción en número de manera importante, en pacientes con FPI. Sin la presencia de un proceso patológico, la pérdida de CEAs tipo I es compensada por la transdiferenciación de las CEAs tipo II para lograr el restablecimiento de un epitelio funcional alveolar. Sin embargo, en la FPI este proceso está profundamente alterado debido a anomalías en la matriz extracelular (MEC) y a la interrupción de la membrana basal epitelial (King *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que la FPI es el resultado de daño epitelial y una subsecuente reparación desregulada, con activación de células epiteliales alveolares, donde el daño resulta en liberación de citocinas, exceso en la deposición de matriz extracelular en el parénquima pulmonar, una activación celular mesenquimal anormal y la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos (Selman, King y Pardo, 2001).

Otra característica distintiva de la FPI es la presencia de zonas focales de proliferación de fibroblastos/miofibroblastos que representan áreas de fibrogénesis activa, con una inapropiada reepitelización, y una distorsión en la arquitectura del parénquima pulmonar (Gross, y Hunninghake, 2001).

Los focos de fibroblastos están fuertemente constituidos por miofibroblastos, células contráctiles que tienen características tanto de fibroblastos como de células de células de músculo liso, y a los cuales se les considera como la principal fuente

de producción anormal de matriz extracelular en FPI (Yang, 2012), que también contribuyen a la disrupción de la membrana basal y a la muerte de células epiteliales. No está clara la razón por la cual los fibroblastos y los miofibroblastos aparentemente sobreviven mientras que las células epiteliales mueren dentro del mismo microambiente. Se ha propuesto que la deficiencia de la prostaglandina E2 (PGE₂) desempeña un papel importante, ya que incrementa la sensibilidad a apoptosis en CEAs pero provoca un decremento en la apoptosis de los fibroblastos. De igual forma se sabe que el Factor de Crecimiento Transformante- β 1 (TGF- β 1), molécula pro-fibrosante por excelencia, y la endotelina-1 (sintetizada por las CEAs) ejercen un efecto antiapoptótico en los miofibroblastos (King *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la rigidez de la matriz, producto de la excesiva secreción de proteínas por parte de focos de fibroblastos/miofibroblastos durante un proceso fibrótico, puede regular la diferenciación a miofibroblastos a través de una vía de mecanotransducción. Recientes observaciones se han enfocado en el hecho de que la variación en la rigidez de la matriz o el sustrato en el que crecen los fibroblastos altera la morfología, proliferación, señalización del TGF β -1, y activación de miofibroblastos, por lo cual se ha llegado a proponer la posibilidad de que la rigidez de la MEC sea considerado como un factor importante, responsable de promover, perpetuar y amplificar la fibrosis (Huang *et al.*, 2012).

En FPI existe un gran número de moléculas cuya expresión se ve alterada, sin embargo las moléculas que se modifican como resultado del estrés mecánico que existe en FPI, han sido poco estudiadas. Por tal motivo es importante tratar de elucidar los mecanismos subyacentes e identificar las moléculas participantes en las vías mecanotransductoras de la FPI (Liu *et al.*, 2010).

Matriz extracelular (MEC)

La MEC es un medio complejo y dinámico que funciona como un andamio para el soporte de las células que conforman a los órganos y a los tejidos, caracterizado por propiedades bioquímicas y mecánicas, específicas y heterogéneas para cada

uno de ellos. La MEC es considerada como un iniciador crucial de señales bioquímicas y biomecánicas requeridas para la morfogénesis, diferenciación y homeostasis de los tejidos (Gattazzo, Urciuolo y Bonaldo, 2014).

La MEC se compone principalmente de proteínas fibrosas, polisacáridos glucosaminoglucanos, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato. Los glucosaminoglucanos se encuentran llenando la mayoría de los espacios intersticiales dentro de los tejidos en forma de gel hidratado, teniendo como principales grupos a los hialuronatos, los cuales con frecuencia están unidos a núcleos de proteínas formando proteoglucanos. Además de las ya mencionadas, en la MEC se pueden encontrar otro tipo de moléculas como las proteínas no fibrosas, entre las que se encuentran Factores de Crecimiento (FC) (Alberts *et al.*, 2008; Barrier y Yamada, 2007). Los proteoglicanos más comunes son el agregcano, el betaglicano, la decorina, el perlecano y el sindecano -1. Mientras que las principales proteínas fibrosas en la MEC son, en primer lugar, las colágenas, seguidas por las elásticas, fibronectinas y lamininas. Las colágenas son una familia de proteínas que se forman de tres cadenas α helicoidales ricas en prolina y glicina. Se sabe que existen 42 distintos genes que codifican para diferentes cadenas α , dando como resultado la formación de 28 tipos de colágena, actualmente conocidos. La colágena tipo I es, por mucho la que se encuentra en mayor cantidad y junto con la colágena tipo III funcionan como una red de fibras en el intersticio de los tejidos, mientras que la colágena tipo IV que se encuentra en redes con forma de hojas, es el mayor componente de la membrana basal. Las colágenas son las proteínas fibrosas más abundantes de la MEC, conforman un 30% de la masa de proteínas en animales multicelulares, proveen resistencia a la tracción (oposición al rompimiento ante la aplicación de fuerzas que actúan en sentidos contrarios y que tienden a estirarlo), regulan también la adhesión celular, el soporte, la quimiotaxis, la migración y el desarrollo de los tejidos (Frantz, Stewart y Valerie, 2010).

Los componentes de la MEC están sujetos a una variedad de modificaciones postraduccionales, tal como sucede con la colágena tipo I donde ocurre la

hidroxilación de residuos de prolina y lisina, y del corte de los propeptidos N- y C-terminal, conformando una estructura altamente dinámica ya que se encuentra en una constante remodelación por medios enzimáticos o no enzimáticos. Las enzimas que se encargan de la homeostasis en el tejido son las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y otras enzimas como las lisil oxidasa (LOX) que retícula fibras de elastina y colágena vía residuos de lisina. También se encuentran en abundancia FCs, los cuales se unen a la MEC regulando la transcripción de genes, el crecimiento celular y la migración por la inducción de transducción de señales al interactuar con los receptores en la superficie de las células y cuando estos FCs son liberados forman parte de un circuito de retroalimentación estrechamente controlado. A través de estas características, la MEC mantiene la homeostasis y la retención de agua además de generar las propiedades bioquímicas y mecánicas, características de cada órgano tal como su fuerza tensil y compresiva, y elasticidad. Así mismo, la MEC media la protección de los tejidos por una acción amortiguadora, la cual también varía dependiendo del órgano del que se esté hablando (Frantz *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2013).

Las macromoléculas que conforman a la MEC son producidas de manera local principalmente por los fibroblastos, los cuales, además pueden contribuir a la organización de la matriz, ya que son capaces de estructurar la fibrillas de colágena en hojas o cables de acuerdo a la tensión de la matriz, e influir dramáticamente en el alineamiento de las fibras de colágena. Además, el citoesqueleto participa en la adhesión celular, ya que se acopla a la MEC por medio de receptores como las integrinas y receptores con dominios de discoidina y sindecanos (Alberts *et al.*, 2008; Barrier y Yamada, 2007; Frantz *et al.*, 2010).

Fibroblastos y miofibroblastos

Los fibroblastos son células que se encuentran dispersas en el tejido conectivo por todo el cuerpo. La *Encyclopaedia britannica* menciona que morfológicamente son grandes, aplanadas, alargadas (en forma de huso), pertenecen a la familia de células del tejido conjuntivo, las cuales son responsables del marco arquitectónico del cuerpo, ya que contribuyen al soporte y reparación de casi todos los tejidos y órganos. Este tipo celular está caracterizado por la expresión de moléculas vimentina y actina F, α y β y el antígeno de superficie de fibroblastos (SFA), usadas como marcadores moleculares de fibroblastos, y se encuentra especializado en la secreción de una matriz que es rica en colágenas, especialmente en la tipo I y tipo III (Ramos *et al.*, 2004; Strutz *et al.*, 1995).

Los fibroblastos tienen un papel central en el mantenimiento de la función de los tejidos normales y en la respuesta de cicatrización de heridas. Por medio de la generación de moléculas de la MEC, los fibroblastos proveen de sostén a las células y la capacidad de respuesta ante cambios rápidos de fuerzas que actúan sobre los tejidos, ya que algunos órganos al ser muy dinámicos, están sometidos a diversos grados de movimiento y estrés, como es el caso del pulmón. Un gran número de fibroblastos pulmonares, se localizan de manera normal en capas subepiteliales de las vías aéreas y en el intersticio del parénquima pulmonar. De esta manera, tienen una ubicación primordial para la interacción con las células epiteliales y endoteliales (Clarke *et al.*, 2007; <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/205914/fibroblast>).

Cuando se produce una herida en un tejido, los fibroblastos cercanos proliferan, migran y producen una gran cantidad de moléculas de matriz, principalmente colágena en el sitio de la herida, favoreciendo el aislamiento y reparación del tejido dañado. Durante este proceso, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos y adquieren la expresión de moléculas como la desmina, la cadena pesada de la miosina y α -actina del músculo liso (α -SMA), que confiere una actividad contráctil

similar a la de las células del músculo liso, y también presentan elevadas secreciones de moléculas de la MEC. Cuando la secreción de proteínas de la MEC, por parte de los miofibroblastos es exacerbada, puede llevar a un problema de una reparación correcta de la herida y en el funcionamiento adecuado de los tejidos y órganos, induciendo al desarrollo de ciertos trastornos como una cicatrización hipertrófica, esclerodermia, la enfermedad de Dupuytren o fibrosis en órganos como el riñón o los pulmones (Carlos *et al.*, 2004; Hinz *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2013).

Los fibroblastos y miofibroblastos son células metabólicamente activas, capaces de sintetizar, y secretar componentes y enzimas degradadoras de la MEC. Dentro de los componentes de la MEC se encuentran colágenas, proteoglicanos, tenascinas, lamininas y fibronectina. Como parte de las enzimas reguladoras de la arquitectura de la MEC se encuentran las MMPs y sus inhibidores, TIMPs. Debido a su importancia en el desarrollo de varias patologías, como ocurre en la FPI, es necesario entender las vías y mecanismos moleculares que regulan la diferenciación a miofibroblastos, para así tratar de contrarrestar la disfunción de los órganos causada por estos. En el pulmón, órgano en el que se desarrolla la FPI, los fibroblastos se encuentran en capas subepiteliales del parénquima pulmonar, en donde interactúan con el epitelio y células endoteliales (Clarke *et al.*, 2007).

Los miofibroblastos son elementos clave en el desarrollo de fibrosis, por lo tanto su estudio en la FPI es esencial para entender los procesos patológicos que ocurren en este padecimiento. Así mismo es necesario comprender el origen de los fibroblastos y los mecanismos moleculares que regulan su diferenciación a miofibroblasto. Los fibroblastos de pulmones con FPI tienen fenotipos heterogéneos y propiedades diferentes a las de los fibroblastos de los pulmones normales, por lo cual se ha propuesto que dicha heterogeneidad se debe a que los fibroblastos derivan de múltiples tipos celulares (Kim *et al.*, 2006). En cuanto a la procedencia de los fibroblastos, estos pueden provenir en primer lugar de otros fibroblastos residentes del tejido, también se asume que se originan a partir de

fibrocitos circulantes que migran y se diferencian a este tipo celular. Adicionalmente, se ha propuesto que las CEAs y los pericitos pueden contribuir a la formación de células con un fenotipo de miofibroblastos a partir de una transición epitelio-mesenquima (TEM) o transición endotelio mesénquima (TEndoM) como resultado de una inducción por TGF β -1 (Willis *et al.*, 2005; Keeley *et al.*, 2010).

La activación de los miofibroblastos a partir de fibroblastos, se caracteriza por el reclutamiento de moléculas de α -actina del músculo liso (α -SMA) en fibras de estrés, llevando a un incremento en la contractilidad. La función biológica de la contracción del miofibroblasto es la de restaurar la integridad del pulmón y remodelar la MEC circundante para estabilizar el tejido dañado. Sin embargo, en la fibrosis hay una contracción excesiva y persistencia de los miofibroblastos, dando como resultado una mayor rigidez en el tejido, alterando su correcto funcionamiento. Como se ha mencionado, TGF β -1 resulta ser un factor muy importante, al grado de ser considerado como el estímulo más potente para inducir la activación de miofibroblastos, proceso caracterizado por una hipertrofia celular y la expresión *de novo* de α -SMA en fibras de estrés, regulando la expresión de fibronectina y de receptores de integrina, contribuyendo a la activación/fosforilación de cinasa de adhesión focal, y al aumento de la contractilidad de estas células, lo cual es favorable para estabilizar mecánicamente los daños en el tejido (Balestrini *et al.*, 2012).

Sin embargo, durante procesos patológicos, como en la fibrosis, los miofibroblastos persisten y la contracción excesiva lleva a un endurecimiento de los tejidos, incrementando la tensión mecánica, afectando el correcto funcionamiento, e incluso llevando a un fallo orgánico en el pulmón (Balestrini *et al.*, 2012; Honda *et al.*, 2013).

Estudios recientes sugieren que la contracción de los miofibroblastos proveen de un mecanismo de retroalimentación para el mantenimiento de su fenotipo a través de la conversión de estímulos mecánicos en señales fibrogénicas, principalmente

por la vía extrínseca de mecanostrucción, la cual involucra la activación de TGF- β latente. Aunque, también se ha identificado una vía intrínseca, en la cual, el factor de transcripción mecano-sensitivo Leucemia megacarioblástica 1 (MKL1) convierte los estímulos mecánicos, derivados de la contracción de los fibroblastos en respuesta al endurecimiento de la MEC, en señales intracelulares que promueven la diferenciación a miofibroblastos, por medio de la activación de la vía de RhoA/ROCK (Zhuo *et al.*, 2013).

Mecánica de la MEC

La mecánica de la MEC es un fenómeno altamente complejo ya que en los órganos, la MEC presenta generalmente, propiedades mecánicas bien definidas caracterizadas por módulos elásticos o de Young (resistencia a la deformación) los cuales dependen del tipo de tejido, la edad y la salud del organismo (Jamney *et al.*, 2009).

Las propiedades mecánicas de la MEC contribuyen a la regulación de muchos procesos importantes que determinan el destino y la función celular, como la proliferación, migración, dispersión morfológica y diferenciación de células troncales. Estos procesos involucran la interacción de proteínas de la MEC, como la colágena, fibronectina o vitronectina con proteínas receptoras transmembranales de la familia de las integrinas (Pelham y Wang, 1997).

La MEC muestra una alta variación de rigidez entre los diferentes tejidos del cuerpo; el cerebro con 260-490 Pa, el hígado con 640 Pa, el riñón con 2.5 kPa, el músculo esquelético con 12-100 kPa, el cartílago con 950 kPa y el pulmón con 1.83 kPa (Sunyer *et al.*, 2012; Mariapan *et al.*, 2012).

Los cambios de rigidez en los tejidos de adultos, *in vivo*, suelen ocurrir por daño o enfermedad. En el cambio de rigidez como resultado de daño en el tejido, existe el depósito de una matriz provisional de fibrina, contraída primero por plaquetas y después por miofibroblastos. Durante procesos patológicos puede darse un

endurecimiento de los tejidos, como ocurre en el cáncer y en la fibrosis, donde en la mayoría de los casos, permanece sin ser elucidada la importancia del endurecimiento de los tejidos en la progresión de enfermedades. Por ello se han desarrollado materiales biocompatibles para el cultivo celular, por medio de los cuales se ha llegado a descubrir cómo las células reaccionan ante estímulos mecánicos del medio, permitiendo así, demostrar que las células son sensitivas a cambios en las propiedades mecánicas de sus sustratos. Debido a estos estudios ha resurgido un interés en la mecanosensitividad y en los cambios de rigidez de tejidos que ocurren en estados patológicos (Janmey *et al.*, 2009).

Por medio de numerosos estudios *in vitro*, se ha visto la importancia de los estímulos mecánicos del medio sobre las células, mostrando que son sensitivas a las propiedades mecánicas de su sustrato, ya que traducen los estímulos mecánicos del medio en señales bioquímicas, permitiendo que las células se adapten a su medio físico, llamándole a este proceso mecanotransducción (Janmey *et al.*, 2009; Lo *et al.*, 2000).

Se han realizado extensas investigaciones para identificar las moléculas involucradas en la mecanotransducción celular, sin embargo, diversos componentes y mecanotransductores primarios siguen sin ser definidos por completo. Por ello, se han llevado a cabo diversos estudios de mecanotransducción en distintos tipos celulares; células del músculo, del hueso, endoteliales, del cartílago, miocitos, vasculares del músculo liso, fibroblastos, entre otros, demostrando que la mecanotransducción está involucrada en un amplio rango de funciones celulares. Por ejemplo, las células madre pueden ser diferenciadas hacia un destino en específico de acuerdo a la geometría y rigidez del sustrato en el que se crece la célula y las interacciones intercelulares como la tensión y adhesión (Jalouk y Lammerding, 2009).

Cuando se presentan alteraciones en la mecánica de tejidos o componentes de tejidos, como lo es la MEC, ocasionadas por el desarrollo de alguna patología, se

pueden llegar a presentar alteraciones en la mecanotransducción, en las que resulta común encontrar una disrupción en la fuerza de transmisión entre la MEC, el citoesqueleto y el interior del núcleo. La sensibilidad de las células está basada en los cambios conformacionales de las proteínas sujetas a fuerzas moleculares, las cuales llevan a la activación de vías de señalización (Jaalouk y Lammerding, 2009). La MEC y las células que componen cada órgano se encuentran estrechamente asociadas por adhesiones, llamadas adhesiones célula-matriz o adhesiones focales (AFs), a través de estructuras discretas en la superficie celular, estas adhesiones median interacciones directas de la célula con su medio extracelular. Las adhesiones focales, complejos multiproteicos compuestos principalmente por integrinas, son parte esencial en procesos como la migración, organización del tejido y diferenciación, por lo tanto este tipo de adhesiones son de gran importancia en el desarrollo embrionario, remodelación y homeostasis de tejidos y órganos. Así mismo, las señales de adhesión de la matriz cooperan con otras vías regulando fenómenos como sobrevivencia celular, proliferación, cicatrización de heridas y tumorigénesis. Las integrinas son los principales receptores de superficie celular, encargados de regular la adhesión célula-matriz, ya que permiten la percepción de las perturbaciones mecánicas del medio a la célula y de la célula al medio (Barrier y Yamada, 2007; Wipff y Hinz, 2008).

Integrinas en la mecanotransducción

Las integrinas son receptores heterodiméricos, generados por apareamiento selectivo entre subunidades de dos tipos, α y β , de las cuales existen 18 y 8, respectivamente, conformando 24 pares $\alpha\beta$ distintos que se unen a varios ligandos de la MEC con diferentes afinidades (Wipff y Hinz, 2008).

Las integrinas proveen de un conducto para información mecanoquímica a través de la membrana celular, constituyendo un mecanismo de conexión entre los compartimentos intracelulares y extracelulares. La adhesión celular a la MEC

transmite información vía receptores de integrina regulando la señalización intracelular vía señalización afuera-adentro, ocasionada por la tensión exógena, importante en la expansión y migración celular. Así mismo, las señales intracelulares o tensión endógena, pueden inducir cambios en la conformación y activación de integrinas que altera su actividad de unión a los ligandos en un proceso denominados señalización de adentro-afuera. La interacción de las integrinas junto con la MEC, pueden afectar su activación, dando como resultado un *crosstalk* bidireccional entre señalizaciones internas y externas por tensiones endógenas debido a contractilidad y exógenas ocasionadas por la rigidez de la MEC (Berrier y Yamada, 2007).

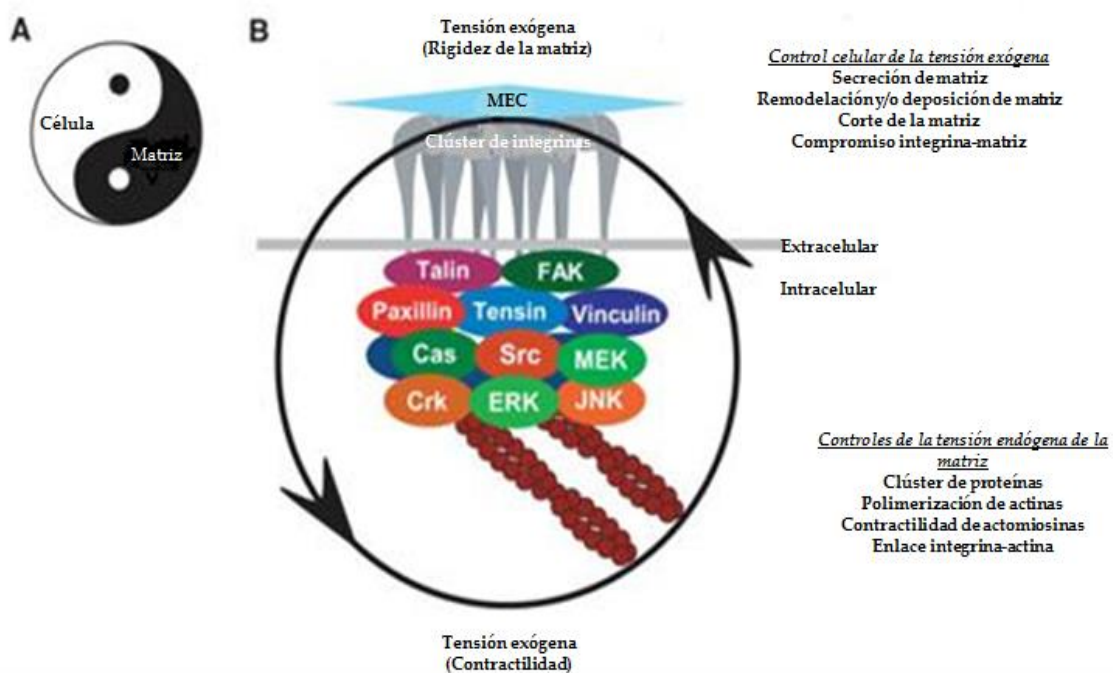


Fig. 1. Regulación de la tensión exógena (rigidez de la matriz) y endógena (contractilidad e la célula). Señalización bidireccional entre los receptores de integrinas y los compartimentos intracelulares y extracelulares. La participación de las integrinas con la MEC regula la tensión endógena provocando una reorganización en el citoesqueleto de actina y contractilidad de la actinmiosina, alterando los niveles de tensión exógena (rigidez de la matriz) (Modificado de *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 565-573).

El agrupamiento de receptores de integrinas, seguido de la unión de las integrinas con la MEC, promueve la concentración de moléculas de señalización intracelulares, como cinasas de adhesiones focales (FAK), proteínas de la familia de las cinasas C, proteínas lipídicas como la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y fosfatasas. Las vías de señalización de estas cinasas y fosfatasas inducen a modificaciones postraduccionales de proteínas que participan en cascadas de señalización río abajo que controlan la organización del citoesqueleto, la regulación de genes y diversos procesos y funciones celulares (Barrier y Yamada, 2007) (**Fig. 1**) .

Hay una gran variedad de vías de factores de crecimiento asociadas con las integrinas, donde algunas interactúan con receptores para Factores de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGF), Factores de Crecimiento parecidos a la Insulina (IGF) o Factores de Crecimiento Epidérmicos (EGF), pero de todos los factores de crecimiento que cooperan con integrinas, el TGF- β parece tener una participación biológica y activación de mayor complejidad. Recientemente se ha sugerido que el endurecimiento de la matriz regula la diferenciación de miofibroblastos por medio del TGF- β , ya que una de las vías que promueven la activación de esta citocina latente en la matriz se da por medio del endurecimiento de la MEC (Wipff y Hinz, 2008; Hinz *et al.*, 2007). El TGF- β pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que comprende a las avidinas y proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), que modulan el crecimiento celular, adhesión, migración, síntesis de MEC y apoptosis. En tejidos maduros, la vía de señalización de TGF- β lleva a la homeostasis de tejidos, controla la proliferación de células epiteliales, endoteliales, células del sistema inmune y fibroblastos. (Wipff y Hinz, 2008). Las adhesiones focales unen físicamente la MEC al citoesqueleto, el cual tiene un papel preponderante en la comunicación de la célula con la MEC, y se encuentra conformado por tres clases de estructuras filamentosas; actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Estos elementos son importantes ya que se requiere

de un crosstalk coordinado entre la actina, filamentos intermedios y redes de microtúbulos del citoesqueleto. Los filamentos de actina del citoesqueleto están físicamente conectados a la MEC y a células vecinas a través de complejos de adhesiones focales y cadherinas, estas estructuras monitorean la tensión interna y externa en la célula y participa en la regulación de diversas funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración y expresión de genes. Proteínas como las RhoA GTPasa pequeñas regulan procesos de polimerización de actina entre (G-) monomérica y (F-) polimerizada, las cuales interactúan con los factores transcripcionales MKL1, el Factor de transcripción relacionado a miocardina A (MRTF-A) y smad3, permitiendo su translocación al núcleo y su interacción con el Factor de respuesta al suero (FRS), induciendo la transactivación de genes profibróticos como α -SMA. Esta GTPasa pequeña ha demostrado tener una importante participación en la expresión y formación de fibras de estrés y de α -SMA, mediado por un estrés mecánico, así mismo, se ha demostrado que se puede promover la expresión de cadenas de colágena, por medio de la vía de ROCK (Huang *et al.*, 2012; Scharenberg *et al.*, 2014).

Alteraciones mecánicas de la MEC en FPI

En diferentes trabajos el objetivo de estudio se centra en la relación de los fibroblastos y su capacidad mecanosensitiva, en los que se destacan las implicaciones de las variaciones en la rigidez de la MEC durante el desarrollo de procesos fibrogénicos, mostrando que estas variaciones actúan como modificadores potenciales de la morfología, proliferación, señalización del TGF- β y activación de miofibroblastos. En estudios realizados con fibroblastos y señalizaciones de TGF- β se ha demostrado cómo los cambios en la rigidez de la matriz puede facilitar la diferenciación de un fenotipo quiescente a un fenotipo remodelante, el cual además de endurecer la MEC por acumulación de moléculas de la matriz, puede llegar a crear un asa de retroalimentación positiva que

promueva la progresión del estado patológico (Jamney *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012, Hinz, 2010).

A partir de este tipo de estudios se ha observado que los fibroblastos muestran una mayor fuerza de tracción y desarrollan una morfología más amplia y aplanada en sustratos rígidos con respecto a los que crecen en sustratos suaves pero la superficie de adhesión es igual (ya que la densidad de proteínas de unión es independiente de la dureza del gel), así mismo se ha observado que las células en una superficie de menor rigidez migran hacia una rigidez mayor, nombrando a esta aparente preferencia por los sustratos duros como durotaxis o mecanotaxis (Yeung *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2014).

Sobre la línea de investigación de la FPI se han hecho diversos estudios tratando de esclarecer la importancia del efecto mecánico que pudiera tener el aumento de la rigidez de la MEC en el desarrollo y perpetuación de la FPI. Para ello se han usado diferentes tipos de materiales reológicos en el cultivo celular, intentando probar el efecto directo que se tiene al crecer fibroblastos sobre matrices con diversos grados de rigidez, tratando de imitar las propiedades mecánicas del pulmón normal y del pulmón fibrótico (Balestrini *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). La capacidad de los fibroblastos para percibir el estrés extracelular y transmitir la fuerza contráctil de la MEC es crucial para la regulación de su actividad durante la remodelación del tejido conectivo. Los cambios en la composición, organización y propiedades mecánicas de la MEC, junto con la acción de factores de crecimiento, posterior a un daño tisular, estimulan la migración de fibroblastos y el desarrollo in vivo de fibras de estrés, las cuales en un inicio se componen de actinas citoplasmáticas. El resultado es el incremento en la tensión de la MEC, el cual, en conjunto con la acción del TGF- β conforman un prerrequisito para la expresión *de novo* de α -SMA en los miofibroblastos. Aunque también se ha demostrado que únicamente por medio de un estrés mecánico en la MEC, se puede activar la expresión de α -SMA mediante la vía de Rho cinasa (ROCK) (Huang *et al.*, 2012). Las ROCK son cinasas serin/treonina activadas por las enzimas GTPasas Rho, y

regulan importantes funciones celulares, como proliferación, migración, adhesión y apoptosis/sobrevivencia. Se sabe que mediante el efecto de ROCK se fosforilan blancos río abajo, donde algunos de ellos se han asociado a contractilidad celular, organización del citoesqueleto de actina, formación de fibras de estrés y ensamblaje de adhesiones focales. Al promover la activación de la GTPasa RhoA/ROCK por medio de estímulos mecánicos, se favorece la translocación de MKL 1 al núcleo de la célula donde la FRS se une a la MKL1 formando un complejo que activa al promotor de α -SMA (Goffin, 2006; Huang *et al.*, 2012; Zhou, 2013).

La enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) es otra de las moléculas cuya expresión se ve alterada por la rigidez del sustrato, esta enzima se encarga de mediar la producción de un prostanoide de gran importancia en las vías aéreas, prostaglandina E₂ (PGE₂), y que se sabe puede ofrecer un efecto protector ante eventos fibróticos en el pulmón. La regulación de la expresión de COX-2 también está asociada a la vía de Rho/ROCK, por efecto de estímulos mecánicos en el medio celular, puesto que se ha reportado que COX-2 disminuye sus niveles de expresión en fibroblastos sembrados en sustratos más rígidos, como los podría ser la MEC en FPI, y por consiguiente, la expresión de PGE₂ también se ve afectada y se reduce (Liu *et al.*, 2010) (**Fig. 2**).

Alfa actina del músculo liso (α -SMA)

Cuando un tejido, como el pulmonar, recibe algún daño, los fibroblastos son reclutados para ayudar a sanar la herida y en el sitio del daño se adquieren algunas características del músculo liso, como una mayor contractilidad, debido a la formación de fibras de estrés y la incorporación de alfa α -SMA en ellas, dicha contractilidad es una característica de la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto y es esencial para sanar el tejido dañado (Wipff y Hinz, 2008).

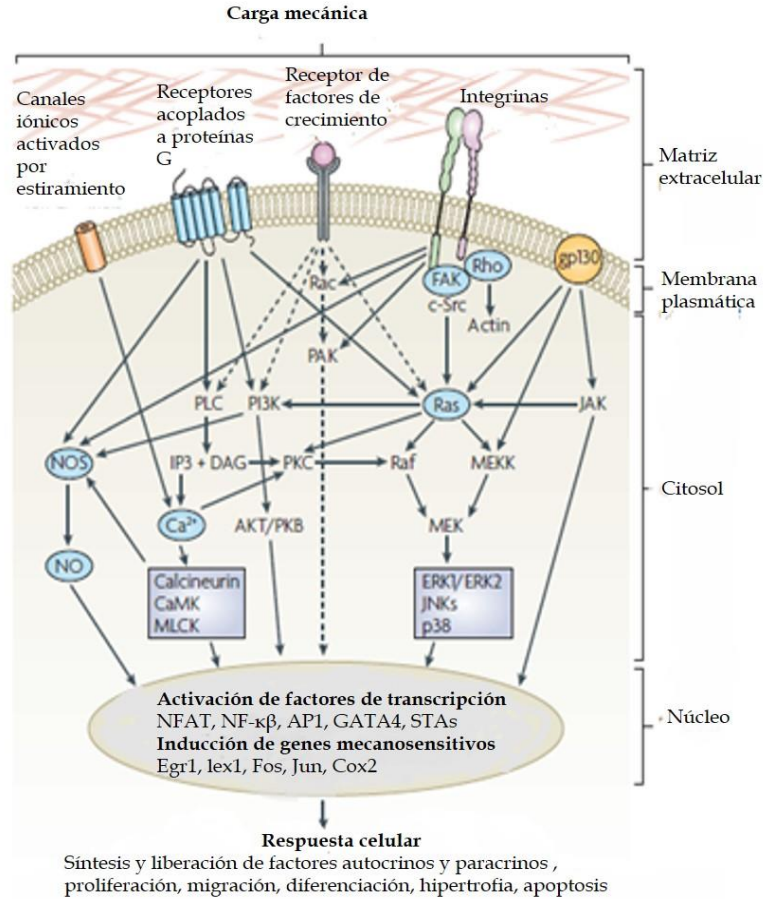


Fig. 2. Vías de señalización de la mecanotransducción en cardiomiocitos. Se muestran la interacción de elementos de la MEC con receptores transmembranales y con segundos mensajeros, como los receptores de integrina con proteínas GTPasas Rho, teniendo un efecto sobre los filamentos de actina y de COX-2 (Modificado de *Molecular cell biology*, 2009; 10: 63-73).

La proteína α -SMA de citoesqueleto, tiene un peso molecular de 42 kDa y es el marcador molecular más común para miofibroblastos, está codificada por el gen ACTA2 y pertenece a la familia de las actinas que se encuentra altamente conservada y cuyas funciones se centran en la motilidad celular, estructura e integridad (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59>).

No se conoce el mecanismo por el cual α -SMA genera tan altas contracciones comparadas con otras isoformas de actina (β y γ -actina), sólo se sabe que la

secuencia AcEEED de amino ácidos en la porción N-terminal tiene un papel importante en este mecanismo (Wippf y Hinz, 2008; Hinz *et al.*, 2007).

Para que se genere la expresión de α -SMA en miofibroblastos diferenciados se requiere; 1) El estímulo por TGF- β , 2) la presencia de proteínas especializadas de la MEC, como variantes resultado del splicing del exón ED-A de la fibronectina, y 3) un elevado estrés mecánico resultado de la actividad de remodelación de la MEC (Hinz *et al.*, 2007).

α -SMA puede ser considerada una proteína de mecanopercepción, ya que se encuentran conformando complejos de adhesiones focales maduras (FAs). Estos complejos de adhesión anclan los miofibroblastos a la matriz y median la mecanopercepción. El citoesqueleto de los miofibroblastos puede funcionar como traductor de señales mecánicas a bioquímicas, ya que la expresión de α -SMA inducida por fuerza involucra una serie de reacciones a nivel molecular, que llevan a la formación de un asa de amplificación, en la cual *a priori* se requiere α -SMA en las FAs, la unión de la proteína cinasa activadora de mitógeno p38 (p38 MAP) a fibras de estrés y su activación por fosforilación, la activación de Rho y la unión del FRS a la caja CArG-B en el promotor de α -SMA (Hinz *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006). Por lo tanto, α -SMA es una proteína estructural muy importante durante el mantenimiento y remodelación de tejidos, cuya capacidad mecanosensora le permiten potenciar su expresión por miofibroblastos en ambientes más rígidos de lo considerado normal (Hinz *et al.*, 2007).

Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

La prostaglandina E2 (PGE₂) es un conocido mediador antifibrótica, ya que se ha comprobado que potencia la cicatrización de heridas mejorando la sobrevivencia de células epiteliales, inhibe la proliferación de fibroblastos, síntesis de colágeno tipo I, migración celular y diferenciación en miofibroblastos e induce la apoptosis

en fibroblastos (Gabasa *et al.*, 2013). La PGE₂ es un prostanoide, ácido graso derivado del metabolismo del ácido araquidónico, que es convertido en prostaglandina H₂, la cual se procesa en varios tipos de prostaglandina, incluyendo la PGE₂, por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), proteína de 72 kDa, y es considerado como el prostanoide con mayor presencia en las vías aéreas, siendo el producto predominante de prostaglandinas en células epiteliales alveolares y en fibroblastos pulmonares. Se ha demostrado en modelos animales que la PGE₂ ofrece un efecto protector contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y que la ausencia de COX-2 y de PGE₂ favorece el desarrollo de fibrosis (Dubois *et al.*, 1998).

Durante un proceso normal de cicatrización en los pulmones, la restitución del epitelio y la apoptosis de fibroblastos/miofibroblastos son pasos clave en la restauración estructural y funcional de los tejidos. Sin embargo, en FPI ocurren eventos de apoptosis epitelial en exceso, combinados con resistencia a la apoptosis por parte de los fibroblastos/miofibroblastos, favoreciendo así el desarrollo y perpetuación de la fibrosis. Se sabe que la sobreexposición de las células pulmonares a mediadores como el TGF- β , tiene un efecto contrario a la disminución de COX-2 en CEAs y fibroblastos; aumento en la apoptosis y resistencia a la apoptosis, respectivamente. Esto podría explicar la paradoja de resistencia de fibroblastos a la apoptosis y el exceso de apoptosis en CEAs en FPI (Maher *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

En FPI la expresión de PGE₂ se encuentra disminuida, esto es debido a un fallo en la regulación de COX-2 en pacientes con este padecimiento. La reducción de PGE₂ dependiente de COX-2 contribuye a un incremento en la proliferación y producción de colágena por fibroblastos estimulados con TGF- β . Además, se ha observado que las señalizaciones de Rho/ROCK y COX-2/PGE₂ ofrecen un efecto antagonista mutualista en la morfología, estructura del citoesqueleto y adhesiones focales en fibroblastos, ya que a mayor presencia de ROCK, la actividad de COX-2 y por lo tanto síntesis de PGE₂, disminuye. Mientras que a mayor presencia de

PGE₂ se inhibe el efecto de ROCK sobre la expresión de proteínas asociadas a adhesiones focales, como α -SMA. Se sugiere que el balance entre estas dos vías antagonicas definen dos fenotipos en fibroblastos: activo (elevada presencia de Rho y baja de COX-2) y quiescente (baja presencia de Rho y elevada de COX-2), teniendo en la rigidez del pulmón normal un fenotipo quiescente y la activación de fibroblastos en matriz rígida (Coward *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010; Gabasa *et al.*, 2013) (Fig. 3).



Fig. 3. Efecto de la rigidez de la matriz sobre COX-2/PGE₂. El aumento de la rigidez en el sustrato induce una disminución en la expresión de COX-2/PGE₂ en fibroblastos, dando como resultado un aumento en la proliferación de fibroblastos y mayor expresión de α -SMA (Modificado de *J. Cell Biol*, 2010; 190: 693–706).

Hidrogeles de poliacrilamida en el estudio de la FPI

Entre algunos de los materiales usados para experimentar los efectos mecánicos sobre los fibroblastos se encuentran las matrices 3D de colágena, hidrogeles de poliacrilamida, de silicón y polidimetilsiloxano (Jamney, 2009).

Se ha demostrado que la rigidez de sustratos adhesivos en el cultivo celular, como los hidrogeles de poliacrilamida, tiene un papel importante en la regulación de las respuestas biológica por parte de las células. La poliacrilamida es un polímero

hidrofílico sin carga, altamente flexible y con poca o nula afinidad por células o proteínas transmembranales. Debido a estas propiedades Pelham y Wang (1997) experimentaron por primera vez con este tipo de materiales en el cultivo de fibroblastos, creando los primeros geles de poliacrilamida (PA) con diferente grado de rigidez (por cambios relativos de concentración de acrilamida y bis-acrilamida) y cubiertos con colágena tipo I, con los cuales demostraron cambios en la motilidad y adhesión de los fibroblastos al sustrato de fibroblastos, según el módulo de rigidez en el que se crecieran. Por lo tanto, estos geles se han usado ampliamente en diversos experimentos de mecanotransducción para promover la propagación, diferenciación y dispersión de células adherentes en este tipo de geles (Frey y Wang, 2009; Pelham y Wang, 1997).

Liu (2010) usando hidrogel de poliacrilamida, realizaron ensayos con fibroblastos de humano y de ratón tratando de elucidar los efectos de la variación de la dureza de la matriz sobre la biología de fibroblastos pulmonares. En la línea CCL-15 observaron diferencias en el cambio de la morfología y acumulación de miofibroblastos en el transcurso de 120 h, en dosis dependiente de la rigidez del sustrato. Teniendo que en los módulos de rigidez de 20-50 kPa los fibroblastos se alineaban en remolinos paralelos en forma de huso como ocurre in vivo en focos de fibroblastos y en sustratos rígidos de cultivo celular. Mientras que en módulos de rigidez ligeramente mayores a las del pulmón normal, 0.5-3 kPa, observaron un punto de equilibrio entre migración celular, proliferación y muerte. También se observó que las características mecánicas propias de los pulmones normales por sí mismas, como la baja rigidez, protege contra la proliferación de miofibroblastos, incluso en presencia del factor profibrótico, TGF β -1, ya que no se observó un cambio en el patrón y acumulación de miofibroblastos. Aunado a estos resultados, se encontró un incremento en la expresión de procolagena I y la disminución en la expresión de la enzima colagenolítica MMP1, con el aumento de la rigidez. Estos descubrimientos demostraron un aumento en la síntesis de la matriz a través de la acción de señales mecánicas y cuando participa un factor soluble, TGF β -1, surge un

efecto sinérgico no sólo en la síntesis de matriz, también en la activación de miofibroblastos.

Balestrini (2012) ha reportado estudios sobre mecanosensitividad y FPI, haciendo uso de sustratos de silicona, donde menciona que los módulos elásticos de la mayoría de los tejidos normales muestran un rango de 0.5 a 15 kPa, mientras que en los fibróticos pueden ser de 10 a 100 veces más rígidos. Seleccionó el módulo elástico de 5 kPa para representar el tejido saludable o normal y el tejido fibroso con módulos de 25, 50 y 100 kPa, donde los 100 kPa representan la etapa final de fibrosis.

Su trabajo respalda que al crecer fibroblastos en superficies patológicamente rígidas (>16 kPa) se promueve la activación de miofibroblastos, mientras que al exponerlos a sustratos menos rígidos (5-10 kPa) existe una aguda pérdida del fenotipo de miofibroblasto. Según plantea, los fibroblastos mantienen una memoria mecánica, puesto que al pasarlos de sustratos suaves, en los cuales se crecieron por varias semanas, a sustratos de mayor rigidez, expresaban en menor proporción marcadores profibróticos (α -SMA en fibras de estrés y colágena tipo I), en comparación a aquellos cultivados durante varios días en sustratos de rigidez patológica, donde los fibroblastos expresaban en mayor proporción α -SMA y colágena tipo I, y posteriormente al pasarlos a un sustrato más suave, se mantenía el fenotipo de miofibroblasto. Además observó que con el incremento de la rigidez de la MEC (100 kPa), semejante al ocurridas durante etapas finales de la fibrosis, se daba una mayor proliferación de fibroblastos/miofibroblastos (Balestrini *et al.*, 2012).

OBJETIVO

Estudiar el efecto de la dureza de la matriz en fibroblastos derivados de pulmón de ratón.

Objetivos particulares

- Estandarizar los cultivos de fibroblastos de ratón en matrices de PA cubiertos con colágena tipo I, con módulos diferentes de rigidez; 20 kPa, 80 kPa y en vidrio (2 GPa).
- Evaluar si existen diferencias en la sobrevivencia de los fibroblastos cultivados en los hidrogeles con diferentes módulos de rigidez.
- Evaluar la expresión de α -SMA y COX-2 por medio Western Blot de los fibroblastos sembrados en los diferentes módulos de rigidez.

JUSTIFICACIÓN

Las propiedades mecánicas de la MEC, como la elasticidad, han demostrado ser un factor importante en la regulación de diversas funciones celulares. En la FPI existen alteraciones en la elasticidad de la MEC, aumentando la rigidez de los tejidos pulmonares debido a un depósito exacerbado de matriz extracelular por parte de los focos de fibroblastos/miofibroblastos, que se presentan como uno de los caracteres diagnósticos de este padecimiento. Las investigaciones de la mecánica de la MEC en FPI es muy escasa, por lo tanto este estudio se enfocó en observar qué efectos se presentan en fibroblastos pulmonares de ratón al cultivarlos en matrices de poliacrilamida con módulos de rigidez diferentes que pueden imitar características mecánicas cercanas a las fisiológicas, de mayor rigidez como en el tejido pulmonar en condiciones patológicas, y en superficies aún más rígidas como el vidrio (2GPa), que semeja las condiciones mecánicas que se tienen al cultivar células en modelos *in vitro* con cajas de cultivo de polietileno.

MÉTODO

Obtención de fibroblastos de pulmón

Para la obtención de fibroblastos de pulmón de ratón, con la previa aprobación del Comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se utilizaron nueve ratones de la cepa C57BL6 con 8 semanas de edad, sacrificándolos por medio de una dosis de 500 μ l del anestésico pentobarbital sódico al 10%tribromoetanol, diluido en una solución inyectable, por la vía intraperitoneal.

Se hizo una incisión en el área cercana al diafragma para abrir la cavidad torácica y se realizó un corte transversal a la tráquea para retirar los dos pulmones, los cuales se lavaron con agua estéril, y se colocaron en una caja Petri. Sobre la base de la caja Petri, los pulmones fueron cortados en fragmentos menores a 0.5 mm, usando tijeras de disección. Al pulmón cortado se le agregaron 2.5 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, USA), y se homogeneizó con una pipeta para colocarlo en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml, a esto se le adicionaron 2.5 ml de tripsina/EDTA 1X (Sigma, MD, USA) para disgregar a las células que conforman al tejido pulmonar. Los tubos se incubaron en baño María a 37 °C mezclando por inversión cada 5 minutos hasta completar 20 minutos totales.

Cumplido este periodo de tiempo se detuvo la reacción de la tripsina con 5 ml del medio DMEM con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 1 500 r.p.m. para retirar la tripsina. El sobrenadante, resultado de la centrifugación, fue desechado, mientras que el botón se resuspendió en medio DMEM con SFB al 10%. El botón resuspendido se filtró con gasas estériles para separar las células de los fragmentos de pulmón o explantes.

Tanto los explantes como las células provenientes de la filtración se sembraron por separado en cajas de 6 pozos y una vez que los fibroblastos llegaron a confluencia en las cajas de 6 pozos, se despegaron de la caja usando tripsina y se sembraron en cajas de cultivo de 25 cm² (Corning, NY, USA).

Módulos de rigidez

Se realizaron hidrogeles de poliacrilamida con diferentes módulos de rigidez, cambiando las concentraciones de las soluciones stock de acrilamida al 40% y bisacrilamida al 2% (Sigma). Se fabricaron hidrogeles de 2, 20 y 80 kPa, de entre los cuales se eligió como módulo de rigidez representativa del pulmón fibrótico (>16 kPa) al de 80 kPa, y 20 kPa como la más próxima a un pulmón en condición fisiológica saludable (0.5-11 kPa) (Mariappan et al., 2001; Liu et al., 2010; Huang, 2012; Goffin et al., 2006; Balestrini *et al.*, 2012), ya que los hidrogeles con módulos menores a esta rigidez resultaron complicadas para trabajar en cultivo, como se profundiza más adelante en los resultados. Además de los hidrogeles se usaron cubreobjetos de vidrio para sembrar en ellos fibroblastos, los cuales cuentan con una rigidez próxima a los 2 gigapascales (GPa) (Das *et al.*, 2013), usándolos como representantes de un modelo de estudio celular *in vitro* más común, como los que se realizan en cajas de cultivo de polietileno, con también 2 GPa de módulo de rigidez (Balestrini *et al.*, 2012). Posteriormente la rigidez de los hidrogeles fue validada por medio de un ensayo de elasticidad, obteniendo valores diferentes a los esperados para cada módulo de elasticidad (ver resultados).

Una vez determinados los módulos de elasticidad se fabricaron las mezclas de acrilamida, bis-acrilamida y agua, formando una mezcla para poder realizar los hidrogeles por triplicado, y así mismo para el vidrio. Para los hidrogeles de 20 kPa se usaron 400 µl de acrilamida al 40%, 264 µl de bis-acrilamida al 2% y 1336 µl de agua, mientras que para los hidrogeles de 80 kPa se usaron 800 µl de acrilamida al

40%, 560 μ l de bis-acrilamida y 640 μ l de agua, según las proporciones reportadas por Tse y Engler (2010). Los cálculos para los hidrogeles de 80 kPa se hicieron a partir de una relación de las concentraciones de acrilamida-bisacrilamida usadas para la fabricación de los hidrogeles de 40 kPa, calculando las concentraciones necesarias de cada reactivo para duplicar la rigidez del hidrogel.

Preparación de cubreobjetos

Los portaobjetos que se usaron para la fabricación de los hidrogeles se trataron con 100 μ l de Dimethyldichlorosilane (DCDMS) (Aldrich chemistry, USA), dispersándolo sobre la superficie por un minuto y retirando el exceso para que los hidrogeles de PA polimerizados se deslizaran fácilmente por la superficie del portaobjetos. En el caso de los cubreobjetos (Fisher scientific), se usaron tres por cada módulo de rigidez, primero se expusieron a luz UV en el aparato UV/Ozone Procleaner™ Plus (Bioforce Nanosciences), para favorecer la adhesión de la mezcla de PA al cubreobjetos. Posteriormente se colocaron en una caja de Petri con una solución de 100 μ l de 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (Silano) (Sigma-Aldrich, USA), 600 μ l de ácido acético (1:10) y 20 ml de etanol durante 5 minutos para favorecer la adhesión del gel de poliacrilamida al cubreobjetos. Pasado el tiempo se colocaron en otra caja de Petri con etanol por un lapso de tres minutos para después limpiarlos con Kimwipes (Kimtech science, Canadá).

Fabricación de hidrogeles

Cuando estuvieron listos los cubreobjetos y los portaobjetos, se adicionó a 500 μ l de la mezcla de PA, 6 μ l de persulfato de amonio (APS) (Bio-Rad, Japón) y 0.6 μ l de Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad, Japón) para catalizar la reacción de polimerización. De esta mezcla se colocó 25 μ l sobre cada uno de los

portaobjetos (**Fig. 4a**) y sobre cada gota un cubreobjetos (**Fig. 4b**). Posteriormente se dejó polimerizar por 20 minutos y se retiraron los cubreobjetos con el hidrogel adherido a estos, deslizando el hidrogel teniendo como base el cubreobjetos (**Fig. 4c**). En cada uno de los pozos, de una caja de seis pozos (Costar) con un área de 9.6 cm², se colocaron los cubreobjetos con el hidrogel hacia arriba, trabajando dentro de la campana de flujo laminar (**Fig. 4d**).

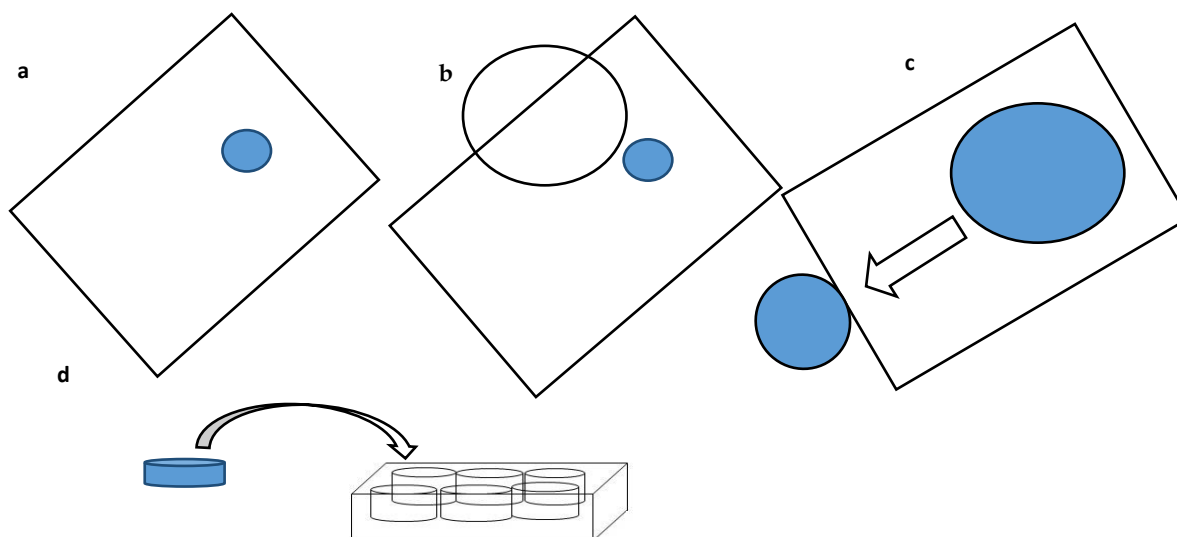


Fig. 4. Esquema de la elaboración de los hidrogel. Para cualquiera de los dos módulos de rigidez el procedimiento fue el mismo.

Ya en las cajas de seis pozos se hizo un lavado con buffer fosfato salino (PBS), se retiró y se trataron los hidrogel con 1 ml de una solución de sulfo-SANPAH 1x (Sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate) en HEPES al 0.05 M en agua destilada (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Calbiochem, Taiwan) a una concentración de 0.2 mg/ml, en cada pozo, y se expusieron a luz UV en un transiluminador por 10 minutos, para promover la unión de las moléculas de colágena al hidrogel puesto que el sulfo-SANPAH es un agente reticulante que contiene un grupo *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) el cual reacciona con aminas primarias y un grupo nitrofenil azida, reactivo a grupos amino a una longitud de onda de 320-350nm. Pasado el tiempo, se retiró el sulfo-

SANPAH 1x y se hicieron los lavados con HEPES y PBS, tres veces con cada uno de estos buffers. Al finalizar con los lavados se puso 1.5 ml de colágena a una concentración de 0.1 mg/ml, diluida en HEPES en cada uno de los hidrogeles, y se dejó incubar toda la noche a 37° C para permitir que la colágena polimerizara (<http://www.proteochem.com/sulfosanpahcrosslinker100mg-p-102.html>).

Al día siguiente se retira el exceso de colágena y se repiten los tres lavados con HEPES y PBS. Se esterilizaron los hidrogeles por 20 minutos bajo luz UV teniendo a los hidrogeles en el PBS del último lavado. Posterior a esto, se contaron en el Countess automated cell counter (life technologies) los fibroblastos de ratón para cada pozo y se sembraron 100 000 células usando medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Auckland, NZ).

Comprobación de los módulos de rigidez

Se comprobó la rigidez esperada de los hidrogeles de poli(acrilamida), usados en experimentación, por medio del Miniprobador mecánico para ensayos de tracción uniaxial, en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la UNAM.

Para el ensayo de tracción uniaxial se realizaron hidrogeles de 20 y 80 kPa a mayor escala, hechos con vidrios y bases de electroforesis (Biorad), manteniendo las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida propia de cada rigidez, para poder obtener probetas (muestra en la cual se prueba una cualidad mecánica) del tamaño necesario para poder realizar el ensayo, las cuales se obtuvieron al cortar los hidrogeles con un suaje (herramienta fabricada a base de una placa de acero con filo de un lado).

Se midió el espesor transversal (t) en varios puntos, a lo largo de las probetas de 20 y 80 kPa, por triplicado. De los duplicados de las probetas de 20 kPa (Probetas 1 y 2) y los triplicados de las probetas de 80 kPa (Probetas 1, 2 y 3), se promediaron los espesores transversales ($t\bar{X}$) y se multiplicaron por el ancho de las probetas (4.85

cm) (Tablas 1 y 2). Cuando se tuvieron las áreas, se procedió a colocar las probetas entre las mordazas para iniciar con el ensayo.

Tabla 1

Probetas de 20 kPa	Espesores (ξ) (cm)	Promedio de espesores ($\xi\bar{X}$) (cm)	de Área (m^2)
1	0.78, 0.60, 0.55, 0.65, 0.58, 0.63	0.63	0.030
2*	0.57, 0.55, 0.53, 0.52, 0.51	0.53	0.026
3	0.55, 0.64, 0.60, 0.66	0.61	0.029

Tabla 2

Probetas de 80 kPa	Espesores (ξ) (cm)	Promedio de espesores ($\xi\bar{X}$) (cm)	de Área (m^2)
1	0.64, 0.60, 0.60, 0.65	0.63	0.030
2	0.81, 0.65, 0.55, 0.60, 0.60	0.64	0.031
3	0.69, 0.66, 0.68, 0.68, 0.66	0.67	0.032

Tablas 1 y 2. Espesores y áreas obtenidas para cada probeta. Se hicieron triplicados para las probetas de 20 y 80 kPa, en cada probeta se tomaron varias mediciones del espesor a lo largo de las probetas de PA. Los valores del espesor se multiplicaron por el ancho del suaje (4.85 cm) para determinar el área. La probeta 2* con módulo de rigidez esperado de 20 kPa no pudo ser usada durante el ensayo dado que debido a su labilidad se rompió durante su manipulación.

El ensayo de tracción uniaxial consistió en determinar los módulos de Young o módulos de elasticidad dados en kPa, al medir la deformación del polímero cuando se aplica un esfuerzo sobre las probetas, provocando una deformación en el polímero debido a una tracción longitudinal con incrementos constantes de fuerza conocidos, donde el sensor de desplazamiento se encargó de medir y reportar los valores de desplazamiento longitudinal hasta conseguir la fractura de

la probeta. La función de la celda de carga fue la de convertir la deformación del hidrogel en señales eléctricas, que fueron interpretadas por el programa de tensión uniaxial, instalado en la computadora del miniprobador mecánico de tensión uniaxial. Para los cálculos de la rigidez, también se consideró el área y la velocidad de deformación del polímero de PA (0.16 mm/s).

Con todos los datos colectados en el programa de tensión uniaxial, se graficó una recta, a partir de la cual se calculó la pendiente y así se obtuvieron los módulos de rigidez de los duplicados de las probetas de 20 kPa y los triplicados de 80 kPa, los cuales se promediaron para obtener un resultado final (**Fig. 5**).

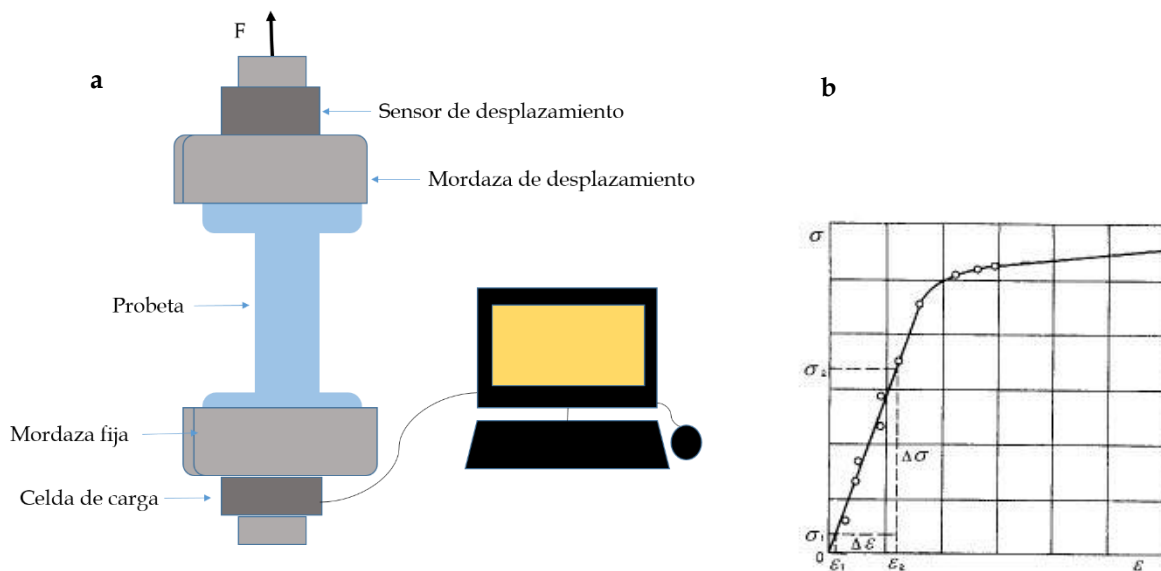


Fig. 5. Ensayo de tracción uniaxial. Esquema del miniprobador mecánico para ensayos de tracción uniaxial (a), en el cual la flecha indica la dirección de la fuerza de tracción ejercida sobre el hidrogel a una velocidad de deformación de 0.16 mm/s, hasta conseguir romperlo por la tensión ejercida. La deformación de la probeta se registró y procesó en el programa de tracción uniaxial, generando una curva (b), de la cual se calculó la pendiente de la recta para poder obtener los módulos de Young o de elasticidad.

Conteo celular

Se realizó conteo celular para sembrar 100 000 fibroblastos sobre cada hidrogel y posterior a las 24 y 72 h de cultivo para saber si la sobrevivencia de los fibroblastos se había afectado al ser cultivados sobre los hidrogeles con diferentes módulos de rigidez. Los fibroblastos de ratón cultivados en cajas de cultivo de 25 cm² se desprendieron de la superficie por medio enzimático (tripsina-EDTA 1x), se centrifugaron por 5 minutos a 2 440 g y cuando se retiró el sobrenadante, el botón de células se resuspendió en 400 µl de medio DMEM con SFB al 10% por cada caja de cultivo de 25 cm² confluyente, y se tomaron 10 µl de los fibroblastos resuspendidos colocándolos en un nuevo tubo con 10 µl de azul tripano, homogeneizando la mezcla con la micropipeta y tomando 10 µl para su posterior colocación en una placa del Countess para realizar el conteo de manera automática.

Siembra de fibroblastos sobre los hidrogeles

Al tener el número de fibroblastos por caja T-25 se hizo el cálculo según el número de células totales por mililitro y número de células vivas, para poder colocar un número igual de fibroblastos en cada hidrogel, el cual fue de 100 000 células por cada hidrogel, teniendo triplicados para cada condición (20 kPa, 80 kPa y vidrio). Para mantener todos los fibroblastos sembrados sobre el hidrogel, se tomaron aproximadamente 100 µl del medio con el número de fibroblastos establecido y se colocaron sobre la superficie del hidrogel tratando de que fuera homogéneo. Pasados 15 minutos para permitir que las células se adhirieran a la superficie del hidrogel, se colocaron cuidadosamente 2 ml de medio DMEM con SFB al 10% y se monitorearon durante los siguientes 3 días, cambiando el medio y tomando fotografías de cada hidrogel con los objetivos 10x y 20x del microscopio.

Los fibroblastos sembrados en sobre los hidrogeles de poliacrilamida se cultivaron de la misma manera que en las cajas de cultivo de 25 cm², en la incubadora (Thermo scientific) a 37 °C, con una humedad relativa del 95% y 5% de CO₂. Con 2 ml de medio DMEM con SFB al 10% por hidrogel.

Extracción de proteínas

A partir de los fibroblastos pulmonares de ratón que se sembraron sobre los hidrogeles de 29 kPa y 163 kPa, y del vidrio, se extrajo proteína usando buffer RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Tris-HCL 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, Igepal 1.0%, desoxicolato de sodio 0.5%, sodio duodecil sulfato 0.1%) (Sigma, USA) como a continuación se describe. Primero se despegaron los fibroblastos de los hidrogeles usando tripsina/EDTA 1x, los fibroblastos correspondientes a cada uno de los tratamientos fueron colocados en tubos cónicos de 1.5ml diferentes para ser centrifugados a 300 g durante 6 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 150 µl del medio DMEM con SFB al 10%, para los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles de 29 kPa y 200 µl para los cultivados sobre los hidrogeles de 163 kPa y vidrio, para tener un número suficiente de fibroblastos en la alícuota tomada para el conteo celular. Se observaban una densidad ligeramente mayor en 163 kPa y vidrio, por lo tanto se decidió colocar 50 µl más para los fibroblastos cultivados en estas dos matrices. De las células resuspendidas se tomó una alícuota de 10 µl para el conteo celular. El resto de los fibroblastos se pasaron a un tubo Eppendorf de 0.5 ml para ser nuevamente centrifugados bajo las condiciones anteriores y así poder retirar el medio. Posterior a esto, el botón se resuspendió en 35 µl de buffer RIPA con inhibidores de fosfatasa Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (solución de Dimetil sulfoxido, cantaridina, oxalato de bromolevamisol, Caliculina A) (Sigma, USA) hasta homogeneizar con micropipeta. Para retirar los restos celulares se volvió a centrifugar a 12 000 rpm por 5 minutos.

El sobrenadante con las proteínas se colocó en un nuevo tubo y se almacenó a -80°C para utilizarlo posteriormente.

Western Blot

Para la electroforesis se realizaron geles de acrilamida-bis-acrilamida, para determinar la presencia de COX-2, proteína con un peso molecular de 70-72 kDa se usaron geles al 8%, y del 12% para la electroforesis de α -SMA, cuyo peso molecular es de 42 kDa. Se usó β -tubulina como control de carga. Se montaron muestras de cada triplicado para cada condición (29 kPa, 163 kPa y vidrio), teniendo nueve muestras más el marcador de pesos moleculares (Gibco). El voltaje utilizado durante la electroforesis fue de 160 Volts por 1 hora.

Una vez finalizada la electroforesis, se hizo la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa en cámara semi-húmeda (Biorad) por 25 minutos a 16 V. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche para bloquear Blotting-Grade Blocker (Calbiochem) al 5% en TBS-T 5%, para evitar la unión del anticuerpo a sitios inespecíficos. Después de bloquear la membrana, se colocó para cada membrana el respectivo anticuerpo primario de acuerdo a la proteína buscada; usando una concentración de 0.4 ng/ml para el anti-COX-2 (Abcam), 180 ng/ml para anti- α -SMA y para β -tubulina con 200 ng/ml, en diluyente para anticuerpo Antibody Diluent Reagent Solution (Invitrogene). Se dejó incubar toda la noche y al día siguiente después de los lavados correspondientes con TBS-T al 0.1%, y se colocó el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) con una concentración de 6.43 ng/ml para anti-COX-2 y anti- β -tubulina. Para anti- α -SMA se usó el anticuerpo policlonal anti-mouse a una concentración de 3 ng/ml. Se dejó incubando por una hora y después se realizaron dos lavados con TBS-T al 0.1% y uno final con TBS, cada uno de 10 minutos.

Se revelaron las membranas en el Chemidoc TM XRS+ system (Biorad), con el kit Immobilon TM Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore, USA) según las especificaciones del fabricante.

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos obtenidos en el conteo del número de fibroblastos pulmonares de ratón que permanecían adheridos a los hidrogeles de 29 kPa y 163 kPa y al vidrio, a las 24 y 72 h de cultivo, se realizó en Excel, promediando el número de fibroblastos contenidos en cada uno de los triplicados de los hidrogeles y el vidrio, a las 24 y 72 h. Las gráficas y el análisis estadístico se hicieron en el programa Graph Pad Prism 6, reportando medias del número total más el error estándar y se usó el análisis de varianza ANOVA dos vías, como prueba estadística, manejando una $n=3$.

Para realizar los cálculos de la expresión relativa de α -SMA y COX-2 con respecto a β -tubulina se hicieron las densitometrías correspondientes a las bandas de cada western blot; de α -SMA, COX-2 y β -tubulina en el programa Quantity One de Biorad. Con los datos de las densitometrías, en Excel se calcularon las densidades relativas, dividiendo las densidades de las proteínas problemas sobre la proteína constitutiva α -tubulina. En el programa Graph Pad Prism 6 se realizaron las gráficas, reportando las medias con su correspondiente desviación estándar y se usó ANOVA de una vía.

RESULTADOS

Validación de los módulos de rigidez de los hidrogeles

De acuerdo a las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida reportadas por Tse y Engler (2010) se fabricaron los hidrogeles de PA de 20 y de 80 kPa, usando las concentraciones reportadas de 40 kPa como base para obtener módulos de mayor rigidez (80 kPa).

Usando el Miniprobador de tracción uniaxial del IIM, UNAM, se realizó un ensayo de elasticidad para validar los valores elegidos de los hidrogeles a trabajar; de 20 y de 80 kPa (**Fig. 6**).

Los resultados obtenidos mediante este ensayo fueron diferentes a lo esperado para ambos módulos: En el caso del de 20 kPa el resultado fue de 29 kPa y en el caso del de 80 kPa el resultado fue de 163 kPa. Ambos módulos de rigidez, resultado del ensayo, demostraron ser diferentes entre ellos, por lo cual se siguieron usando las mismas concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida para la fabricación de los hidrogeles, pero considerando los nuevos valores dados por el ensayo (**Tabla 3**).

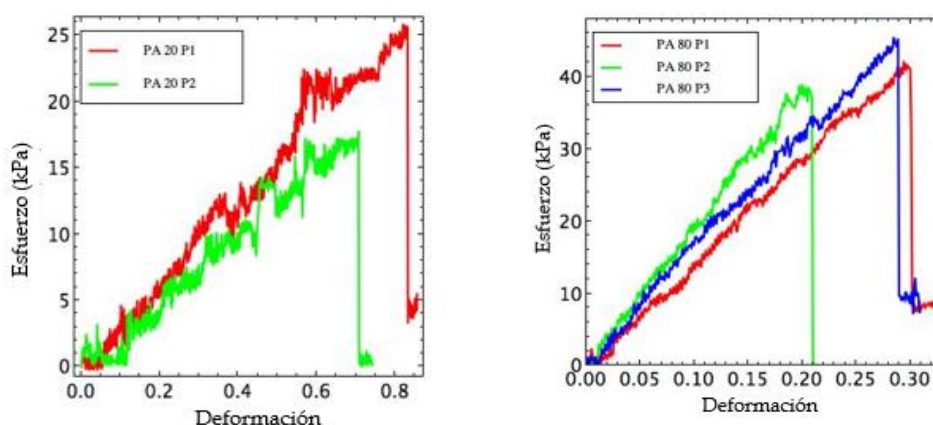


Fig. 6. Gráficas de los módulos de rigidez. Se promediaron las pendientes de las rectas que se graficaron a partir de los duplicados de 20 kPa y los triplicados de 80 kPa durante el ensayo de tracción uniaxial para obtener los módulos de Young de los hidrogeles.

Módulo de rigidez esperado (kPa)	Módulo de rigidez obtenido (kPa)
20	29
80	163

Tabla 3. Se muestra la rigidez esperada y obtenida de los hidrogeles usados en experimentación. En la columna de la izquierda se muestran los módulos de rigidez esperados, de acuerdo a lo citado en literatura y en la columna de la derecha, los módulos de rigidez obtenidos en el ensayo de tracción uniaxial.

Estandarización de cultivo de fibroblastos en hidrogeles de poliacrilamida

Para la estandarización del cultivo se usaron fibroblastos de ratón C57BL6 de 8 semanas de edad. En un inicio se probaron diferentes módulos de rigidez; 2, 20 y 80 kPa, pero se observó que a las 24 h la gran mayoría de los fibroblastos no sobrevivían en las matrices de baja rigidez (2 kPa), por lo que se decidió hacer el estudio usando matrices de 20 kPa y 80 kPa (29 kPa y 163 kPa) cubiertas con colágena tipo I. Además de los hidrogeles con módulos de rigidez distinta, se usaron cubreobjetos también cubiertos con colágena tipo I, tratando de representar los efectos que se tiene al experimentar con células en condiciones habituales de siembra *in vitro*, es decir, con una rigidez de 2 GPa. Durante los diversos experimentos se sembraron 100 000 células, número suficiente para poder extraer proteína de ellos y así poder realizar análisis por western blot.

Los fibroblastos de ratón pasaje 6 y 7 mostraron ser metodológicamente los más convenientes para ser cultivados en las matrices de PA, debido a que los fibroblastos de pasaje más elevado, pasaje 11, mostraban una reducción considerable en la cantidad de células adheridas sobre los hidrogeles de 29 kPa, a las 72 h (**Fig. 7**). En una prueba que se realizó con fibroblastos de pasaje más temprano, pasaje 6, las células lograron permanecer adheridas hasta por 120 h

sobre los hidrogeles, aunque el número de fibroblastos se seguía viendo afectado con el paso del tiempo. Por lo anterior se optó por usar fibroblastos de pasajes tempranos, pasajes 6 y 7, y por reducir el tiempo de cultivo a 24 y 72 h.

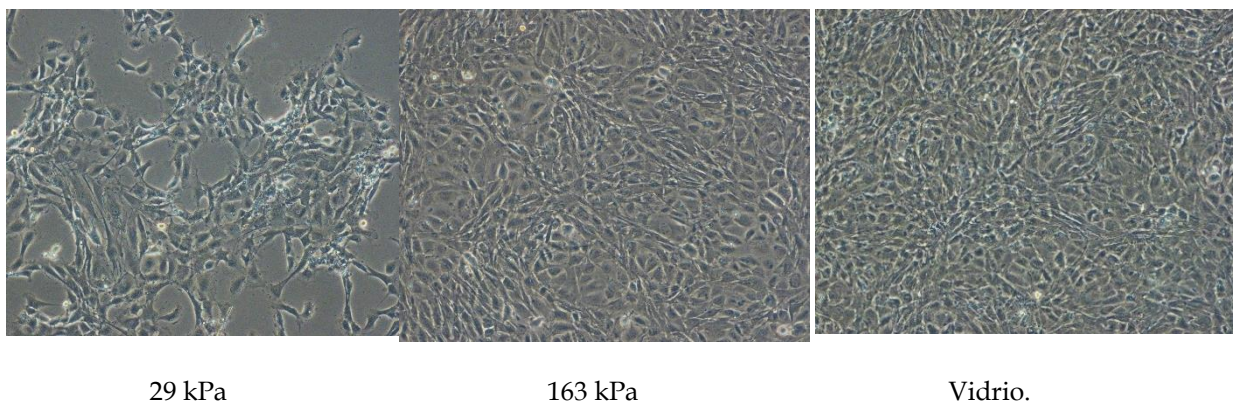
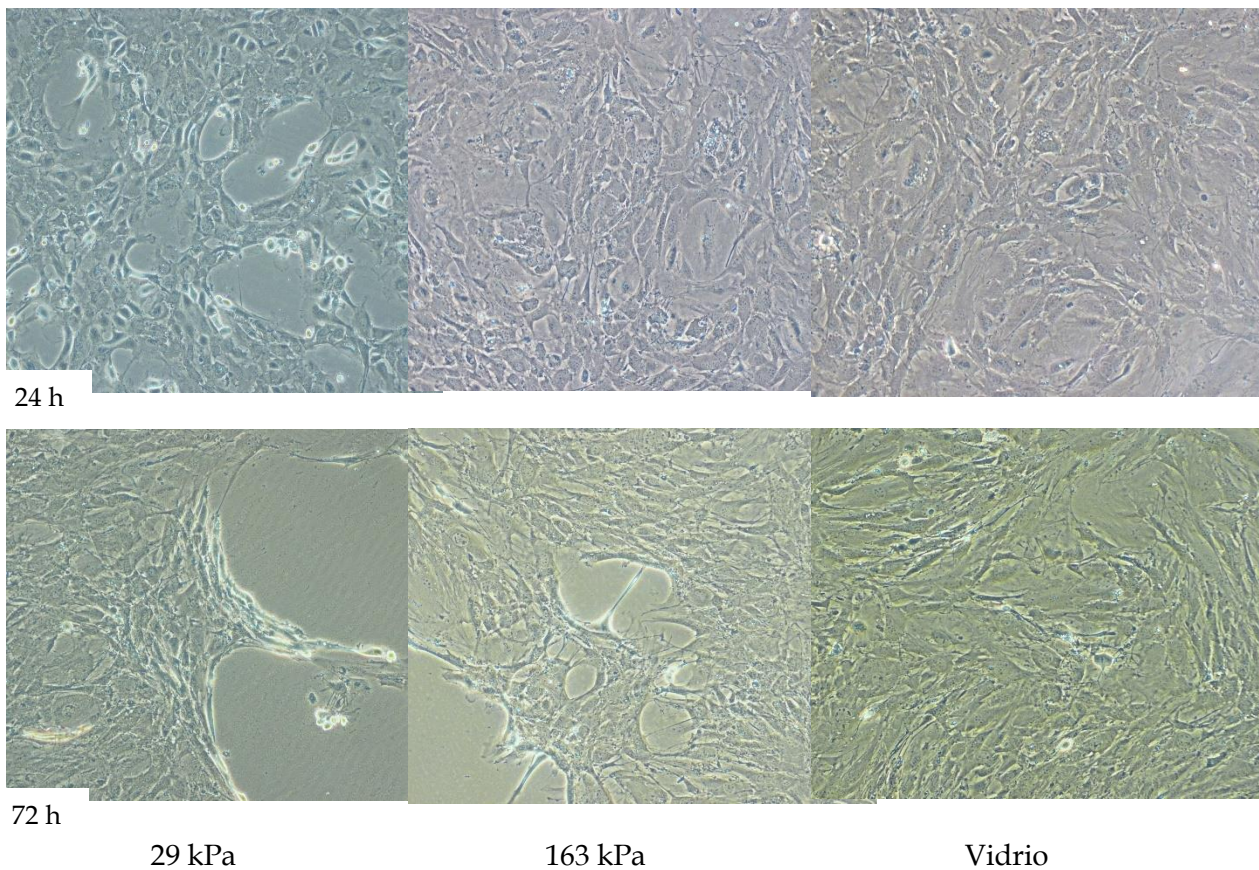


Fig. 7. Fibroblastos pulmonares de ratón pasaje 11 cultivados 72 h sobre hidrogeles de 29, 163 kPa y vidrio. Se observa un menos número de fibroblastos sobre los hidrogeles de 29 kPa, a diferencia de lo que ocurre en los hidrogeles de 163 kPa.

Se sembraron fibroblastos de ratón de pasajes 6 y 7, durante 24 y 72 h sobre hidrogeles de 29 kPa, 163 kPa y vidrio, por triplicado y repitiendo los experimentos tres veces de manera independiente. Lo que se observó en todos los experimentos realizados, fue que en las matrices de 29 y 163 kPa se formaron espacios en el continuo de los fibroblastos sembrados. A las 24 h se podía observar sobre la aparición de espacios entre los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles de 29 kPa. A las 72 h, sobre las matrices de 29 kPa, los espacios aumentaban su número y diámetro, mientras que sobre los hidrogeles de 163 kPa, comenzaban a aparecer. Tales espacios iban incrementando en número en diversas regiones del cultivo con el tiempo, disminuyendo el área de los fibroblastos sobre los hidrogeles, principalmente de 29 kPa. En el vidrio no se registró la formación de estos espacios (**Fig. 8**).

Según la observación realizada, los espacios entre lo fibroblastos ocurrían con mayor frecuencia en las periferias del cultivo y en menor proporción en las zonas

centrales. La formación de los espacios se daba por la separación entre algunos fibroblastos y a su desprendimiento de la matriz, aunque permanecían adheridos a



otros fibroblastos que seguían anclados a la matriz.

Fig. 8. Fibroblastos pulmonares de ratón a las 24 y 72 h sobre hidrogeles de 29 kPa, 163 kPa, y vidrio. A las 24 h se pudo observar el inicio de la formación de pequeños espacios entre los fibroblastos sobre los hidrogeles de 29 kPa y a las 72 h se vio un aumento en el número y longitud de dichos espacios en los hidrogeles de 29 kPa y la aparición de dichos espacios entre los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles de 163 kPa.

Número de fibroblastos en diferentes módulos de rigidez

En el conteo del número de fibroblastos pasaje 6 y 7, se observó que no existen diferencias en el número de fibroblastos cultivados por 24 y 72 h, en los módulos de rigidez usados; 29 kPa, 163 kPa y vidrio. También se puede observar una tendencia en el aumento de fibroblastos a las 72 h con respecto a su basal. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías; $P = 0.2065$ (Fig. 9).

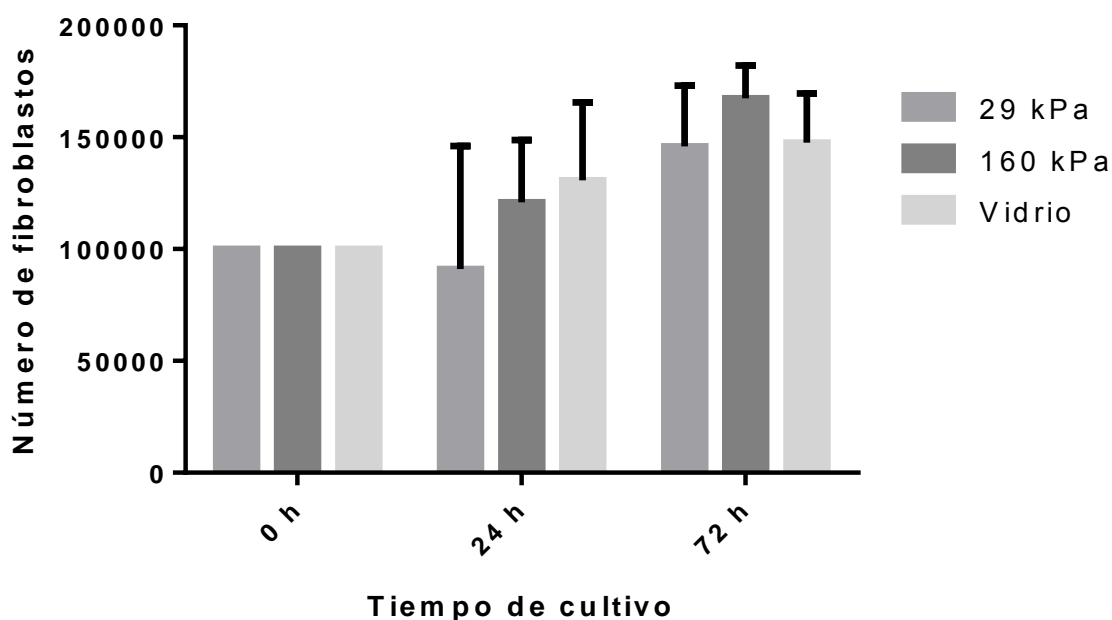


Fig. 9. Número de fibroblastos cultivados por 24 y 72 h. Se cultivaron 100 000 fibroblastos de ratón sobre matrices de hidrogel de 29 kPa, 163 kPa y vidrio. A las 0 h se tienen los 100 000 fibroblastos sembrados y a las 24 y 72 h se contabilizó el número de fibroblastos en cada una de las matrices. No se observan diferencias significativas entre los grupos, según el análisis por ANOVA de dos vías que se realizó. $P = 0.2065$.

Western Blot de α -SMA y COX-2

Se realizaron western blot para analizar la expresión de las proteínas α -SMA y COX-2 y se usó como control de carga a β -tubulina. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de α -SMA a las 72 h mediante el análisis por ANOVA de una vía que se realizó; $P = 0.2252$ (Fig. 10). Se observa una tendencia a un aumento de esta proteína en los fibroblastos crecidos sobre vidrio con respecto

a los que crecieron en los hidrogeles de 29 y 163 sin llegar a ser significativo (**Fig. 14**).

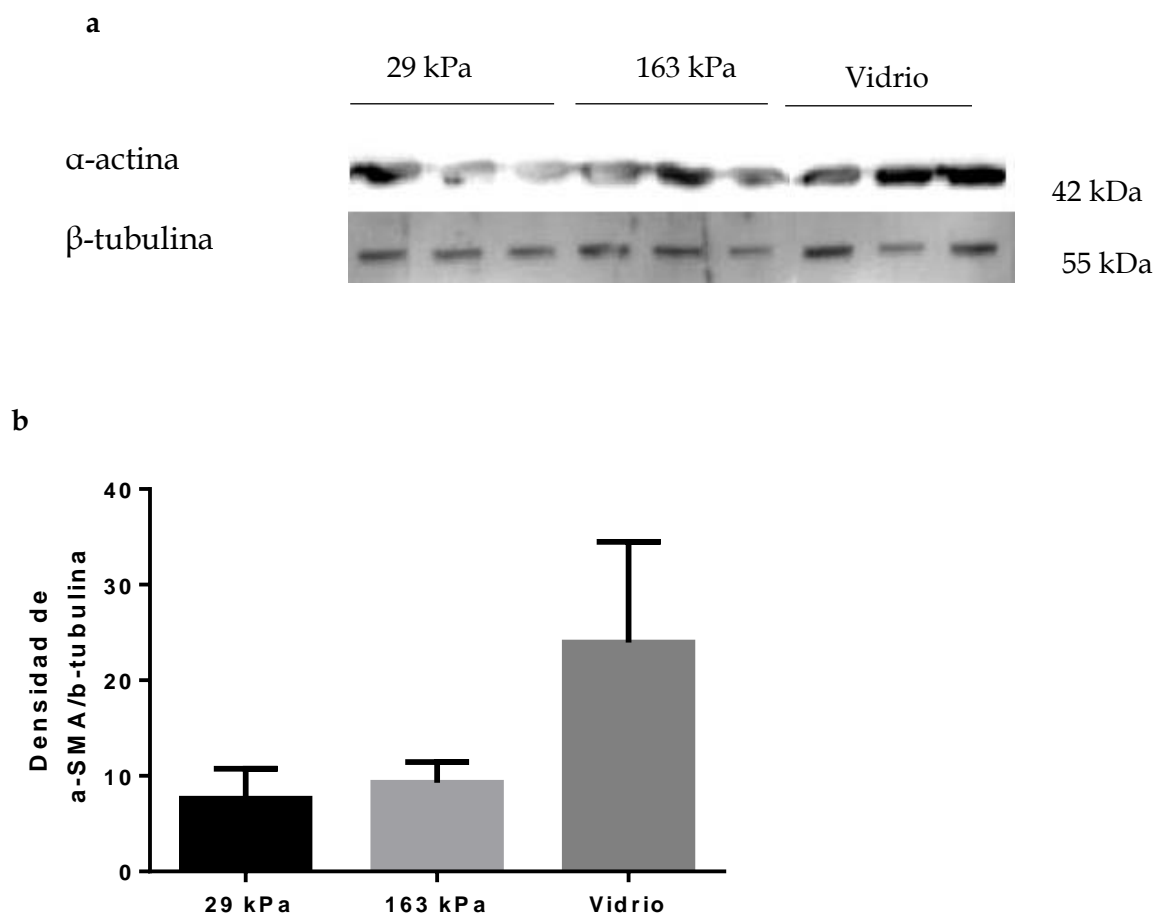


Fig. 10. Expresión de α -SMA/ β -tubulina. a) Western blot representativo de la expresión de α -SMA a las 72 h. **b)** No existen diferencias significativas en cuanto a la expresión del marcador de miofibroblastos, α -SMA entre los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles de 29 kPa, 163 kPa y vidrio, según el análisis de ANOVA de una vía que se realizó; $P=0.2252$. Sin embargo, existe una mayor cantidad de esta proteína en los fibroblastos cultivados en vidrio.

Para el western blot de COX-2 también se utilizó como control de carga a β -tubulina. Se usaron fibroblastos cultivados durante 72 h en matrices de hidrogel de 29, y 163 kPa y sobre vidrio. El análisis estadístico ANOVA de una vía no mostró diferencias, teniendo un valor de $P= 0.2680$. Los resultados obtenidos no son

compatibles con lo visto en literatura (Liu *et al.*, 2010), en donde se señala que esta enzima disminuye su expresión por parte de los fibroblastos al haber mayor tensión mecánica o rigidez de la matriz en biopsias de pacientes con FPI. Caso contrario, a pesar de que no es un resultado significativo, se aprecia una mayor expresión de COX-2 en la matriz de vidrio. En cuanto a las matrices de 29 kPa y 163 kPa, hay una diferencia mínima en cuanto a la expresión entre ambas matrices de COX-2, en las que se aprecia una reducción en el hidrogel de 163 kPa con respecto a 29 kPa, cuyo dato va según lo esperado (Liu *et al.*, 2010) (**Fig. 11**).

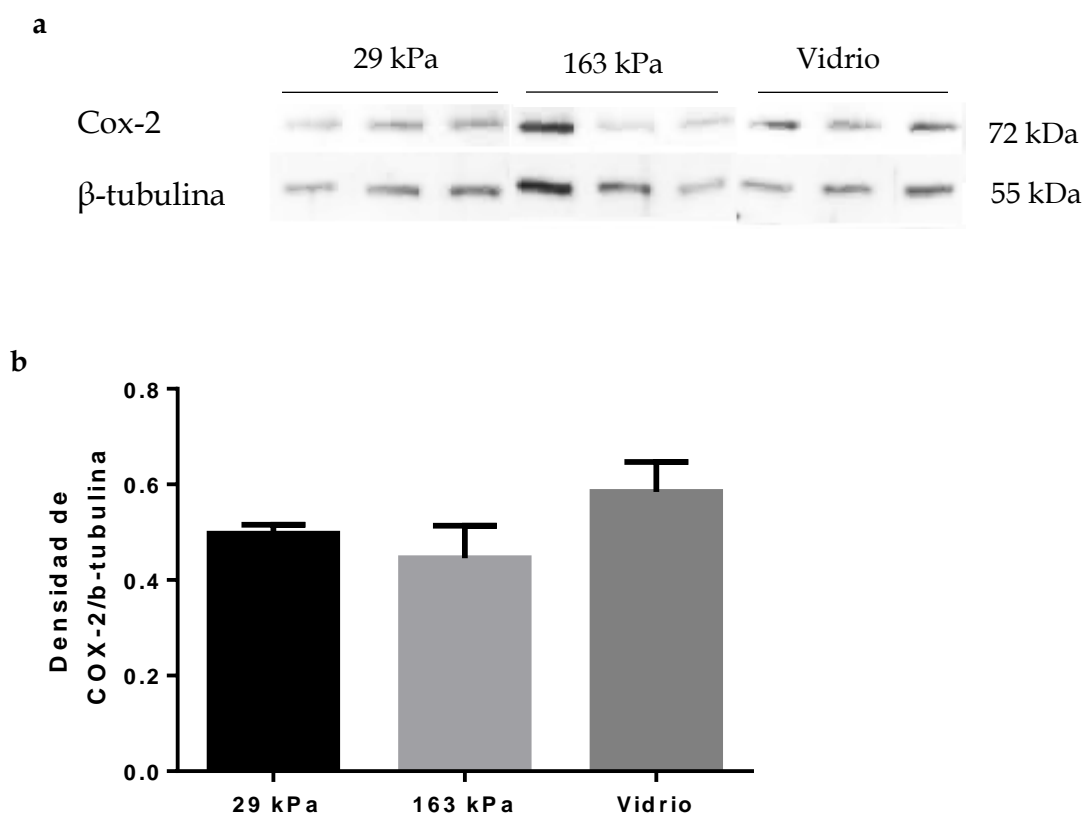


Figura. 11. Expresión de COX-2/ β -tubulina. **a)** Western blot representativo de la expresión de COX-2 a las 72 h en fibroblastos de ratón cultivados sobre los hidrogeles de 29 kPa, 163 kPa y vidrio. **b)** No se observan diferencias significativas en la expresión de COX-2 de acuerdo a la prueba ANOVA de una vía que se realizó; $P=0.2680$.

Discusión y conclusiones

Los miofibroblastos tienen funciones esenciales en la producción y remodelación de la MEC y son fundamentales en la cicatrización de heridas en todos los tejidos y órganos, pero cuando se presenta el desarrollo de una patología como la FPI, la cicatrización en el pulmón no ocurre de manera normal frente al daño, existiendo una remodelación aberrante del parénquima pulmonar, producida por focos de fibroblastos/miofibroblastos, los cuales secretan moléculas de la MEC de manera exacerbada, promoviendo el aumento de la rigidez del pulmón y la activación de miofibroblastos, los cuales se perpetúan en el sitio del daño (King *et al*, 2011).

Los fibroblastos, son capaces de llevar a cabo el proceso de mecanotransducción, percibiendo el estrés mecánico de la MEC, por medio de proteínas como las integrinas, las cuales propagan el estímulo del estrés mecánico al interior de la célula, activando vías de señalización específicas y regulando la expresión génica. Cuando se ve alterada la rigidez del tejido, la transcripción de diversos genes ligados a la mecanotransducción también se ve afectada, ya sea aumentando o disminuyendo su expresión, alterando así, diversos procesos celulares (Liu *et al.*, 2010).

Debido a que la rigidez de la MEC tiene una función esencial en el desarrollo de enfermedades fibrosantes, como la FPI, el considerar el factor mecánico en los ensayos *in vitro*, podría ser un buen acercamiento para lograr reproducir el ambiente pulmonar y los procesos celulares involucrados en la FPI.

Al tratar de validar los módulos de rigidez seleccionados, los resultados obtenidos fueron diferentes a lo esperado, sobre todo en el caso de los hidrogeles de 80 kPa. Probablemente esta variación se debe a que no se usaron exactamente los mismos reactivos que se mencionan en la literatura, ni el mismo método de cuantificación de la rigidez (Tse y Engler, 2010) y que las concentraciones para el módulo de 80 kPa no se encontraban reportadas en el artículo, por lo que se tuvo que realizar una

relación tomando como base las concentraciones reportadas en los hidrogeles de 40 kPa, siendo este un método poco eficaz para lograr obtener la rigidez deseada. Se determinó el seguir usando los hidrogeles de 29 y 163 kPa pues mostraban diferencia en su grado de rigidez, para así permitir la comparación entre los fibroblastos cultivados sobre ellos.

Los resultados no se muestran pero se intentó medir la rigidez de hidrogeles de 2 kPa, pero su elasticidad era tan alta que no se pudo completar el ensayo, ya que la probeta no alcanzó a romperse, paso necesario para el cálculo de su rigidez. Por lo anterior no se lograron coleccionar datos que respaldaran la rigidez de este sustrato por medio del miniprobador mecánico para ensayos de tracción uniaxial.

A lo largo de todos los experimentos realizados en los hidrogeles de 29 y 163 kPa con los fibroblastos de pasaje 6 y 7, se dio la formación de espacios entre en el continuo de los fibroblastos, aunque este dato no es cuantitativo, se puede decir que en los hidrogeles de 29 kPa los espacios se presentaban con mayor frecuencia, y con el paso del tiempo la presencia de estos espacios era más evidente. Es importante mencionar que no se observaron espacios entre los fibroblastos cultivados sobre vidrio, el cual tiene una rigidez igual a la de las cajas de polietileno (2 GPa).

Según las observaciones realizadas, no se levantaban uno por uno, si no que se pudo observar como ciertos fibroblastos se desprendían de la matriz y se separaban de algunos fibroblastos vecinos pero permanecían unidos a otros que seguían adheridos a la matriz, por lo cual no se daba una pérdida significativa de fibroblastos en los hidrogeles, al menos hasta las 72 h, ya que a veces sólo se plegaban hacia el resto de los fibroblastos que permanecían adheridos a la matriz, generando esta apariencia de espacios ausentes de células.

Probablemente el hecho de que se formaran espacios entre los fibroblastos en las matrices de 29 y 163 kPa y no en los cultivados en vidrio, se deba a que los

fibroblastos tienen una preferencia por los sustratos más rígidos, debido a la mecanotaxis (Lo *et al.*, 2000), y al no encontrar sustratos de mayor rigidez a su alrededor probablemente se apagaron las señales de sobrevivencia celular, ocasionando el desprendimiento de la matriz y su muerte. Debe realizarse un ensayo de apoptosis para observar si los fibroblastos que se van desprendiendo de la matriz están muriendo, lo cual podría deberse a la anoikis.

Los fibroblastos al perder o al no tener una adecuada adhesión a la matriz, podrían estar activando la anoikis, una apoptosis dependiente del anclaje celular a la matriz. La matriz transmite señales de sobrevivencia a la célula por medio de adhesiones focales, reguladas por la vía de señalización integrina/FAK (quinasas de adhesiones focales), pero cuando se da la pérdida de anclaje a la matriz, puede iniciar la expresión de ligandos y de sus receptores relacionados a la muerte celular, como Fas-L y Fas o el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) que promueven la anoikis, apagando las señales de sobrevivencia y alterando la arquitectura de las adhesiones focales, llevando a la muerte celular (Taddei *et al.*, 2012; Thannikal y Horowitz, 2006). Se podría realizar un análisis del estado de activación de las vías de señalización relacionadas con la anoikis, como la vía Integrina/FAK (quinasas de adhesión focal), la cual promueve la activación de PI3K/Akt, ERK y Jun-Cinasa (JNK) (Thannikal y Horowitz, 2006).

A pesar de que se observaron espacios en el continuo de los fibroblastos, también se puede ver una tendencia a aumentar el número de fibroblastos a las 72 h. La probable proliferación celular se muestra más marcada a las 72 h, así como la formación de espacios entre los fibroblastos, pero al no desprenderse de manera inmediata de la superficie de los hidrogeles, la pérdida de fibroblastos se vería reflejada posterior las 72 h. Por lo cual se propone un ensayo de proliferación para confirmar esta hipótesis y un ensayo de apoptosis para comparar el porcentaje de los fibroblastos que proliferan contra los que mueren, por una probable anoikis.

El estudio de las adhesiones focales, también es un aspecto relevante a considerar en la formación de los espacios entre los fibroblastos, ya que además de regular vías de señalización relacionadas a la apoptosis o sobrevivencia celular, podrían favorecer la mecanotaxis (Lo *et al.*, 2000), donde las adhesiones menos maduras podrían estar favoreciendo la movilidad de los fibroblastos. Por lo anterior se propone realizar un estudio sobre la composición molecular de las adhesiones focales en los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles y el vidrio, ya que se ha visto que esta composición puede variar de acuerdo a la rigidez del sustrato, yendo de adhesiones nacientes (integrina $\alpha\beta3$ y talina 1), complejos focales (tempranos; integrina $\alpha\beta3$, talina 1, acumulación de residuos fosforilados de tirosina-PY-, paxilina, vinculina y FAK) adhesiones focales tempranas (integrina $\alpha\beta3$, talina, PY, paxilina, vinculina, FAK, α -actina, fosfoproteína estimulada por vasodilatador -VASP-, integrina $\alpha5\beta1$, tensina y zyxina) hasta adhesiones focales maduras (integrina $\alpha\beta3$, talina 1, PY, paxilina, vinculina, FAK, α -actina y zyxina) y adhesiones focales supermaduras (integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$, alta concentración de PY, paxilina, tensina, vinculina, talina 1 y FAK) con respecto al aumento de la rigidez de la matriz (Hinz, 2010).

El hecho de que los fibroblastos no sobrevivieran por más de 24 h en matrices de módulos de rigidez muy bajo (2kPa), también se deba a la mecanotaxis, ya que buscaban un sitio de mayor rigidez y al no hallarlo, probablemente entraron en anoikis.

Balestrini *et al.* (2012) describió la existencia de una “memoria mecánica” en fibroblastos, la cual consiste en permitirles mantener ciertos niveles de expresión de proteínas ligadas a la mecanotransducción después de haber sido sembrados en matrices de una rigidez determinada y resembrarlos en matrices con una rigidez diferente. El haber cultivado los fibroblastos sobre cajas de polietileno, previo a su cultivo sobre los hidrogeles, podría estar condicionando a los fibroblastos a permanecer sobre sustratos rígidos, ya que si la composición molecular de las

adhesiones focales se ve alterada por la rigidez de la matriz, al ser sembradas sobre un sustrato de 2 GPa durante varios pasajes, las proteínas contenidas en las adhesiones focales (adhesiones focales maduras o supermaduras), quizá no les estén permitiendo a los fibroblastos el mantenerse sobre matrices de menor rigidez. Por lo cual, para lograr el crecimiento de fibroblastos sobre matrices con módulos de rigidez cercanas a lo fisiológicamente sano, probablemente sea necesario el uso de cultivos primarios de fibroblastos pulmonares que inicialmente se crezcan desde su extracción sobre matrices de PA que vayan de los 0.5-15 kPa, como lo reporta Balestrini *et al.*, 2012.

También se usaron cubreobjetos de vidrio, ya que cuenta con la misma rigidez de los materiales más comúnmente usados en estudios *in vitro* (2GPa), en las que se usan cajas de cultivo de polietileno (Baestrini *et al.*, 2012; Tully *et al.*, 2012). Se decidió utilizar los cubreobjetos porque en los hidrogeles se usaron como base el mismo tipo de cubreobjetos de vidrio para montarlos, así que de esta manera se tendría la misma área en ambas matrices, haciendo menos variable las condiciones de crecimiento de los fibroblastos cultivados en los hidrogeles y los cubreobjetos de vidrio.

En este experimento fue muy importante regular el número de fibroblastos sobre las matrices y evitar su dispersión en los pozos donde se cultivaron los hidrogeles para saber si el número inicial de células aumentaba o disminuía por efecto de la dureza del sustrato, por lo que al sembrarlos y tratar de que solo permanecieran sobre el área del hidrogel/cubreobjetos, el sembrado resultaba poco homogéneo y quedaban muy cercanos entre ellos en algunas zonas, a causa de la tensión superficial y del área tan reducida. Esto pudo haber afectado algunos procesos celulares. Así que se propone que para estudios posteriores usar el mismo número de fibroblastos, o incluso más elevado, repartido en un mayor número de réplicas de cada matriz (29kPa, 163 kPa y vidrio).

Con las proteínas extraídas de los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles y el vidrio, se analizó la expresión de α -SMA y COX-2, donde los resultados obtenidos por western blot señalan que el marcador de miofibroblastos, α -SMA, se encuentra presente en los fibroblastos usados en las tres matrices (hidrogeles de 29 kPa y 163 kPa y en vidrio). A pesar de no verse diferencias en la expresión de α -SMA, se puede observar una tendencia en el aumento de la expresión de este marcador de miofibroblastos en los fibroblastos cultivados sobre vidrio. Lo anterior va de acuerdo a lo revisado en bibliografía, donde en las matrices más rígidas habrá mayor activación de miofibroblastos, con respecto a las menos rígidas, ya que se activan vías de señalización que regulan el citoesqueleto de la célula, como lo es la vía de Rho/ROCK (Huang *et al.*, 2012).

De acuerdo con lo revisado en literatura, COX-2 es una enzima cuya expresión es dependiente de la rigidez del sustrato (Liu *et al.*, 2010), por lo cual se trató de corroborar lo anterior usando las matrices de PA y vidrio. Los resultados obtenidos con el western blot de fibroblastos de ratón cultivados por 72 h en hidrogeles de PA y vidrio, se muestran diferente a lo esperado. Para empezar no existen diferencias entre las tres condiciones usadas (29 kPa, 163 kPa y vidrio), y ni siquiera se observa una tendencia a disminuir la expresión en los fibroblastos con el aumento de la rigidez.

En el estudio de Liu *et al.*, 2010, se menciona la reducción en la expresión de COX-2 en microarreglos hechos con biopsias de pacientes con FPI y no en fibroblastos. Su análisis *in vitro* consistió en la evaluación de la expresión de PGE₂ por medio de PCR-RT, al inhibir la expresión de COX-2, en cultivos de fibroblastos humanos sobre matrices con distintos módulos de rigidez. No se realizó un estudio directamente para evaluar la expresión de COX-2, y no se tienen antecedentes en la literatura sobre análisis proteicos de COX-2, con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos en este estudio.

Para mejorar el análisis de COX-2 y α -SMA, se sugiere el uso de fibroblastos inicialmente sembrados sobre matrices con una rigidez similar a la del tejido normal, ya que serviría como un parámetro más próximo para conocer los niveles de expresión de estas proteínas en condiciones fisiológicas y cómo se ven modificados al aumentar la rigidez del sustrato. El hecho de no observar diferencias en la expresión de genes en las matrices de 29 kPa, 163 kPa y vidrio, tal vez también esté ligado a la memoria mecánica de los fibroblastos, ya que al haberlos cultivado previamente por varios pasajes sobre cajas con rigidez de 2 GPa, los niveles de expresión de α -SMA y COX-2 se lograron mantener, a pesar de cultivarlos posteriormente en hidrogeles de menor rigidez.

El desarrollo de la FPI es multifactorial, quizá el efecto sinérgico de la rigidez de la matriz y de moléculas profibrósantes encontradas en el medio celular, como el TGF- β 1, podría funcionar para recrear de manera más próxima, los eventos fibróticos ocurridos durante la FPI, ya que el exponer los fibroblastos únicamente a condiciones de rigidez patológica, podría no ser suficiente para recrear los eventos fibróticos en el pulmón, pues se ha visto que TGF- β 1, molécula que puede ser activado por la tensión de la MEC, promueve la desregulación de COX-2 en CEAs (Takai *et al.*, 2013) y la diferenciación a miofibroblasto en sustratos con una rigidez correspondiente a la fibrótica y no en una rigidez fisiológica (Goffin *et al.*, 2006).

En este estudio se pudo estandarizar el cultivo de fibroblastos sobre matrices de poliacrilamida y comprobar que sí existen diferencias en algunos aspectos en los fibroblastos al exponerlos a matrices con módulos de rigidez diferentes, como el aumento en espacios entre fibroblastos sobre matrices de hidrogel y no de vidrio, aunque fueron meramente cualitativos y no se vieron reflejadas en un resultado significativo en el conteo celular. En cuanto a las moléculas estudiadas no se encontraron diferencias en expresión bajo las condiciones de cultivo usadas, aunque se pudo observar una tendencia en el aumento de la expresión de α -SMA en respuesta a una mayor rigidez. En el caso de COX-2, los resultados no

mostraron lo que se esperaba. Se deben modificar algunos aspectos metodológicos para poder darle seguimiento a lo observado durante la investigación y tratar de responder a los cuestionamientos que surgieron.

La rigidez de la matriz es un factor muy importante en la señalización celular, al poder modificar la expresión génica y otros aspectos celulares, como la migración, la proliferación, la morfología y la activación de TGF- β (Jamney *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010) y que está muy poco explorado, sobre todo en patologías como la FPI, por lo cual es necesario profundizar en este campo, ya que nos podría brindar indicios de tratamientos alternativos o de terapia para la FPI u otras enfermedades con un aumento en la rigidez de la matriz como el cáncer u otros tipos de fibrosis.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) *Molecular biology of the cell*. (5ta. Edición). New York: Garland science.
2. Balestrini, J. L., Chaudhry, S., Sarranzy, V., Koehler, A., Hinz, B. (2012) *The mechanical memory of lung myofibroblasts*. *Integral. Bio.* **4**, 410-421.
3. Barrier, A., y Yamada, K. (2007) Cell-Matrix Adhesion. *J. Cell. Physiol.* **213**; 565-573.
4. Clarke, D., Carruthers, A., Mustelin, T., Murray, L. (2013) Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* **6**; 1-9.
5. Coward, W., Feghali-Bostwick, C., Jenkins, G., Knox, A., Pang, L. (2014) A central role for G9a and EZH2 in the epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal.* **28**; 3183-3196.
6. Das, Al, Kapoor, A., Meheta, G., Gosh, G., Sen, S. (2013) Extracellular Matrix Density Regulates Extracellular Proteolysis via Modulation of Cellular Contractility. *J Carcinogene Mutagene.* S13: 003.
7. Dubois, R., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Putte, V., Lipsky, P., E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal.* **12**; 1063-1073.
8. Encyclopaedia britannica. (s.f.). Fibroblast. Recuperado el 14 de noviembre de 2013, de <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/205914/fibroblast>.
9. Frantz, Ch., Stewart, K. M., Weaven, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science.* **123**; 4195-4200.
10. Freya, M. y Wang, Y-l. (2009) A photo-modulatable material for probing cellular responses to substrate rigidity. *Soft Matter.* **5**; 1918-1924.
11. Gabasa, M., Royo, D., Molina-Molina, M., Roca-Ferrer, J., Pujols, L., Picado, C., Xaubet, A., Pereda, J. (2013) Lung Myofibroblasts Are Characterized by Down-Regulated Cyclooxygenase-2 and Its Main Metabolite, Prostaglandin E2. *PLOS ONE.* **8**; e65445-e65445
12. Gattazzo, F., Urciuolo, A., Bonaldo, P. (2014) Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1-14.
13. Goffi, J. M., Pittet, P, Csucs, G., Lussi, J. W., Meister, J-J., Hinz, B. (2006). Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *The Journal of Cell Biology,* **2**; 259-268.
14. Gross, T., y Hunninghake, W. H. (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* **345**; 517-525.

15. Hinz, B. (2010) The myofibroblasts: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics*. **43**; 146-155.
16. Hinz, B., Phan, S. H., Galli, A., Thannickal, V., Bochaton-Piallat, M., Gabbiani, G. 2007. Biological Perspectives The Myofibroblast One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology*. **170**; 1807-1816.
17. Honda, E., Park, A-M., Yoshida, K., Tabuchi, M., Munakata, H. (2013) Myofibroblast; Biochemical and proteomic approaches to fibrosis. *Tohoku J Exp Med*. **230**; 67-73.
18. Huang, X., Yang, N., Fiore, V., Barker, T., Sun, Y., Morris, S., Ding, Q., Thannickal, V., Zhuo, Y. (2012). Matrix Stiffness-Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **47**; 340-348.
19. Jaalouk, D. E., Lammerding, J. (2009) Mechanotransduction gone awry *Molecular cell Biology*. **10**; 63-73.
20. Jaalouk, D., Lammerding, J. (2009) Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews*. **10**; 63-73.
21. Janmey, P., Winer, J. P., Murray, M. E., Wen, Q. (2009) The hard life of the soft cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. **8**; 597-605.
22. Keeley, E., Mehrad, B., Strieter, R. (2010) Fibrocytes: Bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **42**; 535-542
23. Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, Alveolar, A., Sheppard, D., Chapman, H. A. (2006) Epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis an is regulated by the extracellular matrix. *Department of Medicine and Cardiovascular Research Institute, PNAS*. **35**, 13180-13185.
24. King, T., Pardo, A., Selman, M. (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. **378**; 1949-61
25. Liu, F., Mih, J. D., Shea, B., Kho, A., Sharif, A. S., Tager, A. M., Tschumperlin, D. J. (2010) Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *J. Cell Biol*. **190**; 693-706.
26. Liu, F., Stopfer, L., Marinkoic, A., Vrbanac, V., Probst, C., Hiemer, S. E., Sisson, H., Horowitz, C., Rosas, I. O., Fredenburgh, L. E., Feghali-Bostwick, C., Varelas, X., Tager, M., Tschumperlin, D. J. (2014) Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*: **308**; L344-L357, 2015.
27. Lo, Ch-M., Wang, H-B., Dembo, M., Wang, Y. (2000) Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal*. **79**; 144-152.
28. Maher, T. M., Evans, I. C., Bottoms, S. E., Mercer, P. F., Thorley, A. J., Nocholson, A. G., Laurent, G. J., Tetley, T. D., Chambers, R., McNulty, R. (2010) Diminished Prostaglandin

- E2 Contributes to the Apoptosis Paradox in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* **182**; 73–82.
29. Mariappan, Y., Kevin, J. G., Hubmayr, R., Manduca, A., Ehman, R. L., McGee, K. (2011) Magnetic resonance elastography of human lung parenchyma: Technical development, theoretical modeling and in vivo validation. *J Magn Reson Imaging.* **33**; 1351-1361.
 30. Nalysnk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., Esser, D. (2012) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev.* **126**, 355–361.
 31. National Center for Biotechnology Information. *ACTA2 actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [Homo sapiens (human)]*. [En línea] actualizado el 07/08/2014. [Fecha de consulta: 26/08/2014]. Disponible desde: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59>>.
 32. Pelham, R. J., Wang, Y-L. (1997) Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 13661-13665.
 33. Proteochem crosslinking biology and chemistry. Recuperado el 12 de mayo de 2014, de: <http://www.proteochem.com/sulfosanpahcrosslinker100mg-p-102.html>.
 34. Ramos, C., Becerril, C, Cisneros-lira J. G., Montaña, M. (2004) El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* **3**; 215-231.
 35. Scharenberg, M. A., Pippenger, B. E., Sack, R., Zingg, D., Ferralli J., Schenk, S., Martin, I., Chiquet-Ehrismann, R. (2012) TGF-b-induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *Journal of Cell Science.* **127**; 1079–1091.
 36. Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, et al (2007) Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE.* **2**; 1-11.
 37. Selman M, King TE, Pardo A. (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* **134**; 136-151., 2001.
 38. Selman, M., Pardo, A. (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* **3**, 1-8.
 39. Strutz, F., Okada, H., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E., Neilson, E. G. (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *JCB.* **130**; 393-405.
 40. Sunyer, R., Jin, A. J., Nossal, R., Sackett, D. L. (2012) Fabrication of Hydrogels with Steep Stiffness Gradients for Studying Cell Mechanical Response. *PLOS ONE.* **10**; 1-9.
 41. Taddei, ML., Giannoni, E., Fiaschi, T. y Chiarugi, P. (2012) Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *Journal of Pathology.* **226**; 380–393.
 42. Thannickal, V., Horowitz, J. (2006) Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**; 350-356.

43. Tse, J. R., Engler, A. (2010) Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols in Cell Biology*. 10.16.1-10.16.16.
44. Tully, A., Traves, K., Studdiford, J. (2012) Evaluation of Nail Abnormalities. *American family physician*. **8**; 1096-1108.
45. Wang, J., Zohar, R., McCulloch, C. (2006) Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction. *Experimental cell research*. **312**; 205-214.
46. Willis, B., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., Du Bois, R. M., Borok, Z. (2005) Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-1. Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Pathology*. **66**, 1321-1332.
47. Wipff, P.-J., Hinz, B. (2008) Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 - An intimate relationship. *European Journal of Cell Biology*. **87**; 601-615.
48. Wipff, P.-J., Hinz, B. (2008) Myofibroblasts work best under stress. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. **13**; 121-127.
49. Yang, I. (2012) Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Epigenomics*. **2**, 195-203
50. Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., Janmey, P. A. (2005) Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. **60**; 24-34.
51. Zhou, Y., Huang, X., Hecker, L., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Liu, H., Jin, T-H., Desai, L., Bernard, K., Thannickal, V. J. (2013) Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. **123**; 1096-1108.