



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFECTO DE LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO EN EL
COMPORTAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR HEPÁTICA C9**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ANA LUCIA CABRIALES TORRIJOS

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MATHIEU HAUTEFEUILLE

Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ

Facultad de Medicina, UNAM

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ

CD. MX., AGOSTO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DIRECCIÓN DE TESIS DOCTORAL:

Dr. Mathieu Hautefeuille, Facultad de Ciencias, UNAM

COLABORADORES:

Dra. Marina Macías Silva, IFC, UNAM

Dr. Genaro Vázquez Victorio, Facultad de Ciencias, UNAM

Mto. David Martínez Pastor, IFC, UNAM

Dra. Nadia Adriana Vázquez Torres, Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Jorge Carretero Ortega, Facultad de Ciencias, UNAM

Biol. Alejandra Jiménez Escobar, Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, IFC, UNAM

Dr. David Kershenovich Stalnikowitz, INCMNSZ

Jurado de Examen Doctoral:

Dra. Annie Pardo Cemo, Facultad de Ciencias/Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas, IFC, UNAM

Dr. Andrés Castell Rodríguez, Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Francisco Sánchez Arévalo, IIM, UNAM

Dr. Mathieu Hautefeuille, Facultad de Ciencias/IFC, UNAM

Este trabajo de tesis fue realizado en:

*Laboratorio de Micro y NanoTecnología (μ NTec),
Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México*

y

*Laboratorio 224 N,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México*

Ambos forman parte de:

*Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia
(LaNSBioDyT)*

Agradecimientos institucionales

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por darme la oportunidad de cursar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca #582556 otorgada durante mis estudios.

A CONACyT con números de proyecto 299027 y 272894 por el apoyo brindado.

A DGAPA-PAPIIT con números de proyectos #IT102017 y #IA206818 por el apoyo brindado.

Por sus asesorías técnicas, a:

Dra. Marina Macías Silva, IFC, UNAM

Dr. Genaro Vázquez Victorio, uNTec/LaNSBioDyT, UNAM

Fís. Diego Zamarron Hernandez, uNTec/LaNSBioDyT, UNAM

Dr. Jorge Carretero Ortega, uNTec/LaNSBioDyT, UNAM

Dr. Francisco Sánchez Arévalo, IIM, UNAM

Por su apoyo técnico, a:

Mto. David Martínez Pastor, IFC, UNAM

Dra. Nadia Adriana Vázquez Torres, Facultad de Medicina/LaNSBioDyT, UNAM

Dra. Marisol Garnica Palafox, IIM, UNAM

Mta. Andrea Magali González Mora

Biol. Alejandra Jiménez Escobar

Biol. Eric Grepe Córdoba

Biol. Aranza Torres Caballero

Por los servicios ofrecidos a:

Unidad de Imagenología, IFC, UNAM

Unidad de biología molecular, IFC, UNAM

Fís. Edgar Jiménez Díaz y a la Unidad de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias, UNAM

A la Dra. Soledad Funes y a Sara Méndez Ibañez de la Coordinación de enseñanza del IFC por todo su apoyo administrativo durante mis estudios.

Agradezco:

A Linda y Lalo, mis padres, por su amor y apoyo durante toda mi vida, por enseñarme de rebeldía y a defender las causas justas, por mostrarme el gusto por el conocimiento y dejarme explorar mi curiosidad para encontrar mi propio camino

A Andre, Lalo, Luna y Macarena por hacer de nuestro hogar un lugar seguro, por ser una familia no convencional que acompaña con las risas más disfrutables del mundo y por siempre darme palabras y lengüetazos que me alientan a continuar

A mis amigas queridas, Paulina, Yadira, Ceci, Abi, Mariana, Anaid, Ana Lucía y Farah, por acompañarnos en la búsqueda de formas más amables para transitar en este mundo y sobre todo por compartirme de su fortaleza

A mi tutor, el Dr. Mathieu Hautefeuille, por ser un guía que acompaña pero no obliga, por ser un mentor que comparte desde su experiencia pero trata como colega, por escuchar mis ideas y apoyarme para llevarlas a cabo, por todo el tiempo compartido y las lecciones aprendidas, por su honestidad, por su amistad y sobre todo por ver en mi una buena científica y ayudarme a superar mis miedos

A la Dra. Marina Macías por toda su confianza y apoyo brindados desde el inicio, por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartirme sus ideas y su tiempo, por ser una gran guía y por compartirme su pasión por la investigación

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio, por llevarme de la mano hacia el mundo biológico, por su paciencia al instruirme, por compartirme sus ideas y su conocimiento y sobre todo por su amistad

A David Martínez, Nadia Vázquez, Jorge Carretero y Alejandra Jiménez por su invaluable apoyo técnico y disposición para este proyecto

A mis compañer@s del laboratorio uNTec, con quienes he compartido el espacio de trabajo, por lo mucho que hemos crecido junt@s, por su apoyo, por las discusiones y sobre todo por “todo eso”

A mis compañer@s del laboratorio 224 N, IFC por compartirme su espacio de trabajo, por sus palabras de apoyo y por siempre recibirme con una sonrisa

Al Dr. Adolfo García Sáinz y Dr. David Kershenobich, miembros de mi comité tutor, por todos sus comentarios, las discusiones sobre el proyecto y el apoyo brindado durante mi formación

A mis sinodales por el tiempo dedicado a este trabajo y sus enriquecedores comentarios

Al LaNSBioDyT por generar un espacio de vanguardia en investigación, por confiar en sus estudiantes y darles la voz que merecen

A la UNAM por ser un espacio de encuentro, por mostrarme nuevos horizontes y por ser mi Alma Mater

Índice

RESUMEN	9
ABREVIATURAS	11
Capítulo 1	
Introducción	13
1.1 Mecanobiología y mecanotransducción (En qué consiste estudiar la mecanotransducción)	13
1.2 Fuerzas a las que son sometidos células y tejidos	14
1.3 Fuerzas mecánicas como reguladores de procesos celulares	15
1.4 Rigidez del sustrato como regulador de procesos celulares	17
1.5 ¿Cómo ‘sensa’ la célula la rigidez del sustrato?	19
1.6 Mecanismos de mecanotransducción	21
1.6.1 Señalización de YAP/TAZ	21
1.6.2 Señalización de MAPK	23
1.7 Técnicas de control de la rigidez del sustrato	25
1.8 Síntesis del capítulo	28
Capítulo 2	
Antecedentes, hipótesis y objetivos	31
2.1 Antecedentes	31
2.2 Hipótesis	33
2.3 Objetivos	33
2.3.1 Objetivo general	33
2.3.2 Objetivos particulares	33
Capítulo 3	
Fabricación y caracterización de sustratos de PDMS para control de rigidez	35
3.1 ¿Qué sustratos son usados para control de rigidez?	35
3.2 Estandarización del protocolo de fabricación para controlar la rigidez	38
3.3 Caracterización mecánica por microindentación	42
3.4 Tratamiento del PDMS para cultivo celular	47
3.5 Conclusiones del capítulo	48

Capítulo 4	
Efecto de la rigidez del sustrato en el comportamiento celular	51
4.1 <i>Introducción al capítulo</i>	51
4.2 <i>Resultados:</i>	52
4.2.1 <i>Preparación de sustratos para cultivo celular</i>	52
4.2.2 <i>La tasa de proliferación celular es regulada por la rigidez del sustrato</i>	53
4.2.3 <i>La vía de MAPK regula la proliferación celular en respuesta a la rigidez del sustrato</i>	56
4.2.4 <i>Las adhesiones célula-célula y célula-sustrato son reguladas por la rigidez</i>	59
4.2.5 <i>Células C9 aumentan su tasa de proliferación celular después de haberse adaptado a sustratos suaves</i>	62
4.2.6 <i>Células C9 re-adaptadas expresan altos niveles de proteína α-SMA y tienen capacidad aumentada de adhesión al sustrato</i>	65
4.3 <i>Conclusiones del capítulo</i>	68
Discusión y conclusiones generales	71
Materiales y métodos	77
Referencias	83
Anexos	93

RESUMEN

Las fuerzas mecánicas que actúan sobre las células son apreciadas cada vez más como mediadores importantes del comportamiento celular. Regulan ampliamente la señalización celular, con efectos sobre la proliferación, diferenciación, motilidad y quiescencia. Aunque los valores de rigidez óptimos, es decir aquellos en los que las células llevan a cabo las funciones especializadas en su ambiente natural, varían ampliamente para diferentes tipos de células adherentes, en general es cierto que la proliferación celular y diferenciación aumentan con la rigidez de la matriz. Sin embargo, resulta de interés evaluar si las líneas celulares que fueron originalmente diseñadas y seleccionadas para sobrevivir en sustratos rígidos, pueden revertir su comportamiento al cultivarse en sustratos suaves.

En este proyecto de tesis se estudia la influencia de la suavidad del sustrato en la proliferación, adhesión y morfología de la línea celular hepática C9, una línea que de inicio es altamente proliferativa y presenta una gran capacidad de adhesión a los sustratos de cultivo comunes, rígidos. Las células C9 fueron cultivadas sobre sustratos de polidimetilsiloxano (PDMS) suaves y rígidos, preparados con dos módulos elásticos diferentes en el rango de 9-11 kPa y 160-200 kPa respectivamente. Se observó una menor proliferación celular en sustratos de menor rigidez sin afectar a la viabilidad celular. Fue posible determinar además que el mecanismo mediante el cual se regula la proliferación en respuesta a la baja rigidez del sustrato es la vía de las MAPK ya que hay una disminución en la fosforilación de ERK 1/2 en los sustratos suaves. A pesar de que esta línea celular ha sido descrita como una célula epitelial hepática, su caracterización demostró que el origen de las células C9 es incierto: aunque claramente epitelial, ya que presentan expresión de marcadores de varias células epiteliales hepáticas, a su vez presentan características mesenquimales como la expresión de vimentina. Esto sugiere que, una célula que ya está expresando altos niveles de vimentina y que fue seleccionada por su capacidad de producir fuertes adhesiones en sustratos rígidos podría requerir más tiempo en sustratos suaves para revertir el fenotipo mesenquimal. Sin embargo, cuando se probó esta hipótesis a través de pases consecutivos de células C9 en el PDMS suave, se observó que la expresión de vimentina se mantuvo constante y los niveles de fosforilación de ERK aumentaron después de varios pases, desencadenando nuevamente un aumento en la proliferación celular, como una forma de adaptación o entrenamiento progresivo a la nueva suavidad del sustrato. Más aún, después de varios pases y casi en sincronía con la reactivación de la proliferación, se encontró que las células C9 aumentaron la expresión de α -SMA y adquirieron una morfología alargada, sugiriendo la adquisición de características más contráctiles, comúnmente asociadas a miofibroblastos.

Este estudio muestra que la exposición por tiempos cortos de las células C9 a sustrato suaves, cuya rigidez es más cercana al rango fisiológico (5-10 kPa) en comparación con la caja de poliestireno muy rígida (GPa), promueve la disminución de la tasa de proliferación celular, como se ha reportado para otros tipos de células en PDMS. Sin embargo, una exposición prolongada hace que las células se adapten al sustrato suave a través de un cambio en morfología y fenotipo. Además, contrario al efecto observado durante periodos cortos, las células C9 aumentaron la tasa de proliferación celular. Esto sugiere que la adaptación de las líneas celulares a sustratos suaves es dependiente del tiempo de exposición.

ABSTRACT

Mechanical forces acting on cells are increasingly appreciated as important mediators of cell behavior. They widely regulate cell signaling, with effects on proliferation, differentiation, motility and quiescence. Although optimal stiffness values, i.e. those in which cells carry out the specialized functions in their natural environment, vary widely for different types of adherent cells, it is generally true that cell proliferation and differentiation increase with matrix stiffness. However, it is relevant to evaluate whether cell lines that were originally designed and selected to survive on stiff substrates can reverse their behavior when grown on soft substrates.

In this dissertation it is presented the study of the effect that substrate softness has on cellular proliferation, adhesion and morphology of the hepatic C9 cell line, a line that is highly proliferative and has a great capacity to adhere to the substrate. C9 cells were culture on soft and stiff polydimethylsiloxane (PDMS) substrates prepared with two different elastic moduli in the range of 9-11 kPa and 160-200 kPa respectively and a lower cell proliferation was observed on softest substrates without affecting cell viability. It was possible to determine that the mechanism by which proliferation is regulated in response to substrate stiffness is the MAPK pathway since there is a decrease in ERK 1/2 phosphorylation in soft substrates. Despite the fact that this cell line has been described as an hepatic epithelial cell, the characterization showed that the origin of C9 cells is uncertain, although clearly epithelial as they present the expression of several hepatic epithelial cells markers while presenting mesenchymal characteristics such as vimentin expression. This suggests that a cell that is already expressing high levels of vimentin and was selected for its ability to produce strong adhesions on rigid substrates might require more time on soft substrates to reverse the mesenchymal phenotype. However, when this hypothesis was tested, through consecutive passages of C9 cells in the soft PDMS, no decrease in vimentin expression was observed but rather ERK phosphorylation levels increased after several passages triggering again an increase in cell proliferation. Furthermore, after several passages and almost in synchrony with the reactivation of proliferation, C9 cells were found to increase the expression of α -SMA and acquire an elongated morphology, suggesting the acquisition of more contractile characteristics commonly associated with myofibroblasts.

This study shows that short-term exposure of C9 cells to soft substrate, whose stiffness is closer to the physiological range (5-10 kPa) compared to the polystyrene (GPa) petri dish, promotes a decrease in the rate of cell proliferation, as has been reported for other cell types in PDMS. However, much longer exposure causes the cells to adapt to the soft substrate through a change in morphology and phenotype. In addition, contrary to the effect observed for short periods, C9 cells increased the rate of cell proliferation. This suggests that the cell lines adaptation to soft substrates might be time-dependent.

ABREVIATURAS

AFM	Microscopio de fuerza atómica
AFP	α -Fetoproteína
ALB	Albúmina
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer (cancer-associated fibroblast)
CTM	Células troncales mesenquimales
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
hMSC	Células troncales mesenquimales humanas
HNF4	Factor nuclear 4 alfa de hepatocitos
HS	Suero de caballo
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IP	Yoduro de propidio
kPa	kilo pascales
LAST 1/2	Cinasa grande supresora de tumores 1
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase)
MEC	Matriz extracelular
MEK	Cinasa de MAP cinasa
MOB1	Cinasa activadora MOB 1A
mRNA	RNA mensajero
MST 1/2	Proteínas cinasas de serina y treonina 1 y 2
MYL9	Polipéptido ligero regulador de miosina 9
Pa	Pascales
PAA	Poliacrilamida
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFA	Paraformaldehído
PS	Poliestireno
PTKR	Receptor de la proteína cinasa de tirosina
Raf	Cinasa de serina/treonina Raf (Fibrosarcoma de rápida aceleración)

Ras	Pequeña GTPasa, con actividad reguladora GTP-hidrolasa
Rho	Proteína Rho, helicasa
RIPA	Solución de lisis para ensayos de radioinmunoprecipitación
ROCK	Proteína cinasa asociada a Rho
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SOX9	Factor de transcripción SOX9
TA	Temperatura ambiente
TAZ	Coactivador transcripcional con motivo de unión PDZ
TEAD	Factor transcripcional Miembro de la familia del dominio TEA 1
TFM	Microscopía de fuerza de tracción
TRIC	Tetrametilrodamina
WB	Western blot
YAP	Proteína asociada a Yes
α SMA	Alfa actina de músculo liso

Capítulo 1

1. Introducción

En este capítulo se presenta un panorama general de los conceptos básicos en mecanotransducción que son relevantes para abordar el presente trabajo de investigación. Partiendo del estudio de las fuerzas que son percibidas por las células, en conjunto con los mecanismos con los que cuenta la célula para percibir y reaccionar a estos estímulos, se introduce el uso del control de la rigidez del sustrato como una estrategia para el estudio de la respuesta celular a la mecánica del ambiente.

1.1 Mecanobiología y mecanotransducción

Los organismos vivos están expuestos de manera constante a fuerzas mecánicas presentes en sus alrededores, tal es el caso de peces en el fondo del océano experimentando presiones de hasta 600 atm o una persona sometida a la gravedad en la superficie terrestre. Sabemos que la respuesta de los organismos a su entorno es producto de la respuesta colectiva de las múltiples células que los conforman. Más aún, sabemos que las funciones de las células en los diferentes tejidos han evolucionado en contextos físicos muy específicos que conducen a un acoplamiento entre las células y su entorno. Por tanto, aunque la investigación en biología y medicina ha sido dominada por la genética y bioquímica, las fuerzas mecánicas han sido cada vez más reconocidas por el papel que juegan en la regulación y desarrollo de tejidos (Ingber, Wang, and Stamenovic 2014). Con esto se dio origen a un campo de estudio llamado mecanobiología, a partir del cual se ha permitido integrar la mecánica en el estudio de la biología celular, otorgando una nueva comprensión de procesos celulares fundamentales en los que se incluyen la división celular, diferenciación y morfogénesis, entre otros.

Desde el punto de vista de la comunicación celular y la transducción de señales, la mecanotransducción busca estudiar cómo los sistemas biológicos perciben los esfuerzos mecánicos en la superficie celular transduciendo las fuerzas a señales moleculares que la célula puede manejar internamente. Existen diversos agentes que participan en este proceso, que van desde el reconocimiento de la señal externa, su transmisión y procesamiento en el interior celular, y finalmente en la regulación de factores que generan respuestas a nivel nuclear y que participan en el control de

la polarización, adhesión, morfología, diferenciación celular, así como la producción de proteínas de matriz extracelular (MEC) y el crecimiento de tejidos (Peter F. Davies 2009; Shi and Tarbell 2011).

El estudio de la mecanobiología y mecanotransducción requiere la integración multidisciplinaria de la biología, física y bioingeniería para la caracterización de las fuerzas que percibe la célula, las fuerzas que ejerce la célula en su alrededor y el papel que éstas juegan en las diversas respuestas celulares durante la formación y mantenimiento de tejidos así como en el desarrollo de patologías.

1.2 Fuerzas a las que son sometidos células y tejidos

Las células en los tejidos están constantemente sujetas a fuerzas exógenas y fisiológicas, tales como presión osmótica, tensión, compresión, torsión, vibración, estiramiento y cizalladura (o *shear stress*) debido al flujo, las cuales pueden deformar la célula. Estas fuerzas se clasifican en dos tipos, por un lado las fuerzas perpendiculares a la superficie como la tensión y la presión, y por otro las paralelas a la superficie como el *shear stress*. Cada una de estas fuerzas ejerce un esfuerzo σ sobre la célula que se define como la fuerza normalizada por unidad de área y que se mide en pascuales (Pa), resultando en la deformación de las células (Wells 2013).

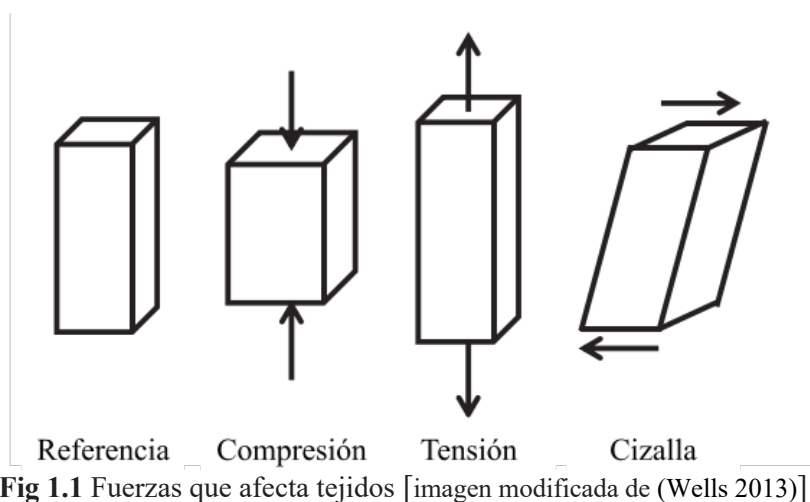


Fig 1.1 Fuerzas que afecta tejidos [imagen modificada de (Wells 2013)]

Los principales moduladores de fuerzas que siente la célula son la rigidez y las propiedades viscoelásticas de los tejidos. Por un lado, la rigidez se define como la resistencia de un cuerpo a deformarse debido a un esfuerzo aplicado, mientras que la viscoelasticidad es una propiedad intrínseca del tejido a resistir a una tasa de deformación (y por ende depende del tiempo de aplicación del esfuerzo) y que está determinada por la compleja composición del mismo. Las proteínas, las células y los tejidos presentan propiedades mecánicas altamente anisotrópicas, heterogéneas y no lineales que varían ampliamente y dependen de la composición, la arquitectura, las condiciones ambientales, así como de la dirección y la naturaleza de la fuerza (Gardel et al. 2008; Navajas, Maksym, and Bates 1995). Es aceptado además que la elasticidad y rigidez del tejido son conferidas por la composición y estructura de la matriz extracelular (MEC), y a su vez estas propiedades mecánicas contribuyen determinantemente a la correcta fisiología de las células dentro del mismo.

La rigidez de los tejidos se cuantifica comúnmente con el módulo elástico longitudinal o módulo de Young, ya que es un parámetro físico característico de cada material y permite conocer la resistencia

a la deformación del material cuando se le aplica externamente una fuerza de compresión o de tracción. Dentro del régimen elástico, el esfuerzo está relacionado con la deformación a través de la ley de Hooke $F = kx$ cuyo equivalente para aplicación de esfuerzo en una superficie es

$$\sigma = E\varepsilon$$

donde σ es el esfuerzo y ε es la deformación. Por lo tanto, el módulo elástico longitudinal E es la constante que relaciona el esfuerzo de tracción o compresión con la respectiva deformación dada por aumento o disminución de longitud que tiene el objeto sometido a estas fuerzas.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}$$

Analizando esta relación se dice que, para una fuerza de compresión o tensión aplicada, un material que sufre una deformación grande es un material suave y por lo tanto tiene un módulo elástico E pequeño.

Los materiales que se definen como isotrópicos lineales presentan un módulo elástico con el mismo valor para una tracción que para una compresión. Sin embargo, cuando se busca caracterizar tejidos o células, es relevante considerar que dichos objetos presentan una composición y estructura con anisotropía mecánica, es decir que su resistencia a la deformación depende de la dirección en la que se aplica la fuerza.

Finalmente y así como se mencionó al inicio de esta sección, las células dentro de los tejidos están sometidas a distintos esfuerzos que resultan en la deformación de las mismas. Por lo tanto es posible también estudiar el tipo de deformación que sufrirían estos objetos al aplicarles un esfuerzo paralelo a la superficie como el caso del esfuerzo dado por el flujo o shear stress. En este caso, el módulo de corte G o módulo elástico transversal es la constante que relaciona el esfuerzo de corte o cizalladura con la deformación angular que sufre el material.

1.3 Fuerzas mecánicas como reguladores de procesos celulares

Los efectos biológicos de las fuerzas parecen ser más evidentes en el contexto de la actividad mecánica, tal es el caso de movimientos respiratorios, el bombeo cardiaco y flujo sanguíneo pero también se dan en procesos de reparación de herida, regeneración e incluso en procesos fisiológicos normales como en el intestino por ejemplo, en el que se requieren patrones de contracción para asegurar la digestión y absorción de manera adecuada y eficiente (Gayer and Basson 2009). Se sabe que estas fuerzas regulan procesos a nivel celular como la morfogénesis, la migración celular e incluso la adhesión de las células a la matriz extracelular y pueden regular una amplia variedad de respuestas biológicas desde la proliferación y diferenciación celular hasta la homeostasis del tejido (Eyckmans et al. 2011). A continuación se describirán algunos contextos biológicos para ejemplificar la diversidad de respuestas que la mecánica puede producir a nivel celular.

El riñón, hígado y pulmón, por ejemplo, son órganos altamente vascularizados y que resultan muy sensibles a alteraciones en el flujo (M. Y. Kim, Baik, and Lee 2010). Por lo tanto, pequeñas alteraciones en la geometría del vaso, la velocidad de flujo y la viscosidad del fluido son suficientes

para regular la liberación de factores vasodilatadores como el óxido nítrico por parte del endotelio. Incluso, esto podría llevar a cambios permanentes en la expresión genética y de proteínas.

Dentro de la gran familia de canales iónicos, existen canales que son mecanosensibles. Esto quiere decir que son capaces de controlar el flujo de las moléculas a través de las membranas celulares en respuesta a un estímulo mecánico, permitiendo, por un lado, que el flujo de moléculas libere la presión osmótica mientras que por otro lado también puede activar otras vías de señalización (Martinac, Saimi, and Kung 2008).

El estudio de la mecánica, principalmente en el cultivo de células, ha sido posible en gran medida gracias a un conjunto de técnicas e instrumentos para medir y manipular esas fuerzas *in vitro*. Por ejemplo, la aplicación *in vitro* del esfuerzo que experimentaría el hueso durante la actividad física aumenta la proliferación celular (Raab-Cullen et al. 1994), la diferenciación osteogénica (el Haj et al. 1990; David et al. 2007) y la deposición de la matriz ósea (Bancroft et al. 2002; Chien, Li, and Shyy 1998). Todas estas características están presentes en el crecimiento óseo anabólico *in vivo*. También se ha demostrado que el estiramiento mecánico puede imitar el efecto del flujo sanguíneo pulsátil y desencadenar muchas alteraciones en la señalización de las células endoteliales y del músculo liso (Chien, Li, and Shyy 1998; Tzima et al. 2005), la proliferación de las células vasculares (P. F. Davies et al. 1984; Haudenschild, Grunwald, and Chobanian 1985; Sumpio et al. 1987) y la expresión de marcadores inflamatorios (Yamawaki et al. 2005). En las células endoteliales vasculares (EV), el *shear stress* producido por la fuerza de fricción generada por el flujo sanguíneo es percibido en la superficie de la célula apical deformándola en la dirección del flujo. La tensión celular provoca un aumento del calcio en las células probablemente mediante la activación directa de los canales de Ca^{2+} que responden al estiramiento celular (Ballermann et al. 1998; Butler 2016). Además, tras la exposición al *shear stress*, se produce una rápida reorganización del citoesqueleto en las células EV, éstas se alinean en la dirección del flujo (Wechezak et al. 1989; Franke et al. 1984) y también se produce aumento de los contactos de adhesión focal en los extremos superiores de las células. Así como la tensión física de la membrana plasmática también puede desempeñar un papel como orquestador de muchos eventos celulares (Masters et al. 2013). Por otro lado, durante el desarrollo temprano la velocidad de flujo puede regular la diferenciación del fenotipo arterial en lugar del venoso (le Noble et al. 2004). También se han desarrollado dispositivos tipo bioreactores para modelar la compresión que experimentan los condrocitos en las articulaciones, la tensión en los músculos, ligamentos y tendones, así como las fuerzas de impacto asociadas a los traumatismos (Freed, Vunjak-Novakovic, and Langer 1993; Molnar et al. 1997; Garvin et al. 2003).

Además de las fuerzas externas aplicadas a las células en los tejidos, también ha sido determinado que las células mismas ejercen fuerzas contráctiles generadas por la actomiosina sobre la matriz extracelular (MEC) y a las células vecinas a través las adhesiones celulares (Schoen, Pruitt, and Vogel 2013) ya que las células cultivadas en sustratos de polímeros blandos son capaces de deformar (arrugar) la superficie del sustrato (Harris, Stopak, and Wild 1981). Sugiriendo que las fuerzas podrían estar siempre presentes, incluso en entornos sin un estímulo mecánico explícito. Por lo tanto, ha sido ampliamente reconocido que, la mayoría de las células eucarióticas pueden generar fuerzas intracelulares que actúan sobre la matriz extracelular (MEC) circundante o las células vecinas, y que esta actividad contráctil es fundamental para una serie de procesos biológicos como la migración celular, la mitosis, así como la diferenciación y la autorrenovación de células troncales.

1.4 Rigidez como regulador de procesos celulares

Las células secretan y remodelan la MEC que comprende su microambiente. *In vivo* la MEC consiste en una combinación de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteínas fibrosas y proteínas de adhesión, que se estructuran adquiriendo una conformación tridimensional (3D), a micro- y nano-escala (Nguyen, Sathe, and Yim 2016), y que proporciona integridad estructural y química que rodea a las células y posteriormente determina el destino de las mismas (Zheng, Zhang, and Jiang 2013). Las variaciones en las propiedades biofísicas de la MEC dentro o a través de un tejido están definidas por su composición, entrecruzamiento, dimensión y rigidez, creadas por las células específicas de cada tejido. Particularmente, la rigidez y elasticidad de la MEC están determinadas y proporcionalmente relacionadas con la cantidad de colágena fibrilar y elastina presentes en la matriz, lo que lleva a una gran variedad de propiedades mecánicas de la matriz distintiva de cada tejido.

La remodelación de la matriz ha sido identificada a su vez como respuesta a estímulos mecánicos. Tal es el caso de la reabsorción ósea realizada por las proteasas secretadas por los osteoclastos en un ambiente de baja gravedad, esto da lugar a que las redes de la matriz sean más porosas y débiles. En contraste, también se ha encontrado que ejercicios de alto impacto como el levantamiento de pesas incrementa el crecimiento óseo mediante la secreción y remodelación de la MEC (J. C. Chen, Castillo, and Jacobs 2013). Por otro lado, la remodelación de la MEC es un proceso fundamental en la cicatrización y en el desarrollo de fibrosis. En el caso de la cicatrización, cuando la herida en la piel ocurre se inicia un proceso inflamatorio en el que se liberan diferentes factores de crecimiento y citocinas que estimulan la activación de los fibroblastos promoviendo la proliferación celular y la síntesis de proteínas de matriz. Particularmente, la última etapa de la cicatrización, conocida como remodelación, se caracteriza por la síntesis de colágena tipo I que está presente en la piel sana. Sin embargo, el depósito excesivo y desregulado de colágena tipo I puede llevar a condiciones patológicas como la cicatrización queloide o hipertrófica (Young and McNaught 2011). Estos proceso de deposición de matriz desregulada es lo que sucede en la fibrosis. Tal es el caso de la fibrosis pulmonar, que es el producto de una serie de daños en el epitelio alveolar, ya sea por contaminantes ambientales, medicamentos o enfermedades del tejido conectivo, que produce la reparación desregulada del parénquima pulmonar (American Thoracic Society and European Respiratory Society 2002). La secreción de factores de crecimiento, citocinas y metaloproteasas, entre otras moléculas, activa a las células mesenquimales produciendo el depósito excesivo de proteínas de MEC. Los fibroblastos presentes en el septo alveolar son activados durante el proceso fibrótico, promoviendo la acumulación de proteínas fibrilares, principalmente la colágena tipo I, lo que favorece el aumento en la rigidez del tejido pulmonar alterando la señalización intracelular debido al nuevo estímulo mecánico percibido por los fibroblastos (King, Pardo, and Selman 2011). Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se encuentra el envejecimiento al cual se le han asociado diferentes marcas distintivas dentro de las cuales se encuentra el aumento de la rigidez del tejido, lo que se cree puede participar en la activación de las vías de señalización pro-fibróticas (Pardo and Selman 2016). Otro claro ejemplo es la fibrosis en el hígado, en este caso el daño hepático producto de la exposición constante a fármacos o al alcohol por ejemplo, induce la activación de las células estrelladas hepáticas, quienes adquieren características de miofibroblastos e incrementan la deposición de proteínas de matriz fibrilares como la colágena, ésto genera un aumento en la rigidez de la matriz en el hígado y a

su vez, el aumento de la rigidez de la matriz modifica la señalización celular cuya respuesta incluye la pérdida de las funciones especializadas de los hepatocitos lo que conduce a patologías crónicas como la cirrosis. Particularmente en el caso de la fibrosis es posible identificar que, además de que las células son capaces de remodelar su ambiente a través de la remodelación de la MEC, las propiedades de la MEC a su vez, inducen una respuesta mecánica en las células mediante la activación de la señalización celular. Por lo tanto, la remodelación de la matriz es conocida como un ciclo de retroalimentación de fuerza.

Se sabe que los diferentes tejidos varían en rigidez, algunos de los valores reportados son 100 Pa para el cerebro, considerado el tejido más suave, 400-600 Pa en hígado, 10^4 Pa en músculo y 10^6 Pa en hueso, el más rígido (Janmey and Miller 2011). Con avances en el desarrollo de materiales para cultivo con rigidez variable se ha demostrado que la rigidez del sustrato puede dirigir la diferenciación celular, tal es el caso de las células mesenquimales humanas (hMSC por sus siglas en inglés) que han sido dirigidas a distintos linajes como neuronal, muscular u óseo, mediante la imitación *in vitro* de la rigidez del entorno *in vivo* respectivo (Engler et al. 2006). En estados patológicos como la fibrosis la rigidez del tejido aumenta debido a la deposición excesiva de proteínas de matriz. Algunos de los datos reportados en este caso son: pulmón que pasa de un estado sano con 2 kPa a fibrótico con 17 kPa (Wells 2013) y el hígado que pasa de 5 kPa en un tejido sano a 12 kPa en el tejido fibrótico (Degos et al. 2010). En el caso particular del pulmón, además de los efectos en la señalización celular, este aumento en la rigidez limita la capacidad de distensión del tejido lo que dificulta la respiración.

La tensión ejercida en las células debido al aumento de la rigidez del microambiente induce diferentes respuestas a nivel celular. Por ejemplo, similar a la quimiotaxis, en la que las células migran en la dirección de un gradiente de concentración, se ha demostrado que existe la durotaxis que se refiere a la migración celular en un gradiente de rigidez. Este fenómeno tiene particular relevancia en la formación de tejidos durante el desarrollo, o la migración de las células durante el cierre de heridas, inflamación y metástasis (Paluch et al. 2015). Para comprender la migración celular por durotaxis se requiere comprender procesos fundamentales subyacentes como la adhesión celular, esparcimiento (*spreading* en inglés) y contracción. El proceso mediante el cual las células se arrastran en un sustrato plano hacia el lado de mayor rigidez cuenta con cuatro pasos principales (Alberts et al. 2002). Primero, las células forman protuberancias en la dirección de mayor rigidez, denominada extremo guía, impulsadas por la polimerización de la actina. Segundo, estas protuberancias se unen al sustrato a través de la formación de adhesiones focales. Tercero, estas adhesiones focales están conectadas a los filamentos de actina que se tensan a través de la actividad contráctil de los motores de miosina. Finalmente, las adhesiones focales en el extremo posterior de las células se desvanecen bajo la influencia de la fuerza contráctil lo que hace que la célula se desplace en dirección del extremo guía.

Por otro lado, en procesos como morfogénesis o reparación de tejidos es posible observar la migración colectiva de grupos de células mediante la coordinación de procesos contráctiles y su propagación a través del cinturón de actomiosina, el cual es formado por la conexión de las uniones adherentes entre células vecinas (Ladoux and Mège 2017). Mediante la utilización de la velocimetría de imágenes de partículas (PIV por sus siglas en inglés) ha sido posible obtener los campos de velocidades de capas multicelulares, a partir de los cuales se puede visualizar la distribución espacial, el rango en el que se coordinan los movimientos dentro del tejido, proporciona información sobre el orden local de las células, así como la dinámica del flujo de celular en el tejido. Debido a la complejidad de estos

procesos se han propuesto modelos de cristales líquidos y materia activa para estudiar la reología de las capas celulares (Ladoux and Mège 2017). Más aún, en procesos de migración colectiva como el ensayo de cierre de herida, ha sido posible cuantificar la fuerza de tracción que ejercen las células sobre el sustrato, mostrando que la célula líder en los bordes aplica más fuerza de tracción que las células alejadas de los bordes, aunque siguen siendo perceptibles (Reffay et al. 2014; du Roure et al. 2005). Por lo tanto, la migración colectiva se inicia por la transmisión de las fuerzas de la matriz, mientras que el proceso cooperativo de transmisión es impulsado por la transmisión de fuerzas a través de las uniones célula-célula y su acoplamiento con la dinámica del citoesqueleto. Además, trabajos recientes han mostrado que la rigidez de la matriz puede acelerar los procesos de migración colectiva posiblemente debido a la tensión ejercida en las células líder (Balcioglu et al. 2020).

1.5 ¿Cómo “sensa” la célula la rigidez del sustrato?

Las células, aunque pueden variar ampliamente en forma y función dependiendo del tejido en el que se encuentren, tienen una estructura especializada altamente conservada que les permite mantener su integridad debido al constante estrés mecánico al que son sometidas. Dicha estructura celular está integrada por la membrana celular, el núcleo y el citoplasma, quienes en conjunto definen las propiedades mecánicas de la célula y su capacidad de responder al microambiente.

El citoesqueleto es una compleja red de proteínas que se encuentra en el citoplasma y que es el principal responsable de dar a la célula la habilidad de adaptarse a la deformación. Las principales funciones del citoesqueleto son determinar la forma celular, organizar los organelos dentro del citoplasma, servir como vía para el desplazamiento de motores moleculares que transportan proteínas cargo a lo largo de la célula, además de ser una estructura dinámica que resiste, transmite y genera fuerzas celulares permitiendo que la célula interactúe física y químicamente con sus alrededores (Fletcher and Dyche Mullins 2010). Los filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios son los tres principales polímeros proteicos que forman el citoesqueleto. Estas tres estructuras se organizan en redes que pueden reorganizarse en respuesta a fuerzas externas.

Los filamentos de actina que son los principales componentes estructurales del citoesqueleto, y junto con la miosina, son los encargados del balance de fuerzas requerido para el movimiento y contracción celular (De, Zemel, and Safran 2010). Cada filamento de actina o F-actina está formado por la unión de la actina globular o G-actina, dando origen a un polímero lineal altamente dinámico debido a una constante polimerización y despolimerización a través de la asociación y disociación de monómeros de actina globular en ambos extremos del filamento (Lodish et al. 2016). Aunque de manera individual estos filamentos son menos rígidos que los microtúbulos pueden formar estructuras altamente organizadas y más estables formando redes con ayuda de proteínas de unión a actina. Tal es el caso de las fibras de estrés que consisten en la unión de dos o más filamentos unidos paralelamente por la actinina. Por otro lado, la miosina es un motor molecular cuya función es desplazar paralelamente dos fibras de actina, uno contra otro, y que participa en la contracción muscular (Pellegrin and Mellor 2007). En este caso, la miosina es capaz de convertir energía química, en forma de hidrólisis de ATP, en energía mecánica para contraer la red produciendo una fuerza aproximada de 3-4 pN (Finer, Simmons, and Spudich 1994). Los motores de miosina también actúan sobre las fibras de estrés, lo que permite a las células contraerse y sentir su entorno externo a través de las adhesiones focales (Fletcher and Dyche Mullins 2010).

Las adhesiones focales son complejos de proteínas que tienen un papel estructural y mecanosensible, mediante las cuales la célula es capaz de adherirse al sustrato (Eyckmans et al. 2011). El complejo proteico que forma las adhesiones focales incluye un grupo de proteínas citoplasmáticas agregadas en la superficie interna de la membrana de una célula dentro de las que se destacan proteínas como vinculina y talina. Estas proteínas se unen por un lado a los filamentos de actina y por otro a los receptores transmembranales conocidos como integrinas. Las integrinas por su parte, se unen a los ligandos específicos en la matriz extracelular (MEC). Las fuerzas producidas por la miosina pueden ser transmitidas a través de las adhesiones focales a la interfaz integrina-EMC, donde actúan como fuerzas de tracción (DuFort, Paszek, and Weaver 2011). Por lo tanto, las células son capaces de deformar la matriz, aplicando una fuerza de tracción, con la cual es capaz de percibir la rigidez del entorno ya que mientras más rígida sea la matriz, más fuerza deberá aplicar para poder deformarla (una mayor rigidez de la matriz opondría una mayor resistencia a la deformación por la tensión ejercida por la célula). Finalmente son activadas las vías de señalización asociadas a las adhesiones focales como la polimerización del citoesqueleto dependiente de la GTPasa Rho. A su vez, el estímulo mecánico es transmitido hacia el núcleo a través del citoesqueleto debido a que los filamentos de actina están directamente conectados a la lámina nuclear (Maniotis, Chen, and Ingber 1997). El núcleo es deformado debido a la transmisión de la tensión y estrés mecánico (Swift et al. 2013) lo que permite por un lado la apertura de los poros nucleares que permite el paso de factores de transcripción y por otro lado permite la remodelación de la cromatina para promover la expresión de genes involucrados en proliferación, polarización, diferenciación celular, etc.

La tensión celular no sólo es transmitida hacia la MEC a través de las adhesiones focales sino que también puede ser transmitida a las células vecinas mediante las uniones célula a célula. Particularmente, las uniones adherentes conectan los filamentos de actina entre células vecinas a través de cadherinas.

En síntesis, los fundamentos que rigen la respuesta celular debido a la mecánica toman como eje de la transmisión mecánica al aparato de actomiosina y que interactúa con el exterior a través de las uniones celulares. Para que la célula pueda sentir la rigidez de estructuras externas como la MEC, el citoesqueleto de actina y miosina ejerce tensión a través de la unión de integrinas en las adhesiones focales y cadherinas en las uniones adherentes que también le permite transmitir estímulos mecánicos en células vecinas. Finalmente esta información es transferida al núcleo mediante la transmisión de la tensión mecánica a través del citoesqueleto que está unido directamente a la envoltura nuclear. La deformación del núcleo debido a la tensión del citoesqueleto participa en la regulación de la transcripción mediante la remodelación de la cromatina o bien permitiendo la apertura de los poros nucleares y permitir el paso de factores de transcripción hacia el núcleo.

1.6 Mecanismos de mecanotransducción

1.6.1 Señalización de YAP y TAZ

La señalización de YAP y TAZ es de las vías de mecanotransducción que más se han utilizado para entender los mecanismos moleculares involucrados en la transmisión de señales mecánicas y su transducción hacia el núcleo. Las proteínas YAP y TAZ son cofactores transcripcionales descritos como proteínas efectoras de la vía de señalización Hippo que ha sido implicada en la regulación del

crecimiento de órganos, la proliferación celular, en la amplificación de células progenitoras durante la renovación y regeneración de tejidos así como en cáncer. Particularmente, se ha definido que la actividad de YAP y TAZ responde a la naturaleza física de la célula y de su ambiente mediante las adhesiones celulares y a las señales mecánicas que la célula recibe de la arquitectura de los tejidos y la matriz extracelular circundante (MEC) (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014).

La ruta de señalización inicia con la unión de la cinasa MST1/2 a su proteína reguladora SAV1/WW45 para formar una enzima activa que fosforila y activa las cinasasa LATS1/2 y la subunidad MOB1A/B. A su vez, el complejo activado LATS1/2-MOB1A/B fosforila a YAP y TAZ (Berridge 2014). La fosforilación de YAP y TAZ inhibe su actividad: en el caso de TAZ al ser fosforilada es secuestrada por la proteína 14-3-3 que la mantiene en el citoplasma; en el caso de YAP, al ser fosforilada y encontrarse en el citoplasma puede ser enviada a degradación por ubiquitinación. Esto implica que cuando las proteínas YAP y TAZ se encuentran activas presentan una acumulación nuclear. En el núcleo, YAP y TAZ actúan como cofactores transcripcionales e interactúan con los factores transcripcionales TEAD para promover la transcripción de genes, por ejemplo los que regulan la proliferación, como se muestra en la figura 1.3.

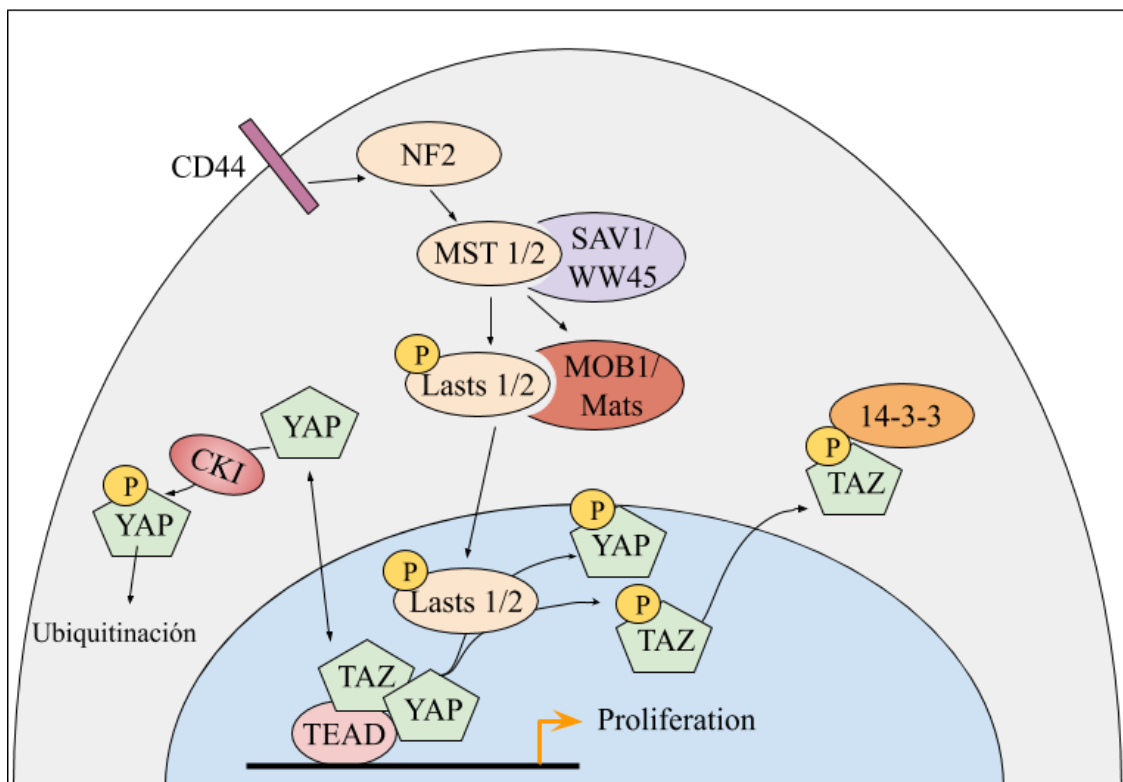


Fig 1.3 Vía de señalización Hippo La vía de señalización del hipopótamo se basa en una cascada de fosforilación de proteínas que funciona para regular la transcripción de los genes que juegan un papel en regulando la proliferación y el crecimiento de las células (Berridge 2014)

Una forma de estudiar la respuesta de células en diferentes contextos mecánicos requiere la evaluación de la localización subcelular de las proteínas YAP y TAZ, ver figura 1.4. Se ha reportado por ejemplo, que cuando una célula individual es libre de expandirse sobre la matriz, aumenta su área celular y la formación de fibras de estrés, entonces YAP y TAZ son activadas mostrando una acumulación nuclear en donde promueven la proliferación celular e inhiben la diferenciación. Por el contrario, cuando la

morfología celular se restringe para que adquiera una forma redonda y compacta, YAP y TAZ son traslocadas al citoplasma y sus propiedades transcripcionales se desactivan, deteniendo así la proliferación o el estado de diferenciación.

Por otro lado, la localización de YAP/TAZ también responde a cambios en la rigidez de la MEC. Una matriz o sustrato rígido mantiene activo a YAP y TAZ mientras que los sustratos suaves favorecen su inactivación y translocación al citoplasma. Tal es el caso de células trocalesas mesenquimales quienes en un sustrato rígido mantienen YAP y TAZ elevado en el núcleo y son inducidas hacia hueso, en contraste, los entornos más suaves deshabilitan progresivamente a YAP y TAZ y esto permite la diferenciación en otros tipos celulares, como los adipocitos.

La regulación mecánica de YAP y TAZ ocurre en células aisladas y en una variedad de tipos de células, independientemente de su origen mesenquimal, endotelial o epitelial. Esto sugiere la existencia de un mecanismo universal para el control de YAP y TAZ que es independiente de la polaridad epitelial y de los complejos de adhesión relacionados con la regulación de la vía de Hippo por las proteínas LAST1/2. De hecho se ha encontrado que la inhibición de YAP y TAZ por LAST1/2 no es apreciable en condiciones de bajo estrés mecánico. Tal es el caso de células tratadas con latrunculina, un inhibidor de la polimerización de actina, en las que se observó que la inhibición de LAST1/2 no es capaz de rescatar la actividad de YAP y TAZ (Aragona et al. 2013; Dupont et al. 2011). Por lo tanto el citoesqueleto de actina es una estructura requerida para la localización nuclear de YAP y TAZ.

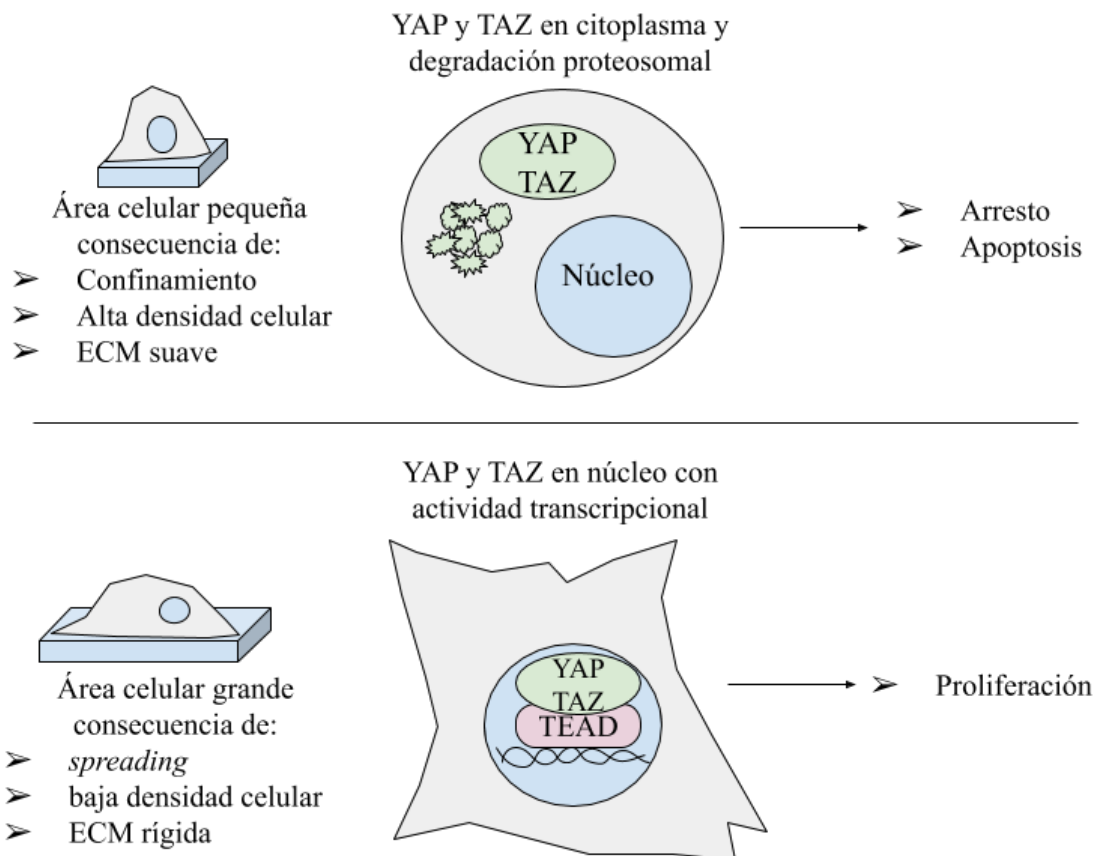


Fig 1.4 Representación de la regulación de la actividad de YAP/TAZ en función del esparcimiento celular y rigidez de la matriz (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014).

En el contexto del cáncer, YAP es activada por el endurecimiento aberrante de la MEC y promueve la expresión de proteínas tumorigénicas en fibroblastos asociados al cáncer (CAF por sus siglas en inglés). Interesantemente, YAP tiene la capacidad de auto-mantenerse activa en los CAFs, debido a la expresión de miosina de cadena ligera (MYL9) y la contractilidad de la actina, que a su vez induce el aumento de la rigidez de la MEC (Calvo et al. 2013).

La inhibición de proliferación por contacto, también induce la inhibición de YAP y TAZ. Se sabe, que estas proteínas están activas con localización nuclear en células que crecen a baja densidad pero se convierten en citoplasmáticas en células confluentes. Cuando las células comienzan a hacer contacto entre sí, el sistema de E-cadherina/catenina promueve la activación del LATS y, por tanto, la fosforilación de YAP y TAZ para su translocación al citoplasma. Posteriormente, cuando las células han alcanzado alta confluencia, su área se reduce significativamente y éste confinamiento provoca la inhibición de YAP y TAZ, esto implica la remodelación del citoesqueleto de actina, mediado por el taponamiento (*capping* en inglés) de los filamentos de actina y las proteínas de separación Cofilina, CapZ, y Gelsolina (Aragona et al. 2013)

Tomando en cuenta la información presentada en esta sección, la localización subcelular de YAP y TAZ es comúnmente utilizada como un sensor de la respuesta mecánica ya que se encuentra activo en el núcleo cuando las células están bajo estrés mecánico y por tanto se planteado en el presente proyecto como una manera de evaluar la respuesta de las células C9 a la rigidez del sustrato, cuyos datos se presentarán en el capítulo cuatro.

1.6.2 Señalización de MAPK

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) regulan diversos programas celulares al transmitir señales extracelulares a respuestas intracelulares. En los mamíferos, hay más de una docena de enzimas MAPK que regulan de manera coordinada la expresión génica, mitosis, metabolismo, motilidad, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular. Las más conocidas son las MAPK convencionales, que incluyen las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) (Berridge 2014). A través de la vía MEK-ERK la información es transferida por una serie de fosforilaciones subsecuentes, primero los miembros de la familia Raf (Raf-1, A-Raf y B-Raf) que fosforilan dos residuos de serina de MEK 1/2. Estas últimas son proteínas cinasas de doble especificidad que a su vez fosforilan los residuos de tirosina y treonina de ERK1/2 que son responsables de estimular los efectores posteriores, muchos de los cuales son factores de transcripción que regulan respuestas como proliferación, diferenciación y tumorigenesis.

Una característica importante de la vía de MEK-ERK es que puede ser activada por los receptores de proteína tirosina-cinasa (PTKR) y por los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs). Particularmente, se sabe que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que pertenece a una subfamilia de los PTKR, es un potente activador de la vía MEK/ERK. Sin embargo, además de los estímulos bioquímicos también se ha mostrado que las fuerzas mecánicas activan a ERK a través de los complejos de adhesión activando la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK (MacQueen, Sun, and Simmons 2013). Se ha encontrado por ejemplo, que en el contexto de la diferenciación de células troncales a células de músculo liso, proteínas de adhesión focal como la zixina refuerzan las

fibras de estrés en las células, probablemente mediante el aumento en la tensión del citoesqueleto y esto provoca un incremento en la actividad de ERK (Dharmarajan et al. 2018).

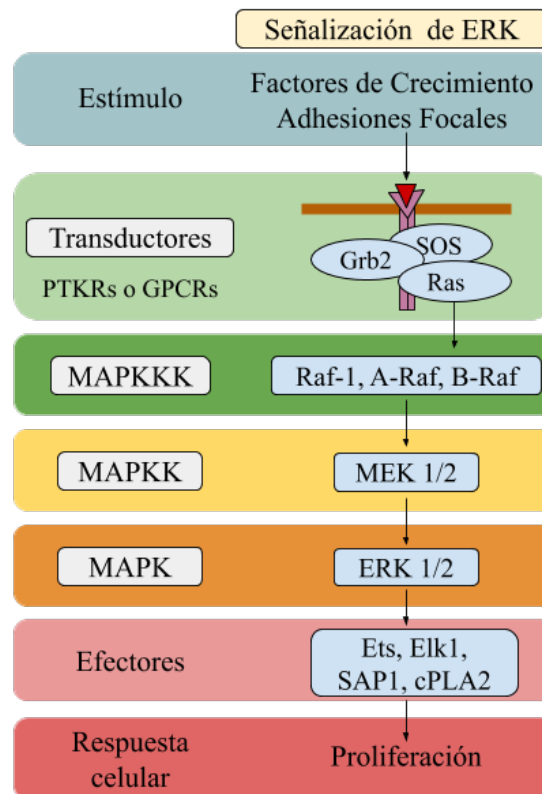


Fig 1.4 Vía de señalización MAPK genérica Organización de la vía de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Es representado aquí por Raf-1, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)/ERK quinasa 1/2 (MEK1/2) y ERK1/2, que puede ser activada por cualquiera de las proteínas receptores ligados a la tirosina y las cinas (PTKR) o por los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) (Berridge 2014).

En general es bastante aceptado que la señalización de ERK juega un papel relevante en la mecanotransducción, teniendo efectos en la diferenciación celular, división de células epiteliales y homeostasis. Estudios recientes han mostrado que durante el proceso de migración colectiva de células epiteliales, la activación de ERK se propaga en forma de ondas de activación a partir de la célula líder hacia las células que la siguen, esta caracterización ha sido posible mediante el diseño de biosensores de ERK que funcionan con base en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés) (Matsubayashi et al. 2004). Además, se ha mostrado que la propagación de la actividad de ERK facilita el movimiento de migración colectiva, particularmente la onda de activación de ERK se propaga en dirección contraria a la dirección de migración y también se encontró que la actividad ERK se correlacionó inversamente con la densidad celular local durante el ensayo de cierre de herida usando células caninas Madin-Darby (MDCK por sus siglas en inglés) (Aoki et al. 2017). Posteriormente Hino et al. usaron este mismo ensayo para estudiar la integración de las señales mecánicas y químicas durante la migración colectiva, en su trabajo mostraron que el estiramiento mecánico de la célula líder en la migración colectiva, activado ya sea por quimiotaxis o durotaxis, produce la activación de ERK a través del EGFR. Como consecuencia de la activación de ERK se produce la contracción celular a través de la regulación de la actinomicina por la cinasa asociada a Rho (ROCK por sus siglas en inglés). A su vez, la contracción de la célula líder jala a las células

vecinas a través de las uniones célula-célula iniciando la siguiente ronda de activación de ERK y contracción celular, a lo que se le conoce como retroalimentación mecanoquímica (Hino et al. 2020) y es el mecanismo por el cual se va transmitiendo la información hacia las células vecinas. Debido a la complejidad de la dinámica colectiva se han propuesto también modelos teóricos de biofísica para explicar cuantitativamente este proceso mediante un acoplamiento mecanoquímico entre las tensiones superficiales de la célula, la deformación celular y la actividad de ERK (Boockock et al., n.d.).

1.7 Técnicas de control de la rigidez del sustrato

Muchos de los avances en el entendimiento de la actividad de las moléculas que participan en el complejo proceso de la mecanotransducción han sido posibles gracias a los avances tecnológicos resultantes de la colaboración entre biólogos, físicos e ingenieros. Uno de los principales retos en el campo radica en la capacidad de diseñar materiales que puedan recrear efectivamente las interacciones célula-matriz presentes en la naturaleza. Esto requiere no sólo fabricar una estructura que sea similar a la MEC, sino más importante, crear una superficie con características químicas, mecánicas y topográficas adecuadas para el cultivo de células.

Los polímeros sintéticos se han utilizado cada vez más como sustratos que mimeticen las interacciones célula-matriz debido a que presentan una gran flexibilidad en los grupos funcionales que los conforman, pueden ser fácilmente moldeables además de que son mecánica y químicamente robustos (Langer and Vacanti 1993). Generalmente, las señales químicas en la superficie del polímero que tienen una influencia en el comportamiento de las células incluyen biomoléculas así como propiedades físico-químicas, tal es el caso de la hidrofobicidad, la energía superficial, rugosidad, entre otras (L. Chen, Yan, and Zheng 2018). La adhesión celular es el proceso por el cual las células interactúan y se unen a la superficie de un material o a otra célula, lo cual es esencial para la comunicación celular, la regulación, la formación de órganos y el mantenimiento de los tejidos (Khalili and Ahmad 2015) y por tanto es el primer paso en la interacción célula-polímero (Langer and Vacanti 1993). Las células interactúan inicialmente con una superficie a través del receptor transmembrana asociado al citoesqueleto. Durante este proceso, los receptores de la membrana celular se unen al sustrato cultivado a través de secuencias peptídicas específicas como el Arg-Gly-Asp (RGD), la fibronectina, la gelatina y el colágeno, que se presentan dentro de las proteínas de la MEC. Por lo tanto, los polímeros que son inertes a la adhesión celular requieren ser modificados con por proteínas que promuevan la adhesión celular. El polimetacrilato de glicidílico (PGMA) es uno de los polímeros más utilizados para ser modificado con las secuencias peptídicas específicas a través de sus grupos epoxídicos que reaccionan fácilmente con los grupos amino o carboxilo de las secuencias peptídicas (Yuan et al. 2012; Xu, Wang, and Yang 2010). Por ejemplo, Xu y colaboradores modificaron las superficies de policaprolactona (PCL) fijando motivos RGD y colágena en las cadenas de PGMA para promover la adhesión de fibroblastos 3T3 (Yuan et al. 2012; Xu, Wang, and Yang 2010). En otro ejemplo, Li y colaboradores unieron moléculas de sulfo-SANPAH a la superficie del PDMS con radiación UV. Luego, el grupo amino-reactivo del NHS en otro lado de sulfo-SANPAH reaccionó con el extremo amino de las moléculas de RGD, fijando así los motivos RGD con el PDMS. Los experimentos de cultivos celulares mostraron que el PDMS modificado por el RGD mejoró la adhesión, proliferación y secreción de colágeno de los fibroblastos humanos (B. Li, Chen, and Wang 2006; Pinese et al. 2017).

Reportes recientes muestran que la hidrofobicidad de la superficie de un polímero también juega un papel clave en la interacción célula-material y en la regulación de comportamientos celulares. La hidrofobicidad de una superficie depende de los grupos funcionales de la superficie, la rugosidad de la superficie del material, entre otros (Alves et al. 2010). Además, la hidrofobicidad puede controlar la absorción de proteínas esenciales en la superficie del polímero, afectando la adhesión celular y por consiguiente alterando el comportamiento de las mismas (Benoit et al. 2008; Lim et al. 2008). La mayoría de las células adherentes prefieren una superficie de hidrofiliencia moderada para la adhesión y el crecimiento, mientras que las superficies superhidrofílicas (ángulo de contacto inferior a 5°) y superhidrofóbicas (ángulo de contacto superior a 150°) no son favorables para la adhesión y el crecimiento celular (Inoue, Nakanishi, and Ishihara 2013; Fukazawa et al. 2016). Más aún, Oliveira y colaboradores mostraron que diferentes líneas celulares pueden tener respuestas distintas a las superficies hidrofóbicas. Ellos fabricaron superficies de poliestireno (PS) superhidrofóbico mediante un tratamiento de UV/ozono y observaron que células de la línea L929 (derivada de fibroblastos pulmonares de ratón) proliferaron normalmente en estas superficies mientras que las de la línea celular ATDC5 (derivada de teratocarcinoma de condrocitos de ratón) no proliferaron en estas superficies (Oliveira et al. 2011). A pesar de que hay diversos reportes sobre las diferentes respuestas celulares según la hidrofobicidad del material, aún no es claro cuál es el mecanismo molecular subyacente.

La topografía en las superficies de los materiales empleados como sustratos también puede influir significativamente en la interacción entre las células y los sustratos (X. Liu and Wang 2014). Normalmente, la topografía de una superficie de material puede dividirse en la topografía de superficie aleatoria y la topografía de superficie regular, dada por un patrón superficial. La topografía aleatoria, incluyendo características de pequeñas escalas como la porosidad (Alves et al. 2010; Ouyang et al. 2015), la rugosidad (Hallab et al. 2001; Ponsonnet et al. 2003) y el tamaño de los poros (O'Brien et al. 2005), puede afectar significativamente a la absorción de proteínas y, por tanto, a la respuesta celular. Sin embargo, al diseñar la topografía de la superficie mediante la asignación de un patrón con parámetros de rugosidad o porosidad controlados, es posible promover la adhesión y proliferación. Para controlar las señales topográficas una estrategia directa es controlar la cristalización de la superficie del polímero. En particular, muchos polímeros biodegradables pueden cristalizarse en esferulitas de diferente cristalinidad (Alves et al. 2010). Como consecuencia, las microcavidades formadas entre las esferulitas pueden actuar como una superficie texturizada para controlar la actividad celular. Por ejemplo, Martínez y colaboradores (Costa Martínez et al. 2008) prepararon ácido poliláctico (PLLA) semicristalino con microtopografía bien definida mediante diferentes tratamientos térmicos. Se encontró que el condrocito humano primario mostraba una forma alargada en una superficie de esferulitas más grandes mientras que una forma isotrópica en la superficie de esferulitas más pequeñas.

Utilizando polímeros, también es posible imitar las condiciones de rigidez de la MEC, lo que también permitiría modular la respuesta celular. El PDMS es un material elastomérico de bajo costo que se ha utilizado ampliamente para imitar la rigidez de la MEC, debido a que ofrece una amplia gama de valores de rigidez para el cultivo celular. Tal es el caso del trabajo presentado por Park y colaboradores en el que prepararon varios sustratos de PDMS de diferentes rigidez (de 280 a 1000 kPa) variando la relación entre la base de PDMS y el agente curante (Park et al. 2010). Al cultivar fibroblastos de ratón en este rango de rigidez observaron una menor proliferación y viabilidad en sustratos suaves y una

mayor proliferación en sustratos rígidos. De forma análoga, también se ha reportado que la rigidez del sustrato de PDMS tiene un efecto en la morfología, la formación de colonias así como en la osteogénesis de las células troncales mesenquimales de ratón (rMSC). En sustratos más rígidos se observa una mayor viabilidad, tamaño celular y grado de mineralización de las rMSC durante la pre-diferenciación celular (P.-Y. Wang, Tsai, and Voelcker 2012).

En búsqueda de ampliar el entendimiento de las interacciones mecánicas de las células con su microambiente, también se han desarrollado diferentes técnicas que permiten estimar las fuerzas que las células mismas ejercen en su entorno. Por ejemplo, la microscopía de fuerza de tracción (Pelham and Wang 1999) es un enfoque para realizar esta estimación: las células se colocan en un sustrato que contiene partículas fluorescentes que actúan como puntos de referencia, conociendo el módulo elástico del material del sustrato y mediante el seguimiento del movimiento de las partículas a medida que la célula ejerce fuerza sobre el sustrato, es posible estimar la fuerza según la ley de Hook. Para esta técnica se utilizan normalmente hidrogeles de poli(acrilamida) (PAA) recubiertos con ligandos como fibronectina o colágena que promueven la adhesión celular, una de las principales ventajas que tiene la PAA es que su rigidez puede ajustarse fácilmente en un rango fisiológico de 100 Pa a 100 kPa (Sabass et al. 2008). Sin embargo, una de las principales limitaciones al utilizar sustratos planos radica en que se requiere un alto poder de cómputo para hacer el mapeo de la deformación a lo largo del material, siguiendo el desplazamiento de las partículas ya sea por velocimetría de rastreo de partículas (PTV por sus siglas en inglés), o por velocimetría de imagen de partículas (PIV por sus siglas en inglés). Los hidrogeles de PAA, además de ser utilizados como sustratos para la técnica de TFM descrita anteriormente han sido cada vez más utilizados como sustratos de cultivo celular para estudios en mecanotransducción, debido a que permiten el control de sus propiedades mecánicas mediante el entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas. Son materiales transparentes e hidrofílicos que pueden ser funcionalizados con diferentes proteínas para promover la adhesión celular. Estas mismas razones los hacen ideales para imitar tanto la mecánica en rangos fisiológicos como las señales bioquímicas de la matriz extracelular (Pelham and Wang 1997).

Como alternativa a los sustratos planos empleados en TFM, se ha propuesto el uso de arreglos de micropilares fabricados con polidimetilsiloxano (PDMS), sobre los cuales las células son cultivadas, esto permite tener una estructura definida y de fácil visualización como referencia para la cuantificación de la deformación. El PDMS empleado para esta técnica presenta una gran capacidad para ser microestructurado pero tiene una rigidez alrededor de los 2 MPa que se encuentra muy por encima de los valores fisiológicos (Sabass et al. 2008). Por lo que una de las principales ventajas del uso de pilares radica en que la rigidez “aparente” del sustrato puede modificarse con la geometría de los pilares sin modificar la rigidez del material en bulto. Entonces, al conocer las dimensiones de los pilares, el módulo elástico del PDMS en bulto y la deflexión de los pilares producida por las células, es posible estimar la fuerza que ellas aplican para deformar los postes subyacentes (J. L. Tan et al. 2003). Con esta técnica se pueden medir fuerzas en el rango de 50 pN a 100 nN, con resolución espacial de 1 μ m, usando sustratos de rigidez de 1.2 kPa a 1 MPa, además de que es posible medir la fuerza ejercida por células individuales así como en monocapas celulares (Polacheck and Chen 2016).

Por otro lado, también se han propuesto sistemas de estimulación mecánica de forma dinámica en los que se utiliza la deformación del sustrato por estiramiento, con lo que se puede imitar movimientos

similares a la respiración o dilatación de vasos sanguíneos (Huh 2015). En estos sistemas usualmente se emplean membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) que al ser estiradas y debido a la tensión de la misma permite que la célula percibe una rigidez localmente mayor que si la membrana estuviera en su posición constitutiva (Verstreken et al. 2019). Más aún, se ha mostrado que fibroblastos embrionarios de ratón (FEM por sus siglas en inglés), así como células de riñón embrionario humano 293 (HEK293 por sus siglas en inglés) presentan un mayor esparcimiento y activación de ERK durante el estiramiento del sustrato, similar a lo observado en sustratos rígidos (Ursekar et al. 2014).

Más adelante, en el capítulo 3, se presentan con más detalle las diferentes estrategias que permiten tener un control específico de la rigidez para imitar condiciones fisiológicas para el cultivo de células y estudios de la respuesta celular a la mecánica del ambiente.

1.8 Síntesis del capítulo

En este capítulo introdujimos el estudio de la mecanobiología y mecanotransducción como un área de estudio multidisciplinaria que integra conceptos de biología, física e ingeniería para entender el papel que juegan las señales mecánicas en la regulación de procesos celulares como la diferenciación, proliferación, motilidad, entre otros. La mecanotransducción entra dentro del área de estudio de la comunicación celular y transducción de señales. Describimos las diferentes fuerzas mecánicas que actúan de manera constante sobre los tejidos y las células así como algunas de las respuestas celulares que se asocian a esos estímulos como es el caso la vasodilatación activada por los esfuerzos de corte dados por el flujo sanguíneo. Sin embargo, pusimos mayor énfasis en la rigidez asociada a la composición y estructura de la matriz extracelular debido a la relevancia para el presente proyecto. Las células utilizan el aparato de actomiosina para transmitir fuerzas de tracción hacia sus alrededores a través de las integrinas asociadas a las adhesiones focales o las cadherinas en las uniones adherentes. Con esto pueden percibir la rigidez de la matriz, remodelarla y a su vez pueden transmitir estímulos mecánicos a las células vecinas. Posteriormente, el estímulo mecánico es transmitido hacia el núcleo a través del citoesqueleto de actina que se une directamente a la lámina nuclear activando la transcripción. La señalización de YAP y TAZ es de las vías de mecanotransducción que más se han utilizado para entender los mecanismos moleculares involucrados en la transmisión de señales mecánicas y su transducción hacia el núcleo. La localización subcelular de YAP y TAZ es comúnmente utilizada como un sensor de la respuesta mecánica ya que se encuentra activo en el núcleo cuando las células están bajo estrés mecánico, ya sea por rigidez, flujo o spreading, o bien están en el citoplasma desactivadas en condiciones de bajo estrés mecánico o aumento en el confinamiento celular. Se sabe que cuando se encuentran activos regulan la expresión de genes asociados con la proliferación celular y comúnmente se observan pérdida del estado de diferenciación. Además de las proteínas LAST que se encargan de regular la fosforilación y la actividad de YAP/TAZ en la ruta Hippo, también se sabe que la dinámica del citoesqueleto juega un papel regulatorio en la señalización. Por otro lado, la vía de MAPK es una vía que ha sido ampliamente estudiada en distintos contextos celulares, y se encarga de regular la sobrevivencia y proliferación celular. Sin embargo, además de las señales bioquímicas que activan esta vía cada vez se ha encontrado más evidencia de que la activación de la polimerización del citoesqueleto y formación de fibras de estrés activada por las adhesiones focales en condiciones de estrés mecánico también aumentan la actividad de ERK.

Finalmente se mencionaron de forma preliminar algunas de las técnicas que se han empleado para controlar la rigidez del sustrato, como el uso de hidrogeles con rigidez modulable, capaces de ser entrecruzados con proteínas de matriz para imitar tanto el ambiente químico como el mecánico presente en la matriz extracelular. Además, estos mismos sustratos han sido empleados para desarrollar diferentes técnicas que permitan estimar las fuerzas que ejerce la célula sobre su alrededor. Por tanto, el control rigidez permite por un lado estimular mecánicamente a las células y también nos da una idea de la forma en la que la célula deforma al ambiente que la rodea. Teniendo toda esta información en mente, en el siguiente capítulo presentaremos de manera precisa los antecedentes sobre el control de rigidez *in vitro* para estudios de mecanotransducción para plantear la hipótesis y los objetivos del presente proyecto.

Capítulo 2

2. Antecedentes, hipótesis y objetivos

2.1 Antecedentes

El control de la rigidez de los sustratos usados para el cultivo *in vitro* de células es una estrategia ampliamente utilizada para llevar a cabo estudios de mecanotransducción. En una gran variedad de trabajos se ha reportado que en células epiteliales, una baja rigidez promueve el establecimiento de la polaridad y el fenotipo epitelial, mientras que en células mesenquimales puede inducir una modificación del fenotipo, tal es el caso de la especificación neuronal en células troncales mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) (Engler et al. 2006; Chlasta et al. 2017; Nasrollahi et al. 2017) o bien la inducción del estado quiescente en MSC humanas cultivadas sobre sustratos suaves (Winer et al. 2009). Sin embargo, el valor de rigidez fisiológico que garantiza la diferenciación celular parece variar significativamente de una célula a otra y aún se sabe poco sobre el fenómeno de “decisión celular” que ocurre en respuesta a la rigidez, sobre todo en líneas celulares que han sido diseñadas y mantenidas en sustratos plásticos rígidos. Actualmente es aceptado que células con fenotipo normal, como fibroblastos 3T3 por ejemplo, sufren apoptosis y disminuyen su tasa de proliferación celular en sustratos suaves en comparación con los rígidos (H.-B. Wang, Dembo, and Wang 2000). Otros estudios han demostrado por ejemplo que las células adherentes parecen perder su respuesta a la mecánica con el envejecimiento (Pelissier et al. 2014) y la rigidez del sustrato puede terminar siendo irrelevante para las células envejecidas. Esta observación parece de principal relevancia en el estudio de líneas celulares que han sido mantenidas en cultivo por tiempos prolongados. Por otro lado, la rigidez también puede regular la especificación del linaje celular, como la diferenciación de células precursoras a miofibroblastos u osteoblastos, la ramificación de las neuritas, la estriación de las células musculares y la morfología de los epitelios (Engler et al. 2006; Chlasta et al. 2017).

Por otro lado, se ha establecido que la composición y estructura de la matriz extracelular (MEC) confiere elasticidad y rigidez al tejido, y a su vez estas propiedades mecánicas contribuyen determinantemente a la correcta fisiología de las células dentro del mismo. Más aún, se sabe que la

rigidez de la matriz es responsable de la regulación del número y tamaño de las adhesiones focales, así como de la rigidez y la tensión desarrolladas por la propia célula (Pelham and Wang 1997; Wells 2008). Además, en algunas líneas celulares epiteliales de mama no transformadas (como las MCF10A T47D, MDA-MB-231, and NMuMG) se ha observado un aumento en la fosforilación de ERK en respuesta a un aumento en el módulo elástico del sustrato controlado por la densidad de colágena fibrilar, y esto a su vez aumenta la capacidad invasiva de dichas células (Provenzano et al. 2009). En el caso particular de las células hepáticas, se ha demostrado que las células estrelladas hepáticas (HSC) en sustratos blandos de poliacrilamida (PA) permanecen inactivas, mientras que en condiciones rígidas son activadas, adquiriendo un fenotipo tipo miofibroblasto, descrito por el aumento en la proliferación, contractilidad, capacidad migratoria y la expresión de actina de músculo liso alfa (α -SMA) y aumento en el área celular (Friedman et al. 1989; Guvendiren et al. 2014; Saums et al. 2014), aunque la aparición de estas características ocurre de manera progresiva, se ha observado que después de 7 días en sustratos rígidos las HSC adquieren el fenotipo de miofibroblasto completamente diferenciado (Olsen et al. 2011). En cuanto a las células epiteliales hepáticas, Fassett et al mostraron que cuando los hepatocitos primarios son cultivados en geles rígidos de colágena, después de 2 días, adquieren una mayor área celular, aumento en la proliferación y adoptan un fenotipo desdiferenciado, mientras que cuando se cultivan en geles suaves de colágena, permanecen diferenciados, el crecimiento se detiene y la fosforilación ERK se reduce significativamente (Fassett, Tobolt, and Hansen 2006; Godoy et al. 2009).

En resumen, las fuerzas mecánicas del microambiente celular regulan una amplia variedad de respuestas celulares, como diferenciación, proliferación, motilidad, quiescencia, viabilidad y expresión fenotípica. Es generalmente aceptado que la proliferación celular, el esparcimiento (del inglés *spreading*) y las adhesiones focales aumentan en un contexto de mayor rigidez de la matriz. Sin embargo, lo que no está claro es si este tipo de comportamiento celular puede revertirse cultivando en sustratos blandos aquellas líneas celulares que fueron seleccionadas originalmente en superficies rígidas.

En la mayoría de los reportes presentados anteriormente en esta sección, los experimentos para evaluar la respuesta celular a la rigidez del sustrato se realiza en un periodo de tiempo que comprende desde horas hasta un par de días. Sin embargo, aunque la evolución celular in vitro inducida bioquímicamente (por antibióticos por ejemplo) está bien establecida, ningún estudio ha examinado si la población de células puede evolucionar en respuesta a la selección impuesta por la exposición a las propiedades físicas de los materiales. En la terminología de la biología evolutiva, los fenotipos alternativos que podrían surgir debido a la rigidez del sustrato entre células con genotipos subyacentes idénticos se denominan "plasticidad fenotípica". La causa de la plasticidad fenotípica es el cambio epigenético (por ejemplo, la metilación del ADN, los cambios en los pequeños ARN), los cuales serían inducidos este caso por sustratos de rigidez definida y que pueden ser heredados a corto plazo (Killaars et al. 2019; C. X. Li et al. 2017; Yang et al. 2014). Killaars et al, utilizaron hidrogeles de PEG con rigidez fotosintonizable para estudiar el efecto de la historia del cultivo (en condiciones de baja y alta rigidez) en la epigenética de células troncales mesenquimales humanas (hMSC). Observaron que la acetilación de las histonas aumentó y la condensación de cromatina disminuyó en las hMSC cultivadas en sustratos de PEG rígidos y que la morfología nuclear, la acetilación de las histonas y la condensación de cromatina son reversibles cuando el tiempo de exposición a los sustratos rígidos es

corto, pero los efectos pueden llegar a ser irreversibles con una exposición y dosificación prolongadas, aparentemente regulada por la histona acetiltransferasa 1 (HAT1) (Killaars et al. 2019; C. X. Li et al. 2017; Yang et al. 2014)). Esto indica que la dosificación mecánica juega un papel importante en la remodelación de la cromatina a lo largo del tiempo y resulta relevante para la plasticidad fenotípica en las líneas celulares.

2.2 Hipótesis

Las células hepáticas C9, altamente proliferativas en sustratos de poliestireno rígidos, son sensibles a la rigidez del sustrato en el que son cultivadas y por lo tanto es posible disminuir la tasa de proliferación de esta línea celular al cultivarla en sustratos suaves. Potencialmente este arresto en la proliferación llevaría al aumento de la expresión de marcadores de fenotipo epitelial más parecido a un fenotipo de hepatocitos, ideal para la obtención de modelos *in vitro* de células epiteliales hepáticas

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Estudiar la influencia de la rigidez del sustrato de PDMS (con valores en el rango de 5 a 200 kPa) sobre la viabilidad, morfología y expresión del fenotipo de células hepáticas de la línea celular C9, en comparación con la caja de poliestireno con un módulo elástico del orden de GPa.

2.3.2 Objetivos particulares

- Fabricación de sustratos de PDMS con rigidez controlada para su uso como sustratos de cultivo celular.
- Caracterización mecánica por microindentación para la obtención del módulo elástico de los sustratos de PDMS, comparando con la técnica de tracción uniaxial.
- Evaluación del efecto de la rigidez del sustrato en la viabilidad, proliferación, adhesión, morfología y expresión del fenotipo de la línea celular hepática C9 en tiempos cortos de exposición a la mecánica del sustrato.
- Evaluación de la evolución temporal de la respuesta celular a la mecánica del sustrato durante tiempos de exposición prolongados.

Capítulo 3

3. Fabricación de sustratos con control de rigidez

En este capítulo se presenta un panorama de los diferentes sustratos que son comúnmente utilizados para control de rigidez así como las ventajas que hicieron destacar al PDMS como sustrato para este proyecto. Se presenta también el proceso de fabricación y estandarización empleado para la obtención de sustratos de PDMS con rigidez variable utilizando dos kits comerciales, gel y elastómero, de PDMS. Finalmente se presenta la caracterización mecánica empleada para garantizar reproducibilidad y repetibilidad en los sustratos aquí empleados, mediante indentación y su comparación con tensión uniaxial.

3.1 ¿Qué sustratos son usados para control de rigidez?

Tradicionalmente, los métodos de cultivo empleados consisten en la siembra de células sobre superficies de plástico o vidrio planas y rígidas ($\sim 3 \text{ GPa}^1$ (Worzakowska 2015; Eyckmans and Chen 2014)) a las cuales se les agrega un medio de cultivo rico en nutrientes de manera estática. Sin embargo, estas condiciones de cultivo, particularmente para el cultivo de células hepáticas, carecen de un entorno biomimético que permita mantener el fenotipo que se requiere en ensayos esenciales para estudiar el metabolismo de fármacos o el desarrollo de dispositivos hepáticos bioartificiales por ejemplo.

Como hemos mencionado hasta ahora, la rigidez del sustrato, entre otros parámetros, desempeña un papel fundamental en la optimización del cultivo celular al emular condiciones más fisiológicas. En el caso particular del hígado, se han reportado diferentes rangos de rigidez dependiendo si se considera la caracterización a nivel celular o bien del órgano completo. De hecho, la rigidez ha sido un parámetro crucial en el diagnóstico de la fibrosis en el hígado para lo que se han utilizado dispositivos no invasivos, tal es el caso del FibroScan que permite una caracterización global de la rigidez del órgano

¹ [Sitio web] Engineering ToolBox, (2003). Young's Modulus - Tensile and Yield Strength for common Materials. Disponible en: https://www.engineeringtoolbox.com/young-modulus-d_417.html [Revisado 05/08/2020]

mediante la elastografía por ultrasonido, ésta es una técnica mediante la cual se transmite una vibración hacia el hígado induciendo así una onda elástica que se propaga a través del tejido. Esta propagación es seguida por la ecografía pulso-eco con la que se mide la velocidad de propagación del sonido en el tejido hepático, que se relaciona directamente con la rigidez del tejido. Cuanto más rígido es el tejido, más rápido se propaga la onda elástica (Friedrich-Rust et al. 2008). Los valores de rigidez reportados por elastografía que se suelen utilizar en el diagnóstico de los niveles de fibrosis hepática son inferiores a 5 kPa para el tejido sano y aumenta a 10 kPa o más en condiciones fibróticas (Degos et al. 2010). Una de las principales ventajas del uso de esta técnica es que es una prueba no invasiva al no requerir una biopsia del paciente, sin embargo, presenta alta confiabilidad sólo en estado avanzados de fibrosis o cirrosis pero baja en el estado de fibrosis significativa que va de 7-10 kPa (Degos et al. 2010) lo que limita su uso en el diagnóstico preventivo de la cirrosis. Además de que esta prueba evalúa la rigidez del órgano completo sin capacidad de distinguir entre los elementos que lo componen y la arquitectura interna determinada por la organización espacial de la matriz extracelular y las células del parénquima hepático en conjunto con las no parenquimales.

Con el fin de caracterizar efectivamente la rigidez del hígado de manera localizada, se ha utilizado la microindentación por microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés). El principio básico de este método es el uso de una punta de AFM con geometría conocida para indentar la superficie del tejido y estimar la fuerza aplicada debido a la deflexión del cantilever del AFM. Ajustando la curva de fuerza vs indentación al modelo de Hertz y considerando la geometría de la punta utilizada se pueden obtener mediciones cuantitativas de la rigidez del material (Thomas et al. 2013; F. Liu and Tschumperlin 2011). Utilizando esta técnica ha sido posible caracterizar de manera localizada la rigidez del lobulillo hepático, la unidad estructural y funcional del hígado. En condiciones del hígado sano la rigidez medida es de 150 Pa y aumenta a 1-6 kPa en el hígado fibrótico debido al depósito de colágena fibrilar (Desai et al. 2016). La principal ventaja de esta técnica de caracterización es que permite hacer un mapeo de la rigidez en un tejido lo que ayuda a distinguir gradientes de rigidez o bien a localizar las regiones referentes de acumulación de matriz. Sin embargo, el AFM no mide directamente la fuerza que el tejido requiere para la deformación sino que hace una estimación en función de la deflexión del cantilever por lo tanto escoger el cantilever con la constante de resorte fuera del rango de fuerza adecuado puede, ya sea dañar la muestra si no flexiona lo suficiente o sobrestimar la rigidez del tejido porque se flexiona mucho. Por otro lado, una fuente importante de incertidumbre en la medición con AFM es la dificultad de precisar el punto de contacto con la superficie de interés para determinar precisamente el momento en el que comienza la indentación.

Sin embargo y a pesar de las limitaciones que hemos mencionado, estas técnicas permiten tener valores de referencia de la caracterización de las propiedades mecánicas del tejido hepático. Por lo tanto, para integrar en los modelos *in vitro* valores de rigidez comparables con las condiciones mecánicas del ambiente natural, tanto en condiciones normales como patológicas, es necesario contar con materiales que permitan un control preciso de la rigidez en un rango de fisiológico, de 1 a 20 kPa idealmente.

En respuesta a esta necesidad se han propuesto diferentes materiales como los geles a base de componentes de MEC como colágena tipo I (Jabaji et al. 2014), fibrina (J. Liu et al. 2012), laminina (Alcaraz et al. 2008) o matrigel (Kleinman and Martin 2005), en todos los casos la rigidez puede

modificarse con la densidad de proteína o bien por un entrecruzante químico. Sin embargo, la complejidad y composición de dichas matrices no permiten modificar la rigidez de manera controlada y precisa. Otros materiales propuestos son polímeros naturales de carbohidratos como agarosa y agar suave, estos materiales son termorreversibles por lo que son fáciles de usar además de que no son tóxicos para las células lo que los hace ideales para cultivar células embebidas en ellos. La desventaja principal de este tipo de polímeros es su baja resistencia a la deformación además de que son poco estables con el tiempo.

Se han propuesto también polímeros sintéticos que permiten controlar de forma más precisa algunas de las propiedades mecánicas que los hacen ideales para su uso como sustratos de cultivo celular que pueden ir desde superficies planas para cultivo 2D como estructuras complejas para cultivo 3D. Dentro de estos materiales se destacan el ácido poli-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA) que resultan fáciles de moldear y además, en el caso particular del PLLA y PGA pueden ser materiales biodegradables. Sin embargo, al desgastarse estos materiales producen CO₂ lo que acidifica el pH causando un efecto nocivo para los cultivos. Dentro de los polímeros sintéticos no biodegradables se destacan los hidrogeles de poliacrilamida (PA) que permiten un control preciso de rigidez y que pueden ser funcionalizados con proteínas de MEC para promover la adhesión celular (Tse and Engler 2010). Con el fin de contar con materiales con baja citotoxicidad que permitan hacer cultivo 3D embebiendo las células para obtener un confinamiento mecánico isotrópico se han propuesto modificaciones químicas que permiten usar enzimas como agentes entrecruzantes tal es el caso de los hidrogeles de poli-etilenglicol (PEG) entrecruzados enzimáticamente y que son usado para la expansión de organoides de células troncales de intestino y que debido a la baja rigidez del material mantienen su estado no diferenciado (Gjorevski et al. 2016).

Otros polímeros sintéticos también han sido propuestos por su capacidad de modular la rigidez, tal es el caso del polidimetilsiloxano (PDMS) cuya rigidez reportada varía en un rango muy amplio que no permiten otros materiales, desde los 5 kPa hasta los 2 MPa (Palchesko et al. 2012). Este polímero biocompatible permite que las células se adhieran, proliferen y tengan un comportamiento comparable con la caja de poliestireno (PS) lo que lo hace ideal para el cultivo de las células C9 en este proyecto, en contraste con los hidrogeles de poliacrilamida en los que se ha observado una baja adhesión celular aún controlando el recubrimiento con proteínas de matriz. Por otro lado, el PDMS es un material barato y de fácil uso, cuyas propiedades mecánicas y eléctricas ha propiciado su uso en procesos de microfabricación, tal es el caso de la técnica de litografía suave conocida como Molde-Réplica, debido a que el PDMS tiene la capacidad de replicar estructuras con una alta fidelidad y con resolución en nm (Qin, Xia, and Whitesides 2010). Es así que la posibilidad de microestructurar el PDMS así como la posibilidad de modificar sus propiedades mecánicas ha motivado su utilización como sustrato para cultivo celular. En el área de la investigación en Biomedicina, el PDMS se ha utilizado para la fabricación de membranas porosas, andamios, biosensores e incluso en sistemas más complejos del tipo *lab-on-a-chip* para estudios biológicos o médicos (Mata et al. 2009). Sin embargo, en el presente proyecto, es de particular interés la posibilidad de modificar la rigidez del polímero hasta llegar a valores de 5 kPa, que representa un valor comparable con las condiciones fisiológicas en contraste con el poliestireno que tiene rigidez en el orden de 3 GPa. Además, usando este material se tiene el potencial de que los resultados que surjan de este estudio sean trasladados a sistemas biomiméticos más complejos del tipo *lab-on-chip*.

3.2 Estandarización del protocolo de fabricación para controlar la rigidez

Para la preparación de los sustratos de cultivo con PDMS de diferente módulo elástico se trabajó con las presentaciones del elastómero Sylgard 184 y del gel Sylgard 527 que fueron adquiridos comercialmente de Dow Corning. El Sylgard 184 se preparó mezclando en una proporción en peso 10:1 del prepolímero y el agente curante del kit. Mientras que el Sylgard 527 se preparó mezclando partes iguales del reactivo A y el reactivo B, equivalente a una proporción en peso 1:1. A cada una de estas mezclas nos referimos como las mezclas madre.

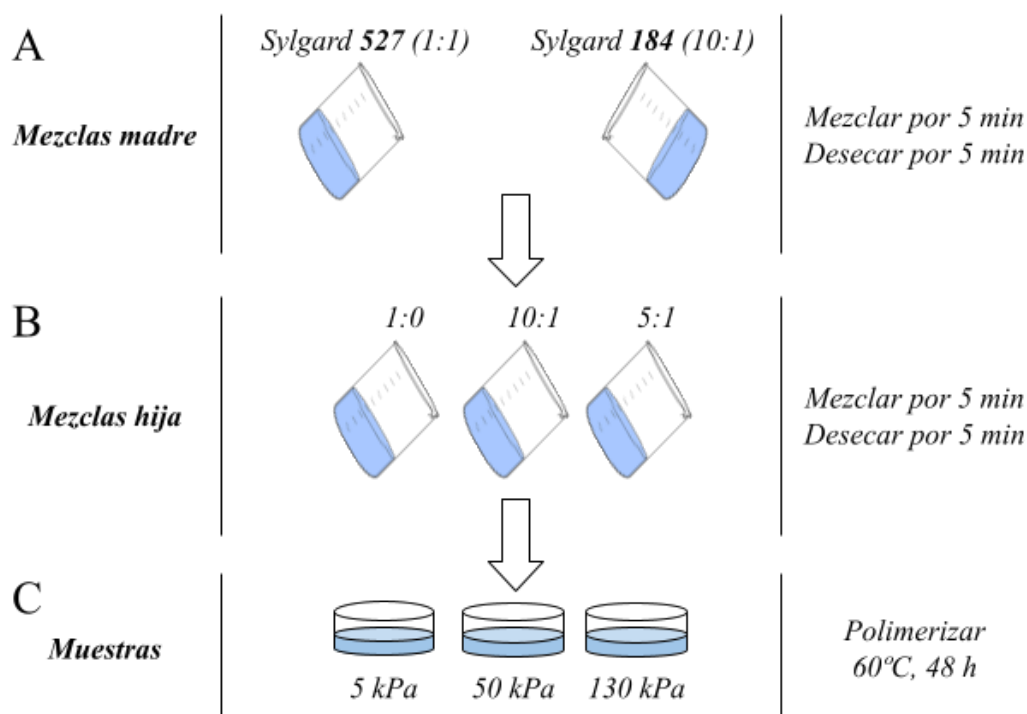


Fig. 3.1 Esquematización del flujo de trabajo para la fabricación de sustratos de PDMS con rigidez variable

Según el protocolo reportado por Palchesko et. al., con el elastómero 184 en proporción 10:1 se obtiene una rigidez de alrededor de 2 MPa por lo que el principio por el cual se logra disminuir este valor de rigidez es al incorporar en la mezcla cierta proporción del gel 527 (1:1) cuya rigidez se reporta alrededor de los 5 kPa. Para la obtención de los sustratos con valores de rigidez inferiores a 2 MPa se prepararon mezclas hijas en las que las dos mezclas madres 527 y 184 son integradas en proporciones 1:0, 10:1 y 5:1 cuyos valores de rigidez reportados por Palchesko et. at. son 5 kPa, 20 kPa, 50 kPa y 130 kPa respectivamente, como se muestra en la figura 3.2. Todas las preparaciones, tanto madres como hijas, fueron mezcladas homogéneamente a 1500 rpm por 5 min, después desecadas para retirar las burbujas que se generaron en el mezclado y finalmente colocadas en los moldes correspondientes para su posterior polimerizar en un horno de convección a 60°C por 48 h.

Una primera caracterización mecánica de los sustratos de PDMS fabricados se hizo a través de la prueba de tracción uniaxial que es una de las pruebas más utilizadas en la caracterización de propiedades mecánicas tales como el módulo elástico y el esfuerzo último de ruptura (UTS, por sus siglas en inglés ultimate tensile strength) de diversos materiales metálicos y poliméricos. Esta prueba consiste en colocar una muestra del material de interés entre dos mordazas y tirar por un extremo mientras el otro se queda fijo. Conociendo la fuerza aplicada, el desplazamiento y las dimensiones de

la muestra es posible obtener la gráfica de esfuerzo (σ) contra deformación (ϵ), a través de la cual se pueden calcular propiedades mecánicas tales como módulo elástico (E) y esfuerzo último de corte (UTS por sus siglas en inglés). Debido a la necesidad de obtener mediciones precisas requeridas para la prueba de tracción uniaxial particularmente para sustratos suaves y delgados como el caso del PDMS, se utilizó el miniprobador de tensión uniaxial diseñado en el laboratorio del Dr. Francisco Sánchez Arévalo del Instituto de Investigaciones en Materiales (Garnica-Palafox et al. 2014), en la figura 3.2 se muestra una esquematización del dispositivo empleado.

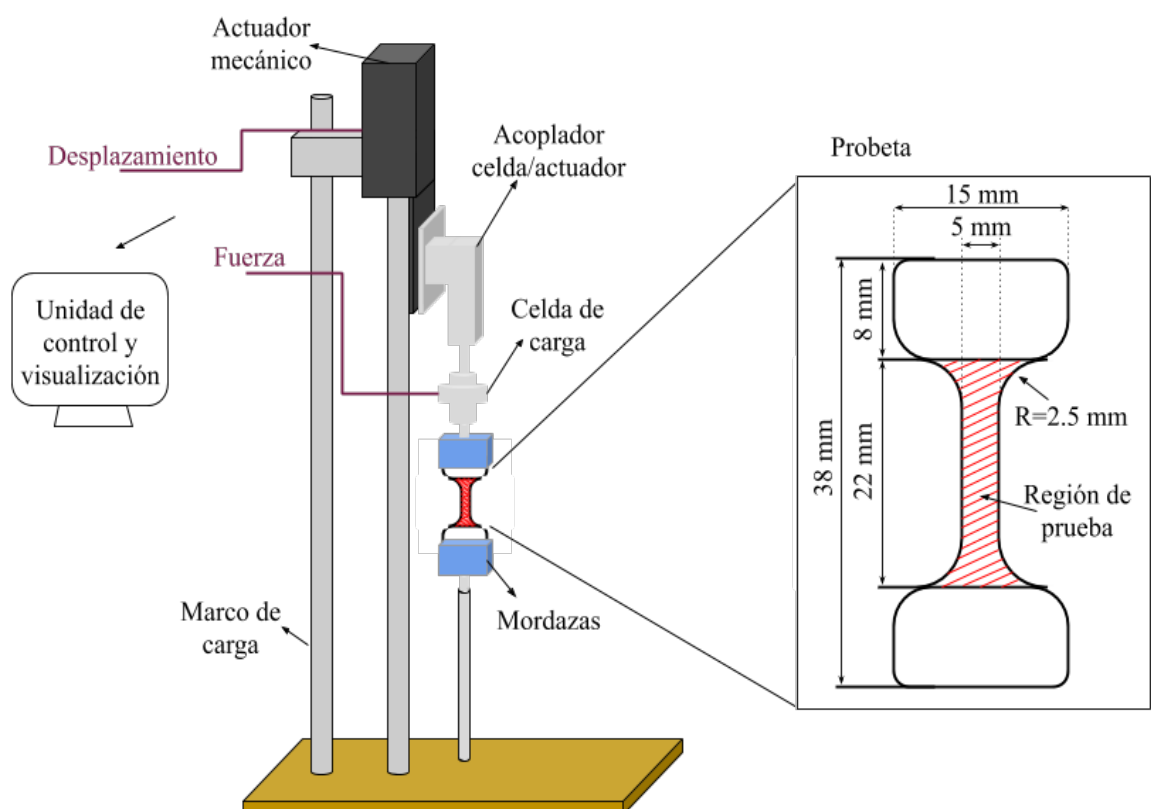


Fig. 3.2 Diagrama del probador de tracción uniaxial y probeta con geometría de mancuerna acordes al estándar ASTM D1708

Para esta prueba se fabricaron membranas de PDMS en un molde antiadherente para poder desprenderse y cortar las muestras que se disponen para la prueba de tracción uniaxial, a las que también se les llaman probetas. Como parte importante de la prueba consiste en conocer de manera precisa las dimensiones de la probeta utilizada se utiliza un suaje con geometría estandarizada tipo mancuerna ya que ésta es una geometría que permite que la distribución de los esfuerzos ocurra en la parte central de las probetas, las dimensiones son especificadas en la figura 3.2. Se cortaron al menos 5 probetas por cada membrana de PDMS y antes de colocar las muestras en el miniprobador se midió su espesor con un micrómetro digital, realizando por lo menos tres mediciones por probeta para obtener el espesor promedio.

Finalmente, cada probeta fue colocada cuidadosamente entre las dos mordazas. La mordaza inferior se mantiene fija mientras que la superior se desplaza hacia arriba para someter la probeta a una deformación longitudinal. El dispositivo permite medir tanto el desplazamiento (con el actuador mecánico) como la fuerza aplicada (con la celda de carga) hasta que la probeta finalmente se rompe.

Con los valores de fuerza medidos por el equipo es posible calcular el esfuerzo (σ) con la siguiente relación

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

donde F es la fuerza y A_0 es la sección transversal inicial en el centro de la probeta, $[\sigma] = \frac{N}{m^2} = \text{Pa}$.

Por otro lado, debido a que el PDMS es un material hiperelástico, es decir que sufre grandes deformaciones ante pequeños esfuerzos, su relación esfuerzo vs deformación no es lineal por lo que no es posible aplicar el modelo de Hooke ($\epsilon = \sigma/E$) para determinar el módulo elástico E . En este trabajo utilizamos el modelo de Ogden para estudiar el PDMS asumiendo que su comportamiento es de un material hiperelástico (elastomérico) y que aún mezclándolo con el gel 527 su comportamiento sigue siendo hiperelástico. La siguiente ecuación corresponde con el modelo de Ogden para tracción uniaxial

$$\sigma(\lambda) = \frac{2\mu}{\alpha} \left[\lambda^{(\alpha-1)} - \lambda^{-(\frac{1}{2}\alpha+1)} \right]$$

donde σ es el esfuerzo, λ es la razón de elongación ($\lambda = \epsilon + 1$), μ es el módulo de corte y α es un parámetro relacionado a materiales incompresibles (Ogden 1973). La deformación longitudinal de la muestra (ϵ) es calculada usando $\epsilon = \frac{l-l_0}{l_0}$, donde l_0 es la distancia inicial entre ambas mordazas y l es el cambio en la distancia según se van alejando las mordazas durante la prueba. Para determinar el módulo elástico (E) se utiliza la siguiente relación para materiales incompresibles

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

donde ν es el coeficiente de Poisson, que es una constante elástica que relaciona la deformación transversal y la deformación longitudinal del material en respuesta a un esfuerzo de tensión en una de las dos direcciones. Considerando que el PDMS puede ser considerado como un material incompresible, se utilizó el coeficiente de Poisson de 0.5, como ha sido reportado previamente para elastómeros (Callister and Rethwisch 2012), por lo tanto $E = 3\mu$. A partir de los datos de fuerza y desplazamiento medido con el probador, se obtienen las curvas de σ vs λ , usando las relaciones descritas previamente. Utilizando Mathematica se realiza un ajuste no lineal a los datos para obtener el valor de μ y finalmente obtener el módulo elástico E de las muestras.

Al hacer una primera caracterización de las mezclas de PDMS fabricadas siguiendo el protocolo de la sección anterior, se observó una alta dispersión en el comportamiento mecánico comparando hasta seis probetas de una misma muestra, ver figura 3.3A. Esto indica que las propiedades mecánicas obtenidas fueron heterogéneas en cada muestra además de poco reproducibles. Esto resaltó la necesidad de estandarizar el método de fabricación para tener un control preciso de la rigidez de las muestras de PDMS, así como para garantizar la reproducibilidad y homogeneidad de las mismas. Algunos de los parámetros cruciales para la estandarización del método son: el tiempo de mezclado (t_m), crucial para homogeneizar la mezcla y obtener una polimerización homogénea en todo el material en bulto; tiempo de desecado (t_d) que es fundamental para extraer las burbujas obtenidas durante el mezclado, esto garantiza que los sustratos de PDMS obtenidos sean transparentes y facilita la imagenología; temperatura (T) y tiempo de polimerización (t_p), la temperatura ayuda a acelerar la

reacción de polimerización de manera controlada y tiempo prolongado garantiza llegar a al máximo de polimerización. Los valores determinados fueron: $t_m = 5$ min (a 1500 rpm); $t_d = 5$ min; $T = 60^\circ\text{C}$; $t_p = 48$ h.

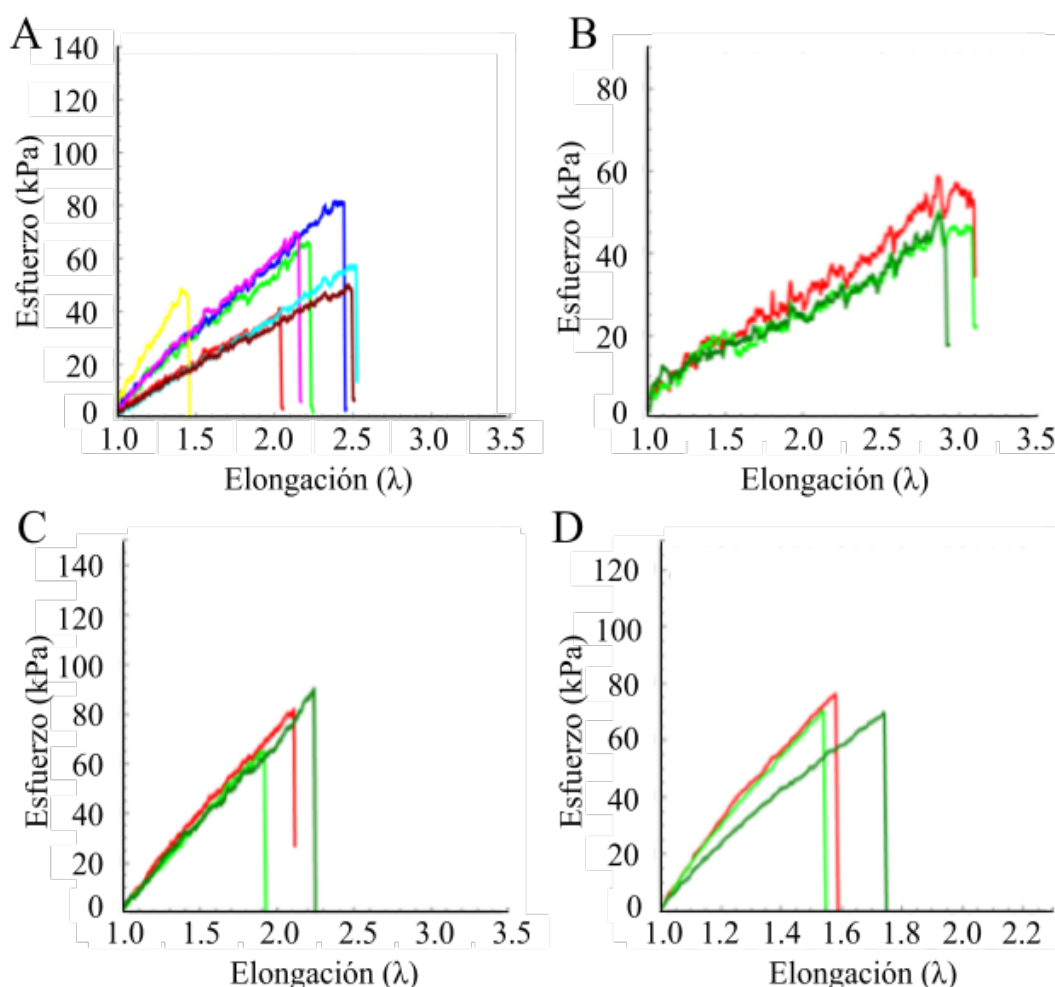


Fig. 3.3 Gráficas de esfuerzo contra elongación de probetas distinta para 3 preparaciones de PDMS (A) Mezcla hija 1:0 no estandarizada (B) Mezcla hija 1:0 estandarizada (C) Mezcla hija 10:1 (D) Mezcla hija 5:1

Una vez establecido el método, se prepararon nuevas muestras para su consecutiva caracterización por tracción uniaxial, esta ocasión se fijó a tres el número de probetas por cada preparación. En esta ocasión y como se puede observar en la figura 3.3B-D, las muestras presentaron baja variabilidad en las curvas de esfuerzo contra elongación, lo que sugiere que fue posible homogeneizar las propiedades mecánicas del material.

En la tabla 3.1 se observan los valores del módulo elástico obtenidos antes y después de la estandarización del método de fabricación. Es posible identificar que los valores de E obtenidos experimentalmente sin cuidar la preparación se encuentran alrededor de 50 kPa por encima de los valores que se esperaban. Particularmente llama la atención que mientras menor es la rigidez del material, mayor es la dispersión de los datos ya que presentan una mayor desviación estándar, la incertidumbre es casi del 30% para el PDMS más suave (mezcla 1:0 en la tabla 3.1). Por otro lado, después de estandarizar el protocolo de fabricación se observaron valores más cercanos a los esperados aunque siguen estando por encima. Sin embargo, se puede observar que la incertidumbre

de las mediciones bajó considerablemente especialmente en el PDMS más suave cuya incertidumbre es ahora del 13%. Estos datos confirman la necesidad de cuidar el proceso de fabricación, controlando tiempo de mezclado, temperatura y tiempo de curado para garantizar reproducibilidad y repetibilidad de las características mecánicas.

PDMS	Módulo elástico E		
	<i>E</i> teórico (kPa)	<i>E</i> experimental no estandarizado (kPa)	<i>E</i> experimental estandarizado (kPa)
Mezcla 1:0	5	58.65 ± 17.61	18.4 ± 2.51
Mezcla 10:1	50	101.18 ± 15.65	83.9 ± 7.26
Mezcla 5:1	130	184.31 ± 4.38	158.9 ± 11.3

Tabla 3.1. Valores del módulo elástico para las diferentes preparaciones de PDMS

Finalmente y en busca de entender a qué se debía la discrepancia de los valores obtenidos con los valores esperados, se buscó un método alternativo de caracterización y poder hacer así una comparación de los resultados. Además, la prueba de tensión uniaxial es una prueba destructiva que requiere un gran número de muestras y tiempo para llevarse a cabo por lo que se buscó un método que permitiera reducir estos tiempos y material para hacer una caracterización más profunda.

3.3 Caracterización mecánica por microindentación

Físicamente las propiedades mecánicas se definen cuando se ejerce en cierta dirección un esfuerzo mecánico produciendo una deformación en el material de estudio. Al medir la fuerza ortogonal correspondiente a un esfuerzo ejercido sobre una cara del material durante su deformación se pueden obtener el módulo elástico *E*, o módulo de Young, el cual se define como el cociente entre la tensión y la deformación que sufre un material en la dirección del esfuerzo aplicado. Este mismo principio se aplica para la prueba de tracción uniaxial empleado en la sección anterior. Sin embargo, como hemos mencionado, esta es una prueba destructiva y que para las pruebas de caracterización de PDMS no arrojó valores comparables con lo esperado. Por lo tanto, en esta sección se presenta la técnica de microindentación como una alternativa para conocer el módulo elástico del PDMS. La microindentación es una prueba no destructiva y altamente localizada que permite aumentar el número de mediciones por muestra y por tanto aumentar la estadística de la caracterización utilizando menos material y menos tiempo. Además resulta más representativo de lo que perciben las células al interactuar con el sustrato ya que las mediciones pueden ser realizadas en condiciones de humectación y temperatura como en el cultivo celular.

La microindentación consiste en presionar la superficie del PDMS utilizando una punta rígida de geometría conocida y escala micrométrica. Conociendo, la fuerza aplicada y el área de contacto que corresponde con la huella que deja la punta en el material es posible determinar propiedades mecánicas del material como el módulo elástico. Uno de los equipos de medición mecánica por indentación más utilizados es el AFM. Sin embargo, la medición de la fuerza durante la deformación con este equipo se realiza de manera indirecta utilizando la deflexión del *cantilever*, además de que

su elevado costo limita el acceso en diversos laboratorios de investigación. Particularmente en este trabajo empleamos el probador micromecánico FT-MTA-03 de la marca Femto Tools. Por la naturaleza del equipo, es posible utilizar el modelo de Hertz ya que éste relaciona la distancia, la fuerza y geometría de indentación con el módulo efectivo de Young del material (Guz et al. 2014). Para que esto sea válido se supone que el material es homogéneo e isotrópico, la indentación debe ser normal a la superficie de la muestra y considerando deformaciones pequeñas, menores al 30% del radio de la esfera utilizada para indentar. Esto último es relevante para poder suponer que el material es elástico y que no hay más interacciones no normales del material con la punta de prueba. Por lo tanto, se utilizó una punta de cristal esférica de 50 μm de diámetro ($\text{FTS100} \pm 100 \mu\text{N}$), considerando una indentación máxima de 7.5 μm de indentación.

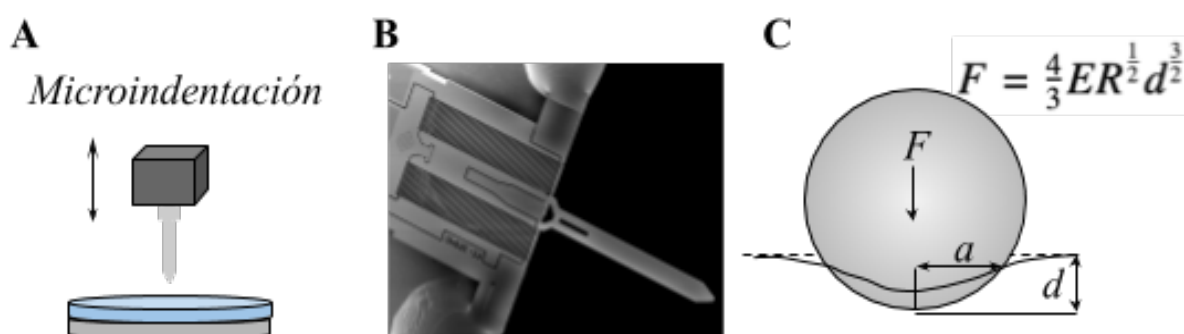


Fig 3.4 (A) Diagrama de microindentación (B) Fotografía de punta empleada para la microindentación (C) Esquema de mecánica de contacto para determinar el módulo elástico E usando el valor de fuerza aplicada F , el radio de la esfera R y la distancia de indentación d .

Para garantizar la integridad de la punta del equipo es recomendado utilizar muestras no adherentes para evitar que se adhieran a la punta durante la prueba lo que podría causar que los modelos matemáticos de ajuste y cálculo del módulo de Young fueran incorrectos y también prevenir que la punta se rompiera. Una forma de reducir la adherencia de las muestras de PDMS fue mantenerlas en humectación por lo que todas las mediciones se realizaron en muestras cubiertas en medio de cultivo ya que el equipo permite además realizar las mediciones en líquido. Esto es una ventaja también para conocer las propiedades mecánicas del material en condiciones más cercanas a las del cultivo celular que nos interesa.

Debido al interés de usar los sustratos de PDMS de rigidez variable como sustratos de cultivos celular es necesario considerar los protocolos necesarios para la esterilización del material. Uno de los procesos de esterilización más utilizados por su sencillez y efectividad es la exposición a luz ultravioleta (UV). Sin embargo, diversos estudios han mostrado que el tratamiento con UV y ozono pueden alterar la red polimérica del PDMS (Efimenko, Wallace, and Genzer 2002; Fu et al. 2010). Por lo tanto, para evaluar el posible efecto del tratamiento UV en la rigidez del PDMS, se realizó la medición por indentación antes y después del tratamiento.

En la figura 3.5a se muestra una curva típica de indentación obtenida con el equipo para una de las muestras de PDMS, en cian se encuentran los valores medidos de fuerza contra distancia de indentación y en rojo está el ajuste usando el modelo de Hertz. Una fuente importante de incertidumbre en el proceso de análisis de los datos está relacionada con poder encontrar el punto de contacto de la punta con el material en la gráfica de fuerza contra distancia. Esto último gana relevancia en materiales

muy suaves en los que los valores de fuerza detectados fuera y en contacto con el material no varían mucho. En el laboratorio se desarrolló un método de análisis empleando la gráfica de la segunda derivada mediante la cual se puede observar un punto máximo que corresponde al punto de inflexión a partir del cual se asegura que la punta está en contacto con el material, ver figura 3.5b. Por lo tanto, una vez encontrado el punto de contacto, se hace el ajuste del modelo de Hertz hasta una distancia de indentación máxima de $7.5 \mu\text{m}$ y finalmente, con este ajuste se calcula el módulo elástico E .

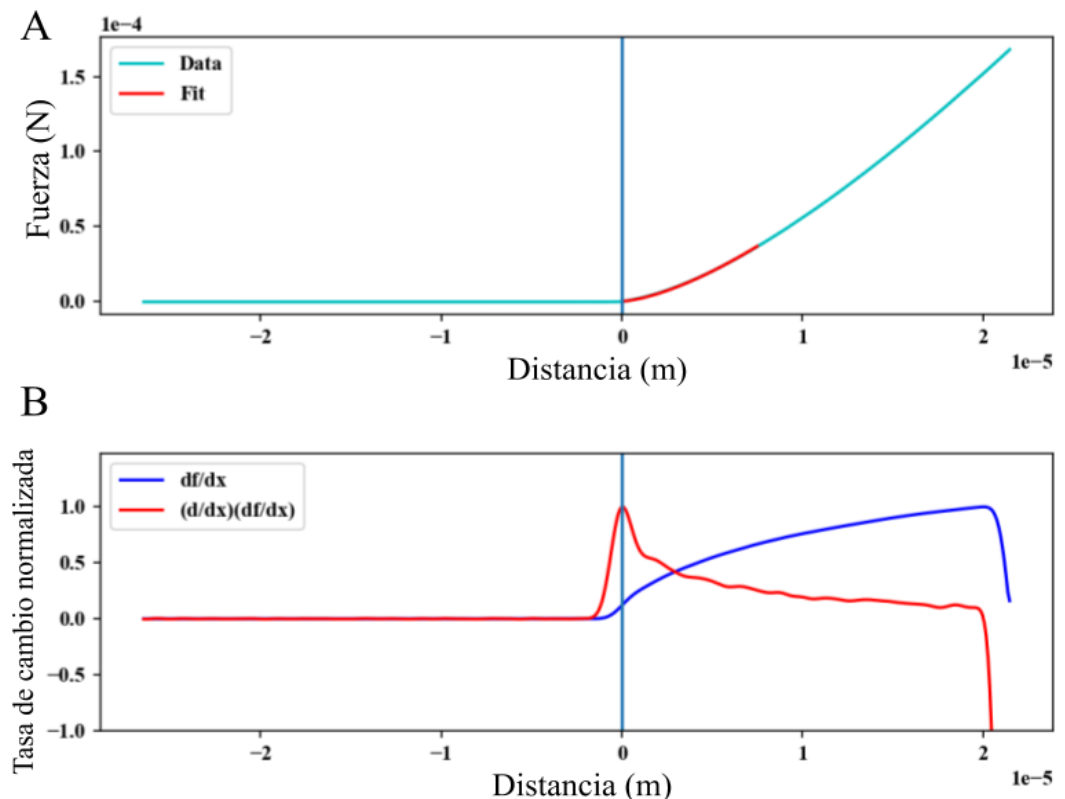


Fig 3.5 (A) Gráfica de fuerza contra distancia de indentación medida el equipo, mostrando el ajuste en rojo. **(B)** Gráficas de la primera derivada (azul) y la segunda (rojo) para poder determinar de manera precisa el punto de contacto.

En la tabla 3.2 se muestran los valores obtenidos para muestras de de la mezcla 1:0 y 5:1 preparadas con kits de dos lotes distintos y caracterizadas para su comparación antes y después del tratamiento y humectación requeridos para el cultivo. Como se puede observar y comparando los intervalos de incertidumbre, no se encontraron cambios significativos en los valores de rigidez antes y después del tratamiento. El valor resaltado en rojo llama la atención porque sale mucho del rango esperado además de que presenta un error casi del 50%, esto lo asociamos a que la muestra de PDMS no tratada presenta una mayor adherencia a la punta por lo que la incertidumbre aumenta. Es importante señalar que los valores utilizados en el resto del trabajo son los que se midieron después del tratamiento ya que son los más cercanos a las condiciones de cultivo. Por otro lado, también se realizaron pruebas utilizando dos kits de PDMS de dos lotes distintos para determinar que tanta variabilidad se puede presentar. Los datos mostrados en la tabla 3.2, muestran que para el PDMS más suave (mezcla 1:0) no hay diferencias importantes entre ambos lotes ya que los valores obtenidos de E caen dentro del intervalo de incertidumbre. Pero en el caso del PDMS rígido se observó una diferencia de alrededor de 47 kPa entre el lote 1 y el lote 2.

Muestras	E teórico (kPa)	Módulo elástico E (kPa)			
		Lote 1		Lote 2	
		No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
Mezcla hija 1:0	5	9.97 ± 1.93	11.38 ± 0.48	9.77 ± 0.55	9.29 ± 0.40
Mezcla hija 5:1	130	824.6 ± 430.3	162.5 ± 14.1	207.32 ± 5.80	209.44 ± 8.72

Tabla 3.2 Valores del módulo elástico para las diferentes preparaciones de PDMS

Mediante la caracterización por microindentación fue posible aumentar la estadística de las mediciones ya que en la mayoría de las muestras se realizaron alrededor de 8 curvas de indentación y por cada mezcla se consideraron al menos tres muestras independientes, los valores reportados en la tabla 3.2 corresponden al valor promedio ± SD. Para obtener un análisis más completo de la caracterización mecánica se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para las muestras medidas antes y después del tratamiento en tres experimentos independientes. Como se puede observar en la figura 3.6A, el PDMS suave no muestra diferencias estadísticamente significativas antes y después del tratamiento. Sin embargo, en el PDMS rígido este cambio si es significativo, principalmente debido al valor alto que se muestran en rojo en la tabla 3.2 y que se asocia más a un error en la medición que a las características de la muestra.

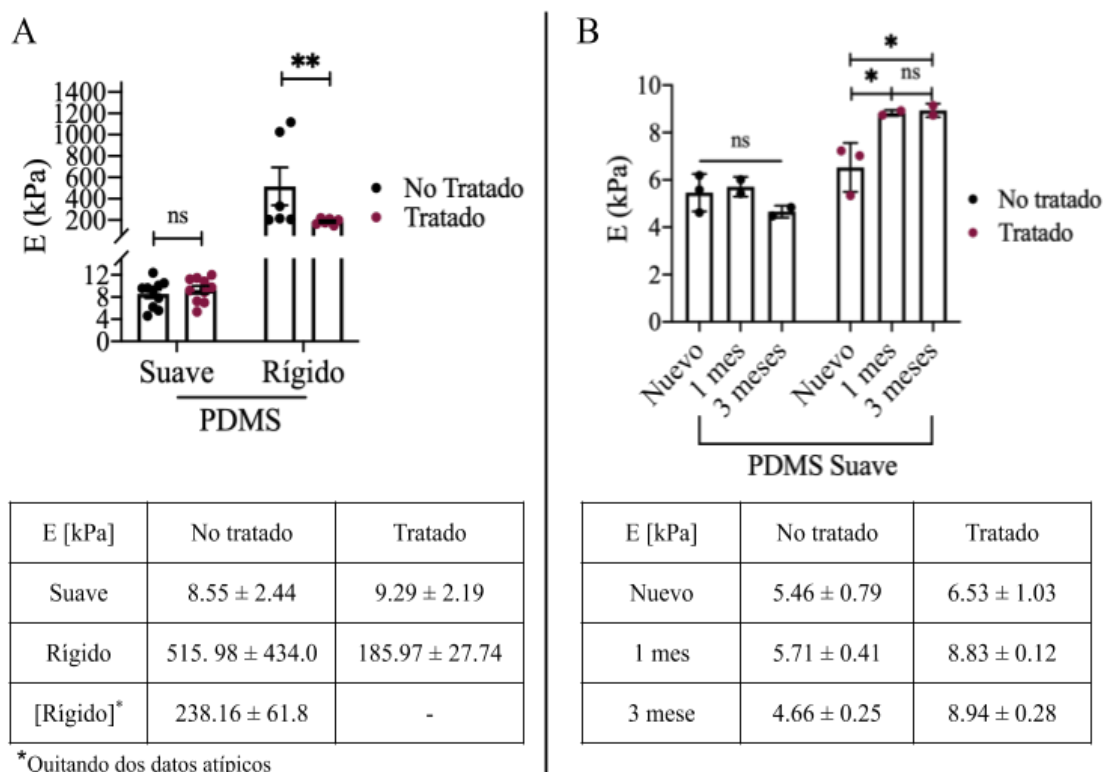


Fig 3.6 Caracterización mecánica por microindentación (A) Gráfica del módulo elástico para PDMS suave y rígido, antes y después de ser tratado para cultivo celular. Cada punto representa el valor promedio de E de una muestra independiente. Las barras muestran el valor promedio ± SEM, al menos tres muestras de tres experimentos independientes. ** $p < 0,0085$; ns, no significativo. Tabla con los valores promedios ± DS, n=9 **(B)** Gráfica del módulo elástico de muestras de PDMS suave, recién fabricado comparado con envejecimiento de 1 y 3 meses, antes y después del tratamiento para cultivo. Cada punto representa una muestra independiente.

Las barras representan valor promedio \pm SEM, de sólo un experimento independiente. ** $p < 0,0183$; ns, no significativo. Tabla con los valores promedios \pm DS, n=3.

Adicionalmente también se buscó caracterizar la evolución temporal de las propiedades mecánicas de los sustratos de PDMS una vez que se dejan envejecer. En la figura 3.6B, se observa que el módulo elástico permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo de envejecimiento. Sin embargo, en el caso de las muestras tratadas se observa un aumento significativo en el módulo elástico después de un mes de envejecimiento para después mantenerse prácticamente constante hasta los tres meses. Esto indica que, si bien el material mantiene su rigidez en el mismo orden de magnitud, es mejor utilizarlo inmediatamente después de fabricarlo para evitar la influencia del envejecimiento de la superficie y que podría repercutir en la respuesta celular.

Aunque los valores obtenidos siguen estando por encima de lo esperado (ver tabla 3.2), con el protocolo de fabricación estandarizado se obtienen sustratos de rigidez altamente reproducible en un rango de 9-11 kPa para el suave y 160-200 kPa para el rígido, cuyos valores promedio son 9.29 ± 2.19 kPa para el suave y 185.97 ± 27.74 kPa para el rígido. El que los valores no sean del todo reproducibles con lo reportado por Palchesko y colaboradores sugiere que algunas condiciones atmosféricas como presión y temperatura ambiente podrían modificar la polimerización del PDMS. Más aún, algunas de las principales fuentes de incertidumbre en este proceso de caracterización en condiciones de cultivo con la prueba de microindentación son: que la muestra esté mal adherida al sustrato y se pueda desplazar lateralmente o que la superficie no sea plana y no garantice un esfuerzo normal. Para disminuir este efecto se utilizaron como muestras cubreobjetos de vidrio recubiertos con PDMS por *spin coating* que es una técnica de recubrimiento en la que se coloca una gota de PDMS líquido en la superficie del sustrato de vidrio y éste se hace girar a 100 rpm por 15 s para esparcir homogéneamente el material debido a la fuerza centrífuga, con este principio se obtienen recubrimientos de PDMS planos y de espesor homogéneo. Una vez recubiertos con PDMS, los sustratos son colocados en el horno para su polimerización, debido a la polimerización del PDMS directo en el vidrio y a que ambos materiales son a base de silicio, el recubrimiento queda adherido de manera estable al sustrato. En este mismo punto, fue importante determinar el espesor de la capa de PDMS depositada sobre el cubreobjetos para evitar que el sustrato rígido de vidrio interfiera tanto en la medición mecánica del PDMS como en la respuesta celular. Para esta caracterización se utilizó también el método de indentación como se describe en la figura 3.7. Antes de la hidratación el espesor obtenido es de 74.30 μm para el PDMS suave y 86.12 μm para el rígido mientras que después del tratamiento el espesor es de 80.07 μm y 93.39 μm para el PDMS suave y rígido respectivamente, ver tabla 3.3. Con esto resultados podemos observar que el espesor es mayor para el PDMS rígido que para el suave, esto se debe a que la viscosidad de la mezcla rígida es mayor debido a que contiene una proporción mayor del elastómero 184 y la viscosidad es un parámetro que determina el espesor obtenido con el *spin coater*. Más aún, esta caracterización además nos permite cuantificar el aumento en el espesor que sufre el PDMS una vez que se le ha realizado el proceso de humectación. Como se presenta en la tabla 3.3, este aumento de espesor fue de 5.77 μm y 7.27 μm para el PDMS suave y rígido, respectivamente. Esta caracterización muestra que los sustratos de PDMS antes y después de la humectación tienen un espesor superior a las 40 μm mínimas necesarias para que el cubreobjetos rígido subyacente deje de tener un efecto sobre las células (Buxboim et al. 2010).

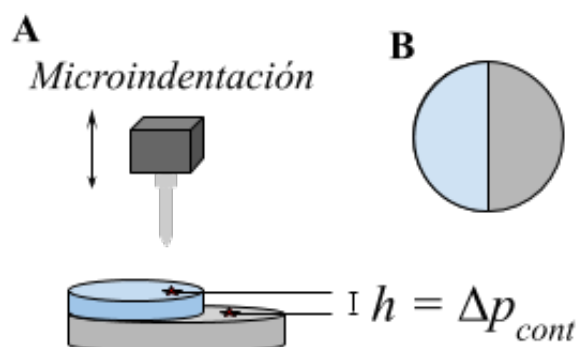


Fig 3.7 (A) Diagrama de microindentación. El espesor fue definido como la diferencia de los puntos de contacto entre la superficie del vidrio sin recubrimiento y la superficie del PDMS **(B)** Diagrama de muestra semicubierta

PDMS/Tratamiento	Espesor h (μm)		
	No hidratados	Hidratados	Δh
Suave	74.30 ± 19.11	80.07 ± 34.48	5.77
Rígido	86.12 ± 10.74	93.39 ± 23.07	7.27

Tabla 3.3 Espesor del recubrimiento de PDMS sobre cubreobjetos de vidrio, antes y después de tratamiento con UV y humectación para cultivo

3.4 Tratamiento del PDMS para cultivo celular

El PDMS recién polimerizado se caracteriza por sus propiedades hidrofóbicas (Mata, Fleischman, and Roy 2005), lo cual lo hace ideal para diversas aplicaciones tal como la microfluídica. Sin embargo, esta misma propiedad dificulta su utilización directa como sustrato para cultivo celular sin tratamiento adicional. Más aún, a pesar de que en este trabajo utilizamos dos kits comercial diferentes de PDMS, ha sido reportado que tanto el Sylgard 184 como el 527 presentan una topografía y ángulo de contacto con el agua similares, del orden de 110° lo que indica que tienen energía superficial e hidrofobicidad similares (Palchesko et al. 2012). Por lo tanto, en busca de contrarrestar este efecto, se estandarizó un protocolo para garantizar el uso del PDMS como sustrato para cultivo celular.

Se ha reportado que, mediante la exposición del PDMS a diferentes tratamientos superficiales tales como plasma o por radiación UV de 265 nm es posible disminuir la hidrofobicidad del PDMS (Atayde, de Menezes Atayde, and Doi 2010). En trabajos previos en el laboratorio hemos logrado controlar este cambio de superficie combinando lavados con etanol seguida de la exposición a la luz UV de 254 nm para disminuir el ángulo de contacto. Sin embargo, en todos los casos, el cambio de superficie para volver el PDMS hidrófilo solamente puede permanecer en aire por un par de horas como reportado (Atayde, de Menezes Atayde, and Doi 2010). Para solucionar este problema, se ha reportado que al mantener la superficie de PDMS sumergida en agua o medio acuoso inmediatamente después del tratamiento se impide la recuperación de la hidrofobicidad, con lo que se forman superficies de PDMS hidrófilas más estables, es decir que mantendrán la hidrofiliidad mientras estén en contacto con el agua (Ma et al. 2011). Con esta información se determinó que la primera etapa del protocolo incluye remover todas las impurezas de la superficie del PDMS usando etanol al 70% en condiciones estériles, posteriormente se expone el PDMS a la luz UV por 30 minutos para esterilizar

el material y disminuir su hidrofobicidad. Finalmente, y para estabilizar la característica hidrofílica del PDMS irradiado, los sustratos son sumergidos en el medio de cultivo para mantenerlos humectados.

El paso de humectación se realiza utilizando el medio de cultivo complementado con suero fetal bovino (FBS) 10% debido a que la fibronectina y vitronectina presentes en el suero son proteínas que promueven la adhesión celular al sustrato. Más aún, se ha reportado que usando el tratamiento con radiación UV los grupos metilo en la superficie del PDMS son convertidos en grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo que pueden interactuar con grupos parcialmente cargados de aminoácidos presentes en las proteínas como la fibronectina y la vitronectina que son comúnmente empleadas para promover la adhesión celular (Özçam et al. 2014). Esto último sugiere que la fibronectina y vitronectina del suero podrían interactuar con la superficie hidrofílica del PDMS ayudando a promover la adhesión celular. En nuestra experiencia, al utilizar este protocolo de humectación, no se observaron diferencias significativas en la adhesión celular al PDMS comparado con la caja de PS. Los detalles de esta observación se presentarán en el siguiente capítulo.

Por otro lado, se han propuesto alternativas que permitan controlar de manera precisa tanto la cantidad como el tipo de proteína que se deposita en los sustratos para promover la adhesión celular de manera más homogénea. Algunos de los protocolos propuestos incluyen la fijación de proteínas de matriz como colágena o fibronectina mediante enlaces covalente con el sustrato. En el caso particular del PDMS, en nuestro grupo de trabajo se ha mostrado que es posible usar APTES y glutaraldehído (GA) para inmovilizar la proteína en la superficie de sustratos de PDMS (Escutia-Guadarrama et al. 2017). Sin embargo, éstos son dos reactivos que presentan alta citotoxicidad y que podrían ser difíciles de remover incluso a pesar de los lavados. Además también se ha observado que pueden producir modificaciones superficiales en el PDMS alterando las propiedades fisicoquímicas de la superficie lo que también alteraría las propiedades detectadas por las células de manera local por lo que se descartó su uso para el presente proyecto.

3.5 Conclusiones del capítulo

Fue posible obtener sustratos de PDMS con rigidez variable y con propiedades mecánicas altamente reproducibles y homogéneas mediante la estandarización del proceso de fabricación en el que se fijaron parámetros como el tiempo de mezclado (t_m), tiempo de desecado (t_d), temperatura (T) y tiempo de polimerización (t_p). Mediante la prueba de tensión uniaxial se caracterizó la rigidez de las diferentes mezclas de PDMS antes y después de la estandarización del método de fabricación. Se obtuvieron valores de 18, 84 y 159 kPa que están por encima de los valores esperados 5, 50 y 130 kPa respectivamente. Sin embargo, a pesar de esta diferencia en valores se observa una clara y mejoría en la homogeneidad de las propiedades mecánicas de las muestras ya que se obtiene una menor dispersión en las mediciones. Debido a que la prueba de tensión uniaxial es una prueba destructiva y que requiere mucho material para obtener las probetas necesarias, además de que no es del todo representativa de lo que percibe la célula en condiciones de cultivo, se utilizó, como alternativa, la caracterización mecánica por microindentación. Ésta es una técnica no es invasiva y es representativa de lo que percibe la célula ya que (1) permite medir las muestras en condiciones de cultivo y (2) es una prueba por contacto en la que la microesfera presiona la superficie del PDMS similar a lo que hace la

célula mediante las integrinas para percibir la rigidez del sustrato en el que se encuentra. Mediante esta caracterización, se obtuvieron valores que, aunque aún mayores a los valores esperados, son más cercanos que los obtenidos por tensión uniaxial (9-11 kPa para el PDMS suave y 160-200 kPa para el PDMS rígido). Además, las mediciones fueron altamente reproducibles arrojando valores de rigidez en el mismo rango en muestras antes y después del tratamiento con UV y humectación. De hecho se observó que la desviación estándar de muestras tratadas es menor que las no tratadas, esto nos hace suponer que el tratamiento que se le hace a las superficie del PDMS permite disminuir los efectos electrostáticos que afectan la medición, esto nos permite además justificar que se reporte el valor de rigidez en muestras tratadas en el presente proyecto. Concluimos entonces que el protocolo de fabricación es un protocolo robusto que permite controlar de manera precisa la rigidez y la homogeneidad de los sustratos de PDMS.

Capítulo 4

4. Efecto de la rigidez del sustrato en el comportamiento celular

En este capítulo se presenta la caracterización de la respuesta en proliferación, viabilidad, adhesión y morfología, así como un acercamiento a la caracterización del mecanismo molecular involucrado en la regulación de la proliferación en esta línea celular C9 en respuesta a la rigidez de sustratos de PDMS fabricados según el protocolo descrito en el capítulo anterior. También se presenta la adaptación que sufren estas células al mantenerlas por tiempos prolongados en cultivo sobre PDMS suave.

4.1 Introducción al capítulo

Como hemos mencionado anteriormente, controlar la rigidez del sustrato *in vitro* ha sido una estrategia ampliamente utilizada para estudios de mecanotransducción y ha sido sugerida como una estrategia para promover el establecimiento de la polaridad epitelial o preservar el fenotipo celular epitelial (Engler et al. 2006). Como mencionamos en el capítulo 2, es generalmente aceptado que la proliferación celular, área celular o *spreading* y la formación de adhesiones focales aumentan con una mayor rigidez de la matriz. Sin embargo, lo que no está claro es si este tipo de comportamiento celular puede revertirse cultivando en sustratos suaves aquellas líneas celulares que fueron seleccionadas originalmente o preparadas en superficies rígidas.

Investigadores en el campo de la mecanobiología han usado una gran variedad de células inmortalizadas (Yanguas et al. 2016; Lee, Kim, and Choi 2015), para facilitar el acceso a un mayor número de células y además para garantizar la reproducibilidad experimental. Sin embargo, dichas líneas celulares han sido diseñadas para sobrevivir y proliferar en superficies planas y rígidas como las cajas de poliestireno convencionales para cultivo celular. Por lo que resulta de mayor relevancia, estudiar si dichas líneas celulares inmortalizadas mantienen la capacidad de respuesta a la mecánica del ambiente. Particularmente, se busca entender la influencia de la suavidad del sustrato en la proliferación, adhesión y morfología.

En este trabajo se utilizó la línea celular hepática C9 que es una línea inmortalizada a partir la extracción de hepatocitos primarios de un hígado de rata, es altamente proliferativa y presenta una gran capacidad de adhesión al sustrato comparada con otras líneas hepáticas como HepG2 en las que es requerido un recubrimiento de proteína de matriz extracelular como colágena tipo I para promover la adhesión al sustrato (Escutia-Guadarrama et al. 2017; Schrader et al. 2011). Esta última característica es relevante para resaltar el efecto de la rigidez del material y no del recubrimiento de proteína, ya que éste último podría cambiar de manera localizada la rigidez que sensa la célula al interactuar con el sustrato.

Las células C9 fueron cultivadas en sustratos de PDMS con dos módulos elásticos diferentes en el rango de 9-11 y 160-200 kPa, con lo cual se buscó entender si dichas células pueden adquirir un fenotipo más quiescente disminuyendo su tasa de proliferación mediante la exposición a materiales más suaves que el vidrio y el poliestireno (al menos dos órdenes de magnitud), con rigideces más cercanas a los rangos fisiológicos. Valores de rigidez menores implicaría el uso de otros materiales como los hidrogeles de poliacrilamida, sin embargo, se ha observado que esto podría comprometer la adhesión y viabilidad. A continuación se describen los resultados más relevantes de dicho trabajo incluyendo la caracterización de proliferación celular, adhesiones celulares, morfología y el mecanismo molecular que se encarga de regular la proliferación.

4.2 Resultados

4.2.1 Sustratos para cultivo celular

En la preparación de los sustratos de PDMS se utilizaron las mezclas para 9-11 kPa y 160-200 kPa descritas en el capítulo anterior, en la continuación de este proyecto dichos valores serán referidos como suave y rígido respectivamente. Se fabricaron diferentes muestras de PDMS en función de los sustratos requeridos para las diferentes técnicas de caracterización biológica, tales como cubreobjetos para inmunofluorescencia, cajas de cultivo y placas de pozos para cultivo celular y extracción de proteína. En la Figura 4.1 se muestra un resumen con los tres diferentes tipos de muestras de PDMS utilizadas según el tipo de experimento a realizar, incluyendo placas de seis pozos, cubreobjetos y cajas p100. En todos los casos el protocolo de curado empleado fue 60°C por 48 h. Así como se describió en el capítulo anterior, para contrarrestar la hidrofobicidad del PDMS y promover la adhesión celular se utilizó un protocolo de esterilización que consiste en limpiar con etanol 70% más 30 minutos de UV y una posterior humectación con medio de cultivo DMEM + SFB 10% + Pen/Strep 1% por lo menos 2 horas.

El PS y los sustratos de vidrio se utilizaron como controles de rigidez de 3 y 64 GPa, respectivamente (Worzakowska 2015; Eyckmans and Chen 2014); (Bouras et al. 2009). A fin de homogeneizar la interacción entre las células y los diferentes materiales, los sustratos de PS, vidrio y PDMS se trataron con los mismos protocolos de esterilización e incubación del medio antes de la siembra de las células y no se observaron diferencias significativas en la adhesión celular entre los diferentes materiales, éste último, y como se describirá más adelante en este capítulo, fue caracterizado mediante la cuantificación de las células adheridas a las 24 h de cultivo, indicando que el número de cuentas es prácticamente el mismo en los diferentes sustratos.

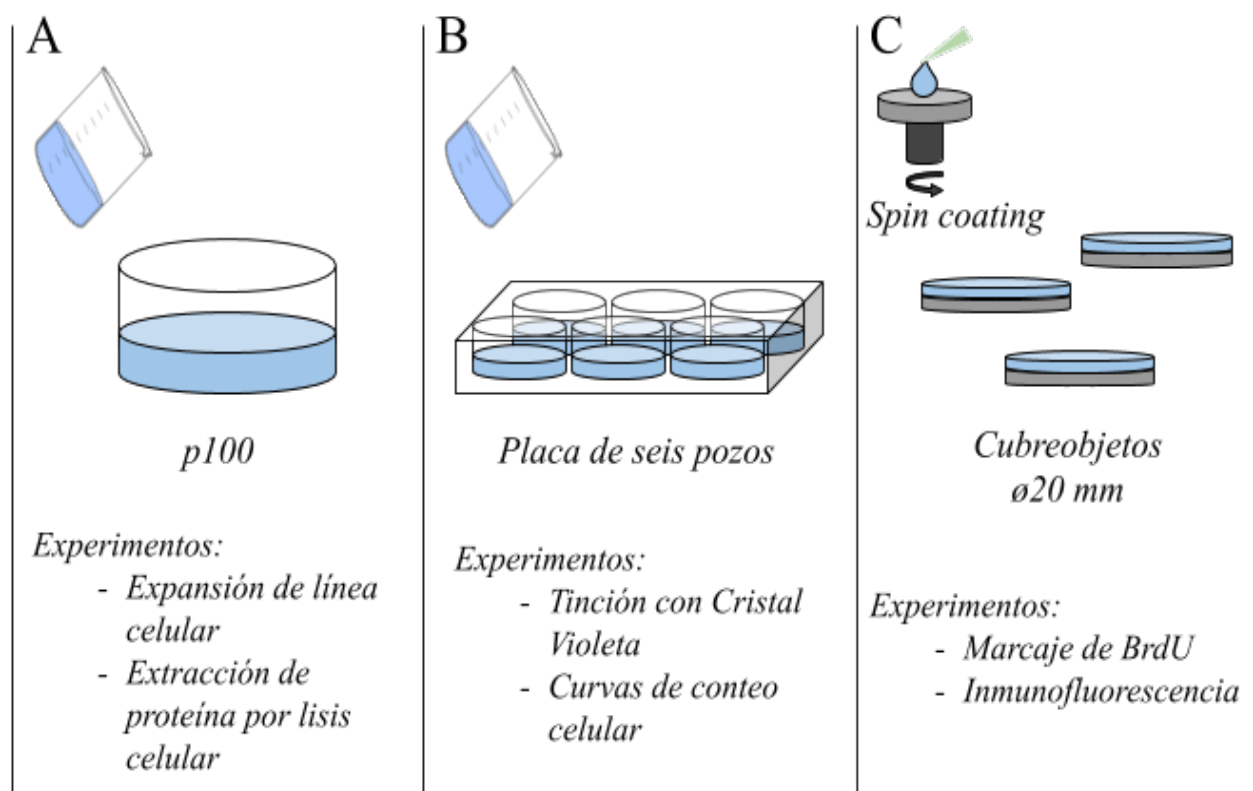


Fig. 4.1 Resumen esquematizado de los tres tipos de muestras utilizadas para los diferentes experimentos de caracterización biológica (A) Cajas p100 para cultivo celular recubiertas con PDMS que fueron empleadas para expandir la línea celular **(B)** Placas de 6 pozos de cultivo recubiertas con PDMS, fueron empleadas para los experimentos de tinción con cristal violeta para la obtención de las curvas de conteo celular **(C)** Cubreobjetos de vidrio de 20 mm de diámetro recubiertos por spin coating con PDMS, estos sustratos fueron utilizados para los ensayos de inmunomarcaje con fluorescencia y BrdU

4.2.2 La tasa de proliferación celular es regulada por la rigidez del sustrato

Una vez tratados los sustratos de PDMS de rigidez controlada se procedió a realizar el cultivo celular. Las células C9 fueron cultivadas sobre sustratos de PDMS suave y rígido así como en placas de 6 pozos de cultivo. Los cultivos partieron del mismo número de células (50×10^3 células por pozo) en las tres condiciones de rigidez y se mantuvieron hasta seis días en cultivo. Después de los primeros cuatro días de cultivo fue claramente visible una menor densidad celular en los sustratos con menor rigidez, como se ve en la tinción de cristal violeta que se muestra en la figura 4.3A.

Para obtener un resultado cuantitativo de esta observación, se tomaron fotografías de los cultivos a las 24, 72, 120 y 144 h después de la siembra, en la figura 4.2 se muestran fotografías con un magnificación de 20X representativas de las 24 y 96 h. Para obtener el gráfico de densidad celular en función del tiempo de cultivo mostrado en la figura 4.3*Ci-ii* se realizó la cuantificación del número de células por unidad de área usando el software ImageJ.

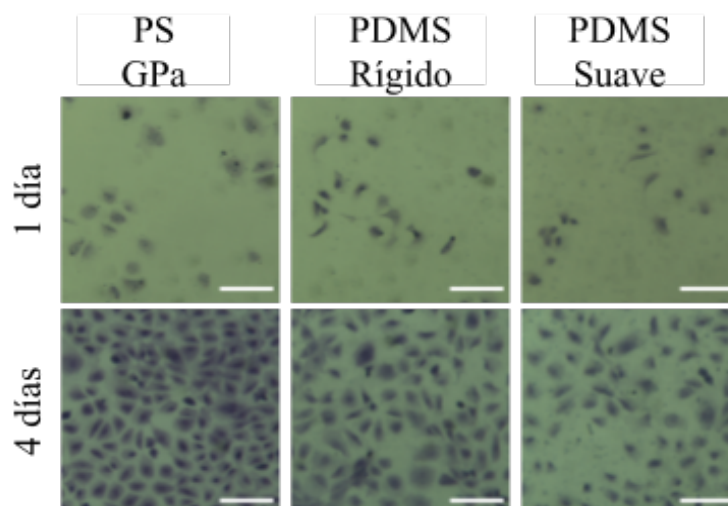


Fig. 4.2 Células C9 cultivadas por 24 y 96 h en sustratos de PDMS suave, rígido y PS. Las células fueron teñidas con cristal violeta para facilitar su visualización. Fotografías tomadas con campo claro, magnificación 20X. Barra de escala 100 μ m

A partir de la figura 4.3Cii, es posible confirmar una disminución de la densidad celular en los sustratos de PDMS comparado con la caja de GPa. Más aún, en la figura 4.3Ci se observa que la curva de crecimiento de la población celular en GPa llega a una saturación debido a la confluencia celular, mientras que en ambos sustratos de PDMS la población celular sigue mostrando un crecimiento ascendente. Además, en la figura 4.3Cii se observa que el número de células adheridas a las 24 h es similar en los diferentes sustratos de cultivo, ya que no se encontraron diferencias significativas. Esto confirma que la adhesión celular al PDMS suave y rígido es comparable con la observada en las placas de PS. Además, en el PDMS se observa la presencia de una región cercana al borde de mayor densidad celular, esta observación es asociada con la formación de un menisco que se forma durante el proceso de fabricación del PDMS. Por lo tanto, para descartar los efectos de borde en la cuantificación de la densidad celular se tomaron fotografías excluyendo esta región en forma de anillo cercana al borde.

A continuación se caracterizó la viabilidad celular mediante un curso temporal del ensayo de Calceína AM/yoduro de propidio (PI por sus siglas en inglés) para descartar que la disminución en la densidad celular en los sustratos más suaves fueran producto de una respuesta adversa causada por el PDMS. Con este experimento se confirma que el cultivo de C9 se mantiene con una viabilidad alrededor del 95% en el PDMS, similar a la observada en el control como se muestra en la figura 4.2B.

Por último, se caracterizó la tasa de proliferación celular mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) que permite cuantificar el número de células proliferantes que se encuentran en la fase S del ciclo celular. En la figura 4.3Dii se presenta la comparación de los tres materiales para tiempos de cultivo que van de 24 a 144 h. A las 72h, se observa una población de células en fase S significativamente más baja en los sustratos más blandos de PDMS en comparación con la condición de GPa rígida.

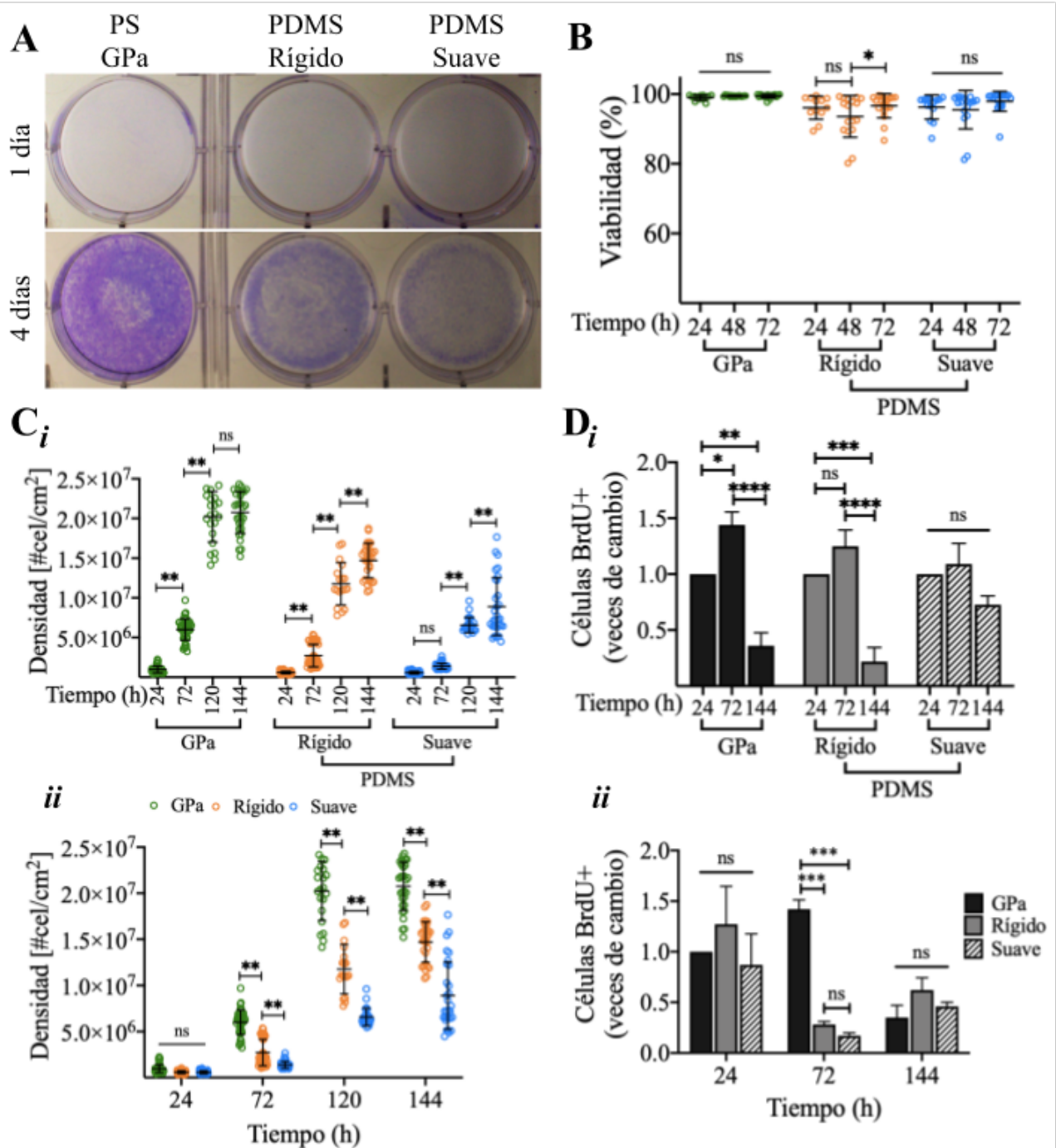


Fig. 4.3 La suavidad del sustrato disminuye la tasa de proliferación de las células C9 sin afectar a la viabilidad celular (A) Tinción con cristal violeta para visualizar y evaluar la densidad celular después de 1 y 4 días en cultivo, mostrando que la densidad celular disminuye en el PDMS suave con respecto al PS. (B) Curso temporal de viabilidad evaluada en células C9 en vidrio (GPa) y PDMS suave y rígido. (C) Las células presentadas en (A) fueron visualizadas por microscopía de contraste a las 24, 48, 120 y 144 h después del cultivo. La densidad celular se representa como el número de células por unidad de área comparando (i) el tiempo de cultivo en cada material y (ii) los materiales entre sí para cada tiempo de cultivo. (D) La proliferación celular fue evaluada mediante un curso temporal del ensayo de BrdU en células C9 cultivadas en vidrio y cubreobjetos recubiertos con PDMS suave y rígido. Las poblaciones de células positivas a BrdU (Células BrdU+) se compararon (i) a lo largo del tiempo para cada material y (ii) todos los materiales entre sí para cada tiempo de cultivo.

Además, el cultivo celular en PS alcanza la confluencia entre 72 y 144 h, por lo que la población en fase S disminuye drásticamente alcanzando un valor similar a los obtenidos para los sustratos de PDMS. Esta observación era de esperarse, ya que la proliferación celular también está regulada por la inhibición por contacto entre células. Por lo tanto, a una mayor confluencia se esperaba menor señal de BrdU. Finalmente, en la figura 4.3Di se presenta la comparación de los tiempos de cultivo de cada material, mostrando que en el PDMS Suave la tasa de proliferación no presenta diferencias significativas a lo largo del tiempo. Esto sugiere que la proliferación de las células C9 en sustratos de PDMS suave permanece constante durante el tiempo, lo que explica por qué la población celular crece más lento en esta condición comparada con la caja de PS como se mostró en la figura 4.3Ci-ii.

Los datos presentados demuestran que las células hepáticas C9 responden a las propiedades elásticas del sustrato de cultivo mediante la reducción en la tasa de proliferación sin afectar a su viabilidad. Por lo tanto en una siguiente etapa del proyecto se buscó entender el mecanismo involucrado en la regulación de la proliferación en respuesta a la rigidez del sustrato así como las consecuencias biológicas que representa estas condiciones para las células C9.

4.2.3 La vía de MAPK regula la proliferación celular en respuesta a la rigidez del sustrato

Para identificar el mecanismo molecular responsable de la regulación de la proliferación de células C9 en respuesta a los cambios en la rigidez del sustrato, primero, se evaluó la actividad de YAP y TAZ, ya que han sido reportadas como proteínas que actúan como sensores y transductores de estímulos mecánicos y son proteínas efectoras que se encarga de la regulación de genes que activan la proliferación. Estudios han revelado que, por ejemplo la alta rigidez de la MEC o bien la baja densidad celular inducen una morfología celular extendida que provoca la activación de YAP y TAZ, promoviendo la proliferación celular e inhibiendo la diferenciación, mientras que los sustratos suaves o la alta confluencia inducen una morfología celular compacta que da como resultado la translocación de YAP y TAZ al citoplasma (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014; Aragona et al. 2013). Con el fin de evaluar si las células C9 muestran este comportamiento en respuesta a la rigidez del sustrato se diseñó un experimento para analizar la localización subcelular de dichas proteínas. Las células C9 fueron cultivadas en diferentes densidades sobre sustratos de PDMS suave y en vidrio como control (GPa). La hipótesis era que al cultivar las células C9 en PDMS suave, la localización de YAP y TAZ sería principalmente citoplasmática y esto podría explicar la baja en proliferación celular observada previamente. Sin embargo, este experimento reveló que, contrario a lo que esperábamos, en la línea celular C9 se mantiene principalmente la localización nuclear de las proteína YAP y TAZ incluso sobre sustratos suaves y es sólo la confluencia celular la que produce su translocación al citoplasma como se observa en la figura 4.4A.

La cuantificación de la porción nuclear de la señal de YAP y TAZ permitió confirmar esta observación ya que al aumentar la densidad celular la señal tiene mayor presencia en el citoplasma en ambos sustratos (ver fig 4.3B-C). Al comparar ambos sustratos para cada densidad se observa que la porción citoplasmática a baja y alta densidad en los extremos no tienen diferencias significativas 4.4D. Sin embargo, en el punto de densidad media la señal citoplasmática de YAP y TAZ es significativamente mayor en el PDMS sugiriendo que la translocación en este sustrato ocurre más rápido que en el vidrio, ver 4.4D.

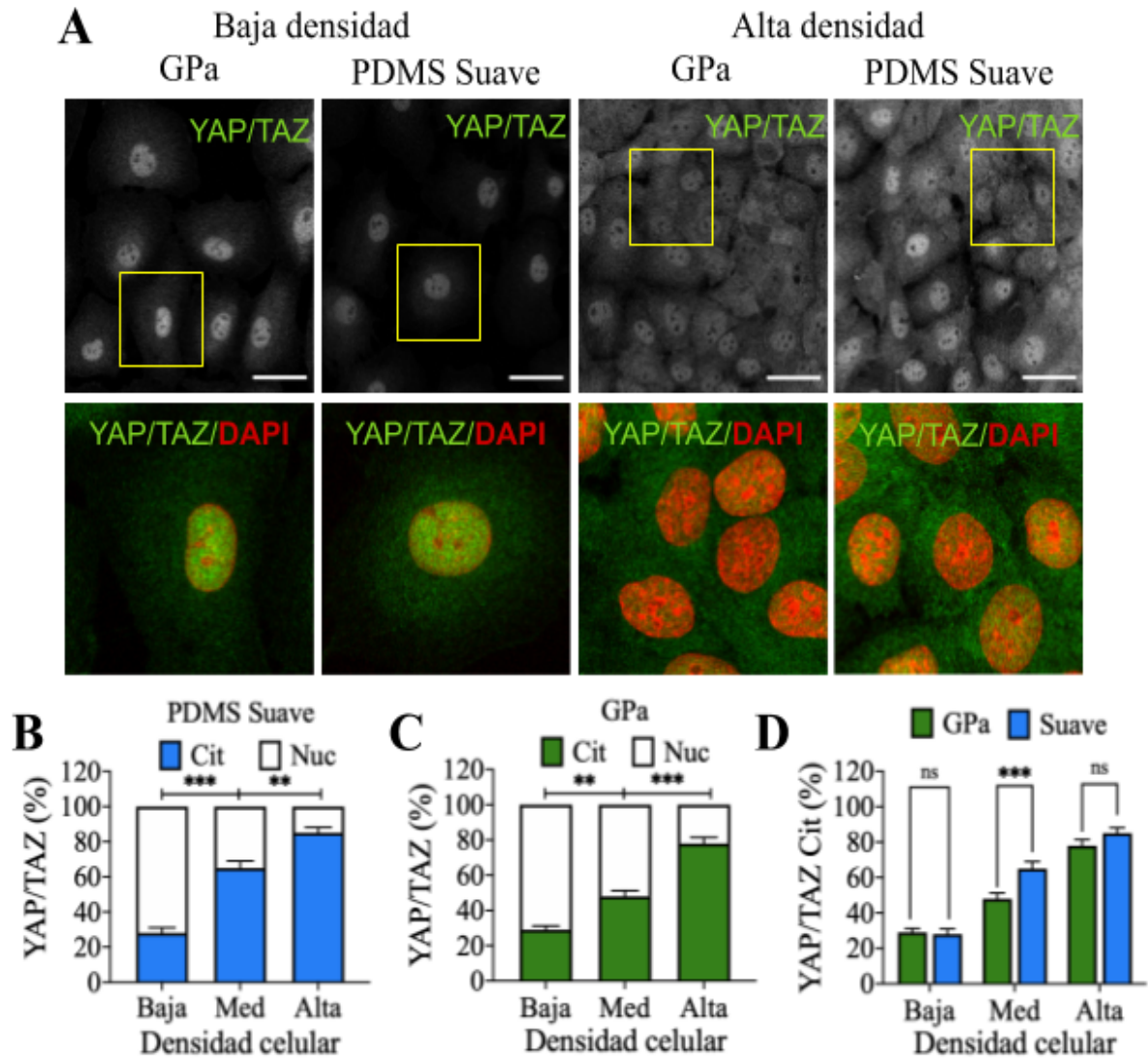


Fig 4.4 Cambios en la rigidez del sustrato no afecta la localización nuclear de YAP y TAZ (A) Inmunolocalización de las proteínas YAP y TAZ (verde) en células C9 cultivada en vidrio (GPa) y PDMS suave comparando baja, media y alta densidad celular. DAPI (rojo) fue utilizado como marcador de núcleo. A bajas densidades, estas proteínas tienen una localización nuclear independientemente de la rigidez del sustrato, mientras que la distribución a densidades más altas es principalmente citoplasmática. Escala 30 μ m. **(B)** Cuantificación de la porción citoplasmática y nuclear de la señal de YAP y TAZ en PDMS suave comparando tres densidades distintas. **(C)** Cuantificación de la porción citoplasmática y nuclear de la señal de YAP y TAZ en vidrio comparando tres densidades distintas. **(D)** Cuantificación de la porción citoplasmática de la señal de YAP y TAZ comparando cada densidad celular en vidrio y PDMS suave. Valores presentados como promedio \pm SD de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.0088$; *** $p < 0.0001$

Debido a que los resultados obtenidos en la caracterización de la localización de YAP y TAZ no permiten confirmar que la actividad de dichas proteínas esté regulando significativamente la proliferación celular en C9 en respuesta a la rigidez, se sugiere la presencia de otro mecanismo que regule de manera más significativa la proliferación celular en estas células. Para probar esta hipótesis se caracterizó por WB la activación por fosforilación de las proteínas ERK 1/2. Se observó que pERK1/2 disminuye significativamente en los sustratos de PDMS suaves sin que se vea afectada la expresión de la proteína total, como se muestra en la figura 4.5. Este era un resultado esperado ya que

se sabe que cuando ERK es fosforilada, es translocada al núcleo donde promueve la activación de genes relacionados con la proliferación celular y la supervivencia, como aquellos que codifican a factores de crecimiento, citocinas, ciclinas, entre otros (Berridge 2014; Moreno-Layseca and Streuli 2014).

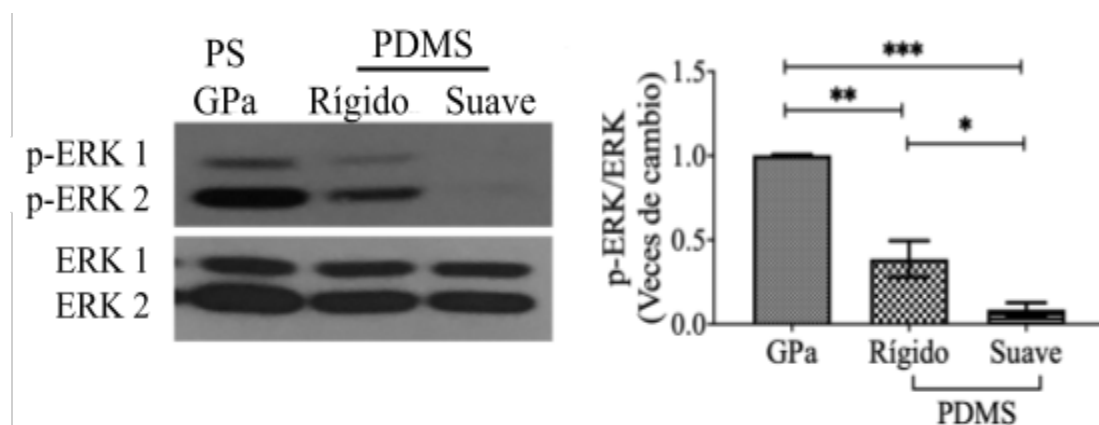


Fig. 4.5 Sustratos suaves reducen la fosforilación de ERK Los niveles totales de las proteínas ERK y la activación por fosforilación de ERK fueron caracterizados por WB en los diferentes sustratos. El gráfico muestra el análisis densitométrico de la relación p-ERK/ERK en PDMS rígido y suave con respecto al control PS. Los datos se presentan como promedio \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,0272$; ** $p < 0,006$; *** $p < 0,0001$

Con el fin de determinar si la disminución de la proliferación celular en sustratos suaves es efectivamente debida a la inactivación de ERK, las células C9 cultivadas y adheridas en PS fueron tratadas con U0126 (5 y 10 μ M), un potente inhibidor de MEK, la cinasa que fosforila a ERK río arriba en la vía de señalización de las MAPK, cuyo efecto fue confirmado por WB y reportado en la figura 4.6A. Se observó una disminución en la densidad celular en función de la concentración del inhibidor, sin embargo, no se presentaron alteraciones en la morfología celular como se observa en la figura 4.6B. Se tomaron fotografías a las 0 y 72 h de inhibición y se utilizaron para cuantificar el número de células en función de la concentración de U0126. También se incluyó una condición de ayuno para evaluar el efecto de la presencia de suero para contrarrestar los efectos del inhibidor. La gráfica presentada en la figura 4.6C incluye el resumen de dicha cuantificación mostrando la disminución significativa del número de células a las 72 h de inhibición comparada con el control. Más aún, esta gráfica revela que usando la concentración de 10 μ M se puede inhibir el efecto del suero presente en el medio de cultivo. Finalmente, se llevó a cabo la caracterización de la proliferación celular mediante el ensayo de BrdU para determinar si la vía MAPK está directamente involucrada en la regulación de la proliferación en nuestros experimentos. Se observó que efectivamente, la población de células proliferantes en fase S disminuye usando el tratamiento con U0126, ver figura 4.6D.

Todos estos resultados juntos sugieren que efectivamente hay menos actividad de las cinasa de ERK cuando las células C9 se cultivan en PDMS suave, lo que provoca una tasa de proliferación celular más baja. Sin embargo, se observó también que la proliferación celular no se detuvo completamente al tratar los cultivos con U0126. Esto sugiere nuevamente que MAPK no es el único mecanismo involucrado. Se sabe, por ejemplo, que las proteínas YAP y TAZ pueden regular la proliferación mediante la regulación de la expresión de E2F1 (W. Kim et al. 2019). Por lo tanto, y debido a que anteriormente mostramos que YAP y TAZ permanecen activas en PDMS suave, se sugiere que éste

podría ser el mecanismo que ayuda a mantener la proliferación de células C9 en los sustratos más suaves. Esto explicaría también la disminución de la población de células proliferantes cuando las células C9 han alcanzado la confluencia como se reportó en la figura 4.3Di. Por otro lado, se sabe que la cinasa de adhesión focal (FAK) es reclutada por el complejo de adhesión focal y participa en la regulación de crecimiento, proliferación y motilidad celular (Bogorad et al. 2014), además de que también participa en el reordenamiento del citoesqueleto (Bogorad et al. 2014; McBeath et al. 2004), por lo tanto es un mecanismo que también podría participar en mantener la proliferación.

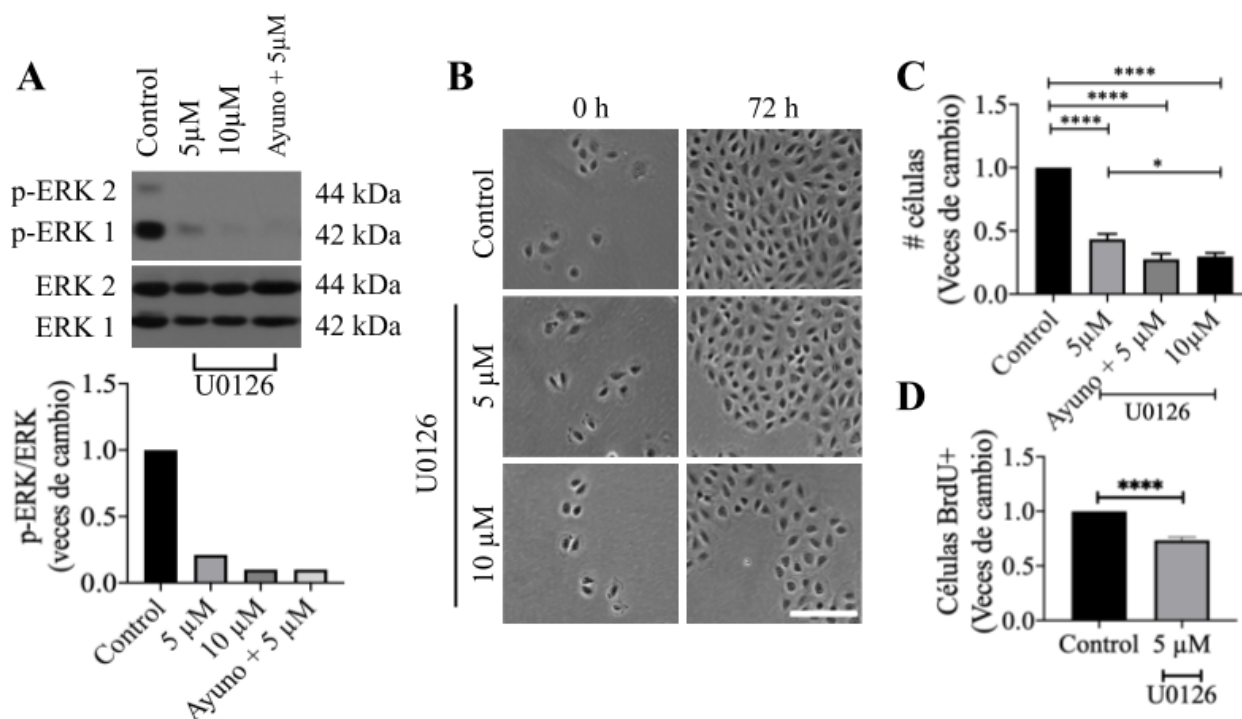


Fig. 4.6 MAPK regula la proliferación en C9 (A) Los niveles totales de las proteínas ERK y la activación por fosforilación de ERK fueron caracterizados por WB en diferentes condiciones de inhibición. En la gráfica se muestra el análisis densitométrico de la proporción de activación de ERK como veces de cambio sobre el control de GPα (B) Imágenes de campo claro de células C9 cultivadas en PS tratadas con 5 y 10 μM de U0126. Escala 100 μm (C) La cifra del recuento de células confirma una disminución en el número de células dependiendo de la concentración del inhibidor U0126. Los datos se presentan como promedio ± SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,0287$; **** $p < 0,0001$ (D) La proliferación celular fue evaluada por el ensayo de BrdU. Las células C9 fueron sembradas a baja densidad (35×10^3 células por pozo) en cubreobjetos de vidrio y recubrimientos de PDMS suave y rígido. Las células fueron tratadas con U0126 durante 24 h. Las células positivas a BrdU (BrdU+) fueron teñidas con un anticuerpo acoplado con fluoresceína (verde) y comparadas con el número total de células teñidas con DAPI (azul). Las imágenes de microscopía de epifluorescencia fueron adquiridas 24 h después del cultivo para la cuantificación de las poblaciones celulares. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y se presentan como media ± SD. **** $p < 0.0001$

4.2.4 Las adhesiones célula-célula y célula-sustrato son reguladas por la rigidez

Las células interactúan con la mecánica de su entorno a través de las adhesiones focales y perciben la rigidez del sustrato a través del citoesqueleto de actomiosina, ejerciendo una tensión a través de la unión de las integrinas en las adhesiones focales (Iskratsch, Wolfenson, and Sheetz 2014). Esto

implicaría que una mayor rigidez provocaría un aumento de la resistencia a la tensión de las células. Por lo tanto se buscó caracterizar la distribución de los puntos de adhesión focal en las células C9 comparando los diferentes sustratos, esperando observar menos sitios de adhesión focal en materiales más blandos como ha sido reportado previamente (Iskratsch, Wolfenson, and Sheetz 2014; Wells 2008). Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, no se encontró ningún cambio significativo en la densidad de adhesiones por unidad de longitud en las células C9 cultivadas en sustratos de PDMS suaves comparado con vidrio, aunque sí fue posible observar un cambio significativo en la morfología de las adhesiones como se muestra en la figura 4.6A-C, el mapa de calor que se presenta en la figura 4.7A corresponde a la intensidad de fluorescencia del canal de vinculina lo que permite observar los puntos de adhesión focal en la región membranal. Mediante el análisis de imágenes, fue posible cuantificar la razón de aspecto de las adhesiones focales como una representación numérica de su morfología, confirmando una reducción estadísticamente significativa en el sustrato blando de PDMS en comparación con el de GPa, véase la Figura 4.7C. Estudios previos han reportado que la morfología de las adhesiones puede asociarse con la madurez de las mismas lo que depende de las proteínas que forman el complejo de adhesión como la integrina $\beta 1$ y $\beta 3$ que están presentes en una adhesión focal madura con una morfología alargada (Hinz 2010; Bogorad et al. 2014). Sin embargo, se necesitan más experimentos para evaluar la presencia de la integrina $\beta 1$ y su participación en la regulación de la proliferación de C9.

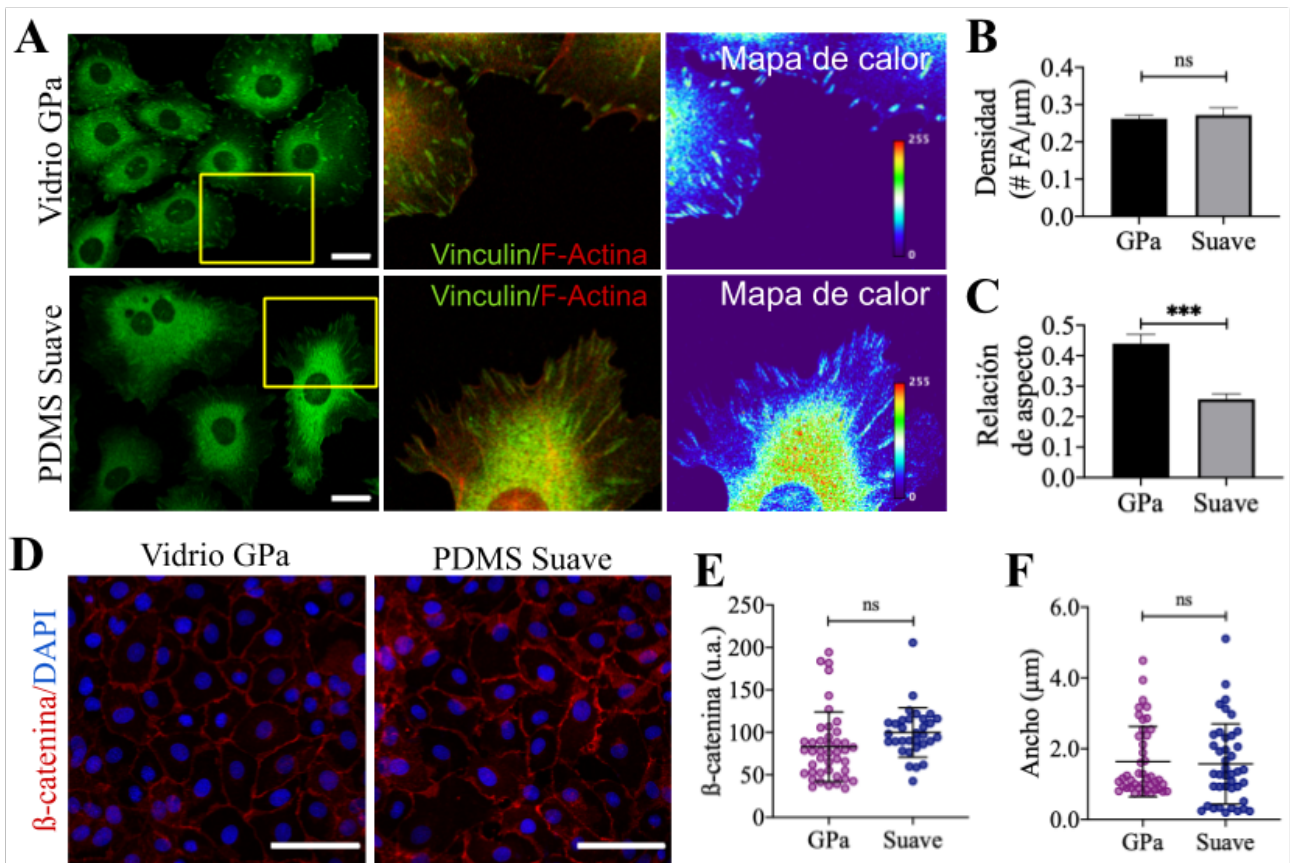


Fig. 4.7 La suavidad induce una morfología de adherencias focales alargadas y no induce la acumulación de membranas de β -catenina (A) Las células C9 fueron sembradas a baja densidad (35×10^3 células por pozo). El sitio de adhesión focal se detectó tiñendo con Vinculina (verde), F-Actin (rojo) las células C9 cultivadas en vidrio (GPa) y el PDMS blando. Los filamentos de actina fueron teñidos con faloidina acoplada a Alexa 594. Barra de escala $20 \mu\text{m}$. (B) El gráfico muestra la densidad de las adhesiones focales, representada como el

número de adhesiones focales por unidad de longitud. Los datos se presentan como media \pm SD de 3 experimentos independientes. ns, no significativo. **(C)** El gráfico muestra la relación de aspecto, representada como la relación eje menor/eje mayor de la adherencia focal. Los datos se presentan como media \pm SD de 3 experimentos independientes; **** $p < 0.0001$ comparado con el control. **(D)** Las adhesiones de célula a célula fueron analizadas evaluando la localización de la β -catenina (rojo). Las células C9 fueron sembradas a alta densidad (100×10^3 células por pozo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$. **(E)** Se midieron los niveles relativos de β -catenina como contraste de fluorescencia en la región de la membrana. Los datos se presentan como medidas únicas con media \pm SD de 3 experimentos independientes. ns, no significativo **(F)** Anchura de la región de la membrana β -catenina. Los datos se presentan como mediciones únicas con media \pm SD de 3 experimentos independientes. ns, no significativo.

Se sabe que la rigidez del sustrato también puede afectar el contacto entre células, ya que el complejo cadherina-catenina en las uniones adherentes también son estructuras mecanosensibles (Buckley et al. 2014); se ha reportado que, a medida que el sustrato se endurece, se produce la pérdida progresiva de las uniones adherentes y su sustitución por adhesiones focales (Polio et al. 2019). Por lo tanto, también evaluamos la formación de uniones adherentes en las células C9 en respuesta a la rigidez mediante la inmunolocalización de β -catenina cultivadas tanto en PDMS como en vidrio, ver figura 4.7D. Se esperaba que las células en el PDMS suave presentaran una mayor acumulación membranal de β -catenina ya que sería un indicativo de que mantienen las uniones adherentes estables con las células vecinas la cual es una característica del fenotipo epitelial. Sin embargo, la cuantificación de la señal de fluorescencia - caracterizada tanto por la intensidad de la señal en la región membranal así como el ancho de la misma - no reveló una diferencia significativa entre el sustrato de PDMS suave y vidrio.

Estos dos últimos resultados son contrarios a lo que se esperaba por lo que se procedió a realizar la caracterización de fenotipo en células C9 para comprender este comportamiento. Se analizó la expresión de diferentes marcadores epitelial y mesenquimal, incluyendo: α -Fetoproteína (AFP)/Albúmina/HNF4 α y vimentina, respectivamente. La caracterización por WB reveló que, a pesar de la morfología epitelial presente en estas células, estas células tienen nula expresión de albúmina y HNF4 como se muestra en la figura 4.8A. Además, se encontró que sintetizan altos niveles de proteína vimentina (ver figura 4.8A), con organización funcional en filamentos, como es posible apreciar en la visualización por inmunofluorescencia de la figura 4.7B.

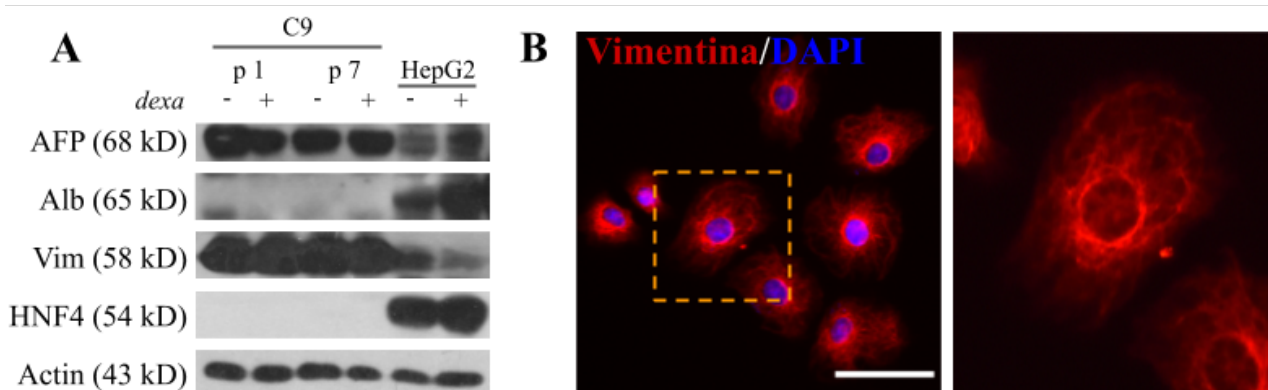


Fig. 4.8 Las células C9 control presentan altos niveles de vimentina y no expresan marcadores de fenotipo epitelial como albúmina y HNF4 **(A)** Los niveles totales de las proteínas AFP, Albúmina, Vimentina y HNF4 fueron caracterizados por WB en células C9 control. **(B)** Fotografías de fluorescencia para visualizar la

presencia subcelular de Vimentina (rojo). La molécula DAPI se utilizó como marcador de núcleo. La fotografía del lado derecho corresponde al zoom de la célula individual resaltada con la línea punteada. Escala 50 μm

Estos datos establecen que la línea celular C9 presenta un fenotipo significativamente más mesenquimal que epitelial, a pesar de haber sido inmortalizada a partir de hepatocitos primarios. Este resultado puede ser asociado al proceso de inmortalización en el que dichas células fueron adquiriendo mayor expresión de vimentina y fueron seleccionadas por su capacidad de sobrevivir, proliferar y de producir adhesiones estables. Además, esto ayudaría a explicar por qué las células C9, que ya han sido modificadas respecto a las características epiteliales de origen, mantengan las adhesiones casi sin alterar a pesar de haber sido transferidas a sustratos más suaves.

4.2.5 Células C9 aumentan su tasa proliferación celular después de haberse adaptado a sustratos suaves

Algunos trabajos han sugerido que las células tienen la capacidad de mantener información sobre la mecánica de los sustratos en los que fueron cultivadas previamente, tal es el caso de las hMSC cultivadas inicialmente en placas de cultivo rígidas (GPa) que presentan una predisposición hacia adquirir una diferenciación osteogénica (Nasrollahi et al. 2017; Yang et al. 2014). Por lo tanto, resulta de interés evaluar si las características mesenquimales de las células C9 pueden ser revertidas al cultivarlas recursivamente en sustratos suaves para disminuir el efecto de haber mantenido las células C9 indefinidamente en la caja de PS. Por lo tanto, se diseñó un protocolo en el que las células C9 fueron sembradas y cultivadas durante varios pases en PDMS suave, como se muestra en la figura 4.9.

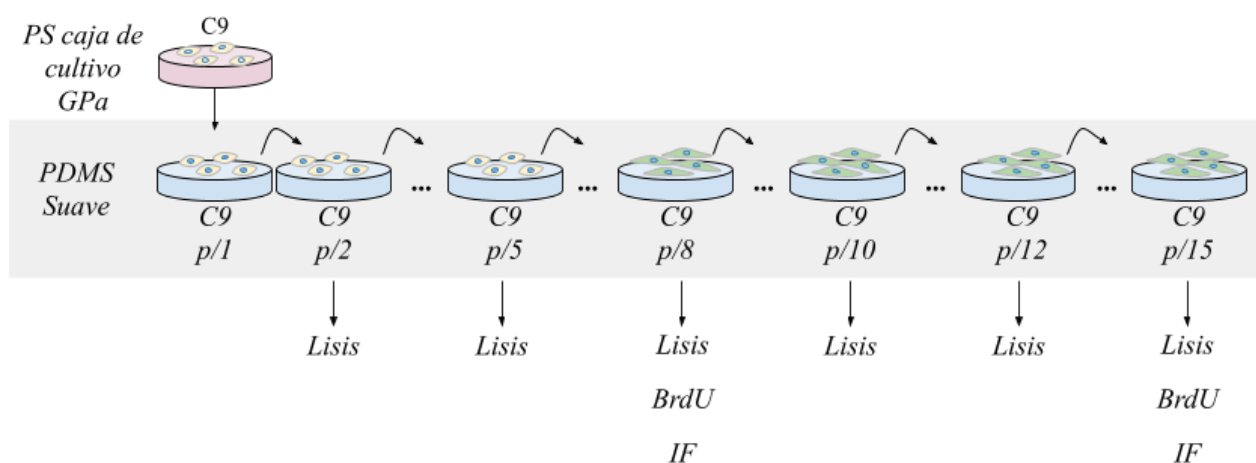


Fig. 4.9 Diagrama del protocolo de pases en PDMS empleado Las células C9 fueron sembradas a baja densidad en placas de cultivo p100 cubiertas con PDMS suave. Se realizaron hasta 15 pases manteniendo una dilución 1:10 en cada uno. En los pases 2, 5, 8, 10, 12 y 15 se extrajo proteína por lisis celular para la caracterización de WB, integrando el extracto de C9 como control. Para la caracterización por inmunofluorescencia (IF) y BrdU se consideraron muestras C9 control, C9 p/8 y p/15.

Contrario a lo que se esperaba, observamos que después de 7 pases las células cultivadas en PDMS suave fueron capaces de restablecer su tasa de proliferación a un nivel similar al observado en la caja de PS en las células control. Ésto fue confirmado mediante el ensayo de BrdU ya que el porcentaje de células proliferantes positivas a BrdU aumenta de manera significativa en el pase 8 y aún más en el

pase 15 con respecto a las células originales, como se muestra en la figura 4.10A. Los resultados obtenidos también mostraron un aumento estadísticamente significativo de la fosforilación ERK 1/2 a partir del pase 8 y luego en el pase 15 en comparación con las células de control C9, lo que coincide con el aumento de la tasa de proliferación y apoya la observación de que la actividad ERK tienen una fuerte influencia en la regulación de la proliferación de las células C9, como se muestra en las figuras 4.10Bi y 4.10Bii.

Por otro lado, el aumento en la proliferación de las células C9 también fue seguido por un cambio progresivo en la circularidad celular, ver figura 4.10C. Se observa una clara disminución de la circularidad de las células C9 entre el paso 5 y el paso 7, lo que implica que han adquirido una morfología alargada como es posible apreciar en la micrografía insertada en 4.10C. En los pases posteriores, esta modificación morfológica se mantiene prácticamente constante. Respecto al área celular, se observó una disminución clara desde el primer pase en PDMS y fue posible apreciar un aumento gradual a lo largo de los pases en el PDMS. Sin embargo, incluso en el pasaje 15, el área celular sigue siendo menor que la observada en las C9 control. Los datos mostrados en esta sección suponen una clara adaptación de las células C9 a condiciones suaves (después de 5 pases) mediante la activación de la fosforilación ERK y la adquisición de una morfología comúnmente asociada con células mesenquimales.

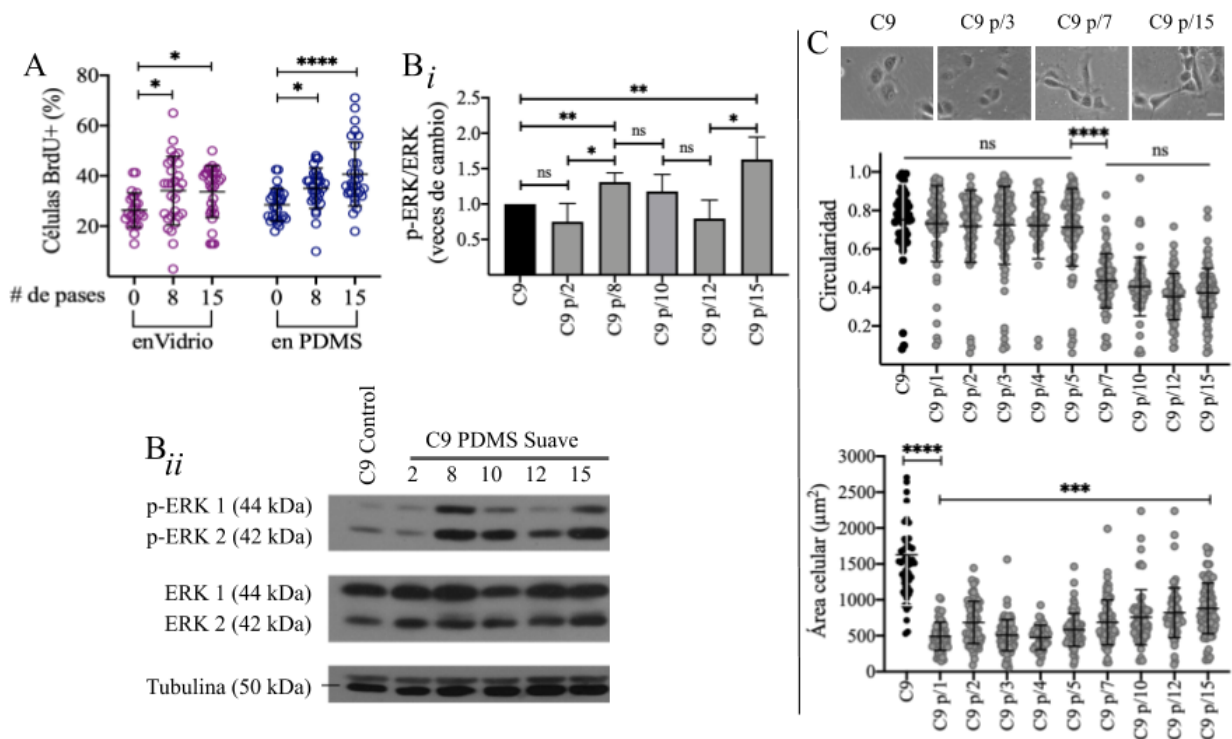


Fig. 4.10 Pases consecutivos de células C9 en el PDMS suave aumenta la tasa de proliferación regulada por la activación de ERK (A) La proliferación celular fue evaluada por el ensayo BrdU. Las células C9, C9 p/8 y C9 p/15 fueron sembradas a baja densidad (35×10^3 células por pozo) en placas de vidrio y cubreobjetos con PDMS suave en una placa de cultivo de tejido de 12 pozos. Las células proliferativas incorporadas al BrdU se tiñeron con un anticuerpo acoplado a la fluoresceína (verde) y se compararon con el número total de células teñidas con DAPI (azul). Las imágenes del microscopio de epifluorescencia fueron adquiridas 24 h después del cultivo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes y se presentan como media \pm SD. * $p < 0.0376$; **** $p < 0.0001$. (C) (i) Densitometría de los niveles de expresión de p-ERK. Los datos se presentan como

media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.0086$; ns, no significativo. ii) Los niveles de proteínas ERK totales y la activación por fosforilación de ERK fueron analizados por WB en lisados de células enteras de C9 p/2, p/8, p/10, p/12, p/15 y comparados con las células de control C9. (D) Circularidad y área de la célula sobre el número de pasajes. Los datos se presentan como media \pm SD. *** $p < 0.0006$; **** $p < 0.0001$; ns, no significativo.

Sin embargo, es importante contemplar que el cultivo de células durante pases consecutivos es comúnmente utilizado para imitar procesos de envejecimiento. Para tener una forma de distinguir entre el envejecimiento de la línea celular del efecto de la rigidez del sustrato, se repitió el mismo experimento de pases descrito en la figura 4.9 pero esta vez integrando también el sustrato de PS como control. Esto permitió evaluar si la línea celular C9 presenta la misma activación de proliferación y cambio morfológico en PS que el que observamos en PDMS.

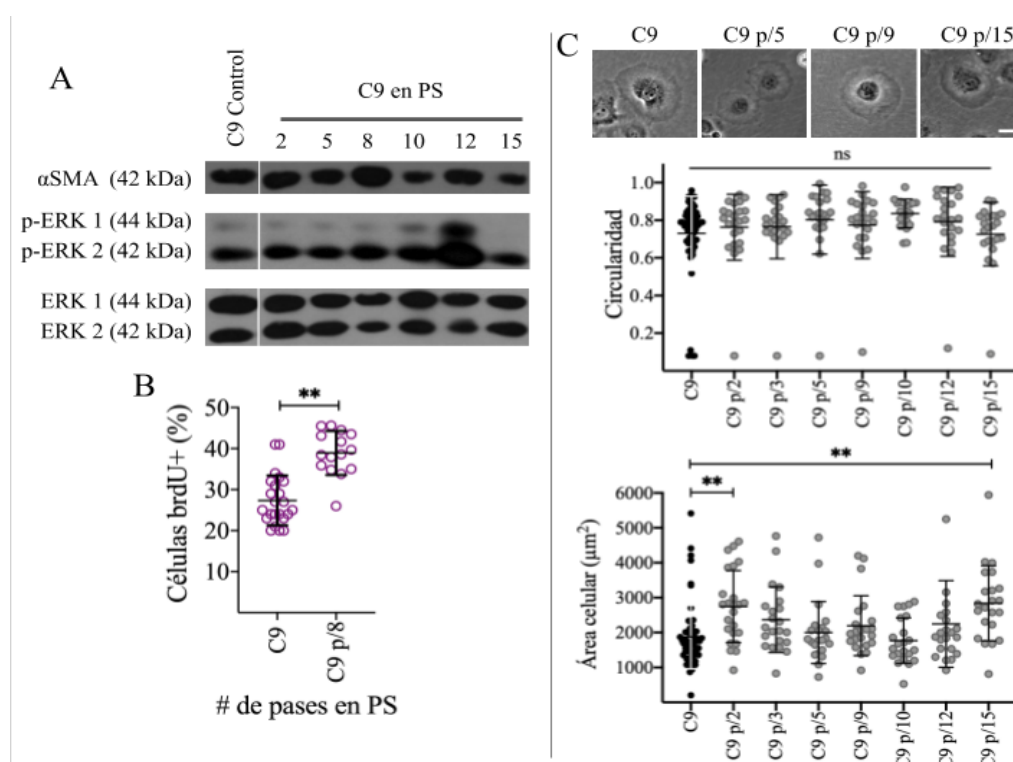


Fig. 4.11 Estudio preliminar del efecto de pases consecutivos de células C9 en sustratos de cultivo de PS (A) Las células C9 fueron sembradas a baja densidad (dilución 1:10) en platos de cultivo tratados con TC de 100 mm y mantenidas durante 15 pasajes utilizando una dilución constante 1:10 en cada paso. α SMA, los niveles de proteína ERK total y los niveles de p-ERK fueron analizados por WB en C9 p/2, p/5, p/8, p/10, p/12 y p/15 en comparación con las células C9 de control **(B)** La proliferación celular fue evaluada por el ensayo BrdU. Las células C9 y C9 p/8 se sembraron a baja densidad (35×10^3 células por pozo) en cubreobjetos de vidrio. Las células proliferativas incorporadas a la BrdU se tiñeron con un anticuerpo acoplado a la fluoresceína (verde) y se compararon con el número total de células teñidas con DAPI (azul). Las imágenes del microscopio de epifluorescencia fueron adquiridas 24 h después del cultivo. Los datos son representativos de 1 experimento independiente y se presentan como media \pm SD. ** $p < 0.002$ (Prueba de la t de Student) **C.** Circularidad y área celular sobre el número de pasajes en PS. Los datos se presentan como media \pm SD. ** $p < 0.002$; ns, no significativo.

En la figura 4.11 se presentan los resultados preliminares de esta prueba. En el panel C se observa que la morfología de las células no se modifica cuando son pasadas en PS ya que la circularidad permanece

prácticamente constante. Respecto al área celular, se observa que las células de los pases tiene valores de área similares al de las células control, aunque sí fue posible observar un ligero aumento gradual hacia los últimos pases. Por otro lado, la actividad de ERK también permanece constante en los pases y sólo se observa un aumento hasta superar el pase 12, ver figura 4.11A. Para que estos experimentos fueran comparables, se inició el protocolo de pases en PDMS al mismo tiempo que el de PS. A pesar de que en cada pase se mantuvo las misma dilución de 1:10, fue posible observamos una clara diferencia en la progresión de los pases en la PS vs. la PDMS desde el principio, las células C9 cultivadas en la PS requirieron 2 días en promedio para completar un pasaje en comparación con 5 días en el PDMS. En la caja de PS este período permanece prácticamente constante hasta el pase 15 en contraste con el PDMS que después del pase 7 disminuye en el tiempo a alrededor de 3 días para cumplir un pase. Con el fin de evaluar de manera más cuantitativa la proliferación a lo largo de los pases en los diferentes sustratos, se usó el ensayo de BrdU con el que se observó, contrario a lo que se esperaba, que también hubo un aumento en la tasa de proliferación en el pase 8. Esto podría sugerir que el aumento en la proliferación con los pases es un efecto común en esta línea celular pero el mecanismo que se encarga de regular dicho aumento no es el mismo que en PDMS. Más aún, en PS las células no presentan un cambio morfológico para adaptarse al sustrato.

4.2.6 Células C9 *re-adaptadas* expresan altos niveles de proteína α -SMA y tienen capacidad aumentada de adhesión al sustrato

Se realizó una mayor caracterización de los marcadores de fenotipo mediante WB en células de pases en PDMS suave. Contrario a lo que esperábamos, los niveles de expresión de albúmina no aumentaron, al mismo tiempo que los niveles de vimentina no disminuyeron a lo largo de los pases (ver figura 4.12A-B), de manera similar a reportes anteriores en los que la adaptación a los sustratos blandos no disminuyó los niveles de expresión de vimentina (Balestrini y otros, 2012; Li y otros, 2017). Esto sugiere que la exposición prolongada a sustratos suaves no revierte el fenotipo mesenquimatoso. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de α -SMA después de más de cinco pases, lo que sugiere que el fenotipo de las células C9 se vio afectado adquiriendo características normalmente asociadas con miofibroblastos (figura 4.12C-D).

La caracterización por inmunofluorescencia confirmó el aumento en la expresión de α -SMA en células confluentes C9 del pase 8, comparadas con las control (figura 4.12E). En las fotografías con la marca de F-Actin de la figura 4.12E, podemos apreciar un espacio entre las células C9 p/8 a pesar de su proximidad y la organización de los filamentos de actina es predominantemente en filamentos a lo largo de toda la célula y no cortical como se observó en el p/0. Estas características han sido descritas principalmente en células comprometidas con un fenotipo contráctil como los miofibroblastos (Hinz 2010; Bagalad, Mohan Kumar, and Puneeth 2017). Interesantemente, el aumento en los niveles de expresión de α -SMA coincide con el aumento en los niveles de p-ERK, mostrados antes en las figuras 4.10Bi y Bii.

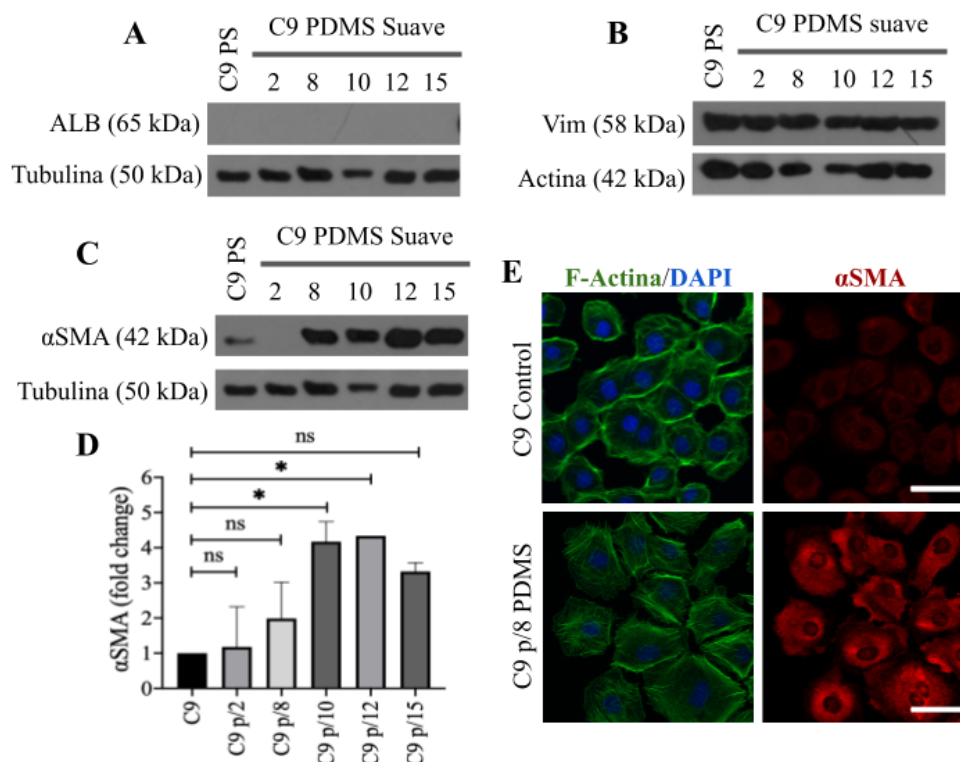


Fig. 4.12 Las células C9 adaptadas a un sustrato blando expresan niveles más altos de αSMA y aumentan su capacidad de propagación cuando cambian a un sustrato rígido (A) El nivel de expresión de la proteína albúmina fue analizado por WB en lisados totales de células C9 cultivadas hasta 15 pasajes en PDMS suave **(B)** Los niveles de expresión de la proteína vimentina fueron analizados por WB en células C9 cultivadas hasta 15 pasajes en PDMS suave **(C)** Los niveles de expresión de la proteína αSMA fueron analizados por WB en células C9 cultivadas hasta 15 pasajes en PDMS suave **(D)** Densitometría de los niveles de expresión de αSMA. Los datos se presentan como promedio ± SD de 2 experimentos independientes; *p < 0.05 y **p < 0.01 en comparación con el control **(E)** Las imágenes de microscopía confocal de las células de control C9, C9 p/8 y C9 p/15, que muestran que la expresión de αSMA está aumentada en C9 p/8. Los filamentos de actina fueron teñidos con faloidina acoplada a Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala: 50 μm.

Adicionalmente, se observó cualitativamente que las células C9 de los pases en PDMS adquieren progresivamente una mayor capacidad de adhesión lo que concuerda con la adquisición de características tipo miofibroblasto, especialmente después de lo que parece ser una etapa de readaptación en el paso 8. Para confirmar esta observación se realizó una prueba de adhesión en la que células del pase 15 en PDMS (C9 p/15) fueron sembradas nuevamente en caja de PS y se monitoreó discretamente el proceso de adhesión justo después de haber sido sembradas. Para esta prueba se utilizaron como control las células C9 originales. Cuando las C9 p/15 se sembraron de nuevo en placas de PS rígido, se encontró una mayor capacidad de esparcimiento, como lo demuestra el aumento del área celular en comparación con las C9 control, ver figura 4.13B. Además, la figura 4.13C muestra que 2 h después de la siembra, una vez que las células se han adherido al sustrato, su circularidad disminuye como resultado de la adopción de una morfología más alargada que las células C9. Este comportamiento de rápida adhesión podría deberse a que las células C9 provenientes de pases en sustrato suave adquieren una mayor capacidad contráctil y por tanto esto explicaría el aumento de los niveles de la proteína α-SMA.

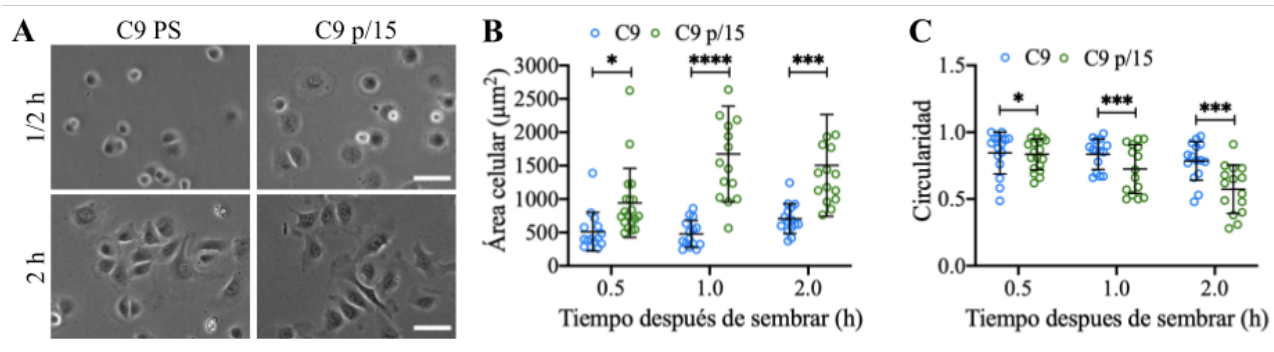


Fig. 4.13 (A) Micrografías de células C9 p/15 30 min y 1 h después de sembrar en sustratos GPa rígidos. Barra de escala. 50 µm (B) La cuantificación del área celular después de sembrar las células pasadas en placas de vidrio PS revelan que C9 p/15 presentan una capacidad de dispersión más rápida que el C9 de control en las primeras 2 h de cultivo. Los datos se presentan como media ± SD. * p < 0,0191; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001; ns, no significativo (C) Cuantificación de la circularidad celular después de sembrar las células pasadas en placas de PS. Los datos se presentan como media ± SD. * p < 0,0191; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001; ns, no significativo

Todos los datos presentados en esta sección y la anterior sugieren una aparente readaptación de las células C9 mediante la adquisición de características de miofibroblasto en células que inicialmente mostraban algunas características epiteliales. Este resultado es contraintuitivo ya que ha sido ampliamente reportado que la disminución de las fuerzas de tracción dada por una menor rigidez normalmente promueve la apoptosis y reduce fuertemente la proliferación en células hepáticas epiteliales (Schrader et al. 2011; Godoy et al. 2009).

Con el fin de determinar si las modificaciones en las células C9 eran reversibles, se cultivaron en PDMS suave hasta el pase 16 (C9 p/16) se cultivaron nuevamente en placas de cultivo de PS. Los resultados mostraron que la morfología celular alargada que habían adquirido las células en PDMS regresa a una morfología circular cuando las células son cultivadas en la caja de cultivo de poliestireno con una rigidez del rango de GPa, como se muestran en las fotografías en la figura 4.14a y que fue confirmado por la gráfica de circularidad celular.

Además, la circularidad parece permanecer constante en los pasajes subsiguientes y el valor calculado es similar al observado en las células de control C9 presentado en 4.11C. Esta observación se repitió en la caracterización del área celular ya que las células, que tienden a extenderse menos en el PDMS suave, como se mostró antes, aumentan de área celular una vez que se cultivan de nuevo en placas de cultivo PS rígidas. Más aún, estos cambios en la morfología se correlacionan con la disminución de la expresión de α SMA, caracterizada por WB (ver figura 4.14B) que sugiere que la expresión del fenotipo tipo miofibroblasto es reversible, resaltando la plasticidad de las células C9. Finalmente, en la figura 4.14B también se muestra que la actividad de ERK disminuye gradualmente al regresar las células C9p/16 al PS. Sin embargo hace falta hacer más experimentos para confirmar estas observaciones.

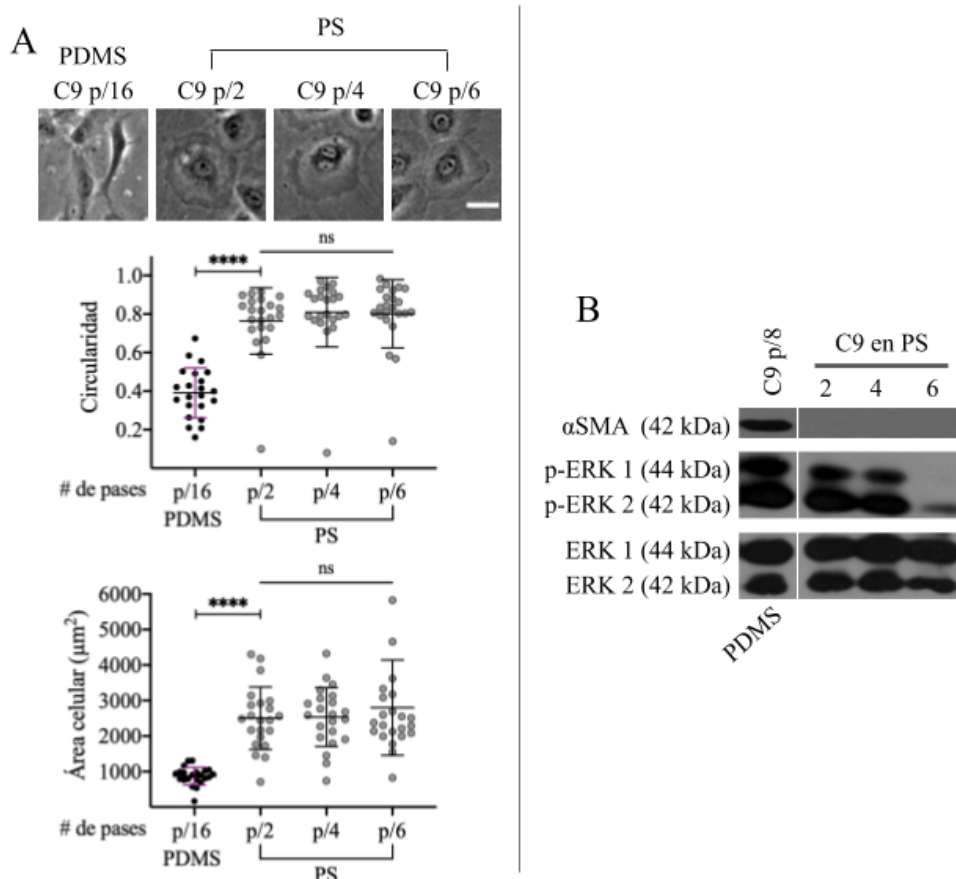


Fig. 4.14 Células C9 entrenadas en PDMS revierten el fenotipo al regresar a PS (A) Las células C9 que fueron cultivadas hasta 16 pasajes en PDMS (C9 p/16) fueron colocadas nuevamente en una placa de cultivo de PS con rigidez del orden de GPa, se mantuvieron hasta 6 pasajes en placas de cultivo PS. La morfología adquirida por las células cultivadas en PDMS se revierte al cultivarlas en PS y es similar a la morfología presentada en las células C9 de control. Los datos se presentan como promedio \pm SD. **** $p < 0.0001$; ns, no significativo. **(B)** Niveles de expresión de las proteínas αSMA , ERK 1/2 y p-ERK1/2 fueron caracterizados por WB en células C9 p/16 que fueron cultivadas nuevamente en PS.

4.3 Conclusiones del capítulo

En este capítulo se presentó el uso de sustratos de PDMS con rigidez modulable para su uso en el estudio de la respuesta celular a la mecánica del microambiente. El uso de PDMS permitió fabricar una amplia variedad de muestras tales como cubreobjetos, placas de pozos y cajas de cultivo. Esto permitió realizar diferentes técnicas de caracterización biológica con la caracterización de viabilidad, proliferación, expresión de proteínas por western blot e inmunomarcaje. Nuestro trabajo reveló que las propiedades mecánicas del entorno celular juegan un papel clave en la regulación de la proliferación y morfología celular.

En una primera exposición a los sustratos suaves, se observó una disminución en la velocidad de crecimiento de los cultivos sobre PDMS suave y rígido comparado con el cultivo convencional en caja de poliestireno (GPa). Al hacer el conteo celular se comprobó que efectivamente la densidad celular es menor en sustratos de menor rigidez. Mediante la caracterización con el ensayo de BrdU y Calceína AM/IP se confirmó que esta disminución en la densidad celular se debe a una baja en la proliferación y no a que la viabilidad celular se haya visto comprometida. Además, fue posible

determinar que el mecanismo mediante el cual se regula la proliferación en las células C9 en respuesta a la rigidez del sustrato es la vía de las MAPK ya que hay una disminución en la fosforilación de ERK1/2 en los sustratos suaves.

A pesar de que esta línea celular ha sido descrita como una célula epitelial hepática, se encontró que presenta propiedades de célula mesenquimal como la alta expresión de vimentina y nula expresión de albúmina. Por lo que se buscó revertir estas características mesenquimales al mantener las células por pases consecutivos en sustratos suaves. La hipótesis es que si bajan la proliferación, podría ser posible inducir un estado de quiescencia celular y por lo tanto se podría inducir la expresión de los marcadores epiteliales de hepatocitos. Los pases consecutivos de células C9 en el PDMS suave no alteraron este fenotipo mesenquimal, la expresión de vimentina no disminuyó a lo largo de los pases y tampoco aumentó la expresión de albúmina. Se observó que la tasa de proliferación celular se reactivó después de varios pases (a partir del pase 5) llegando a niveles similares a los observados en la caja de poliestireno, esta reactivación estuvo acompañada de un claro aumento en la fosforilación de ERK a partir del pase 8. Durante esta readaptación al sustrato suave, las células C9 van modificando su morfología y comienzan a expresar α -SMA lo que sugiere que han adquirido características de miofibroblasto.

Finalmente, se obtuvieron resultados que, aunque tiene que verificarse, sugieren que esta modificación en fenotipo dada por la constante interacción al PDMS suave es reversible ya que cuando las células entrenadas por hasta 15 pases son regresadas a sustratos de poliestireno rígidos recuperan la morfología circular, disminuyen la expresión de α -SMA y además baja la activación de ERK.

Discusión y conclusiones generales

Después de revisar la literatura, y con el fin de obtener un modelo hepático útil en el cual se pudiera preservar un fenotipo epitelial gracias a la baja rigidez del sustrato, el objetivo inicial de este trabajo fue probar si las células hepáticas C9 podían adquirir un fenotipo más quiescente disminuyendo su tasa de proliferación mediante la exposición a materiales mucho más blandos que el vidrio y el poliestireno, con rigideces más cercanas a los rangos fisiológicos. Para el hígado, el rango fisiológico puede variar a escala celular en comparación con lo reportado para todo el órgano pero es aceptado que el tejido sano tenga una rigidez de 5 kPa y aumenta a 10 kPa o más en condiciones fibróticas (Degos y otros, 2010). Resulta relevante señalar que debido a una compleja composición de los tejidos, los valores de rigidez pueden variar de un laboratorio a otro debido a las técnicas empleadas o por el tipo de análisis de datos empleado por lo que no se deben tomar como absolutos los valores de rigidez sino como una referencia.

Debido a nuestro protocolo de fabricación de PDMS, se lograron valores bajos de módulo de Young de hasta 9 kPa, el cual cae en un rango fibrótico. Sin embargo, utilizando los sustratos suaves de PDMS fue posible disminuir aproximadamente 10^6 veces la rigidez del sustrato que está en contacto con las células en estudio en comparación con la caja de poliestireno (3 GPa). Además, y lo que resulta más relevante, fue posible observar una respuesta celular aún en el rango de rigideces presentadas aquí, ya que la tasa de proliferación de las células C9, que de inicio son altamente proliferativas, disminuyó sin que la adhesión celular al sustrato o la viabilidad celular se vieran comprometidas. Si bien se sabe que los hepatocitos se activan por la mecánica a partir de >1 kPa (Desai et al., 2016), imitar estas rigidez podría comprometer la viabilidad de la célula al reducir la regulación de las señales de proliferación y supervivencia como MAPK y AKT, respectivamente, como se ha reportado para las células hepáticas (Schreder et al., 2011). Más aún, reportes previos han mostrado que valores de rigidez similares a los utilizados en este trabajo para el PDMS son suficientes para obtener hepatocitos primarios funcionales (Natarajan et al., 2015). Por lo tanto, el cultivo de células C9 en el rango de 9-11 kPa sería suficiente para influir en el fenotipo de las células C9 sin comprometer la supervivencia y la proliferación celular.

Por otro lado, se observó que la regulación de la disminución en proliferación celular en C9 en el PDMS suave depende de la actividad de ERK y no de YAP y TAZ como inicialmente se esperaba. Recientemente, se demostró que la localización subcelular de la proteína YAP en los hepatocitos

primarios depende del confinamiento celular en lugar de la rigidez (Sun et al., 2019) ya que los hepatocitos confinados translocan la proteína YAP al citoplasma incluso a pesar de ser cultivados en vidrio rígido (en el rango de GPa). Esto permite plantear que la tasas de proliferación podría ser influenciada de dos maneras, según el estímulo mecánico al que sean sometidas las células: las células cultivadas en sustratos suaves presentan una baja en la actividad de ERK, por tanto una baja en la proliferación; mientras que al llegar a un alta densidad celular las uniones célula a célula inducen un confinamiento mecánico que provoca la translocación de las proteínas YAP y TAZ al citoplasma y por ende se inhibe la proliferación, posiblemente debido a que al inactivar YAP se inhibe la expresión de la proteína del factor de transcripción E2F1 involucrada en la progresión del ciclo celular como se ha reportado previamente (Kim et al. 2019).

Ha sido reportado ampliamente que al bajar la rigidez del sustrato, tanto el área como la razón de aspecto de los puntos de adhesión focal son más bajos (Prager-Khoutorsky et al. 2011). En contraste, las células C9 cultivadas en PDMS suave en este proyecto presentan adhesiones focales más alargadas y por tanto con una razón de aspecto menor, además de que no bajan en número. Esto lleva al cuestionamiento de si las células pueden estar sintiendo influencia por la rigidez del cubreobjetos de vidrio que está debajo del recubrimiento de PDMS, debido a que utilizamos la técnica de spin coater que permite obtener películas delgadas. Sin embargo, en nuestra caracterización obtuvimos espesores de entre 80 y 90 μm , valores que están por encima del espesor mínimo las 40 μm necesario para que la célula no perciba la rigidez del material subyacente (Buxboim et al. 2010). Por lo tanto esta observación se debe a la interacción con el PDMS suave y no a un artefacto del sustrato debajo. Entonces ¿qué hace que las células C9 se comporten diferente de lo que se esperaba?

En una primera caracterización de la C9 para intentar contestar esta pregunta, se encontró que no expresan marcadores de hepatocitos como albúmina y HNF4, pero sí presentan altos niveles de vimentina. Incluso se utilizó un tratamiento con dexametasona que debía promover una fenotipo epitelial pero no se observó el aumento en la expresión de marcadores epiteliales hepáticos. Por lo tanto, una sola exposición al PDMS suave podría ser insuficiente para inducir un cambio fenotípico. En general, la mayoría de las investigaciones realizadas para evaluar las respuestas celulares a los estímulos mecánicos utilizan períodos de tiempo cortos, de horas a pocos días. La respuesta temprana de las células C9 cultivadas en PDMS, a pesar de sus características mesenquimales de inicio, fue similar a los datos observados en informes anteriores: una disminución de la tasa de proliferación y en la fosforilación de ERK1/2 (Godoy et al., 2009; Schrader et al., 2011). Por lo tanto se propuso mantener las células C9 cultivadas en PDMS por varios pases, en este experimento se esperaba que las células adquirieron un estado de reposo o quiescente para poder inducir así la expresión del fenotipo epitelial, similar al tejido hepático y que ha sido reportado previamente para las células hepáticas (Natarajan y otros, 2015; Li y otros, 2016). Sin embargo, las células C9 escaparon de la inhibición de la proliferación y activaron nuevamente la fosforilación ERK1/2 después de varios pases. Además y de manera inesperada, las células C9 aumentaron los niveles de la proteína α -SMA, esta proteína es un marcador mesenquimal muy conocido y que es asociado a miofibroblastos. Por tanto una nueva hipótesis sugiere que las células C9 respondieron a la suavidad del sustrato aumentando las señales que promueven la proliferación y activan las funciones mesenquimales para adaptarse a la nueva propiedades mecánicas. Es decir, se adaptan para mantener su tasa de supervivencia y proliferación.

Esta observación de readaptación a los sustratos suaves adquiriendo características mesenquimales es contraintuitiva por lo que se procedió a realizar una caracterización fenotípica de las células C9 para comprender este comportamiento inesperado. La información de la que partimos fue que las células C9 inmortalizadas a partir de hepatocitos primarios se obtuvieron de ATCC. La evidencia de que las células C9 son de origen epitelial incluye su forma poligonal, su falta de locomoción y su extensa adhesión célula-célula. Sin embargo, no es posible decir con certeza si las C9 fueron derivadas realmente de células del parénquima hepático (hepatocitos), a pesar de que utilizaban métodos adecuados (separación basada en el percoll). También se descartó su capacidad de formar tumores y crecer en agar suave, por lo que se descarta que sea una línea transformada. En nuestros datos, llamó la atención que las células C9 expresan altos niveles de α -fetoproteína (AFP). La AFP tiene varias funciones celulares como el crecimiento, la proliferación, la apoptosis, la angiogénesis y la regulación inmunológica de las células (Gillespie y otros, 2000. Rich, 2014). La AFP es un marcador clínico de la inducción de células progenitoras en el hígado adulto lesionado, aunque no se comprende del todo el origen de las células productoras de AFP. Recientemente, Nakano et al. identificaron una nueva población de células que expresan AFP en el hígado fibrótico murino (Nakano y otros, 2017). Sin embargo, las células que expresan AFP en el tejido hepático fibrótico no expresaron marcadores de células progenitoras hepáticas (CD44 y EpCAM) ni marcadores de linaje ductal (CK19 y HNF1 β). Por lo tanto, queda por determinar el papel de estas células positivas para la AFP en la fisiología hepática.

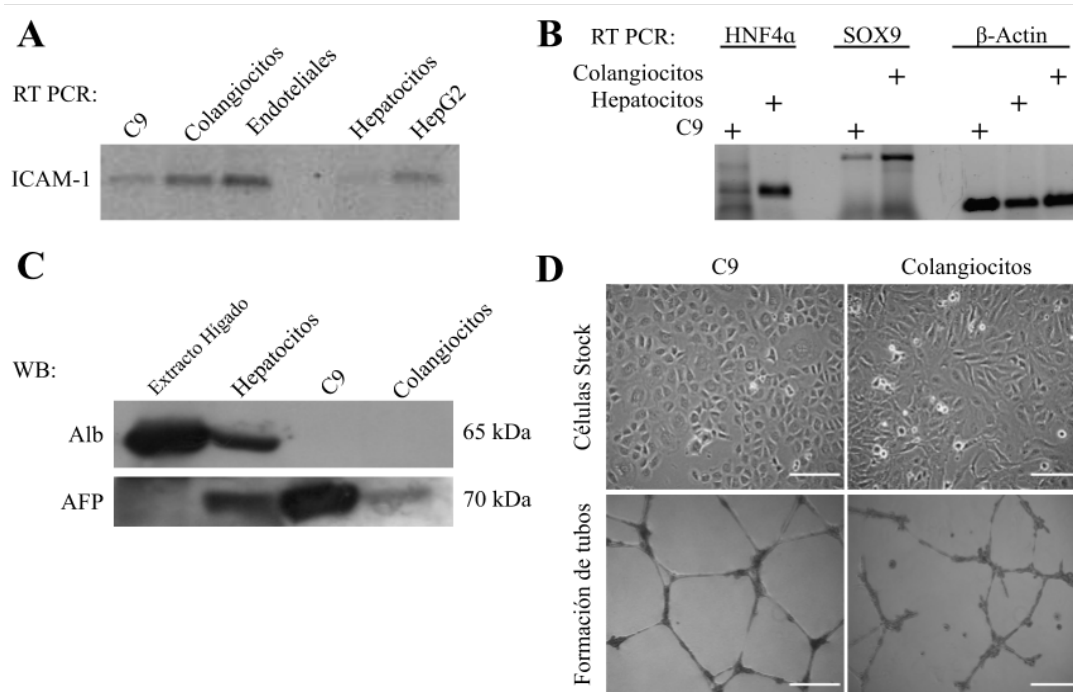


Fig D.1 Estudio del fenotipo de las células C9 Se probaron diferentes marcadores de fenotipo en las células C9 (A) Usando extractos totales de RNA de células C9, colangiocitos, células endoteliales, hepatocitos primarios y HepG2, se probó la expresión de ICAM-1 mediante la prueba de RT-PCR (B) Usando extractos totales de RNA de células C9, colangiocitos, y hepatocitos primarios se probó la expresión de HNF4 α como marcador de hepatocito y SOX9 como marcador de colangiocitos (C) Niveles de expresión de Albúmina y α -Fetoproteína fueron caracterizado por western blot en lisados totales de células C9, hepatocitos primarios, células endoteliales, colangiocitos y extracto total de hígado (D) El ensayo de tubulogénesis en matrigel fue empleado para evaluar la capacidad de formar estructuras tubulares en colangiocitos y células C9. Las células C9 y los colangiocitos, que crecen en el Medio de Águila Modificado de Dulbecco con FBS 10% fueron

sembradas en matrigel y cultivados a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 h antes de la observación. 100.000 células, aproximadamente, fueron sembradas para cada condición. Barra de escala = 100 μ m.

Con toda esta información se decidió analizar la expresión de diferentes marcadores, incluyendo los marcadores de: hepatocitos y colangiocitos (Albúmina/HNF4 α y SOX9 respectivamente); progenitoras (SOX9 y AFP); y marcador endotelial (ICAM-1). Como se muestra en la figura D.1, se encontró que las células C9 coexpresan SOX9 y AFP, presentan bajos niveles del transcrito de HNF4 α y no se detectó ninguna expresión de albúmina. También se encontró que la célula C9 expresa el transcrito de ICAM-1 y es capaz de formar túbulos en Matrigel, similares al comportamiento funcional de los colangiocitos y las células endoteliales. En resumen, las células C9 muestran una morfología claramente epitelial, expresan transcritos de ICAM y SOX9 y expresan la proteína AFP. Anteriormente también se había encontrado que las C9 expresan vimentina funcional. A pesar de que la vimentina de filamentos intermedios se conoce como un marcador típico de las células mesenquimales como los fibroblastos, las células C9 mostraron β -catenina cortical y establecieron excelentes contactos entre células; ambos marcadores típicos de las células epiteliales. Por tanto, los datos no son suficientemente concluyentes como para definir claramente el origen de la línea de células C9 o nombrar un fenotipo definido particular (hepatocitos, colangiocitos, célula endotelial o célula progenitora). Sin embargo, el consenso es que esta es una célula de tipo epitelial con algunos marcadores mesenquimales.

Todo lo anterior sugiere que las células C9 son células epiteliales que puedan ser dirigidas a un fenotipo mesenquimal funcional con la expresión α -SMA y otros marcadores mesenquimales en respuesta al estímulo constante al sustrato suave. Con la señales de proliferación altamente reducida pero sin pérdida de viabilidad, es probable que las células C9 cultivadas en PDMS suave hayan regulado la señalización interna, posiblemente a través de vías de supervivencia como la señalización de AKT, y hayan convertido su fenotipo de tipo epitelial en una célula mesenquimal comprometida que puede ser capaz de sintetizar y reorganizar la MEC, migrar y secretar factores de crecimiento. Resulta particularmente atractivo que, aunque el fenotipo epitelial preciso de las células C9 utilizadas en este experimento sigue siendo difícil de definir (con marcadores de colangiocitos, hepatocitos, células endoteliales hepáticas y progenitores), la transición epitelial-mesenquimal es clara después de varios pases en los sustratos más blandos, contrariamente a lo que es reportado en la literatura, donde el aumento de la rigidez es al que se le asocia este tipo de transición. Por otro lado, obtuvimos datos que, aunque preliminares, sugieren que la adquisición del fenotipo mesenquimal tipo miofibroblasto es reversible a un fenotipo de tipo epitelial cuando las células entrenadas en PDMS son cultivadas nuevamente en poliestireno, ya que recuperar la morfología más circular y disminuyen la expresión de α -SMA como se observaba en las células control.

Uno de las conclusiones más relevantes de este trabajo es que la adaptación de las células epiteliales a un fenotipo mesenquimal mediante la exposición durante un período prolongado a una condición suave sugiere la necesidad de realizarse una evaluación más estricta de los efectos reales causados por la modificación en los estímulos mecánicos, particularmente cuando se trabaja con líneas celulares. Incluso han surgido estudios recientes que evalúan si este tipo de adaptación mediante la exposición a sustratos suaves puede suceder en otros tipos celulares, tal es el caso del trabajo de Purkayastha y colaboradores en el que estudian la plasticidad de fibroblastos 3T3 cultivados por tiempos prolongados en sustratos suaves, mostrando resultados similares a los nuestros respecto a reactivación

de la proliferación después de algún tiempo (Purkayastha et al., n.d., biorxiv). Esto también puede ser particularmente importante de considerar en la estrategia en la que se prueba la reducción de la rigidez del microambiente en tumores como estrategia para detener la metástasis (Levental et al. 2009; Gehler et al. 2013).

En conclusión, a pesar de que el objetivo inicial era inducir un fenotipo más epitelial en las células hepáticas C9 junto con la disminución de su tasa de proliferación exponiéndolas a un sustrato mucho más suave que los materiales comunes de cultivo de células en GP, este trabajo reveló un papel clave de las propiedades mecánicas del entorno celular como regulador de la proliferación y la morfología celular. En el primer pase (correspondiente a 6 días en cultivo blando), la suavidad del sustrato disminuyó la tasa de proliferación de las células C9 como se esperaba. Al estudiar si el cultivo de células C9 en PDMS blando durante períodos de tiempo más largos podría promover un estado de reposo que a su vez conduciría a un fenotipo de tipo epitelial, observamos sin embargo que después de más de 7 pasajes (correspondientes a 42 días en cultivo blando), las células volvían a presentar una mayor tasa de proliferación asociada a cambios morfológicos y probablemente fenotípicos, señalando a nuestra atención el hecho de que la influencia anteriormente observada de un sustrato blando en esa línea celular sólo duraba un tiempo de exposición limitado. Se confirmó que después de un largo período de tiempo en el PDMS blando, la reactivación de la proliferación fue paralela al aumento de la actividad de la ERK. Esto puede sugerir que los modelos celulares in vitro, especialmente las líneas celulares inmortalizadas, seleccionadas originalmente para crecer en materiales rígidos, son capaces de presentar una capacidad de readaptación a ambientes más blandos después de una exposición prolongada a materiales blandos, lo que afecta a su morfología y fenotipo, además de aumentar su tasa de proliferación. Así pues, este trabajo indica que es importante abordar más profundamente el efecto de los sustratos blandos en la viabilidad celular y la tasa de proliferación durante períodos de tiempo más largos que los que se suelen presentar o reportar. Parece especialmente relevante en la propuesta de un tratamiento tumoral alternativo mediante la reducción de la rigidez del medio extracelular (DuFort, Paszek y Weaver 2011).

Materiales y métodos

Fabricación de sustratos

Para la preparación de los sustratos de cultivo con PDMS de diferente módulo elástico se trabajó con el elastómero Sylgard 184 y el gel Sylgard 527 que fueron adquiridos comercialmente de Dow Corning. Primero se preparó el Sylgard 184 mezclando 10 partes del prepolímero con una parte del agente de curante (proporción 10:1 en peso) y por separado se preparó el Sylgard 527 mezclando partes iguales del agente A y del agente B (proporción 1:1 en peso), esta última preparación fue la que se utilizó para el sustrato más blando referido como PDMS suave con un rango de rigidez de 9-11 kPa. Para los sustratos de PDMS rígido (160-200 kPa) se mezclaron 5 partes de 527 y una parte de 184 (proporción 1:5 p/p) siguiendo el protocolo descrito (Palchesko et al. 2012). Todas las preparaciones se mezclaron a 1500 rpm durante 5 min y se desecaron al vacío durante 5 min. Posteriormente se depositan en el molde a utilizar (cubreobjetos, placas de pozos o cajas p100) según la muestra requerida. Finalmente las muestras fueron polimerizadas durante 48h a 60°C. Particularmente para los experimentos de inmunofluorescencia, los cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro fueron recubiertos de PDMS utilizando un programa de dos pasos: 1) 500 rpm x 20 s, 2) 1000 x 15 s en el *spin coater* (Laurell WS-650-23) y se polimerizaron durante 48 h a 60°C. Los parámetros de recubrimiento usados con el *spin coater* fueron 1000 rpm por 20 segundos. Los cubreobjetos de vidrio, las placas de petri de poliestireno (PS) y los platos de 6 pozos se utilizaron como sustratos rígidos de rango GPa como controles. Específicamente el vidrio (borosilicato) tiene un módulo elástico de 64 GPa y el PS de 3 GPa.

Caracterización mecánica por tensión uniaxial

Para las pruebas de tensión uniaxial se prepararon membranas de PDMS suave, intermedio y rígido siguiendo las proporciones 1:0, 20:1 y 5:1 de mezcla 527:184, según el protocolo descrito por Palchesko et al. Utilizando un suaje con geometría tipo mancuerna siguiendo los estándares de ASTM 1708 se cortaron varias probetas de cada preparación de PDMS. El espesor de las probetas se midió utilizando un micrómetro Mitutoyo (modelo MDC-1-SXF), se consideraron al menos tres mediciones por probeta para determinar el espesor promedio y poder calcular así el área de la sección transversal de las probetas. Las muestras se colocaron entre las mordazas del dispositivo de tracción uniaxial diseñando a la medida para la caracterización de elastómeros reportado por (Garnica-Palafox et al. 2014). Con el desplazamiento de una de las mordazas, la probeta es estirada a una velocidad constante. La prueba de tensión se llevó a cabo a 24°C considerando al menos cinco probetas. A partir de los datos de desplazamiento y fuerza registrados por el equipo de tracción uniaxial, se obtuvo la curva de estrés (σ) contra la razón de elongación (λ) para cada caso. A continuación, estos datos se ajustaron utilizando el modelo de Ogden de primer orden mediante un algoritmo de ajuste no lineal empleado

con Mathematica; de ahí que se determinó el módulo de corte μ para cada muestra. Considerando las diferentes preparaciones de PDMS como un material incompresible, el módulo de elasticidad puede determinarse como $E = 3\mu$.

Caracterización mecánica por microindentación

Las propiedades mecánicas del PDMS fueron caracterizadas usando el sistema de microindentación FT-MTA-02 (Femto Tools). Para la indentación de los sustratos de PDMS se utilizó una punta esférica de vidrio de 50 μm de diámetro ($\text{FSTS100} \pm 100 \mu\text{N}$) considerando una indentación máxima de 7.5 μm . Para determinar de manera precisa el punto de contacto para poder considerar la distancia de indentación con mayor precisión se utilizó un método de análisis de los datos desarrollado en el laboratorio en el que se utiliza la segunda derivada para hallar el punto de inflexión en los datos, como se explicó en el capítulo 3. El modelo de contacto de Hertz permite obtener el módulo elástico de una muestra a partir de las curvas de fuerza contra distancia de indentación obtenidas a partir del contacto de una esfera rígida que presiona la superficie de una superficie plana, en este caso el PDMS. El modelo de Hertz relaciona la distancia de indentación d y la fuerza F mediante la siguiente relación (Johnson and Johnson 1987),

$$F = \frac{4}{3} E^* R^{\frac{1}{2}} d^{\frac{3}{2}}$$

donde R es el radio de la esfera, E^* es una combinación del módulo elástico del indentador y de la muestra que está determinado por

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_{\text{indentador}}^2}{E_{\text{indentador}}} + \frac{1 - \nu_{\text{muestra}}^2}{E_{\text{muestra}}}$$

donde $E_{\text{indentador}}$ y E_{muestra} son los módulos elásticos del indentador y de la muestra, y $\nu_{\text{indentador}}$ y ν_{muestra} son los módulos de Poisson del indentador y de la muestra, respectivamente (J. Tan et al. 2009). Cuando un indentador rígido comprime de forma ortogonal una muestra plana y suave como la muestra de PDMS utilizada en este estudio, la deformación del indentador es despreciable en relación con la de la muestra en estudio. Más aún, debido a que el indentador de nuestro equipo es una punta esférica de vidrio (*soda lime glass*) cuyo módulo de Poisson es 0.2 y el módulo elástico es de 7 GPa (J. Tan et al. 2009; Blieske and Stollwerck 2013), entonces se deprecia el primer término que es muy cercano a cero. Por lo que la relación utilizada para determinar el módulo de la muestra es

$$E_{\text{muestra}} = (1 - \nu_{\text{muestra}}^2) E^*$$

donde el valor del módulo de Poisson para el PDMS se considera 0.5. Una vez obtenidos los valores experimentales de fuerza y distancia de indentación, se calcula el valor experimental de E^* y se utiliza la ecuación anterior para determinar E_{muestra} .

Con el fin de medir las muestras en las condiciones de cultivo celular, éstas fueron tratadas tras la esterilización e hidratación necesaria para el cultivo. Además, todas las mediciones de indentación se realizaron en hidratación (con medio de cultivo DMEM +SFB 10% + P/S 1%) para disminuir la adhesión de la punta al material. Para la preparación de las muestras se utilizaron diferentes lotes y se

comprobó que las mediciones eran comparables a lo largo de la vida útil de los kits Sylgard. El PDMS suave presentó un módulo de Young entre 9 y 11 kPa, mientras que el PDMS rígido presentó un módulo entre 160 y 200 kPa. Se utilizaron al menos 3 muestras de cada preparación de la PDMS y se realizaron al menos cinco pruebas de indentación independientes para calcular los valores promedios de cada muestra.

Caracterización del espesor de muestras de PDMS depositadas por spincoating

Debido a que resulta imposible utilizar un perfilómetro mecánico para medir directamente el espesor en sustratos blandos como el PDMS, ya que la punta del perfilómetro comprime el material e incluso podría romperlo, se utilizó también el microindentador FT-MTA-02 para calcular el espesor de las capas de PDMS depositadas por spincoating sobre cubreobjetos de vidrio. Ésto se logró mediante la indentación directa en el cubreobjetos de vidrio en una región no recubierta de la muestra, seguida de la indentación de la superficie de la capa de PDMS. El espesor de la capa de PDMS corresponde entonces con la diferencia entre el punto de contacto en el cubreobjetos de vidrio y en la superficie de la PDMS. Se obtuvieron espesores de $93.4 \pm 23.1 \mu\text{m}$ y $80.1 \pm 34.5 \mu\text{m}$ para el PDMS rígida y suave, respectivamente. Estas mediciones se realizaron en tres muestras diferentes con al menos 5 mediciones en cada muestra, los valores reportados son el promedio \pm SD. Particularmente en la muestra rígida se obtuvo un error en la medición de casi el 50%, lo cual puede asociarse a que la velocidad del giro para el depósito del spin coater es ‘baja’ (100 rpm) por lo que se pueden presentar efectos del borde y que el perfil del depósito sea menos homogéneo, para esto es importante realizar las mediciones principalmente en el centro del cubreobjetos.

Esterilización y humectación de sustratos para cultivo

Previo a su uso como sustrato para cultivo celular, el PDMS fue lavado 3 veces con etanol al 70% en condiciones estériles y expuesto a la luz UV durante 30 min. Inmediatamente después de la luz UV, el PDMS es humectado con medio DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, durante al menos 2 h. Se utilizaron sustratos de vidrio y poliestireno como controles de rigidez del orden de GPa. Para homogeneizar la interacción entre las células y los diferentes materiales, los sustratos de poliestireno, vidrio y PDMS se trataron siguiendo el mismo protocolo de esterilización e incubación del medio antes de la siembra de las células y no se observaron diferencias significativas en la adhesión celular entre los diferentes materiales.

Cultivo celular

La línea celular C9 se cultivó en medio DMEM con baja glucosa complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina/estreptomicina (P/S) al 1%; el recambio de medio se realizó cada tercer día y el pase se hizo al llegar a una confluencia del 80-90%.

Protocolo de expansión celular en PDMS

Las células C9 fueron sembradas en cajas de cultivo de 100 mm recubiertas con PDMS suave (denotado C9 p/1) a una dilución de 1:10. Luego, las células C9 p/1 confluentes fueron tripsinizadas y sembradas nuevamente en una caja de cultivo recubierta con PDMS suave (denotado C9 p/2) usando una dilución de 1:10. El mismo procedimiento se realizó consecutivamente hasta llegar a 15 pases

(denotado C9 p/15). La extracción de proteína por lisis celular, empleada para la caracterización por Western blot, se realizó a partir de células confluentes C9, C9 p/2, C9 p/8, C9 p/10, C9 p/12 y C9 p/15. Para la evaluación de la proliferación, las células C9 C9 p/8 y C9 /15 fueron sembradas en cubreobjetos con PDMS suave así como en cubreobjetos de vidrio, ambos colocados en una placa de cultivo de tejido de 12 pozos. El ensayo BrdU se realizó después de 24 h en cultivo. Para la prueba de adhesión, las células C9 y C9 p/15 fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pozos de cultivo convencionales, imágenes de campo claro fueron adquiridas a los 30 min, 1 y 2 h después de la siembra. Para la visualización de F-Actin y α SMA, las células C9 y C9 p/8 fueron sembradas en cubreobjetos con PDMS suave así como en cubreobjetos de vidrio, ambos colocados en una placa de cultivo de tejido de 12 pozos. Las muestras se fijaron después de 24 h de cultivo y se procedió al marcaje por inmunofluorescencia.

Tinción con cristal violeta

Las células se fijaron durante 15 min con 0.4% de paraformaldehído (PFA) en PBS a 37°C, se incubaron durante 5 min con 1% de cristal violeta en agua desionizada y luego se lavaron con agua desionizada 4 veces. Finalmente las células se secaron y se tomaron fotografías de campo claro.

Ensayo de viabilidad

Las células C9 fueron sembradas en cubreobjetos con PDMS suave y rígido colocados en una placa de cultivo de tejido de 12 pozos. Las células fueron sembradas a baja densidad (35×10^3 células por pozo) y cultivadas durante 72 h. A las 24, 48 y 72 h en cultivo, las células fueron incubadas con $1 \mu\text{M}$ de Calceína AM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) y $5 \mu\text{M}$ de yoduro de propidio (PI; P4170, Sigma) durante 15 min en medio de ayuno a 37°C. Luego, las células vivas y muertas fueron visualizadas por microscopía de epifluorescencia. Las imágenes fueron procesadas y analizadas usando el software libre ImageJ para el conteo de las poblaciones de células vivas en verde y células muertas en rojo. Se evaluó la viabilidad a las 24, 48 y 72 h de cultivo como la razón de las células vivas entre el total de las células.

Ensayo de proliferación

Las células fueron sembradas en cubreobjetos circulares cubiertos con PDMS así como en cubreobjetos de vidrio como control, éstos fueron colocados en cajas de 12 pozos de cultivo. Se utilizó el ensayo de detección y marcaje de bromodeoxiuridina (BrdU) I (11296736001 Roche). Las células fueron cultivadas por 72 h en medio de crecimiento DMEM + SFB 10%. a las 24, 48 y 72 h de cultivo, las células se incubaron con la solución de BrdU a 1:1000 en un medio en ayuno durante 30 min a 37°C, luego se fijaron con la solución de fijación (50 mM de solución de glicina a 70 ml de EtOH para obtener 100 ml de fijador, pH 2.0), durante 20 min a -20°C. La solución de fijación se lavó 3 veces con PBS 1X. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario de reconocimiento específico para BrdU usando una dilución 1:10 en solución de incubación provista por el kit, durante 30 min a 37°C. Las muestras se lavaron 3 veces por 5 min con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse-Ig-fluoresceína usando la dilución 1:10 en PBS 1X, durante 30 min a 37°C. Para la tinción de núcleos, las células se incubaron con DAPI a 1:200 (Invitrogen) en PBS durante 10 min. Finalmente las muestras fueron montadas con Mowiol (Calbiochem) y polimerizadas a temperatura ambiente (TA). La toma de imágenes de las muestras se realizó usando el microscopio de fluorescencia (Nikon

Eclipse Ci-L). El análisis de las imágenes se hizo utilizando el software libre ImageJ para cuantificar las poblaciones de células positivas BrdU en verde y el número total de células en azul.

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en cubreobjetos circulares cubiertos con PDMS así como en cubreobjetos de vidrio como control, éstos fueron colocados en cajas de 12 pozos de cultivo. Las células fueron cultivadas por 24 h en medio de crecimiento DMEM + SFB 10%. Después de este periodo, las células se lavaron una vez con PBS tibio, después se incubaron por 15 min con 0.4% de paraformaldehído (PFA) en PBS 1X a 37°C, el PFA fue lavado tres veces con PBS. Las muestras fueron permeabilizadas con 0.1% de Triton X-100 en PBS 1X durante 10 min a TA y lavadas tres veces con PBS para retirar la solución de permeabilización. Las muestras fueron bloqueadas usando la solución de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) al 1% y suero de caballo (HS por sus siglas en inglés) al 10%, durante 1 h a TA en agitación. Después del bloqueo, los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C (diluciones utilizadas anti-YAP/TAZ 1:200, anti- β -cat 1:200, anti-Vinculina 1: 200 en solución de bloqueo). Posterior a la incubación, la solución con anticuerpo primario se lavó 3 veces por 5 min en PBS 1X. Las muestras se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa 488 para YAP/TAZ y Alexa 594 para β -catenina) usando una dilución de 1:500 en solución bloqueante. Las muestras se lavaron 3 veces por 5 min con PBS 1X. Para la tinción de F-Actin, las muestras se incubaron durante 45 min con Phalloidin TRIC (FAK 100 Merck), diluido 1:50 en PBS 1X. Para la tinción de núcleos, las células se incubaron con DAPI a 1:200 (Invitrogen) en PBS durante 10 min. Finalmente las muestras fueron montadas con Mowiol (Calbiochem) y polimerizadas a TA. La toma de imágenes de las muestras se realizó usando el microscopio confocal (LEICA TCS-SP8). El análisis de las imágenes se hizo utilizando el software libre ImageJ.

Cuantificación de localización subcelular de YAP y TAZ

Las células C9 fueron marcadas con anticuerpos específicos para YAP y TAZ para su posterior detección por microscopía de fluorescencia. La caracterización de la localización de YAP y TAZ se realizó a partir de imágenes de microscopía confocal (LEICA TCS-SP8). La fluorescencia celular se midió usando el software ImageJ siguiendo el protocolo desarrollado por Luke Hammond de la Universidad de Queensland, Australia: Las células positivas a estas proteínas de interés fueron seleccionadas manualmente usando el canal de YAP y TAZ (verde en nuestro caso). Para hacer un seguimiento de los objetos seleccionados se utilizó la herramienta de administración de región de interés (ROI manager en inglés), con el que se midió el área seleccionada (AS) y la densidad integrada (DI) para cada células de interés; adicionalmente se midió la fluorescencia promedio del fondo (FPF); finalmente la fluorescencia total corregida de las células positivas a YAP y TAZ (FTC) para cada celda utilizando la fórmula: $FTC = DI - (AS \times FPF)$; posteriormente, utilizando el canal DAPI, los núcleos fueron seleccionados manualmente y se transfirieron al canal YAP/TAZ utilizando el *ROI manager* como referencia para seleccionar la región nuclear de la señal de YAP y TAZ; luego se midió el área nuclear seleccionada (ANS) y la densidad nuclear integrada (DNI) para determinar la fluorescencia nuclear corregida (FNC) para cada celda utilizando la siguiente fórmula: $FNC = ANS - (DNI \times FPF)$; finalmente la fracción citoplasmática (FCyt) de la señal de YAP y TAZ se calculó

usando $FCyt = FTC - FNC$. Para la estadística se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Lisis celular y caracterización por Western Blot

La extracción de proteínas se realizó a partir de lisados celulares utilizando la solución de lisis RIPA (50mM de Tris-HCL, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, desoxicolato de sodio al 0.5%, Nonidet 40 al 1% más SDS al 0.1%), adicionado con inhibidores de la proteasa y la fosfatasa. Las células se incubaron con 1 ml de RIPA en agitación por 1 h a 4°C, los extractos se centrifugaron a 13 300 rpm por 10 min y se descartó el material insoluble conocido como *pellet*. Los extractos celulares fueron cuantificados usando el ensayo de proteína DC de Bio-Rad (500-0114 Bio-Rad). Se agregó 20 y 50 µg de proteína por muestra y se desnaturizó con Laemmli 6X previo a ser cargadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Después de resolverse, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), y se incubaron durante 1 h con una solución de bloqueo de leche a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C. Más tarde, la membrana se lavó e incubó durante 1 h con anticuerpos secundarios específicos a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas por Western blot (WB) usando el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore). Las placas reveladas fueron escaneadas para realizar el análisis densitométrico con el software ImageJ.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como promedio \pm SD de tres experimentos independientes. La diferencias entre los diversos grupos experimentales se analizó mediante un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) utilizando la función de análisis estadístico incorporada en el software Prism seguida de la prueba Tukey. Para el análisis estadístico de todos los datos, se utilizó $p < 0,05$ como umbral de significancia

Por otro lado, para calcular la significancia estadística de los experimentos no agrupados, se realizó la prueba t de Student usando el software Prism. El valor $p < 0,05$ se consideró significativo.

Referencias

- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Peter Walter, Martin Raff, and Keith Roberts. 2002. *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*. Garland Science.
- Alcaraz, Jordi, Ren Xu, Hidetoshi Mori, Celeste M. Nelson, Rana Mroue, Virginia A. Spencer, Doug Brownfield, Derek C. Radisky, Carlos Bustamante, and Mina J. Bissell. 2008. “Laminin and Biomimetic Extracellular Elasticity Enhance Functional Differentiation in Mammary Epithelia.” *The EMBO Journal* 27 (21): 2829–38.
- Alves, Natália M., Iva Pashkuleva, Rui L. Reis, and João F. Mano. 2010. “Controlling Cell Behavior through the Design of Polymer Surfaces.” *Small* 6 (20): 2208–20.
- American Thoracic Society, and European Respiratory Society. 2002. “American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) Was Adopted by the ATS Board of Directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (2): 277–304.
- Aoki, Kazuhiro, Yohei Kondo, Honda Naoki, Toru Hiratsuka, Reina E. Itoh, and Michiyuki Matsuda. 2017. “Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration.” *Developmental Cell* 43 (3): 305–17.e5.
- Aragona, Mariaceleste, Tito Panciera, Andrea Manfrin, Stefano Giullitti, Federica Michielin, Nicola Elvassore, Sirio Dupont, and Stefano Piccolo. 2013. “A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors.” *Cell* 154 (5): 1047–59.
- Atayde, Cleuson de Menezes, Cleuson de Menezes Atayde, and Ioshiaki Doi. 2010. “Highly Stable Hydrophilic Surfaces of PDMS Thin Layer Obtained by UV Radiation and Oxygen Plasma Treatments.” *Physica Status Solidi (c)*. <https://doi.org/10.1002/pssc.200982419>.
- Bagalad, Bhavana S., K. P. Mohan Kumar, and H. K. Puneeth. 2017. “Myofibroblasts: Master of Disguise.” *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* 21 (3): 462–63.
- Balcioglu, Hayri E., Lakshmi Balasubramaniam, Tomita Vasilica Stirbat, Bryant L. Doss, Marc-Antoine Fardin, René-Marc Mège, and Benoit Ladoux. 2020. “A Subtle Relationship between Substrate Stiffness and Collective Migration of Cell Clusters.” *Soft Matter* 16 (7): 1825–39.
- Ballermann, Barbara J., Alan Dardik, Eudora Eng, and Ailian Liu. 1998. “Shear Stress and the Endothelium.” *Kidney International*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x>.
- Bancroft, G. N., V. I. Sikavitsas, J. van den Dolder, T. L. Sheffield, C. G. Ambrose, J. A. Jansen, and A. G. Mikos. 2002. “Fluid Flow Increases Mineralized Matrix Deposition in 3D Perfusion Culture of Marrow Stromal Osteoblasts in a Dose-Dependent Manner.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.202296599>.
- Benoit, Danielle S. W., Michael P. Schwartz, Andrew R. Durney, and Kristi S. Anseth. 2008. “Small Functional Groups for Controlled Differentiation of Hydrogel-Encapsulated Human Mesenchymal Stem Cells.” *Nature Materials* 7 (10): 816–23.
- Berridge, Michael J. 2014. “Module 2: Cell Signalling Pathways.” *Cell Signalling Biology*. <https://doi.org/10.1042/csb0001002>.
- Blieske, Ulf, and Gunther Stollwerck. 2013. “Glass and Other Encapsulation Materials.” *Semiconductors and Semimetals*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381343-5.00004-5>.
- Bogorad, Roman L., Hao Yin, Anja Zeigerer, Hidenori Nonaka, Vera M. Ruda, Marino Zerial, Daniel G. Anderson, and Victor Koteliansky. 2014. “Nanoparticle-Formulated siRNA

- Targeting Integrins Inhibits Hepatocellular Carcinoma Progression in Mice.” *Nature Communications* 5 (May): 3869.
- Boocock, Daniel, Naoya Hino, Natalia Ruzickova, Tsuyoshi Hirashima, and Edouard Hannezo. n.d. “Theory of Mechano-Chemical Patterning and Optimal Migration in Cell Monolayers.” <https://doi.org/10.1101/2020.05.15.096479>.
- Bouras, N., M. A. Madjoubi, M. Kolli, S. Benterki, and M. Hamidouche. 2009. “Thermal and Mechanical Characterization of Borosilicate Glass.” *Physics Procedia*. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2009.11.074>.
- Buckley, Craig D., Jiongyi Tan, Karen L. Anderson, Dorit Hanein, Niels Volkmann, William I. Weis, W. James Nelson, and Alexander R. Dunn. 2014. “Cell Adhesion. The Minimal Cadherin-Catenin Complex Binds to Actin Filaments under Force.” *Science* 346 (6209): 1254211.
- Butler, Peter J. 2016. “Mechanotransduction of Shear Stress by the Endothelium.” *Vascular Engineering*. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54801-0_9.
- Buxboim, Amnon, Karthikan Rajagopal, Andre’ E. X. Brown, and Dennis E. Discher. 2010. “How Deeply Cells Feel: Methods for Thin Gels.” *Journal of Physics. Condensed Matter: An Institute of Physics Journal* 22 (19): 194116.
- Callister, William D., Jr., and David G. Rethwisch. 2012. *Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach*. John Wiley & Sons.
- Calvo, Fernando, Nil Ege, Araceli Grande-Garcia, Steven Hooper, Robert P. Jenkins, Shahid I. Chaudhry, Kevin Harrington, et al. 2013. “Mechanotransduction and YAP-Dependent Matrix Remodelling Is Required for the Generation and Maintenance of Cancer-Associated Fibroblasts.” *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>.
- Chen, Julia C., Alesha B. Castillo, and Christopher R. Jacobs. 2013. “Cellular and Molecular Mechanotransduction in Bone.” *Osteoporosis*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415853-5.00020-0>.
- Chen, Lina, Casey Yan, and Zijian Zheng. 2018. “Functional Polymer Surfaces for Controlling Cell Behaviors.” *Materials Today*. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002>.
- Chien, S., S. Li, and Y. J. Shyy. 1998. “Effects of Mechanical Forces on Signal Transduction and Gene Expression in Endothelial Cells.” *Hypertension* 31 (1 Pt 2): 162–69.
- Chlasta, Julien, Pascale Milani, Gaël Runel, Jean-Luc Duteyrat, Leticia Arias, Laurie-Anne Lamiré, Arezki Boudaoud, and Muriel Grammont. 2017. “Variations in Basement Membrane Mechanics Are Linked to Epithelial Morphogenesis.” *Development* 144 (23): 4350–62.
- Costa Martínez, Elisa, Jose Carlos Rodríguez Hernández, Margarida Machado, João F. Mano, Jose Luis Gómez Ribelles, Manuel Monleón Pradas, and Manuel Salmerón Sánchez. 2008. “Human Chondrocyte Morphology, Its Dedifferentiation, and Fibronectin Conformation on Different PLLA Microtopographies.” *Tissue Engineering. Part A* 14 (10): 1751–62.
- David, Valentin, Aline Martin, Marie-Hélène Lafage-Proust, Luc Malaval, Sylvie Peyroche, David B. Jones, Laurence Vico, and Alain Guignandon. 2007. “Mechanical Loading down-Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Bone Marrow Stromal Cells and Favors Osteoblastogenesis at the Expense of Adipogenesis.” *Endocrinology* 148 (5): 2553–62.
- Davies, Peter F. 2009. “Hemodynamic Shear Stress and the Endothelium in Cardiovascular Pathophysiology.” *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1397>.
- Davies, P. F., C. F. Dewey Jr, S. R. Bussolari, E. J. Gordon, and M. A. Gimbrone Jr. 1984. “Influence of Hemodynamic Forces on Vascular Endothelial Function. In Vitro Studies of Shear Stress and Pinocytosis in Bovine Aortic Cells.” *The Journal of Clinical Investigation* 73 (4): 1121–29.
- Degos, Francoise, Paul Perez, Bruno Roche, Amel Mahmoudi, Julien Asselineau, Hélène Voitot, Pierre Bedossa, and FIBROSTIC study group. 2010. “Diagnostic Accuracy of FibroScan and

- Comparison to Liver Fibrosis Biomarkers in Chronic Viral Hepatitis: A Multicenter Prospective Study (the FIBROSTIC Study)." *Journal of Hepatology* 53 (6): 1013–21.
- De, Rumi, Assaf Zemel, and Samuel A. Safran. 2010. "Theoretical Concepts and Models of Cellular Mechanosensing." *Methods in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(10\)98007-2](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(10)98007-2).
- Desai, Seema S., Jason C. Tung, Vivian X. Zhou, James P. Grenert, Yann Malato, Milad Rezvani, Regina Español-Suñer, Holger Willenbring, Valerie M. Weaver, and Tammy T. Chang. 2016. "Physiological Ranges of Matrix Rigidity Modulate Primary Mouse Hepatocyte Function in Part through Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha." *Hepatology* 64 (1): 261–75.
- Dharmarajan, Anirudh, Michael Floren, Lewis Cox, Yifu Ding, Richard Johnson, and Wei Tan. 2018. "Mechanochemical Effects on Extracellular Signal-Regulated Kinase Dynamics in Stem Cell Differentiation." *Tissue Engineering. Part A* 24 (15-16): 1179–89.
- DuFort, Christopher C., Matthew J. Paszek, and Valerie M. Weaver. 2011. "Balancing Forces: Architectural Control of Mechanotransduction." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (5): 308–19.
- Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giullitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. "Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.
- Efimenko, Kirill, William E. Wallace, and Jan Genzer. 2002. "Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl Siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment." *Journal of Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8594>.
- Engler, Adam J., Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. 2006. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126 (4): 677–89.
- Escutia-Guadarrama, Lidia, Genaro Vázquez-Victorio, David Martínez-Pastor, Brenda Nieto-Rivera, Marcela Sosa-Garrocho, Marina Macías-Silva, and Mathieu Hautefeuille. 2017. "Fabrication of Low-Cost Micropatterned Polydimethyl-Siloxane Scaffolds to Organise Cells in a Variety of Two-Dimensional Biomimetic Arrangements for Lab-on-Chip Culture Platforms." *Journal of Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1177/2041731417741505>.
- Eyckmans, Jeroen, Thomas Boudou, Xiang Yu, and Christopher S. Chen. 2011. "A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology." *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.015>.
- Eyckmans, Jeroen, and Christopher S. Chen. 2014. "Stem Cell Differentiation: Sticky Mechanical Memory." *Nature Materials*.
- Fassett, John, Diane Tobolt, and Linda K. Hansen. 2006. "Type I Collagen Structure Regulates Cell Morphology and EGF Signaling in Primary Rat Hepatocytes through cAMP-Dependent Protein Kinase A." *Molecular Biology of the Cell* 17 (1): 345–56.
- Finer, Jeffrey T., Robert M. Simmons, and James A. Spudich. 1994. "Single Myosin Molecule Mechanics: Piconewton Forces and Nanometre Steps." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/368113a0>.
- Fletcher, Daniel A., and R. Dyche Mullins. 2010. "Cell Mechanics and the Cytoskeleton." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
- Franke, R. P., M. Gräfe, H. Schnittler, D. Seiffge, C. Mittermayer, and D. Drenckhahn. 1984. "Induction of Human Vascular Endothelial Stress Fibres by Fluid Shear Stress." *Nature* 307 (5952): 648–49.
- Freed, L. E., G. Vunjak-Novakovic, and R. Langer. 1993. "Cultivation of Cell-Polymer Cartilage Implants in Bioreactors." *Journal of Cellular Biochemistry* 51 (3): 257–64.
- Friedman, S. L., F. J. Roll, J. Boyles, D. M. Arenson, and D. M. Bissell. 1989. "Maintenance of Differentiated Phenotype of Cultured Rat Hepatic Lipocytes by Basement Membrane Matrix." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (18): 10756–62.
- Friedrich-Rust, Mireen, Mei-Fang Ong, Swantje Martens, Christoph Sarrazin, Joerg Bojunga, Stefan Zeuzem, and Eva Herrmann. 2008. "Performance of Transient Elastography for the Staging of Liver Fibrosis: A Meta-Analysis." *Gastroenterology* 134 (4): 960–74.

- Fukazawa, Kyoko, Aiko Nakao, Mizuo Maeda, and Kazuhiko Ishihara. 2016. "Photoreactive Initiator for Surface-Initiated ATRP on Versatile Polymeric Substrates." *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (38): 24994–98.
- Fu, Ywu-Jang, Hsuan-Zhi Qui, Kuo-Sung Liao, Shingjiang Jessie Lue, Chien-Chieh Hu, Kueir-Rarn Lee, and Juin-Yih Lai. 2010. "Effect of UV-Ozone Treatment on Poly(dimethylsiloxane) Membranes: Surface Characterization and Gas Separation Performance." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 26 (6): 4392–99.
- Gardel, Margaret L., Karen E. Kasza, Clifford P. Brangwynne, Jiayu Liu, and David A. Weitz. 2008. "Chapter 19 Mechanical Response of Cytoskeletal Networks." *Methods in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00619-5](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00619-5).
- Garnica-Palafox, I. M., F. M. Sánchez-Arévalo, C. Velasquillo, Z. Y. García-Carvajal, J. García-López, C. Ortega-Sánchez, C. Ibarra, G. Luna-Bárceñas, and L. Solís-Arrieta. 2014. "Mechanical and Structural Response of a Hybrid Hydrogel Based on Chitosan and Poly(vinyl Alcohol) Cross-Linked with Epichlorohydrin for Potential Use in Tissue Engineering." *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 25 (1): 32–50.
- Garvin, Joanne, Jie Qi, Melissa Maloney, and Albert J. Banes. 2003. "Novel System for Engineering Bioartificial Tendons and Application of Mechanical Load." *Tissue Engineering* 9 (5): 967–79.
- Gayer, Christopher P., and Marc D. Basson. 2009. "The Effects of Mechanical Forces on Intestinal Physiology and Pathology." *Cellular Signalling* 21 (8): 1237–44.
- Gjorevski, Nikolce, Norman Sachs, Andrea Manfrin, Sonja Giger, Maíia E. Bragina, Paloma Ordóñez-Morán, Hans Clevers, and Matthias P. Lutolf. 2016. "Designer Matrices for Intestinal Stem Cell and Organoid Culture." *Nature* 539 (7630): 560–64.
- Godoy, Patricio, Jan G. Hengstler, Iryna Ilkavets, Christoph Meyer, Anastasia Bachmann, Alexandra Müller, Gregor Tuschl, Stefan O. Mueller, and Steven Dooley. 2009. "Extracellular Matrix Modulates Sensitivity of Hepatocytes to Fibroblastoid Dedifferentiation and Transforming Growth Factor Beta-Induced Apoptosis." *Hepatology* 49 (6): 2031–43.
- Guvendiren, Murat, Maryna Perepelyuk, Rebecca G. Wells, and Jason A. Burdick. 2014. "Hydrogels with Differential and Patterned Mechanics to Study Stiffness-Mediated Myofibroblastic Differentiation of Hepatic Stellate Cells." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 38 (October): 198–208.
- Guz, Nataliia, Maxim Dokukin, Vivekanand Kalaparathi, and Igor Sokolov. 2014. "If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments." *Biophysical Journal* 107 (3): 564–75.
- Haj, A. J. el, S. L. Minter, S. C. Rawlinson, R. Suswillo, and L. E. Lanyon. 1990. "Cellular Responses to Mechanical Loading in Vitro." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 5 (9): 923–32.
- Hallab, N. J., K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses, and J. J. Jacobs. 2001. "Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion." *Tissue Engineering* 7 (1): 55–71.
- Harris, A. K., D. Stopak, and P. Wild. 1981. "Fibroblast Traction as a Mechanism for Collagen Morphogenesis." *Nature* 290 (5803): 249–51.
- Haudenschild, C. C., J. Grunwald, and A. V. Chobanian. 1985. "Effects of Hypertension on Migration and Proliferation of Smooth Muscle in Culture." *Hypertension* 7 (3 Pt 2): I101–4.
- Hino, Naoya, Leone Rossetti, Ariadna Marín-Llauradó, Kazuhiro Aoki, Xavier Trepát, Michiyuki Matsuda, and Tsuyoshi Hirashima. 2020. "ERK-Mediated Mechanochemical Waves Direct Collective Cell Polarization." *Developmental Cell* 53 (6): 646–60.
- Hinz, Boris. 2010. "The Myofibroblast: Paradigm for a Mechanically Active Cell." *Journal of Biomechanics* 43 (1): 146–55.
- Huh, Dongeun Dan. 2015. "A Human Breathing Lung-on-a-Chip." *Annals of the American Thoracic Society* 12 Suppl 1 (March): S42–44.

- Ingber, Donald E., Ning Wang, and Dimitrije Stamenovic. 2014. "Tensegrity, Cellular Biophysics, and the Mechanics of Living Systems." *Reports on Progress in Physics* 77 (4): 046603.
- Inoue, Yuuki, Tomoaki Nakanishi, and Kazuhiko Ishihara. 2013. "Elastic Repulsion from Polymer Brush Layers Exhibiting High Protein Repellency." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 29 (34): 10752–58.
- Iskratsch, Thomas, Haguy Wolfenson, and Michael P. Sheetz. 2014. "Appreciating Force and Shape — the Rise of Mechanotransduction in Cell Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3903>.
- Jabaji, Ziyad, Garrett J. Brinkley, Hassan A. Khalil, Connie M. Sears, Nan Ye Lei, Michael Lewis, Matthias Stelzner, Martín G. Martín, and James C. Y. Dunn. 2014. "Type I Collagen as an Extracellular Matrix for the in Vitro Growth of Human Small Intestinal Epithelium." *PLoS One* 9 (9): e107814.
- Janmey, P. A., and R. T. Miller. 2011. "Mechanisms of Mechanical Signaling in Development and Disease." *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.071001>.
- Johnson, K. L., and Kenneth Langstreth Johnson. 1987. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press.
- Khalili, Amelia Ahmad, and Mohd Ridzuan Ahmad. 2015. "A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8): 18149–84.
- Killaars, Anouk R., Joseph C. Grim, Cierra J. Walker, Ella A. Hushka, Tobin E. Brown, and Kristi S. Anseth. 2019. "Extended Exposure to Stiff Microenvironments Leads to Persistent Chromatin Remodeling in Human Mesenchymal Stem Cells." *Advancement of Science* 6 (3): 1801483.
- Kim, Moon Young, Soon Koo Baik, and Samuel S. Lee. 2010. "Hemodynamic Alterations in Cirrhosis and Portal Hypertension." *The Korean Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.3350/kjhep.2010.16.4.347>.
- Kim, Wantae, Yong Suk Cho, Xiaohui Wang, Ogyi Park, Xueyan Ma, Hanjun Kim, Wenjian Gan, et al. 2019. "Hippo Signaling Is Intrinsically Regulated during Cell Cycle Progression by APC/C." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (19): 9423–32.
- King, Talmadge E., Jr, Annie Pardo, and Moisés Selman. 2011. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *The Lancet* 378 (9807): 1949–61.
- Kleinman, Hynda K., and George R. Martin. 2005. "Matrigel: Basement Membrane Matrix with Biological Activity." *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
- Ladoux, Benoit, and René-Marc Mège. 2017. "Mechanobiology of Collective Cell Behaviours." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.98>.
- Langer, R., and J. P. Vacanti. 1993. "Tissue Engineering." *Science* 260 (5110): 920–26.
- Lee, Soo Young, Han Joon Kim, and Dongho Choi. 2015. "Cell Sources, Liver Support Systems and Liver Tissue Engineering: Alternatives to Liver Transplantation." *International Journal of Stem Cells* 8 (1): 36–47.
- Li, Bin, Jianxin Chen, and James H-C Wang. 2006. "RGD Peptide-Conjugated Poly(dimethylsiloxane) Promotes Adhesion, Proliferation, and Collagen Secretion of Human Fibroblasts." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 79 (4): 989–98.
- Li, Chen Xi, Nilesh P. Talele, Stellar Boo, Anne Koehler, Ericka Knee-Walden, Jenna L. Balestrini, Pam Speight, Andras Kapus, and Boris Hinz. 2017. "MicroRNA-21 Preserves the Fibrotic Mechanical Memory of Mesenchymal Stem Cells." *Nature Materials* 16 (3): 379–89.
- Lim, Jung Yul, Michael C. Shaughnessy, Zhiyi Zhou, Hyeran Noh, Erwin A. Vogler, and Henry J. Donahue. 2008. "Surface Energy Effects on Osteoblast Spatial Growth and Mineralization." *Biomaterials* 29 (12): 1776–84.

- Liu, Fei, and Daniel J. Tschumperlin. 2011. "Micro-Mechanical Characterization of Lung Tissue Using Atomic Force Microscopy." *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/2911>.
- Liu, Jing, Youhua Tan, Huafeng Zhang, Yi Zhang, Pingwei Xu, Junwei Chen, Yeh-Chuin Poh, Ke Tang, Ning Wang, and Bo Huang. 2012. "Soft Fibrin Gels Promote Selection and Growth of Tumorigenic Cells." *Nature Materials* 11 (8): 734–41.
- Liu, Xueli, and Shutao Wang. 2014. "Three-Dimensional Nano-Biointerface as a New Platform for Guiding Cell Fate." *Chemical Society Reviews* 43 (8): 2385–2401.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, and Matthew P. Scott. 2016. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- MacQueen, Luke, Yu Sun, and Craig A. Simmons. 2013. "Mesenchymal Stem Cell Mechanobiology and Emerging Experimental Platforms." *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 10 (84): 20130179.
- Ma, Kun, Javier Rivera, George J. Hirasaki, and Sibani Lisa Biswal. 2011. "Wettability Control and Patterning of PDMS Using UV-Ozone and Water Immersion." *Journal of Colloid and Interface Science* 363 (1): 371–78.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, and D. E. Ingber. 1997. "Demonstration of Mechanical Connections between Integrins, Cytoskeletal Filaments, and Nucleoplasm That Stabilize Nuclear Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (3): 849–54.
- Martinac, Boris, Yoshiro Saimi, and Ching Kung. 2008. "Ion Channels in Microbes." *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2008>.
- Masters, Thomas A., Bruno Pontes, Virgile Viasnoff, You Li, and Nils C. Gauthier. 2013. "Plasma Membrane Tension Orchestrates Membrane Trafficking, Cytoskeletal Remodeling, and Biochemical Signaling during Phagocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29): 11875–80.
- Mata, Alvaro, Aaron J. Fleischman, and Shuvo Roy. 2005. "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/nanosystems." *Biomedical Microdevices* 7 (4): 281–93.
- Mata, Alvaro, Eun Jung Kim, Cynthia A. Boehm, Aaron J. Fleischman, George F. Muschler, and Shuvo Roy. 2009. "A Three-Dimensional Scaffold with Precise Micro-Architecture and Surface Micro-Textures." *Biomaterials* 30 (27): 4610–17.
- Matsubayashi, Yutaka, Miki Ebisuya, Sakiko Honjoh, and Eisuke Nishida. 2004. "ERK Activation Propagates in Epithelial Cell Sheets and Regulates Their Migration during Wound Healing." *Current Biology: CB* 14 (8): 731–35.
- McBeath, Rowena, Dana M. Pirone, Celeste M. Nelson, Kiran Bhadriraju, and Christopher S. Chen. 2004. "Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment." *Developmental Cell* 6 (4): 483–95.
- Molnar, G., N. A. Schroedl, S. R. Gonda, and C. R. Hartzell. 1997. "Skeletal Muscle Satellite Cells Cultured in Simulated Microgravity." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 33 (5): 386–91.
- Moreno-Layseca, Paulina, and Charles H. Streuli. 2014. "Signalling Pathways Linking Integrins with Cell Cycle Progression." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 34 (February): 144–53.
- Nasrollahi, Samila, Christopher Walter, Andrew J. Loza, Gregory V. Schimizzi, Gregory D. Longmore, and Amit Pathak. 2017. "Past Matrix Stiffness Primes Epithelial Cells and Regulates Their Future Collective Migration through a Mechanical Memory." *Biomaterials* 146 (November): 146–55.
- Navajas, D., G. N. Maksym, and J. H. Bates. 1995. "Dynamic Viscoelastic Nonlinearity of Lung Parenchymal Tissue." *Journal of Applied Physiology* 79 (1): 348–56.

- Nguyen, Anh Tuan, Sharvari R. Sathe, and Evelyn K. F. Yim. 2016. "From Nano to Micro: Topographical Scale and Its Impact on Cell Adhesion, Morphology and Contact Guidance." *Journal of Physics. Condensed Matter: An Institute of Physics Journal* 28 (18): 183001.
- Noble, Ferdinand le, Delphine Moyon, Luc Pardanaud, Li Yuan, Valentin Djonov, Robert Matthijssen, Christiane Bréant, Vincent Fleury, and Anne Eichmann. 2004. "Flow Regulates Arterial-Venous Differentiation in the Chick Embryo Yolk Sac." *Development* 131 (2): 361–75.
- O'Brien, F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas, and L. J. Gibson. 2005. "The Effect of Pore Size on Cell Adhesion in Collagen-GAG Scaffolds." *Biomaterials* 26 (4): 433–41.
- Ogden, R. W. 1973. "Large Deformation Isotropic Elasticity—On the Correlation of Theory and Experiment for Incompressible Rubberlike Solids." *Rubber Chemistry and Technology*. <https://doi.org/10.5254/1.3542910>.
- Oliveira, Sara M., Wenlong Song, Natália M. Alves, and João F. Mano. 2011. "Chemical Modification of Bioinspired Superhydrophobic Polystyrene Surfaces to Control Cell Attachment/proliferation." *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/c1sm05943b>.
- Olsen, Abby L., Steven A. Bloomer, Erick P. Chan, Marianna D. A. Gaça, Penelope C. Georges, Bridget Sackey, Masayuki Uemura, Paul A. Janmey, and Rebecca G. Wells. 2011. "Hepatic Stellate Cells Require a Stiff Environment for Myofibroblastic Differentiation." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (1): G110–18.
- Ouyang, Jun, Ming Chen, Wen-Jing Bao, Qian-Wen Zhang, Kang Wang, and Xing-Hua Xia. 2015. "Morphology Controlled Poly(aminophenylboronic Acid) Nanostructures as Smart Substrates for Enhanced Capture and Release of Circulating Tumor Cells." *Advanced Functional Materials*. <https://doi.org/10.1002/adfm.201502420>.
- Özçam, A. Evren, A. Evren Özçam, Kirill Efimenko, and Jan Genzer. 2014. "Effect of Ultraviolet/ozone Treatment on the Surface and Bulk Properties of Poly(dimethyl Siloxane) and Poly(vinylmethyl Siloxane) Networks." *Polymer*. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.05.027>.
- Palchesko, Rachelle N., Ling Zhang, Yan Sun, and Adam W. Feinberg. 2012. "Development of Polydimethylsiloxane Substrates with Tunable Elastic Modulus to Study Cell Mechanobiology in Muscle and Nerve." *PloS One* 7 (12): e51499.
- Paluch, Ewa K., Celeste M. Nelson, Nicolas Biais, Ben Fabry, Jens Moeller, Beth L. Pruitt, Carina Wollnik, Galina Kudryasheva, Florian Rehfeldt, and Walter Federle. 2015. "Mechanotransduction: Use the Force(s)." *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0150-4>.
- Pardo, Annie, and Moisés Selman. 2016. "Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Annals of the American Thoracic Society*. <https://doi.org/10.1513/annalsats.201605-341aw>.
- Park, Joong Yull, Sung Ju Yoo, Eun-Joong Lee, Dae Ho Lee, Ji Young Kim, and Sang-Hoon Lee. 2010. "Increased Poly(dimethylsiloxane) Stiffness Improves Viability and Morphology of Mouse Fibroblast Cells." *Biochip Journal* 4 (3): 230–36.
- Pelham, R. J., Jr, and Y. I. Wang. 1997. "Cell Locomotion and Focal Adhesions Are Regulated by Substrate Flexibility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 13661–65.
- . 1999. "High Resolution Detection of Mechanical Forces Exerted by Locomoting Fibroblasts on the Substrate." *Molecular Biology of the Cell* 10 (4): 935–45.
- Pelissier, Fanny A., James C. Garbe, Badriprasad Ananthanarayanan, Masaru Miyano, Chunhan Lin, Tiina Jokela, Sanjay Kumar, Martha R. Stampfer, James B. Lorens, and Mark A. LaBarge. 2014. "Age-Related Dysfunction in Mechanotransduction Impairs Differentiation of Human Mammary Epithelial Progenitors." *Cell Reports* 7 (6): 1926–39.
- Pellegrin, S., and H. Mellor. 2007. "Actin Stress Fibres." *Journal of Cell Science*.


- <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>.
- Piccolo, Stefano, Sirio Dupont, and Michelangelo Cordenonsi. 2014. "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and beyond." *Physiological Reviews* 94 (4): 1287–1312.
- Pinese, Coline, Said Jebors, Pierre Emmanuel Stoebner, Vincent Humblot, Pascal Verdié, Léa Causse, Xavier Garric, et al. 2017. "Bioactive Peptides Grafted Silicone Dressings: A Simple and Specific Method." *Materials Today Chemistry* 4 (June): 73–83.
- Polacheck, William J., and Christopher S. Chen. 2016. "Measuring Cell-Generated Forces: A Guide to the Available Tools." *Nature Methods* 13 (5): 415–23.
- Polio, Samuel R., Suzanne E. Stasiak, Ryan R. Jamieson, Jenna L. Balestrini, Ramaswamy Krishnan, and Harikrishnan Parameswaran. 2019. "Extracellular Matrix Stiffness Regulates Human Airway Smooth Muscle Contraction by Altering the Cell-Cell Coupling." *Scientific Reports* 9 (1): 9564.
- Ponsonnet, L., K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, and C. Martelet. 2003. "Relationship between Surface Properties (roughness, Wettability) of Titanium and Titanium Alloys and Cell Behaviour." *Materials Science and Engineering: C* 23 (4): 551–60.
- Prager-Khoutorsky, Masha, Alexandra Lichtenstein, Ramaswamy Krishnan, Kavitha Rajendran, Avi Mayo, Zvi Kam, Benjamin Geiger, and Alexander D. Bershadsky. 2011. "Fibroblast Polarization Is a Matrix-Rigidity-Dependent Process Controlled by Focal Adhesion Mechanosensing." *Nature Cell Biology* 13 (12): 1457–65.
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri, and P. J. Keely. 2009. "Matrix Density-Induced Mechanoregulation of Breast Cell Phenotype, Signaling and Gene Expression through a FAK-ERK Linkage." *Oncogene* 28 (49): 4326–43.
- Purkayastha, Purboja, Kavya Pendyala, Ayush S. Saxena, Hesamedin Hakimjavadi, Srikar Chamala, Charles F. Baer, and Tanmay P. Lele. n.d. "Natural Selection Imposed by Mechanical Properties of a Biomaterial Results in Novel Cellular Phenotypes." <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.061911>.
- Qin, Dong, Younan Xia, and George M. Whitesides. 2010. "Soft Lithography for Micro- and Nanoscale Patterning." *Nature Protocols* 5 (3): 491–502.
- Raab-Cullen, D. M., M. A. Thiede, D. N. Petersen, D. B. Kimmel, and R. R. Recker. 1994. "Mechanical Loading Stimulates Rapid Changes in Periosteal Gene Expression." *Calcified Tissue International* 55 (6): 473–78.
- Reffay, M., M. C. Parrini, O. Cochet-Escartin, B. Ladoux, A. Buguin, S. Coscoy, F. Amblard, J. Camonis, and P. Silberzan. 2014. "Interplay of RhoA and Mechanical Forces in Collective Cell Migration Driven by Leader Cells." *Nature Cell Biology* 16 (3): 217–23.
- Roure, Olivia du, Alexandre Saez, Axel Buguin, Robert H. Austin, Philippe Chavrier, Pascal Silberzan, and Benoit Ladoux. 2005. "Force Mapping in Epithelial Cell Migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (7): 2390–95.
- Sabass, Benedikt, Margaret L. Gardel, Clare M. Waterman, and Ulrich S. Schwarz. 2008. "High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances." *Biophysical Journal* 94 (1): 207–20.
- Saums, Michele K., Weifeng Wang, Biao Han, Lakshmi Madhavan, Lin Han, Daeyeon Lee, and Rebecca G. Wells. 2014. "Mechanically and Chemically Tunable Cell Culture System for Studying the Myofibroblast Phenotype." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 30 (19): 5481–87.
- Schoen, Ingmar, Beth L. Pruitt, and Viola Vogel. 2013. "The Yin-Yang of Rigidity Sensing: How Forces and Mechanical Properties Regulate the Cellular Response to Materials." *Annual Review of Materials Research*. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-062910-100407>.
- Schrader, Jörg, Timothy T. Gordon-Walker, Rebecca L. Aucott, Mariëlle van Deemter, Alexander Quaas, Shaun Walsh, Daniel Benten, Stuart J. Forbes, Rebecca G. Wells, and John P. Iredale.

2011. "Matrix Stiffness Modulates Proliferation, Chemotherapeutic Response, and Dormancy in Hepatocellular Carcinoma Cells." *Hepatology* 53 (4): 1192–1205.
- Shi, Zhong-Dong, and John M. Tarbell. 2011. "Fluid Flow Mechanotransduction in Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts." *Annals of Biomedical Engineering* 39 (6): 1608–19.
- Sumpio, B. E., A. J. Banes, L. G. Levin, and G. Johnson Jr. 1987. "Mechanical Stress Stimulates Aortic Endothelial Cells to Proliferate." *Journal of Vascular Surgery* 6 (3): 252–56.
- Swift, Joe, Irena L. Ivanovska, Amnon Buxboim, Takamasa Harada, P. C. Dave P. Dingal, Joel Pinter, J. David Pajeroski, et al. 2013. "Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation." *Science* 341 (6149): 1240104.
- Tan, Jinzhu, Y. J. Chao, Xiaodong Li, and J. W. Van Zee. 2009. "Microindentation Test for Assessing the Mechanical Properties of Silicone Rubber Exposed to a Simulated Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell Environment." *Journal of Fuel Cell Science and Technology*. <https://doi.org/10.1115/1.3008030>.
- Tan, John L., Joe Tien, Dana M. Pirone, Darren S. Gray, Kiran Bhadriraju, and Christopher S. Chen. 2003. "Cells Lying on a Bed of Microneedles: An Approach to Isolate Mechanical Force." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (4): 1484–89.
- Thomas, Gawain, Nancy A. Burnham, Terri Anne Camesano, and Qi Wen. 2013. "Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 76 (June). <https://doi.org/10.3791/50497>.
- Tse, Justin R., and Adam J. Engler. 2010. "Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties." *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]* Chapter 10 (June): Unit 10.16.
- Tzima, Eleni, Mohamed Irani-Tehrani, William B. Kiosses, Elizabetta Dejana, David A. Schultz, Britta Engelhardt, Gaoyuan Cao, Horace DeLisser, and Martin Alexander Schwartz. 2005. "A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress." *Nature* 437 (7057): 426–31.
- Ursekar, Chaitanya Prashant, Soo-Kng Teo, Hiroaki Hirata, Ichiro Harada, Keng-Hwee Chiam, and Yasuhiro Sawada. 2014. "Design and Construction of an Equibiaxial Cell Stretching System That Is Improved for Biochemical Analysis." *PloS One* 9 (3): e90665.
- Verstreken, C. M., C. Labouesse, C. C. Agley, and K. J. Chalut. 2019. "Embryonic Stem Cells Become Mechanoresponsive upon Exit from Ground State of Pluripotency." *Open Biology* 9 (1): 180203.
- Wang, Hong-Bei, Micah Dembo, and Yu-Li Wang. 2000. "Substrate Flexibility Regulates Growth and Apoptosis of Normal but Not Transformed Cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.5.c1345>.
- Wang, Peng-Yuan, Wei-Bor Tsai, and Nicolas H. Voelcker. 2012. "Screening of Rat Mesenchymal Stem Cell Behaviour on Polydimethylsiloxane Stiffness Gradients." *Acta Biomaterialia* 8 (2): 519–30.
- Wechezak, A. R., T. N. Wight, R. F. Viggers, and L. R. Sauvage. 1989. "Endothelial Adherence under Shear Stress Is Dependent upon Microfilament Reorganization." *Journal of Cellular Physiology* 139 (1): 136–46.
- Wells, Rebecca G. 2008. "The Role of Matrix Stiffness in Regulating Cell Behavior." *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.22193>.
- . 2013. "Tissue Mechanics and Fibrosis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.007>.
- Winer, Jessamine P., Paul A. Janmey, Margaret E. McCormick, and Makoto Funaki. 2009. "Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Become Quiescent on Soft Substrates but Remain Responsive to Chemical or Mechanical Stimuli." *Tissue Engineering Part A*. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0388>.

- Worzakowska, Marta. 2015. "Thermal and Mechanical Properties of Polystyrene Modified with Esters Derivatives of 3-Phenylprop-2-En-1-Ol." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 121 (1): 235–43.
- Xu, F. J., Z. H. Wang, and W. T. Yang. 2010. "Surface Functionalization of Polycaprolactone Films via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization for Covalently Coupling Cell-Adhesive Biomolecules." *Biomaterials* 31 (12): 3139–47.
- Yamawaki, Hideyuki, Shi Pan, Richard T. Lee, and Bradford C. Berk. 2005. "Fluid Shear Stress Inhibits Vascular Inflammation by Decreasing Thioredoxin-Interacting Protein in Endothelial Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (3): 733–38.
- Yang, Chun, Mark W. Tibbitt, Lena Basta, and Kristi S. Anseth. 2014. "Mechanical Memory and Dosing Influence Stem Cell Fate." *Nature Materials* 13 (6): 645–52.
- Yanguas, Sara Crespo, Bruno Cogliati, Joost Willebrords, Michaël Maes, Isabelle Colle, Bert van den Bossche, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, et al. 2016. "Experimental Models of Liver Fibrosis." *Archives of Toxicology* 90 (5): 1025–48.
- Young, Alistair, and Clare-Ellen McNaught. 2011. "The Physiology of Wound Healing." *Surgery (Oxford)*. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.011>.
- Yuan, Shaojun, Gordon Xiong, Ariel Roguin, and Cleo Choong. 2012. "Immobilization of Gelatin onto Poly(glycidyl Methacrylate)-Grafted Polycaprolactone Substrates for Improved Cell-Material Interactions." *Biointerphases* 7 (1-4): 30.
- Zheng, Wenfu, Wei Zhang, and Xingyu Jiang. 2013. "Precise Control of Cell Adhesion by Combination of Surface Chemistry and Soft Lithography." *Advanced Healthcare Materials* 2 (1): 95–108.



Hepatic C9 cells switch their behaviour in short or long exposure to soft substrates

Lucia Cabriales*†, Mathieu Hautefeuille*†¹ , Genaro Vázquez-Victorio*†, David Martínez-Pastor*‡, Jorge Carretero-Ortega*, Alejandra Jiménez-Escobar* and Marina Macias-Silva*‡

*LaNSBioDyT, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Ciudad de México CP 04510, México, †Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Ciudad de México CP 04510, México, and ‡Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Ciudad de México CP 04510, México

Background Information. There have been several studies to understand the influence of stiffness of the culture substrates for different types of adherent cells. It is generally accepted that cell proliferation, spreading and focal adhesions increase with higher matrix stiffness. However, what remains unclear is whether this kind of cell behaviour may be reverted by culturing on soft substrates those cell lines that were originally selected or primed on stiff surfaces.

Results. Here, we studied the influence of substrate softness on proliferation, adhesion and morphology of the highly proliferative hepatic C9 cell line. We cultured C9 cells on soft and stiff polydimethylsiloxane (PDMS) substrates prepared with two different elastic moduli in the range of 10 and 200 kPa, respectively. Lower cell proliferation was observed on substrates with lower stiffness without affecting cell viability. The proliferation rate of C9 cell line along with extracellular growth-regulated kinase (ERK) phosphorylation was decreased on soft PDMS. Despite this cell line has been described as a hepatic epithelial cell, our characterisation demonstrated that the origin of C9 cells is uncertain, although clearly epithelial, with the expression of markers of several hepatic cells. Surprisingly, consecutive passages of C9 cells on soft PDMS did not alter this mesenchymal phenotype, vimentin expression did not decrease when culturing cells in soft substrates, even though the ERK phosphorylation levels eventually were increased after several passages on soft PDMS, triggering again an increase of cell proliferation.

Conclusions and Significance. This study shows that the exposure of C9 cells to soft substrates promoted a decrease of cell proliferation rate, as reported for other types of cells on PDMS, whereas a much longer term exposure caused cells to adapt to softness after trained for several passages, reactivating proliferation. During this phenomenon, the morphology and phenotype of trained cells was modified accompanying the increase of cell proliferation rate contrary to the effect observed in short periods of cell culture. In contrast to previous reports, cell death was not observed during these experiments, discarding a cell selection mechanism and suggesting soft cell adaptation may be limited in time in C9 cells.



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

¹To whom correspondence should be addressed (email: mathieu_h@ciencias.unam.mx)

Key words: C9 hepatic cell line, MAPK signalling, Polydimethylsiloxane, Proliferation regulation, Substrate stiffness.

Abbreviations: CTCF, corrected total cell fluorescence; ECM, extracellular matrix; ERK, extracellular growth-regulated kinase; PDMS, polydimethylsiloxane;

Introduction

Cells are highly sensitive to geometric and mechanical constraints as they might be confined by other

PS, polystyrene; FAK, focal adhesion kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; BrdU, bromodeoxyuridine; C9 p/15, C9 cells after 15 passages on PDMS; α -SMA, smooth muscle actin alpha; WB, Western blot.