



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Biomedicina

**Efecto de la rigidez de la matriz en fibroblastos pulmonares normales
humanos.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Andrea Magali González Mora

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Annie Pardo Cemo

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Facultad de Ciencias, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

ENERO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Biomedicina

Efecto de la rigidez de la matriz en fibroblastos pulmonares normales

humanos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Andrea Magali González Mora

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Annie Pardo Cemo

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Facultad de Ciencias, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX.

ENERO, 2018

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/836/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de octubre de 2017** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del (la) alumno(a) **GONZÁLEZ MORA ANDREA MAGALI** con número de cuenta **307148036** con la tesis titulada "**Efecto de la rigidez de la matriz en fibroblastos pulmonares normales humanos.**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANNIE PARDO CEMO:**

Presidente: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
Vocal: DR. FRANCISCO MANUEL SÁNCHEZ ARÉVALO
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Suplente: DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ÁLVAREZ
Suplente: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de noviembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

- Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Al Consejo de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de registro 581757).
- Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para el Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la Facultad de Ciencias (UNAM) porque en sus instalaciones recibí apoyo en todo momento para el desarrollo de este proyecto.
- Al Instituto de Investigación en Materiales (IIM) de la UNAM pues parte de este proyecto se llevó a cabo en sus instalaciones.
- Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación de reactivos y material biológico.
- De manera muy especial, agradezco a mi tutora por todo el apoyo que me brindó: Dra. Annie Pardo Cemo
- A mi comité tutorial por sus acertados comentarios e invaluable ayuda durante la realización de este proyecto:

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, no me cansaré nunca de agradecer todo lo recibido de la máxima casa de estudios desde mi ingreso al bachillerato hasta el día de hoy.

A la Facultad de Ciencias porque en sus aulas encontré un mundo nuevo lleno de preguntas por responder, grandes maestros y la oportunidad de desconocer un poco menos sobre la vida.

A mi tutora, la Dra. Annie Pardo Cemo por aceptarme como su estudiante, por apoyarme siempre, depositar su confianza en mí y por todo lo que me ha enseñado. Tiene toda mi admiración y respeto.

Gracias al Dr. Moises Selman por su apoyo desde que estuve en el taller.

A los investigadores del INER por su apoyo, por recibirme bien en cada visita y quiero agradecer en especial a la Dra. Martha Montaña por abrirme las puertas de su laboratorio y a la Dra. Carina Becerril por facilitarme la obtención de material, en especial de las líneas celulares usadas en este proyecto, por su paciencia y buenos consejos.

A todos los miembros del antiguo laboratorio de Bioquímica, actual Laboratorio de Biopatología Pulmonar y Enfermedades Fibrosantes, porque todos siempre tuvieron la disposición de ayudarme. Especialmente quiero agradecer a la M. en C. Remedios Ramirez por compartir su conocimiento y brindarme su apoyo moral, al Dr. Jorge Garcpor confiar en mí y siempre estar ahí para darme palabras de aliento y apoyo, no sólo en el aspecto laboral, también en mi desarrollo profesional y personal. A David por ser el maestro sustituto y darme siempre consejos, al Dr. José Cisneros porque me recibió bien en su laboratorio, por los consejos académicos y personales que me ha dado. A Mariel, Luis, Yalbi, Miguel y a Yair quienes son parte de los hermanos mayores en el laboratorio, aprendí mucho de ustedes y quiero agradecer en especial a Yair, al Dr. Yair y a Marielita porque siempre tuvieron la buena disposición de ayudarme en todo momento. A los hermanos menores y contemporáneos; Gerzon, Abraham, Andrés, Fernanda, Marco, Ángeles y Juan Manuel por estar a mí lado en los momentos de estrés, haciendo más llevadero el trabajo y las clases. Les quiero agradecer a todos porque todos siempre tuvieron la disposición de compartir sus conocimientos conmigo, además de que más que compañeros de laboratorio se convirtieron en entrañables amigos.

Al Dr. Mathieu Hautefeuille y a su grupo de trabajo. En primer plano agradezco a Mathieu porque me integró a su grupo de estudiantes, gracias porque siempre estuvo dispuesto a escucharme, resolver mis dudas y ayudarme a resolver los problemas que se fueron presentando durante este estudio. Gracias a todos los chicos que pertenecen a este gran equipo, porque además de ayudarme y enseñarme las cosas que necesitaba saber, siempre fueron solidarios y amigables desde el inicio, me sentí muy bien recibida desde que entré por primera vez a su laboratorio. En particular, quiero agradecer al Dr. Genaro por su interés en el

proyecto, su amabilidad y disposición para apoyarme, a Lidia por compartirme algunos métodos para la preparación de la superficie del PDMS y ser tan linda conmigo siempre. A Lucia por ser mi compañera y amiga PDMS, la desesperación nos inundaba a veces pero logramos salir a flote ¡Yei!, y a Daniel por todo el apoyo que siempre me brindó en lo académico y personal, gracias por ser tan bueno conmigo. Gracias a todos por los agradables momentos, por compartir su conocimiento y por su amistad.

Al Dr. Francisco Sánchez y a la M. en C. Marisol Garnica del IIM, por la ayuda recibida durante las mediciones de los módulos de Young, por siempre estar dispuestos a apoyarnos en cualquier cosa que se requiriera y con la mejor disposición posible, siempre manteniendo una sonrisa amable y sincera.

Dedicatorias

A mi mamá, gracias por ayudarme a cumplir cada meta, por ser mi amiga, por cuidarme siempre y por confiar en mí más que nadie. He recibido muchas cosas buenas de esta vida pero de entre todo, tenerla a mi lado es lo más maravilloso de este mundo. Es uno de los motivos más importantes que tengo para tratar de ser cada día una mejor persona.

A mi abuelita y familia por sus cuidados y por preocuparse por mí. Por la compañía y el apoyo.

A mis amigos de la facultad, en especial a Mariana, Monse y Mical por ser mi apoyo desde ese entonces, por no dejar morir la amistad y porque a pesar de que somos tan diferentes en varios aspectos el cariño nos mantiene unidas aunque estemos distanciadas. Gracias Mical, por ser esa amiga que cualquiera desearía, admiro mucho la persona que eres y me has influenciado de muchas maneras, todas positivas.

A mis amigos del laboratorio, Mariel, Juan Manuel, Miguel, Luis, Andrés, Gerzon, Abraham, David, Ángeles, Marco y Fernanda porque cuando comencé a conocerlos más descubrí a las maravillosas personas que estaban detrás de esos matraces y probetas. Gracias por todo su cariño y por los momentos divertidos, por darme su confianza y consejos. En especial quiero agradecer a Juan Manuel por tomar mi mano cuando sentía que más lo necesitaba, por preocuparse y cuidar de mí.

A Jorge por apoyar mi carrera profesional y por siempre estar dispuesto a escuchar y responder mis dudas. Gracias por esa amabilidad que tanto te caracteriza y que nos permite tener la confianza de acudir a ti en cualquier circunstancia.

A Dylann porque en el poco tiempo que convivimos me ayudó a recuperar el entusiasmo por la ciencia que creía perdido pero que simplemente andaba escondido en alguna parte. Gracias por ayudarme a confiar de nuevo en mí y por impulsarme a salir de mi zona de confort.

A Tanya, porque es la amiga que más tiempo ha estado conmigo y que a pesar de la distancia seguimos manteniendo la complicidad y el cariño.

A mis amigos de la prepa, principalmente a Isabel, Ana, Erika y Giovanna por brindarme su amistad por tantos años y ayudarme a crecer como persona. Mucho de lo que soy se los debo a ustedes (No se culpen, hablo de las cosas buenas). Ana, espero hacer las cosas cada vez mejor para que no te arrepientas por haberle puesto Andrea a tu pequeña hija y ser un buen ejemplo para ella.

A Gustavo porque a pesar de todo sigue presente en mi vida, dándome su cariño y apoyándome para lograr cumplir mis metas. Gracias por todos los bonitos momentos, por decidir crecer como persona a mi lado y por todo lo que hemos aprendido juntos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| <u>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</u> | 1 |
| <u>RESUMEN</u> | 3 |
| <u>ABSTRACT</u> | 4 |
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | 6 |
| Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)..... | 6 |
| Fibroblastos..... | 8 |
| Activación de miofibroblastos por rigidez..... | 11 |
| Actina..... | 12 |
| Matriz extracelular..... | 12 |
| MEC y mecanotransducción..... | 14 |
| Biomimetización de tejidos..... | 19 |
| Polidimetilsiloxano (PDMS)..... | 21 |
| <u>OBJETIVO</u> | 24 |
| Objetivos particulares..... | 24 |
| <u>MÉTODOS</u> | 25 |
| Líneas celulares..... | 25 |
| Cultivo celular en placas de poliestireno..... | 25 |
| Fabricación de matrices de diferente rigidez de PDMS..... | 25 |
| Ensayo de tracción uniaxial..... | 26 |
| Reducción en la hidorfobicidad del PDMS..... | 31 |
| Cultivo celular en placas con matrices con PDMS..... | 31 |
| Ensayo de herida..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Conteo celular..... | 32 |
| Recubrimiento de matrices de PDMS con colágena..... | 32 |
| Extracción y cuantificación de proteínas..... | 33 |
| Western Blot..... | 34 |
| Ensayo de transfección..... | 34 |
| <u>RESULTADOS</u> | 35 |
| CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES DE PDMS..... | 35 |
| Los módulos de Young presentan una alta dispersión en los datos en ausencia de un método controlado de fabricación..... | 35 |
| ENSAYOS BIOLÓGICOS..... | 39 |
| Adhesión celular sobre las matrices de PDMS..... | 39 |
| Adhesión de fibroblastos en matrices de PDMS y cajas de poliestireno..... | 39 |
| Los fibroblastos cultivados sobre las cajas de poliestireno de 2GPa presentan un cierre de herida más acelerado..... | 40 |
| Número de células..... | 41 |
| La expresión de α -SMA se ve afectada por la rigidez del sustrato en fibroblastos NHLF..... | 41 |
| Expresión de α -SMA de fibroblastos LL-24 cultivados sobre matrices de PDMS..... | 43 |
| Matrices de PDMS cubiertas con colágena tipo I..... | 45 |
| Evaluación en la expresión de α -SMA en fibroblastos NHLF y LL-24 cultivados sobre matrices con colágena..... | 45 |

| | |
|--|----|
| Patrón de expresión de actina citoplasmática en fibroblastos cultivados sobre matrices de diferente rigidez en presencia y ausencia de una cubierta de colágena..... | 48 |
| <u>DISCUSIÓN</u> | 51 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 57 |
| <u>REFERENCIAS</u> | 59 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| ATP | Adenosin trifosfato |
| ERK | Cinasa reguladora de señal extracelular |
| FAK | Cinasa de adhesión focal |
| FGF2 | Factor de crecimiento de fibroblastos ² |
| FOXP1 | Forkhead box P1 |
| FOXF1 | Forkhead box F1 |
| FPI | Fibrosis pulmonar idiopática |
| GEF-H1 | Factor intercambiador de nucleótidos de guanina H1 |
| HA | Hidroxiapatita |
| LAP | Proteína asociada a latencia |
| LARG | Factor intercambiador de nucleótidos de guanina asociados a Rho en leucemia |
| LLC | Gran complejo de latencia |
| MEC | Matriz extracelular |
| MLC | Cadena ligera de la miosina |
| MMP | Metaloproteasa de matriz |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PDMS | Polidimetil siloxano |
| PGA | Ácido policiglicólico |
| PLGA | Ácido poli-(láctico-co-glicólico) |
| PLLA | Ácido poli-l-láctico |
| RFP | Proteína rojo fluorescente |
| ROCK | Proteína cinasa asociada a Rho |
| TCP | Fosfato tricálcico |
| TEM | Transición epitelio mesenquima |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante- β |

| | |
|---------------|--|
| TIMPs | Inhibidores tisulares de metaloproteasas |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral α |
| VCAM1 | Molécula de adhesión de células vasculares |
| α -SMA | Alfa actina del músculo liso |
| SFB | Suero fetal bovino |

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica, degenerativa y letal, de origen desconocido y que se encuentra asociada al envejecimiento. Durante el proceso de envejecimiento, el pulmón experimenta un aumento de rigidez de manera normal. Sin embargo, cuando se presenta un proceso fibrótico, la rigidez del pulmón es aún mayor, debido a que los septos alveolares se engrosan por el depósito excesivo de matriz extracelular (MEC), secretado principalmente por fibroblastos/miofibroblastos, reduciendo la elasticidad del pulmón e impidiendo su correcto funcionamiento.

En el presente trabajo se propuso un modelo de cultivo de fibroblastos pulmonares normales humanos sobre matrices compuestas del polímero poli-dimetilsiloxano (PDMS), que se caracteriza por ser transparente, biocompatible, de bajo costo, de fácil preparación, permeable a los gases y de rigidez modulable. Se consideraron tres módulos de rigidez de las matrices; 17, 69 y 164 kPa. Las observaciones realizadas de los fibroblastos cultivados sobre estas matrices, se compararon con las hechas en fibroblastos cultivados sobre las placas de cultivo tradicional (2GPa) de poliestireno, que como se puede ver, la rigidez de este material es varios órdenes de magnitud mayor a la de las matrices de PDMS usadas.

El objetivo de estas comparaciones fue el tratar de identificar si existen diferencias en la expresión de α -SMA, en el cierre de herida, en el crecimiento celular y en el arreglo del citoesqueleto de actina, entre fibroblastos cultivados sobre matrices de diferente y menor rigidez, con respecto a los fibroblastos crecidos sobre las placas de poliestireno.

En los experimentos de cierre de herida, conteo del número celular, expresión de α -SMA y de transfección de actina marcada con red fluorescent protein (RFP), se observaron diferencias significativas entre los fibroblastos de las matrices de PDMS con respecto a los fibroblastos

cultivados sobre las cajas de poliestireno. Sin embargo, entre los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS de diferente módulo de Young en ningún caso se observaron diferencias significativas. Aunque en este estudio se establecieron avances en la preparación de andamios se requieren más estudios para proponer un modelo de cultivo celular que pueda ser de utilidad para evaluar el comportamiento celular en condiciones cercanas a las fisiológicas.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis is a chronic, degenerative and lethal disease of unknown origin that is associated with aging. During the aging process, the lung undergoes an increase in stiffness. However, when a fibrotic process occurs, the stiffness of the lung is even greater, because the alveolar septa are thickened by the excessive deposit of extracellular matrix (ECM), secreted mainly by fibroblasts / myofibroblasts, reducing the elasticity of the lung. preventing its proper functioning.

In the present work a culture model of human normal lung fibroblasts was proposed on matrices composed of poly-dimethylsiloxane polymer (PDMS), which is characterized by being transparent, biocompatible, cost-effective, easy prepare, permeable to gases and a modulable stiffness. Three matrix stiffness modules were considered; 17, 69 and 164 kPa. Observations made of the fibroblasts grown on these matrices were compared with those made in fibroblasts grown on the plates of traditional culture (2GPa) of polystyrene, which as you can see, the rigidity of this material is several orders of magnitude higher than the of the PDMS matrices used.

The aim of these comparisons was to try to identify if there are differences in the expression of α -SMA, in wound closure, in cell growth and in the arrangement of the actin cytoskeleton, between fibroblasts grown on different and lower stiffness matrix, with respect to fibroblasts grown on polystyrene plates.

In wound healing assay, cell count, α -SMA expression and actin transfection marked with red fluorescent protein (RFP), significant differences were observed between the fibroblasts of the PDMS matrices with respect to the cultured fibroblasts on the polystyrene plates. However, no significant differences were observed between the fibroblasts grown on the PDMS matrices of different Young's modulus. Although advances in the preparation of scaffolds were established in this study, further studies are required to propose a cell culture model that may be useful for evaluating cellular behavior in conditions close to physiological conditions.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, degenerativa y letal. Se ha propuesto que es el resultado de una serie de daños en el epitelio alveolar, con una subsecuente reparación desregulada del parénquima pulmonar, donde ocurre una activación aberrante del epitelio alveolar, con la secreción de una amplia variedad de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, metaloproteasas de matriz y moléculas involucradas en el desarrollo embrionario. Esto induce la migración, proliferación y activación de células mesenquimales, culminando en un depósito excesivo de matriz extracelular, que impide el correcto funcionamiento del pulmón (1, 2).

A pesar de que se conocen ciertos mecanismos subyacentes de esta patología, como su nombre lo indica, es un padecimiento de causas desconocidas. Se han identificado factores de riesgo ligados al desarrollo de este padecimiento, como el tabaquismo, la exposición a humo de leña y herencia genética con un patrón de transmisión con penetrancia reducida. Además, el envejecimiento figura como un elemento importante de riesgo, ya que esta enfermedad suele presentarse sobre todo en individuos mayores de 55 años (3)

El envejecimiento posee una serie de marcas distintivas (Fig. 1), y varias de estas marcas se han podido identificar en pacientes con FPI, aunque tienen la variante de que suelen presentarse con una mayor gravedad en comparación con individuos control apareados por edad (4).

Algunas marcas del envejecimiento que se han podido observar en células epiteliales alveolares de pacientes con FPI son el acortamiento anormal de los telómeros, una subsecuente muerte celular por apoptosis, senescencia celular, así como una disfunción

mitocondrial, inestabilidad genómica y defectos en la proteostasis (4).

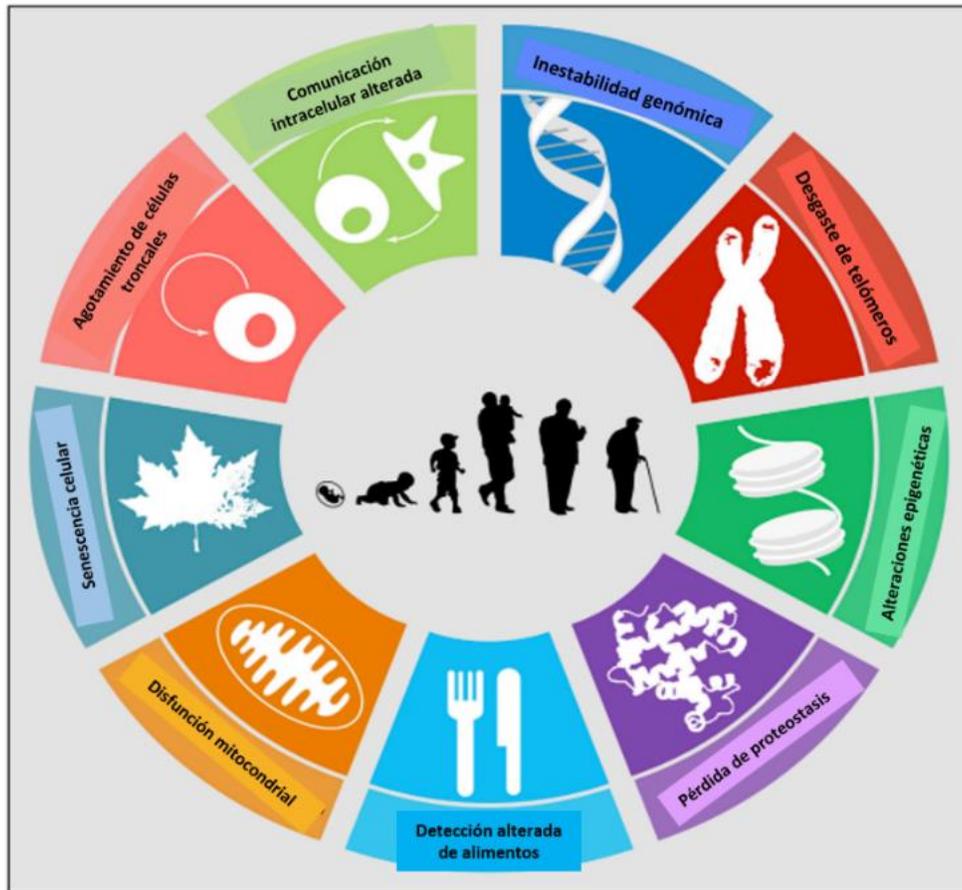


Fig. 1. Marcas distintivas del envejecimiento. El envejecimiento es un proceso caracterizado por modificaciones en la regulación molecular, celular y tisular. El envejecimiento conlleva un deterioro de la integridad fisiológica, promoviendo el desarrollo de un gran número de enfermedades, entre ellas la FPI. Modificado de: *Cell*. 2013; 53.

Además de las células epiteliales alveolares, otros tipos celulares en FPI también presentan una serie de procesos alterados. Entre estos se pueden mencionar a los fibroblastos pulmonares, que de manera normal se encuentran en pequeñas poblaciones en el septo alveolar produciendo moléculas de la matriz extracelular en bajas cantidades, aunque durante un proceso fibrótico muestran una sobreactivación, promoviendo la acumulación de matriz extracelular (MEC), principalmente colágena tipo I, entre otras moléculas. Este depósito excesivo de MEC lleva a una alteración

en la distensibilidad pulmonar, es decir, se favorece el aumento en la rigidez del tejido pulmonar, alterando las señalizaciones intracelulares por cambios en los estímulos mecánicos percibidos por los fibroblastos. De manera normal, durante el envejecimiento hay un aumento en la rigidez del pulmón, lo cual podría estar funcionando como activador de vías de señalización profibróticas en pacientes susceptible a desarrollar FPI (5).

Fibroblastos

Los fibroblastos son células de origen mesenquimal, propias del tejido conjuntivo, con un retículo endoplásmico pequeño (en comparación con la forma activa, los miofibroblastos), un núcleo aplanado y heterocromático, tienen forma de huso y al expresar colágenas intersticiales (colágena tipo I y III), son las encargadas de la síntesis y depósito de la matriz extracelular (MEC) (6,7) Existen marcadores bien establecidos para fibroblastos pero ninguno de ellos es exclusivo de fibroblastos, ni se encuentra en todos los fibroblastos (**Tabla 1**) (8).

| Marcador | Función | Tipo de fibroblastos en el que se encuentra |
|---|--|---|
| Vimentina | Proteína de asociación a filamentos intermedios | Diversos |
| α -actina del músculo liso | Generación de fuerzas contráctiles para el cierre de heridas | Miofibroblastos |
| Desmina | Proteína asociada a filamentos intermedios | Fibroblastos de piel |
| Proteína activadora de fibroblastos (FAP) | Serin proteasa | Fibroblastos activados |

Tabla 1. Marcadores de fibroblastos. Existen diversos tipos de fibroblastos, caracterizados por la expresión de ciertos marcadores moleculares. Para los miofibroblastos, el marcador por excelencia es la α -actina del músculo liso. Modificado de: *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 392-401, *Am J Pathol*. 2005; 166(5): 1343-1351.

Las características fenotípicas de los fibroblastos pueden variar de acuerdo al tipo de tejido en el que se les encuentre y a su origen. Se han realizado estudios comparando los patrones de expresión génica de fibroblastos provenientes de diversos sitios, mostrando una alta diversidad en estos patrones de expresión (6). Para los fibroblastos pulmonares, se ha observado una diferencia en la expresión de colágena y heterogeneidad en la expresión de marcadores de superficie, como en el caso de los fibroblastos thy-1(+) y thy-1 (-), en los que se ha visto que la ausencia de este marcador se correlaciona con procesos fibrogénicos (9).

Por su parte, los fibroblastos periodontales tienen diferencias en la morfología, producción de colágena y glucógeno (7). Otros ejemplos son los fibroblastos fetales de piel, los cuales expresan altos niveles de colágena tipo I y V, mientras que los fibroblastos fetales pulmonares no hacen pero sí expresan, exclusivamente, los factores de transcripción FOXF1 y FOXP1. Estas diferencias fenotípicas, no hacen otra cosa más que mostrarnos que los fibroblastos provienen de distintos linajes con diferenciación sitio-específica (8).

Los fibroblastos pueden ser activados, llegando a ser células con un aumento en su actividad metabólica, es decir, aumentando su capacidad de sintetizar moléculas propias de la MEC, factores de crecimiento, de metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibidores de metaloproteasas (TIMPs). En un estado activo, poseen un gran núcleo eucromático oval, con uno o dos nucléolos, con retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominentes (6). Cuando se encuentran bajo esta condición son llamados miofibroblastos debido a que mantienen características de fibroblastos y adquieren algunas otras de célula muscular, como haces de microfilamentos con cuerpos densos dispersos entre ellos, uniones gap y fibronexos (unión célula-matriz a través de un haz de miofilamento alineado que entra en contacto con fibrillas de fibronectina en varios puntos de la superficie celular) (10, 12, 13). Otra de estas características

tipo célula muscular, adquirida en la diferenciación a miofibroblasto, es su capacidad contráctil, similar a la de las células musculares, debido a la expresión de la proteína alfa actina del músculo liso (α -SMA), isoforma de la actina típica de células musculares lisas vasculares. La α -SMA le da al fibroblasto una capacidad de generar fuerza contráctil, que le permite participar de manera importante en el cierre de heridas (10,11, 13).

Después del daño, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, los cuales pueden tener múltiples orígenes de acuerdo al sitio donde se encuentren. Se sostiene que la mayoría provienen de células mesenquimales residentes locales como los fibroblastos, células musculares lisas o células estrelladas hepáticas. También se considera que pueden provenir de otras fuentes locales, como lo son las células epiteliales o endoteliales, a través de una transición epitelio mesénquima (TEM) o incluso, se sostiene que pueden tener su origen a partir de fibrocitos provenientes de la médula ósea (10).

Se han reconocido diversos estímulos que regulan la diferenciación de miofibroblastos, como factores de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de necrosis tumoral (TNF- α), angiotensina II y aldosterona. También se sabe que los miofibroblastos se pueden activar por contacto célula-célula con leucocitos a través de moléculas como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) o la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM1). Dentro de otros factores de activación de miofibroblastos están, la presencia de especies reactivas de oxígeno, composición alterada de la MEC, la presencia de la variante de la fibronectina ED-A y la tensión mecánica (10-12, 14). La diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos es clave en el desarrollo de diversos procesos fisiológicos, como el desarrollo embriológico, crecimiento, mantenimiento de la homeostasis y reparación de varios tejidos. Así mismo, son determinantes para la progresión de algunas

enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Dupuytren, escleroderma, cicatriz hipertrófica y la fibrosis (7, 12).

La diferenciación a miofibroblastos permite asegurar la integridad del tejido dañado por medio de la secreción de matriz extracelular, proceso controlado a través de estímulos mecánicos por parte de la MEC y los miofibroblastos, generando así, un asa de retroalimentación positiva (15).

Activación de miofibroblastos por rigidez

En estudios previos, como el realizado por Balestrini *et al.*, 2012, se ha observado que al cultivar líneas celulares de fibroblastos sobre matrices con módulos de rigidez similares a los fisiológicos para pulmón (0.5-15 kPa) (16) la expresión de α -SMA se ve reducida, contrario a lo que ocurre con los fibroblastos cultivados sobre matrices de mayor rigidez (>15 kPa), obteniendo en estas condiciones, una expresión mayor de α -SMA. Se han descrito diversos procesos ligados a la activación de miofibroblastos por cambios en la mecánica de la matriz, algunos de estos son por activación de vías de señalización como la de Rho/ROCK o la activación de TGF- β latente (17, 18).

Además de cambios en la expresión de α -sma, se ha demostrado que los fibroblastos cultivados sobre matrices con distintos módulos de rigidez, muestran otro tipo de modificaciones, como la dispersión morfológica, la migración, expresión génica y la proliferación (17, 18). Por ellos es importante evaluar el papel de la rigidez de la matriz en patologías como la FPI, donde la remodelación de ésta implica importantes modificaciones mecánicas en este tejido, alterando el comportamiento de las células residentes.

Actina

La actina es la proteína más abundante en las células eucariontes y se encuentra altamente conservada. Sus interacciones son del tipo proteína-proteína, por lo que sus monómeros (G-actina) son capaces de formar filamentos (F-actina) por la hidrólisis de moléculas de ATP. La actina tiene una participación en muchas funciones celulares, como la motilidad, mantenimiento de la forma, remodelación de la cromatina, regulación transcripcional y tráfico vesicular. En conjunto con la miosina, también se encarga de regular la contractilidad muscular (19).

Una de las razones por la cual la actina tiene tantas funciones es que tiene seis isoformas, todas participan en la formación de fibras de estrés. En aves y mamíferos podemos encontrar seis genes, cada uno codificando para una isoforma diferente. Cuatro de estas isoformas; α -actina del músculo liso (α -SMA), γ -actina del músculo liso, α -actina del músculo esquelético y α -actina cardiaca, son expresadas principalmente en músculo liso, esquelético y cardiaco. Mientras que las isoformas β - y γ - actina se encuentran expresados en todos los tipos celulares. Las diferencia entre estas isoformas radica en unos pocos aminoácidos, cuya mayor variación ocurre en el N terminal. En los miofibroblastos β - y γ - actina se encuentran formando las fibras de estrés, la α -SMA bajo la presencia de estímulos fibróticos, como el de TGF β 1 o una tensión isométrica, es reclutada *de novo* en las fibras de estrés (20, 21).

La polimerización de los filamentos de actina contribuye a que la célula sea capaz de generar fuerzas de contractilidad, que ejercen tracción sobre la matriz o células circundantes y de responder ante estímulos mecánicos exógenos, generando fuerzas endógenas dentro de la célula (19).

Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red intrincada de una amplia variedad de proteínas y polisacáridos sintetizados por diferentes tipos celulares,

dentro de los cuales destacan los fibroblastos. La MEC se comienza a secretar durante el desarrollo embrionario a través de un dinámico y recíproco diálogo bioquímico y biofísico entre diferentes tipos celulares (22). Se remodela constantemente debido al rompimiento de sus componentes por metaloproteasas de matriz (MMPs) y a la síntesis y depósito de nuevas proteínas propias de la MEC (22, 23).

La MEC comprende cerca de 300 proteínas, 200 glucoproteínas y 30 proteoglicanos (PGs) (23). Los PGs están formados por cadenas de glucosaminoglucanos (GAGs), que se encuentran unidos de manera covalente a núcleos de proteínas (22). Los GAG son heteropolisacáridos grandes y negativamente cargados, caracterizados por repeticiones de disacáridos de hexosaminas N-acetiladas y D-/L- ácido hexurónico, que son substituidas con grupos sulfato en varias posiciones. Entre los principales GAG tenemos al condroitin sulfato (CS), dermatán sulfato (DS), los queratán sulfato (KS), heparina (Hep) y heparan sulfato (HS). El hiarunonano (HA), es un GAG particular, es biosintetizado en la membrana celular, en lugar del aparato de Golgi, no se encuentra sulfatado y no está ligado a proteínas.

Dentro de las proteínas que componen a la MEC, las más abundantes son las colágenas. En tejidos que tienen que resistir a fuerzas de presión, tracción y de cizallamiento, como los tendones, hueso, cartílago y piel, las colágenas tienen un arreglo fibrilar. Las colágenas I, II, III, V y XI, tienen este arreglo típico en forma de fibras (23). Las proteínas más abundantes en animales son principalmente las colágenas fibrilares I y III, que dotan a la MEC de rigidez, evitando la deformación y el fallo de tejidos y órganos cuando realizan alguna función, como la que se lleva a cabo en el pulmón durante la respiración (22).

Existe otro tipo de colágenas, cuyas triple hélices se encuentran interrumpidas por segmentos no helicoidales, las colágenas no fibrilares,

entre las que se encuentra la colágena tipo IV encontrada en la membrana basal (24).

Por otra parte, la MEC contiene diversas proteínas, como las fibras elásticas, que le otorgan extensibilidad (las fibras elásticas se extienden hasta en un 150% sin romperse) y resiliencia (capacidad de recuperarse ante una deformación) a los tejidos. Estas fibras elásticas consisten de un núcleo de elastina rodeadas de hojas de microfibrillas de fibrilina y fibulina, los cuales son considerados como los componentes de la MEC más térmica y químicamente estables (25).

Hace tiempo se creía que la MEC era una estructura que servía principalmente de andamio para las células residentes, generando una estabilidad estructural. Con el tiempo se ha descubierto que debido a su compleja composición molecular, tiene funciones reguladoras del medio celular. Se sabe que es crucial en la iniciación de señalizaciones bioquímicas y biomecánicas requeridas en la morfogénesis, diferenciación, homeostasis, migración, crecimiento, proliferación y sobrevivencia (22-24).

MEC y mecanotransducción

La rigidez de la MEC en condiciones normales está altamente regulada, sin embargo presenta cambios severos en presencia de una enfermedad. Se sabe que en cáncer, los tumores tienden a ser más rígidos que el tejido circundante. Un micromedio local o el nicho de células cancerosas, tiene un papel preponderante en el desarrollo de esta enfermedad, como componente de este nicho encontramos a la MEC, que se encuentra influenciando marcas distintivas del cáncer como la angiogénesis, migración y metástasis (26, 27).

El aumento de la rigidez también se encuentra asociado al desarrollo de otras patologías, como es el caso de la FPI. Como ya se ha mencionado, en la FPI hay una acumulación excesiva de componentes de la MEC,

promoviendo la rigidez del tejido pulmonar. Las células residentes del pulmón, como los fibroblastos/miofibroblastos, son capaces de responder ante estímulos químicos, como factores de crecimiento, o mecánicos, como algunas deformaciones ocasionadas por fuerzas (por tensión).

FUERZAS EXTERNAMENTE APLICADAS

Esfuerzo cortante

Es el estrés aplicado de manera paralela a la superficie de la célula. Ejemplo: El flujo de sangre ejerce un esfuerzo cortante en las células endoteliales.

Efecto con RhoA: regulación bifásica; de RhoA; inhibición (5-10 min) con posterior activación (>30 min).

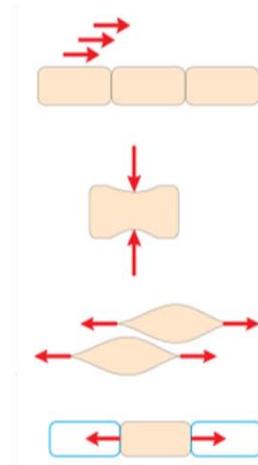
Compresión

Es el estrés aplicado perpendicularmente a la célula, resultando en una compactación. Ejemplo: El peso del cuerpo y la tensión muscular ejercen una carga compresiva sobre los condrocitos. Efecto en RhoA: activación.

Tensión

Estrés aplicado en direcciones contrarias, resultando en la expansión. Ejemplo: Los ciclos cardiacos crean una onda de presión que estira las largas arterias, produciendo tensión en las células del músculo liso. Efecto en Rho: activación.

Es el estrés aplicado



FUERZAS GENERADAS POR CÉLULAS

Contractilidad de la actomiosina

Las células generan contractilidad dependiente de la miosina generando fuerzas que son aplicadas en su adhesión. Ejemplo: Las células continuamente ajustan esas fuerzas a la resistencia ofrecida por su matriz, así cuando la célula crece en sustratos rígidos generan mayor contractilidad.

Protusión dependiente de la tensión de la membrana

La protusión de actina produce tensión en la membrana plasmática (o el citoesqueleto cortical). Ejemplo: Protusión dependiente de la tensión de la membrana en el borde delantero mantiene la polaridad durante la migración celular, potencialmente a través de la actividad de Rho.

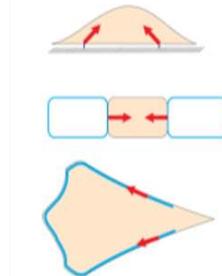


Fig. 2. Tipos de fuerzas que actúan sobre las células. Pueden actuar fuerzas externas o fuerzas internas, es decir, aquellas generadas por las células. La fuerza (N) es un vector con magnitud y dirección (flechas rojas) que hace que un objeto con masa cambie su velocidad. Tensión (Pa): Fuerza por unidad de área. Modificado de: *Biochemistry*. 2012; 51: 7420-7432, *Transl Res*. 2011; 158: 181-196.

Existen dos tipos de fuerzas que pueden actuar sobre las células: fuerzas externas o fuerzas internas. Las primeras se pueden dividir en esfuerzo cortante, compresión y tensión. Por otra parte, las fuerzas internas, está ejemplificada por la contractilidad de la actomiosina y la protusión dependiente de la tensión de la membrana (Fig. 2). A pesar de las aparentes

diferencias entre las fuerzas internas y externas, ambas poseen similitudes en la regulación del mecanismo de transducción de señales. En las dos situaciones, la superficie de adhesión celular, el citoesqueleto y la tensión de la membrana actúan en conjunto para transmitir el estímulo mecánico hacia el interior de la célula y disparar una mecanorespuesta (28).

Los miofibroblastos son células clave en el desarrollo de la FPI y que se pueden activar tanto por estímulos químicos, como por mecánicos. La presencia del TGF β , el cual es sintetizado por los mismos fibroblastos y las células del epitelio alveolar, es un inductor químico que promueve la perpetuación del estímulo profibrótico a través de la activación de los miofibroblastos. Sin embargo, la activación de los miofibroblastos también puede ocurrir por la tensión generada por fuerzas externas o internas, es decir, por fuerzas ejercidas por la tensión de la membrana o por la fuerza ocasionada por la contracción del citoesqueleto (15). Esto ocurre debido a que la tensión ejercida por la fuerza contráctil de los miofibroblastos es capaz de promover la liberación del TGF β latente. El TGF β se sintetiza en un complejo llamado gran complejo de latencia (LLC), este se compone por el TGF β 1 homodimérico, proteínas asociadas a latencia (LAP) y la proteína de unión a TGF β 1 latente (15,17).

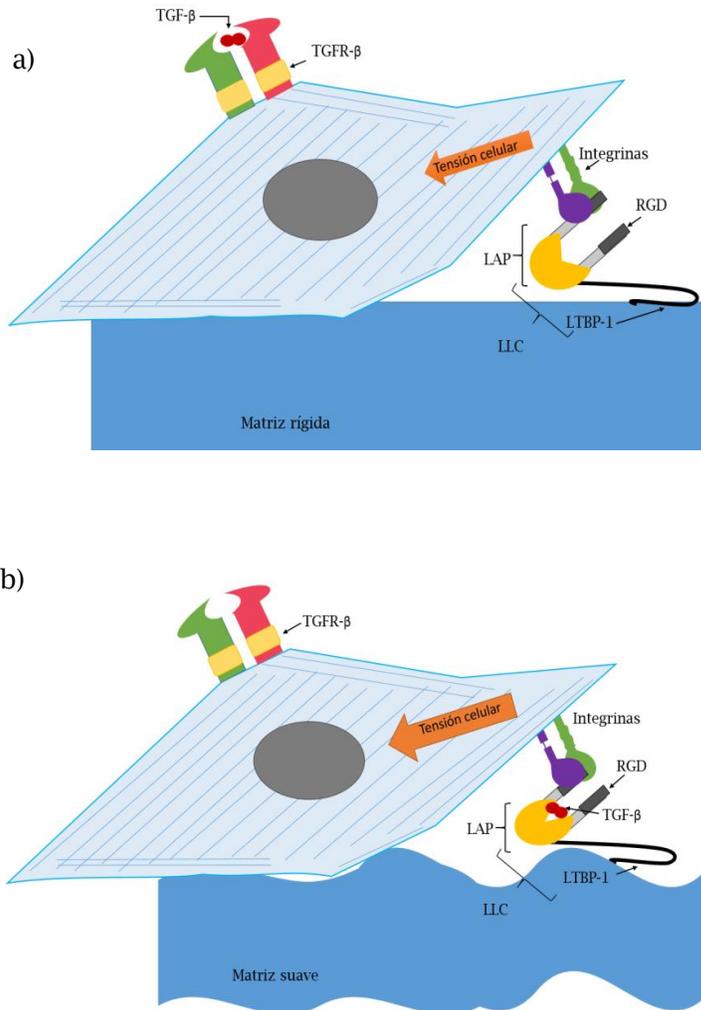


Fig. 3. Activación de TGFβ por tensión mecánica. a) La tensión ejercida por la fuerza contráctil de los miofibroblastos es capaz de promover la liberación del TGFβ latente en matrices rígidas. b) En matrices suaves no ocurre una liberación del TGFβ porque no se ejerce una tensión sobre el complejo LAP.

Las integrinas se unen a motivos RGD de LAP, lo que permite que cuando este complejo está anclado a una matriz rígida, es posible que la tensión generada por el citoesqueleto contráctil del miofibroblasto, transmitido a través de las integrinas, genere un cambio conformacional en el complejo y libere el TGFβ1, el cual se puede unir a los receptores TGFR-β, promoviendo señalizaciones intracelulares profibróticas (Fig 3a). Cuando los miofibroblastos residen en matrices suaves, la tensión generada por el citoesqueleto promueve que el complejo LLC sea arrastrado en lugar de generar un cambio conformacional que promueva la activación del TGFβ (3b) (15, 17).

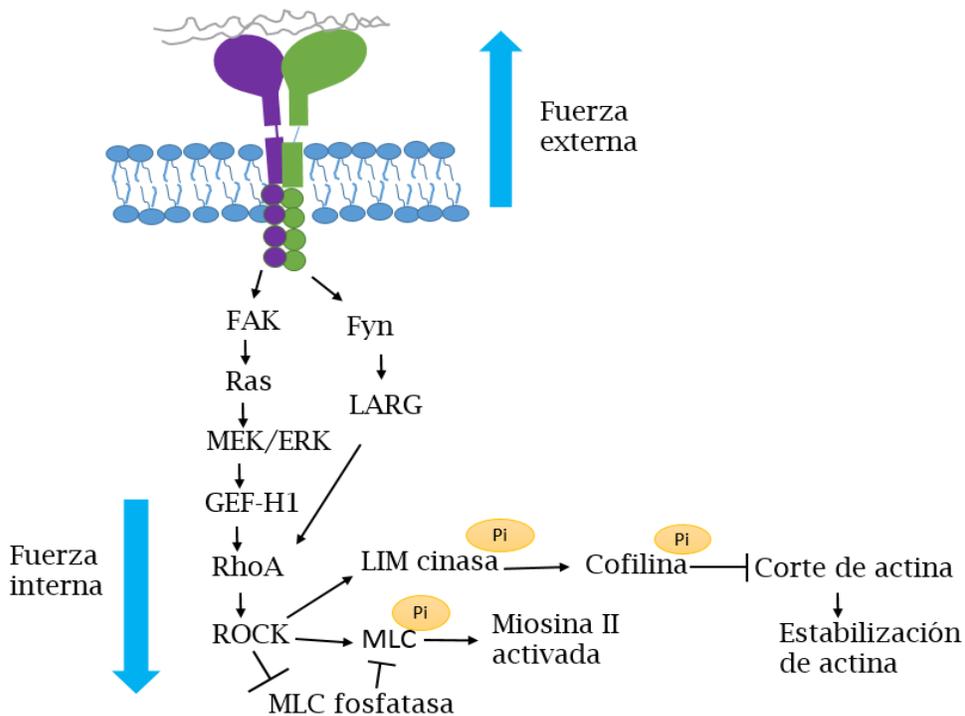


Fig. 4. Regulación del citoesqueleto de actina por RhoA. La tensión generada por la rigidez de la MEC (fuerzas externas), son percibidas por la célula a través de las integrinas, que se encargan de transmitir el impulso mecánico hacia el interior de la célula. *Biochemistry*. 2012; 51(38): 7420-7432, *Transl Res*. 2011; 158(4): 181-196.

Por otra parte, en respuesta a la tensión de la MEC, se inician diversas cascadas de señalización, una de las más estudiadas es la de RhoA/ROCK. Como se muestra en la **Figura 4**, la fuerza detectada por las integrinas activa la vía de FAK/Ras/ERK, que a su vez activan a GEF-H1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina H1), el cual media la activación de RhoA. Así mismo, Fyn también puede activar a RhoA por medio de la GEF LARG (Factor de intercambiador de nucleótidos de guanina LARG) (28). La activación de RhoA promueve la interacción con las proteínas efectoras que inducen la contractilidad de la actomiosina y la estabilidad de la actina. Esto ocurre porque ROCK activa a MLC (cadena ligera de la miosina) y a LIM cinasa por medio de fosforilación; MLC aumenta la actividad de la miosina II al ser fosforilada por ROCK y esta cinasa inhibe a la MLC fosfatasa. LIM

fosforilada promueve la polimerización de la actina al inhibir a cofilina. El conjunto de las fuerzas externas e internas actúan promoviendo la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, perpetuando un efecto fibrótico (28).

Biomimetización de tejidos

Los métodos tradicionales de cultivo consisten en una superficie plana y rígida en donde se siembran células sumergidas en un medio líquido, rico en nutrientes. Mientras que los procesos que ocurren en el cuerpo humano durante el desarrollo y progresión de alguna enfermedad, se llevan a cabo en células rodeadas por un microambiente complejo (29).

El microambiente o ambiente celular es vital para determinar el comportamiento celular, debido a que las células son capaces de percibir y responder a estímulos de su entorno local a micro y nano escala. Las modificaciones químicas y físicas en su medio pueden inducir cambios en las células, tales como la conformación del citoesqueleto y en la adhesión celular, mientras que las variaciones en la topografía también han mostrado cambios en la diferenciación, propiedades inmunosupresoras, adhesión y proliferación (30).

En el campo de la investigación, el acoplar distintas variantes que permitan imitar el ambiente tisular de una manera más precisa, resulta muy importante pues de esta manera, las investigaciones podrán arrojar resultados más cercanos a lo natural, en comparación con el que se tiene cuando se realiza cultivo en las cajas de cultivo celular de poliestireno (29).

Muchas de las plataformas biomiméticas usadas para terapia e investigación, están fabricadas con biomateriales. Los biomateriales son materiales destinados a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Existen tres grupos principales de biomateriales; cerámicas, polímeros sintéticos y polímeros naturales. Los andamios de cerámica

como la hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), son comúnmente usados como injertos óseos debido a su elevada rigidez mecánica (módulo de Young) y por su capacidad de potenciar la diferenciación de osteoblastos y su proliferación. Las desventajas que poseen estos materiales es que es difícil moldearlos al injertarlos y no se tiene control sobre su tasa de degradación. En cuanto a los biomateriales naturales, se encuentran las colágenas, proteoglicanos, sustratos con base de alginato y quitosan, muy útiles en la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos. Se caracterizan por ser biológicamente activos, promoviendo una excelente adhesión celular y crecimiento celular, son biodegradables, permitiendo que con el tiempo, la célula pueda degradar el biomaterial y sintetizar una MEC propia. La desventaja es que resulta complicado el fabricar andamios compuestos de estos materiales con una estructura homogénea y reproducible. Dentro de los polímeros sintéticos se encuentran poliestireno, ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA), los cuales son muy usados para la fabricación de andamios dada la facilidad con la que se puede moldear su arquitectura, así como por la tasa de degradación de materiales como el PLLA y PGA, la cual puede controlarse por la variación en la composición del mismo polímero. Sin embargo, la desventaja que tienen este tipo de materiales es que al degradarse producen CO_2 , el cual modifica el pH local haciéndolo más ácido, ocasionando una necrosis en el tejido (31).

Existen diversos materiales sintéticos no degradables, como el Polidimetil siloxano (PDMS), que permite que las células se puedan adherir a la superficie, tengan un funcionamiento normal, proliferen y migren sobre la superficie e incluso, a través de los poros del andamio. Al implantarse en un organismo, la respuesta inmune es mínima, lo cual evita que se dé un retraso en la cicatrización o un rechazo por parte del cuerpo. Cuando un material presenta este conjunto de propiedades se le considera como

biocompatible, lo cual resulta ser un criterio indispensable para poder emplearlo en plataformas biomiméticas (31, 32).

El tratar de imitar a los sistemas biológicos a través de materiales sintéticos y manipulables por el hombre, permiten medir la importancia de diferentes parámetros en la fisiología celular y tisular. El uso de biomateriales da como resultado el desarrollo de tecnologías que ayudan a reproducir procesos fisiológicos para responder a un gran número de preguntas y también para la generación de nuevas opciones para terapia. Uno de los biomateriales más usados en investigación es el PDMS, que permite la generación de plataformas de cultivo por las propiedades interesantes que posee: es transparente, biocompatible e inerte, se puede moldear fácilmente a microescala, es compatible con la impresión de proteínas de superficie y es de bajo costo (33, 34).

Polidimetilsiloxano (PDMS)

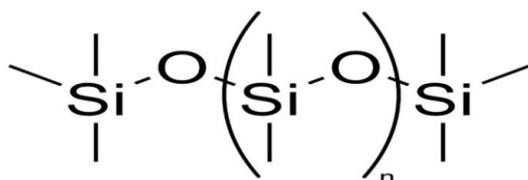


Fig 5. Fórmula química del PDMS. El PDMS tiene como fórmula química $(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, donde n es el número de repeticiones del monómero $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$.

El polidimetilsiloxano pertenece al grupo de organosilicones poliméricos, útil en el desarrollo de plataformas biomiméticas para el cultivo celular debido a sus propiedades físicas y químicas, entre las que se pueden mencionar una baja reactividad química, una relativa hidrofobicidad por la exposición de sus grupos metilo, impidiendo de inicio que las células puedan adherirse a la superficie (Fig. 5) (35). Se pueden usar diversos métodos para modificar la superficie de este material en cultivo celular, uno de ellos es la oxidación por plasma, en donde se utiliza el silanol

(SiOH) para alterar químicamente la superficie, a través de la aplicación de plasma atmosférico de aire o plasma de argón (29,34). La desventaja del método de oxidación por plasma es que se promueve la formación de capas de sílice frágil en la superficie del PDMS generados por cambios químicos a algunos cientos de nanómetros bajo la superficie del material. La capa de sílice se endurece y por lo tanto posee propiedades mecánicas distintas al del resto del elastómero elástico, propiciando que se formen fracturas en el PDMS por la diferencia de rigidez. El grosor de la capa de sílice que se forme, depende del tiempo de oxidación, la potencia del plasma, la presión de la cámara y la composición química del gas. Un método alternativo y efectivo para modificar la carga de la superficie del PDMS es el de oxidación a través del uso de luz UV y ozono. Este método consiste en un proceso de oxidación fotosensibilizada por la absorción de radiación de longitud de onda corta UV y oxígeno atómico. Una exposición a estos agentes por periodos cortos puede ocasionar la formación de una variedad de grupos hidrofílicos en la superficie de elastómeros de silicón, como el PDMS. Algunos de estos grupos son hidroxilos, carboxilos, aldehídos, peróxidos, entre otros. Al igual que ocurre con el tratamiento de plasma, el tratamiento UV/ozono en PDMS puede llevar a la formación de capas tipo sílice, que endurece de manera considerable la superficie suave del polímero (35). Por previas investigaciones, se ha descubierto que más de 30 minutos de tratamiento conllevan a la formación de 5 nm de grosor de la capa, donde aproximadamente el 50% consistía en sílice puro. Una ventaja del tratamiento UV/ozono sobre el de plasma es que durante el proceso, la temperatura aumenta menos que durante el plasma, evitando cualquier efecto térmico no deseado (35, 36).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de plataformas biomiméticas, es decir, que posean características propias de tejidos y órganos. Actualmente sigue siendo poco entendido el efecto que tienen los andamios sobre la morfología y señalizaciones bioquímicas. Para

el desarrollo de andamios biomiméticos, que posean propiedades bioquímicas, que permitan determinar cómo las interacciones mecánicas producen cambios a nivel fisiológico, celular y molecular, se requiere de un material de bajo costo y con un método de fácil fabricación (37, 38).

En este contexto este trabajo tiene el siguiente:

OBJETIVO

Evaluar diferencias en crecimiento celular, expresión de α -SMA, formación de fibras de estrés y cierre de herida entre fibroblastos cultivados sobre matrices de PDMS de diferente rigidez y con cajas de cultivo de poliestireno.

Objetivos particulares

- Estandarizar las condiciones de fabricación del PDMS y del cultivo celular
- Obtener la rigidez de las membranas de PDMS usadas.
- Evaluar tiempo de cierre de heridas.
- Valorar el crecimiento celular.
- Analizar la expresión de α -SMA.
- Identificar si existen diferencias al sembrar fibroblastos en matrices de PDMS, de diferente rigidez, en ausencia y presencia de una cubierta de colágena.
- Observar el arreglo del citoesqueleto de actina en fibroblastos cultivados sobre matrices sin y con una cubierta de colágena.

MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de fibroblastos humanos de pulmón normal. Las líneas usadas en el presente trabajo fueron la línea NHLF (Lonza) y la línea LL-24 (ATCC).

Cultivo celular en placas de poliestireno

Previo al cultivo sobre las matrices de PDMS, las líneas celulares NHLF y LL-24, se cultivaron por varios pasajes en cajas de poliestireno (costar) hasta alcanzar confluencia, manteniéndolas en incubación a 37° centígrados, con un 95% de humedad y 5% de CO₂. Se usó el medio de cultivo FGM-2 (Lonza) al 2% de SFB para el cultivo de la línea celular NHLF (Lonza) y F-12 (Gibco) al 15% de SFB para las células LL-24 (ATCC).

Fabricación de matrices de diferente rigidez de PDMS

Para la fabricación de estas plataformas de cultivo se usaron dos tipos de kits de PDMS; sylgard 184 y sylgard 527. Cada uno de los kits posee dos reactivos, uno de ellos es el prepolímero y el otro al agente curante. Ambos reactivos de cada kit se mezclaron de la siguiente manera: el PDMS sylgard 184 se mezcló a una proporción de 1:10 y el PDMS sylgard 527 a una proporción de 1:1.

Es importante pesar el sylgard 184 antes que el 527, dada su facultad de polimerizar a temperatura ambiente en un tiempo menor y posible formación de núcleos de polimerización previo al vaciado en las placas de cultivo.

Posterior al pesado de las muestras, en este trabajo se mezcló usando una herramienta rotativa (Dremel) a 15000 rpm. A continuación se colocaron las muestras en un desecador por 5 minutos para el caso del PDMS 527 y

aproximadamente 10 minutos en el caso del PDMS 184 para quitar las burbujas formadas en el proceso de mezclado.

Cuando se tuvieron listos los PDMS Sylgard 184 y 527, se mezclaron en proporción 1:10 y 1:5; es decir, se colocó una parte del Sylgard 184, contra 10 y 5 partes del Sylgard 527, respectivamente.

Como se resume en la **Tabla 2.**, al final se obtuvieron tres mezclas usadas para la fabricación de las matrices de diferente rigidez; Sylgard 527 en proporción 1:1, mezcla de Sylgard 527 y 184 en proporción 1:10 y mezcla de Sylgard 527 y 184 en proporción 1:5 (39).

| Composición | Proporción | Tipo de matriz |
|-----------------|------------|-------------------|
| Sylgard 527 | 1:1 | Suave |
| Sylgard 184:527 | 1:10 | Intermedia |
| Sylgard 184:527 | 1:5 | Intermedia-rígida |

Tabla 2. Composición de las distintas matrices usadas.

El PDMS 1:10 y 1:5 se mezclaron de la misma manera que el 1:1, y también se dejaron en el desecador por cinco minutos. Cuando las muestras salieron del vacío, se colocaron en las placas de cultivo, vertiendo el mismo peso en cada uno de los pozos. El tiempo de preparación fue de aproximadamente una hora y es recomendable que el tiempo para ingresar al horno, previamente calentado sea mínimo.

Se colocaron las muestras en el horno por 48 h a una temperatura de 60°C, debido a que las placas de cultivo no soportan temperaturas muy elevadas.

Ensayo de tracción uniaxial

Se obtuvieron los módulos de Young de los sustratos de PDMS fabricados por medio del ensayo de tracción uniaxial en el Instituto de Investigación en Materiales, con la ayuda del Dr. Francisco Sánchez Arévalo y la M. en C. Marisol Garnica Palafox, usando el miniprobador de tensión uniaxial.

Para el ensayo se fabricaron membranas de PDMS en moldes hechos con láminas antiadherentes para cocinar. Se usó un suaje de 38 mm de largo por 5 mm de ancho en la sección estrecha y 15 mm de ancho en las cabezas para cortar las muestras, en este caso llamadas probetas, usadas en el ensayo (**Fig. 6**). Una vez que las probetas fueron cortadas con el suaje se midió el grosor de cada una para obtener el área bajo la carga (A).

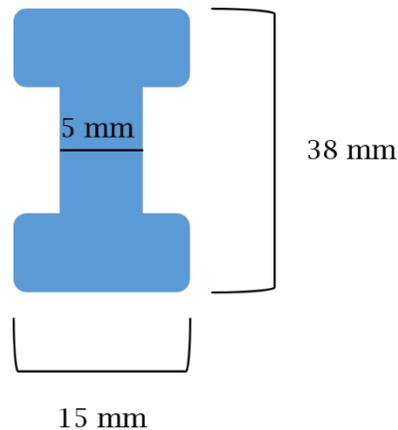


Fig. 6. Esquema de una probeta de PDMS.

Se cortaron de 3 a 5 probetas por mezcla y se montaron en el equipo para la realización del ensayo.

El ensayo de tracción uniaxial consiste en la deformación de las probetas hasta llegar a la fractura del material por la aplicación de una carga tensora a lo largo del eje de la probeta (**Fig.7**). Esto ocurre gracias a que el equipo posee dos mordazas, una en cada extremo, en donde una de ellas se desplaza en dirección opuesta a otra mordaza que se encuentra fija.

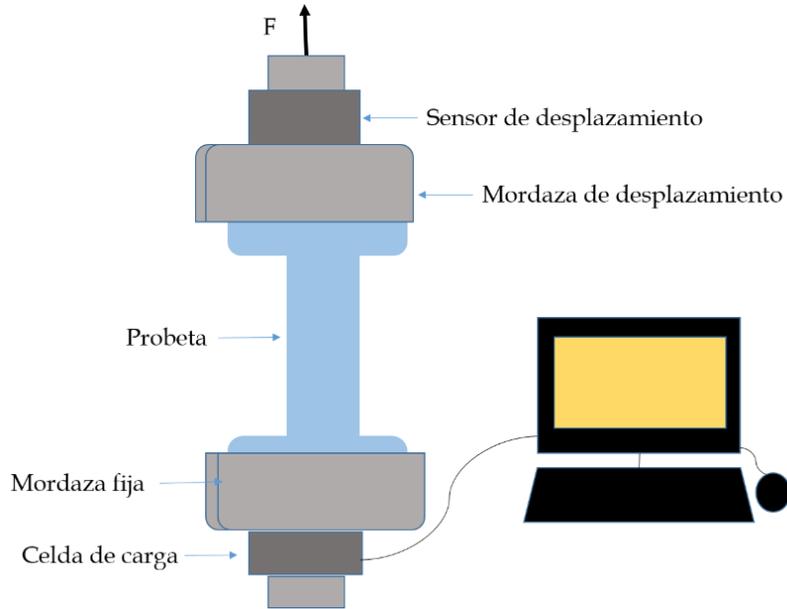


Fig. 7. Esquema del miniprobador de tensión uniaxial. Probeta montada para el ensayo de tracción uniaxial. La flecha indica la dirección a la cual se movía la mordaza de desplazamiento. Los datos generados por el aparato se procesaron en un computador.

Conforme se va aplicando la carga tensora sobre el material, las probetas experimentan un cambio en la longitud inicial (l_0). Los datos generados en este ensayo van a servir para obtener una curva de esfuerzo-deformación, donde el esfuerzo (σ) se determina con la siguiente fórmula:

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

Donde F es la carga aplicada a la sección transversal de la probeta, sus unidades son los Newtons (N) y A_0 es el área de la sección transversal original, es decir, es el área antes de que se le aplique la carga, sus unidades son los metros cuadrados (m^2). Por lo que las unidades de σ son los kilopascales (kPa).

Y para la determinación de la deformación en modelos lineales se usa la siguiente fórmula:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

La curva de esfuerzo-deformación brinda la información necesaria para que a partir de su pendiente se obtenga el módulo de proporcionalidad o de Young (E), ya que este segmento corresponde al módulo de elasticidad del material.

Sin embargo, cuando el esfuerzo y la deformación no son proporcionales se dice que no se cumple con la Ley de Hooke, como ocurre en materiales hiper elásticos como el PDMS (ref.) (**Fig. 8a**). En estos casos la curva de esfuerzo-deformación no es lineal, por lo tanto, para la obtención de E se usa un modelo no lineal, el modelo de Ogden, el cual fue usado en este trabajo para obtener los módulos de elasticidad (**Fig. 8b**).

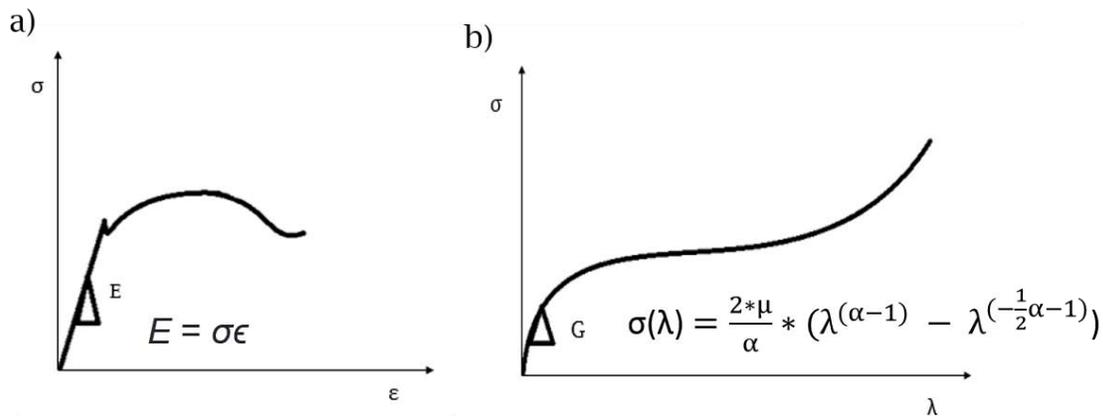


Fig. 8. Esquemas de curvas esfuerzo-deformación. a) Curva lineal de esfuerzo-deformación, en donde E es la pendiente de la porción lineal inicial. Se señala la fórmula de la Ley de Hooke para la obtención del módulo de Young. b) Curva no lineal de esfuerzo-deformación, en donde en la abscisa se tiene la razón de cambio de elongación o deformación de la probeta y en la pendiente da el valor de $G=\mu$, el cual es requerido para calcular a E en el modelo de Ogden (fórmula señalada en el esquema).

En el modelo de Ogden se maneja una razón de deformación (λ) en las abscisas en lugar de sólo la deformación:

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Se realiza un despeje de la fórmula para obtener a λ :

$$\epsilon = \frac{l_f - l_0}{l_0}$$

$$\varepsilon = \frac{l_f}{l_0} - \frac{l_0}{l_0}$$

$$\varepsilon = \frac{l_f}{l_0} - 1$$

$$\varepsilon + 1 = \frac{l_f}{l_0} = \lambda$$

Con la razón de deformación establecida (λ), se calculó a E con la siguiente fórmula:

$$E = 2G(1 + \nu)$$

$$E = 2G(1 + 0.5)$$

$$E = 3G$$

Donde $G=\mu$ es el módulo de corte o cizalla, una constante elástica que describe el cambio de forma que experimenta un material elástico cuando se aplican esfuerzos cortantes y el cual está relacionado con el módulo de Young.

Y donde ν es la razón de Poisson, que indica la razón entre una elongación axial y la contracción lateral del material, en respuesta a un esfuerzo tensil. Para materiales isotrópicos (características como el módulo de Young no dependen de la dirección en las que son medidas) como el PDMS, el valor de ν es de 0.5 (40).

Para la obtención de E, se ocuparon los datos de desplazamiento y fuerza, generados por el miniprobador de tensión uniaxial, y fueron procesados en un script proporcionado por el Laboratorio de mecánica y micromecánica de sólidos, IIM, UNAM.

Reducción en la hidrofobicidad del PDMS

Para mejorar la adhesión de las células sobre el material se trataron las matrices con dos métodos distintos.

El primer método fue colocando etanol al 70% durante 15 minutos, las placas con pozos cubiertos por PDMS se introdujeron a la campana de flujo laminar y se expusieron a la luz UV por 20 minutos (41). El segundo método consistió en tratar las placas de cultivo con PDMS en el UV ozone cleaner, ProCleaner™ Plus (Bioforce nanosciences) por 10 minutos (35). En ambos casos, después del tratamiento, se colocó en cada pozo un mililitro de medio F-12 con SFB al 10%. Las placas se dejaron incubando toda la noche y al día siguiente se sembraron los fibroblastos de la línea celular NHLF. Se realizó un registro fotográfico cada 24 h.

Cultivo celular en placas con matrices con PDMS

Las monocapas de células confluentes en las cajas de poliestireno se disociaron usando trispina/EDTA (Sigma-Aldrich). Las células en suspensión se centrifugaron y contaron con la cámara de Neubauer, para tener un número inicial de células similar en cada pozo. Se sembraron 150, 000 células en las placas de 6 pozos, 20, 000 células sobre las placas de 12, pozos para el ensayo de transfección y 100, 000 células en las placas de 12 pozos para el ensayo de herida.

Ensayo de herida

Se sembraron 100, 000 células de la línea NHLF en placas de 12 pozos y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 100% en cada pozo. Se trazaron líneas verticales en el centro de los pozos. En las matrices de 17 kPa se usaron puntas de 10 μ l, en las de 50 y 150 kPa se usaron puntas de 200 μ l y en las células que se cultivaron sobre la caja de poliestireno se usaron puntas de 1000 μ l. El hecho de utilizar puntas de distinto volumen fue para conseguir heridas de un ancho similar. Las heridas se

monitorearon cada 24 horas y se tomó registro fotográfico para el posterior análisis del cierre de la herida usando el software woundhealingtool del programa de análisis ImageJ.

Conteo celular

Se deseaba conocer la tasa de proliferación de los fibroblastos usando el WST-1 cell proliferation Assay kit (Roche), sin embargo, debido a que el PDMS absorbía el reactivo se decidió realizar otro tipo de cuantificación. Se tomaron fotografías con la cámara Nikon que está incorporada al microscopio invertido Nikon, en el objetivo 10x, de fibroblastos NHLF cultivados en los distintos módulos de Young a las 24, 48 y 72 h. Se tomaron fotos de 5 campos distintos en cada pozo (Fig. 9). Se contaron todos los núcleos por campo y se procesaron las gráficas y los análisis estadísticos en el programa GraphPad Prism.

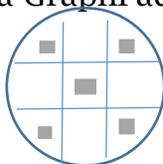


Fig. 9. Esquema del pozo con los cuadrantes usados para la toma de fotos. Los cuadros grises representan las áreas seleccionadas para fotografiar.

Recubrimiento de matrices de PDMS con colágena

Las placas de cultivo que contenían las matrices de PDMS se trataron con luz UV/Ozono en el UV ozone cleaner, ProCleaner™ Plus (Bioforce nanosciences) durante 10 minutos e inmediatamente después se colocaron 2 ml de colágena al 0.1% en ácido acético al 0.20 mM. Se dejaron incubando durante toda la noche y al día siguiente, previo a la siembra de las células, se dio un lavado con medio F-12 sin suero para retirar los restos de la colágena sin adherir.

A la par, aquellas placas con matrices de PDMS que se usaron para cultivar células sin una cubierta de colágena, se trataron el mismo día con

UV/Ozono por 10 minutos, pasado el tiempo se colocó de manera inmediata medio F-12 con SFB al 15% y se dejó incubar durante toda la noche.

Extracción y cuantificación de proteínas

Para poder observar los niveles de expresión de la proteína α -SMA por medio de la técnica de Western blot (Wb), se levantaron las células con tripsina de las cajas de poliestireno donde se cultivaron los fibroblastos por varios pasajes. De las células que se obtuvieron, se contaron con hemocitómetro y se tomó una fracción con aproximadamente 300, 000 células. A esta fracción de fibroblastos se les extrajo proteína con buffer RIPA (Sigma-Aldrich), se le llamó proteína basal “B (2GPa)” y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que se extrajeron las muestras de proteínas provenientes de las matrices de PDMS (Fig. 7).

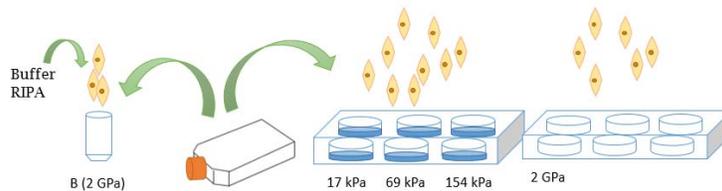


Fig. 10. Extracción de proteína. Se usó una basal “B (2GPa)” para determinar los niveles de expresión de α -SMA de los fibroblastos antes de ser cultivados sobre las matrices de PDMS.

El resto de los fibroblastos en suspensión se sembró sobre cada pozo de las placas usadas y pasado el tiempo de cultivo establecido de cada experimento, se extrajo la proteína de estos fibroblastos usando buffer RIPA. Después de la lisis de los fibroblastos con el buffer RIPA, se centrifugaron las muestras a 12, 000 rpm durante 15 minutos para retirar los restos celulares. Se conservó el sobrenadante con las proteínas solubles en él y se procedió a realizar la cuantificación con el Micro BCA Assay kit (Thermo Fisher Scientific).

Western Blot

Se realizó una electroforesis usando geles SDS-PAGE al 10%, en el cual se cargó una cantidad de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en cada pozo. Se hizo la transferencia de las proteínas del gel SDS-PAGE al 10%, a una membrana de PVDF en el trans-blot turbo (Bio-Rad). Para la detección de la proteína α -actina del músculo liso (α -SMA) se usó el anti- α -SMA hecho en ratón (DAKO, No. Cat. M0851) en una dilución de 1:500 y para el control de carga se usó el anticuerpo primario contra β -actina hecho en conejo (Sigma, No. Cat. A5441) a una concentración de 1:10, 000. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche, al día siguiente se hicieron lavados con PBS-T 0.05%. Después de los lavados se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos de 700 y 800 nm, anti-ratón (LI-COR, No. Cat. P/N 926-32210) y anti-conejo (LI-COR, No. Cat. P/N 926-68071), respectivamente. Se reveló la membrana en el aparato Odyssey CLx. El bloqueo de la membrana y dilución de los anticuerpos se hicieron usando el Odysseyblocking buffer PBS (Li-corBioscience).

Ensayo de transfección

Se usó el reactivo cellLight actin-RFP, BacMam 2.0 (Invitrogen) para transfectar el gen de actina marcado con red fluorescentprotein (RFP) a la línea celular NHLF. Se realizaron duplicados para cada rigidez (17 kPa, 69, kPa, 164 kPa y 2 GPa) en placas de 12 pozos, sembrando 20, 000 fibroblastos en cada matriz. Se colocaron 2 μl del reactivo por pozo, antes de que las células se adhirieran a la matriz. Se dejó incubar toda la noche y al día siguiente se tiñeron los núcleos con Hoechst (ThermoFisher), usando una dilución de 1:5000 μl en medio FGM-2, la cual se dejó actuar por cinco minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS, para evitar un efecto de citotoxicidad del colorante por una alta concentración. Se volvió a colocar medio FGM-2 para la toma de fotografías en el microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imagen (Biorad).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES DE PDMS

Los módulos de Young presentan una alta dispersión en los datos en ausencia de un método controlado de fabricación

Los módulos de Young de las mezclas de PDMS se establecieron de acuerdo a lo reportado por Palchesko *et al.* (39). Para corroborar que las medidas obtenidas en el laboratorio correspondían a las halladas en la literatura, se realizaron pruebas de tensión uniaxial con el miniprobador de tensión uniaxial del IIM.

Las primeras mediciones de las matrices mostraron una alta dispersión en los datos obtenidos entre las muestras de cada mezcla, como se observa en la **Figura 11**. Este resultado indica que nuestro método de fabricación daba como resultado matrices con una rigidez heterogénea o por lo menos poco reproducible para cada preparación.

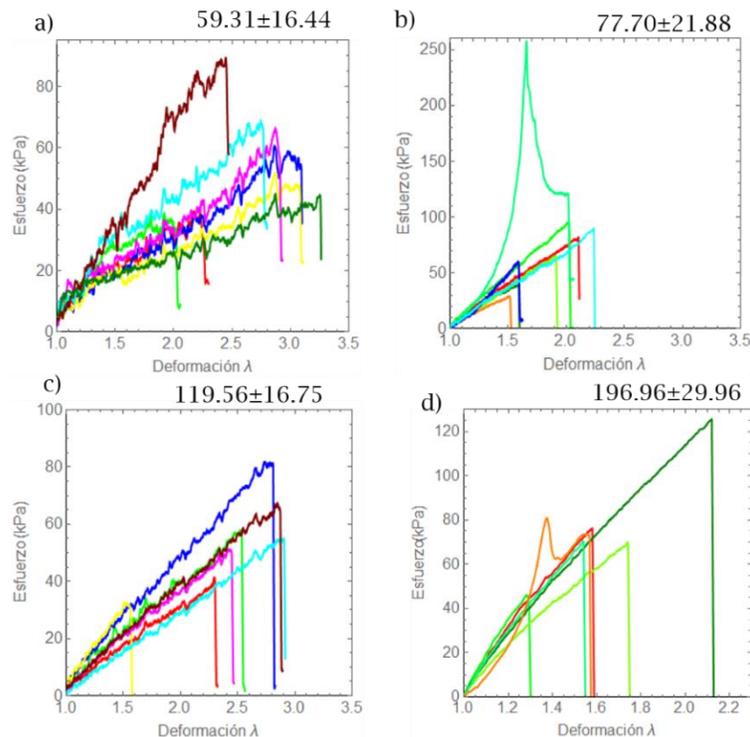


Fig. 11. Módulos de rigidez de matrices de PDMS previas a la estandarización del método de fabricación. Se consideraron cuatro mezclas de PDMS: a) Sylgard 527, 1:1. b) Mezcla del Sylgard 181 y Sylgard 527, 1:20. c) Mezcla del Sylgard 181 y Sylgard 527, 1:10. d) Mezcla del Sylgard 181 y

Sylgard 527, 1:5. Se midieron de 3 a 5 réplicas de cada membrana fabricada con las distintas mezclas de PDMS.

En este contexto, fue importante establecer condiciones estandarizadas en la fabricación del PDMS, que a continuación se detallan, para reducir la dispersión de los datos.

Se modificaron varios parámetros con respecto al método de fabricación original, como se muestra en la **Tabla 3**.

| Parámetros | Condiciones |
|------------------------|---|
| Tiempo de mezclado | 5 minutos (herramienta rotativa *Dremel*) |
| Tiempo en el desecador | 5 minutos |
| Tiempo de fabricación | 48 h |
| Temperatura | 60 °C |
| Tiempo de preparación | 1 h |

Tabla 3. Parámetros modificados durante el proceso de estandarización. Se fijaron las condiciones de distintos parámetros que podrían estar influyendo en las variaciones del módulo de Young.

Con las condiciones de fabricación ya establecidas, se midió de nueva cuenta el módulo de Young de las matrices de PDMS de diferente rigidez.

Como se muestra en la **Figura 12**, este método estandarizado dio como resultado una reducción en la dispersión de los datos y en el valor de los módulos de Young, en comparación a la primera medición realizada.

Se descartó medir la matriz de 1:20, manteniendo solamente una matriz de rigidez intermedia (Mezcla del Sylgard 184 y 527 en proporción 1:10).

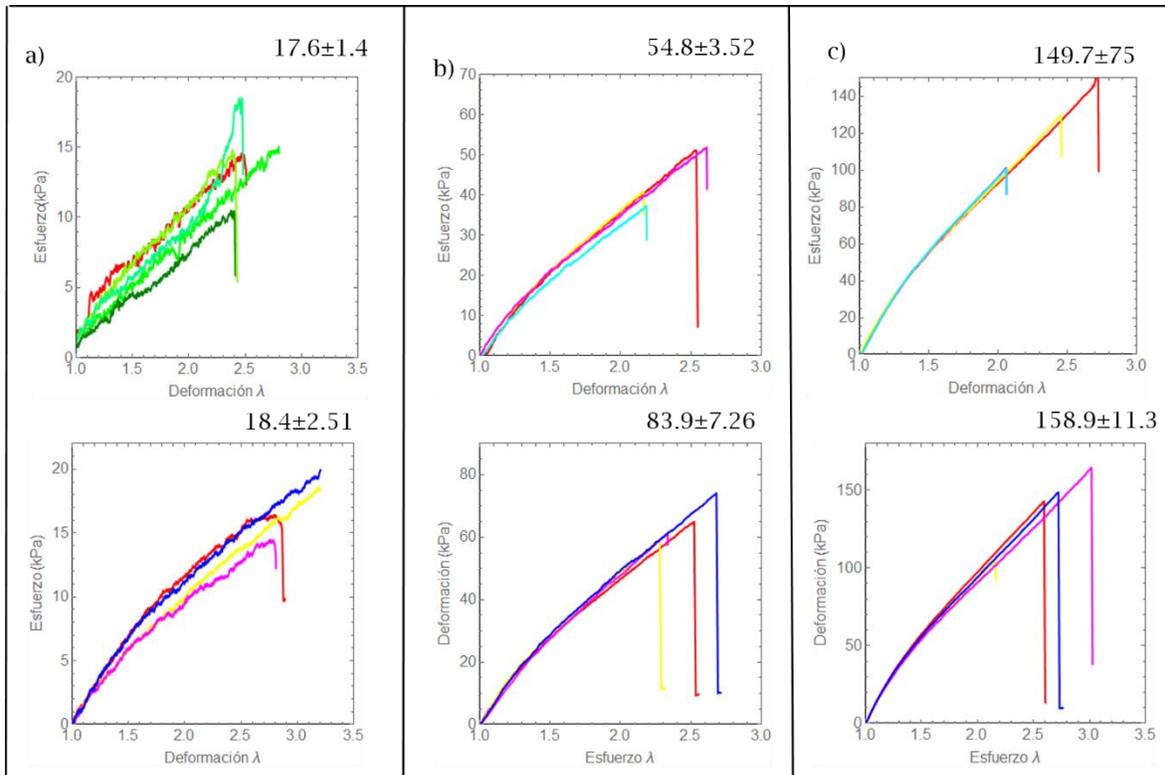


Fig. 12. Mediciones por duplicado del módulo de rigidez de matrices de PDMS fabricadas con el método estandarizado. Se consideraron tres mezclas de PDMS: a) Sylgard 527, 1:1. b) Mezcla del Sylgard 181 y Sylgard 527, 1:10. c) Mezcla del Sylgard 181 y Sylgard 527, 1:5. Se midieron de 3 a 5 réplicas de cada membrana fabricada con las distintas mezclas de PDMS.

Es importante hacer notar que bajo condiciones controladas de fabricación, aunque los resultados obtenidos muestran baja dispersión, no son iguales a los reportados en la literatura.

En la **Tabla 4** se muestra la comparación de los módulos de Young obtenidos en el ensayo de tracción uniaxial con respecto a los reportados por *Palchesko et al.* (39).

| PDMS | Palchesko et al., 2012 (kPa) | LaNsBioDyT No E (kPa) | LaNsBioDyT E1 (kPa) | LaNsBioDyTE2 (kPa) |
|---------|------------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| 1 en 1 | 5 | 59.31 ± 16.44 | 17.6 ± 1.4 | 18.45 ± 2.51 |
| 1 en 20 | 20-50 | 77.70 ± 21.88 | | |
| 1 en 10 | 50 | 110.56 ± 16.75 | 54.87 ± 3.52 | 83.99 ± 7.26 |
| 1 en 5 | 130 | 196.96 ± 29.96 | 149.75 ± 1.58 | 158.97 ± 11.30 |

Tabla 4. Se muestran los resultados reportados por Palchesko *et al* (39), los obtenidos en este trabajo antes de estandarizar las condiciones (LaNsBioDyT No E) y dos mediciones después de estandarizar (LaNsBioDyT E1 y 2).

Se continuó trabajando con estos módulos de rigidez, tomando el promedio de los dos experimentos estandarizados (LaNsBioDyT E 1 y 2), quedando de la manera que se muestra en la **Tabla 5**.

| PDMS | Módulo de Young (kPa) |
|------|-----------------------|
| 1:1 | 17±3 |
| 1:10 | 69±16 |
| 1:5 | 154±9 |

Tabla 5. Módulos de Young. De cada mezcla de PDMS se sacaron los promedios finales, con DE, obtenidos de los dos experimentos independientes realizados. n de 1:1 =7, n de 1:10 = 8, n de 1:5 = 8. Los valores se redondearon para facilitar el manejo de los datos.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Es importante señalar que durante la realización de este trabajo, al inicio del proyecto se realizaron algunas observaciones en matrices de PDMS fabricadas sin un método estandarizado. Se señala al pie de figura cuáles fueron dichos ensayos.

En las matrices fabricadas con un método estandarizado no se hace ningún tipo de señalamiento.

Adhesión celular sobre matrices de PDMS

Se hicieron diferentes pruebas para reducir la hidrofobicidad del PDMS, comparando el uso de etanol + UV contra el uso de UV/Ozono. Se cultivaron fibroblastos NHLF en cada matriz tratada con UV+ etanol y UV/Ozono y se incubaron por 6 días. Como se muestra en la **Figura 13**, desde las 24 horas, las células mostraban una mejor adhesión en las matrices tratadas con UV/ozono. De acuerdo a las observaciones se decidió que este sería el método a usar para cultivar a los fibroblastos.

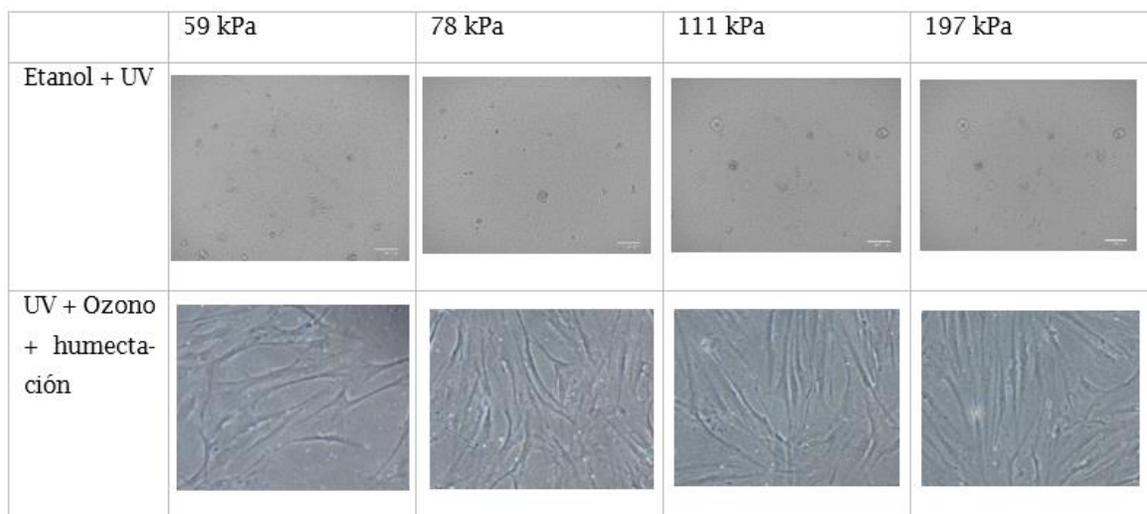


Fig. 13. Fibroblastos NHLF cultivados durante 24h en matrices de PDMS. Al recibir un tratamiento con UV/ozono, las matrices de PDMS permiten una mejora en la adhesión de las células, en comparación con aquellas que fueron cultivadas sobre PDMS tratado únicamente con etanol + UV. En este ensayo se trabajó sobre matrices fabricadas sin un método de fabricación de este polímero.

Los fibroblastos cultivados sobre las cajas de poliestireno de 2GPa presentan un cierre de herida más acelerado.

Se realizó un ensayo de cierre de herida con los fibroblastos NHLF cultivados sobre las matrices de PDMS de diferente rigidez y placas de poliestireno para saber en qué condiciones de cultivo los fibroblastos cierran la herida en un menor tiempo como se muestra en la **Figura 14a**. Como se puede observar en la **Figura 14b**, no existen diferencias en el cierre de herida entre las matrices de PDMS, sin embargo, sí hay diferencia entre los fibroblastos cultivados en las placas de poliestireno y los crecidos sobre PDMS a las 24 h.

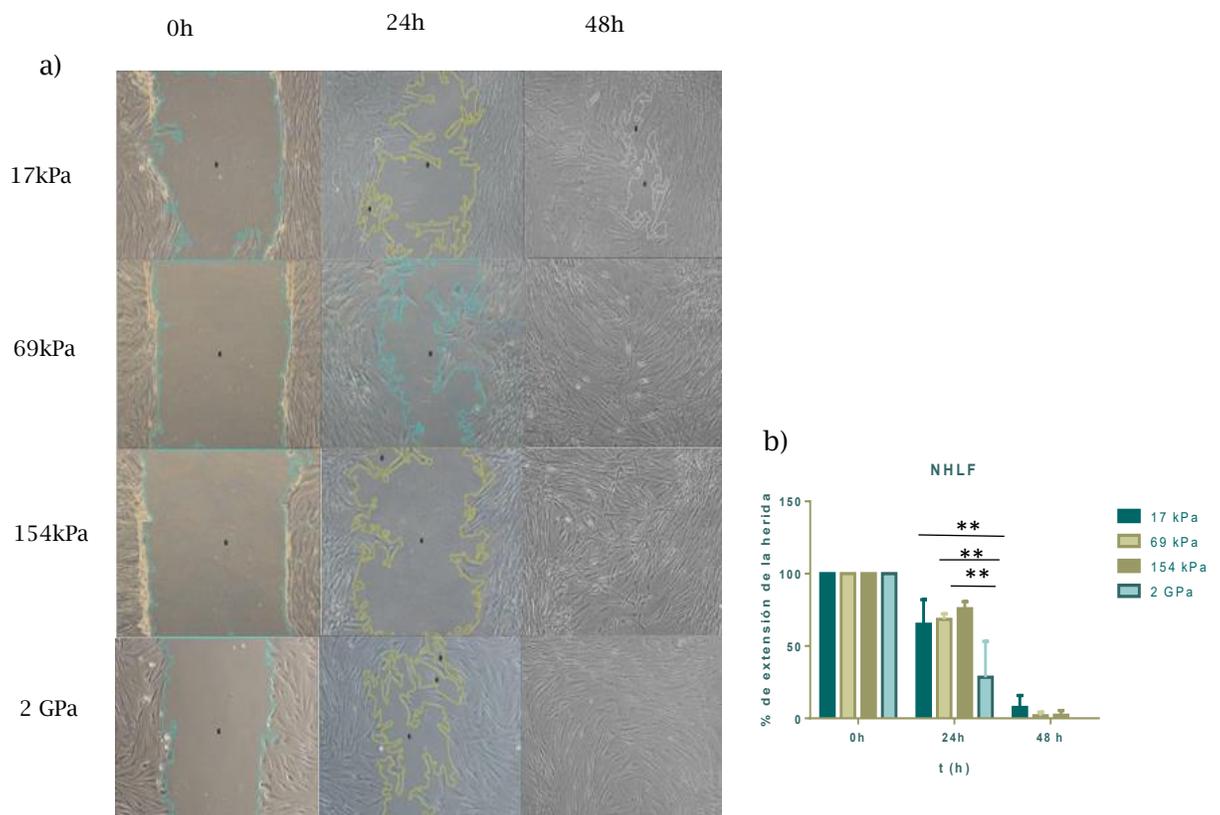


Fig. 12. Respuesta funcional de fibroblastos a la rigidez en células NHLF. a) Fotografías de cierre de herida en las diferentes matrices en tres tiempos; 0, 24 y 48 h. Se tomaron a un aumento de 10x. b) Gráfica del cierre de la herida. Datos representativos de dos experimentos independientes por triplicado.

Número de células

Par saber si existía un crecimiento diferencial entre las matrices de PDMS y las placas de cultivo celular de poliestireno, se hizo conteo de núcleos en cultivos de células NHLF, sembradas sobre matrices de 17 y 69 KPa, y en placas de poliestireno de 2GPa.

Como se observa en la Figura 15, se tuvo un aumento significativo en el número de células en las placas de 2GPa, respecto a las matrices de PDMS de 17 y 69 kPa, a las 48 y 72h.

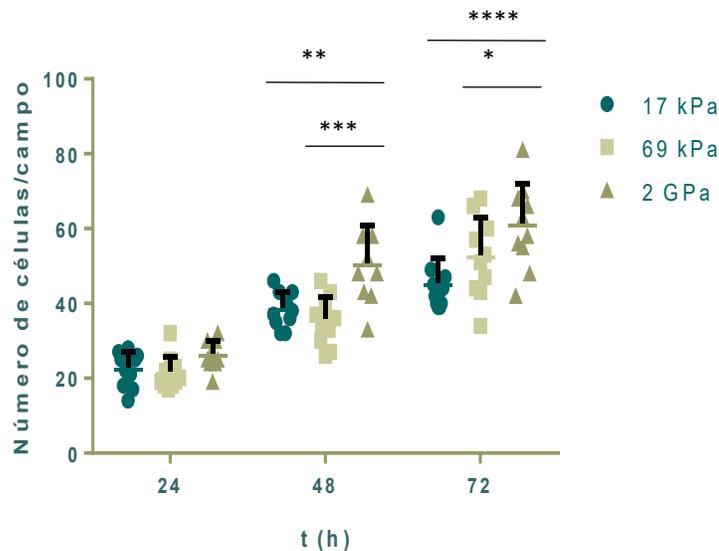


Fig. 15. Gráfica de conteo celular. Se contó el número de células por cada campo fotografiado en matrices de PDMS (17 y 69 kPa) y placas de poliestireno (2GPa), en tres tiempos (24, 48 y 72 h). c) Resultado del conteo de células por campo en microscopio invertido de contraste de fases, con aumento 10x. Análisis estadístico hecho con ANOVA de dos vías, $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***). Resultados representativos de dos ensayos independientes con triplicados.

La expresión de α -SMA se ve afectada por la rigidez del sustrato en fibroblastos NHLF

En un primer ensayo se midió la expresión de α -SMA por Western blot, de los fibroblastos cultivados en las matrices de PDMS hechas sin un método de fabricación estandarizado. Como se observa en la **Figura 16a**, los resultados

sugieren una tendencia en el aumento de la expresión de α -SMA, en proporción a la rigidez del sustrato.

Como se puede ver en la **Figura 16 b**, cuando se estandarizó el método de fabricación del PDMS, se volvió a medir la expresión de α -SMA con la misma línea celular, mostrando el mismo patrón en la expresión de esta proteína. En este segundo ensayo también se midió la expresión basal de la α -SMA “B (2GPa)”, es decir, la expresión de α -SMA que tienen los fibroblastos antes de ser cultivados sobre las matrices de PDMS. El basal mostró una expresión mayor de α -SMA con respecto a los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS y la placa de poliestireno (2GPa).

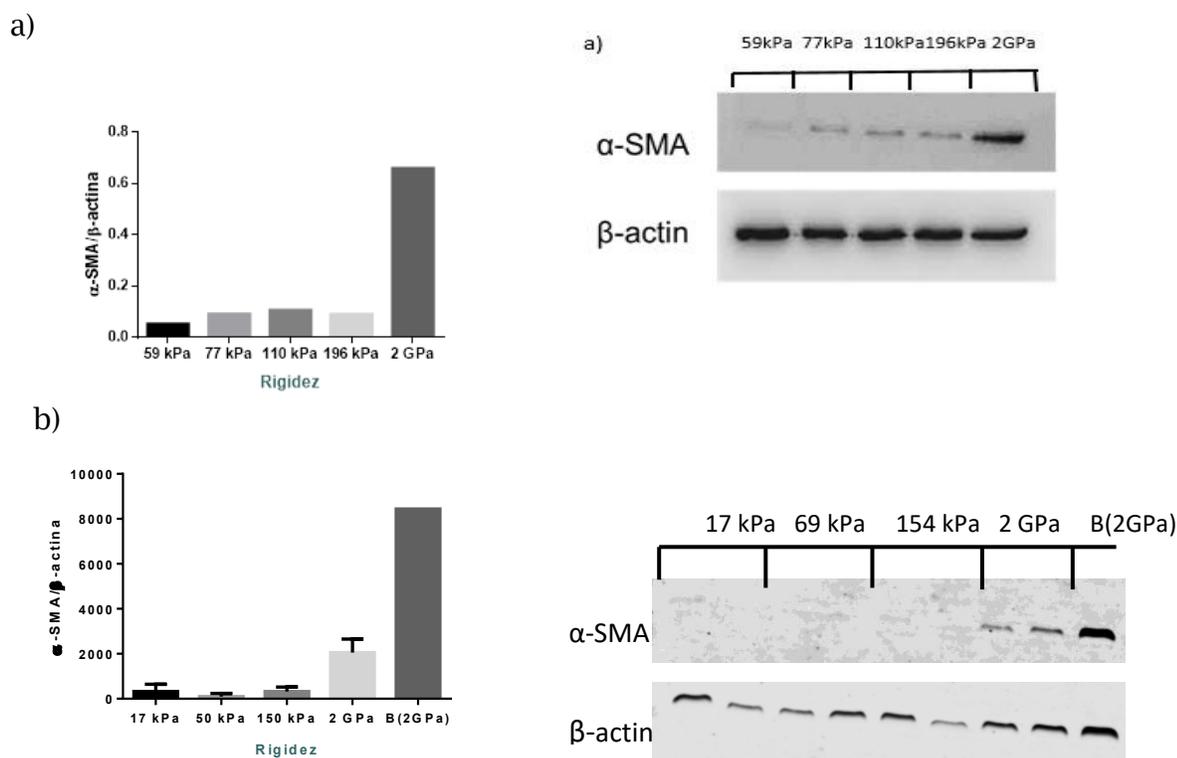


Fig. 16. Expresión de α -SMA de fibroblastos NHLF. a) Evaluación de la expresión de α -SMA en fibroblastos en matrices de PDMS previo a la estandarización del proceso de fabricación. b) Expresión de α -SMA de fibroblastos cultivados en matrices de PDMS posterior a la estandarización del proceso de fabricación. El tiempo de cultivo para este experimento fue de 6 días.

Expresión de α -SMA de fibroblastos LL-24 cultivados sobre matrices de PDMS

Para posteriores trabajos funcionales se propuso trabajar con la línea celular normal LL-24, cuyos pasajes fueron elevados (p23). Se cultivaron sobre matrices de PDMS de diferente módulo de rigidez y con la finalidad de observar si existe un comportamiento semejante con los fibroblastos NHLF que se muestran en la **Figura 16**. Los resultados mostrados en la **Figura 17a** no mostraron el mismo patrón en la reducción de la expresión de α -SMA en los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS.

Se pensó que quizá la falta de respuesta ante los estímulos mecánicos de las matrices se debía al elevado pasaje en el que se trabajaron las células. Se usó la misma línea celular pero en un pasaje menor (p5) y se evaluó de nuevo la expresión de α -SMA. Como se muestra en la **Figura 17b**, los fibroblastos no presentaron una disminución considerable en la expresión de α -SMA. Es importante señalar que a partir de este ensayo, se usó un basal -B(2GPa)-, el cual no muestra diferencias importantes en la expresión de α -SMA con respecto a los fibroblastos cultivados en las matrices de PDMS y en la placa de poliestireno (2GPa).

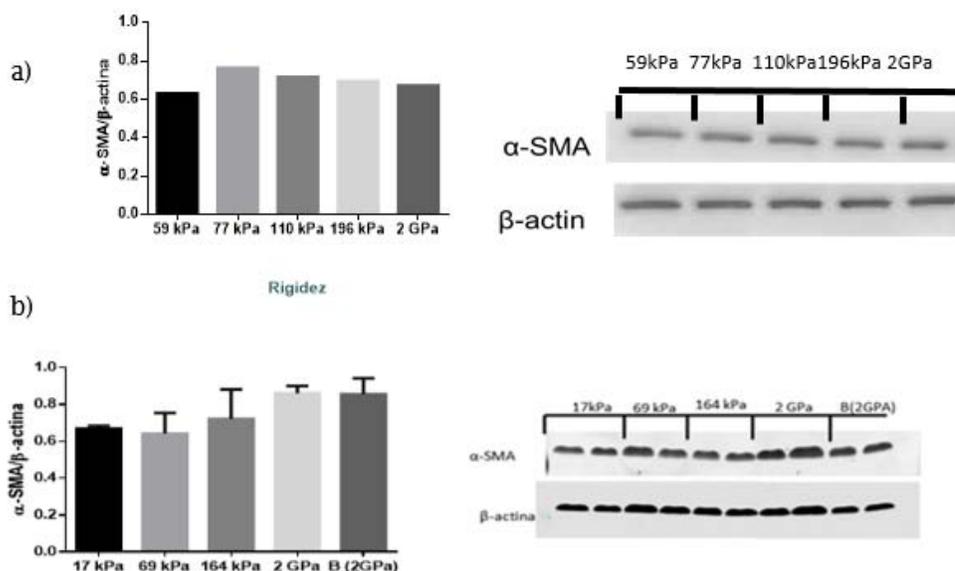


Fig. 17. Expresión de α -SMA de fibroblastos LL-24 cultivados sobre matrices de diferente rigidez. a) Expresión de α -SMA de fibroblastos LL-24 de pasaje 23 (p23) cultivados en matrices de PDMS. b) Expresión de α -SMA de fibroblastos de pasaje 5 (p5) cultivados sobre matrices de PDMS de distinta rigidez. Se midió la expresión de α -SMA de los fibroblastos de p5 antes de crecerlos sobre el PDMS

para observar si existían diferencias en la expresión de esta proteína al realizar el sub-cultivo en las matrices de PDMS y de 2GPa.

Una posible causa es que los fibroblastos podrían estar manteniendo una memoria mecánica que impidiera la reducción de la expresión de α -SMA, por lo que se extendió el tiempo de cultivo desde 6, 12 y hasta 18 días, sobre las matrices de PDMS. Como se puede ver en la **Figura 18**, no se observó una disminución importante en la expresión de α -SMA en ninguno de los tres tiempos.

Por lo anterior se descartó que la elevada expresión de α -SMA de los fibroblastos LL-24 se debiera al pasaje o a una memoria mecánica.

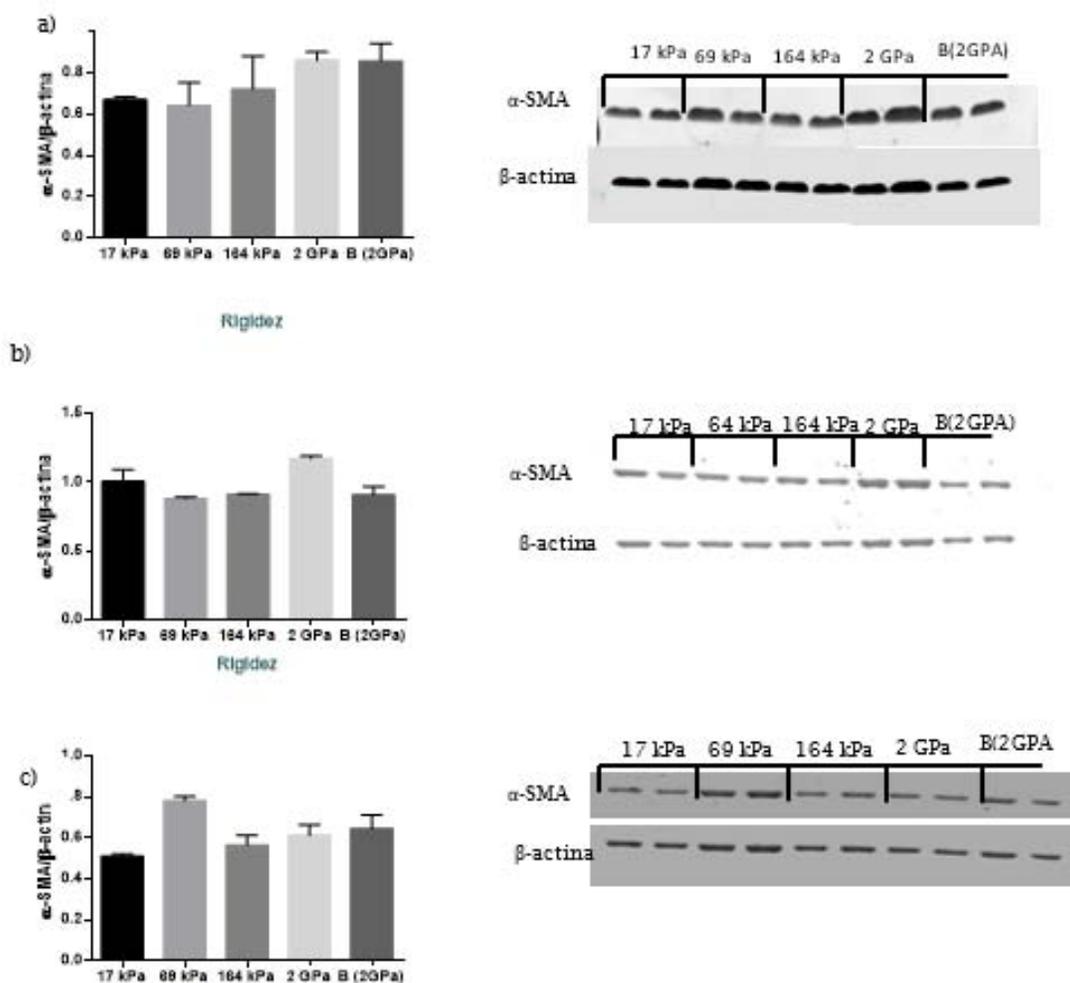


Fig. 18. Expresión de α -SMA en diferentes tiempos. Se cultivaron los fibroblastos de la línea celular LL-24 desde el pasaje 5, durante 6 (a), 12 (b) y 18 (c) días. Se extrajo la proteína de cada cultivo celular y se realizó Wb para ver la expresión de α -SMA. El basal proviene de la proteína que se extrajo previo al cultivo en las matrices de PDMS.

Matrices de PDMS cubiertas con colágena tipo I

Evaluación de la expresión de α -SMA en fibroblastos NHLF y LL-24 cultivados sobre matrices con colágena.

A pesar de no obtener resultados positivos en la reducción de la α -SMA en los fibroblastos LL-24, se decidió que se seguiría trabajando con esta línea celular y con la NHLF. El siguiente paso fue la adición de una cubierta de colágena sobre los sustratos, integrando otro elemento que generara un ambiente más natural.

La finalidad de adicionar la cubierta de colágena fue el tratar de ver alguna respuesta diferente a las mostradas previamente. Para ello se cultivaron a los fibroblastos de ambas líneas celulares en matrices con cubierta de colágena y en matrices sin cubierta de colágena, permitiendo de esta manera, la comparación entre ambas condiciones.

En la **Figura 19** se observan a los fibroblastos de la línea LL-24, mientras en que en la **Figura 20** se tiene a los fibroblastos de la línea NHLF. Los cultivos celulares se mantuvieron durante un menor tiempo (3 días) para evaluar si este factor favorecía la reducción de la expresión de α -SMA en la línea LL-24, ya que se pensó que el mantener a los fibroblastos en estrecho contacto por una confluencia total podría inducir cierto estrés en las células.

Una de las primeras observaciones fue que, independientemente de la línea celular, en las matrices de PDMS sin cubierta de colágena se ve un mayor número de células refringentes, en comparación con las matrices con cubierta de colágena, a las 24h.

Cuando se realizó el Wb para cuantificar la expresión de α -SMA se pudo observar que el patrón de expresión es similar en los fibroblastos cultivados sobre PDMS con y sin colágena de ambas líneas celulares, mostrando que al reducir el tiempo de cultivo a tres días, es posible obtener una disminución en la expresión de α -SMA en los fibroblastos de la línea LL-24.

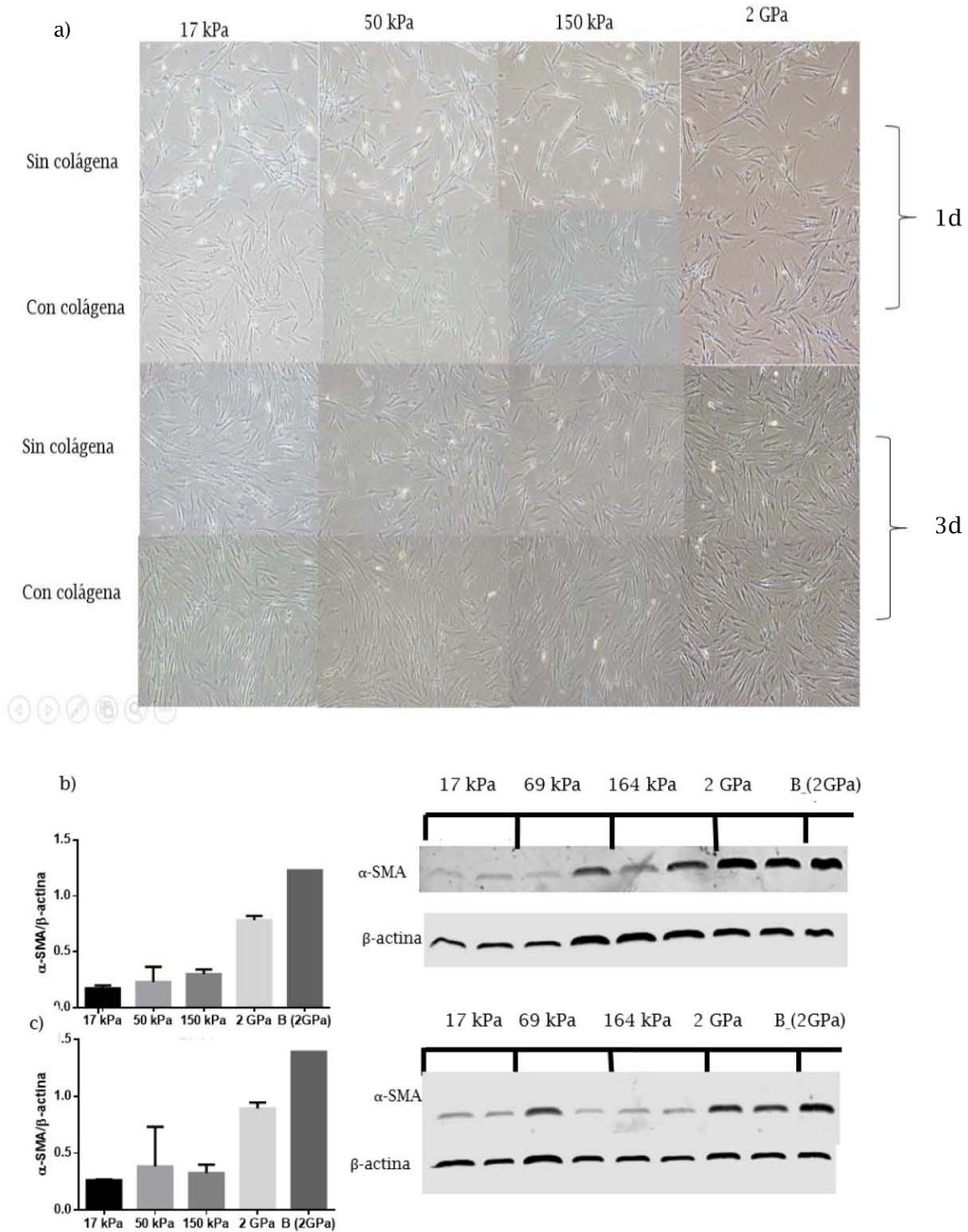


Fig. 19. Cultivo de fibroblastos de la línea celular LL-24 en matrices de diferente módulo de Young sin y con cubierta de colágena. a) Registro fotográfico a 1 y 3 días de los fibroblastos cultivados sobre las matrices sin y con cubierta de colágena. Wb de la expresión de α -SMA de fibroblastos cultivados sobre matrices sin cubierta de colágena (b) y con cubierta de colágena (c) durante tres días. Imágenes tomadas con un aumento de 10x.

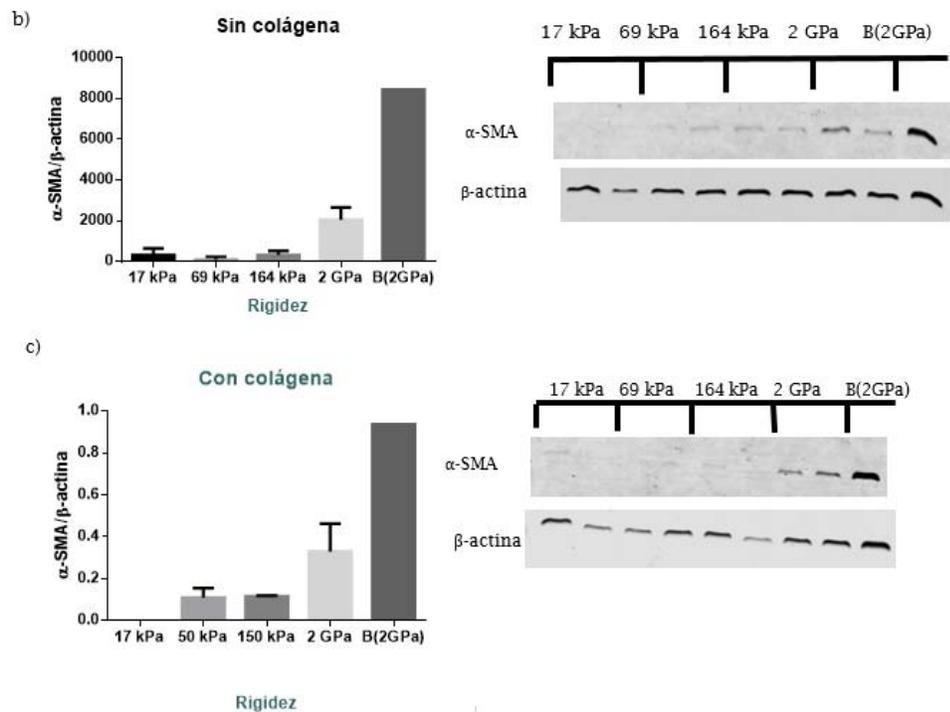
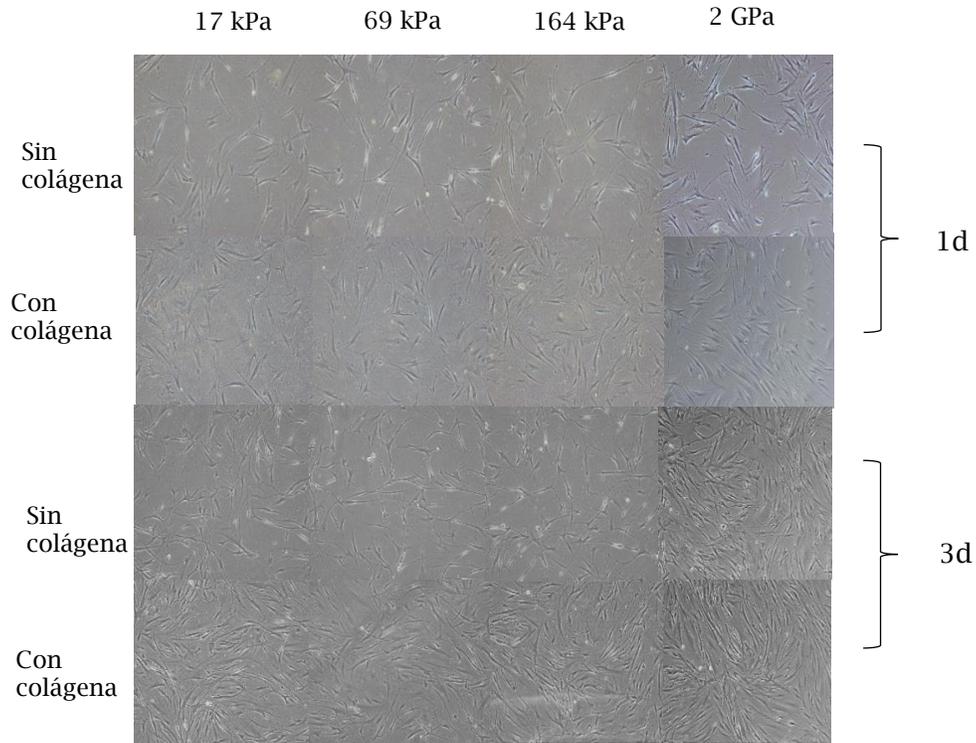


Fig. 20. Cultivo de fibroblastos de la línea celular NHLF en matrices de diferente módulo de Young sin y con cubierta de colágena. a) Registro fotográfico a 1 y 3 días de los fibroblastos cultivados sobre las matrices sin y con cubierta de colágena. Wb de la expresión de α -SMA de fibroblastos cultivados sobre matrices sin cubierta de colágena (b) y con colágena (c), durante tres días. Imágenes tomadas con un aumento de 10x.

Patrón de expresión de actina citoplasmática en fibroblastos cultivados sobre matrices de diferente rigidez en presencia y ausencia de una cubierta de colágena.

Para ver el efecto que la rigidez de la matriz tiene sobre el citoesqueleto de actina, se sembraron fibroblastos de las líneas NHLF, sobre matrices de PDMS de diferente rigidez y en placas de cultivo. Estos sustratos se cubrieron con una cubierta de colágena y al mismo tiempo, se siguió trabajando con los sustratos sin cubierta proteica.

El objetivo de adicionar una cubierta de colágena fue el tratar de ver si se observaba alguna diferencia en el patrón de expresión de la actina, en contraste con los fibroblastos crecidos sobre sustratos sin una cubierta proteica.

A los fibroblastos trabajados en este ensayo se les transfectó el gen de la actina marcado con RFP, usando un baculovirus como vector.

Como se puede ver en las **Figuras 21 y 22**, independientemente de la cubierta proteica, en las matrices de PDMS de diferente rigidez se puede ver que los fibroblastos poseen una morfología más alargada y con una menor presencia de fibras de estrés en su citoplasma. En cambio en las placas de poliestireno, se pueden apreciar fibroblastos más anchos y con una expresión marcada de fibras de estrés.

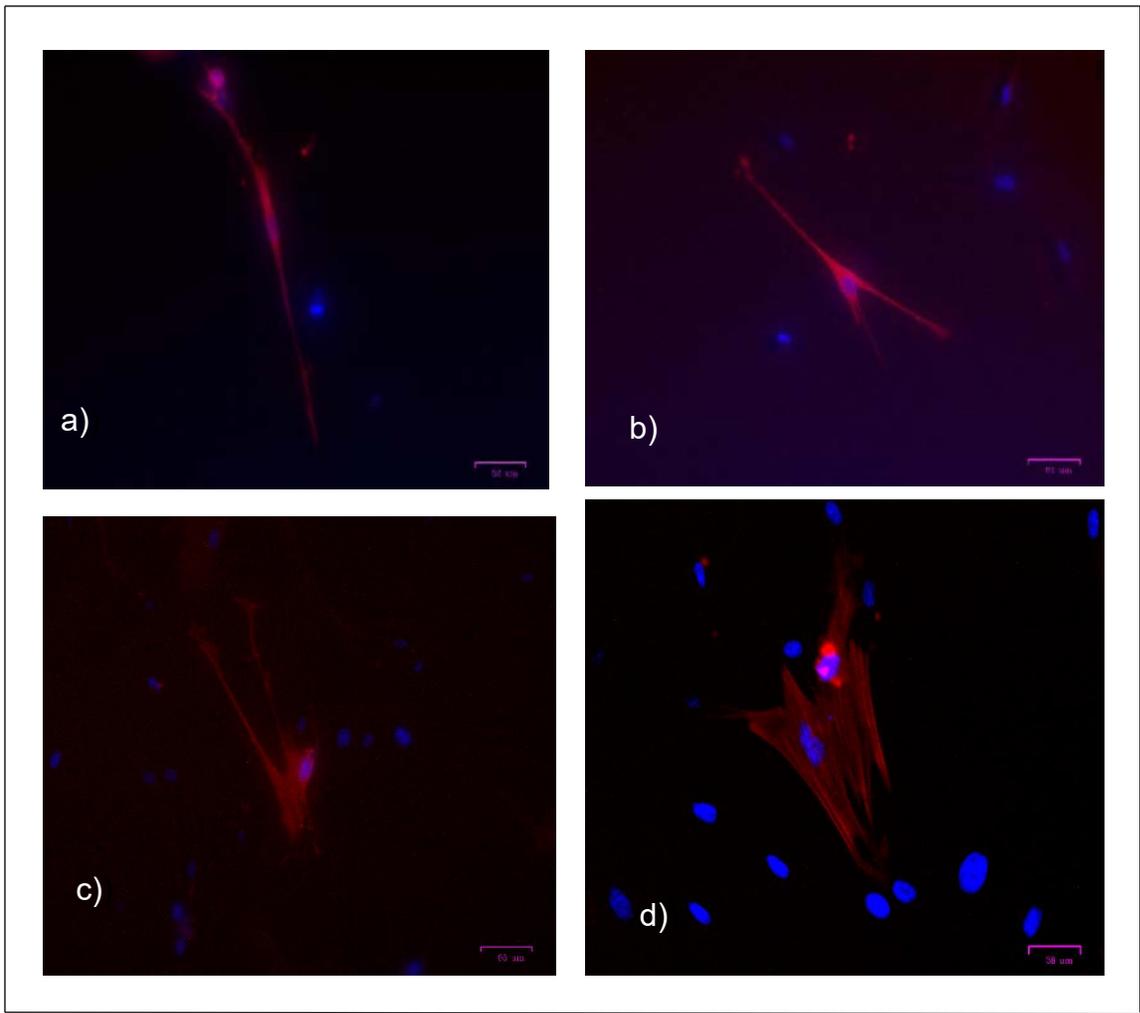


Fig. 21. Expresión de actina citoplasmática en fibroblastos de la línea NHLF cultivados sobre matrices de PDMS y placas de cultivo celular sin cubierta de colágena tipo I. a) Fibroblastos cultivados sobre matrices de 17 kPa; b) Fibroblastos cultivados sobre matrices de 69 kPa; c) Fibroblastos sobre matrices de 164 kPa; d) Fibroblastos cultivados en placas de cultivo (2GPa).

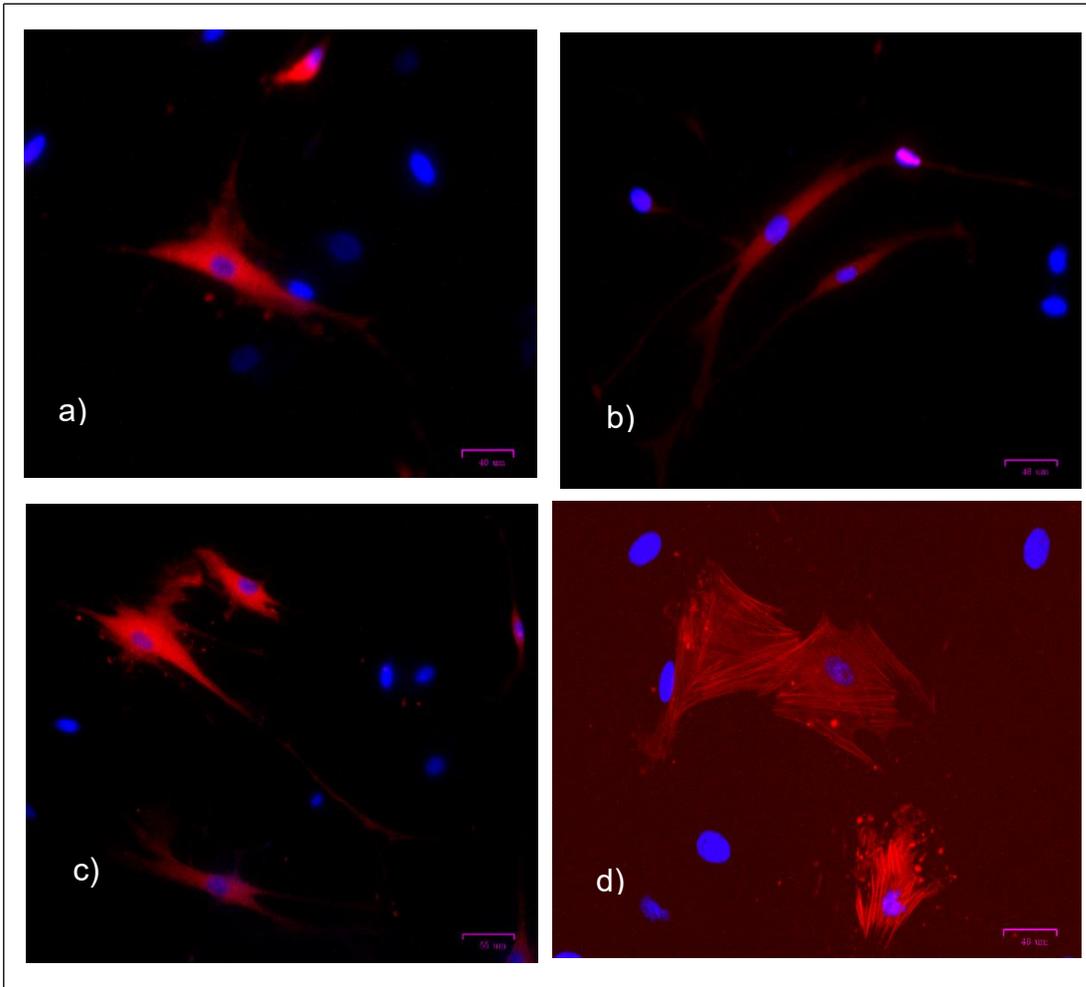


Fig. 22. Expresión de actina citoplasmática en fibroblastos de la línea NHLF cultivados sobre matrices de PDMS y placas de cultivo celular con cubierta de colágena tipo I. Fibroblastos cultivados sobre matrices de 17 kPa (a), de 69 kPa (b), de 164 kPa (c) y en placas de cultivo (2GPa) (d).

DISCUSIÓN

Los módulos de Young de las matrices de PDMS de diferente rigidez que se obtuvieron en los ensayos de tracción uniaxial, mostraban una alta dispersión entre los datos de cada muestra y un módulo de Young mayor al reportado en la literatura (39). Por lo anterior se decidió modificar y establecer algunos parámetros en el método de fabricación para poder obtener repetibilidad en los módulos de Young de cada mezcla y reducir la dispersión en los datos.

Se consiguió la repetibilidad deseada y la reducción en la desviación estándar de los valores de rigidez de cada muestra aunque no se pudieron imitar los módulos de Young reportados en la literatura (39). Se piensa que estas diferencias entre los módulos de Young obtenidos en nuestro grupo y el de Plachesko, se pueden deber a que los métodos usados por cada grupo de estudio son distintos en varios puntos, como en los tiempos de mezclado, de desecación al vacío y de polimerización.

Hay fuerzas que se ejercen sobre el material durante los pasos de mezclado y de desecación. Esto resulta interesante porque al tratarse de un fluido no Newtoniano, su viscosidad va a variar de acuerdo a las fuerzas y temperatura que se le apliquen, es importante mencionarlo porque se ha demostrado que la viscosidad es un factor importante en la determinación de las propiedades mecánicas del PDMS (42, 43). Por lo anterior, se puede pensar que estos elementos podrían ser determinantes en los módulos de rigidez obtenidos en ambos estudios.

Otra variable a considerar, para tratar de explicar las diferencias entre los módulos de Young obtenidos en ambos estudios es el tiempo de curado o polimerización. En ambos estudios se usan temperaturas similares; 65 °C contra los 60°C que se usaron en el presente trabajo. Sin embargo, los tiempos de polimerización a estas temperaturas son diferentes; el grupo de Palchesko reporta un rango de tiempo de curado, de 12 a 24 h, mientras

que en nuestro caso fueron 72 h, en todos los experimentos. En nuestra experiencia, el tiempo de curado es determinante en el grado de polimerización del material y por lo tanto, de su rigidez.

Se logró el cultivo de fibroblastos sobre las matrices de PDMS con el uso de UV/Ozono (REF), prefiriendo este método por encima del de UV + etanol, ya que el tratamiento con UV/ozono es más rápido y los fibroblastos se adhieren en menos tiempo.

La desventaja de ambos métodos es que el efecto que tienen es reversible en un corto lapso. Si no se mantiene hidratado el polímero, en pocos minutos vuelve a ser hidrofóbico, por lo tanto, el paso de hidratación posterior al tratamiento con UV/ozono es crítico. Por lo tanto, en cuanto al tratamiento de UV/ozono, se recomienda no tardar más de un par de minutos en hidratar las matrices de PDMS. Se recomienda el uso de medio con SFB, en la hidratación, ya que se ha visto que debido a la porosidad del PDMS, se tiene la capacidad de adsorber proteínas que pueden favorecer la reducción en la hidrofobicidad del material y el aumento en la adhesión celular (44).

Una vez que se consiguió cultivar a los fibroblastos sobre las matrices de PDMS, se realizaron ensayos de herida con los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS y de poliestireno. Se observó un cierre más acelerado de la herida cuando se cultivaron a los fibroblastos sobre el poliestireno, en cambio, no se observó una diferencia en el tiempo de cierre de la herida entre los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS. En otros estudios se ha visto que los fibroblastos tienen una mayor tendencia a migrar hacia sustratos más rígidos, corroborando los resultados (45).

Así mismo, es probable que la proliferación también sea un factor importante en el cierre de la herida, no se usó ningún reactivo que detuviera la división celular como la mitomicina-C, por lo que se sugiere

que para futuros experimentos el uso de agentes que detengan el ciclo celular para poder asegurar que la progresión en el cierre de herida se debe a un proceso de migración y no de proliferación.

También se hizo un conteo de las células sembradas sobre las diferentes matrices y la caja de poliestireno, mostrando que los fibroblastos crecidos en las cajas de poliestireno tuvieron un mayor número de células con respecto a las matrices de PDMS de diferente rigidez. En previos estudios se respaldan los resultados aquí obtenidos, en ellos se muestra que existe un aumento en la proliferación y una disminución de la apoptosis en las cajas de poliestireno en contraste con los fibroblastos crecidos en matrices de PDMS, medido por BrdU y por el porcentaje de fibroblastos positivos para caspasa 3/7 (45).

Cuando se iniciaron los experimentos exploratorios con la línea celular NHLF, se vieron resultados alentadores sobre diferencias en la expresión de α -SMA de acuerdo a la rigidez de la matriz, independientemente de si la matriz fue fabricada o no, con el método estandarizado. Sin embargo al cambiar de línea celular se pudo ver que no se repetían los resultados. La línea celular LL-24, no mostraba cambios en los niveles de expresión de α -SMA al cultivarlos sobre las matrices de PDMS, que son mucho menos rígidas que el poliestireno. En un inicio se pensó que no todas las células responden de la misma manera a la rigidez del sustrato, a pesar de que se traten del mismo tipo celular. Sin embargo, cuando se redujo el tiempo (de 6 a 3 días), y también el número de células sembradas (de 150 000 a 80 000), se notó una disminución en la expresión de α -SMA en las células cultivadas sobre las matrices de PDMS, ausencia y presencia de la capa de colágena, con respecto a la caja de 2 GPa. Se propone que al pasar más tiempo en cultivo, las células proliferaron llegando a confluencia, provocando que el estrecho contacto entre los fibroblastos pudiera generar

tensión entre las células y por lo tanto, la activación del gen ACTA2, que codifica para la α -SMA. Por otra parte, un mayor número de fibroblastos podría propiciar la activación de una mayor concentración de TGF β o algún otro factor profibrótico que estimule el aumento en la expresión de α -SMA (15).

Cuando se utilizaron las muestras basales (2 GPa) se pudo observar cómo los niveles basales de α -SMA son elevados y que al pasar los fibroblastos a sustratos de menor rigidez, la presencia de esta proteína disminuye. La elevada cantidad de α -SMA nos indica que previo al cultivo en las matrices de PDMS ya se tenían miofibroblastos en las cajas de cultivo de poliestireno. Al pasar estas células a las matrices de PDMS de diferente rigidez se revierte el fenotipo de miofibroblasto a fibroblasto, de acuerdo a la expresión de α -SMA. En este revertimiento de fenotipo podrían estar actuando vías mecanotransductoras, como la de Rho A, la activación de TGF- β , la vía de Hippo y/o procesos epigenéticos. Un aumento en la metilación de islas CpGs del gen que codifica para la α -SMA (ACTA2) se relaciona con un silenciamiento del gen, por lo que se esperaría una reducción en la metilación al cultivar a los fibroblastos sobre las matrices de PDMS (46).

Se comparó la expresión de α -SMA entre los fibroblastos de dos líneas celulares, cultivados sobre matrices de PDMS y las placas poliestireno sin una cubierta de colágena, y además, se comparó la expresión de α -SMA de fibroblastos cultivados sobre mismos sustratos pero con una cubierta de colágena. Se hicieron observaciones de los fibroblastos cultivados en estas dos condiciones (sin colágena y con colágena) y se pudo apreciar en fotos que los fibroblastos sobre sustratos sin cubierta de colágena presentaron un mayor número de células refringentes a las 24h, indicando que podrían estar muriendo o que no estaban bien adheridas aún. No se hicieron estudios adicionales para comprobar esta hipótesis. Se sugiere, nuevamente, un ensayo de apoptosis o la evaluación de moléculas de

adhesiones focales, como los niveles de fosforilación de las FAKs (quinasas de adhesiones focales) o integrinas como las $\alpha_5\beta_1$ o $\alpha_v\beta_3$, encargadas de promover la formación de adhesiones focales (47). En cuanto a la expresión de α -SMA, independientemente de la ausencia o presencia de colágena, no se observaron diferencias entre los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS, sin embargo, sí se dio una diferencia con respecto a los fibroblastos cultivados sobre las cajas de poliestireno, en ambas condiciones.

Por último, para poder apreciar el rearrreglo del esqueleto de actina de los fibroblastos cultivados sobre las matrices de PDMS, se hizo una transfección de actina marcada con RFP. El citoesqueleto de actina se mostró diferente de acuerdo a la rigidez del sustrato; en las matrices de PDMS, en su mayoría los fibroblastos mostraron un color rojizo en el citoplasma, sin patrones bien definidos. En el caso de los fibroblastos cultivados sobre las cajas de poliestireno se pudieron apreciar, en mayor proporción, células con el citoplasma más distendido y con lo que parecen ser fibras de estrés de actina, incluso se observaba la corteza de actina en los bordes de las células. En este experimento se pudo comprobar que la rigidez de la matriz tiene un efecto sobre el arreglo del citoesqueleto de actina de los fibroblastos. Se sabe que la α -SMA es reclutada en las fibras de estrés formadas en el citoplasma, por lo que el tener una mayor presencia de células con fibras de estrés podría estar indicando una proporción mayor de miofibroblastos en las cajas de poliestireno. Datos que concuerdan con los resultados obtenidos por western blot de α -SMA (48,49).

Por otra parte, se observó que las células cultivadas sobre las matrices cubiertas con colágena tenían un fenotipo más integro con respecto a las cultivadas sin cubierta de colágena, después de la transfección. Se sabe que en las transfecciones, el DNA exógeno se inserta de manera aleatoria en el DNA propio del fibroblasto, pudiendo producir efectos adversos en las

células. Probablemente la transfección pudiera estar dañando a las células de manera más severa cuando no se tiene la capa de colágena, debido a que esta cubierta de colágena les podría estar activando señales de supervivencia (50).

CONCLUSIONES

Se establecieron los parámetros que permitieron la determinación de los módulos de Young de cada una de las mezclas, los cuales son repetibles y con baja dispersión, indicando cierta homogeneidad del material.

El uso de UV/ozono disminuye la hidrofobicidad del material y promueve la adhesión celular en poco tiempo. El paso de la hidratación usando medio con SFB es esencial y es importante no dejar secar el PDMS durante el proceso de cultivo celular.

Los videos tomados parecen indicar que los fibroblastos pulmonares de la línea NHLF se adhieren más rápido sobre las matrices de PDMS que en las placas de poliestireno.

El cierre de herida es significativamente mayor en las placas de cultivo de 2GPa.

Hay un aumento significativo en el número de células cultivadas sobre las placas de cultivo, con respecto al número de fibroblastos sobre matrices de PDMS en el tiempo. No se observan diferencias significativas entre los fibroblastos cultivados sobre las diferentes matrices de PDMS.

Los resultados sugieren la existencia de diferencias en la adhesión de células en presencia y ausencia de una cubierta de colágena sobre las matrices de PDMS, sin embargo se requiere de estudios complementarios para llegar a una aseveración.

Se observó una reversión en el fenotipo de miofibroblastos a fibroblasto, de acuerdo a la disminución en la expresión de α -SMA en las líneas celulares NHLF y LL-24 (a los 3 días y con baja confluencia), al cultivar los fibroblastos sobre los tres tipos de matrices de PDMS.

En el ensayo de transfección de actina marcada con RFP, se ve un mayor número de células con fibras de estrés en el citoplasma cuando se crecen

sobre las cajas de 2 GPa, con respecto a los fibroblastos pertenecientes a los cultivos sobre PDMS, independientemente de si se encuentran sobre una superficie sin una cubierta de colágena o con ella.

REFERENCIAS

1. Selman, M., Pardo, A. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 3, 3.
2. King, T. E., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 378: 1949-1961
3. Selman, M., Pardo, A. (2014). Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis: An integral model. *Am J Respir Crit Care Med.* 189: 1161-1172.
4. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell.* 153(6): 1194-217.
5. Pardo, A., & Selman, M. (2016). Lung fibroblasts, aging, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 13: 417-421.
6. Souders, C. A., Bowers, S. L. K., & Baudino, T. A. (2009). Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circ Res.* 105(12): 1164-76.
7. Krenning, G., Zeisberg, E. M., & Kalluri, R. (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol.* 225(3): 631-7
8. Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(5), 392-401.
9. Hagood, J. S., Prabhakaran, P., Kumbla, P., Salazar, L., MacEwen, M. W., Barker, T. H., Selman, M. (2005). Loss of Fibroblast Thy-1 Expression Correlates with Lung Fibrogenesis. *Am J Pathol.* 167(2), 365-379.
10. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., & Gabbiani, G. (2007). The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am J of Pathol.* 170(6), 1807-1816.
11. Desmoulière, A., Chaponnier, C., & Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration.*

- 12.Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol Biol Cell*, 12(9), 2730-2741.
- 13.Meran, S., & Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol*. 92(3):158-67.
- 14.Eyden, B. (2008). The myofibroblast: Phenotypic characterization as a prerequisite to understand dingits functions in translational medicine: Translational Medicine. *J Cell and Mol Med*. 12(1), 22-37.
- 15.Hinz, B. (2010). The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*. 43(1), 146-155.
- 16.Balestrini, J. L., Chaudhry, S., Sarrazy, V., Koehler, A., & Hinz, B. (2012). The mechanicalmemory of lung myofibroblasts. *Integ Biol*. 4(4): 410-21
- 17.Wells, R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*. 47(4), 1394-1400.
- 18.Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., & Schwartz, M. A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.15(12), 802-812.
- 19.Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton*. 67(10), 630-634.
- 20.Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*. 40, 169-86.
- 21.Sandbo, N., & Dulin, N. (2011, October). Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: Ultrastructure defining form and driving function. *Transl Res*.158(4):181-96
- 22.Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 123(24), 4195-4200.
- 23.Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 200: 423-428.

24. Suttmuller, M., Bruijn, J. A., & De Heer, E. (1997). Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology, *Histol Histopathol.* 12(2):557-66
25. Muiznieks, L. D., & Keeley, F. W. (2013). Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta.* 1832(7):866-75.
26. Chin, L. K., Xia, Y., Discher, D. E., & Janmey, P. A. (2016). Mechanotransduction in cancer. *Curr Opin Chem Eng.* 11: 77-84.
27. Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 196(4):395-406
28. Lessey, E. C., Guilluy, C., & Burridge, K. (2012). From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry.* 51(38): 7420-7432.
29. Li, N., Tourovskaia, A., & Folch, A. (2003). Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. *Crit Rev Biomed Eng.* 31(5-6), 423-488.
30. Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17-26.
31. O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95.
32. Kim, S. J., Lee, D. S., Kim, I. G., Sohn, D. W., Park, J. Y., Choi, B. K., & Kim, S. W. (2012). Evaluation of the biocompatibility of a coating material for an implantable bladder volume sensor. *Kaohsiung J Med Sci.*, 28(3), 123-129.
33. Albera, L., Parra, L. C., Karfoul, A., Kachenoura, A., & Senhadji, L. (2010). Chapter 18 - Biomedical applications. In *Handbook of Blind Source Separation* (pp. 737-777).
34. Polydimethylsiloxane - Dimethicone. Dimethicone. <http://www.dimethicone.net/polydimethylsiloxane/polydimethylsiloxanescaffolds>

- 35.Özçam, A. E., Efimenko, K., & Genzer, J. (2014). Effect of ultraviolet/ozone treatment on the surface and bulk properties of poly(dimethyl siloxane) and poly(vinylmethyl siloxane) networks. *Polymer*. 55 (14): 3107-3119.
- 36.Efimenko, K., Wallace, W. E., & Genzer, J. (2002). Surface Modification of Sylgard-184 Poly (dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet / Ozone Treatment. *J Colloid Interface Sci.*, 315, 306-315.
- 37.O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 14(3), 88-95.
- 38.Stanton, M. M., Parrillo, A., Thomas, G. M., McGimpsey, W. G., Wen, Q., Bellin, R. M., & Lambert, C. R. (2015). Fibroblast extracellular matrix and adhesion on microtextured polydimethyl siloxane scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 103(4):861-9.
- 39.Palchesko, R. N., Zhang, L., Sun, Y., & Feinberg, A. W. (2012). Development of Polydimethylsiloxane Substrates with Tunable Elastic Modulus to Study Cell Mechanobiology in Muscle and Nerve. *PLoS ONE*, 7(12): e51499.
- 40.Callister, W. D. W., & Rethwisch, D. D. G. (2011). Materials science and engineering. Materials Science and Engineering. *John Wiley & Sons NY*, 5, 266-267
- 41.Auger, M. A., Schilardi, P. L., Caretti, I., Sanchez, O., Benítez, G., Albella, J. M., Azzaroni, O. (2005). Alternative Lithography: Unleashing the Potentials of Nanotechnology. *Small*, 1(3), 300-309.
42. Kuo, A. C. M. (1999). Poly (dimethylsiloxane). *Polymer*, 136(15), 411-435.
- 43.Yeh, Y-Ch., Corbin, E. A., Steven, R. C., Ouyang, L., Vega, S. L. (2017). Mechanically dynamic PDMS substrates to investigate changing cell environments. *Biomaterials*, 145: 23-32.

- 44.Chumbimuni-Torres, K. Y., Coronado, R. E., Mfuh, A. M., Castro-Guerrero, C., Silva, M. F., Negrete, G. R., Garcia, C. D. (2011). Adsorption of proteins to thin-films of PDMS and its effect on the adhesion of human endothelial cells. *RSC Advances*. 1: 706–714.
- 45.Liu, F., Mih, J. D., Shea, B. S., Kho, A. T., 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(4), 693–706
- 46.Hu, B., Gharaee-Kermani, M., Wu, Z., & Phan, S. H. (2010). Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *Am. J. Pathol.* 177(1): 21–28.
- 47.Zhang, Y., Liao, K., Lai, A., Foo, J. J., Chan, V. (2017). Progress in integrative biomaterial systems to approach three-dimensional cell mechanotransduction. *Bioengineering*, 4(3): 72.
- 48.Hinz, B., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. (2002). The NH₂-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 157, 657-663.
- 49.Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers-assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*, 125(Pt 8), 1855–1864.
- 50.Somaiah, C., Kumar, A., Mawrie, D., Sharma, A., Patil, S. D., Bhattacharyya, J., Jaganathan, B. G. (2015). Collagen promotes higher adhesion, survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 10(12).

