



Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales
Facultad de Ciencias

FABRICACIÓN CONTROLADA DE MICROAMBIENTES CELULARES
BIOMIMÉTICOS PARA ESTUDIO DE MECANOTRANSDUCCIÓN

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

M. en C. DANIEL PÉREZ CALIXTO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MATHIEU HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. JUAN HERNÁNDEZ CORDERO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

CD UNIVERSITARIA, CDMX. JUNIO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater y mi segundo hogar
Al CONACyT, por el apoyo brindado a través de la becas nacional (No. de CVU 594952) que
permitiera la realización de este trabajo

Al Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, que a través del programa de apoyo a
estudios de posgrado (PAEP), permitió la presentación de este trabajo en diversos eventos
nacionales e internacionales

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia
LaNSBioDyT, que me dio la oportunidad de realizar este trabajo de tesis

A mi director de tesis y tutor Dr Mathieu Hautefeuille, por el apoyo y paciencia brindando
durante todo este trabajo, por dejarme aprender a mi manera

A mi comité tutor Dra Annie Pardo Cemo y Dr Juan Hernández Cordero, por todo su apoyo y
por sus comentarios que me enriquecieron mucho en mi formación

A mis sinodales Dra Pilar Carreon, Dra Maina Macias, Dr Francisco Sanchez y Dr Andres
Castell, por todos sus comentarios, sugerencias y correcciones que permitieron mejorar
este trabajo de tesis

Al Dr Genaro Vazquez Victorio, por ser mi asesor e instructor técnico en la parte biológica,
por la realización de los cultivos celulares realizados en este trabajo, especialmente por todo
el apoyo, ayuda y confianza que me brindó durante toda esta jornada

A la unidad de imagenología cuantitativa de la facultad de ciencias (UNICUA) y al Fís Edgar
Adan Jimenez díaz por su apoyo en la obtención de imágenes por microscopía confocal

A la Dra Natalia Serna Marquez, por su apoyo en el sembrado y el marcaje
inmunofluorescente de los hepatocitos primarios de rata

A la M. en C. Maria Fernanda Toscano Marquez por su apoyo en el sembrado y el marcaje
inmunofluorescente de las célula de pulmón A549 y NHLF

Al Fís. Felix Emilio Ceron Vera por su apoyo en la fabricación de los moldes de acrílico para
su réplica en hidrogel

A la M en Ing. Erika Araceli Gonzalez Villa por su apoyo técnico en la automatización del
análisis de imágenes con Python

A Samuel Amat Shapiro, por la automatización del análisis de los datos de relajación.

Al programa ECOS LaNSBioDyt-LAAS por el apoyo brindado para la realización de la
estancia corta de investigación

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio μ nTec y de los laboratorios de fibrosis I y
II con los que pude intercambiar muchas ideas sobre ciencia y otros temas.

Dedicatoria

A Jehová *él Shaddai*, porque de su plenitud tomamos todos

A mis padres, Eleazar y Gilberto por todo su amor y apoyo incondicional

A mi hermana Mitzi por siempre apoyarme, por llenarme de risas y memes la vida

A Lidia por todo lo que he aprendido y compartido contigo

A Samuel, Paco y Bemjamin por tantos años de amistad

A mis amigos Daniel, Cristian y Miguel por haber compartido tantos momentos desde la
maestría

A Asha y Yoyis por ser tan sensacionales

Resumen

El microambiente celular natural es rico en señales físico-químicas, las cuales son percibidas e interpretadas por las células, estas influyen de manera directa en el comportamiento, destino y función celular. En los valores adecuados, favorecen el mantenimiento de la homeostasis en la célula y cualquier perturbación de estos parámetros da lugar a una respuesta visible como un cambio en el comportamiento celular. Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo no reproducen adecuadamente las características propias del microambiente (factores solubles, composición de la matriz extracelular, estructura geométrica y estímulos mecánicos, tanto estáticos como dinámicos), por lo que los tipos celulares cultivados en estas plataformas de cultivo tampoco reproducen el comportamiento que expresan en su microambiente natural in vivo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue: diseñar y fabricar sustratos microestructurados localmente, controlando diferentes parámetros como geometría, rigidez y conjugación superficial de proteína de matriz extracelular, para ser utilizados como plataformas heterogéneas de cultivo celular. Estos sustratos fueron diseñados a la medida del microambiente celular deseado, con la finalidad de que los tipos celulares cultivados en estas plataformas expresen características similares a las que presentan en su microambiente natural (tejido). Para ello, se desarrolló un método de fabricación de hidrogeles de poli(acrilamida), del cual, se tiene control sobre sus propiedades mecánicas, su estructura geométrica y el tipo de proteína utilizada para promover la adhesión celular. Adicionalmente, se desarrolló un método de caracterización mecánica por microindentación y relajación, con el que es posible acceder a las propiedades mecánicas (módulo de Young y módulo de relajación) no sólo de los hidrogeles fabricados, sino también de diversos tipos de materiales suaves incluyendo células y tejidos. Para validar los hidrogeles fabricados se estudió la influencia conjunta de la curvatura y el confinamiento en las células embrionarias renales de la línea AD-293, se observó que su morfología depende de la curvatura donde se encuentran. También, se exploró el comportamiento colectivo de las células de epitelio alveolar A549 estimuladas con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y se comparó con el comportamiento colectivo de los fibroblastos normales de pulmón humano (NHLF). Se encontró que el comportamiento colectivo de estos tipos celulares puede modelarse como un cristal líquido nemático que se describe por medio de la actividad de sus subcomponentes. Finalmente, para describir el comportamiento mecánico del núcleo celular se propuso un modelo híbrido - viscoelástico, que toma en cuenta las características mecánicas reportadas de los principales componentes estructurales del núcleo (la cromatina y la envoltura nuclear) y toma en cuenta la respuesta activa de la envoltura nuclear a la rigidez del sustrato y la reorganización activa de la red de filamentos que rodean al núcleo. Se halló que el modelo describe de manera adecuada la dinámica a largo plazo de los núcleos de hepatocitos primarios de rata y de las células HepG2, provenientes de un hepatocarcinoma humano. El modelo sugiere que el comportamiento mecánico del núcleo celular a largo plazo es un comportamiento irreversible y puede estar ligado a un posible proceso de envejecimiento por estrés mecánico.

Abstract

The natural cell microenvironment possesses a wide variety of physicochemical cues which are sensed and interpreted by cells, these cues directly influence cell behavior, fate and function. In the appropriate values, these signals promote cell homeostasis, but any perturbation of these parameters trigger a visible response as cell behavior modifications. However, traditional cell culture platforms do not reproduce adequately the natural characteristics of the cell microenvironment (soluble factors, extracellular matrix composition, geometry and static or dynamic mechanical stimuli) thus the cell types seeded on these culture platforms, reproduce in a poorly manner the natural behavior that it posses in its native microenvironment. Because of this, the main objective of this work was to design and manufacture microstructured substrates locally, controlling different features such as; geometry, stiffness and surface conjugation with extracellular matrix protein in order to be used as heterogeneous cell culture platforms. These substrates were tailored to the desired cellular microenvironment, so that the cell types grown on these platforms express similar characteristics to those they present in their natural microenvironment (tissue). To achieve this, a method of manufacturing polyacrylamide hydrogels was developed. This method allows us to control mechanical properties and geometry of the hydrogels, even the protein used to promote cell adhesion. Additionally, a mechanical characterization technique based on microindentation and relaxation test was developed; through this technique it is possible to access not only the mechanical properties of hydrogels (Young and relaxation moduli), but also of several types of soft materials, even cells and tissues. To validate the hydrogels manufactured protocol, the combined influence of curvature and confinement in embryonic kidney cells AD-293 were studied. It was observed that the AD-293 cell's shape is dependent on the substrate curvature. Furthermore, the collective cell behavior of A549 alveolar epithelial cells stimulated with transforming growth factor beta (TGF- β) was explored and compared with the collective behavior of normal human lung fibroblasts (NHLF). It was found that the collective behavior of these cell types can be modeled as a nematic liquid crystal, which is described by the activity of its subcomponents. Finally, to describe the mechanical behavior of the cell nucleus, a hybrid-viscoelastic model was proposed, which takes into account the reported mechanical characteristics of the main structural components of cell nucleus (chromatin and nuclear envelope) and the active response of the nuclear envelope to the substrate stiffness and the active reorganization of filaments network that surround the nucleus. The model adequately describes the long-term dynamics of rat primary hepatocyte nuclei and HepG2 cells from human hepatocarcinoma. The model suggests that the long-term mechanical behavior of the cell nucleus is irreversible and may be linked to a possible aging process due to mechanical stress.

Resumen	4
Abstract	5
Capítulo 1. Introducción	8
Mecanobiología y mecanotransducción	8
Técnicas y materiales para cultivo celular	10
Planteamiento del problema	10
Objetivo General	11
Objetivos particulares:	11
Capítulo 2. La célula y su entorno	13
Matriz extracelular	13
Estructura mecánica interna de la célula: el citoesqueleto	14
Adhesión celular	15
Capítulo 3. Fabricación y caracterización de sustratos de hidrogel para cultivo celular	18
Protocolo de fabricación de hidrogeles de poliacrilamida (PAM)	18
1. Funcionalización de cubreobjetos	19
2. Silanización de portaobjetos	21
3. Molde para réplica	21
Diseño del molde y fabricación del molde	21
4. Preparación de disoluciones de poliacrilamida de diferente rigidez	23
5. Polimerización del hidrogel	24
Método APS - TEMED:	24
Método fotoentrecruzante	25
Fabricación de un gradiente de rigidez	26
6. Estructuración geométrica de Hidrogeles	28
7. Conjugación superficial con proteínas de EMC	29
Ensayos de microindentación y relajación	31
Corrección del desplazamiento de la punta y punto de contacto	33
Influencia de la velocidad y distancia de indentación (modelos de indentación)	34
Comportamiento viscoelástico de los hidrogeles	39
Validación biológica del control de la mecánica de los hidrogeles	43
Capítulo 4. Hidrogeles de PAM como plataformas de cultivo con rigidez y estructura controladas.	45
Influencia de la curvatura y confinamiento geométrico de las células epiteliales embrionarias renales AD-293	45
Influencia conjunta de la rigidez de la ECM con el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en el fenotipo y la organización colectiva de las líneas pulmonares A549 y NHLF	49
Capítulo 5. Modelo híbrido-viscoelástico (H-VM) del núcleo celular	56
Formulación del modelo	57
Viscoelasticidad vs Hiperelasticidad	65
Deformación del núcleo celular	67

Evolución de la forma del núcleo de hepatocitos primarios	70
Evolución de la forma del núcleo de la línea celular HepG2	75
Discusión del comportamiento mecánica del núcleo celular	78
Dinámica de las propiedades mecánicas del núcleo celular	78
La deformación del núcleo no es proporcional a la rigidez del sustrato	79
La forma del núcleo guarda información de estados mecánicos previos	79
La dinámica nuclear en intervalos prolongados de tiempo revela un proceso de envejecimiento mecánico	81
Capítulo 6. Conclusiones generales	83
Referencias	85
Anexo 1. Especificaciones experimentales	96
Cultivo celular	96
Aislamiento de hepatocitos de hígado de rata	96
Condiciones de cultivo celular	96
Inmunofluorescencia	97
Adquisición de imágenes y procesamiento de imágenes	98
Análisis estadístico	98
Anexo 2. Solución y validación del H-VM	99
Representación mecánica del citoesqueleto y complejo de adherencia.	99
Programa para la segmentación y caracterización de los núcleos celulares	103
Cuantificación y análisis	104
Anexo 3. Comportamiento y modelos mecánicos de los materiales	115
Anexo 4. Código desarrollado	117
Anexo 5. Artículos publicados	117

Capítulo 1. Introducción

La mecánica, definida como la rama de la física que estudia y analiza la influencia de las fuerzas sobre el comportamiento de los cuerpos a través del tiempo (1), junto a la óptica, definida también como la rama de la física que estudia el comportamiento y las propiedades de la luz (2), han sido ampliamente utilizadas como herramientas de caracterización y prueba de los sistemas vivos tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico. De hecho, para los primeros embriólogos y biólogos celulares, los ensayos mecánicos eran la única herramienta con la que podían probar el comportamiento celular (3). A finales del siglo XIX, Wilhem His postuló por primera vez que la célula está sujeta a las leyes de la física (4), pero el descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (*DNA*, por sus siglas en inglés) en 1953 (5) trajo una nueva era a la biología celular. Puesto que la célula dejó de considerarse un material físico y fue visto como un contenedor de material genético y enzimático, por lo que la biología y la medicina modernas han sido dominadas principalmente por la genética y la bioquímica (6). Sin embargo, gracias al avance tecnológico y a la posible integración de herramientas biofísicas en modelos de estudio por grupos multidisciplinarios de investigación, se ha mostrado que las fuerzas físicas juegan un papel importante en el desarrollo, función y organización de la materia viva (7, 8). Esto dio origen a un nuevo campo de la ciencia llamado mecanobiología, que incluye también señales físicas influenciando el comportamiento celular, al igual que señales solubles (mecanotransducción). Una de sus características más importantes es que revela una nueva forma de modulación de las moléculas y establece una guía global para organizar las entidades biológicas desde las moléculas hasta las células, tejidos y órganos (9).

Mecanobiología y mecanotransducción

La mecanobiología es la ciencia que se ocupa del estudio del comportamiento y de los mecanismos de transducción de la materia viva cuando está sometida a diversos estímulos mecánicos (9). Esta ciencia multidisciplinaria ha tenido un gran auge en los últimos 30 años, ya que se ha mostrado que los sistemas celulares están fuertemente influenciados por una gran variedad de señales de origen mecánico; por ejemplo, la rigidez de la matriz extracelular (*ECM*, por sus siglas en inglés) o las deformaciones estáticas o dinámicas debidas al comportamiento colectivo y la constante reorganización de los sistemas celulares (8, 10, 11). Una de las principales ramas de la mecanobiología es la mecanotransducción, definida como la modulación de las respuestas y los destinos biológicos por fuerzas físicas (4). Esta, se produce en todos los rincones del reino biológico a través de un conjunto de mecanismos ricos y diversos, algunos de estos mecanismos son muy similares en todos los dominios de la vida, como los canales mecanosensibles que permiten que los esfuerzos mecánicos ejercidos sobre las membranas controlen el flujo de moléculas a través de éstas, con el fin de liberar presión osmótica o desencadenar ciertas vías de señalización (12, 13).

Ya sea embebida o adherida en un tejido o simplemente suspendida en un medio, la célula eucarionte está continuamente sujeta a estímulos mecánicos exo- e intra-celulares. Particularmente, las células adherentes perciben y responden constantemente a los estímulos mecánicos de su microambiente por medio de diversos mecanismos que permiten convertir los estímulos mecánicos en señales bioquímicas, proceso también

denominado mecanotransducción (8). Además, se ha mostrado que las células no solamente perciben las señales mecánicas de su microambiente, sino también, generan esfuerzos que parecen ser responsables de su organización estructural interna (14) y de la continua remodelación de su microambiente (15, 16). Este proceso de balance entre esfuerzos internos y externos comúnmente da lugar a un estado mecánico estable, originado por la constante reorganización dinámica del citoesqueleto, cuyo propósito es mantener la forma y función celular (17).

El entorno local de una célula, está definido como su microambiente celular, esté en su estado natural, es un entorno tridimensional heterogéneo, rico en señales físico-químicas, tales como: factores solubles (factores de crecimientos, hormonas, etc.), composición, densidad y organización de la ECM, estructura geometría (curvatura y arquitectura) y estímulos mecánicos tanto estáticos (rigidez de la ECM y confinamiento espacial) como dinámicos (esfuerzo cortante por paso de flujo y deformaciones periódicas) (18–20). Estas señales en los valores adecuados, *i.e.* en sus valores fisiológicos naturales, favorecen la homeostasis en la célula (21) y cualquier perturbación de estos parámetros puede desencadenar una respuesta en el comportamiento, destino y función celular (14, 18, 22). Este proceso dinámico en el cual la célula percibe, interpreta y responde a los estímulos mecánicos externos se esquematiza en la figura 1.1, donde se muestra que la célula al percibir un estímulo externo como la rigidez de la ECM, desencadena una vía de señalización, lo que lleva a una expresión de genes específicos lo que puede resultar en un cambio en el comportamiento y función celular (7). Estos procesos tienen lugar a diferentes escalas de tiempo que van desde unos cuantos milisegundos a semanas dependiendo de la duración, intensidad y el tipo de estímulo percibido por la célula. Entonces, resulta de suma relevancia el estudio y la caracterización de las señales intrínsecas del microambiente celular junto a los mecanismo por medio de los cuales la célula percibe, interpreta y responde al cambio de estas señales propias de su entorno celular.

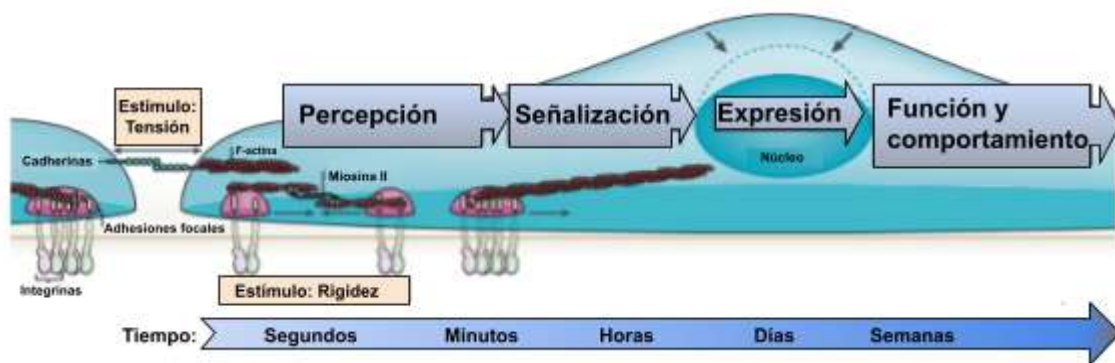


Figura 1.1 | Esquema de la percepción, interpretación y respuesta de la célula a los estímulos mecánicos externos. Primero en una escala de tiempo que ronda en los segundos los estímulos externos son percibidos por la célula mediante diversos mecanismos moleculares y dependiendo de la intensidad, duración y tipo de esta, se puede desencadenar una cascada de señales bioquímicas (señalización) que serán transmitidas al núcleo, lo que a su vez puede generar una respuesta como la expresión de ciertas proteínas funcionales que modifican el comportamiento celular. Finalmente, los intervalos de tiempo en el cual estos procesos son llevados a cabo, dependen del tipo y la duración de señal percibida, figura adaptada de (7).

Por otro lado, los métodos tradicionales de cultivo celular que son empleados desde los años 50 (placas y pozos de poliestireno con una rigidez de ~ 2 GPa) no reproducen de manera adecuada las características propias del microambiente celular natural, y aunque los tipos celulares cultivados en estas plataformas pueden adherirse y moverse en las superficie de las placas o pozos de cultivo, las células cultivadas en estas plataformas presentan una morfología muy similar a la observada cuando se cultivan en vidrio, por lo que los métodos tradicionales de cultivo a menudo limitan la función celular *in vitro*, y no promueven diversas funciones celulares conocidas *in vivo*, tales como migración o la diferenciación que se realizan normalmente en un entorno natural *in situ* (21, 23, 24). Es por esto, que se han adaptado y desarrollado diversas técnicas de microfabricación (25–27) junto a materiales, como: elastómeros, geles e hidrogeles que permiten el control de sus propiedades mecánicas, su estructura geométrica y el entrecruzamiento superficial o en bulto de diferentes tipos de proteínas propias de la ECM (28, 29). Con el fin de fabricar plataformas de cultivo biomiméticas, diseñadas a partir de las características intrínsecas del microambiente celular deseado, para que reproduzcan de mejor manera el entorno celular natural, y así recuperar el fenotipo y la función que las células presentan en su microambiente nativo.

Técnicas y materiales para cultivo celular

Al conjunto de técnicas, procesos y métodos para producir sistemas o estructuras con dimensiones micrométricas se le llama microfabricación. Un gran número de estas técnicas vio su origen en la microelectrónica, que está basada en la industria de semiconductores y circuitos integrados. Gracias a la litografía suave (30), fotolitografía (30, 31), técnicas de fabricación láser (32) y técnicas tanto de micro- como bioimpresión (33), junto al desarrollo de materiales que permiten el control de sus propiedades fisicoquímicas es posible la fabricación de plataformas que emulen de mejor manera las condiciones de cultivo deseadas, ya que la ingeniería de tejidos y órganos requiere de andamios que proporcionen a las células un microambiente que promueva la adhesión, la función celular y que permita la difusión de factores solubles (34). Sin embargo, esta asociación entre el campo de la microfabricación y la biología celular no fue obvia al principio, y este campo de la mecanobiología no hubiera surgido con la misma intensidad si no fuera por interacción entre científicos pertenecientes a diferentes disciplinas, por lo que resultó de suma relevancia la formación de grupos interdisciplinarios que abordan la problemática de encontrar mejores sustratos para el cultivo celular y el desarrollo de equipos que permiten una mejor caracterización de las células. Actualmente, la fabricación de plataformas para cultivo *in vitro* está tomando un enfoque más biomimético, es decir, buscando imitar el microambiente celular y controlar la localización espacial de moléculas activas dentro de la estructura del material (35). Ya que, la capacidad de generar un microambiente celular biomimético y fisiológicamente relevante *in vitro* es crucial si se espera estudiar de forma adecuada acontecimientos celulares propios de los tejidos vivos (34).

Planteamiento del problema

Como se ha descrito, los estímulos mecánicos juegan un papel relevante en el comportamiento, destino y función de los sistemas celulares. Sin embargo, los métodos

tradicionales de cultivo no reproducen de manera adecuada las señales mecánicas propias del microambiente celular natural, por lo que es necesario el uso de técnicas y materiales que permitan el desarrollo de plataformas de cultivo con el fin de reproducir fenómenos fisiológicamente relevantes. Con base en esto se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis

Si es posible controlar ciertas señales propias del microambiente celular, como: rigidez, curvatura y estructura geométrica, entonces es posible definir la influencia individual y conjunta de estas señales sobre el comportamiento y fenotipo celular.

Objetivo General

Diseñar y fabricar sustratos microestructurados localmente, controlando diferentes parámetros como geometría, rigidez y conjugación superficial de proteína, para ser utilizados como plataformas heterogéneas de cultivo celular, diseñados a la medida del microambiente celular deseado, con la finalidad de que los tipos celulares cultivados en estas plataformas expresen características similares a las que presentan en su microambiente natural (tejido).

Objetivos particulares:

- Establecer un protocolo de fabricación de hidrogeles, en donde además del control sobre la rigidez se tenga control sobre la estructura geométrica y la conjugación con diversas proteínas de la ECM.
- Caracterizar las propiedades mecánicas (módulo de Young, módulo de relajación y los módulos dinámicos), químicas (presencia de proteína en la superficie) y geométricas de los hidrogeles fabricados.
- Validar los hidrogeles fabricados por medio del cultivo de células epiteliales en su superficie y probar la influencia de la rigidez cuantificando el esparcimiento celular (*spreading*) y la densidad celular.
- Estudiar la influencia conjunta de diferentes señales del microambiente celular (rigidez, curvatura, confinamiento y factores solubles) sobre la morfología, el esparcimiento y el fenotipo celular.
- Estudiar la influencia de la rigidez sobre la morfología del núcleo celular.

Con el fin de diseñar y fabricar una plataforma biomimética es necesario conocer el microambiente celular nativo de los tipos celulares que se pretenden estudiar en estas plataformas, por ello, en el siguiente capítulo se abordarán las principales características del microambiente celular, así como los mecanismos generales por medio de los cuales las células perciben, responden y se adaptan a los estímulos mecánicos externos a los que la célula está comúnmente expuesta. En el capítulo 3 se presenta el protocolo de fabricación de hidrogeles de poliacrilamida, con el cual se logró controlar las propiedades mecánicas y geométricas del sustrato. Luego, se presenta el método de caracterización mecánica por microindentación y relajación. Después, en el siguiente capítulo se presenta la validación del uso de los hidrogeles de poliacrilamida para el estudio de la curvatura y el confinamiento en las células embrionarias de riñón AD-293 y al final del capítulo se explora

el comportamiento colectivo de las células pulmonares. En el capítulo 5 se presenta el método que se utilizó para el estudio del impacto de la rigidez de la matriz extracelular sobre las propiedades mecánicas del núcleo celular, además se describe un modelo físico propuesto que busca describir la evolución de las propiedades mecánicas del núcleo a diferentes escalas de tiempo. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones generales y la perspectiva de este trabajo de tesis.

Capítulo 2. La célula y su entorno

El uso de los fenómenos físicos como herramientas de caracterización y prueba de los sistemas vivos a nivel microscópico data desde el siglo XVII, cuando Robert Hooke utiliza la magnificación de un sistema de lentes para observar pequeñas estructuras poliédricas a las que denominaría células (3), pero no fue hasta el siglo XIX que se desarrolló este concepto de célula, tomando en cuenta su estructura interior. Esto dio origen a la biología celular que reconoce a la célula como la unidad básica de estructura y función de los seres vivos, idea que constituye uno de los pilares de la biología moderna (6).

El microambiente celular se define como los elementos físico químicos que se encuentran en el entorno circundante a la célula y pueden modificar el comportamiento y la función de esta ya sea de manera directa o indirecta (36). Estas modificaciones pueden observarse como cambios en la morfología, en la tasa de proliferación, diferenciación y apoptosis, entre otras alteraciones de algunas características intrínsecas de la célula (22, 37, 38). Dicho microambiente está principalmente constituido por la matriz extracelular, diferentes tipos celulares, factores solubles y esfuerzos mecánicos, tanto estáticos como dinámicos (18, 36).

En la figura 2.1 se presenta un esquema representativo de los estímulos mecánicos más comunes que se encuentran en el microambiente nativo de una célula adherente, así como algunos mediadores de mecanotransducción que son estructuras celulares por medio de las cuales la célula percibe las señales mecánicas de su exterior.

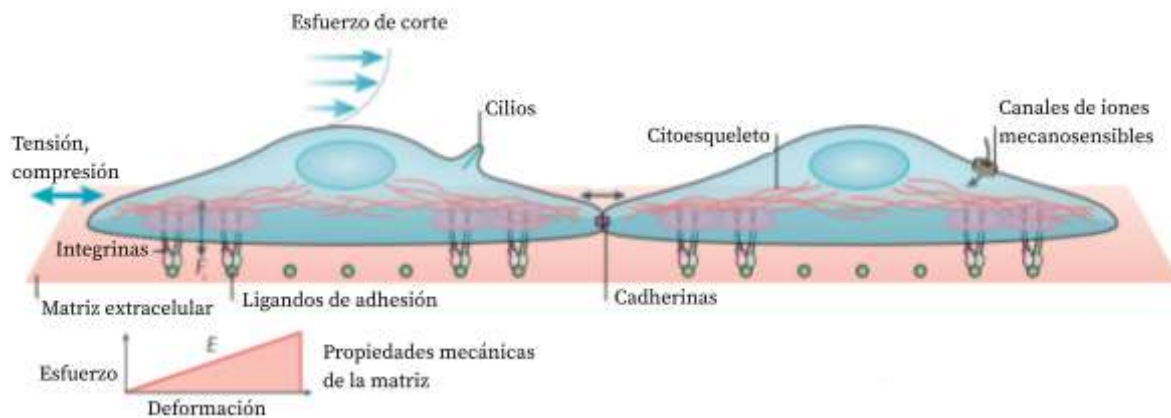


Figura 2.1 | Esquema del microambiente celular. Algunos de los estímulos mecánicos presentes en el microambiente celular, son: rigidez de la matriz extracelular, esfuerzos tanto de tensión como compresión y esfuerzos de cortantes por paso de flujo, así como mediadores mecanotransductores, como: caderinas, integrinas, cilios y canales de iones. Imagen adaptada de (39).

Matriz extracelular

Al día de hoy, a pesar de ser bien conocido el papel que desempeña el microambiente celular en diversos procesos celulares, sigue siendo un tema abierto el estudio de los diversos mecanismos por medio de los cuales la célula percibe, responde y se adapta a los variados estímulos mecánicos de su entorno. Además, para complicar aún más el problema, la célula remodela continuamente su entorno del cual depende y esa relación bilateral y

recíproca es la raíz de la fisiología y la patología de los tejidos. Las señales mecánicas externas pueden clasificarse como aquellas que surgen de la resistencia pasiva a las fuerzas generadas por la célula, y por las que surgen cuando una célula está activamente sometida a fuerzas aplicadas por otras células, a la deformación de la matrix extracelular, a el flujo o la gravedad.

La matriz extracelular (*ECM*, por sus siglas en inglés), como su nombre lo indica, son aquellos componentes no celulares que proporcionan integridad estructural al organismo, denotan los límites funcionales del tejido y delimitan microambientes específicos (40). Además, la ECM sirve como un depósito de señales bioquímicas y biofísicas para apoyar la supervivencia, organización y diferenciación celular (41). Por lo tanto, las células nativas o residentes de cada tipo de tejido son responsables de generar y remodelar su ECM y responden a ella en un proceso denominado retroalimentación dinámica o diafonía bidireccional entre la célula y su entorno (42, 43). Entonces, las células pueden modificar los componentes de la ECM en respuesta a diversos estímulos, como: señales mecánicas, concentración de oxígeno y nutrientes, y muchos otros factores que constituyen el nicho celular (44).

En resumen, desde el punto de vista de la ciencia y de la ingeniería de los materiales, la ECM es el biomaterial ideal, ya que no solo sirve como sustrato para promover la reparación del tejido dañado, sino también como un andamio ideal para la ingeniería de tejidos y órganos. Ya que, la ECM envía señales mecánicas y bioquímicas a las células residentes de cada tejido por medio de diversos receptores presentes en la superficie celular, lo que activa una serie de cascadas de señalización intracelulares, dando como resultado cambios en la expresión génica y el fenotipo celular. Sin embargo, en todo momento la síntesis y secreción de moléculas de la ECM está determinada por los diversos tipos de células residentes de cada microambiente, proceso que ocurre durante toda la vida, tanto en estados fisiológicos “sanos” como patológicos (40). Sin embargo, la continua remodelación de la ECM se debe a la constante retroalimentación entre la células y su entorno, en particular, las células adherentes perciben los estímulos mecánicos por medio una amplia gama de receptores localizados en su superficie, algunos de ellos están conectados al citoesqueleto, el cual está formado por una compleja red de filamentos, que además de conferir a la célula soporte estructural funcionan como transductores y transportadores de diversas señales tanto químicas como mecánicas, además de estar involucrados en la división celular. Es por ello que en las siguientes secciones se describe a grosso modo el citoesqueleto de una célula adherente y la maquinaria que utiliza para adherirse al sustrato.

Estructura mecánica interna de la célula: el citoesqueleto

Desde el punto de vista de la biología molecular, la maquinaria que usa la célula para adherirse al sustrato es la misma que utiliza para percibir su entorno mecánico, por medio de ejercer cierto esfuerzo sobre este (45). Como se mencionó en la sección anterior, las células no sólo perciben los estímulos mecánicos de su exterior, sino también pueden generar esfuerzos que modifiquen su ambiente circundante. Estos esfuerzos que la célula ejerce sobre su entorno se originan en su citoesqueleto, el cual se considera la estructura subcelular responsable del soporte estructural y de la organización interna de la célula, además de que está involucrado en el transporte y tráfico de moléculas y organelos, así

como la división celular (17). La relativa rigidez del citoesqueleto proviene de una resistente red de tubos y filamentos que están interconectados entre la membrana y la envoltura del núcleo, esta red le confiere a la célula su forma y sus propiedades mecánicas por medio de las cuales resiste las cargas y esfuerzos externos; esta red está formada principalmente por:

- Filamentos de actina (F-Actina)
- Microtúbulos
- Filamentos intermedios

Cada uno de estos componentes está constituido por unidades repetitivas que forman filamentos direccionados (polarizados). La polimerización de la mayoría de los subcomponentes de estos tubos y filamentos requiere de energía química en forma de las moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) o trifosfato guanosa (GTP) y cada elemento polimerizado tiene propiedades mecánicas características, que están determinadas por la estructura de sus subunidades. Las estructuras resultantes de la polimerización de los subcomponentes se asocian a otras proteínas estructurales y de señalización para proporcionar estabilidad, regulación y conectividad a otras partes de la célula. Cada componente del citoesqueleto está asociado a ciertos motores moleculares que facilitan el movimiento axial de una manera escalonada, que depende del consumo de ATP, contribuyendo así a la generación de esfuerzos intra- y exocelulares (17).

Los microfilamentos de actina (5-10 nm de diámetro y con un módulo de Young $E \sim 103$ MPa) están compuestos por unidades globulares de actina (G-Actina, proteína de aproximadamente 43 kDa). Este es el componente primario del citoesqueleto para la generación de fuerzas (46) que son generadas por medio de dos mecanismos:

1. Polimerización y despolimerización de los filamentos
2. Miosina (motor molecular asociado a los filamentos de actina, actomiosina).

Comparado con la actina, los microtúbulos (compuestos de proteínas globulares α y β tubulina, ~ 25 nm de diámetro exterior, ~ 12 nm de diámetro interior y $E \sim 103$ MPa) son más largos y rígidos (6, 47) y contribuyen principalmente a la resistencia a la compresión en la homeostasis celular.

El tercer componente principal del citoesqueleto son los filamentos intermedios que, como parte de la red del citoesqueleto, contribuyen a la forma de la célula y a la integridad de su estructura, ya que son considerados “absorbentes de impactos”. Están compuestos de una colección de diversas proteínas que son específicas de cada tipo de tejido (~ 10 nm de diámetro y $E \sim 100-101$ MPa (48)), algunos ejemplos de estas proteínas son: queratina, láminas, desmina, nestina y vimentina, entre otras (49).

Adhesión celular

Una de las principales consecuencias de la interacción entre una célula y su entorno es la adhesión, que es la capacidad que posee una célula para unirse a otras células o al sustrato. El proceso de adhesión se ha modelado de diferentes maneras. Desde el punto de vista termodinámico, consiste en la unión de enlaces reversibles entre moléculas específicas que

compiten con un potencial repulsivo (provocado por la carga negativa neta de la célula y fuerzas osmóticas debidas al impedimento estérico que surge de la disposición espacial entre los diferentes receptores y ligandos). Con el modelo de Bell fue posible predecir el número de enlaces, la separación y el área de contacto entre células o entre la célula y el sustrato (50, 51). Actualmente, diversos modelos de adhesión que buscan modelar las adhesiones como enlaces reversibles receptor-ligando, están basados principalmente del modelo de Bell (50), el cual es un modelo mecano-químico basado en principios estocásticos que tiene su origen en la mecánica estadística. Este modelo describe la formación y ruptura dinámica-estocástica de enlaces en una interfaz deformable con un potencial repulsivo. Matemáticamente se describe por medio de la probabilidad de la formación y ruptura de enlaces (52).

Concretamente, las células eucariontes forman principalmente dos tipos de uniones: adhesiones célula-célula (ACC) y adhesiones célula-sustrato (ACS), las cuales juegan un papel determinante en la arquitectura y función celular (8, 17). El proceso de adhesión se lleva a cabo por medio de una amplia gama de receptores transmembranales que median las interacciones físicas y químicas entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. Estos receptores son específicos en cada tipo de adhesión: para las ACS existen las integrinas que son proteínas heterodiméricas (subunidades α y β) con dominios extracelulares y citosólicos (ver figura 2.2). Otro grupo de moléculas median la interacción célula-célula, éstas son: las cadherinas (glicoproteínas con dominio transmembranal, algunos tipos son: E-, N-, P-Cadherinas); las inmunoglobulinas (N-CAM, ICAM, VCAM, PECAM, entre otras) y las selectinas (E-Selectina, P-Selectina, L-Selectina, entre otras) (17). Estos son algunos ejemplos de la gran variedad de moléculas sumamente específicas que dependen del tipo de unión y del tipo celular, y además, toman lugar relevante en la transducción de señales físicas y químicas del microambiente hacia la célula.

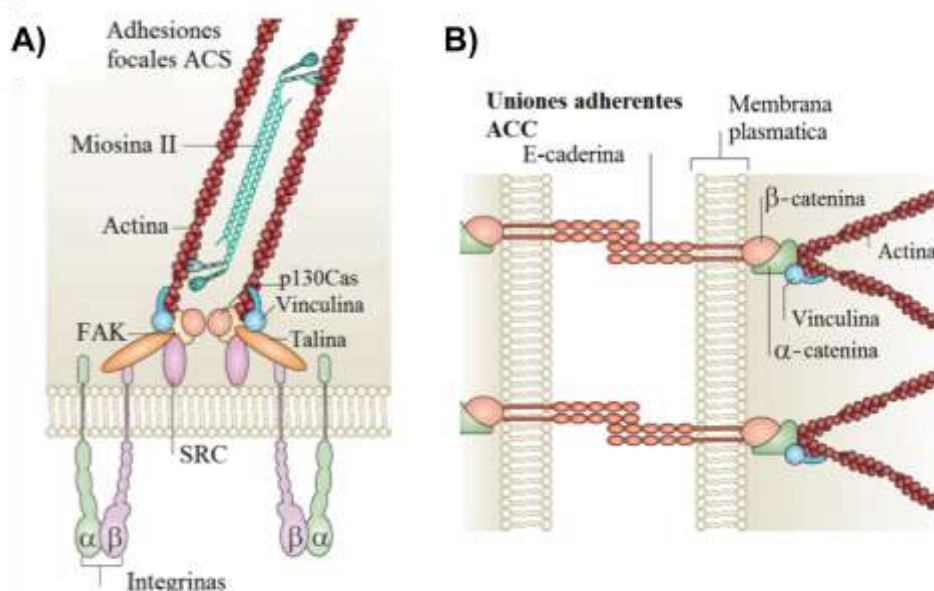


Figura 2.2 | Esquema de adhesión celular. A) Adhesiones célula-sustrato unidas al citoesqueleto de actina por medio de proteínas de enlace (Vinculina, talina,FAK, etc.) B) Adhesiones célula-célula con sus proteínas de enlace (α -catenina, β -catenina y vinculina), imagen adaptada de (8).

Internamente, cada tipo de receptor (integrinas y cadherinas principalmente) está asociado a proteínas que funcionan como transductores celulares de las señales mecánicas externas: para las integrinas están la talina, la vinculina, la cinasa de adhesión focal (*FAK*, por sus siglas en inglés), etcétera, y para las cadherinas son: α -catenina, β -catenina y vinculina entre otras (8, 17). Esta compleja maquinaria de adhesión unida al citoesqueleto se representa en la figura 2.2. La importancia de estos mecanismos de adhesión no sólo radica en su función como receptores mecanosensibles sino también influyen en la morfología, fenotipo y función de la mayor parte de las células adherentes dentro de un tejido (53). Estos dos tipos de adhesiones tienen una retroalimentación negativa entre ambas: al formarse adhesiones focales, disminuyen las uniones adherentes, y viceversa. Es importante remarcar que esto es de suma relevancia, ya que dependiendo del tipo celular es el tipo de adhesión que se forma. Las células mesenquimales tienden a formar más adhesiones focales, mientras que las uniones adherentes son más propias en los tipos epiteliales (54, 55).

La capacidad que posee la célula de percibir, responder y adaptarse a su entorno mecánico depende principalmente del tipo de adhesión y del citoesqueleto (8), cuyos elementos constitutivos que son redes de tubos y filamentos interconectados, coordinan las vías de señalización que perciben los estímulos mecánicos y regulan la adhesión (17). Por ejemplo, en su función de sensores mecanosensibles, las integrinas por medio de un cambio conformacional dependiente de tensión, traduce los esfuerzos externos originados en la rigidez de la *ECM* en cambios de fenotipo celular (56). Por lo tanto, uno de los desafíos actuales en el campo de la biología celular es contar con un marco teórico que describa completamente el comportamiento reológico de la célula para obtener información realista sobre la dinámica de su estructura interna y de la especificidad de ésta en cada tipo celular de interés, con el fin de estimar las propiedades mecánicas internas de los diversos tipos celulares a partir de las observaciones morfológicas externas. Varios modelos (elásticos lineales, tenségricos, ley de potencias, viscoelásticos, materia suave, redes de polímeros y poroelasticidad, entre otros) se han aplicado con éxito para describir algunos fenómenos mecánicos que son observados en las células (57–61). Sin embargo, todavía no existe una teoría mecánica unificada para explicar los mecanismos físicos que rigen el comportamiento mecánico de la célula y los tejidos y que además abarque un paisaje fenomenológico tan amplio dependiente del tiempo (62).

Entonces, debido a que en este trabajo de tesis se hipotetizó que es posible distinguir la influencia individual y colectiva tanto de la rigidez como de la geometría del sustrato, sobre el comportamiento celular (forma y tamaño), se estableció un protocolo de fabricación y estructuración geométrica de hidrogeles de poliacrilamida para ser usados como plataformas de cultivo celular. El protocolo detallado se presenta en el siguiente capítulo y se demuestra que los hidrogeles fabricados poseen una rigidez comparable a la de las estructuras fisiológicas, la cual va desde unos cientos de pascales a varios cientos de kilopascales (62).

Capítulo 3. Fabricación y caracterización de sustratos de hidrogel para cultivo celular

En las últimas décadas se han desarrollado e implementado diversos materiales para la fabricación de andamios celulares, como elastómeros y geles que reproducen ciertas características del microambiente celular; como la composición y estructura tridimensional de la matriz extracelular (ECM), estructura tridimensional de la ECM, esfuerzo cortante por paso de flujo (deformación tangencial), confinamiento espacial y curvatura del sustrato, entre otros. Entre estos materiales se encuentran los hidrogeles, que son materiales altamente hidrofílicos, y por lo tanto son adecuados para múltiples aplicaciones biológicas, biomédicas y farmacológicas, que van desde los lentes de contacto hasta sistemas de liberación controlada de fármacos (34, 63).

Los hidrogeles se forman a través de la reticulación de cadenas de polímeros hidrofílicos dentro de un microambiente acuoso. La gelificación puede conseguirse a través de una variedad de mecanismos, como: el entrecruzamiento físico de cadenas poliméricas, interacciones electrostáticas y reticulación química covalente (63). Una ventaja de este tipo de materiales de origen sintético o natural, es la posibilidad de manipular dinámicamente sus propiedades físicas y químicas, para así lograr una estructura geométrica precisa. Esto es de gran importancia si se busca mimetizar el ambiente nativo celular. Además, los procedimientos para desarrollarlos son bastante reproducibles y es posible colocar proteínas o dominios de adhesión de manera relativamente controlada.

Protocolo de fabricación de hidrogeles de poliacrilamida (PAM)

Uno de los polímeros que se utiliza ampliamente para la fabricación de hidrogeles, en los laboratorios de biología celular y molecular, es la poliacrilamida (PAM), ya que se puede modificar el tamaño del poro (rango 70-150 nm (64, 65)) con la proporción de acrilamida (polímero) y bisacrilamida (agente entrecruzante), es gracias a esta propiedad que este hidrogel ha sido ampliamente utilizados en técnicas de electroforesis y western blot (64). También, por medio de este mecanismo de polimerización, el hidrogel adquiere características mecánicas deseables debido a que se lleva a cabo una reticulación controlada (66). Existen diversos protocolos de fabricación para este hidrogel (28, 66, 67), que puede ser por medio de un iniciador químico o con un fotoiniciador (68). Adicionalmente, el bajo costo de este material aumenta la accesibilidad a este material, por lo que se eligió la poliacrilamida (PAM) para fabricar hidrogeles con rigidez controlada. El protocolo establecido consta de los siguientes pasos y se describe a detalle en las siguientes secciones:

1. Funcionalización de cubreobjetos con Hidróxido de Sodio (NaOH) + 3-AminoPropiltrietoxisilano (APTES) + Glutaraldehído
2. Silanización de portaobjetos con Diclorodimetilsilano (DCMS)
3. Diseño y fabricación del molde para replicar una estructuración geométrica de los hidrogeles
4. Preparación de mezclas de poliacrilamida para obtención de diferente rigidez
5. Polimerización del hidrogel
6. Estructuración geométrica con el molde

7. Conjugación superficial con proteína de ECM

En el paso de polimerización del hidrogel, es posible llevar a cabo la estructuración geométrica y el entrecruzamiento heterogéneo del hidrogel, esto con el fin de obtener una distribución de diferentes rigideces en un mismo sustrato. Es importante mencionar que el protocolo de fabricación de hidrogeles se basó en dos protocolos de fabricación de hidrogeles de PAM, previamente reportados en la literatura. Del trabajo reportado por Justin R. Tse y Adam J. Engler (69), se adaptó el método de control de la rigidez del hidrogel, mientras que, el método de funcionalización de los cubreobjetos se basó en el trabajo realizado por Alexandra Cretu, Paola Castagnino y Richard Assoian (70). Sin embargo, ambos métodos fueron modificados y adaptados para ser utilizados con la infraestructura del laboratorio nacional LaNSBioDyT. Particularmente, se optimizaron las cantidades de los reactivos utilizadas junto a los tiempos de incubación, enjuague y polimerización.

Cabe destacar que el método de estructuración de los hidrogeles y el método de conjugación de la proteína fueron completamente desarrollados de manera original para este trabajo de tesis. A continuación, se describe detalladamente los pasos 1 al 7 de la fabricación de hidrogeles de poliacrilamida, controlando la rigidez del hidrogel así como su estructura geométrica y el depósito de la proteína de ECM conjugada en su superficie.

1. Funcionalización de cubreobjetos

El objetivo de este paso es modificar la superficie de los cubreobjetos de vidrio, con el fin de favorecer la adhesión del hidrogel, esto se logró al adherir un grupo funcional en la superficie del cubreobjetos para poder fijar el hidrogel de poliacrilamida sobre la superficie del vidrio, como se muestra en el esquema presentado en la figura 3.1.

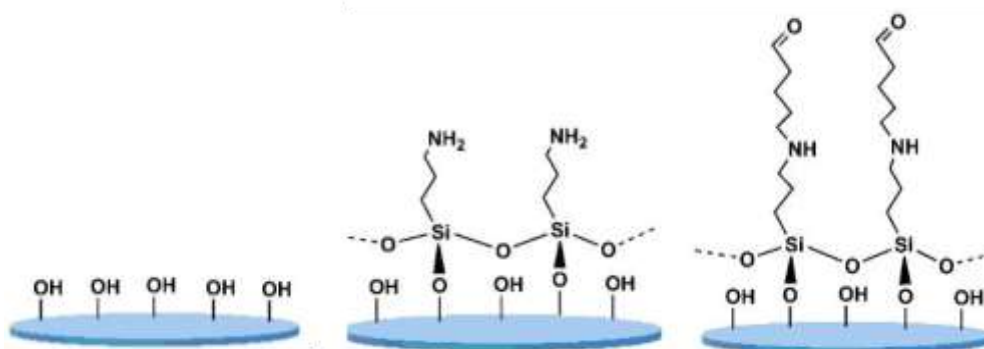


Figura 3.1 | Representación esquemática de los pasos principales para modificar la superficie del cubreobjetos de vidrio con NaOH + APTES + Glutaraldehído

Los pasos para la funcionalización de sustratos de vidrio se mencionan a continuación:

1. Cubrir el fondo de una caja Petri de 10 cm de diámetro con parafilm. Esto facilita el manejo de los cubreobjetos y su extracción de la caja con mayor facilidad
2. Colocar los cubreobjetos a funcionalizar sobre el parafilm. Los cubreobjetos pueden ser circulares de diferentes diámetros y rectangulares de diferentes tamaños. Principalmente se utilizaron cubreobjetos de vidrio circulares de 20 mm de diámetro y rectangulares de 24 x 50 mm de lado.

3. Verter 1 mL de solución 0.1 M de NaOH en cada cubreobjetos e incubar durante 3 min. Al término de este tiempo se aspira completamente la solución con una línea de vacío. Una imagen de los cubreobjetos incubados con NaOH se puede observar en la figura 3.2.
4. En una campana de extracción verter 0.3 mL de 3-APTES (3-aminopropil-trietoxisilano) en cada cubreobjeto. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente y retirar inmediatamente

Nota: debido a que el APTES posee una tensión superficial más baja que el agua se recomienda verterlo con mucho cuidado para evitar que se extienda más allá de la superficie del cubreobjetos.



Figura 3.2 | Cubreobjetos de 20 mm de diámetro en una caja de Petri cubierta con parafilm y sobre ellos una solución de 0.1 M de NaOH.

5. Enjuagar con 20 mL de agua desionizada (ddH₂O) o destilada (dH₂O) los cubreobjetos en la misma caja de Petri y desechar la mezcla en una botella de residuos y repetir en dos ocasiones, al terminar se deben dejar a los cubreobjetos inmersos en agua.

Opcional: en el caso de que quede una capa blanquecina sobre los cubreobjetos se debe enjuagar cada cubreobjetos con agua destilada después de los 3 lavados y transferir con las pinzas los cubreobjetos con la cara tratada hacia arriba a otra caja de Petri cubierta con parafilm. Esto con el fin de no perder la orientación de la superficie ya activada por la incubación con el APTES.

6. Lavar los cubreobjetos con ddH₂O o dH₂O tres veces con agitación (orbital o rocking) durante 10 min a temperatura ambiente por enjuague.
7. Al terminar, aspirar líquido excedente (o usar una toalla de papel kimwipe™) para secar los cubreobjetos.
8. En la campana de extracción, cubrir cada cubreobjetos completamente con 1 mL de una solución al 0.5 % v/v de glutaraldehído en agua destilada o desionizada, durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Retirar el glutaraldehído al 0.5% y proceder como se indica en el paso 6.
10. Secar los cubreobjetos completamente y guardar en una caja de petri cubierta con parafilm, una vez terminado este paso se pueden almacenar los cubreobjetos en un área limpia y seca por un periodo de 1 a 2 semanas posteriores a su funcionalización

Nota: se obtienen mejores resultados cuando se usan recién funcionalizados.

2. Silanización de portaobjetos

Este procedimiento hace inerte la superficie del vidrio que se utilizará como base para obtener sustratos planos y lisos de hidrogel.

1. Los portaobjetos deben de ser previamente limpiados con isopropanol o etanol y secados con un kimwipe™
2. Dentro de una campana de extracción, se abre el recipiente destinado para silanización y se acomodan máximo 5 portaobjetos dentro del recipiente
3. En un vaso de precipitados de 10 mL se vierte 0.4 mL de diclorodimetilsilano (DCDMS) y se coloca dentro del recipiente con los portaobjetos

Nota: NUNCA abrir el frasco de DCDMS fuera de la campana ya que es una sustancia tóxica

4. Se cierra el recipiente y se deja por al menos 6 h dentro de la campana, se puede dejar durante el transcurso de la noche
5. Se abre el recipiente y se deja ventilar durante 6 h y después seorean en un espacio ventilado una noche.
6. Se limpia cualquier residuo sobre ellos y se guardan en una bolsa etiquetada. SIEMPRE se deben tomar los portaobjetos silanizados con guantes.

3. Molde para réplica

En el caso de desear generar un patrón geométrico en la superficie del hidrogel, se utiliza un método sencillo de la litografía suave denominado molde-réplica (30). Para esta técnica se debe diseñar en negativo el patrón geométrico que se desea para después fabricar este molde por medio del uso de diferentes técnicas como: micromaquinado láser (30, 71) o micromaquinado controlado numéricamente por computadora (CNC) (72). A continuación se describe el procedimiento para generar un molde maestro que permite la obtención de un patrón de pilares de diferentes diámetros en la superficie del hidrogel.

Diseño del molde y fabricación del molde

En este paso se deben de considerar las limitaciones del equipo con el que se fabricará el molde recordando que la fabricación no es ideal y tiene ciertas tolerancias, por ello se recomienda caracterizar el molde, una vez fabricado, por medio de perfilometría y microscopía óptica. En la figura 3.3 se muestran los pasos para la obtención de un molde de polimetilmetacrilato (PMMA) para réplica de hidrogeles de PAM, estos pasos se ilustran con el diseño para la réplica de pilares con diferentes diámetros. Debido a las escalas que se buscan reproducir, se optó por la técnica de micromaquinado por control numérico por computadora (CNC). Se debe considerar que la principal limitación de este tipo de técnica es que la resolución depende del tipo de broca a utilizar y del tamaño de paso del motor que controla el movimiento de la broca, por lo que para la optimización del tiempo y la calidad de fabricación se debe de tener muy en cuenta estos parámetros. La figura 3.3A muestra el boceto del diseño de un arreglo de huecos de diferentes diámetros acomodados en un patrón con un factor de llenado definido por la ecuación 3.1

$$F_f = 1 - A_E/A_T \quad (3.1)$$

donde F_f representa el factor de llenado, A_E representa el área total que ocupa la superficie de las estructuras, en este caso el área de la superficie transversal de los diámetros de los huecos y A_T es el área total que delimita el área del arreglo de los pilares. El factor de llenado con el que se diseñaron las estructuras es 0.85, i.e. la superficie total que representan el área del fondo de los huecos es 1/7 del área total que ocupa la región que delimita los pilares. En el panel B, se muestra el proceso de micromaquinado donde una fresa (o punta) montada en un brazo sigue un diseño, la fresa desgasta la superficie del sustrato para dar forma a la estructura deseada con alta precisión y resolución micrométrica.

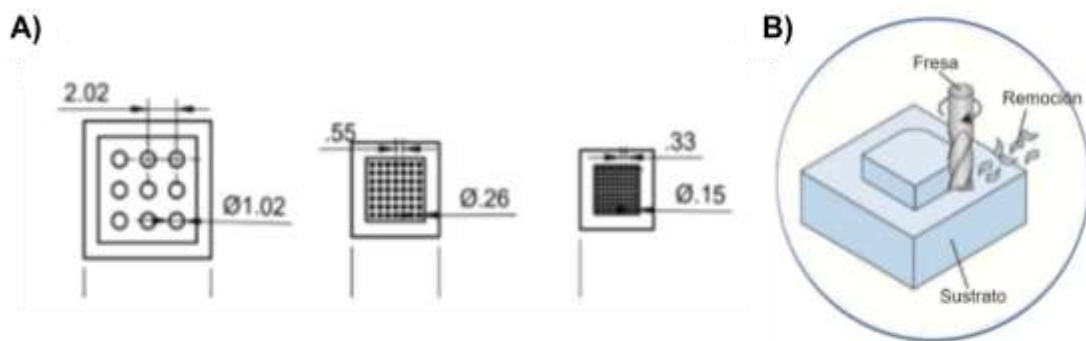


Figura 3.3 | Diseño y fabricación del molde maestro para réplica de hidrogeles, A) Boceto del diseño del arreglo a fabricar utilizando la ecuación 3.1 y B) muestra un esquema del proceso de micromaquinado de un molde de acrílico o PMMA. Las unidades en (A) son mm.

4. Preparación de disoluciones de poliacrilamida de diferente rigidez

Las disoluciones se preparan según lo reportado por Justin R. Tse and Adam J. Engler (69), y se presentan en la tabla 3.1. Como se puede observar la rigidez esperada de los hidrogeles depende de la cantidad de acrilamida y bisacrilamida entrecruzadas. En general, el módulo elástico reportado es lo que se obtiene experimentalmente, ya que hay numerosos reportes por otros laboratorios que lo han medido y encontraron valores muy cercanos. En nuestro caso, se tuvo que caracterizar el valor obtenido y comparar con el valor esperado también.

Acrylamide %	Bis-acrylamide%	Acrylamide from 40% stock solution (ml)	Bis-acrylamide from 2% stock solution (ml)	Water (ml)	$E \pm \text{St. Dev.}$ (kPa)
3	0.03	0.75	0.15	9.1	0.20 ± 0.03
3	0.06	0.75	0.3	8.95	0.48 ± 0.16
3	0.1	0.75	0.5	8.75	1.10 ± 0.34
3	0.15	0.75	0.75	8.5	1.37 ± 0.22
3	0.225	0.75	1.125	8.125	1.67 ± 0.14
3	0.3	0.75	1.5	7.75	1.78 ± 0.19
4	0.03	1	0.15	8.85	0.71 ± 0.24
4	0.06	1	0.3	8.7	1.16 ± 0.54
4	0.1	1	0.5	8.5	2.01 ± 0.75
4	0.15	1	0.75	8.25	2.55 ± 0.17
4	0.225	1	1.125	7.875	3.13 ± 0.42
4	0.3	1	1.5	7.5	3.24 ± 0.58
5	0.03	1.25	0.15	8.6	1.00 ± 0.31
5	0.06	1.25	0.3	8.45	1.80 ± 0.44
5	0.1	1.25	0.5	8.25	3.15 ± 0.85
5	0.15	1.25	0.75	8	4.47 ± 1.19
5	0.225	1.25	1.125	7.625	8.44 ± 0.82
5	0.3	1.25	1.5	7.25	8.73 ± 0.79
8	0.048	2	0.24	7.76	2.61 ± 0.82
8	0.264	2	1.32	6.68	19.66 ± 1.19
8	0.48	2	2.4	5.6	40.40 ± 2.39
10	0.03	2.5	0.15	7.35	2.83
10	0.06	2.5	0.3	7.2	7.43
10	0.1	2.5	0.5	7	10.61
10	0.15	2.5	0.75	6.75	16.70
10	0.225	2.5	1.125	6.375	23.43
10	0.3	2.5	1.5	6	34.88

Tabla 3.1 | Cantidades de acrilamida, bisacrilamida y ddH₂O asociadas a cada valor de rigidez, los valores del módulo de Young se midieron por medio de indentación utilizando un AFM con una punta esférica de 10 μm de diámetro, tabla tomada de (69).

5. Polimerización del hidrogel

En este paso, existen dos formas de obtener los hidrogeles con rigidez controlada: la primera utilizando N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (*TEMED*, por sus siglas en inglés) y persulfato de amonio (*APS*, por sus siglas en inglés), al que llamaremos método APS - *TEMED*, y la segunda utilizando el fotoiniciador Irgacure 2959TM, al que denominaremos método fotoentrecruzante. En la figura 3.4 se observan las reacciones que se llevan a cabo en cada caso. La principal diferencia entre ambas es que en el método fotoentrecruzante se tiene cierto control sobre el nivel y la rapidez del entrecruzamiento del hidrogel. Sin embargo, requiere de la incorporación de una sustancia adicional (Dimetil sulfoxido, *DMSO* por sus siglas en inglés) que actúa como disolvente del fotoiniciador, la cual se tiene que lavar cuidadosamente, ya que es una sustancia potencialmente tóxica y reactiva con la luz.

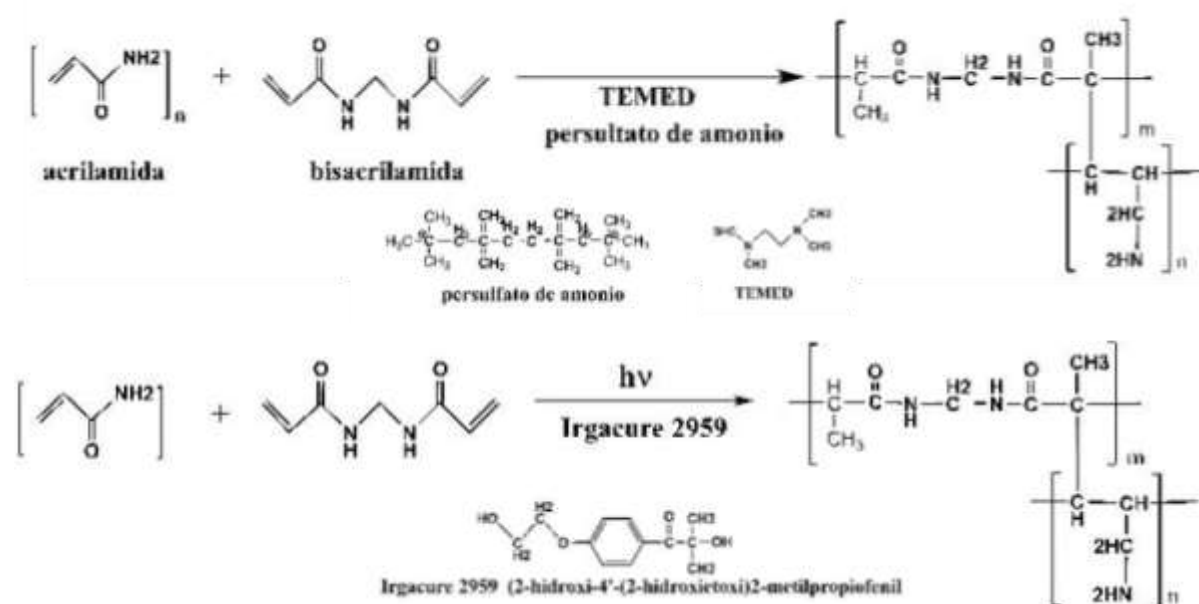


Figura 3.4 | Reacciones de entrecruzamiento de los hidrogeles de poli(acrilamida), las cadenas de acrilamida son entrecruzadas por la acrilamida, A) reacción de entrecruzamiento utilizando APS+TEMED, esta es la reacción de entrecruzamiento más ampliamente utilizada, las estructuras del APS y del TEMED se presentan a la derecha del panel A, B) utilizando el fotoiniciador Irgacure 2959 + $\lambda = 365 \text{ nm}$ se alcanza el entrecruzamiento del hidrogel, debido a que se puede controlar la potencia y el tiempo de la lámpara UV es posible controlar las propiedades mecánicas del hidrogel. En ambos casos, la rigidez del hidrogel está dictada por la proporción de acrilamida/bis-acrilamida.

Método APS - TEMED:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL mezclar las proporciones de acrilamida, bisacrilamida y agua según la tabla 3.1 para obtener la rigidez deseada. Las proporciones en la tabla 3.1 corresponden a un volumen final de 10 mL, por lo que se escalan a un volumen final de 1 mL y se usa un tubo por cada mezcla a realizar (uno por cada rigidez). Colocar los tubos preparados en una gradilla e introducirlos en un desecador por al menos 15 min o hasta que no se observen burbujas de aire saliendo de la mezcla.

2. Para comenzar la reacción de polimerización se agregan 10 μL de APS al 10% en agua ddH₂O y 1 μL de TEMED (alícuota a 4°C) y se mezcla por agitación en un mezclador de vórtices.
 Nota: Antes de iniciar la polimerización se debe de tener todo preparado y al alcance de la mano (portaobjetos silanizados, cubreobjetos funcionalizados, micropipetas y pinzas)
 Nota: Si la mezcla del stock tiene más de una semana almacenada o en uso continuo se recomienda volver a desecar la como se describe en el paso 1, antes de comenzar la reacción de polimerización.
3. Rápidamente se coloca una gota de 100 μL en cubreobjetos de 20 o 18 mm de la mezcla sobre el portaobjetos silanizado.
 Nota: (Puede variar el volumen en un rango de 70 - 100 μL dependiendo de la altura deseada del hidrogel)
4. Se coloca la superficie funcionalizada del cubreobjetos sobre la gota y se deja que se expanda por el peso del cubreobjetos como se muestra en la figura 3.5 y se deja polimerizar de 25 a 30 min como mínimo a temperatura ambiente.
5. Al terminar la polimerización se debe de desprender el cubreobjetos con el hidrogel del portaobjetos silanizado de forma muy cuidadosa para no dañar la superficie del hidrogel y enseguida lavar los hidrogeles obtenidos durante 10 min en 3 ocasiones, utilizando PBS o en su caso ddH₂O, asegurando que al menos el último lavado sea con PBS, esto con el propósito de eliminar todo el material no polimerizado. Una vez lavado debe de almacenarse en agua destilada o desionizada o PBS, dependiendo del líquido con el que se haya lavado el hidrogel.

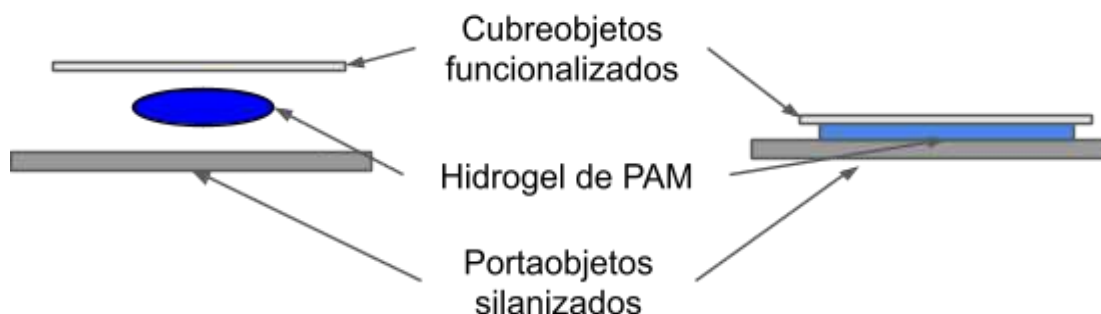


Figura 3.5 | Orden y forma de colocar el hidrogel para su polimerización, el arreglo mostrado tiene como fin obtener una superficie uniforme del hidrogel por ello al terminar la polimerización se debe de desprender cuidadosamente el hidrogel para evitar cualquier daño en su superficie.

Método fotoentrecruzante

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL mezclar las proporciones de acrilamida y bisacrilamida según la tabla 1 para obtener la rigidez deseada. Las proporciones se escalan a un volumen final de 1 mL y se usa un tubo por cada mezcla a realizar (uno por cada rigidez)
2. Se agrega agua restante para llegar a un volumen de 0.9 mL

3. Se agregan 100 μL de Irgacure 2959TM al 10% de concentración en DMSO (0.1g/mL).
Nota: la solución stock de Irgacure 2959TM preparada no debe de exceder más de una semana de antigüedad.
4. Colocar los tubos preparados en una gradilla e introducirlos en un desecador por al menos 15 min o hasta que no se observen burbujas saliendo de la mezcla.
5. Se coloca la superficie funcionalizada del cubreobjetos sobre la gota y se deja que se expanda por el peso del cubreobjetos como se muestra en la figura 2.
6. Se introduce el arreglo en la lámpara CL-1000 UV (365 nm) crosslinker durante al menos 6.5 y hasta 8.0 min dependiendo de la antigüedad del stock.
7. Al terminar la polimerización se debe de desprender el hidrogel del portaobjetos silanizado de forma muy cuidadosa para no dañarlo y lavarse durante 10 min en 3 ocasiones.
8. Una vez lavado debe de almacenarse en agua destilada o desionizada o PBS como se indica en el paso 5 del inciso anterior.

Fabricación de un gradiente de rigidez

Una aplicación particular del método fotoentrecruzante es que al controlar la potencia de luz que incide sobre la mezcla de hidrogel (la luz UV incidente sobre la mezcla comienza y mantiene la reacción de entrecruzamiento) se puede modificar la rigidez de forma controlada, esto utilizando sólo una mezcla de hidrogel (tabla 3.2). En este caso, se utilizó una máscara en una escala de grises para controlar la cantidad de luz que incide sobre el hidrogel, para estudiar si, con este procedimiento era posible obtener un hidrogel con una rigidez de tipo gradiente (siguiendo el nivel de grises), lo que resulta de mucha utilidad en diversos ensayos mecánicos. El procedimiento para este experimento se describe a continuación.

1. Se utiliza un cubreobjetos rectangular de 24x50 mm funcionalizado y una máscara de grises hecha en el software Inkscape (En imágenes de 8 bits, puede haber hasta 256 tonos de gris). Esta máscara se imprime con una impresora láser en acetato (figura 3.6). Mientras mejor sea la calidad de la impresión mejor será la calidad del gradiente.



Figura 3. 6 | Máscara de grises utilizada en la fabricación de un gradiente de rigidez.

2. En un tubo eppendorf de 1.5 mL realizar la siguiente mezcla según la tabla 3.2, se debe mezclar completamente para asegurar una solución homogénea (puede utilizarse un agitador tipo vortex).

Tabla 3.2 | Cantidades a mezclar para lograr gradiente de rigidez, se presentan las cantidades tomadas del stock y los porcentajes totales de cada reactivo.

Material	Cantidad / %
Acrilamida al 40% en ddH ₂ O	250 uL / 10%
Bis-acrilamida 2% en ddH ₂ O	100 ul / 0.2%
Agua destilada o desionizada / dH ₂ O o ddH ₂ O	550 uL / 79.8%
Irgacure 2959 al 10% en DMSO	100 uL / 1%

- Colocar los tubos con las mezclas preparadas en una gradilla e introducirlos en un desecador por al menos 15 min o hasta que no se observen burbujas saliendo de la mezcla.
- Se toman 200 μ L de la mezcla preparada en el paso anterior y se deposita sobre el portaobjetos silanizado (nota: se puede fijar el portaobjetos en una base para facilitar su manejo, la base debe de ser de un material antirreflejante para evitar reflexiones de la luz), después se coloca el cubreobjetos funcionalizado con la máscara de grises en el orden como se muestra en la figura 3.7.

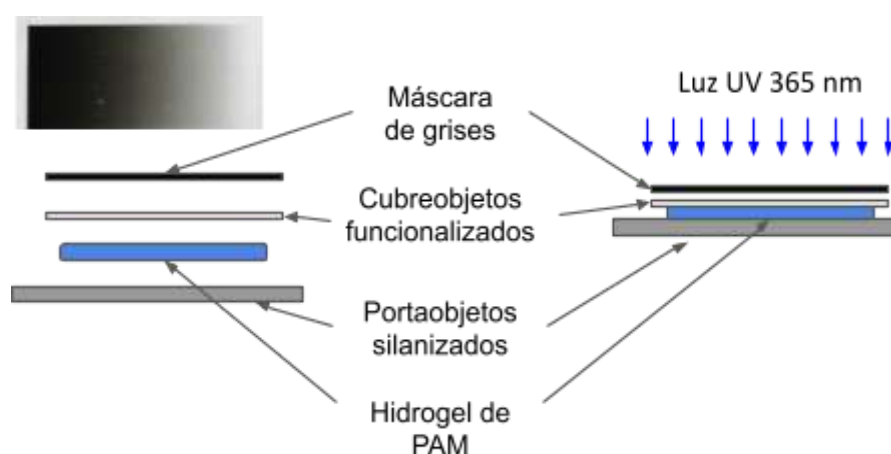


Figura 3.7 | Esquema del arreglo y colocación de los diferentes materiales para la fabricación del gradiente de rigidez.

- Se introduce el portaobjetos en la lámpara CL-1000 UV (365 nm) crosslinker durante 4.5 min.

Nota: Debido a que la calidad de la impresión de la máscara puede variar, se debe optimizar el tiempo de polimerización eligiendo el menor tiempo en el que el hidrogel tarda en estar completamente polimerizado.

- Al terminar la polimerización se debe de desprender el hidrogel de forma muy cuidadosa para no dañarlo.
- Lavar el hidrogel y la máscara inmediatamente con agua desionizada o de preferencia PBS para remover el exceso de Irgacure, se recomienda que el primer

enjuague dure 5 min y después 3 enjuagues de 10 min para poder adherir la proteína a la superficie.

6. Estructuración geométrica de Hidrogeles

Utilizando el proceso molde réplica se puede estructurar los hidrogeles de poliacrilamida al replicar la geometría de un molde maestro (ver paso 3) de acrílico previamente estructurado ya sea por medio de ablación láser o por micromaquinado CNC (control numérico por computadora). La resolución de la réplica dependerá directamente de la rigidez seleccionada del hidrogel y la calidad del molde fabricado.

1. Se mezclan las proporciones de acrilamida, bisacrilamida según la tabla 3.3 para obtener la rigidez deseada o para una estructuración estándar usar las cantidades de la tabla 3.3.

Tabla 3.3 | Cantidades a mezclar para lograr la estructuración de los hidrogeles, se presentan las cantidades tomadas del stock y los porcentajes totales de cada reactivo.

Material	Cantidad / %
Acrilamida 40%/ Acrilamida %	250 uL / 10%
Bis-acrilamida 2%/ Bis-acrilamida %	200 ul / 0.4%
Agua destilada o desionizada / dH ₂ O o ddH ₂ O %	450 uL / 79.6%
Irgacure 2959 10% en DMSO/ Irgacure 2959 %	100 uL / 1%

2. Rápidamente se coloca una gota de 100 μ L de la mezcla sobre el portaobjetos de acrílico en la zona estructurada.
3. Se coloca el cubreobjetos funcionalizado sobre la gota y se deja que se expanda por el peso del cubreobjetos como se muestra en la figura 3.8
4. Se introduce el arreglo en la lámpara CL-1000 UV (365 nm) crosslinker por 11 min.
5. Al terminar la polimerización se debe de desprender el hidrogel de forma muy cuidadosa para no dañar las estructuras y de una sólo intención.
6. Al terminar la polimerización se debe de desprender el hidrogel del portaobjetos silanizado de forma muy cuidadosa para no dañarlo y lavarse durante 5 min en 3 ocasiones. Una vez lavado debe de almacenarse en agua destilada o desionizada o PBS.

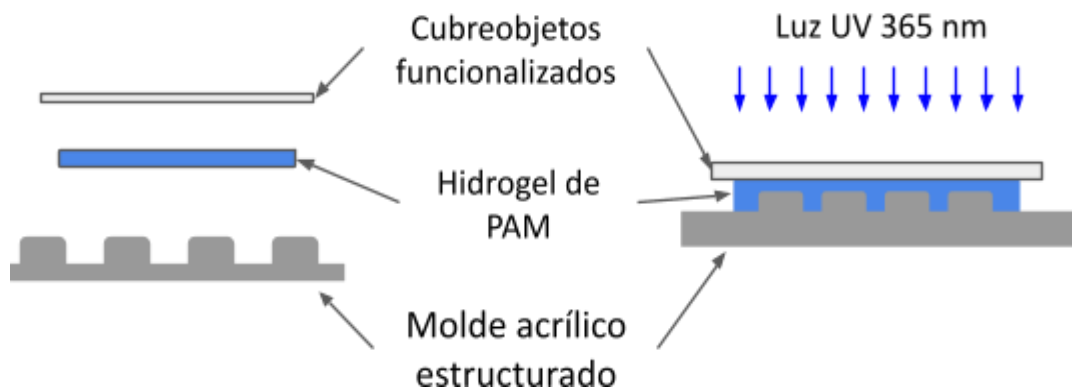


Figura 3.8 | Forma de colocar el hidrogel para su estructuración usando el proceso molde-réplica

7. Conjugación superficial con proteínas de EMC

Este paso es de suma importancia ya que sin la correcta conjugación de la proteína sobre los hidrogeles de poliacrilamida no se podrán adherir las células. El método 1 se basó en el trabajo realizado por Fischer, M. J. (73) y también reportado por Liu E. y colaboradores (74), que consiste en utilizar N-Hydroxysuccinimide (NHS) + N-(3-Dimethylaminopropyl) -N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), este método es utilizado ampliamente; sin embargo, posee varios pasos y se necesita incubar los hidrogeles con la proteína al menos por una noche, lo cual aumenta el tiempo de fabricación. El segundo método se inspiró en lo reportado por Charrier *et. al.* (75), donde utilizan Acrylic acid N-hydroxysuccinimide ester (AA-NHS-éster) ya que es equivalente al uso de NHS+EDC. Sin embargo, nuestra principal aportación en este paso del protocolo fue añadir y estandarizar el uso de Irgacure 2959, lo que disminuye el tiempo de conjugación de la proteína de una noche (~12 h) a 3.5 min, optimizando así el tiempo de fabricación de los hidrogeles. Los métodos estandarizados para su uso en el laboratorio de μ nTec se describen a continuación.

Método 1. Pegado de proteína superficialmente con NHS+EDC

1. Se coloca el cubreobjetos de hidrogel en una caja de cultivo (puede ser de 12 pozos o si es de gradiente se usa una caja petri de 10 cm cubierta con parafilm) y se vierte sobre este 1 mL (2 mL para gradiente) de la solución 1:1 NaOH 0.1M y PBS 0.01 M para carboxilar la acrilamida (cambiar el grupo amino por un grupo carboxilo) durante 30 min a temperatura ambiente.
2. Se retira de la caja de cultivo y se lava con agua destilada o desionizada dos veces.
3. En un tubo eppendorf de 1.5 mL mezclar 10 μ L de NHS (stock 0.02277 g/mL de ddH₂O) y 9 μ L de EDC (stock 0.11536 g/mL de ddH₂O) con 181 μ L de proteína (colágena o fibronectina) por cada cubreobjetos (cada 200 μ L debe contener NHS a una concentración de 50 mM y EDC a una concentración de 20 mM).
4. Se vierten 200 μ L de la solución sobre una caja de petri de 10 cm de diámetro cubierta con parafilm.
5. Se coloca el cubreobjetos con la parte del hidrogel hacia la gota y se deja en cámara húmeda durante 12-16 horas (toda la noche) a 4°C.

Método 2. Foto-adhesión de proteína superficialmente

(Este método se estandarizó en el laboratorio para optimizar el tiempo y disminuir los pasos del proceso. Nota: los reactivos usados deben de provenir de un stock de no más de una semana de antigüedad)

1. En un tubo eppendorf mezclar 300 μL de proteína (colágena o fibronectina), 40 μL de Irgacure 2959 (0.1 g/mL de DMSO) y 30 μL de NHS-ester-acrilato (0.02 g/mL de DMSO), preparar el volumen necesario para el número total de cubreobjetos.
2. Rápidamente se vierten 70 μL (200 μL para gradiente o 40 μL para cubreobjetos de 12 mm de diámetro) de la solución sobre una caja de petri de 10 cm de diámetro cubierta con parafilm.
3. Se coloca el cubreobjetos con la parte del hidrogel hacia la gota y se deja en cámara húmeda.
4. Se colocan los cubreobjetos en la lámpara UV de entrecruzamiento durante al menos 3.5 min. Nota: si se expone mucho tiempo al UV la proteína puede precipitar.
5. Se retiran de la lámpara de entrecruzamiento, estos cubreobjetos pueden ser usados para cultivo en este momento o se pueden dejar reposando durante 12-14 h a 4°C para estabilizar la reacción y lograr un entrecruzamiento más homogéneo.

Al terminar el proceso de entrecruzamiento se deben lavar los hidrogeles (3 enjuagues de 5 min en agitación a temperatura ambiente) y proceder a esterilizarlos para su uso en cultivo, también es posible guardar los hidrogeles fabricados inmersos en agua o PBS para ser usados posteriormente (hasta 1 semana después, siempre teniendo cuidado de la esterilidad de los recipientes empleados). En el caso del hidrogel de gradiente se debe de ser muy cuidadoso con el tiempo de exposición y con el lavado.

Caracterización mecánica de los hidrogeles

A pesar del desarrollo de múltiples protocolos que describen diversos métodos de caracterización mecánica que no requieren la destrucción de la muestra y son utilizados para medir diferentes propiedades mecánicas tanto a nivel del bulto como a nivel local (a microescala) (76), en el campo de la mecanobiología, la microindentación (77) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) (78, 79) siguen siendo las técnicas más utilizadas, aunque técnicas como la aspiración por micropipeta (80) y los métodos basados en las pinzas ópticas (81) también son técnicas comúnmente utilizadas para medir la rigidez del material en un rango de fuerza menores, es decir en un rango de $\sim 0.1 - 100$ pN (80). Además, es importante tomar en cuenta que el comportamiento mecánico de un material se describe mediante la relación esfuerzo-deformación que se puede determinar por mediciones y que permiten construir modelos descriptivos de cada material de interés. Por lo tanto, las técnicas de caracterización buscan medir ciertos parámetros propios de esta relación. Por ejemplo, en el caso de los materiales descritos por un modelo elástico lineal, su comportamiento mecánico puede describirse por dos constantes físicas (p. ej. el módulo de Young y el coeficiente de Poisson). Por el contrario, las propiedades mecánicas de los materiales elásticos no lineales no se pueden representar mediante constantes, sino que se describen mediante parámetros que son funciones de la deformación del material: por ejemplo, el módulo de corte no lineal y el módulo de estiramiento no lineal (82). Por otro lado, los materiales viscoelásticos presentan una respuesta tensión-deformación que

cambia con la velocidad de deformación (83). Esta dependencia puede ser descrita por los módulos de relajación y fluencia en el dominio del tiempo, o por los módulos dinámicos de pérdida y de almacenamiento en el dominio de la frecuencia (ver el Anexo 3, para un breve resumen del comportamiento mecánico de los materiales). A pesar de esto, en el campo de la mecanobiología es muy común caracterizar mecánicamente un material, célula o tejido mediante la rigidez descrita por el módulo de Young, sin embargo, la "rigidez" de un material no es un parámetro adecuado para describir las propiedades mecánicas de diversos materiales blandos, como: los geles, los hidrogeles, las células y los tejidos, ya que el módulo constante de Young (módulo elástico) sólo describe el comportamiento elástico ideal, sin tomar en cuenta efectos disipativos que son de suma relevancia para los materiales biológicos (75), por lo que es sólo una pobre aproximación de las características mecánicas reales de los materiales blandos.

Entonces, en el contexto de la fabricación de plataformas para cultivo celular es imprescindible una correcta caracterización tanto de la mecánica biológica, así como de los materiales empleados para el desarrollo de plataformas de cultivo celular, ya que, una correcta caracterización mecánica de las muestras biológicas hace posible el diseño y la fabricación de diversos materiales compatibles biológicamente y cuyas propiedades físicas recapitulen de la mejor manera posible las condiciones nativas clave que se encuentran en los tejidos biológicos. Teniendo esto en cuenta, se realizó la caracterización mecánica de los hidrogeles de poliacrilamida por medio de las técnicas de microindentación y relajación mecánica, ya que estos métodos no sólo son útiles para la caracterización mecánica de muestras de hidrogel, sino también pueden utilizarse para caracterizar otro tipo de materiales suaves incluyendo células y tejidos (84). Ambos métodos fueron adaptados para ser utilizados en el laboratorio μ NTec con el equipo FemtoTools FT-MTA03 (Micromechanical Testing And Assembly System, FemtoTools AG, Switzerland).

Ensayos de microindentación y relajación

Para llevar a cabo la caracterización mecánica de los hidrogeles, se eligieron 3 formulaciones de la tabla 3.1 requeridas para ensayos biológicos en nuestro laboratorio y que corresponden a una rigidez esperada de 1.10 ± 0.34 , 4.47 ± 1.19 y 34.88 kPa (por simplicidad serán denominados hidrogel de 1, 4 y 34 kPa, respectivamente). Se prepararon según en el protocolo descrito anteriormente en este mismo capítulo (pasos 1 al 5). La figura 3.9 muestra las curvas de fuerza características de los ensayos de relajación y microindentación realizados en distintas condiciones (húmedo y sumergido en agua desionizada más 0.1% de Extran), esto con el fin obtener una caracterización mecánica más completa de los hidrogeles fabricados.

Los paneles 3.9A y 3.9B muestran curvas de fuerza-tiempo (FT) donde se muestran diferentes secciones. La primera sección de la gráfica corresponde al acercamiento de la punta antes del contacto físico con la muestra, en seguida comienza la fase de carga (donde la fuerza aumenta a una tasa que depende del material bajo prueba), hasta que el usuario detiene el desplazamiento de la punta a una fuerza o profundidad de indentación previamente establecida. Luego, comienza la etapa de relajación hasta que la punta se vuelve a desplazar en sentido opuesto con la misma velocidad, comenzando así la sección de retracción (durante la cual la fuerza disminuye a un ritmo dependiente del material).

Particularmente, en el ensayo de relajación es necesario mantener una deformación constante del material, por lo que para comprobar si esta deformación se mantuvo a lo largo del tiempo se graficó la posición z de la punta, debido a que la muestra se encuentra sobre una plataforma con una posición fija en el eje z , entonces una posición constante de la punta implica una deformación constante de la muestra (véanse las gráficas insertadas en la figura 3.9A y 2B).

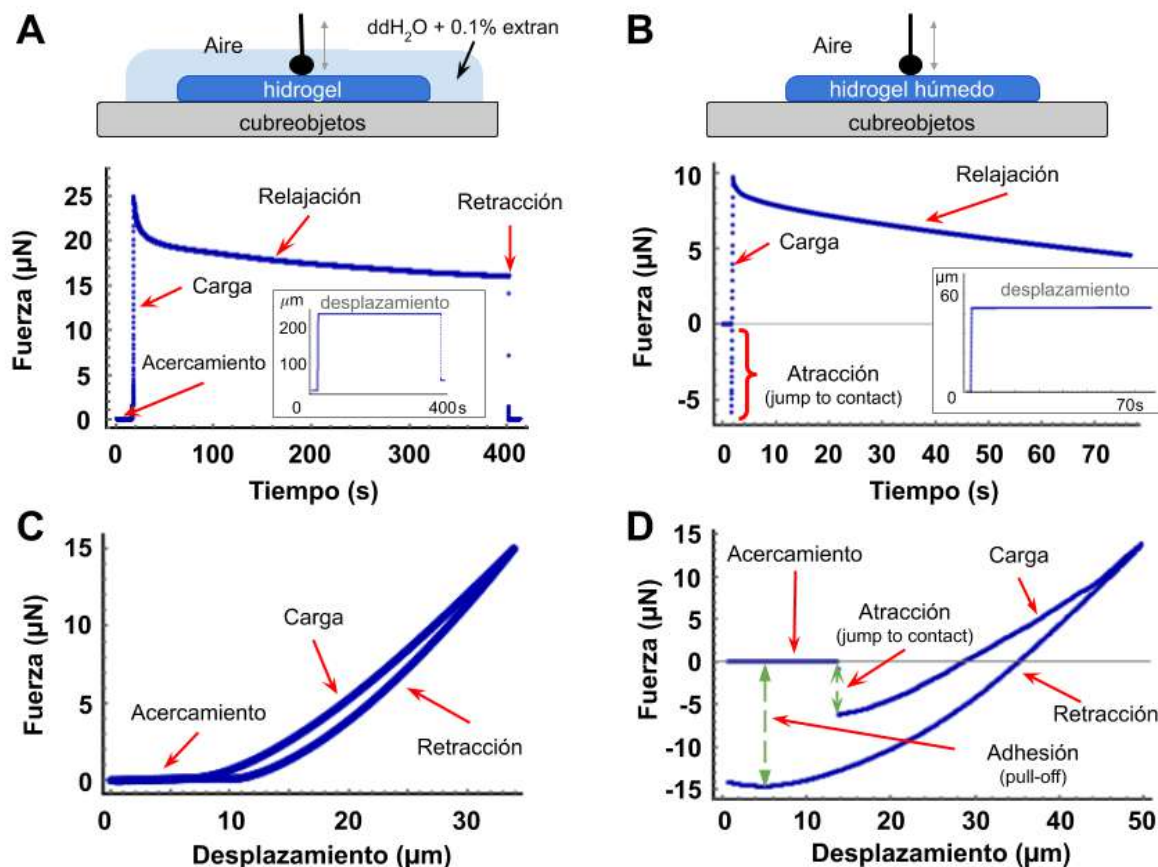


Figura 3.9 | Curvas de fuerza de los ensayos mecánicos de microindentación y-relajación realizados sobre los hidrogeles de PAM fabricados con el protocolo de fabricación establecido en este capítulo. Los paneles A) y B) muestran curvas de fuerza-tiempo representativas de la relajación de un hidrogel de poliacrilamida suave (4 kPa), deformados con una punta esférica de 25 μm de radio. Las flechas rojas señalan las diferentes secciones de la curva y las gráficas incrustadas muestran la posición de la punta, una posición constante equivale a una deformación constante de la muestra. A) gráfica de una curva de relajación obtenida de una muestra medida sumergida en una solución de agua más detergente (ddH₂O + Extran al 0,1%). B): misma curva de una medición en aire de una muestra similar de hidrogel humedecida en agua desionizada (ddH₂O). Las gráficas de C) y D) son curvas de fuerza-desplazamiento, representativas del ciclo de indentación-retracción del mismo hidrogel utilizando la misma punta. De igual manera, las flechas rojas señalan las diferentes secciones de la curva y la magnitud de la atracción entre la punta y la muestra. En las curvas de la medición del hidrogel humedecido se puede observar cierta histéresis entre las secciones de carga y retracción en ambos casos presentados en C) y D).

Los paneles 3.9C y 3.9D muestran curvas de fuerza-distancia (FD), las cuales poseen casi las mismas secciones que las curvas FT, con la diferencia de que inmediatamente después de la sección de carga sigue la sección de retracción. Aunado a esto, es posible observar que

dependiendo de las condiciones de la medición se observará una sección de atracción (ver paneles B y D de la figura 3.9), la cual tiene origen en la tensión superficial entre la punta y el sustrato, esta fuerza de atracción (adhesión) debe de ser tomada en cuenta en el modelo a utilizar para ajustar la curva de fuerza, este efecto es fácilmente inhibido cuando se utiliza un detergente cuya función es disminuir drásticamente la tensión superficial, es este caso fue la razón por la que se utilizó ddH₂O + 0.1 % de Extran.

Corrección del desplazamiento de la punta y punto de contacto

Dado que la punta de indentación se coloca manualmente en el equipo, es necesario descartar cualquier desplazamiento no deseado del mecanismo de la punta durante la medición, ya que, esto puede afectar la medición y por lo tanto los resultados. Para solucionar esto, la rutina de indentación se ejecutó al menos 20 veces y a diferentes velocidades de indentación (1, 50 y 100 $\mu\text{m} / \text{s}$) en un portaobjetos de vidrio. Dado que este material presenta una rigidez de $\sim 70 \text{ GPa}$ (85), se puede considerar que dentro del rango de sensibilidad a la fuerza de la punta FT-S200 que se utilizó en los experimentos (la cual tiene un rango de sensibilidad de 0 - 200 μN), no existe indentación del sustrato. Por lo tanto, cualquier desplazamiento medido corresponde a un desplazamiento del mecanismo de la punta y no a la indentación del portaobjetos de vidrio. La Figura 3.10 muestra una curva FD obtenida de la muesca de un portaobjetos de vidrio (figura 3.10A) y su correspondiente ajuste lineal (figura 3.10B) que resultó en una pendiente de $76.23 \pm 0.18 \mu\text{N} / \mu\text{m}$ ($R^2 = 0.999$). Por lo tanto, la diferencia entre la curva de indentación de las muestras y la curva de indentación del vidrio es la profundidad de indentación real (como se muestra en el panel C de la figura 3.10).

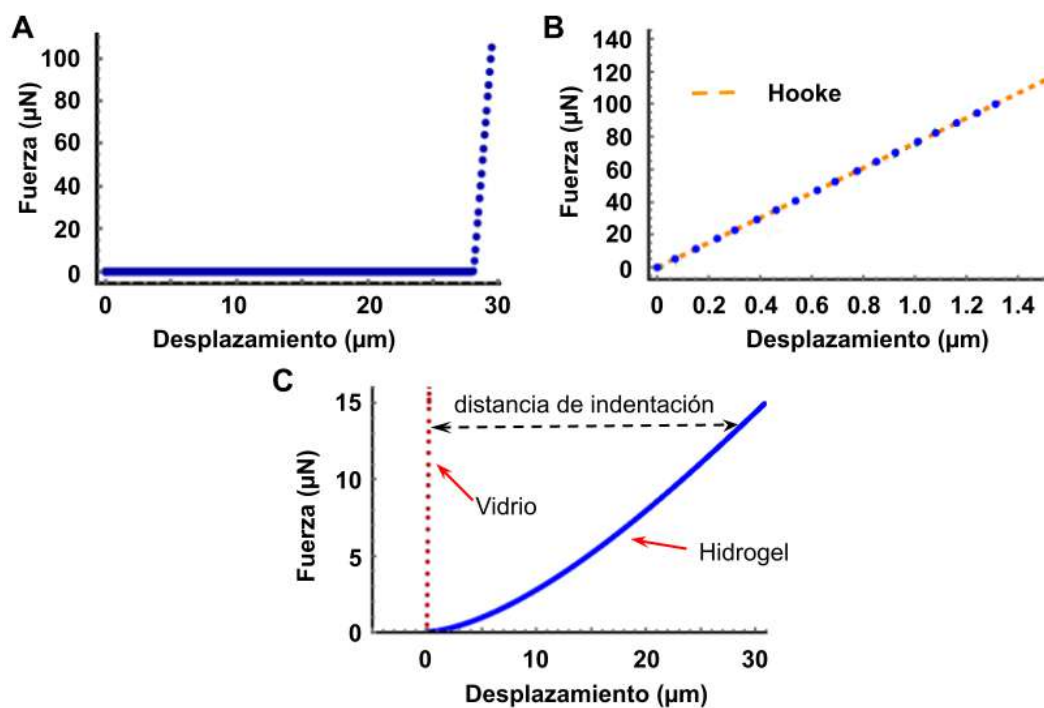


Figura 3.10 | Corrección del desplazamiento de la punta de indentación. A) Curva FD representativa de la indentación de vidrio a una velocidad de indentación de $100 \mu\text{m} / \text{s}$ y una frecuencia de adquisición de datos de 100 Hz. B) Ajuste del modelo Hooke a los datos de indentación del vidrio, C)

comparación entre la curva FD de la indentación de un hidrogel de PAM medido sumergido en ddH₂O + 0.1% Extran (curva azul) y la curva FD de la indentación de vidrio rígido (rojo), asociada al desplazamiento del mecanismo de la punta. La diferencia entre ambas curvas es la distancia de indentación real.

Después de corregir algún posible desplazamiento no deseado de la punta es necesario procesar las curvas de fuerza. Lo primero es encontrar el punto de inicio de la indentación; sin embargo, debido a que se ha reportado que errores muy pequeños en la selección del punto de inicio de la indentación puede provocar grandes cambios en el módulo de elasticidad resultante (86), se implementó un procedimiento que asegura encontrar este punto. Para el caso de las muestras medidas dentro detergente (Figura 3.10 paneles A y C) se asumió que el punto de contacto y el inicio de la indentación coinciden. Sin embargo, para las muestras medidas en húmedo (Figura 3.10 paneles B y D) esto puede no ser así (87), por lo que se consideró que un cambio de la pendiente de la curva de fuerza (1ra derivada) en conjunto con el cambio de la concavidad (2da derivada) marcan el cambio del dominio de las fuerzas que intervienen en la medición. Por lo tanto si se considera que en la curva de fuerza hay cambio del dominio de las fuerzas atractivas que son proporcionales a la distancia de indentación δ ($F_{\text{atracción}} \sim \delta$) y las fuerzas de indentación que son proporcionales a la distancia de indentación a una potencia fraccionaria ($F_{\text{indentación}} \sim \delta^{3/2}$) y se asume que sólo estos dos tipos de fuerza intervienen en la medición, entonces, el máximo de la segunda derivada marca de forma precisa y objetiva el comienzo de la indentación. Esto es válido en los dos tipos de curvas de fuerza (FD y FT), ya que, si $F_{\text{indentación}} \sim \delta^{3/2}$ y suponemos que $F_{\text{indentación}} = F(t)$ entonces $F(t) \sim \delta(t)^{3/2} \Rightarrow dF(t) \sim \frac{3}{2}\delta(t)^{1/2}dt$ y por lo tanto $dF/dt \sim \frac{3}{2}\delta^{1/2}$. Por otra parte, tenemos que $dF/d\delta \sim \frac{3}{2}\delta^{1/2}$ por lo que $dF/d\delta = dF/dt$, mostrando así la equivalencia entre ambas curvas.

Influencia de la velocidad y distancia de indentación (modelos de indentación)

Una vez que se determinó el punto de contacto, es necesario conocer la influencia de los parámetros experimentales; v (velocidad) y d (distancia de indentación). Para ello, se midieron 3 muestras de hidrogel de PAM con una rigidez nominal esperada de $E = 4,47 \pm 1,19$ kPa, sumergidas en ddH₂O + 0.1% Extran, medidas con distintas distancias ($\sim 1, 3, 7, 13$ y $29 \mu\text{m}$) y velocidades de indentación ($\sim 100, 80, 50, 10$ y $1 \mu\text{m} / \text{s}$), las curvas FD obtenidas de estas mediciones fueron analizadas con el modelo de Hertz (ecuación 3.2).

$$F_H = 3/2 E/(1 - \nu^2)r^{1/2}\delta^{3/2} \quad (3.2)$$

donde E es el módulo de Young, ν es el coeficiente de Poisson, r es el radio de la punta y δ es la distancia de indentación. La figura 3.11 muestra que para todas las velocidades, los valores de E calculados disminuyen con la distancia de indentación y se estabilizan rápidamente en un valor fijo o plato, que parece ser independiente de la profundidad. A los diferentes datos de rigidez obtenidos se les realizó un ajuste de decaimiento exponencial, con el que se muestra el decaimiento de E a un valor constante.

Este comportamiento de estabilización de E a un valor constante dependiente de la distancia de indentación, ya ha sido observado por (88), midiendo con AFM geles de agarosa y células pulmonares (ambos materiales poseen una rigidez similar). En ese trabajo, se midió utilizando puntas esféricas con un diámetro de $5\ \mu\text{m}$ y el valor del plato apareció a una indentación de aproximadamente 200 - 400 nm. Curiosamente, la dependencia con la profundidad de indentación es similar tanto en nuestros resultados como en los resultados presentados por Rico et al. (88) con AFM: aparentemente la estabilización del valor de E a un valor constante aparece consistentemente cuando se analizan los datos de las muestras medidos al menos a una profundidad de indentación de $\sim 10\%$ del diámetro de la punta. Esto parece indicar una estimación de la profundidad a la que el material se comporta como bulto, homogéneo y semi-infinito, lo cual es una fuerte hipótesis de los modelos utilizados para determinar el módulo de Young. Esta dependencia de la profundidad del módulo elástico aparente, que se observa en materiales blandos como las células biológicas y los geles, no es nueva, aunque apenas se menciona en los informes de caracterización mecánica. Este resultado es de inmensa relevancia al momento de caracterizar muestras blandas, ya que indica una profundidad de indentación mínima (umbral) que depende del tamaño y la geometría de la punta del indentador, cuyo comportamiento se ha atribuido recientemente a la tensión superficial (89). Sorprendentemente, en nuestro caso, el valor de la meseta también pareció depender de la velocidad de la indentación ($\sim 20\%$ de variación relativa para variaciones de velocidad entre 2 y 5x). Como se ve en los paneles A-C de la figura 3.11 y en el panel 3.11D, cuanto más profunda y lenta es la indentación del material blando, menor es su módulo elástico aparente, lo que sugiere un posible comportamiento viscoelástico, de alguna manera. Para intentar discriminar el impacto de cada parámetro en estos experimentos, se obtuvieron las regiones de Voronoi en la gráfica de densidad del panel 3.11D. Esto se obtuvo con la interpolación de orden cero de Wolfram Mathematica (Wolfram Research, Inc.), produciendo una colección de regiones planas, con pasos en cada punto de datos), cada región de la malla representa la influencia de cada par experimental $E = E(v, \delta)$.

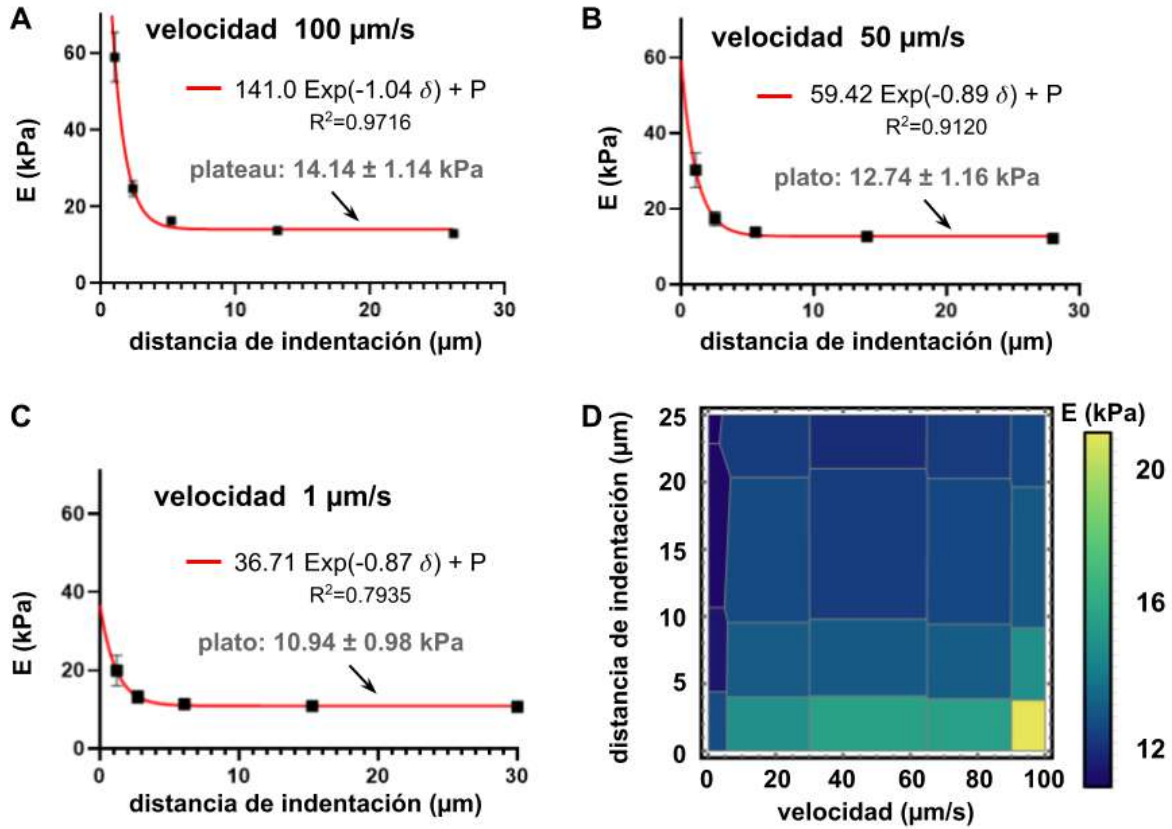


Figura 3.11 | Influencia de la velocidad y la profundidad de indentación en el módulo de Young de un hidrogel PAM de 4 kPa, medido dentro de una solución detergente de ddH₂O + 0.1% extran. Los paneles A-C presentan los resultados para velocidades de 1, 50 y 100 $\mu\text{m/s}$ respectivamente. Los valores presentados fueron obtenidos a partir del ajuste del modelo de Hertz. Al aumentar la profundidad de la indentación, el módulo elástico para cada rango de velocidad disminuye hasta un valor constante de $14,14 \pm 1,14 \text{ kPa}$, $12,74 \pm 1,74 \text{ kPa}$ y $10,94 \pm 0,98 \text{ kPa}$ respectivamente y obtenido a partir de el ajuste de decaimiento exponencial para cada valor de velocidad. Además de las velocidades mostradas en los paneles AC, se probaron velocidades de 80 y 10 $\mu\text{m/s}$, estos resultados se muestran en el diagrama de densidad del panel D. Este gráfico de densidad se divide en diferentes regiones de Voronoi (malla gris) para presentar visualmente la influencia de la velocidad y profundidad de la indentación. En los paneles A-C, las barras de error representan la desviación estándar de la media, cuando no son visibles, son más pequeñas que la dimensión visible del punto de datos.

Para ajustar los datos de las curvas FD que presentan una atracción entre la punta y el sustrato, el modelo clásico de Hertz resulta inadecuado, ya que no toma en cuenta las fuerzas adhesivas, por lo que es necesario implementar el uso de otros modelos de mecánica de contacto que incorporan las fuerzas adhesivas, como: el modelo propuesto por Derjaguin, Muller y Toporov, conocido como modelo DMT y presentado con las ecuaciones 3.3 y 3.4, este modelo se dedujo a partir del cálculo de la energía total del sistema con respecto a la deformación, asumiendo que las fuerzas atractivas no deforman el sustrato (90), por lo que es más adecuado cuando la muestra es rígida y las fuerzas de adhesivas son pequeñas,

$$F = F_H - F_{ad(DMT)} \quad (3.3)$$

$$F_{ad(DMT)} = \pi\Delta\gamma r \quad (3.4)$$

donde F_H es la fuerza de indentación del modelo de Hertz (ecuación 3.2), $F_{(DMT)ad}$ es la fuerza de adhesión en función del trabajo de adhesión $\Delta\gamma$ y del radio de la punta r . Por otro lado el modelo propuesto por Johnson, Kendall and Roberts mejor conocido por modelo JKR (91) y presentado en las ecuaciones 3.5 - 3.7, este modelo es adecuado para muestras blandas y que presenta una fuerte adhesión entre la muestra y la punta de medición.

$$\delta = a_{JKR}^2/r - 4/3(\sqrt{(3(1 - \nu^2) a_{JKR} F_{ad(JKR)})/(4 E r)}) \quad (3.5)$$

$$a_{JKR} = (3(1 - \nu^2)r/4E (\sqrt{F_{(JKR)ad}} + \sqrt{F_n + F_{ad(JKR)}})^2)^{1/3} \quad (3.6)$$

$$F_{ad(JKR)} = (3/2)\pi\Delta\gamma r \quad (3.7)$$

donde $F_{(JKR)ad}$ es la fuerza de adhesión, F_n es la fuerza normal y a_{JKR} es el área de contacto efectiva entre la punta y la muestra. Sin embargo, es necesario el uso del parámetro de Tabor μ para discernir cuál es el modelo adecuado para ajustar los datos de las curvas FD, ya que si $\mu < 0.1$ entonces es conveniente utilizar el modelo DMT, pero si $\mu > 5$ el modelo JKR es más adecuado (92). A continuación, la ecuación 3.8 muestra el parámetro de Tabor.

$$\mu = (r\Delta\gamma^2 / E_r^2 z_0^3)^{1/3} \quad (3.8)$$

donde E_r es el módulo reducido y z_0 es la distancia en equilibrio (definida en (93) como el rango de atracción entre las fuerzas adhesivas cercana a una distancia atómica las cuales se encuentran en un rango de 0.1-0.3 nm), lo cual se definió en (94, 95), en este trabajo se utilizó $z_0 = 0.3$ nm (96), los demás parámetros están definidos en las ecuaciones previas. En este caso el trabajo de adhesión $\Delta\gamma$ se determinó con la magnitud de la fuerza de adhesión F_{ad} presente en la curva de retracción (*jump to contact* en la figura 3.9D) y utilizando la ecuación 3.9:

$$\Delta\gamma = -2F_{adh} / 3\pi R \quad (3.9)$$

Finalmente, el módulo reducido E_r se calculó con la ecuación 3.10:

$$E_r = E / (1 - \nu^2) \quad (3.10)$$

Donde ν es el coeficiente de Poisson de la PAM, se utilizó el valor nominal de 0.457, reportado en (97), y E es el módulo de Young obtenido a partir del ajuste de Hertz presentado en la figura 3.11. Todo el análisis de los datos se realizó utilizando Wolfram Mathematica 12.1. Para los hidrogeles de PAM con una rigidez nominal de 4 kPa medidos solamente humedecidos (figura 3.9D) se encontró un valor del coeficiente de Tabor de $\mu = 31.36 \pm 1.10 \times 10^3$ sugiriendo así el uso de un modelo JKR para ajustar los datos experimentales. La figura 3.12 muestra los ajustes a las curvas FD de los diferentes modelos empleados, en nuestro caso es importante reconocer que el modelo JKR que se muestra en

el panel B y D de la figura 3.12 muestra claramente que está lejos de ser un ajuste ideal para ajustar con precisión los datos. Esto sugiere un comportamiento dependiente de la velocidad de deformación.

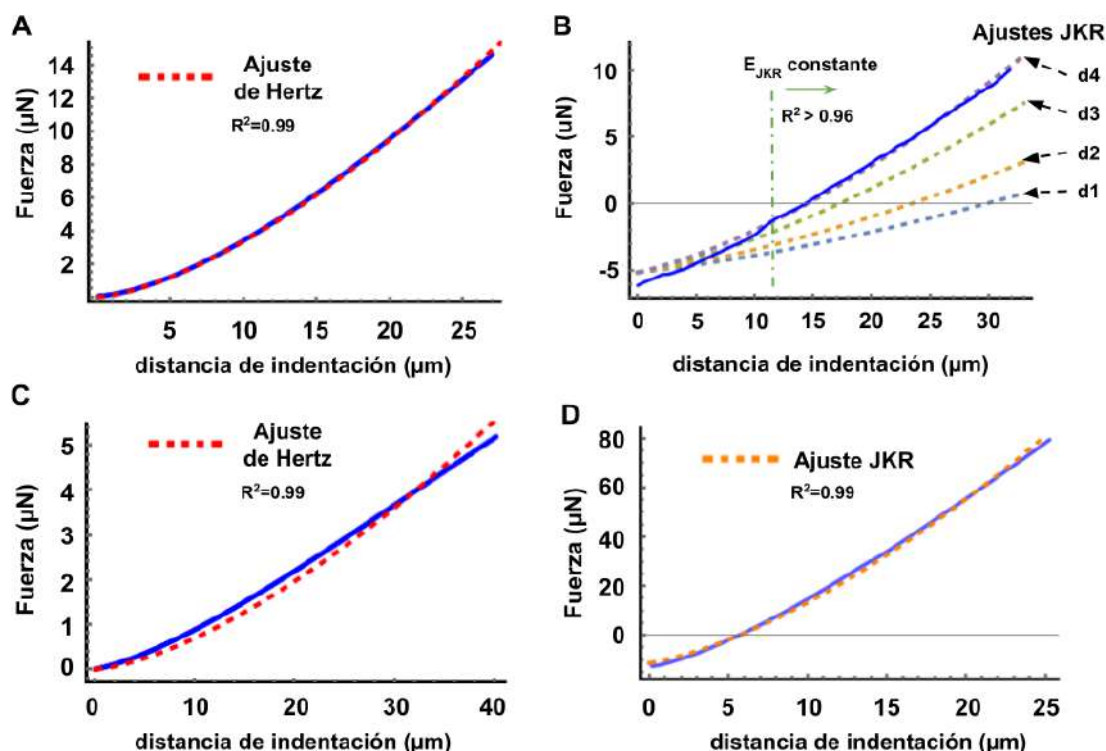


Figura 3.12 | Curvas representativas del ajuste de las curvas FD. A) Ajuste del modelo de Hertz de la indentación de un hidrogel PAM de 4 kPa en $\text{ddH}_2\text{O} + 0.1\%$ Extran. El arrastre viscoso se calculó utilizando la pendiente de la curva de aproximación (figura 3.9C) obteniendo $0,006 \pm 0,005 \mu\text{N} / \mu\text{m}$ a una velocidad de indentación de $100 \mu\text{m} / \text{s}$, que es despreciable en comparación con el cambio de $\sim 0,3 \mu\text{N}$ debido a la relajación. con la misma velocidad de indentación. B) Ajuste del modelo JKR de la muesca del mismo hidrogel PAM medido mientras solo humedecido. Hay una subestimación de la pendiente (por lo tanto, el módulo elástico) cuando se modelan datos con distancias inferiores a $\sim 10 \mu\text{m}$. Además, para profundidades de indentación superiores a $\sim 11 \mu\text{m}$, el módulo de Young alcanza un valor de meseta que es similar al comportamiento presentado en la figura 3.11. C) Ajuste del modelo de Hertz a una muestra de hidrogel de PAM con una rigidez nominal de $\sim 1.1 \text{ kPa}$, medido dentro detergente. D) Ajuste del modelo JKR de un hidrogel rígido de $\sim 35 \text{ kPa}$, medido cuando solo está humedecido en agua desionizada. Se observa una atracción clara de $\sim 10 \mu\text{N}$, el doble de la del hidrogel PAM suave ($\sim 5 \mu\text{N}$), lo que sugiere una posible dependencia de la atracción de la punta con la rigidez de la muestra (proporción entre acrilamida y bisacrilamida).

Estos resultados sugieren que la caracterización mecánica por microindentación puede no estimar de manera correcta las propiedades mecánicas de los hidrogeles suaves, dado que el módulo elástico no toma en cuenta fenómenos, como: la histéresis observada en la Figura 3.9 entre la fase de carga y retracción, lo que indica la existencia de disipación de la energía elástica durante la indentación, así como la dependencia del módulo de Young en función de la velocidad a pesar de estabilizarse a determinada profundidad de indentación, lo que indican claramente que varios parámetros afectan las curvas FD, y por lo tanto influyen en el valor del módulo de Young. Los modelos de indentación clásicos no toman en cuenta los fenómenos disipativos que ocurren en los materiales, cuyo origen puede recaer en la

naturaleza poroelástica o viscoelástica del material y que pueden afectar seriamente las mediciones (98), lo que exige un método de caracterización más completo. Debido a esto se propuso caracterizar las muestras por medio de un ensayo de relajación, con el que es posible conocer el comportamiento temporal de las muestras medidas.

Comportamiento viscoelástico de los hidrogeles

Para comparar el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles de PAM sugerido por la histéresis encontrada en las curvas de indentación (99), adicionalmente se midieron y compararon otros dos tipos de hidrogeles con propiedades distintas y más complejas. En primer lugar, se fabricó un hidrogel de PAM viscoelástico (V-PAM) con un módulo de almacenamiento de $G(\omega_0 = 1 \text{ Hz})' = 1.6 \text{ kPa}$ y un módulo de pérdidas de $G(\omega_0 = 1 \text{ Hz})'' = 200 \text{ Pa}$, siguiendo el protocolo descrito por (75), si se considera que $E = (1 + 2\nu)G^*$ con $G^* = \frac{G(\omega_0)'+G(\omega_0)''}{2}$ (100) y sabiendo que el coeficiente de Poisson de la PAM es de $\nu = 0.457$ (101), entonces se obtiene un módulo equivalente de $E = 1.723 \text{ kPa}$. Este material V-PAM es realmente interesante porque está compuesto por una red de PAM reticulada e interpenetrada con cadenas lineales independientes y no reticuladas de acrilamida dentro de la red PAM que se mueven libremente y permiten una disipación viscosa. Luego, también se fabricó un hidrogel de PAM completamente elástico pero más suave (1.1 kPa, ver tabla 3.1), este hidrogel presenta un tamaño de poro mayor que los hidrogeles de PAM de 4.44 kPa (102).

Para la prueba de relajación, se debe determinar de igual manera el punto de contacto, como se describió anteriormente con el fin de establecer el inicio de la relajación. Luego, se debe de encontrar el valor máximo de la fuerza F_{MAX} para extraer sus valores asociados de tiempo t_{FMAX} y desplazamiento d_{FMAX} , lo que a su vez permite determinar la profundidad de indentación δ como $d_{FMAX} - d_C$ donde d_C es la distancia desde el punto de contacto, según lo definido por el equipo. Luego, se utilizó el modelo de Maxwell generalizado (GMM) para determinar el módulo de relajación $E(t)$ de la siguiente manera (103), la forma del módulo de relajación se presenta a continuación en la ecuación 3.11:

$$E(t) = k_{\infty} + \sum_1^N k_i \text{Exp}(-t/\tau_i) \quad (3.11)$$

donde k_{∞} es la rigidez a largo plazo, τ_i es el i -ésimo tiempo de relajación definido como $\tau_i = \eta_i/k_i$ donde η_i y k_i son la viscosidad y rigidez asociadas al tiempo característico τ_i . Dado que el microindentador experimentalmente mide la fuerza en lugar de la rigidez (fuerza por unidad de área), se utilizó un factor de forma para transformar los parámetros obtenidos y corregir las unidades dimensionales. Para definir este factor de equivalencia, se asumió, que la dependencia temporal de la curva de relajación está definida enteramente por $k(t)$ que representa un parámetro propio de la muestra. Además, ya que la profundidad de indentación es constante, entonces $F(t) \simeq k(t)$, donde $F(t)$ es la fuerza medida por el microindentador. Por lo tanto, si se conoce el área de la superficie indentada por la punta de prueba, entonces es posible recuperar $E(t)$ de $k(t)$, y el factor de forma (SF) está definido por la geometría de la interfaz superficie-punta y la relación de Poisson del material bajo

prueba, siguiendo la ecuación utilizada por (104) se obtiene que $k(t) = SF E(t)$ y el factor de forma (SF) está definido por la ecuación 3.12:

$$(3.12) \quad \text{factor de forma } (SF) = (4\pi a)/(7(1 + \nu)(1 - \nu))$$

donde a representa el área de contacto entre la punta y el sustrato definida como $a = \sqrt{r\delta}$ donde r es el radio de la punta y δ la distancia de indentación dentro de la muestra, esto es si la muestra no presenta adhesión, en el caso de presentar adhesión se debe utilizar el área de contacto del modelo JKR definida en la ecuación 3.6. Para ajustar la ecuación 3.11 a los datos experimentales se desarrolló un programa con el software Wolfram Mathematica 12.1 y se utilizó el criterio de información de Akaike (105) para determinar el grado N del ajuste y evitar un sobreajuste del número de parámetros.

A partir de los valores de τ_i y k_i ajustados a partir del GMM, es posible obtener un espectro de relajación discreto asociado al GMM que define la mecánica del material. El espectro de relajación $H(\tau)$ se construye a partir de funciones tipo delta de Dirac $\delta(t - \tau_i)$ para cada i -ésimo tiempo de relajación con una amplitud k_i/k_{max} normalizada con respecto a la rigidez más máxima k_{max} . Este espectro permite comparar los tiempos de relajación y el comportamiento dinámico de las diferentes condiciones en los diferentes tipos de muestras. Además, si se considera que los hidrogeles PAM presentan un comportamiento viscoelástico lineal, entonces, es posible calcular teóricamente su módulo dinámico de almacenamiento $E'(\omega)$ junto a su módulo de pérdida $E''(\omega)$ en función de la frecuencia angular ω , a partir de los valores de τ_i y k_i y las ecuaciones 3.13 y 3.14 (106).

$$E' = k_{\infty} + \sum_{i=1}^N (k_i \tau_i^2 \omega^2) / (1 + \tau_i^2 \omega^2) \quad (3.13)$$

$$E'' = \sum_{i=1}^N (k_i \tau_i \omega) / (1 + \tau_i^2 \omega^2) \quad (3.14)$$

La figura 3.13A presenta ciertas curvas FT representativas de la relajación durante 60 s de las 3 muestras de hidrogel, las curvas FT se normalizaron a la fuerza máxima F_{MAX} de cada curva, la cual coincide con la fuerza medida por el equipo justo al momento del inicio de la relajación. Se procuró que la distancia de indentación fuera muy similar en las muestras medidas, por lo que la profundidad de indentación para la muestra de 4 kPa fue de $23,94 \pm 1,17 \mu\text{m}$ para el hidrogel de 1 kPa fue de $25,12 \pm 3,85 \mu\text{m}$ y para los hidrogeles de viscoelásticos fue de $28,89 \pm 3,09 \mu\text{m}$. Como era de esperarse, los materiales medidos presentan distintas respuestas de relajación, debido a que cada muestra tiene características mecánicas diferentes, i.e. el hidrogel viscoelástico tiene cadenas lineales de acrilamida inmersas en su red y el hidrogel de 1 kPa tiene un mayor tamaño de poro que el hidrogel de 4 kPa (107), lo que se verá reflejado en la velocidad a la cual relaja el material. Esto se ve reflejado en que el hidrogel elástico más rígido (4 kPa PAM) dejó de relajarse después de 50 segundos y se estabilizó a un valor constante mientras que los otros dos materiales continuaron relajándose, aunque a diferente velocidad.

El hecho de que los hidrogeles de poliacrilamida presentan cierta relajación (figura 3.13A) que es asociada a la disipación de la energía elástica debido a que sufren una deformación constante puede parecer anormal ya que se reporta que son sustratos elásticos. Sin embargo, parte de la relajación de los hidrogeles de PAM tiene su origen en la naturaleza poroelástica de los hidrogeles, debido a que este material está conformado por una matriz elástica porosa interpenetrada por un fluido intersticial que puede fluir y escapar, lo que hace este material similar a una esponja (108–110). Este comportamiento explica también la histéresis observada en las curvas FD mostradas en la figura 3.19C y 3.19D. Entonces, independientemente del origen físico de la relajación del material (p.j. confirmación de la estructura interna, poroelasticidad / fase líquida o viscoelasticidad de la red), el método de caracterización mecánica permite determinar de forma precisa los tiempos de relajación intrínsecos del material. Estos tiempos de relajación son característicos de cada muestra y corresponden a su arquitectura y composición; se presentan de forma visual en la figura 3.13B como deltas de Dirac. En este caso, los tiempos de relajación donde influye la porosidad del material podrían ser los que se encuentran en el intervalo que va de los 3 a los 6 segundos porque este tiempo de relajación está ausente de las mediciones de muestras empapadas en aire, en las que no hay posibilidad para que el medio sea expulsado de la estructura por presión. Allí, los tiempos de relajación del hidrogel de 1 kPa son ligeramente más altos que los de los geles V-PAM lo que podrían deberse a un mayor tamaño de poro, facilitando así la reabsorción. En el panel 3.13C se observa que los hidrogeles de 1 kPa y V-PAM presentaron un comportamiento elástico muy similar, explicado por su módulo de almacenamiento muy similar, lo que también es consistente con el módulo de Young medido en estos geles.

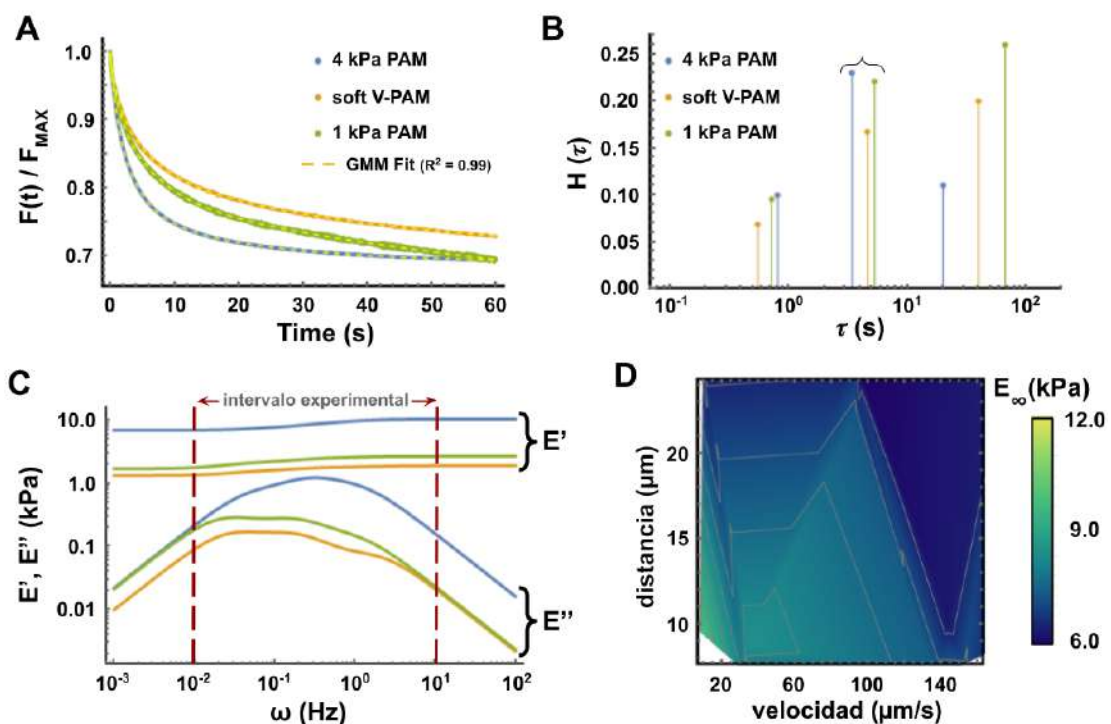


Figura 3.13 | Caracterización mecánica de 3 tipos de hidrogeles de PAM: hidrogel elástico de 1 kPa, hidrogel elástico de 4 kPa e hidrogel viscoelástico. (A) Comparación entre las curvas FT (la relajación se realizó durante 60 s con velocidad de indentación de $\sim 100 \mu\text{m} / \text{s}$ con una frecuencia de

adquisición de datos de 100 Hz) con su respectivo ajuste de GMM. Las curvas se normalizaron a F_{MAX} . (B) Espectro de relajación obtenido del ajuste GMM a tercer orden, los puntos representan deltas de Dirac. (C) A partir de los ajustes GMM de tercer orden junto a las ecuaciones 3.13 y 3.14, se calcularon los módulos dinámicos $E'(\omega)$ y $E''(\omega)$ para cada tipo de muestra. La resolución experimental es el rango de frecuencias correspondiente a los tiempos de medición reales (0-60 segundos a 100 Hz). (D) Influencia de la profundidad y la velocidad de la indentación en la rigidez a largo plazo E_∞ para la muestra de 4 kPa PAM. Para todas las gráficas, se midieron 2 muestras independientes en al menos 5 ubicaciones diferentes para cada condición.

La figura 3.13C muestra los módulos dinámicos $E'(\omega)$ y $E''(\omega)$ calculados a partir de los parámetros derivados del ajuste del modelo GMM a tercer orden con las ecuaciones 3.13 y 3.14. La resolución experimental presentada en la figura 3.13C como “intervalo experimental” representa el rango de frecuencia equivalentes a la escala de tiempo real en la que se realizaron las mediciones. De hecho, es necesario enfatizar que los tiempos característicos obtenidos con el ajuste del GMM ofrecen solo una representación discreta del espectro real. Por tanto, el módulo de almacenamiento de los tres materiales mostrado en la figura 3.13C es equivalente al módulo elástico aparente y comparable con lo reportado en la literatura (ver la tabla 3.4).

Debido a que se conoce que los tiempos de relajación característicos de los materiales poroelásticos dependen en gran medida de las condiciones experimentales y especialmente del coeficiente de difusión que cuantifica la facilidad del movimiento del fluido en una red polimérica (111), esta dependencia será del orden de $\sim \frac{\sqrt{R_{tip}} \delta}{D}$ donde R_{tip} es el radio de la punta, δ es la profundidad de la indentación y D es el coeficiente de difusión del gel (normalmente del orden de 10^{-10} m²/s para agua por el PAM) (112). Entonces se infiere que las diferentes condiciones de cada uno de los geles (diferente porosidad y volumen libre) pueden explicar las variaciones de los tiempos de relajación encontrados. Esto también sugiere que la viscosidad del medio probablemente influirá en la mecánica de los geles bañados en él, como se encuentra en (113). La figura 3.13D muestra la influencia de la velocidad y la profundidad de la indentación en el módulo elástico a largo plazo E_∞ de la muestra de 4 kPa PAM, ahora, cuando se compara con el mismo gráfico construido en la Figura 3.11D que muestra los valores obtenidos por medio de microindentación y ajustando el modelo de Hertz, las variaciones de E_∞ son menores, ya que oscilan en un rango de alrededor de 6 kPa, mientras que las variaciones de E están en un rango de 10 kPa. También se observa que para velocidades de indentación de ~ 140 $\mu\text{m} / \text{s}$, la rigidez a largo plazo E_∞ es casi independiente de la profundidad de indentación. Esto es consistente con los valores reportados en la literatura que muestran que es preferible una velocidad de indentación más alta (114). Además, para demostrar la practicidad y relevancia del método de medición desarrollado en este trabajo, se caracterizaron adicionalmente un muestra de un hidrogel con una rigidez nominal de 34 kPa y dos muestras de PDMS sylgard 184 con una proporción en peso (w/w) de 10:1 y 15:1, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.4.

Uno de los principales resultados que se puede observar en la tabla 3.4 es que si sólo se mide el módulo elástico no es posible diferenciar el comportamiento temporal de dos muestras diferentes como la muestra de PAM con una rigidez nominal de 1 kPa y el hidrogel viscoelástico de PAM. Esto resulta de vital importancia en los ensayos de mecanobiología, ya que como se mencionó en los capítulos uno y dos de esta tesis, las propiedades

mecánicas influyen de manera relevante en el comportamiento, destino y función celular (75) y además la alteración de esta está asociada a ciertas patologías como el cáncer y la fibrosis (115–117).

Tabla 3.4 | Comparación de valores de módulos elásticos obtenidos para diferentes métodos, materiales y condiciones: E = módulo de Young calculado, E_{∞} = rigidez a largo plazo, E' = módulo de almacenamiento evaluado a 1 Hz y E_{ref} = módulo de Young informado. Detergente y empapado son las condiciones representadas en la Figura 2 y seco es una condición para la cual la muestra no se humedece y se mide en aire a temperatura ambiente. Se usó el modelo JKR para ajustar los datos experimentales para muestras empapadas y secas, el modelo Hertz se usó para muestras sumergidas en solución detergente. Todos los valores informados son media \pm desviación estándar para cada condición (se caracterizaron dos muestras en al menos 6 ubicaciones diferentes).

		4 kPa PAM (kPa)	4 kPa PAM (kPa)	V-PAM (kPa)	1 kPa PAM (kPa)	Stiff PAM (kPa)	PDMS ² 10:1 (MPa)	PDMS ² 15:1 (MPa)
Tipo de medición		húmedo	extran*	extran	extran	húmedo	seco	seco
Valor reportado	E_{ref} Ref	4.47 \pm 1.19 (118)	-	1.723 ¹ (119)	1.10 \pm 0.34 (118)	34.88 (118)	1.35 - 2.01 (120)	0.9 - 1.2 (121)
Indentación	E	8.92 \pm 0.55	12.60 \pm 0.42	3.73 \pm 0.27	3.37 \pm 0.17	38.72 \pm 8.71	0.91 \pm 0.09	0.63 \pm 0.01
Relajación	E_{∞}	6.00 \pm 0.57	6.41 \pm 0.44	1.55 \pm 0.31	1.63 \pm 0.39	36.01 \pm 2.67	1.61 \pm 0.48	0.61 \pm 0.17
	E'	8.25 \pm 1.47	8.78 \pm 0.80	2.09 \pm 0.40	2.57 \pm 0.50	39.93 \pm 2.54	1.68 \pm 0.47	0.65 \pm 0.16

* muestra medida sumergida en ddH₂O + 0.1% de Extran, ¹ valor de E comparable a G' , ²PDMS curado a 60°C en un horno de convección por 4 h

Validación biológica del control de la mecánica de los hidrogeles

Para validar que las características mecánicas medidas de los hidrogeles de PAM son percibidas por las células, se sembraron fibroblastos humanos BJ sobre los hidrogeles de PAM conjugados con colágena tipo 1 (0.1 mg/mL). La figura 3.14 muestra la influencia de la rigidez del sustrato sobre el esparcimiento celular (área de la célula proyectada), la densidad y la translocación del factor de transcripción YAP al núcleo en los fibroblastos humanos BJ. En particular, se marcó fluorescentemente esta proteína (Yes Associated Protein, YAP por sus siglas en inglés), debido a que un incremento de la localización YAP en el núcleo celular está asociado a que la célula percibe un sustrato más rígido (122).

La evidencia mostrada en la figura 3.14 es contundente, la rigidez influye de manera clara en el comportamiento de los fibroblastos humanos BJ, de modo que existe una diferencia estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en el comportamiento celular, ya que las células en el hidrogel de 6.41 \pm 0.57 kPa adquieren una mayor área proyectada (*spreading*) que los fibroblastos sembrados en el hidrogel suave de 1.63 \pm 0.39 kPa (figura 3.14C), además, el panel 3.14D muestra que en los fibroblastos sembrados en el hidrogel más rígido, el porcentaje de YAP translocado al núcleo es 40% mayor que en las células sembradas en el sustrato más suave, esta misma observación persiste en la densidad celular. Por último, con base en los resultados mostrados en este trabajo mostramos que el ensayo de relajación es sumamente relevante para obtener una caracterización mecánica más robusta que la que se obtiene por medio de un ensayo clásico de microindentación, esto se ve reflejado directamente en el comportamiento de los tipos celulares sembrados en estos materiales, esto se resume en la tabla 3.4 y las figuras 3.13 y 3.14. Cabe señalar que los ensayos biológicos fueron realizados por el responsable del área biológica del laboratorio μ nTec pero cuantificados y analizados por el autor de este trabajo.

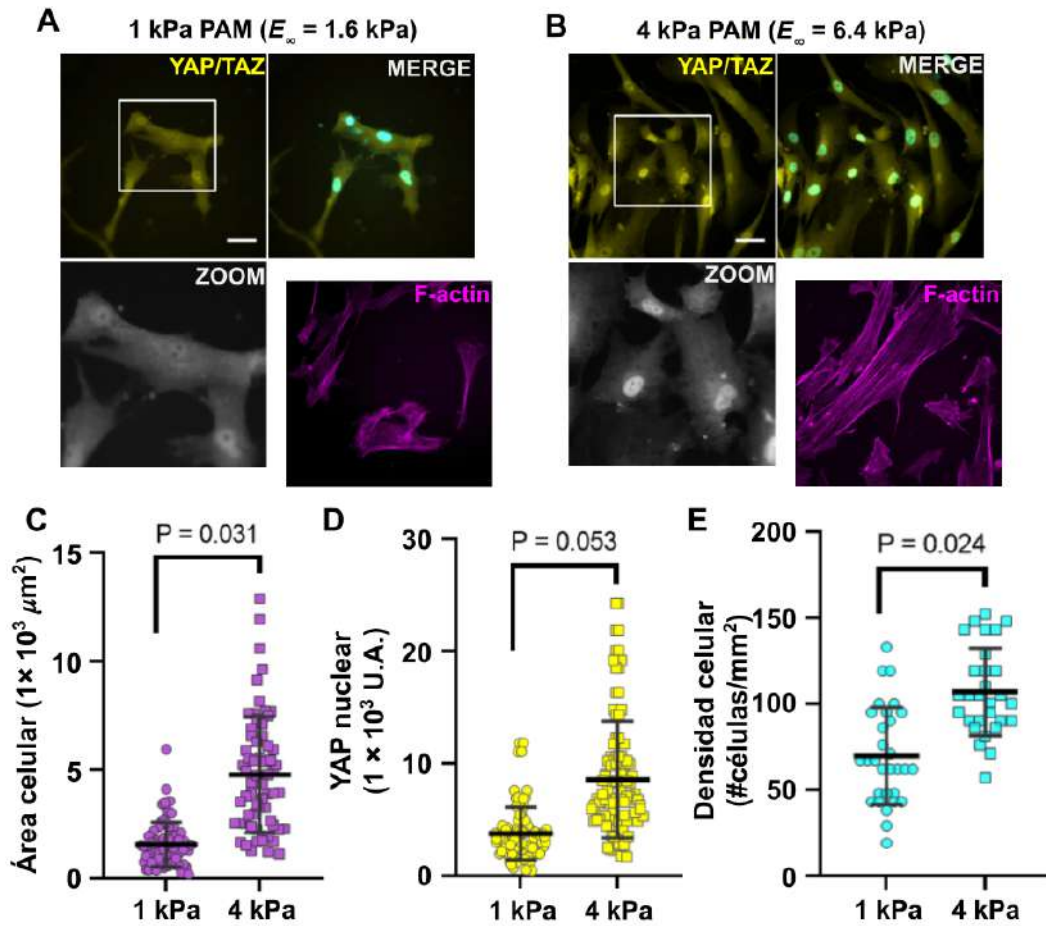


Figura 3.14 | Mecano-respuesta de los fibroblastos humanos inmortalizados sembrados sobre hidrogel elásticos con dos rigideces diferentes. Los fibroblastos humanos BJ se sembraron durante 48 horas en hidrogel de poliacrilamida de 1 kPa (panel A) y 4 kPa (panel B) conjugados superficialmente con [100 $\mu\text{g} / \text{mL}$] de colágena tipo I. Las fotografías se obtuvieron a través del marcaje inmunofluorescente del núcleo con DAPI (cian) y de los filamentos de actina (F-actina) con faloidina acoplada a Alexa-488 (magenta). El marcaje de YAP se realizó por medio de inmunofluorescencia y las fotografías se obtuvieron por microscopía de epifluorescencia. La localización de las proteínas YAP se destacó en los cuadrados de zoom (gris). C) Cuantificación del esparcimiento celular (área celular) de los fibroblastos sembrados en los sustratos de 1 kPa y 4 kPa. D) Cuantificación de la localización nuclear de la proteína YAP en los fibroblastos cultivados sobre sustratos de 1 y 4 kPa. La intensidad de la fluorescencia se presentó en unidades arbitrarias derivadas de la fluorescencia celular total corregida (CTCF). E) Densidad celular de fibroblastos cultivados en sustratos de 1 y 4 kPa durante 48 h. Los datos muestran que para las células cultivadas en la condición más rígida, hay más células adheridas por unidad de área. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes ($n = 3$). Para probar las diferencias estadísticas se realizó una prueba T con corrección de Welch. Las barras presentadas en los gráficos son la media \pm desviación estándar. El tamaño de la barra es de 50 μm .

Capítulo 4. Hidrogeles de PAM como plataformas de cultivo con rigidez y estructura controladas.

Para validar el procedimiento de fabricación de los hidrogeles de poliacrilamida y demostrar su utilidad como sustratos de cultivo celular con rigidez y estructura geométrica controladas, se buscó explorar la influencia conjunta de la curvatura y el confinamiento espacial sobre la morfología y dinámica colectiva de las células epiteliales renales (línea celular AD-293). De igual manera, se estudió la influencia conjunta del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y la rigidez del sustrato sobre la dinámica colectiva de las células pulmonares A549 (células de cáncer de epitelio alveolar) y NHLS (fibroblastos normales de pulmón de humano).

Como se mencionó en el capítulo dos de este trabajo, el citoesqueleto no sólo provee soporte estructural a la célula, sino además es uno de los principales mecanismos que la célula utiliza para percibir su entorno, ya que, este está conectado al exterior por medio de diferentes estructuras, como las adhesiones (8). Entonces, para cuantificar la respuesta celular a los estímulos mecánicos externos se midió el área proyectada por la célula (*spreading*) y la forma de estas, ya que, ha sido ampliamente reportado que las células adheridas a sustratos suaves presentan una geometría redondeada y un área proyectada pequeña en comparación a la que presentan en los sustratos más rígidos donde adoptan una geometría estrellada (18, 123). Además, la geometría celular está ampliamente relacionada con su supervivencia (22) y con diferentes estados patológicos como la fibrosis (124).

Nota: A partir de este momento se presentarán diversos experimentos con cultivos celulares con marcaje inmunofluorescente, por lo que las especificaciones técnicas tanto de los cultivos realizados, así como el marcaje y la toma de imágenes se describirán en el Anexo 1 de especificaciones experimentales.

Influencia de la curvatura y confinamiento geométrico de las células epiteliales embrionarias renales AD-293

Para explorar la influencia conjunta de la curvatura y confinamiento geométrico de la célula sobre la morfología de la línea celular AD-293, se realizó la estructuración de hidrogeles de PAM con una geometría bien definida de pozos y pilares como se describe anteriormente en este capítulo, Se eligió esta geometría debido a que, en el entorno fisiológico, diversos tipos de células se encuentran inmersos en microambientes con características mecánicas y geométricas específicas como lo es la curvatura (125, 126). Particularmente, las células renales se encuentran inmersas en una estructura tubular, la cual es crítica para mantener las funciones del riñón (127, 128). Debido a esto, es de vital importancia estudiar cómo estos parámetros impactan la morfología y organización colectiva de las células renales y por lo tanto la función general del órgano (129). Aunque existen estudios previos donde se ha explorado cómo la curvatura del sustrato afecta sustancialmente la forma, la orientación y la polarización de las células epiteliales renales (líneas celulares HK-2 y MDCK) (128), no se tomaron en cuenta efectos de frontera y efectos de confinamiento, además, poco ha sido explorado sobre cómo un cambio en la frontera de una superficie 3D influye en la organización estructural del citoesqueleto y en el comportamiento colectivo activo de las

células epiteliales (130). La figura 4.1 muestra un diagrama donde se ejemplifica tanto el proceso de estructuración de los hidrogeles así como la conjugación superficial de proteína y su caracterización mecánica. Los hidrogeles producidos se estructuraron con 3 arreglos de pilares con diferentes diámetros (1, 0.20 y 0.15 mm) y alturas (0.1, 0.1 y 0.05 mm, respectivamente), el panel 4.1A muestra el esquema de los arreglos a replicar, el panel 4.1B muestra el diseño CAD para su fabricación por medio de micromaquinado CNC de un molde de acrílico (PMMA) cuyo resultado se muestra en el panel 4.1C, con detalle de dos estructuras. Las réplicas con un hidrogel de PAM de 5 kPa de rigidez nominal se observan en el panel 4.1D, demostrando la fabricación correcta de las estructuras según el diseño. El panel 4.1E muestra por medio de microscopía de epifluorescencia la presencia superficial de proteína (Colágena tipo I) que se colocó para promover la adhesión celular y, finalmente, el panel 4.1F muestra la caracterización mecánica del sustrato por medio de una prueba de relajación que se describe en la sección anterior.

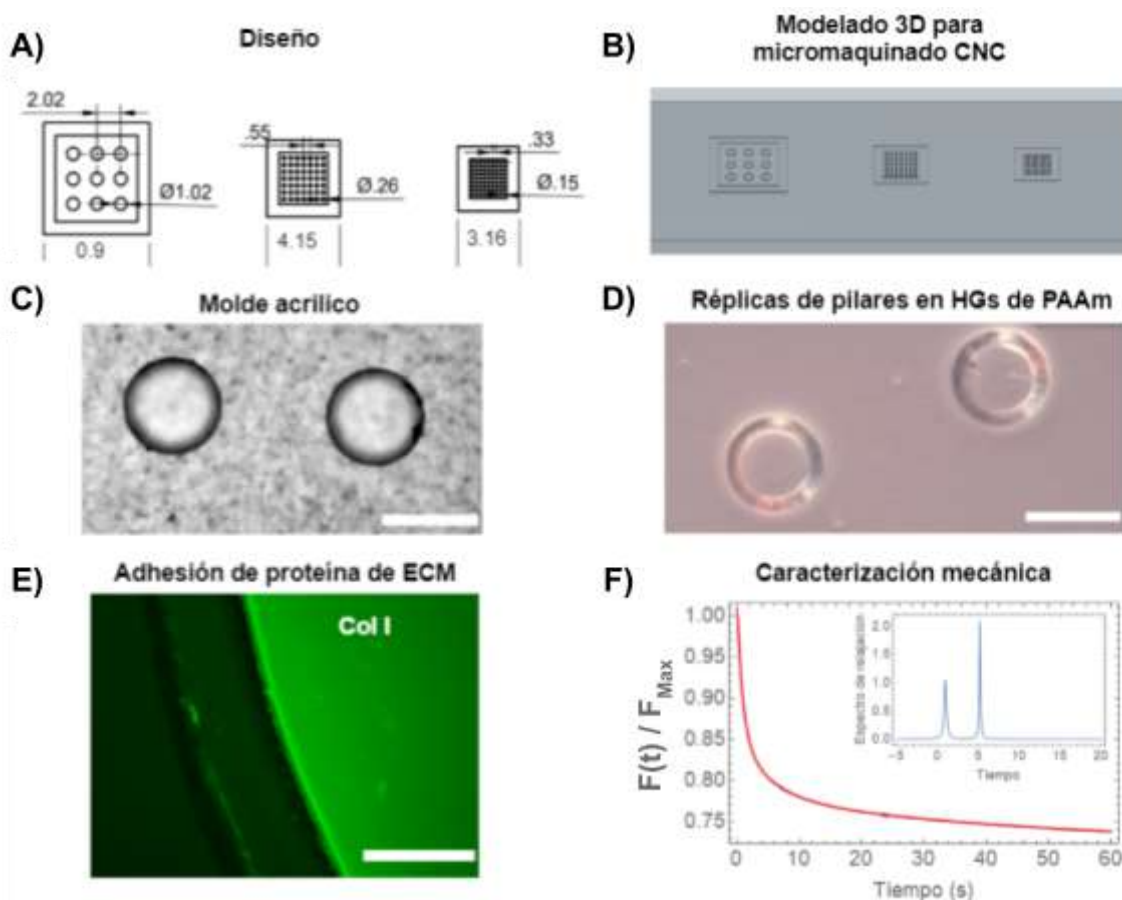


Figura 4.1 | Proceso de estructuración de los hidrogeles (HG) de PAM, A) diagrama de los arreglos diseñados con un factor de llenado 1:7, B) modelado 3D para micromaquinado por control numérico por computadora (CNC), C) micrografía de una sección del molde producido en acrílico (PMMA), D) réplica en HG del molde de PMMA, E) micrografía de fluorescencia que demuestra la presencia de colágena tipo I en la superficie del hidrogel, F) datos y ajuste del modelo de maxwell para la caracterización mecánica del HG por relajación mecánica. Las dimensiones en (A) son mm. Tamaño de la barra 150 μm .

Sobre los pilares circulares con diferentes radios de curvatura ($13.3, 8$ y 2 mm^{-1}) acomodados en arreglos cuadrados con un factor de llenado de 1:7 (esto significa que el área

total del arreglo es siete veces el área efectiva de la superficie superior de los pilares), conjugados superficialmente con colágena tipo I, se sembraron 2.8×10^5 células AD-293, las cuales después de 48 horas de cultivo se fijaron con paraformaldehído al 4% para observarlas. Después, se cuantificó el área celular (*spreading*) celular para cada sección geométrica del pilar (base, cima de los pilares y superficie cóncava) y se comparó con el *spreading* de células sobre hidrogeles con una rigidez nominal de 1 y 23 kPa sembrados a baja y alta densidad. Además se realizó un ensayo de inmunofluorescencia marcando, el núcleo, F-actina y YAP con el fin de observar el acomodamiento y organización espacial del citoesqueleto junto a la forma celular, ya que esto cuantifica la forma en la que las células perciben la rigidez del sustrato (como ya se mencionó una forma redondeada y pequeña es propia de sustratos suaves y una forma irregular o estrellada junto a un área proyectada mayor es característica de las células sobre sustratos rígidos), los resultados obtenidos se resumen en las figuras 4.2 y 4.3.

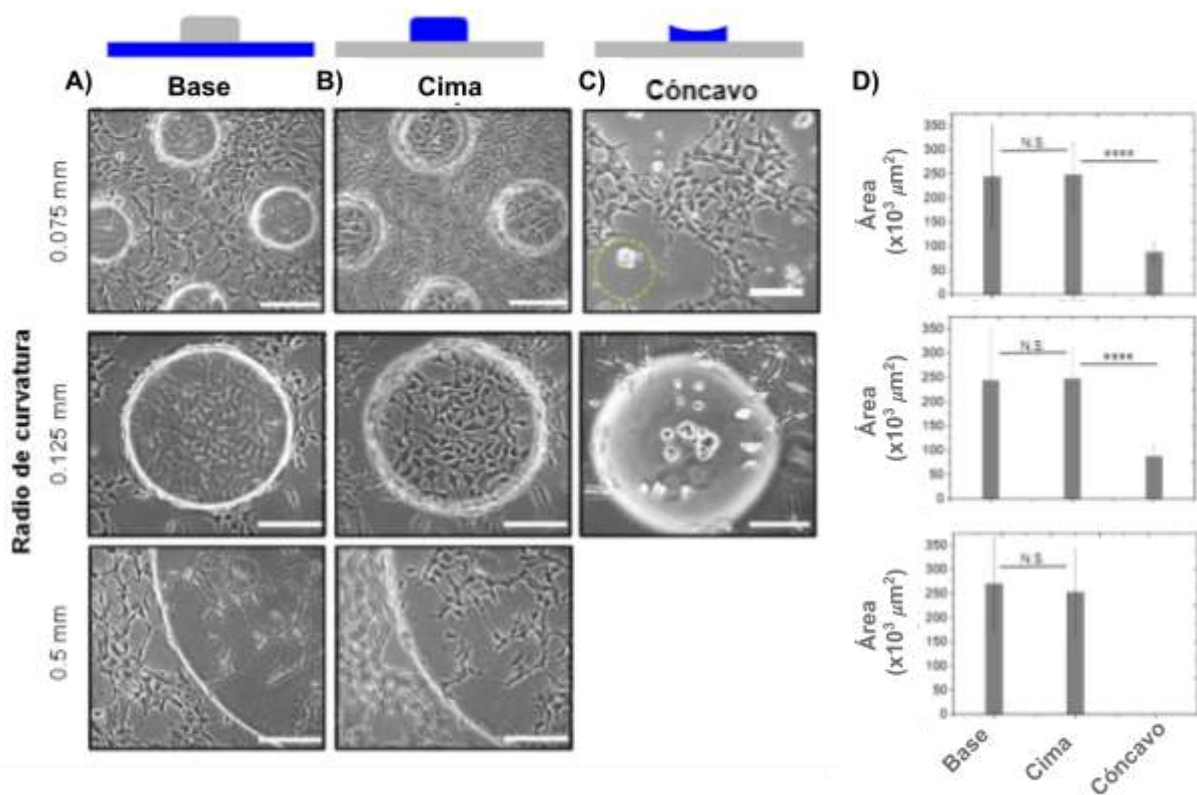


Figura 4.2 | Cuantificación del área celular de las células AD-293 a las 48h de haberse sembrado en arreglos de pilares de HG de PAM con diferentes radios de curvatura, A) micrografías de células ubicadas en la base (bottom) de los arreglos de pilares, B) micrografías de células ubicadas en la cima (top) de los pilares con superficie plana, C) micrografías de células ubicadas en la superficie de pilares con superficie cóncava, D) diferencias del área celular en función de la ubicación de las células y la curvatura de los pilares, las barras de error representan la desviación estándar (SD) de la media, las diferencias significativas entre las células en la base plana y cóncava se encontraron usando Student's t-test con $P < 0.01$, NS=no significativo, ****= $P < 0.0001$. Tamaño de la barra $100 \mu\text{m}$.

Como se observa en la figura 4.2, no existen diferencias significativas entre el área de las células en la base (*bottom*) y las que se encuentran en la cima (*top*) de los pilares con superficie plana pero sí existe una diferencia significativa con las células sobre pilares con

superficie cóncava, Sin embargo, pese a que se observan células ubicadas en las paredes de los pilares no fue posible cuantificar su área proyectada, por lo que se procedió a buscar un marcador que revele la forma en la que las células perciben su microambiente. Por ello, se exploró la translocación de YAP al núcleo en función de la ubicación espacial de las células en los diferentes radios de curvatura y concavidades, esto con el fin de caracterizar la respuesta celular a la ubicación espacial, ya que un incremento de la localización YAP en el núcleo celular está asociado a que la célula percibe un sustrato más rígido (122).

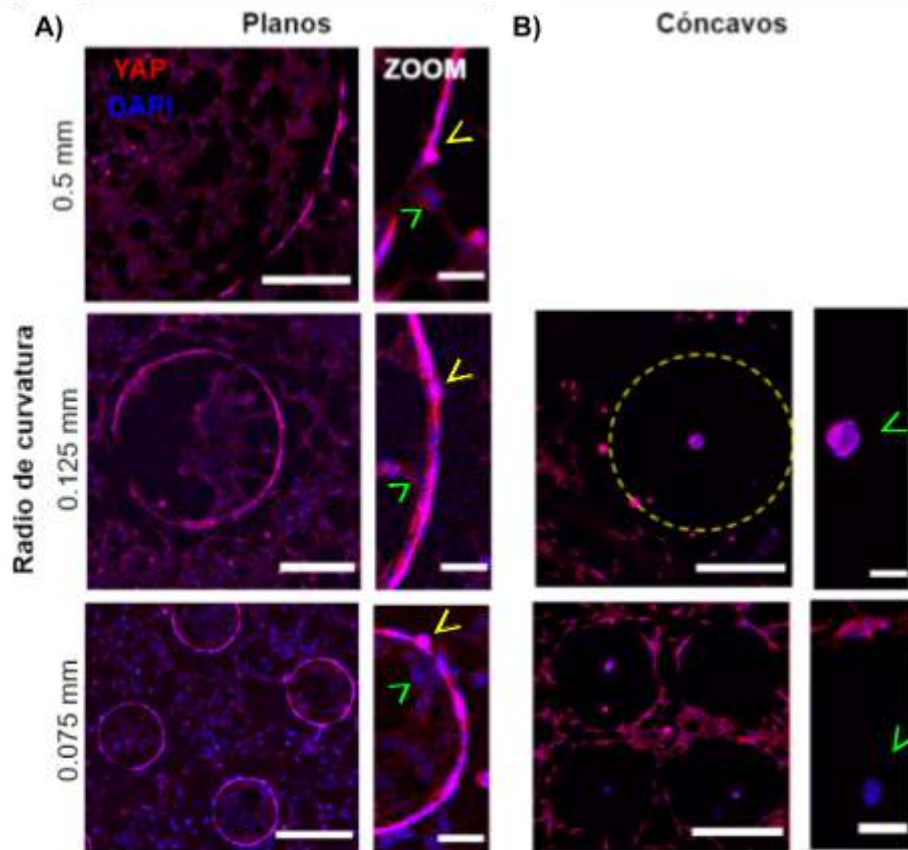


Figura 4.3 | Micrografías de inmunofluorescencia de las células AD-293 sobre los pilares de PAM, se puede notar diferencias en la localización del factor transcripcional YAP dependiendo de la localización y acomodamiento espacial de la célula (flecha amarilla apunta a la colocalización de YAP y DAPI, mientras que las verdes señalan donde no hay colocalización), en A) se observan células sobre pilares cilíndricos por lo que su curvatura sólo está presente en las paredes de los pilares, en B) se muestran las células sobre estructuras cóncavas, (nota la estructura cóncava con un diámetro de 0,5 mm presentó un fondo plano por lo que no se tomó en cuenta) tamaño de la barra 250 μm (50 μm zoom)

En la figura 4.3 se observa de manera cualitativa que las células que rodean a los pilares presentan un mayor nivel de translocación de YAP al núcleo (señalador amarillo contra señalador verde). Luego, debido a que ha sido reportado que la localización de YAP es dependiente del confinamiento celular (22) y también depende de la organización nemática de la red de actina y su interacción con la red de microtúbulos de una célula (23), se verifica que la geometría del sustrato juega un papel relevante en el comportamiento celular (122, 125). Es importante remarcar que; los experimentos presentados en este capítulo tienen el fin de validar el uso de los hidrogeles como sustratos de cultivo celular más que una

cuantificación de los fenómenos biológicos aquí abordados. En el siguiente capítulo se aborda un fenómeno biológico más complejo, donde se utilizan los hidrogeles de PAM fabricados y caracterizados como se describe en el presente capítulo.

Influencia conjunta de la rigidez de la ECM con el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en el fenotipo y la organización colectiva de las líneas pulmonares A549 y NHLF

Como ya se mencionó en los capítulos anteriores, la rigidez del microambiente tiene un gran impacto en el comportamiento celular. Sin embargo, las señales bioquímicas son las que tradicionalmente se estudian cuando se quiere entender el comportamiento celular. Particularmente, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β , por sus siglas en inglés) tiene una gran relevancia en diferentes procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos (131), ya que, este interviene en diversas rutas de señalización (132, 133) y del cual se sabe que está asociado fuertemente a un evento fisiológico denominado transición epitelio mesénquima (134) (*EMT* por sus siglas en inglés). La *EMT* se caracteriza por la pérdida progresiva de las características del fenotipo epitelial, incluyendo la polaridad apico-basal, las uniones célula-célula y por ende la integridad de la capa epitelial deteriorando así su función como barrera. La pérdida de estas características de las células epiteliales va acompañada de una ganancia progresiva de ciertas características mesenquimales, como: la ganancia de una polaridad antero-posterior, la activación de factores de transcripción inductores de *EMT* y la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina, entre otros (135, 136), y por ende influye de manera directa en la reorganización dinámica del citoesqueleto celular (137). En este proceso de *EMT* cada célula epitelial tiende a desadherirse de sus células vecinas, y por lo tanto, puede adquirir cierta capacidad migratoria e invasividad (136). En este contexto, cabe mencionar que cada órgano y tejido está recubierto por una capa confluyente de células epiteliales, las cuales en un estado sano se encuentran en un estado de homeostasis y su comportamiento colectivo puede verse como un material sólido y estático. Durante la morfogénesis, remodelación o reparación de órganos y tejidos, así como durante la invasión maligna o metástasis, el tejido epitelial se vuelve un material tipo fluido con un comportamiento migratorio (138–140). Actualmente, este cambio del comportamiento del tejido epitelial de pasar de un comportamiento estático a uno dinámico (migratorio) se ha entendido como una manifestación de la *EMT* o una transición epitelio mesénquima parcial (*pEMT*, por sus siglas en inglés) (141, 142). Entonces, para explorar la influencia de la rigidez del microambiente en conjunto con el TGF β , sobre la dinámica colectiva de las células pulmonares humanas, se sembraron células de la línea de epitelio alveolar A549 sobre hidrogeles de poliacrilamida con una rigidez nominal de 0.5, 1, 5 y 23 kPa, se observó la dinámica colectiva después de 5 días de cultivo, y se comparó con el mismo sistema alterándolo al agregar TGF β (5 ng/ μ L)(143) al cultivo de células A549, como es de esperarse el sistema tratado con TGF β disminuyen sus adhesiones célula-célula y por ende adquiere mayor movilidad(144), lo que desde un punto de vista físico puede verse como la fluidización de la monocapa epitelial, finalmente la dinámica colectiva de estos sistemas se comparó con la de los fibroblasto normales de pulmón humano (NHLF). Se observó que la rigidez del sustrato influye en la geometría y los marcadores de fenotipo de las células epiteliales cuando se estimulan TGF β 1, este comportamiento ya ha sido reportado en la literatura con otros tipos celulares

(143), y se realizaron dos experimentos por duplicado, hace falta su confirmación por medio de otras técnicas adicionales, como: Western blot y *time lapse microscopy*, por lo que estos experimentos quedan como perspectiva de los estudios que se pueden realizar con los hidrogeles desarrollados en este trabajo. A continuación, la figura 4.4 muestra las micrografías de los cultivos y la cuantificación del área proyectada de las células pulmonares.

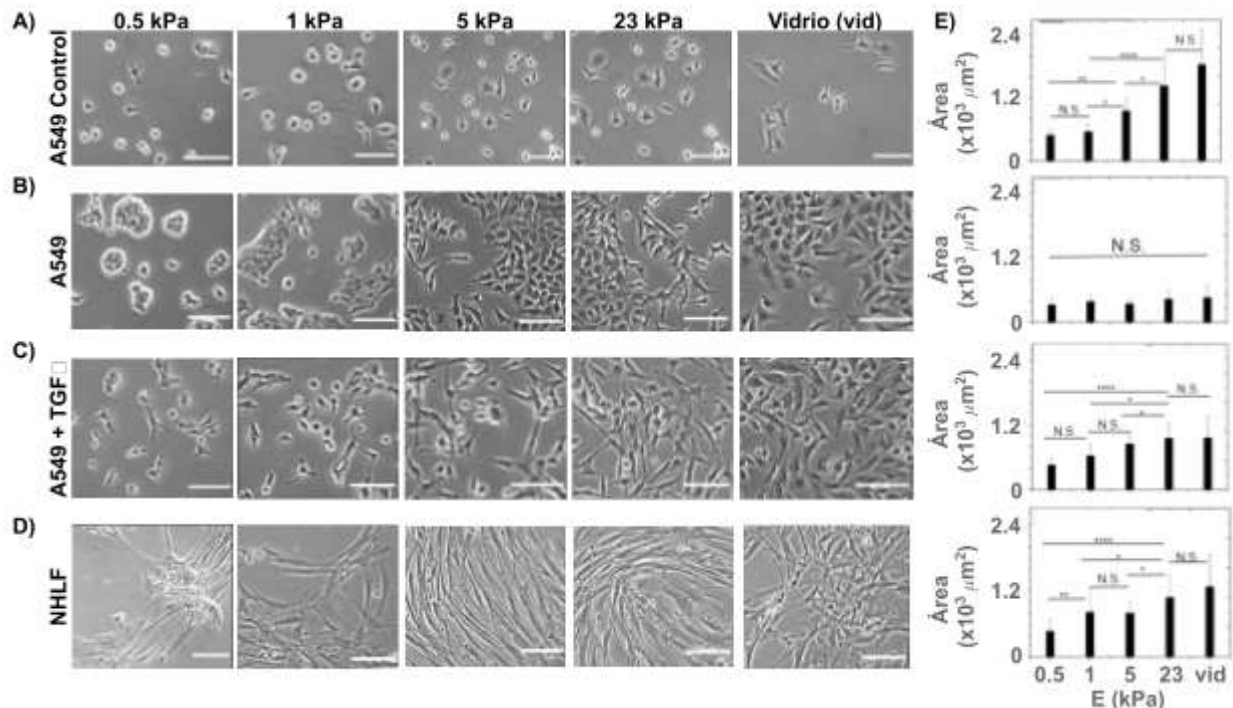


Figura 4.4 | Micrografías representativas de la morfología de las células pulmonares, A - B) Células epiteliales alveolares A549 a las 24 y 120 horas de cultivo en hidrogeles de poliacrilamida de diferente rigidez nominal (0.5, 1, 5 y 23 kPa) y en vidrio como control del estado de las células, esta condición temporal se utilizó como condición de referencia, C) células A549 después de 120 horas de cultivo células A549 + TGFβ1 (5 ng/μL) después de 120 h de cultivo, D) Fibroblastos normales de pulmón de humano (NHLF) después de 120 horas de cultivo en las mismas condiciones. E) cuantificación del área proyectada en función de la rigidez del sustrato por cada condición de los incisos A - D. Los datos presentados en (E) se analizaron con un análisis de varianza de una vía (oneway ANOVA) con la corrección de Tukey para múltiples comparaciones, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Tamaño de la escala: 100 μm.

Se eligieron las rigideces de 0.5, 1, 5 y 23 kPa no sólo porque los valores de 0.5- 5 kPa representan la rigidez de un pulmón sano y 23 kPa la rigidez de un pulmón fibrótico (145), sino también porque está reportado en la literatura que la fuerza ejercida por las adhesiones focales en un área de una micra cuadrada se encuentran en un rango de 2 a 5.5 nN/μm² (146) lo que equivale un valores del módulo de Young de 2 a 5 kPa por lo que la rigidez de 0.5 kPa sería equivalente a adhesiones focales (FA por sus siglas en inglés) no maduras, el valor de 1 kPa se encuentra en el límite inferior donde se empieza la maduración de las FA, el valor de 5 kPa corresponde a una FA madura y 23 kPa se encuentra en el rango de fuerzas (10- 30 nN) que ejercen las FA de un fibroblasto (146). Entonces, como se observa en la figura 4.4 paneles A - E, la morfología de las células A549 mantiene una forma redondeada en los sustratos suaves (0.5 y 1 kPa), mientras que en los sustratos rígidos adquiere una forma más

irregular con algunos vértices. En la condición de control el esparcimiento es proporcional a la rigidez del sustrato, pero después de 120 horas de cultivo las células sin estímulo de TGF β 1 alcanzan el mismo tamaño sin importar la rigidez del sustrato (figura 4.4B), este fenómeno es algo ya reportado y bien descrito en la literatura, ya que el esparcimiento celular es inhibido por el incremento de las uniones célula-célula (147). Por otra parte, esto no se observa en las células estimuladas con TGF β 1, ya que al inhibir las uniones célula-célula no hay una regulación del tamaño celular por contacto (figura 4.4E), además las células estimuladas tienden a una morfología más alargada y a una mayor área proyectada que tiene una mayor similitud a el comportamiento expresado por las células NHLF, lo que se observan en el panel 4.4D. En adición a esto para comparar las morfologías de una manera cuantitativa, utilizando el software ImageJ se cuantificó la excentricidad $ex = \sqrt{1 - \frac{a^2}{b^2}}$ siendo a y b los semiejes mayor y menor respectivamente (figura 4.5), en este caso se midió la excentricidad de la elipse de mayor área contenida dentro de la célula como se muestra en la figura 4.5A, como se observa en la figura 4.5 la excentricidad confirma lo observado cualitativamente en la figura 4.4: las células A549 estimuladas con TGF β 1 adquieren características similares a las células mesenquimales como lo son los fibroblastos NHLF.

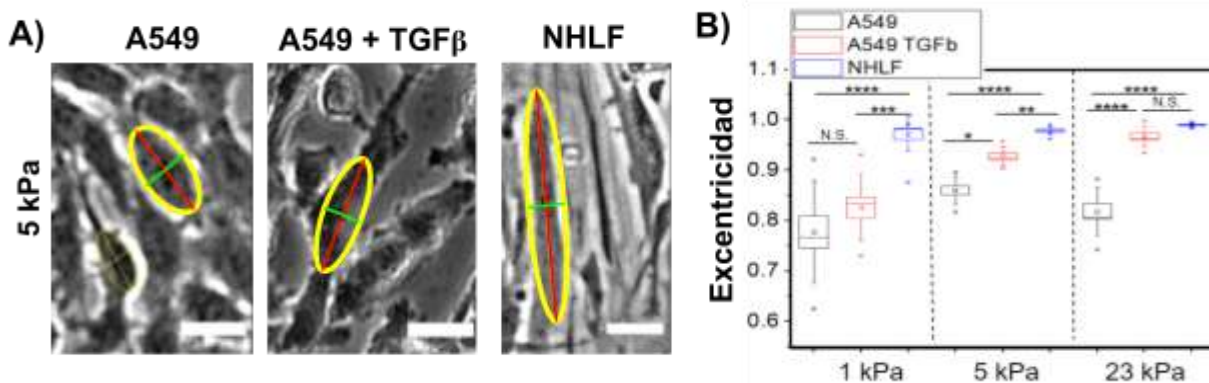


Figura 4.5 | Cuantificación de la morfología de las células pulmonares en función de la rigidez. A) Elipse de John (elipse de mayor área totalmente contenida en la célula), por cuestión representativa se presentan las micrografías de las células en el sustrato de 5 kPa, el semieje mayor de las elipses está representado por la línea roja y le meno por la línea verde, B) Cuantificación y comparación de la excentricidad de la elipse de John. Tamaño de la barra 15 μ m.

Adicionalmente a la cuantificación del cambio de la morfología que sufren las células, se marcaron por medio de inmunofluorescencia (ver Anexo 1) diferentes marcadores (E-Cadherina y Vimentina) involucrados en la EMT. En la figura 4.6 se presentan las micrografías representativas de la tinción de los marcadores ya mencionados en las células A549 con y sin estímulo de TGF β 1 y sembradas en un hidrogel de 1 y 23 kPa, esto para conocer de manera cualitativa la influencia conjunta de la rigidez y el estímulo de TGF β 1 sobre estos marcadores. Se puede notar que en la condición suave la expresión de vimentina es casi nula en las células A549, mientras que en la condición rígida este marcador se expresa en ambas condiciones (con y sin estímulo); además es muy notorio que aumenta la expresión de esta proteína y disminuye la expresión de E-cadherina. Sin embargo, en las

células que tienen una fuerte unión célula-célula se inhibe la expresión de vimentina (cuadros amarillos en la figura 4.6) sin importar que esté presente el estímulo de TGF β 1.

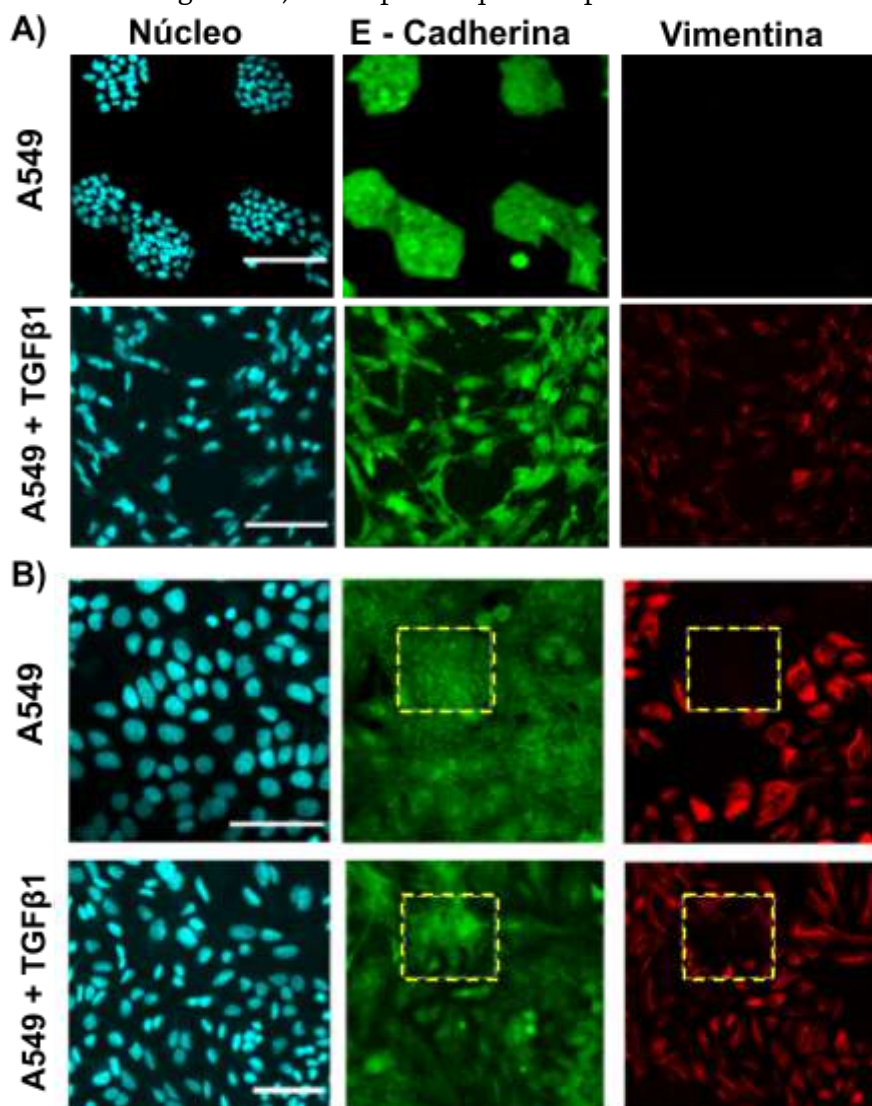


Figura 4.6 | Micrografías de epifluorescencia de la tinción de E-cadherina (canal verde) y Vimentina (canal rojo) en las células A549 con y A549 + TGF β 1, sembradas sobre un hidrogel de PAM (A) con una rigidez nominal de 1 kPa (condición suave) y en un hidrogel de PAM (B) con una rigidez nominal de 23 kPa (condición rígida). También se marcó el núcleo con DAPI (canal cian) para distinguir la ubicación espacial de las células. Tamaño de la barra en (A) 100 μ m, tamaño de la barra eb (B) 75 μ m.

Finalmente, después de explorar la influencia de la rigidez sobre el fenotipo y la morfología celular, se procedió a analizar su comportamiento colectivo, puesto que ha sido reportado que las monocapas celulares adquieren un comportamiento tipo nemático activo (148–150), i.e. las monocapas celulares pueden comportarse como cristales líquidos. En este contexto, las monocapas celulares se denomina como materia activa, la cual busca describir sistemas naturales o artificiales que están fuera del equilibrio termodinámico debido a que extraen energía de su entorno al nivel de una sola partícula y la transforma en trabajo mecánico(151). Todos los sistemas vivientes desde los pájaros, los peces o hasta las bacterias existen intrínsecamente fuera de equilibrio, puesto que convierten el contenido químico de su alimento en alguna forma de trabajo mecánico. De manera similar, los sistemas

sintéticos pueden diseñarse para realizar trabajos impulsados por gradientes de energía ya sea de temperatura, químicos o hasta lumínicos (152). Los sistemas activos no solo proporcionan un campo de prueba experimental para las teorías de la física estadística fuera de equilibrio (153, 154) sino que también sustentan los procesos naturales de la vida (154). Desde eventos patológicos como la formación de biopelículas o la migración celular celular hasta la morfogénesis e incluso un cardumen de peces, parvada de aves o rebaños de animales, la física de la materia activa juega un papel vital (151).

Una de las ventajas de que los biopolímeros y las monocapas celulares puedan verse como cristales líquidos nemáticos (materia activa) es que sus propiedades mecánicas como su elasticidad y su evolución temporal se pueden inferir de simples mediciones a partir de la microscopía óptica, y además, es posible manipular sus propiedades mecánicas ajustando ciertas características de sus subcomponentes, como el producto de la longitud y la concentración (155). Además, conociendo estas simples características puede predecirse y manipularse la evolución de estos sistemas. Teóricamente, el modelo que más éxito ha tenido para describir el comportamiento nemático activo, consiste en una teoría que depende solo de las simetrías del sistema (155, 156). El método de modelado se basa en definir las ecuaciones de movimiento para un parámetro de orden Q que describe el campo de orientación y el campo de velocidad \mathbf{u} . En los materiales tipo cristales líquidos (*LC*, por sus siglas en inglés), los defectos topológicos corresponden a regiones localmente desordenadas donde la orientación de sus subcomponentes denominados mesógenos (las unidades que forman una mesofase de *LC*) cambia abruptamente (157). Los defectos exhiben características ópticas y otras características fisicoquímicas únicas, y sirven como base para muchas de las aplicaciones de estos materiales. La microestructura de un *LC*, está determinada por una delicada interacción entre los esfuerzos mecánicos, las restricciones geométricas y la influencia de los campos externos aplicados formando el llamado "campo director" (158, 159), y por lo tanto, esa microestructura dicta la respuestas óptica y mecánica del *LC* a señales externas. Cuando un *LC* pasa de una fase isotrópica a una fase nemática, surgen defectos topológicos y se aniquilan con el tiempo a medida que el material experimenta un equilibrio térmico. Esos defectos se pueden clasificar por su número de winding también denominado carga topológica(160). La Figura 4.7A proporciona una ilustración de los defectos con carga topológica de $\pm 1/2$.

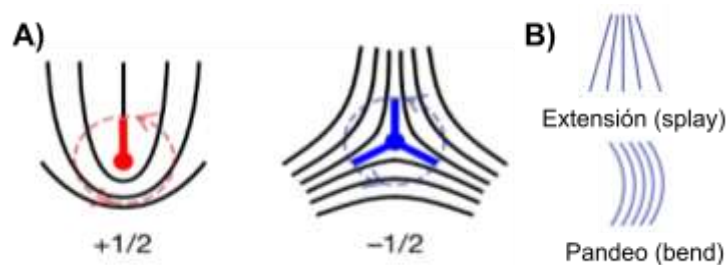


Figura 4.7 | Defectos topológicos en los sistemas nemáticos. A) Defectos con una carga topológica de $\pm 1/2$, B) Deformación por extensión o por pandeo de los subcomponentes de los cristales líquidos, que pueden ser por ejemplo las células de las monocapas celulares. Figura adaptada de (155).

El orden a largo alcance de los *LC* nemáticos a menudo se caracteriza por la teoría elástica de Frank-Oseen (161). Particularmente, en un sistema neumático 2D como lo son las

monocapas celulares (148), sus subcomponentes están obligados a permanecer en un plano, y por lo tanto sus subcomponentes no se verán afectados por los esfuerzos por torsión y las deformaciones de ensilladura son irrelevantes. Por lo tanto, sólo las deformaciones por extensión (splay) y por pandeo (bend) que se ejemplifican en la figura 4.7B influyen en la estructura de los defectos topológicos. Entonces, cómo se muestra en la figura 4.8 (lado izquierdo), los cultivos celulares de A549, A549 + TGF β y NHLF después de 120 horas de cultivo en un sustrato de 23 kPa alcanzan un estado confluyente y se observa la aparición de defectos topológicos con carga de $\pm \frac{1}{2}$ en las células A549 + TGF β y NHLF (ver paneles 4.8B y 4.8C) lo que sugiere que estas condiciones presentan una posible transición isotrópica-nemática. Para corroborar esto se analizaron diferentes imágenes con el plugin OrientationJ de ImagenJ, la distancia para establecer si existe un orden de largo alcance fue de 4 veces el largo de una célula, este procedimiento puede consultarse a detalle en (130, 155). Después con este plugin se obtuvo el campo de orientación y también el cambio instantáneo en la posición (x,y) , esta información se introdujo junto con el campo de velocidades instantáneas a Wolfram Mathematica 12.1 donde se realizó una integral de convolución de línea obteniendo las imágenes del lado derecho de la figura 4.8.

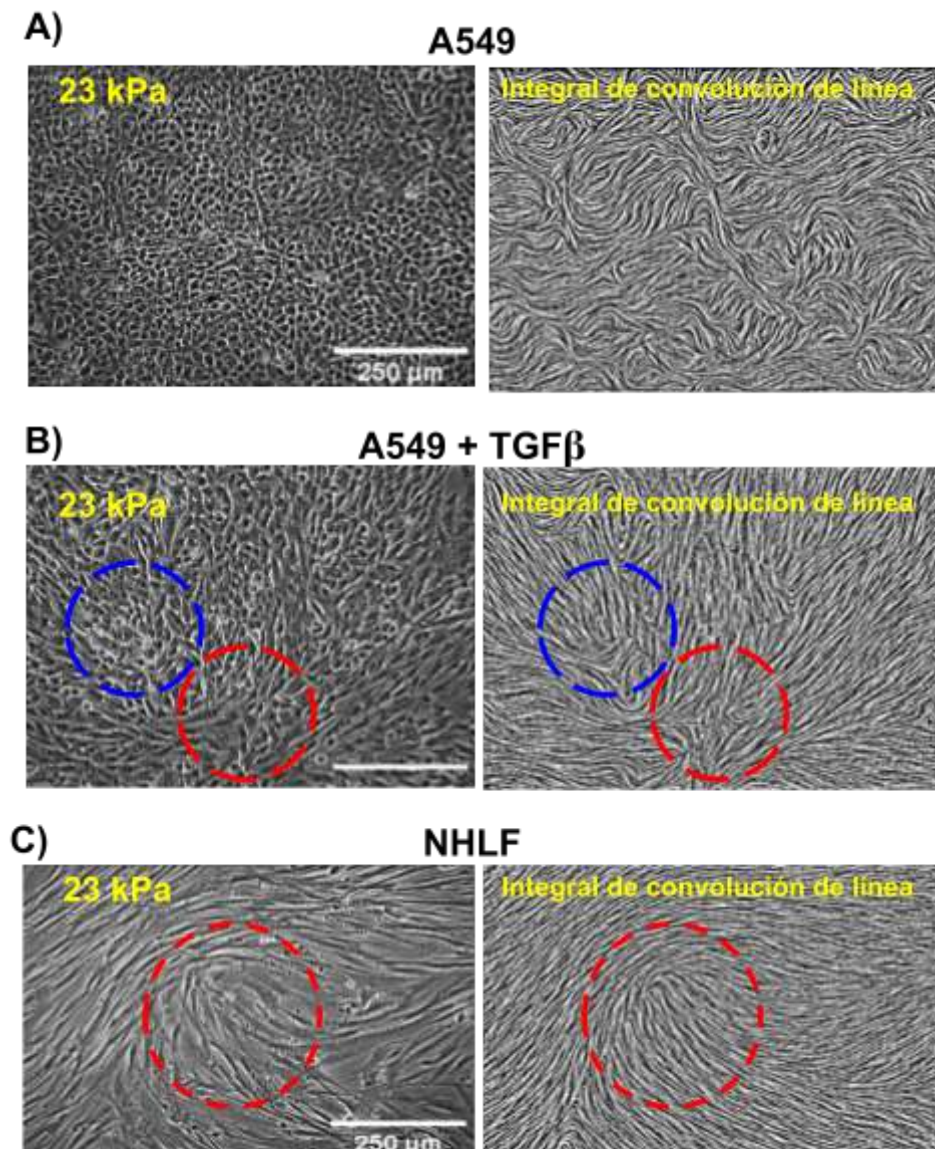


Figura 4.8 | Imágenes procesadas que muestran la aparición de defectos topológicos en los cultivos de monocapa de células de pulmón. A) Células A549 sin estímulo, como se puede observar existe poco orden a largo alcance de las células como resultado de la alta actividad de sus subcomponentes, mientras que las células en (B) muestran una menor actividad, probablemente debido al estímulo de TGF β 1, lo que da como resultado la aparición de defectos topológicos con carga $-\frac{1}{2}$ (círculo azul) y $+\frac{1}{2}$ (círculos rojos), lo cual es comparable a lo observado en (C) por los fibroblastos NHLF que también presentan defectos con una carga topológica de $\frac{1}{2}$. Tamaño de la barra 250 μ m.

La integral de convolución de línea de las imágenes de células confluentes que se presentan en la figura 4.8 (lado derecho) muestran que las células sin estímulo de TGF β (panel 4.8A) no muestran la aparición de defectos topológicos como a diferencia de las células estimuladas y los fibroblastos NHLF (círculos azules y rojos en paneles 4.8B y 4.8C), esto implica que las células con una geometría más alargada (ver figura 4.5) y con una adhesión fuerte al sustrato como lo son las células con características similares a las de un fenotipo mesenquimal adquieren un comportamiento nemático que surge en un sistema ordenado (130). Por otro lado, las células con una geometría más redondeada (ver figura 5.4) y una adhesión débil al sustrato no adquieren un comportamiento ordenado y por lo tanto tiene mayor actividad (biológicamente puede verse como el recambio continuo de sus subcomponentes), esta ausencia de defectos puede significar de igual manera que el sistema ha alcanzado el equilibrio térmico (155), lo que puede verse biológicamente como que las células se encuentran en un estado dinámico estable mecánicamente, ya que el equilibrio térmico tiene que ver con el flujo de movimiento de sus subcomponentes.

Estos resultados muestran que el estímulo con TGF β a las células epiteliales A549 no sólo les confiere a nivel celular características similares a los fibroblastos NHLF (ver figuras 4.4-4.6), sino además, impacta en su comportamiento colectivo haciéndolo similar al presentado por los fibroblastos (ver figura 4.8). Además, este comportamiento es dependiente de la rigidez del sustrato ya que de esta depende la fuerza de adhesión a la ECM (162). Estas observaciones sugieren que observar la dinámica colectiva de las células epiteliales puede ser una forma de detectar cambios en su fenotipo y por ende pudiera utilizarse para predecir la aparición de ciertas patologías como la fibrosis, donde las células cambian morfológicamente y por lo tanto estos cambios morfológicos alteran su comportamiento colectivo. Sin embargo, es necesario realizar estudios con células primarias con características más similares a las que se encuentran *in vivo* para poder establecer si este es un comportamiento más general o particular de estos tipos celulares. Finalmente, las observaciones de este capítulo apuntan también a revisar el comportamiento de los componentes subcelulares con el fin de comprender cómo los esfuerzos transmitidos no sólo de las monocapas celulares a los componentes subcelulares sino además como la rigidez del sustrato influye en la morfología de los organelos celulares y por ende en su dinámica colectiva interna. Por ello, en el próximo capítulo se plantea un modelo teórico para estudiar la influencia de la rigidez sobre la forma y deformación del núcleo celular, en este caso se eligieron los hepatocitos como modelo de estudio ya que son un sistema más simple desde el punto de vista físico, puesto que este tipo celular se encuentran en un sistema mecánico estático a diferencia de las células pulmonares sujetas a esfuerzos y deformaciones periódicas.

Capítulo 5. Modelo híbrido-viscoelástico (H-VM) del núcleo celular

Las células adherentes perciben y responden constantemente a los estímulos mecánicos de su microambiente por medio de diversos mecanismos que permiten convertir dichos estímulos en señales bioquímicas (7, 8, 14). Además, se ha mostrado que las células no solamente perciben, sino también, generan esfuerzos que parecen ser responsables de su organización estructural interna (17, 163). Este proceso de balance entre esfuerzos internos y externos comúnmente da lugar a un estado mecánico estable (8, 164), originado por la constante reorganización dinámica del citoesqueleto, cuyo propósito es mantener la forma y función celular (17, 165–167). Particularmente, se ha mostrado la existencia de una conexión mecánica directa entre el microambiente celular y el núcleo celular, vía complejo de adhesión y citoesqueleto, por medio de la cual los estímulos mecánicos externos son transmitidos y percibidos directamente por el núcleo (168, 169). Ya que, el núcleo almacena, organiza y protege el material genético (170, 171), cualquier alteración en sus propiedades mecánicas no sólo afectaría la integridad del genoma, y una correcta expresión de genes (170), sino también, ciertas alteraciones de los componentes estructurales del núcleo están asociadas a diversas patologías como; múltiples laminopatías (172, 173), cáncer (174–176) y enfermedades cardíacas (177, 178). Parece importante entonces evaluar la mecánica nuclear en función de la mecánica del microambiente para poder concebir mejores sustratos de cultivo, adaptados a las necesidades actuales de biomimetismo o estudios de mecanismos de mecanotransducción.

Actualmente, se sabe que las propiedades mecánicas del núcleo están dictadas principalmente por su envoltura nuclear (NE) y el estado de acetilación de la cromatina (Ch) (171, 179). La NE está principalmente compuesta por las láminas A/C junto a las láminas B1 y B2, las cuales no sólo le confieren al núcleo estabilidad estructural, sino también desempeñan un papel importante en la regulación de diferentes procesos como: diferenciación celular, organización del genoma, replicación de genes y desarrollo embrionario, (180–185). Evidencia reciente ha mostrado que una cascada de vías bioquímicas dependientes de contractilidad, pueden modificar la estructura de la cromatina y por lo tanto sus características mecánicas, mediante la translocación de factores epigenéticos al núcleo (186–188). Gracias al desarrollo de diferentes tipos de técnicas de caracterización mecánica (84), ha sido posible estudiar gran parte del comportamiento reológico y la arquitectura espacial del núcleo celular (171). Sin embargo, son diversos los retos que aún quedan para el entendimiento completo del comportamiento mecánico del núcleo en su estado natural, i.e. dentro de la célula. Dado que la mayor parte de las técnicas actuales de caracterización mecánica deforman o ejercen un esfuerzo directo sobre el material a caracterizar (189), esto resulta desafiante en el caso del núcleo, ya que, en su estado natural no es posible acceder a este sin alterar sus alrededores debido a que está interconectado al citoesqueleto (168, 170). Por lo que, las técnicas que requieren contacto físico no sólo podrían sobreestimar o subestimar los valores medidos, también, podrían introducir artefactos o alteraciones al sistema y sus alrededores (190). Por ejemplo: los valores medidos del módulo de Young en núcleos aislados, en algunos casos difieren en más del 50% que su valor medido dentro de las células (191), en adición a esto, las condiciones particulares de cada tipo de ensayo de caracterización mecánica, dificultan la comparación

entre los valores obtenidos por estas técnicas (189). Por otra parte, en los últimos años, se ha optado por el desarrollo de técnicas no invasivas como: Microscopía de Brillouin (190, 192) y elastografía por resonancia magnética (189, 193), las cuales buscan establecer una correlación empírica entre los procesos fisiológicos y patológicos. Debido a que estas técnicas dinámicas no se relacionan directamente con el módulo de Young, sino el módulo longitudinal, es necesaria una correcta calibración e interpretación de los datos obtenidos (189).

Diversos estudios han demostrado que el núcleo posee un comportamiento mecánico tanto reversible (189, 194) como uno irreversible (195), aunado a que las propiedades mecánicas de este dependen de las condiciones mecánicas del microambiente donde se encuentra (168, 196). Por lo tanto, nos planteamos estudiar desde un enfoque teórico-experimental el impacto a largo plazo de la rigidez de la matriz extracelular (ECM) sobre la evolución de la forma del núcleo y si está relacionada con la manifestación de un comportamiento mecánico irreversible. Para este fin, se desarrolló un modelo híbrido-viscoelástico (H-VM), el cual contempla las características viscoelásticas reportadas de la NE y la Ch (196–199), cuyos tiempos de relajación son de pocos minutos (196). También, se tomó en cuenta el comportamiento activo de las láminas nucleares por medio de un circuito de genes, basado en el propuesto por Dingal and Discher (200).

El comportamiento mecánico a escalas de tiempo largas (horas o días) se atribuyó a la dinámica del citoesqueleto (red de filamentos) circundante al núcleo celular, el comportamiento mecánico de la red circundante al núcleo se modeló de 2 maneras: como un material hiperelástico (201) o como un material blando vítreo que se encuentra cerca de su temperatura de transición vítrea y por lo tanto es posible representar sus interacciones por un parámetro denominado ruido térmico (202, 203). Finalmente, se compararon los valores predichos por el modelo con los valores obtenidos de la cuantificación de la evolución en el tiempo del área, la altura y la morfología nuclear de hepatocitos primarios aislados de ratas de la cepa Wistar, así como, de la línea celular HepG2, sembrados sobre hidrogeles de poliacrilamida de diferente rigidez y conjugados con colágena tipo I.

Formulación del modelo

El modelo mecánico del núcleo que se propone, tiene como base un modelo viscoelástico 1D, donde, los principales componentes estructurales del núcleo (figura 5.1A) se modelaron como un material viscoelástico lineal (ver anexo 3) que aproxima las propiedades viscoelásticas reportadas tanto de la NE (con la lamina A/C representada por su viscosidad η_{LA} , y la lámina B, representada por su contribución elástica k_{LB}) como de la Ch (con sus parámetros η_{ch} y k_{ch}) (178, 196, 204). El conjunto está entonces representado por un sistema resorte-amortiguador (sistema de Maxwell). Estos dos sistemas de Maxwell se conectaron en paralelo a un resorte con constante k_l , denominado *long range stiffness*, que representa la rigidez a largo plazo debida a la red de filamentos que rodea al núcleo sin conexión directa (figura 5.1A), la unión de estos elementos genera un sistema general de Maxwell de dos brazos observado en la figura 5.1B. Las ecuaciones 5.1 y 5.2 son las ecuaciones constitutivas de este sistema.

$$k_i dx_{NE}/dt = dF_i/dt + F_i/\tau_i \quad (5.1)$$

$$F = F_l + \sum_i^2 F_i \quad (5.2)$$

dónde F representa la fuerza total ejercida sobre el núcleo y x_{NE} denota la deformación de la envoltura nuclear, F_i representa la fuerza en cada brazo con $\tau_i = \eta_i/k_i$ siendo el tiempo de relajación asociado a cada sistema resorte-amortiguador (figura 5.1B). Para incorporar la contribución de los poros nucleares a la deformación total del núcleo se definió el parámetro $\varphi = x_p/x_{NE}$ que es el cociente entre la deformación de los poros x_p y la deformación de la envoltura nuclear x_{NE} , obteniendo así la ecuación 5.3 que describe la deformación total del núcleo x_n .

$$x_n = (1 + \varphi)x_{NE} \quad (5.3)$$

Para poder modelar el comportamiento a tiempos largos (horas y días) se asumió que los parámetros η_{LA} , k_{LB} y k_l son funciones de la tensión y del tiempo, por lo que es necesario definir las siguientes funciones $\eta_{LA} = \eta_{LA}(T, t)$, $k_{LB} = k_{LB}(T, t)$ y $k_l = k_l(t)$. Entonces, a escalas de tiempo del orden de segundos y minutos, estos parámetros pueden considerarse constantes.

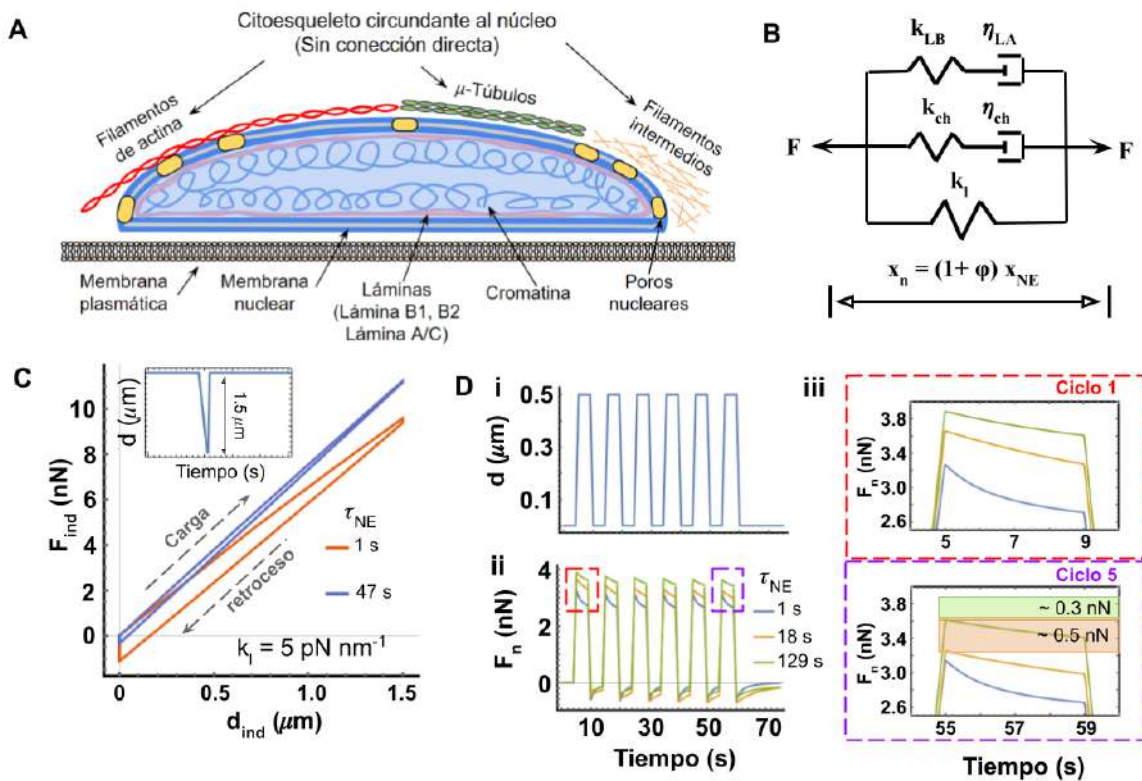


Figura 5.1 | Comportamiento viscoelástico del núcleo celular. A) Los principales componentes subcelulares que determinan las propiedades mecánicas del núcleo son: la envoltura nuclear (NE), el estado de acetilación de la cromatina (Ch) y la reorganización dinámica del citoesqueleto regida por

los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina que rodean al núcleo, estos elementos estructurales está muy influenciado por la rigidez de la matriz extracelular (MEC). B) Modelo generalizado de Maxwell de dos brazos que recapitula el comportamiento reológico del núcleo junto con la actividad de NE y la reorganización dinámica del citoesqueleto celular que rodea al núcleo. C) Simulación de una curva FD para un ensayo de indentación de un núcleo modelado por las ecuaciones 4.1-4.3 asumiendo sus parámetros constantes. Se usó una profundidad de indentación de $1,5 \mu\text{m}$, un retardo de $0,5 \text{ s}$ y una velocidad de indentación de $1 \mu\text{m/s}$. Se modelaron dos tiempos de relajación NE (definidos como $\tau_{NE} = \eta_{LA}/k_{LB}$. En D) se reprodujo un ensayo de deformación periódica (i) con un periodo de 10 s , con pulsos de 4 s donde se crea una deformación de $0,5 \mu\text{m}$, la velocidad de carga y descarga fue de $0,5 \mu\text{m s}^{-1}$, en ii) se muestra el esfuerzo en nN como respuesta a la deformación, en iii) se presenta un zoom del esfuerzo en los ciclos 1 y 5, donde se nota una disminución de entre $0,3$ y $0,5 \text{ nN}$ del esfuerzo resultante, evento asociado al fenómeno de stiffening nuclear. Los tiempos de relajación NE= $1, 18, 47$ y 129 s corresponden a los tiempos de relajación de la NE de los tejidos Hepático, Pulmonar, Muscular y un tejido hepático altamente fibroso (ver material suplementario).

Entonces, para mostrar la validez de considerar los parámetros η_{LA} , k_{LB} y k_l constantes se simuló con Wolfram Mathematica 12.1 y las ecuaciones 5.1 a 5.3 un ensayo clásico de microindentación, el cual se muestra en la figura 5.1C, donde se observa que al aumentar $\tau_{NE} = \eta_{LA}/k_{LB}$ existe un aumento de la pendiente de la curva fuerza-distancia (FD). Esto se interpreta comúnmente como un aumento de la rigidez del núcleo. Además, la curva presentada en el panel 5.1C presenta un comportamiento lineal de la fuerza en función de la distancia, que difiere al esperado $d^{3/2}$ de un material elástico que comúnmente es modelado con el modelo de Hertz (79), este comportamiento ya ha sido descrito en la literatura por J. Schäpe. y colaboradores en (205), donde al aumentar la expresión de la lámina A en la envoltura nuclear en los núcleos de oocitos de *Xenopus* se observa como aumenta la pendiente de la curva FD, obtenida con un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM). Haciendo uso de la ecuación 5.1 y 5.2 es posible reproducir de manera correcta este comportamiento manteniendo constante el tiempo de relajación de la cromatina ($\tau_{ch} = 5 \text{ s}$) y el k_l ($k_l = 5 \text{ pNnm}^{-1}$), sugiriendo así que el aumento aparente del módulo elástico medido con AFM se debe a que el tiempo que tarda en realizarse la caracterización mecánica por micro-nano indentación es comparable con los tiempos de relajación de la envoltura nuclear y la cromatina. Los tiempos de relajación empleados en esta simulación fueron los tiempos asociados al tejido hepático $\tau_{NE} = 1 \text{ s}$ y muscular $\tau_{NE} = 47 \text{ s}$ (196).

La figura 5.1D muestra la simulación de la respuesta mecánica del núcleo a una deformación cíclica de $0,5 \mu\text{m}$ (figura 5.1D-i) con un periodo de 10 segundos, utilizando las ecuaciones 5.1-5,3, los valores de τ_{NE} utilizados son los valores calculados para los núcleo de células hepáticas (1 s), pulmonares (18 s) y hepáticas provenientes de un tejido fibrótico (129 s), (ver tabla 5.1). Las gráficas presentadas en el inciso 5.1D-iii representan un zoom de los valores máximos de los ciclos 1 y 5 de la gráfica presentada en el inciso 5.1D-ii. Entonces, en 5.1D-iii se observa hay una reducción del esfuerzo resultante de $\sim 0,5 \text{ nN}$ para $\tau_{NE} = 18 \text{ s}$ y de $\sim 0,3 \text{ nN}$ para $\tau_{NE} = 129 \text{ s}$, mientras que para la condición de $\tau_{NE} = 1 \text{ s}$ la fuerza permaneció constante, por lo que se infiere que la disminución de la magnitud del esfuerzo

puede interpretarse como el aumento de la rigidez de aparente del núcleo, el cual es un fenómeno conocido como endurecimiento nuclear, el cual puede originarse en la disipación viscosa sufrida tanto por la envoltura nuclear así como la cromatina, este fenómeno de endurecimiento nuclear fue reportado C. Guilluy y colaboradores en (167) en núcleos aislados de la línea celular HeLa. Además, observaron que el endurecimiento nuclear no se produce en los núcleos de células aisladas en las que se inhibió químicamente lamina A/C, incluso después de estos núcleos hayan sido sujetos a múltiples ciclos, lo que sugiere que este fenómeno es determinado principalmente por el comportamiento de la Lamina A/C y por lo tanto por del parámetro τ_{NE} como sugiere el modelo desarrollado.

Tabla 5.1 | Valores de característicos de diferentes tejidos y células estos valores fueron calculados utilizando la relación $\tau \sim [\text{Lámina A:B}]^{2.5}$ como se menciona en (196), además en este caso se utilizó: $[\text{Lámina A}] \sim E^{0.7}$ $[\text{Lámina B}] \sim E^{0.2}$ donde E corresponde al valor de la micro rigidez del tejido, obteniendo la relación $\tau_{NE} \approx E^{1.75}/E^{0.2}$.

Tejido	τ_{NE} (s)	Rigidez E (kPa)	Referencia
Hígado	1.19	1.12 ± 0.15	(206)
Hígado (ECM)	0.05	~ 0.15 ± 0.08	(207)
Hepatocito	0.64 - 1	~0.75 - 1	(208)
Hígado F* (<i>cutoff</i>)	~30 - 48	~9 - 12	(209)
Hígado F1	~27	8.3	(210)
Hígado F4	~129	23 (4.5 - 50) ¹	(210)
Pulmón	18.20	6.5 ± 1.5 kPa	(211)

*4 fases del hígado fibrótico, ¹intervalo de valores dentro de esta categoría

Los fenómenos reproducidos en la figura 5.1, muestran que los ensayos mecánicos cuyo tiempo de medición es del mismo orden que los tiempos de relajación de la envoltura nuclear y de la cromatina (~0-300 s), medirán también la contribución viscosa de éstos, y por lo tanto, para una correcta interpretación de las mediciones es necesario tomar en cuenta las propiedades viscoelásticas del núcleo. A pesar de esto, comúnmente el núcleo es modelado como un material elástico o hiperelástico debido a que los fenómenos que se buscan simular se encuentran en escalas de tiempos mayores al tiempo característico de la disipación viscosa de la envoltura nuclear y la cromatina (212–214). Estos modelos describen exitosamente ciertos fenómenos, como: la migración celular (214) y el impacto del confinamiento geométrico sobre la arquitectura nuclear (201), pero al no tomar en cuenta fenómenos disipativos, se ven muy limitados al abordar y describir eventos de plasticidad, irreversibilidad o envejecimiento (167, 182, 215–219). En adición a esto, no sólo ha sido reportado que los niveles de expresión de las láminas nucleares están asociados a la rigidez de la matriz extracelular (196), sino también que un aumento de la tensión sobre la envoltura nuclear inhibe la fosforilación de láminas nucleares (específicamente lamina A/C) (220) y por ende, favorece el aumento de los niveles funcionales de estas proteínas.

Adicionalmente, los tiempos de recambio de las láminas nucleares y de las histonas en la cromatina son del orden de unas decenas de horas e incluso de días (221). Por tanto, con el fin de modelar la respuesta mecánica del núcleo en escalas de tiempo largas, es necesario incluir la respuesta activa de la envoltura nuclear y la influencia de la reorganización del citoesqueleto circundante al núcleo (figura 5.1A).

El comportamiento activo de la envoltura nuclear se modeló definiendo las funciones $\eta_{LA} = \eta_{LA}(T, t)$, $k_{LB} = k_{LB}(T, t)$, lo cual se logró por medio de plantear un circuito de genes modificado de (200), un esquema del circuito propuesto se muestra en la figura 5.2A, donde la tensión mecánica sobre la envoltura nuclear no sólo inhibe el recambio de las láminas nucleares, sino también, promueve la síntesis de los mRNAs asociados a la expresión de las proteínas dependientes de tensión (figura 5.2A). Entonces, para asociar los niveles de expresión tanto de la proteína y mRNA de la Lámina A/C (l_A , L_A), Lámina B1 (l_B , L_B) modelados por el circuito de genes presentado en la figura 5.2A se utilizó la expresión propuesta por *Swift et. al.* en (196) que se muestra a continuación:

$$\tau_{NE} \simeq [l_A : l_B]^{2.5} \simeq \eta_{LA} / k_{LB} \quad (5.4)$$

De la ecuación 5.4 es posible obtener la viscosidad de la envoltura nuclear (η_{LA}) en función de los niveles de expresión de la Lámina A (l_A), el tiempo (t), la tensión a la está sometida la envoltura nuclear (f) y la tensión de referencia (f_0) propia de cada tipo celular (ecuación 5.5), y la elasticidad de la envoltura nuclear (k_{LB}) en función del nivel de expresión de la Lámina B1 (l_B) y también de t, f y f_0 como se muestra en la ecuación 5.6.

$$\eta_{LA} = l_A(t, f|f_0)^{2.5} \quad (5.5)$$

$$k_{LB} = l_B(t, f|f_0) \quad (5.6)$$

donde $l_A(t, f|f_0)$ y $l_B(t, f|f_0)$ son las soluciones al sistema de ecuaciones 5.7 - 5.10 que describen el circuito de genes presentado en la figura 5.2A

$$dL_A/dt = \Gamma^{n\alpha} \alpha_A l_A - \beta_A L_A \quad (5.7)$$

$$dl_A/dt = \Gamma^{n\alpha} \gamma_A L_A - \delta_A \frac{l_A^{n+1}}{f_l^{nl} + l_A^{nl}} \quad (5.8)$$

$$dL_B/dt = \alpha_B l_B - \beta_B L_B \quad (5.9)$$

$$dl_B/dt = \Gamma^{n\beta} \gamma_B l_B - \delta_B \frac{l_B^{n+1}}{f_l^{nl} + l_B^{nl}} \quad (5.10)$$

donde L_A , L_B y l_A , l_B representan las concentraciones de ARNm y proteínas de la lámina A y la lámina B1 respectivamente, con sus tasas de síntesis (α_i y γ_i) y degradación (β_i y δ_i) respectivamente, las cuales gobiernan los niveles de expresión y modificando así su influencia mecánica sobre la deformación nuclear. El parámetro $f_l = f_r - f_0 / f_0$ representa el cambio relativo de la tensión generada por la contractilidad del aparato de actomiosina y,

por tanto, está asociado con la rigidez de la ECM. Por lo tanto, f_r es la tensión efectiva soportada por el núcleo con respecto a la tensión del núcleo en un estado basal f_0 , la cual se define como la tensión intrínseca del núcleo en un pre-estado mecánico estable, que a su vez se asocia con un tamaño nuclear de referencia debido al estrés del citoesqueleto de un estado anterior. El coeficiente nl se define como el coeficiente cooperativo (≥ 2) que es típico de las interacciones multiméricas (200). Además, el parámetro $\Gamma^{ni} = f_r / f_0$ es el coeficiente de tensión y describe el incremento de la velocidad de síntesis con respecto a la tensión relativa. El coeficiente n_i representa el grado en el cual la síntesis depende de la tensión. Las ecuaciones 5.7-5.10 son representativas de este circuito describen la inhibición de la degradación de las proteínas y el aumento de la síntesis de mRNA por medio de la tensión soportada por la envoltura nuclear y generada por un cambio del estado mecánico de homeostasis del sistema.

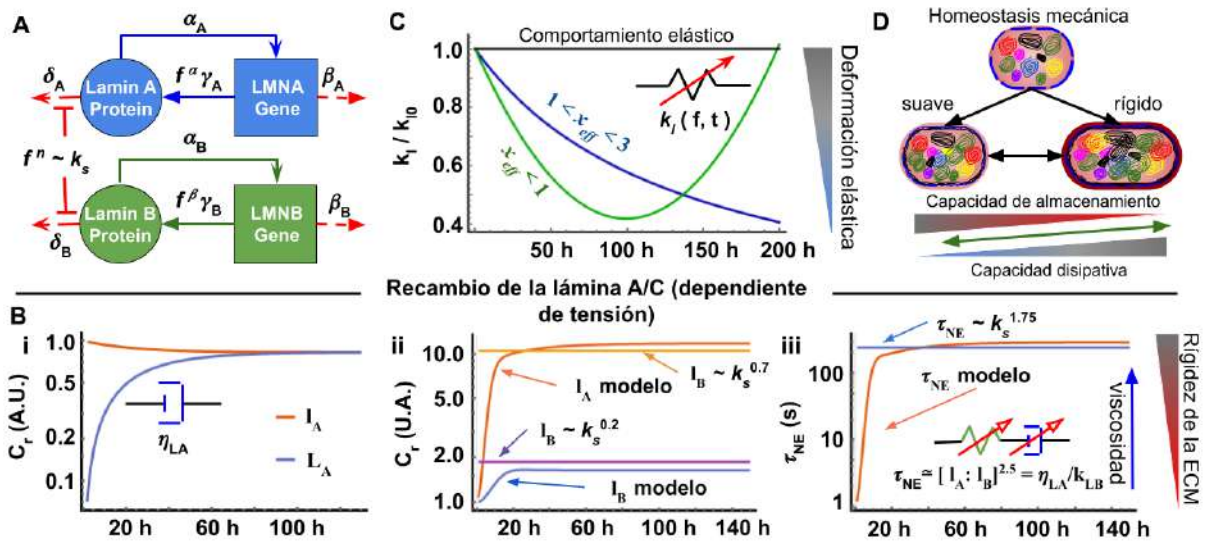


Figura 5.2 | Reorganización activa de la envoltura nuclear y reorganización continua del citoesqueleto. A) Circuito de genes modelado como sistema dinámico que representa la actividad de las Láminas A/C y B1, los coeficientes α , δ y γ son los coeficientes de síntesis y degradación, L_i y l_i denotan la concentración de los mRNAs y de la proteína de las láminas nucleares. Estos coeficientes se asociaron al tiempo de vida media $t_{1/2}$ de cada proteína y mRNA. B-i) Tasa de recambio de la Lámina A en un estado mecánico estable de una célula hepática, en B-ii) se muestra el aumento de la síntesis del mRNA y la inhibición de la degradación de la proteína debido a que la tensión soportada por el núcleo de un hepatocito se incrementó debido a un aumento de la rigidez de la ECM. B-iii) Respuesta mecánica asociada al aumento de rigidez de la ECM lo que es equivalente al aumento de τ_{NE} . C) Comportamiento temporal de k_l cuando se asume como un material elástico (curva negra) o un material vítreo cercano a su temperatura de transición vítrea T_g , cuyo comportamiento está definido por la temperatura de campo medio T_{mf} , y si $T_{mf} \in (1, 2)$, que adquiere un comportamiento tipo ley de potencias. La curva azul representa una ley de potencias débil proveniente de una función lineal generalizada que tiende a un valor constante, mientras que la curva verde representa una ley de potencias con un punto estable cerca de las 100 h. El valor de $k_l(t = 0)$ se asoció a un estado de referencia del sistema. En D) se resume el impacto a largo plazo de τ_{NE} y k_l asumiendo que k_l sigue un comportamiento tipo ley de potencias débil. Cuando se perturba el estado mecánico del núcleo su respuesta dependerá si el microambiente al que se trasladó es más suave o más rígido. Si es más suave tenderá a adquirir un comportamiento más elástico y menos

deformable, por el contrario si es colocado en un ambiente de mayor tensión tenderá a ser más disipativo y deformable.

El circuito de genes se calibró con los valores de vida media reportados para las láminas nucleares y sus mRNA asociados. De acuerdo con (221), tenemos: $t_{1/2LA} = 89.46 \pm 14.85 h$ para la Lámina A/C y $t_{1/2LB} = 114.16 \pm 18.95 h$ para la Lámina B1, $t_{1/2LA} = 18.79 \pm 3.12 h$ para los mRNAs asociados a Lámina A/C y $t_{1/2LB} = 7.14 \pm 1.19 h$ para los mRNAs asociados a la Lámina B1. Debido a que se considera que una célula en su microambiente natural está en equilibrio y por lo tanto no modifica sus propiedades mecánicas de manera espontánea sino en respuesta a un estímulo externo, se definió un estado de homeostasis mecánica. Este estado mecánico estacionario cumple las siguientes condiciones: es casi constante en escalas de tiempo mayores al tiempo de recambio de las proteínas que constituyen los componentes estructurales de la célula y es específico de cada tipo celular. Por tanto, el valor de f_0 y los niveles de concentración iniciales de las proteínas en el circuito de genes (figura 5.2A) establecen un estado de referencia para las células adherentes. Las ecuaciones 5.7 - 5.10 se resolvieron numéricamente usando Wolfram Mathematica 12.1 y sus resultados se observan en la figura 5.2. La figura 5.2B-i muestra los niveles de concentración asociados a la Lámina A (niveles de proteína l_A y mRNA L_A) para el caso particular de un hepatocito primario proveniente de una rigidez natural de 0,75 - 1 kPa (que representa la célula de un hígado sano en estado de homeostasis mecánica (208)). En el panel 4.2B-i se puede observar que tanto l_A así como L_A alcanzan un estado estacionario, es decir, terminan siendo constantes en el tiempo casi sin modificar su magnitud con respecto a su valor inicial. Eso significa que el núcleo celular alcanza un nuevo estado mecánico, en este caso aumenta su capacidad disipativa. En contraste, la figura 5.2B-ii muestra un aumento gradual en la acumulación de los niveles de proteína l_A y l_B , hasta que finalmente alcanzan un estado estable diferente a su condición inicial. Se cree que este aumento de síntesis e inhibición de la degradación de proteínas, debido a la tensión, es una de las posibles respuestas de los hepatocitos al sufrir un aumento de la rigidez de su microambiente, simulando un cultivo sobre un material más rígido (p.j. un hidrogel de 23 kPa). Por lo tanto, para simular el incremento temporal de la contractilidad generada por el aparato de actomiosina (hasta que alcanza otro nivel de tensión estable en respuesta al incremento de la rigidez del sustrato), se asume que f se comporta como una función de acumulación de una distribución logística, ya que, ha sido reportado que este tipo de función en forma de S puede capturar adecuadamente la respuesta tensión-deformación de una red elástica a macroescala en un medio viscoso (como el citoesqueleto) en rangos de tiempo cortos y largos (222). Por lo que, en la gráfica presentada en la figura 5.2B-ii es posible observar el rápido incremento de la concentración de proteína hasta alcanzar un valor constante por lo que la tensión soportada por la envoltura nuclear ha alcanzado un nuevo estado de equilibrio. Entonces, esto demuestra que es posible inferir una relación directa entre la viscoelasticidad de la envoltura nuclear y la rigidez de la ECM k_s , ya que la solución de las ecuaciones 5.7 - 5.10 proporciona las relaciones $l_A \sim k_s^{0.7}$ y $l_B \sim k_s^{0.2}$ como se ve en figura 5.2B-ii.

Para definir la forma explícita de $k_l = k_l(t)$ que describe la red de filamentos (citoesqueleto) que rodea al núcleo, pero que no está directamente conectado directamente a éste (figura

5.1A), se hipotetizó que el citoesqueleto se comporta como un material vítreo blando como es sugerido por B. Fabry, *et. al.* en (203). Se propuso utilizar entonces el marco teórico primeramente propuesto por Sollich y colaboradores en (202), el cual ha sido ampliamente utilizado para modelar la mecánica del citoesqueleto (223–225). El supuesto básico de este modelo es que el movimiento térmico por sí solo no es suficiente para describir una relajación estructural completa y, por lo tanto, el comportamiento mecánico resultante es una consecuencia natural de dos de las suposiciones básicas del modelo de vidrio blando: el desorden estructural y la metaestabilidad de los subcomponentes (202). Entonces, si suponemos un sistema mesoscópico finito en el que cada subcomponente del sistema es un filamento que forma parte de la red que rodea al núcleo celular (citoesqueleto), cada filamento presenta un comportamiento elástico lineal descrito por una constante k_i y una deformación l_i con respecto a la longitud de equilibrio l_{i0} . Luego, la energía elástica E_i asociada al i -ésimo filamento en un estado metaestable, puede estar dada por $E_i = \frac{1}{2}k_i(l_i - l_{i0})^2$, por lo que para modelar los efectos del desorden estructural, la energía elástica total del sistema se describe mediante una densidad de estados de energía (E_T). Entonces, el estado microscópico es descrito por una distribución de probabilidad $P(E_T, l; t)$, donde l es la deformación promedio de la red. Además, en el contexto de las teorías de campo medio, las interacciones entre los filamentos se subsumen en un parámetro de ruido térmico efectivo x_{eff} por lo que la forma de esta distribución de probabilidad en un estado de equilibrio P_{eq} dependerá del parámetro x_{eff} y aproximadamente toma la forma $P_{eq}(E) \sim \exp(-E_T/x_{eff}) \rho(E_T)$, lo que conduce a una ley de potencia para $k_l(t) \sim t^{1-x_{eff}}$ (202). En este trabajo, sólo se asumirán los casos en los que $1 < x_{eff} < 3$ y $x_{eff} < 1$ debido a que, cuando $x_{eff} > 3$, k_l representa a un sistema de Maxwell (que representa un comportamiento similar a un fluido para el cual el núcleo adquiere un comportamiento puramente viscoso lo que no es consistente con las observaciones experimentales). Por otra parte, si x_{eff} se encuentra en el intervalo (3,2), k_l adquiere el comportamiento de una ley de potencia, mientras que en el intervalo (2,1), k_l describe una pseudo ley de potencia o una ley de potencia débil. Finalmente, cuando $x_{eff} < 1$ entonces k_l tiende a un estado no estacionario. Además, $k_l(t)$ debe cumplir con que en breves períodos de tiempo, permanece casi constante, por lo que $\lim_{t \rightarrow 0} k_l(t) = k_{l0}$. Entonces, para el caso en que $1 < x_{eff} < 3$, si asumimos

que las constantes k_i asociadas al i -ésimo filamento son diferentes y adquieren valores positivos aleatorios, sin pérdida de generalidad se puede suponer que la función de densidad de energía sigue una distribución gamma, y por lo tanto:

$$k_l(t) = 1/(a + bt^{x_{eff}-1}) \quad (5.11)$$

donde a , b y x_{eff} son parámetros constantes que se pueden encontrar ajustando la ecuación 5.11 a datos experimentales, ya que la ecuación 5.11 satisface que $k_l(t) \approx t^{1-x_{eff}}$ y $k_l(0) \neq 0 \Rightarrow \frac{1}{a} = k_{l0}$. Por otro lado, cuando $x_{eff} < 1$ implica que $x_{eff} < x_g$ (donde x_g es la temperatura de transición vítrea y se definió como 1) y en consecuencia, no existe un estado de equilibrio ya que la probabilidad de acceder a todos los estados energéticos posibles disminuye y el sistema presenta diversos fenómenos de envejecimiento; es decir, $P(E_T, l; t)$ no presenta un estado estacionario en el tiempo. Sin embargo, si se impone un corte de alta

energía en la función de densidad de energía, $\rho(E_T) \Rightarrow k_l(t) \sim t^{1-x_{eff}} \sim \exp(-E_T/x_{eff})$, por lo que obtenemos la ecuación 5.12 utilizando una expansión de Taylor de tercer orden en $x_g = 1$:

$$k_l = a' - b' t + c' t^2 \quad (5.12)$$

donde las constantes a' , b' y c' de igual manera que las constantes de la ecuación 5.11, se pueden encontrar ajustando la ecuación con datos experimentales con la contricción $k_l(t = 0) = a = k_{l0}$.

La figura 5.2C muestra la evolución temporal de k_l cuando se comporta como un material vítreo blando cercano a su temperatura de transición vítrea o un material hiperelástico (curva negra horizontal). En este caso, la curva azul representa una ley de potencia débil debido a que $1 < x_{eff} < 3$ y la curva verde representa una función no lineal cuando $x_{eff} < 1$ con un punto estable cercano a las 100 horas. El valor $k_l(t = 0) = k_{l0}$ que es el estado de referencia del sistema se normalizó a 1 en todos los casos. los coeficientes b , b' y c' de las ecuaciones 5.11 y 5.12 pueden estar relacionados con la vida media de las proteínas del citoesqueleto las cuales van desde 50 h hasta 120 h (vidas medias típicas conocidas de los filamentos de queratinas, vimentina y otras proteínas citoesqueléticas (226). Adicionalmente, se observa que la curva azul en el panel 5.2C tiende a alcanzar un estado estable que depende del valor del coeficiente b , mientras que la curva que representa la ecuación 5.12 presenta un mínimo que depende de los valores de los coeficientes b' y c' .

Finalmente, se considera que las ecuaciones 5.1 - 5.12 describen completamente el Modelo Híbrido Viscoelástico (H-VM) del núcleo celular y la figura 5.2D resume el comportamiento del núcleo celular a escalas de tiempo mayores a horas e incluso días. Luego, los núcleos de las células que se cultivan en sustratos con una rigidez comparable a la de su estado de homeostasis mecánica (su rigidez natural u original) presentan un nivel casi constante de expresión de las Láminas A/C y B1 por lo que k_l permanece casi invariante. Sin embargo, si el núcleo es perturbado debido a que es sometido a una tensión mayor que la correspondiente a su estado de homeostasis mecánica, los niveles de expresión de las láminas nucleares se incrementan (figura 5.2B) y el valor de k_l puede disminuir monótonamente hasta alcanzar un valor mínimo estable (cuando la ecuación 5.11 es válida), o una vez que alcance un mínimo, aumente nuevamente su capacidad elástica de almacenamiento de energía (en el caso de la ecuación 5.12). Esto es de particular importancia porque, esencialmente, implica que el núcleo de las células sembradas en sustratos más rígidos (o de aquellas sometidas a grandes deformaciones) tendrá una mayor capacidad disipativa y de deformabilidad, mientras que los núcleos de las células cultivadas en materiales más blandos tienden a aumentar su capacidad de deformación elástica (régimen de baja deformación) y una menor capacidad disipativa. Una consecuencia directa de esto (que es predicha por el H-VM) es que si la deformación del núcleo a escalas de tiempo largas se describe en la ecuación 5.12 en lugar de con la ecuación 5.11, el núcleo recupera cierta capacidad de deformación elástica, i.e. si es deformado puede recuperar su forma original después de retirar el esfuerzo de deformación a través de la reorganización de la red de filamentos a su alrededor. Sin embargo, este proceso de reorganización tiene un

costo energético para la célula, ya que no es un proceso reversible. Esto sugiere que el núcleo celular ha pasado por un proceso de deformación largo que puede ser una forma de envejecimiento, cuyo origen radica en la naturaleza irreversible de la deformación nuclear. En la siguiente sección contrastamos más detalladamente el comportamiento viscoelástico contra el hiperelástico ya que en periodos de tiempo cortos dominan el comportamiento viscoelástico del núcleo.

Viscoelasticidad vs Hiperelasticidad

Para obtener una idea de las limitaciones del modelo 1D para una correcta interpretación de resultados, se simuló, por medio del módulo *Structural mechanics* de la versión 5.5 de COMSOL Multiphysics, la compresión de una esfera sólida de $5\ \mu\text{m}$ de radio que representa el núcleo celular, cuyas propiedades mecánicas coinciden con las del modelo propuesto a tiempo de escala cortos (figura 5.1B y ecuaciones 5.1-5.3). Dado que se ha reportado que el núcleo posee tanto un comportamiento mecánico reversible (194) como uno irreversible (215)(195), se simuló adicionalmente el caso en el que el núcleo se comporta como un material hiperelástico (modelo de Neo-Hooke). El *setup* simulado se muestra en la figura 5.3A y está configurado de la siguiente manera: la esfera que representa al núcleo celular se colocó sobre un material elástico lineal con un módulo de Young de 23 kPa y se comprimió con un disco cuyas propiedades mecánicas son equivalentes a las propiedades elásticas de un vidrio de silicio ($\sim\text{GPa}$). Además, se supuso que la contribución debida al estrés osmótico es constante a lo largo del tiempo, ya que se conoce que los esfuerzos osmóticos contribuyen a la resistencia de la deformación nuclear por compresión (227). También se consideró que la influencia de los poros nucleares es constante y lineal con respecto a la deformación total por lo que puede representarse como un factor de escala φ (ecuación 5.3). En particular, se utilizaron los valores del núcleo de un hepatocito sano (ver tabla 5.1), la cual fue comprimida 20% en la dirección z.

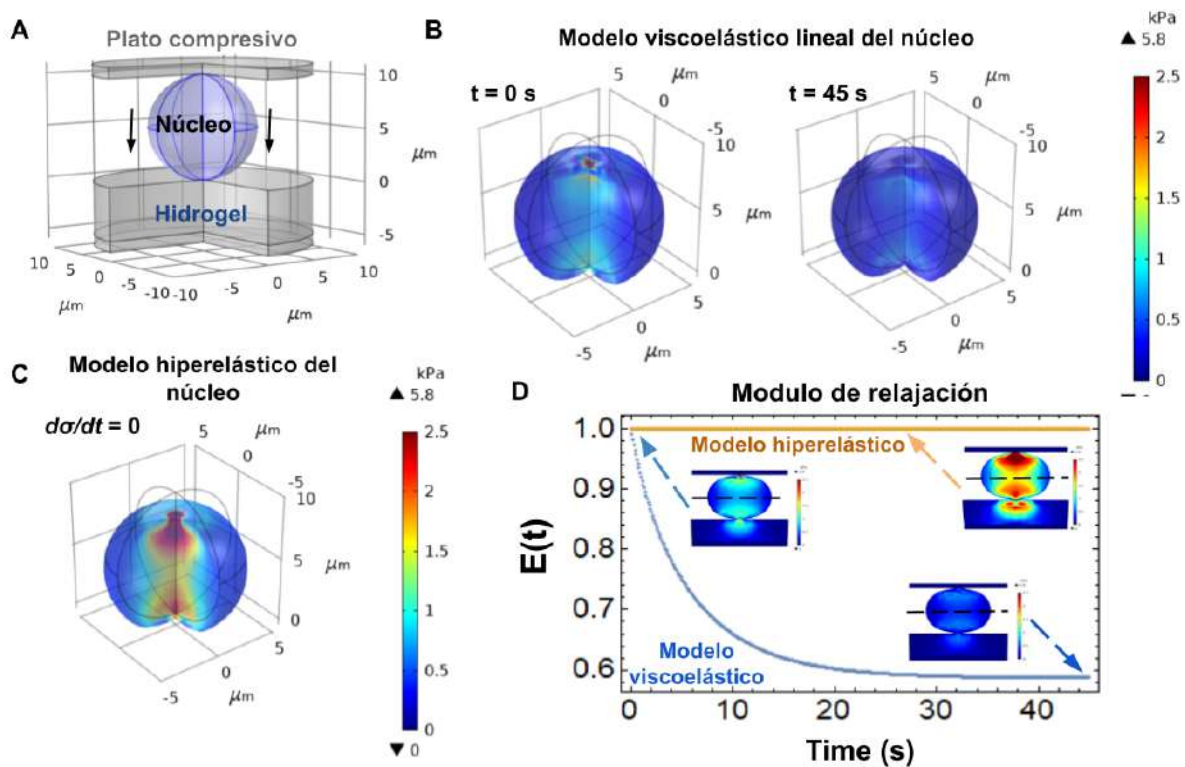


Figura 5.3 | Impacto de la disipación viscosa sobre las características mecánicas del núcleo celular 3D. Por medio de una simulación de elemento finito realizada con el módulo de mecánica estructural de Comsol Multiphasic 5.5, se simuló la compresión de una esfera sólida como un material viscoelástico lineal (sistema generalizado de Maxwell de 2 brazos) o un material hiperelástico (Neo Hooke). A) Arreglo utilizado para la compresión del núcleo entre un sustrato elástico lineal con un módulo de Young de 23 kPa y un disco de vidrio, se desplazó el plato de vidrio una distancia en z de 2 μm lo que genera una compresión de $\sim 20\%$, B) disipación temporal de los esfuerzos distribuidos a lo largo del núcleo simulado como un material viscoelástico lineal, C) distribución de esfuerzos sobre el núcleo simulado como un material hiperelástico, como se espera no existe dependencia temporal sobre los esfuerzos distribuidos sobre el núcleo, D) módulo de relajación sobre el plano transversal del núcleo, se observa que el comportamiento disipativo del núcleo no sólo disminuye el esfuerzo sobre éste, sino además, da lugar a una disminución del esfuerzo transferido al sustrato.

En los paneles 5.3B y 5.3C se presenta la comparación de la distribución de esfuerzos a lo largo de la geometría nuclear simulada como un material hiperelástico (panel 5.3B) y viscoelástico (panel 5.3C). Como se esperaba, la magnitud de los esfuerzos sobre el material hiperelástico es constante a lo largo del tiempo, lo que contrasta con la magnitud del esfuerzo a $t = 0$ s y su disminución a $t = 45$ s en el caso de la esfera simulada como un material viscoelástico. Además, se observa que en ambos casos existe cierta transmisión de esfuerzos al sustrato cuando el núcleo es comprimido, lo que sugiere que en un evento como la compresión nuclear, existirá de igual manera la disipación o almacenamiento de energía elástica, lo que dependerá de las propiedades mecánicas del sustrato sobre el cual la célula se encuentre. La simulaciones mostradas en los paneles 5.3B - C muestra que cuando el núcleo es asumido como un material disipativo y es sometido a una deformación constante a lo largo del tiempo, el esfuerzo soportado por este disminuirá en cuestión de minutos o segundos a diferencia de cuando el núcleo es un material no disipativo, este soportará toda la intensidad del esfuerzo a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la capacidad disipativa del núcleo cobra suma relevancia, ya que, le confiere al núcleo cierta resistencia a

la fatiga por estrés y por ende le confiere mayor estabilidad estructural para soportar esfuerzos mayores a los que soportaría cuando el núcleo solo se comporte por un material hiperelástico. Estos resultados muestran que a pesar de que el H-VM es un modelo unidimensional simplificado, resultó coherente con una simulación FEA 3D (comparar la figura 5.1 contra la 5.3), Ya que, se mostró la formulación completa del H-VM, se procederá a simular uno de los eventos más comúnmente observado en los cultivos *in vitro* que es el esparcimiento de la célula y su núcleo en función de la rigidez del sustrato; este evento se describe detalladamente a continuación.

Deformación del núcleo celular

Los resultados presentados en la figura 5.1, obtenidos a partir del modelo H-VM en una dimensión, reprodujeron teóricamente el comportamiento del núcleo celular reportado en la literatura con ensayos de indentación (205), relajación (228) y deformaciones periódicas (167, 205). Además, se propuso una expresión explícita (ecuaciones 5.5 y 5.6) para modelar el comportamiento activo de la envoltura nuclear y la dinámica de la red de filamentos que rodean la estructura nuclear (ecuación 5.11 o 5.12). Entonces, se unirá el H-VM con otros elementos mecánicos que representan la estructura mecánica interna de una célula (aparato de actomiosina y adhesiones focales) para describir la respuesta mecánica del núcleo dentro de la célula a los esfuerzos fisiológicos ejercidos en escalas de tiempo prolongadas. Por lo tanto, se modeló el mecanismo de esparcimiento (*spreading*) celular, inducido por la rigidez del sustrato y reportado en muchos tipos celulares en cultivo. Dada la naturaleza de este fenómeno, puede ser bien aproximado por un modelo 1D (Figura 5.4A), a causa de la existencia de una conexión directa entre la ECM y el núcleo. Durante el *spreading* celular, la deformación nuclear se debe principalmente a una tensión contráctil producida por el aparato de actomiosina que es dependiente de la rigidez del sustrato (181). Para reproducir este fenómeno, se propuso una representación mecánica de la célula, que se muestra en la figura 5.4B. Este sistema representa la unión entre el modelo H-VM y un conjunto de elementos mecánicos propuesto anteriormente por el grupo de Shenoy (181, 201, 229) y representa la actividad quimio-mecánica ρ de los motores moleculares de miosina en paralelo con la resistencia a la compresión $k_{\mu T}$ de los microtúbulos, la tensión de los filamentos de actina k_a y la rigidez efectiva k_{eff} del complejo de adhesión unido a la ECM (en el Anexo 2 se muestra una descripción detallada de la solución al sistema de ecuaciones que describen el ensamble de la figura 5.4B). El panel 5.4C presenta la disipación del esfuerzo generado por el aparato de actomiosina en función de los niveles de expresión de las láminas nucleares a diferentes tiempos, que corresponden al tiempo característico de la cromatina (5 s) y al tiempo propio de la envoltura nuclear (129 s) de un hepatocito perteneciente a un hígado fibrótico con una microrrigidez de 23 kPa (210) (Ver Tabla 5.1). En adición a esto, en el panel 4.4C se observa que la magnitud del esfuerzo $\sigma(t)$ generado por el aparato de actomiosina es dependiente de los niveles de η_{LA} y k_{LB} . Para valores grandes de η_{LA} y k_{LB} , la magnitud inicial de la tensión puede mantenerse por un periodo de tiempo más largo, pero sufre una mayor disipación una vez que alcanza un estado estable mayor a $\tau_{NE} = \eta_{LA}/k_{LB}$, que depende de la rigidez del sustrato k_S y de $k_i(t)$. Los puntos blanco ($\tau_{NE} = 1$ s) y rojo ($\tau_{NE} = 129$ s) representan los tiempos de relajación de la NE de los hepatocitos de un hígado sano y con una fuerte fibrosis, respectivamente (ver tabla 5.1). La

deformación nuclear $\varepsilon_n(t)$ se calculó utilizando la integral de Boltzmann (ecuación 5.13) que es una función del módulo de fluencia $J(t)$ y del esfuerzo dinámico $\sigma(t)$, cuyo comportamiento temporal se presenta en el panel 4.4D y depende principalmente de los valores de $\eta_{LA}(t, f)$, $k_{LB}(t, f)$, $k_l(t)$ y de k_s . Como se puede ver en este panel 5.4D, $J(t)$ resulta inversamente proporcional al valor de la rigidez de la ECM, lo cual es consistente con lo ya reportado en la literatura (196, 230). La ecuación 5.13 describe la deformación dependiente del tiempo que resulta de la aplicación de una tensión dependiente del tiempo (t) con un valor estable que es función de la rigidez del sustrato. En la ecuación, el parámetro ξ es una variable de convolución:

$$\varepsilon_n(t) = \int_{t_0}^t J_n(t - \xi) \frac{d}{dt} \sigma(\xi) d\xi \quad (5.13)$$

Las ecuaciones 5.1-5.3, no definen explícitamente algún estado de referencia en particular. Sin embargo, sus condiciones iniciales junto con las condiciones iniciales de las ecuaciones 5.6-5.12 imponen un estado de referencia específico que puede asociarse a las condiciones particulares de cada tipo celular. De hecho, la ecuación 5.13 está bien definida para $t_0 \geq 0$ donde t_0 representa un estado dado de referencia. Por lo tanto, la deformación nuclear total dada una condición de referencia se calcula usando la ecuación 5.14:

$$\epsilon_n(t) = \lambda - 1 = \frac{\varepsilon_n(t) - \varepsilon_{n0}(t_0)}{\varepsilon_{n0}(t_0)} \quad (5.14)$$

donde $\lambda = l/l_0$ es la definición común de la deformación, $\epsilon_n(t)$ es la definición de la deformación de Cauchy y $\varepsilon_{n0}(t_0) = l_0$ es la configuración de un estado estable de referencia. Este sistema completo de ecuaciones (ver anexo 2) se resolvió en el dominio de Laplace, por simplicidad, usando Wolfram Mathematica 12.1 y utilizando como parámetros iniciales los valores reportados en la literatura para hepatocitos (ver Tabla A2.1 en el anexo 2). Los resultados de la simulación de la deformación nuclear debido a la contractilidad del aparato de actomiosina en función de la rigidez de la ECM se muestran en la figura 5.4E, donde se observa que la deformación nuclear aumenta cuando k_l se comporta como un material blando vítreo cerca de su temperatura de transición vítrea. Esta condición representa la dinámica de la red de filamentos que constituyen el citoesqueleto que rodea el núcleo celular, en contraste con el comportamiento típico (constante) mostrado por un modelo elástico lineal, que no presenta dependencia temporal al no tomar en cuenta la deformación pasiva de la red de filamentos circundantes al núcleo. Todo esto es de suma importancia porque los resultados sugieren que ciertos fenómenos como el ablandamiento (231) y el endurecimiento (231, 232) del núcleo no solo están regulados por los componentes estructurales intrínsecos del núcleo, sino también por la red de filamentos que lo rodean y que le confieren cierto soporte estructural, en este contexto el H-VM resulta de gran utilidad ya que permite conocer la contribución de cada elemento estructural de forma individual y acoplada. La figura 5.4F, muestra los parámetros utilizados para describir con la forma geométrica del núcleo. Con estos, se cuantificó la deformación, el factor de forma, la relación de aspecto y el coeficiente de Poisson a cualquier instante de tiempo (ver sección

experimental).

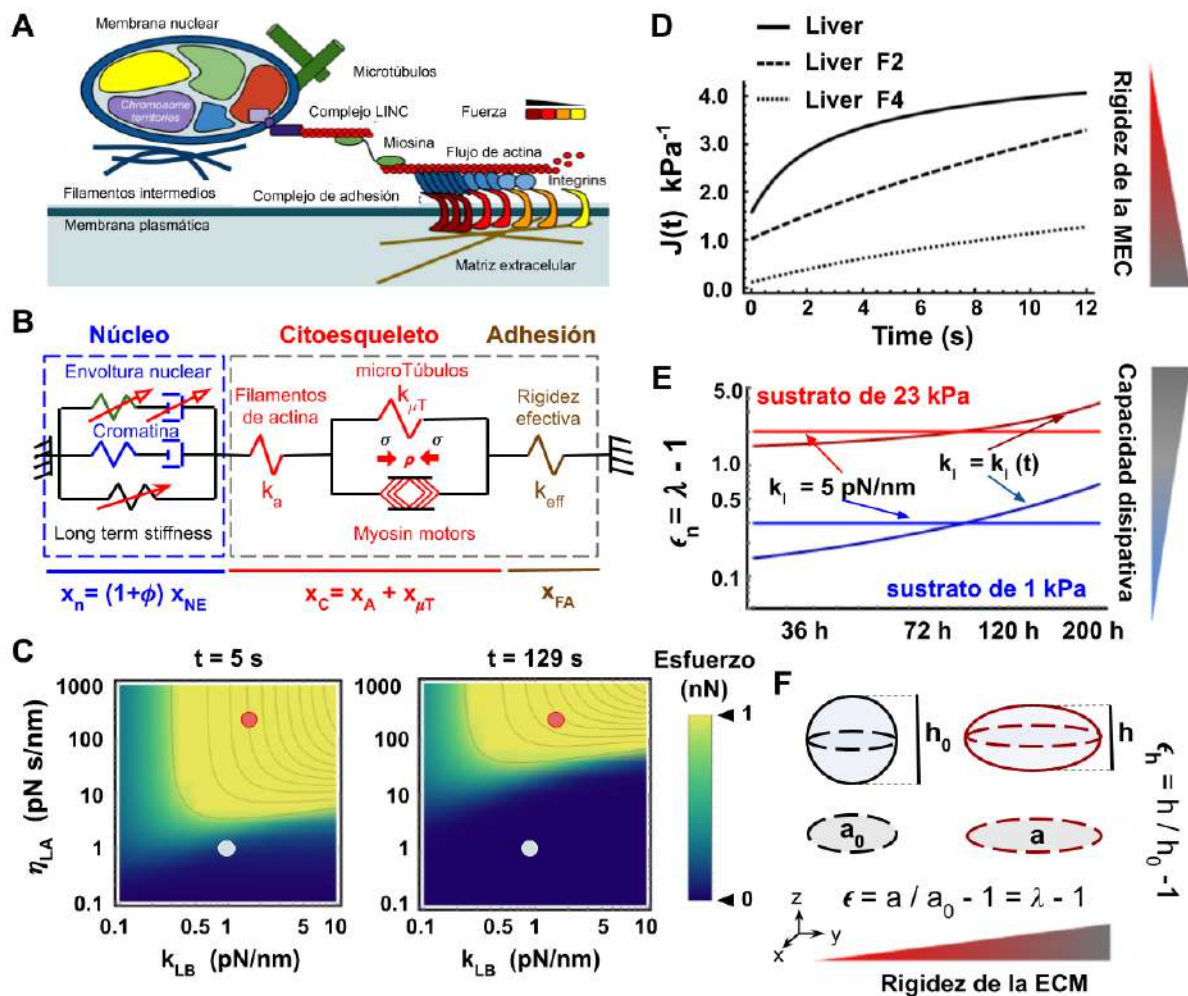


Figura 5.4 | Representación mecánica de una célula adherente. A) Diagrama esquemático del enlace directo entre la MEC y el núcleo a través del complejo de adhesión y el aparato de actomiosina, teniendo en cuenta la resistencia a la compresión de los microtúbulos y la red de filamentos intermedios que rodean el núcleo, proporcionando soporte estructural. B) Representación mecánica de una célula adherente mediante el modelo H-VM. Las flechas rojas en los elementos representativos de la envoltura nuclear y la rigidez a largo plazo representan la dependencia temporal de estos parámetros. También se considera que las adhesiones focales están en equilibrio dinámico (se mantienen a lo largo del tiempo). C) Disipación del esfuerzo generado por el aparato de actomiosina en función de los niveles de viscosidad y elasticidad de las láminas nucleares a un tiempo $t = 5$ s (tiempo de relajación de la cromatina) y a $t = 129$ s (tiempo de relajación de la envoltura nuclear de un hepatocito de un hígado altamente fibrótico de 23 kPa (210). El punto blanco representa los niveles de lamina A/C y lamina B1 de un hepatocito sano (tejido hepático blando) y el punto rojo señala los mismos niveles pero para un hepatocito perteneciente a un hígado en estado de fibrosis fase 4 (F4). D) Módulo de fluencia del modelo H-VM en función de la rigidez de la ECM para un hígado sano y blando (~ 1 kPa), un hígado fibrótico fase 2 (F2) ($\sim 12,5$ kPa) y un hígado fibrótico en fase 4 (~ 23 kPa). E) Deformación nuclear en función del tiempo calculada con dos modelos diferentes: núcleo elástico (línea horizontal) y un núcleo modelado como un material blando vítreo (línea ascendente). Cuanto mayor es la rigidez del ECM, mayor es la deformación y la capacidad de disipar la energía elástica (la ecuación 10.1 muestra que $k_l(t)$ disminuye con el tiempo). F) Área proyectada utilizada para calcular la deformación nuclear longitudinal ϵ y el cambio de la altura. Los valores de referencia del área proyectada a_0 y la altura h_0 provienen de una pre-condición mecánica

estable.

Evolución de la forma del núcleo de hepatocitos primarios

Con el fin de explorar la influencia de la rigidez del sustrato sobre la forma geométrica del núcleo celular, se sembraron hepatocitos primarios de rata Wistar sobre hidrogeles de poliacrilamida con una rigidez nominal de 1 y 23 kPa, se fijaron con paraformaldehído al 4% a diferentes tiempos de cultivo de 2, 36, 72 y 120 horas. Se seleccionaron rigideces de los geles de 1 kPa (fisiológicamente blando) y 23 kPa (rígido) para imitar las rigideces naturales de un hígado sano y fibrótico, respectivamente (207) (233) (210). Después, para cuantificar la respuesta mecánica del núcleo a la rigidez del sustrato, se cuantificó el área, la altura, la deformación y el coeficiente de Poisson de los núcleos. En la figura 5.5, paneles A y B, se presenta un conjunto de micrografías representativas de los núcleos de las células hepáticas (que fueron marcados con DAPI), así como la citoqueratina-18 (CK-18), que es un tipo de filamento intermedio que fue marcado por inmunofluorescencia y la red de filamentos de actina (F-actina) marcada con faloidina acoplada a Alexa 488.

Los datos de área, altura, intensidad de fluorescencia, factor de forma y relación de aspecto se obtuvieron con un programa de segmentación desarrollado en el laboratorio específicamente para el proyecto, escrito en Python 3.0. Los resultados se procesaron y analizaron con un cuaderno Wolfram Mathematica 12.1 (ver Anexo A2 para una explicación más detallada), obteniendo así diversos histogramas para cada condición experimental y cada magnitud cuantificada. Para cada histograma obtenido se ajustó una función de densidad de probabilidad (PDF) que describe inequívocamente la variabilidad de la medición por cada condición. Todos los histogramas asociados con las propiedades de interés de los núcleos de los hepatocitos primarios se muestran en el anexo 2 figuras A2.1 y A2.2. Curiosamente, se encontró la existencia de dos poblaciones muy marcadas de tamaño del núcleo en ambas condiciones de rigidez. En el caso del sustrato blando, una población mantuvo su área casi constante (figura 5.5A), mientras que la otra presentó un aumento en casi un 40% después de las 120 horas de cultivo. Este comportamiento interesante se ve exacerbado en las células cultivadas sobre el sustrato más rígido, donde ambas poblaciones aumentaron su tamaño. Una población sufrió un aumento aproximadamente del 300% (de $79,91 \pm 21,58 \mu\text{m}^2$ a las 2 h a $224,53 \pm 78,13 \mu\text{m}^2$ a las 120 h), mientras que la otra población se comportó de manera similar a los núcleos de las células sembradas en el sustrato de 1 kPa después de 120 horas de cultivo. por un lado, en el hidrogel suave el área proyectada más grande a las 120 h del cultivo tuvo una magnitud de $99,80 \pm 24,87 \mu\text{m}^2$ mientras que en la condición rígida, el área más pequeña fue de $116,88 \pm 30,54 \mu\text{m}^2$ a las 120 h, (anexo 2 figuras A2.1- A2.2).

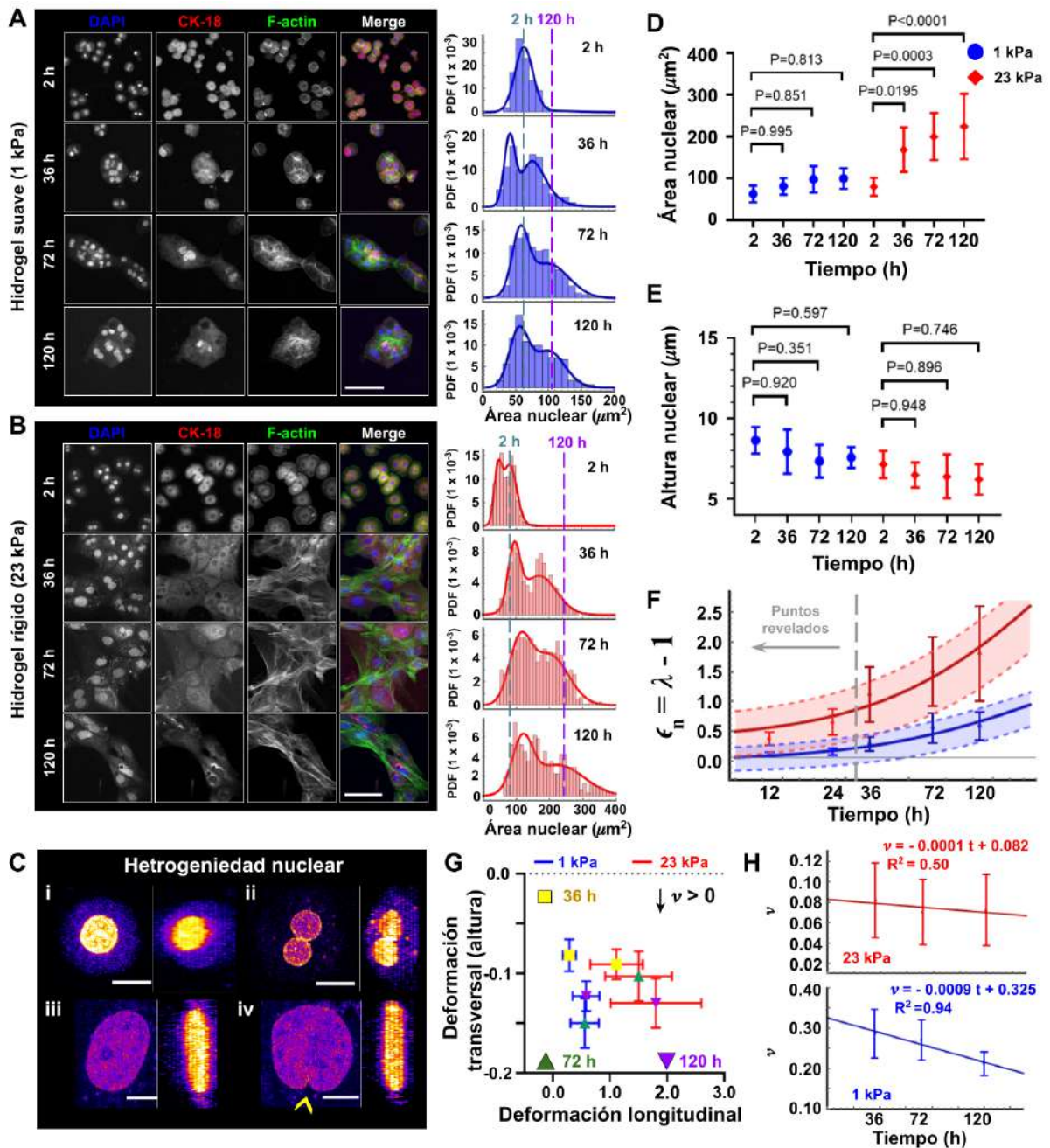


Figura 4.5 | Evolución temporal de la forma del núcleo perteneciente a hepatocitos primarios. A-B) Micrográficas representativas de hepatocitos recién aislados sembrados en hidrogeles de poliacrilamida (HG) con una rigidez nominal de 1 kPa y 23 kPa, conjugados con colágena tipo I. Las células se cultivaron y fijaron hasta las 2, 36, 72 y 120 horas y se muestran los canales DAPI (azul), CK-18 (rojo), F-actina (verde), junto con la fusión de los tres canales. Los histogramas del lado derecho representan las áreas proyectadas de los núcleos en función de su función de densidad de probabilidad (PDF). La deconvolución de la PDF asociada refleja la existencia de dos tamaños (áreas proyectadas); mientras que uno se mantiene prácticamente constante, el segundo aumenta su área proyectada con el tiempo. Las líneas verticales discontinuas muestran el cambio máximo de área proyectada que se produjo entre las 2 h y las 120 h de cultivo. C) Micrográficas representativas, que muestran (i) células mononucleares y (ii) binucleares. Los núcleos presentados en (iii) y (iv) pertenecen a la condición rígida de 23 kPa después de 120 h. D) Valor promedio \pm DE del área y la altura del núcleo (E), que pertenecen a la población celular que sufre el mayor cambio de su área proyectada. Sólo se observa una diferencia significativa para el área de hepatocitos cultivados en 23 kPa HG, en

contra de su control ($t = 2$ h). F) Comparación de la deformación predicha por el H-VM y los datos experimentales, para ajustar el modelo se utilizaron los puntos 36, 72 y 120 h G) Deformación longitudinal (en el plano del área proyectada) vs deformación transversal (ortogonal al plano del área proyectada i.e. la altura del núcleo). Tanto la deformación transversal como la longitudinal varían continuamente en ambas condiciones, cuadrados amarillos = 36h, triángulo verde = 72h y triángulo morado = 120h. H) Coeficiente de Poisson (ν) de los núcleos pertenecientes a hepatocitos primarios, junto su ajuste lineal que sugiere un comportamiento augético. Barras de escala: 60 μm en A), 80 μm en B), 10 μm en C). Los datos presentados en D) y E) se analizaron con un análisis de varianza de una vía (oneway ANOVA) con la corrección de Tukey para múltiples comparaciones, se considera estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

La existencia de dos subpoblaciones de tamaño de núcleo posiblemente está relacionada con el hecho de que la población de hepatocitos es heterogénea, ya que comúnmente pueden ser células mononucleadas o binucleadas. La presencia de esta heterogeneidad se observa en la figura 5.5C-i y 5.5C-ii. Adicionalmente a la cuantificación automática realizada (ver anexo 2), se utilizó el software ImageJ para cuantificar de forma manual el área proyectada por el núcleo de los hepatocitos, con el fin de establecer cuál de las dos poblaciones representan el área proyectada de los núcleos de las células mononucleares, ya que estas son las que pueden aproximarse adecuadamente mediante la representación mecánica celular que se muestra en la figura 5.4B, que corresponde al esparcimiento celular debido a la rigidez de la ECM. Los resultados de la cuantificación manual del área proyectada, el factor de forma y la excentricidad de los núcleos se presentan en el anexo 2 figura A2.6, estos resultados muestran que las células mononucleares aisladas o en los bordes de los cúmulos celulares son los que sufren una mayor deformación en función de la rigidez del sustrato. Los paneles 5.5D y 5.5E muestran la evolución temporal del área y la altura de los hepatocitos primarios cultivados en ambas condiciones de rigidez. La condición del estado de referencia se definió como: el estado que supone menor cambio de sus características morfológicas con respecto con el estado *in vivo*. Por lo tanto, se eligieron las células fijadas después de las dos horas de cultivo, ya que se considera que corresponde al tiempo en el que la adhesión está garantizada pero antes de que ocurra cualquier modificación interna debida a la rigidez del sustrato (181). En el panel 5.5D se observa claramente que los núcleos de las células cultivadas sobre el sustrato rígido sufren una mayor deformación que las que fueron sembradas en el sustrato suave, las cuales casi no sufren deformación por lo que permanecen constantes. Además, aunque no parece significativo, se observa una disminución en la altura de los núcleos en el panel 5.5E. Dada la robustez del modelo generalizado de Maxwell (en el que se basa principalmente el H-VM, ver capítulo 3), el resultado depende fuertemente de la obtención de sus coeficientes a partir del ajuste a datos experimentales. Entonces, para calcular teóricamente la deformación del núcleo es necesario recolectar los siguientes parámetros y coeficientes constantes: k_{s0} (rigidez del sustrato de referencia), k_{l0} (rigidez a largo plazo de la condición de referencia) y las constantes a , b y x_{eff} (o a' , b' y c'), pertenecientes a las ecuación 5.11 (o 5.12). Como se mencionó, los núcleos de los hepatocitos sembrados en el hidrogel con una rigidez nominal de 1 kPa y fijados a las 2 horas de cultivos fueron utilizados para la calibración del modelo H-VM determinado así el estado de referencia (tamaño inicial del núcleo) y para calcular la deformación de Cauchy definida por la ecuación 5.15.

$$\epsilon_n = \frac{a_t - a_0}{a_0} \quad (5.15)$$

donde a_t es el área proyectada a un tiempo t dado y a_0 es el área proyectada del estado de referencia. Debido a las condiciones experimentales, se asumió que el área proyectada es consecuencia de la tensión generada por el aparato de actomiosina que es función de la rigidez del sustrato, y que esta tensión se encuentra en el mismo plano que el del área proyectada (165, 234, 235). Por lo tanto, es válido utilizar la ecuación 5.15 para calcular la deformación nuclear obtenida a partir de datos experimentales y los resultados del modelo H-VM. La comparación entre los datos experimentales y el modelo propuesto se presenta en la figura 5.5F. Es importante destacar que se encontró que la tendencia de $k_i(t)$ se ajusta de una manera adecuada al comportamiento de un material vítreo blando (ver figura 5.5F) y este no permanece constante a lo largo del tiempo, confirmando así que el núcleo no se comporta como un material elástico lineal o hiperelástico como comúnmente se asume.

El comportamiento de $k_i(t)$ que asociamos a la reorganización pasiva de los filamentos intermedios que rodean al núcleo y aparentemente gobiernan la morfología nuclear a largo plazo, se determinó ajustando los valores experimentales de la deformación nuclear en diferentes momentos y en ambas condiciones de rigidez con nuestro modelo (utilizando un programa realizado con Wolfram Mathematica 12.1, ver anexo 4). En este programa básicamente se analiza si la ecuación 5.11 o la ecuación 5.12 ajustan de manera adecuada los valores de deformación utilizados para calibrar el H-VM. Para conocer la bondad del ajuste de $k_i(t)$ se utilizó el coeficiente de determinación R-cuadrado y del criterio de información de Akaike (AIC) (236) (ver Tabla A2.2 en anexo 2). Luego, el modelo calibrado con los datos experimentales de 36, 72 y 120 horas, fue utilizado para revelar el área proyectada por los núcleos a tiempos menores de 12 y 24 horas, obtenidos de otros dos experimentos independientes con hepatocitos primarios frescos cultivados en las mismas condiciones, pero fijados y teñidos a las 12 y 24 horas (ver la figura A2.7 en el anexo 2).

La figura 5.5F muestra que el modelo propuesto es capaz de revelar valores previos de la deformación nuclear en función de la rigidez del sustrato a partir de mediciones experimentales de los núcleos de hepatocitos de cultivo primario. Para el hidrogel blando, los valores de deformación revelados por el modelo a las 12 y 24 h con un intervalo de confianza del 90% son 0.09 ± 0.18 y 0.17 ± 0.19 respectivamente, lo cual es muy cercano a los resultados experimentales que fueron 0.1 ± 0.04 a las 12 h y $0.16 \pm 0,06$ a las 24 h. Para la condición rígida, los valores de deformación revelados por el modelo a las 12 y 24 h con un intervalo de confianza del 95% son: 0.56 ± 0.37 y 0.75 ± 0.38 respectivamente, y los datos experimentales fueron 0.38 ± 0.10 y 0.65 ± 0.22 . La gran similitud entre los valores experimentales y teóricos mostrados resulta sumamente relevante, ya que la deformación es un parámetro muy sensible a los cambios por lo que pequeñas variaciones del área proyectada se verán reflejadas en una mayor deformación del núcleo, además, el hecho de que se utilizó un intervalo de confianza de al menos 90%, implica que el modelo H-VM es capaz de revelar los valores de deformación nuclear en al menos 90% de los núcleos cuantificados. También, con el H-VM es posible calcular la rigidez k_{s0} , este parámetro puede interpretarse como la rigidez de la última condición estable en la que estuvo el hepatocito, en este caso se interpreta como la rigidez del hígado sano del que proceden las células antes

del cultivo en hidrogel. En este caso, el modelo reveló un valor de k_{s0} de 0.75 pN / nm, valor muy cercano con lo reportado en la literatura donde reportan que la rigidez de los hepatocitos oscila entre 0.75 y 1 kPa (208, 237), entonces, utilizando la relación de Boussinesq Green (104, 235) y una escala de longitud de 1 μ m (235), se obtiene que una rigidez de 0.75 y 1 kPa es equivalente a 0.75 - 1 pN / nm. Por lo tanto, la rigidez del hígado sano que es de $\sim 1.12 \pm 0.15$, será equivalente a $\sim 1.12 \pm 0.15$ pN / nm. A partir de la dinámica del modelo H-VM, se puede inferir que a escalas de tiempo largas, el núcleo de los hepatocitos primarios probablemente adquirirá un estado altamente disipativo en los sustratos con una rigidez superior a la rigidez de referencia $k_s > k_{s0}$ (k_{s0} es la rigidez de hígado sano en este caso). De hecho, en estas condiciones, el valor k_l asociado con el almacenamiento de energía elástica (de acuerdo con la Ecuación 5.11) tenderá a disminuir con el tiempo, mientras que el tiempo característico de la envoltura nuclear τ_{NE} aumentará. Lo que sugiere, que la contención de forma de la red de filamentos que rodean al núcleo disminuirá, mientras que los niveles de expresión de la Lámina A aumentaran.

En el panel 5.5G se presenta el gráfico de la deformación transversal (cambio de la altura h) en función de la deformación longitudinal (cambio el área proyectada a_t) calculada con la ecuación 5.15. Este resultado experimental muestra que la deformación es dependiente del tiempo, incluso a tiempos largos, ya que se observa una variación continua en ambas condiciones de rigidez. Dado que el coeficiente de Poisson está definido como el cambio de la deformación transversal entre la longitudinal $\nu = - \Delta transversal / \Delta longitudinal$, por lo que las mediciones del cambio de la altura y del cambio del área proyectada se utilizaron para determinar el coeficiente de Poisson como se muestra en en panel 5.5H. Como una primera aproximación, se calculó el promedio sobre todos los puntos de tiempo obteniendo $\nu \approx 0.074 \pm 0.006$ y $\nu \approx 0.255 \pm 0.039$ para la condición rígida y suave respectivamente. Sin embargo, como se observa en el panel 4.5H, la relación de Poisson presenta un comportamiento dependiente del tiempo, lo que es congruente con lo reportado previamente en la literatura para células eucariotas (238). Debido a la tendencia de los datos experimentales, se realizó un ajuste lineal a los datos obtenidos, siendo el coeficiente de determinación $R^2 = 0.94$ para la condición suave, y $R^2 = 0.50$ para la condición rígida, lo que sugiere que el coeficiente de Poisson posee un comportamiento lineal en la condición suave, mientras que la condición rígida puede presentar un coeficiente de Poisson no lineal. Curiosamente, un ajuste automatizado proporcionado por el software reveló un comportamiento no lineal de la relación de Poisson del núcleo, para la condición rígida, el mejor ajuste fue $0.104 - 7.77 \times 10^{-4}t + 4.26 \times 10^{-6}t^2$ con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$ y para el condición blanda fue $0.27 + 7.98 \times 10^{-4}t - 1.07 \times 10^{-5}t^2$ con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$. El cambio de signo del coeficiente en el término lineal sugiere que el volumen nuclear tiene dos fases en el tiempo y esto puede depender de la rigidez del sustrato sobre dónde se encuentra sembrada la célula. Además, la disminución observada en el coeficiente de Poisson a tiempos largos que se muestra en la el panel 4.5H también es representativa de materiales que exhiben un comportamiento blando vítreo (238). Sumado a esto, para verificar si el núcleo de células fijado a las 2 horas de cultivo es un buen punto de referencia, se utilizó la deformación logarítmica para calcular la pre-tensión del núcleo (ver la figura A2.7 en el anexo 2). Se encontró un valor de 0.993, lo que significa que el núcleo de los

hepatocitos primarios poseen una pre-tensión de 0.397 kPa, que es del mismo orden de magnitud que el valor reportado de 0,5 kPa (239) (240).

Evolución de la forma del núcleo de la línea celular HepG2

Con el objetivo de comprobar si el comportamiento dinámico observado en los núcleos de los hepatocitos primarios es dependiente del tipo celular o de alguna condición específica, se buscó comparar el comportamiento de los hepatocitos primarios con el de la línea celular HepG2, proveniente de un hepatocarcinoma humano y cultivada en la mismas condiciones de rigidez, además ha sido reportado que ambos tipos celulares presentan una respuesta diferente a la mecánica del sustrato (241). De hecho, se asumió que la condición mecánica estable de referencia de las HepG2 diferirá de la de los hepatocitos primarios, debido a que se origina en un estado mecánico alterado como lo es el cáncer, que regularmente altera las propiedades de la ECM (242, 243), aunque esta línea celular aún conserva ciertas características epiteliales y responde a la rigidez del sustrato (244). Los resultados obtenidos de los experimentos con esta línea celular se muestran en la figura 5.6, se buscó presentarlos de manera similar a los resultados de los hepatocitos primarios en la figura 5.5, para que la comparación del comportamiento nuclear de una célula primaria (originada a priori de un estado de homeostasis mecánicamente estable) con una línea celular cancerosa (a priori partiendo lejos del estado mecánico natural de un hígado blando) sea más directo.

Los resultados de la evolución temporal de la forma nuclear para las células HepG2 se presentan en la figura 5.6. Los paneles A y B muestran las micrografías representativas asociadas con las diferentes condiciones de rigidez y se observa que al igual que los hepatocitos primarios, también aparecen dos poblaciones en los histogramas. Sin embargo, en este caso, el cambio máximo en el área proyectada ocurrió a las 72 h y luego disminuyó, mientras que para los hepatocitos primarios, el máximo fue a las 120 h de cultivo. Esto es más evidente en los paneles 5.6C y 5.6D donde se observa una reducción en el área proyectada, así como un aumento en la altura del núcleo en la condición suave. Esta tendencia es aún más clara en el panel 5.6E donde se nota el comportamiento no lineal de la deformación $\epsilon(t)$. En este caso, el ajuste de la evolución de la deformación nuclear fue mediante la ecuación 5.12, lo que el contexto de los materiales blandos vítreos, implica que $k_l(t)$ no adquiere un estado estable a lo largo del tiempo. Esto podría estar asociado a un fenómeno similar al envejecimiento, ya que los subcomponentes celulares asociados a $k_l(t)$ (aquí se asumió que son los filamentos que rodean al núcleo, figura 5.1A) no son capaces de acceder a todos los estados energéticos posibles. Esto, a su vez, indica que $P(E_r, l|t)$ no presenta un comportamiento constante en el tiempo, lo que en el contexto del modelo de vidrio blando es precisamente la definición de envejecimiento (202). Físicamente esto significa que es necesario el consumo de energía para que la red de filamentos que rodea al núcleo vuelva a su estado energético previo. Adicionalmente, en el panel 5.6E se observa que la deformación que sufre el núcleo de la célula en condición blanda antes de las 72 h es mayor que la deformación del núcleo de la línea en condición rígida.

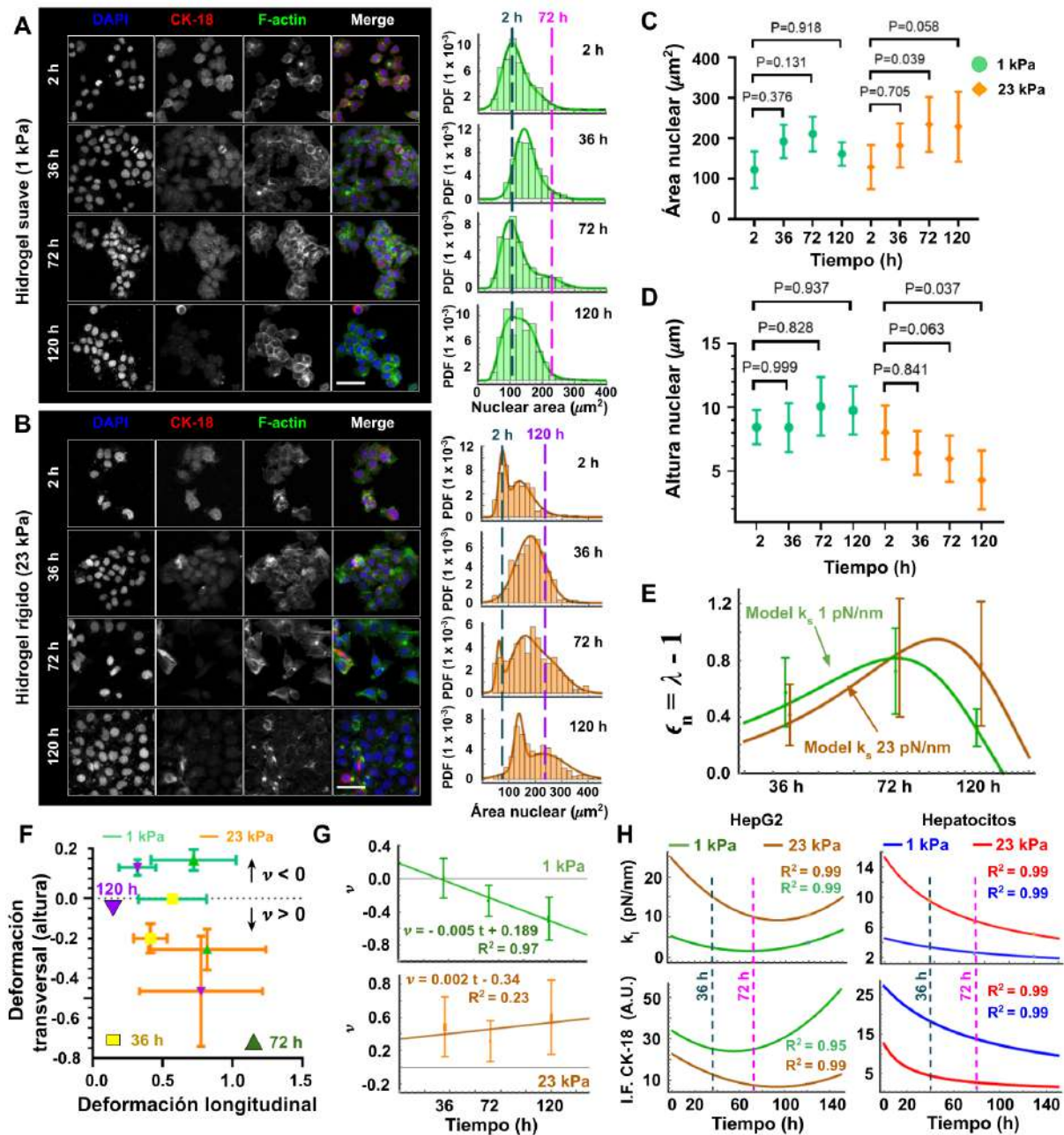


Figura 5.6 | Evolución de la forma nuclear de la línea celular HepG2. A-B) Micrográficas representativas de células HepG2 sembradas sobre hidrogelos de poliacrilamida con una rigidez de 1 kPa (A) y 23 kPa (B) conjugados con colágena tipo I. Las células se cultivaron y fijaron a las 2, 36, 72 y 120 horas y se muestran los canales DAPI (azul), CK-18 (rojo), F-actina (verde), junto con la fusión de los tres canales. Los histogramas del lado derecho representan las áreas proyectadas de los núcleos en función de su función de densidad de probabilidad (PDF). La deconvolución de la PDF asociada a cada condición refleja la existencia de dos diferentes magnitudes del área proyectada por los núcleos; mientras que una se mantiene prácticamente constante, la otra aumenta su área con el tiempo. Las líneas verticales punteadas muestran el cambio máximo del esparcimiento celular, el que ocurrió entre a las 72 h de cultivo en sustratos blandos y a las 120 h de cultivo sobre sustratos rígidos. C-D) Gráficas con el promedio \pm desviación estándar del área y la altura de la población celular que sufre el mayor cambio de su área proyectada. Una vez más, solo se observa una diferencia significativa para el área de HepG2 cultivada en un hidrogel de 23 kPa. E) Comparación entre los datos experimentales del panel C y el ajuste del H-VM a la deformación nuclear utilizando la Ecuación 4.15.

F) Deformación longitudinal (en el plano del área proyectada) vs. la deformación en altura (ortogonal al plano del área proyectada). La deformación longitudinal es mayor antes de las 72 horas en cultivo, luego la deformación en altura absoluta aumenta, a diferencia de lo encontrado con las células primarias donde se observó que tanto la deformación longitudinal así como la transversal varían de manera similar a lo largo del tiempo. Además, aquí la rigidez del sustrato parece importante en el comportamiento celular. G) Graficas del coeficiente de Poisson (ν) que muestra que este sufre una disminución a lo largo del tiempo para los núcleos de la línea HepG2 sembradas en sustratos blandos, el ajuste lineal a ν sugiere un comportamiento augético de los núcleos en ambas condiciones de rigidez después de 72 h. H) Comparación entre las funciones de ajustadas de $k_i(t)$ para los datos de las células HepG2 y los hepatocitos primarios en dos rigideces diferentes más comparación entre la intensidad de fluorescencia (IF) de la CK-18 para ambas células. Barras de escala: 60 μm en (A), 60 μm en (B). Los datos mostrados en (C) y (D) se analizaron con un análisis de varianza de una vía (oneway ANOVA) con la corrección de Tukey para múltiples comparaciones, se considera estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

Estos resultados sugieren la existencia de un proceso de envejecimiento de la línea celular HepG2, asociado al estrés mecánico. Esto se ve reforzado con los resultados de la medición del coeficiente de Poisson del núcleo (figura 5.6G), el cual presenta una dependencia lineal con el tiempo, fenómeno que se ha asociado con procesos de reorganización del citoesqueleto celular (231) y envejecimiento (202, 245). Además, al analizar la deformación longitudinal y transversal en la figura 5.6F, se observa un claro comportamiento augético del núcleo en el hidrogel de 1 kPa. Esta respuesta mecánica poco común ya se ha observado en células troncales no diferenciadas (246): en este estudio Pagliara y colaboradores asumieron que el comportamiento augético del núcleo es consecuencia de que las células experimentaban un estado metaestable de transición a través del cual adquieren un estado diferenciado de manera irreversible. Este estado metaestable puede estar relacionado con una cierta forma de envejecimiento mecánico, que se observa en el comportamiento de $k_i(t)$ presentado en la figura 5.2C y 5.6H para $x_{eff} < x_g$.

Finalmente, para probar nuestra hipótesis acerca de que el comportamiento de $k_i(t)$ se debe a la continua reorganización que del citoesqueleto que rodea al núcleo, se cuantificó la intensidad de fluorescencia (IF) de la CK-18 para ambos tipos celulares (ver las figuras A2.8 y A2.9 en el anexo 2). Los resultados de esta cuantificación se muestran en la figura 5.6H donde se observa que la intensidad de fluorescencia de los filamentos intermedios (citoqueratina 18) posee el mismo comportamiento de las ecuaciones con las ecuaciones 5.11 y 5.12 (las cuales modelan el comportamiento temporal de $k_i(t)$) para los hepatocitos y las células HepG2 respectivamente. Curiosamente, debido a que $k_i(t)$ fue ajustada con los datos experimentales presentó un comportamiento muy similar en ambas condiciones de rigidez, sin embargo, la línea HepG2 y los hepatocitos primarios se comportan de manera diferente. Los hepatocitos primarios muestran claramente una disminución en la intensidad de CK-18 a lo largo del tiempo, una tendencia que también estaba bien ajustada por una ley de potencia débil (ecuación 5.11), pero la tendencia de las células HepG2 resultó mejor descrita por la ecuación 5.12, lo que implica que puede recuperar hasta cierto punto su forma original. Además, se ha reportado que la vida media de tales citoqueratinas presentes en las células hepáticas es de entre 84 y 120 horas (247). Esto puede explicar entonces por qué la forma nuclear se modifica significativamente en este intervalo temporal cuando están en cultivo. Finalmente, la diferencia en la magnitud de la intensidad de fluorescencia

(CK-18) entre ambas condiciones de rigidez también sugieren que la CK-18 no es el único filamento intermedio involucrado en la deformación pasiva del núcleo y por lo tanto en el proceso de irreversibilidad.

Discusión del comportamiento mecánica del núcleo celular

Dinámica de las propiedades mecánicas del núcleo celular

Una de las principales funciones mecánicas del núcleo es mantener la organización espacial que controla la expresión de genes y preserva la integridad estructural del genoma. Su respuesta activa a estímulos mecánicos ha sido estudiada y modelada en varios trabajos de investigación, junto al comportamiento individual y colectivo de todos los componentes estructurales que rigen la forma del núcleo. Uno de los principales objetivos de estos estudios es comprender mejor los mecanismos subyacentes que modifican las propiedades mecánicas del núcleo, para garantizar una configuración estable y funcional durante la homeostasis o como respuesta a estímulos mecánicos intra- y exo-celulares. La relevancia del H-VM radica en el hecho de que no solo describe y emula la respuesta viscoelástica de la envoltura nuclear y la cromatina, sino que también integra su respuesta activa a las perturbaciones mecánicas, basándose en observaciones experimentales. En este contexto, se propone entonces que el comportamiento a largo plazo del núcleo celular (horas o días) está dictado no sólo por el comportamiento activo de la envoltura nuclear, sino también por la reorganización dinámica de la red de filamentos que lo rodea. Gracias a su calibración y validación con datos experimentales, demostramos que el modelo propuesto es adecuado para modelar el comportamiento mecánico del núcleo tanto en escalas de tiempo cortas como largas.

Es claro en los resultados del H-VM que al modelar únicamente el núcleo como un material viscoelástico lineal (figura 4.1B) e incorporar el comportamiento activo de su NE (Figura 4.22A), la respuesta mecánica del núcleo a tiempos cortos es descrita adecuadamente (ver figura 4.1). Sin embargo, la contribución más relevante del modelo propuesto es asumir una respuesta activa de la envoltura nuclear, así como asumir que el citoesqueleto que rodea al núcleo de manera pasiva se comporta como un material blando vítreo que es lo determina la dinámica a largo plazo del comportamiento mecánico nuclear. Adicionalmente, se demuestra que calibrando los parámetros del modelo con datos experimentales, parece posible determinar las características del último estado mecánico estable percibido por el núcleo, incluyendo los parámetros que gobiernan la dinámica nuclear a largo plazo (usando las ecuaciones 4.11 y 4.12). Finalmente, se puede inferir que este estado de referencia es específico para cada tipo de célula, probablemente dependiente de su origen y condiciones mecánicas previas como resultado de su organización espacial y las propiedades mecánicas de su propia red de filamentos.

La deformación del núcleo no es proporcional a la rigidez del sustrato

Al analizar la evolución temporal del área proyectada de los núcleos pertenecientes a los hepatocitos primarios y a la línea celular HepG2 a diferentes tiempos de cultivo, se encontró

que el valor promedio del área proyectada de los núcleos de las células primarias es menor que las de la línea celular HepG2 (ver figuras A2.1- A2.4 en el anexo 2). Esto es de alguna manera esperado, ya que ha sido reportado que los núcleos de las células cancerosas suelen ser más grandes que las células normales (248) (249). Principalmente, se observó que la deformación nuclear que sufren las células primarias es mayor que la que sufren los núcleos de la línea celular. Ya que por un lado, las células primarias aumentaron gradualmente el tamaño de su núcleo, al menos hasta las 120 h de cultivo, lo cual se vio intensificado por la rigidez del sustrato (figura 4.5F). Pero por otro lado, los núcleos de la línea celular HepG2 presentaron una deformación máxima a las 72 h y en este caso la deformación fue mayor en el sustrato más blando antes de las 72 h (figura 4.6E). Para explicar esto, el H-VM sugiere que el núcleo sufre una tensión mecánica diferente a la del estado de referencia de la célula: los niveles de expresión de lamin A y lamin B1 aumentan o disminuyen en función de la rigidez de la ECM. Este efecto conduce entonces a una deformabilidad respectivamente mayor o menor del núcleo en función de la rigidez del sustrato, en cooperación con la reorganización del citoesqueleto que rodea al núcleo y que también es afectado por la rigidez del sustrato. Por lo tanto, se puede suponer que esta diferencia en la deformación de los núcleos de las células primarias en los sustratos de hidrogeles, con respecto a la que sufren los núcleos de la línea celular, se debe a una mayor capacidad del núcleo de la línea celular para disipar la energía elástica. Esta mayor capacidad de disipación probablemente se origina en un entorno natural más rígido (estado de referencia) para la línea de células cancerosas, lo que provoca una menor deformación en los geles blandos. Estas observaciones confirman que a pesar de que el área proyectada depende de la rigidez del sustrato (figuras 4.5D y 4.6C), la deformación real depende más del tipo de célula y del estado mecánico de referencia de su núcleo (figuras 4.5F y 4.6E).

La forma del núcleo guarda información de estados mecánicos previos

En la teoría de la mecánica continua, la deformación mecánica se define como la transformación de un cuerpo desde una configuración de referencia previa (una preconfiguración referida a una organización espacial específica de todas las partículas que componen un cuerpo) hacia una configuración actual(250). Si la deformación (*deformation*) puede describirse mediante una transformación lineal que conserva las líneas y el paralelismo, se denomina deformación afín (251) y en este caso toda la información geométrica del cuerpo puede describirse mediante un parámetro adimensional llamado deformación mecánica (*strain*) que es consecuencia de las propiedades físicas del cuerpo y la suma de esfuerzos ejercidas sobre él. En este contexto se planteó que la forma actual del núcleo celular almacena cierta información de los estados mecánicos previos, a pesar de que la mayoría de los procesos de mecanotransducción ocurren en cortos períodos de tiempo(8). Dado que el núcleo no es un material elástico y presenta un comportamiento mecánico irreversible, su forma puede considerarse como el resultado de la historia de esfuerzos que lo deforman. Y este almacenamiento de la información mecánica puede entonces revelarse ajustando el H-VM a la deformación nuclear obtenida de forma experimental.

Con este enfoque, al calibrar el modelo con valores obtenidos de resultados experimentales con células hepáticas, el modelo fue capaz de revelar la magnitud de la deformación nuclear

correspondiente a estados anteriores que no se utilizaron para calibrar el modelo (figura 4.5F). De hecho, los valores de la magnitud de la deformación calculados para tiempos más cortos de 12 y 24 horas coinciden muy bien con los resultados experimentales de un conjunto diferente de experimentos independientes con hepatocitos primarios. De hecho, las predicciones cayeron dentro de un intervalo de confianza del 95% para los núcleos de células en la condición rígida y con el 90% en la condición suave (figura 4.5F).

En cuanto al estado mecánico de referencia, específico de cada tipo celular (referido a un estado estable previo antes de una perturbación mecánica), el modelo resultó muy útil para determinar las propiedades mecánicas de este estado. Para los hepatocitos primarios frescos, la rigidez basal original k_{s0} del tejido hepático, se encontró en 0,75 pN / nm con una rigidez a largo plazo k_{l0} de 4 pN / nm y un tiempo de relajación de la envoltura nuclear de τ_{NE} fue de 1 s. Es importante mencionar que estos valores son muy similares a los de un hígado sano (208). Por el contrario, para HepG2 (una línea celular cancerosa modificada y optimizada para cultivo *in vitro* en sustratos rígidos recubiertos con colágena tipo I), el estado estable de referencia indicó una rigidez basal mucho mayor k_{s0} de 8 pN / nm con una rigidez a largo plazo k_{l0} de 15 pN / nm y un tiempo de relajación nuclear τ_{NE} de 25.1 s, lo es congruente con el comportamiento de las células adaptadas a sustratos rígidos ya que al presentar mayor expresión de la Lámina A adquieren una mayor capacidad de disipación viscosa reflejándose en un tiempo de relajación mayor.. Notablemente, el valor de k_{s0} de 8 pN / nm corresponde aproximadamente a ~8 kPa que representa la rigidez anterior del sustrato en el que se encontraba la línea HepG2 (estado de referencia), lo cual es un valor de rigidez muy alto para un tejido hepático, pero es mucho más bajo que una placa de cultivo común donde se ha cultivado comúnmente esta línea celular. Esto puede sugerir que este valor de k_{s0} refleja más bien la rigidez externa percibida por el núcleo (y a la que responde), y probablemente esta es la razón por la que es diferente del rango de GPa que es la rigidez del plásticos o vidrio comúnmente utilizado para el cultivo. En el contexto de esta observación, también es importante notar que las células cancerosas pierden algo de capacidad para detectar y responder a la rigidez del sustrato (8, 252), lo que también puede explicar el valor encontrado revelado por el H-VM, Biológicamente, el cambio de $k_i(t)$ representa un reacomodo del citoesqueleto circundante al núcleo por lo que los resultados aquí presentados sugieren que la dinámica nuclear está dictada tanto por los componentes estructurales del núcleo y de la influencia pasiva del citoesqueleto (ver figura 5.1A).

Finalmente, otra contribución de este trabajo es sugerir que es necesario monitorear las proteínas subcelulares que constituyen la red que rodea al núcleo durante largos períodos de tiempo, al menos más que sus vidas medias características reportadas, con el fin de observar su potencial impacto eventual en la forma nuclear, o para monitorear sus modificaciones postraduccionales que afecten a sus funciones. De hecho, el H-VM indica que la dinámica responsable del proceso de sustitución de estas proteínas, así como su organización espacial de la red de filamentos que rodean al núcleo, juegan un papel importante en la dinámica nuclear. Ya que, han sido reportados tiempos característicos típicos de entre 70 horas a 120 horas para las histonas y los filamentos intermedios respectivamente y que corresponden a la aparición de cambios significativos del núcleo (226).

La dinámica nuclear en intervalos prolongados de tiempo revela un proceso de envejecimiento mecánico

Otra diferencia notable fue que los núcleos de los hepatocitos primarios y HepG2 exhibieron diferentes comportamientos temporales. Las células primarias muestran un comportamiento cuasilineal descrito por una ley de potencia débil (ecuación 4.11). Usando la teoría de la materia de vidrio blando, esto implica que la fuerza percibida por el núcleo es proporcional al cambio temporal en su deformación, más que a la deformación en sí. Biológicamente, esto se puede interpretar por una tendencia de la fuerza percibida por el núcleo a alcanzar un estado estacionario más rápidamente que la deformación, es decir, los fenómenos disipativos y la viscosidad dominan fuertemente la forma nuclear. Para los hepatocitos primarios en cultivo, esta resistencia parece perderse cuando las células comienzan a expresar vimentina (o pierden CK-18); y eso coincide precisamente con una deformación del núcleo (253, 254). Por el contrario, los núcleos de HepG2 siguieron un comportamiento no lineal (ecuación 14.12) originado por la reducción de los estados energéticos a los que pueden acceder a los componentes nucleares; es decir, las modificaciones de las propiedades mecánicas del núcleo tienen un alto coste energético relacionado con los procesos de envejecimiento (202). Esto se manifiesta explícitamente mediante el cálculo del coeficiente de Poisson: los núcleos de las células primarias muestran una proporción de Poisson que oscilaba entre 0,1 y 0,4, mientras que los núcleos de HepG2 demuestran un comportamiento augético en los sustratos blandos (esta tendencia no pudo ser observada claramente en la relación de aspecto (figura A2.5 en el anexo 2, lo que sugiere que es el comportamiento dinámico el que puede revelar la naturaleza del comportamiento dinámico del núcleo celular). Esto sugiere que la condición de 1 kPa relajó la tensión en el núcleo celular de las células cancerosas, siendo responsable de tal cambio en la relación entre las deformaciones transversales y longitudinales. Esto es de importancia particular en la biología celular y necesitará más estudio, ya que se ha observado que los comportamientos augéticos están relacionados con una determinada forma de envejecimiento por estrés mecánico (245). En esta dirección, también es relevante señalar que a pesar de que ambos tipos celulares tienen un origen epitelial, las células aquí utilizadas provienen de diferentes microambientes “naturales”; Los hepatocitos primarios se aislaron de un estado de homeostasis mecánica, mientras que la HepG2 se originó a partir de un estado alterado de un hepatocarcinoma humano y se mantuvo en placas de Petri de poliestireno rígido. Además, estos resultados muestran que la hipótesis de incompresibilidad común utilizada en los modelos mecánicos del núcleo (donde $\nu = 0.5$) en realidad está lejos de cumplirse. Además, el comportamiento temporal de las deformaciones nucleares sugiere que está gobernado por la reorganización del citoesqueleto en escalas de tiempo del orden de horas a días.

Entonces, a pesar de ser un modelo sumamente complejo que incorpora todas las características reportadas sobre los componentes que son responsables del comportamiento mecánico del núcleo, sigue siendo necesario el uso de datos experimentales para ajustar los parámetros del modelo, lo cual dificulta su aplicación en diferentes experimentos en los cuales el acceso a datos experimentales sea limitado.

Además, el gran número de parámetros son fijos lo que reduce un posible sobre ajuste, sin embargo, es necesario el desarrollo de modelos más sencillos que puedan capturar la complejidad del comportamiento mecánico del núcleo, tomen en cuenta la variabilidad del comportamiento de los diversos tipos celulares y sean capaces de describir fenómenos de envejecimiento por estrés mecánico.

Capítulo 6. Conclusiones generales

A lo largo de este trabajo se estudió la relevancia que tiene el microambiente sobre el comportamiento, destino y función celular. Por ello, se desarrolló un protocolo de fabricación de hidrogeles de poliacrilamida con el cual se busca aproximar de una manera más adecuada las características mecánicas y geométricas del microambiente nativo, ya que, las técnicas tradicionales de cultivo no reproducen las condiciones naturales del microambiente celular.

El protocolo desarrollado permite el control de la rigidez de los hidrogeles en un rango de 0.2 a 40 kPa, también hace posible su estructuración geométrica utilizando la técnica molde réplica y permite elegir el tipo de proteína de la ECM a conjugar superficialmente, lo cual resulta de suma relevancia, ya que, la proteína utilizada para promover la adhesión celular representa una señal que puede promover la activación de ciertas vías de señalización. En adición a esto, se desarrolló un método de caracterización mecánica por medio de un ensayo de relajación. El cual, permite conocer no sólo las propiedades elásticas de la muestra caracterizada, sino también su comportamiento temporal, que de igual manera juega un papel importante en el comportamiento celular. Mediante este método de caracterización fue posible distinguir las características mecánicas de dos hidrogeles cuyo módulo elástico, medido por medio de microindentación era indistinguible cuando se tomaba en cuenta la desviación estándar.

La utilidad de los hidrogeles fabricados se comprobó con el estudio de la influencia conjunta de la curvatura y el confinamiento de las células AD-293, donde se observó que al adherirse a una superficie convexa, estas adquieren una forma alargada mientras que en una superficie cóncava adquieren una morfología redondeada. Lo anterior, implica que existe una reorganización del citoesqueleto que depende de la geometría del sustrato donde se encuentra la célula. También, utilizando los hidrogeles de poliacrilamida fue posible explorar la influencia conjunta de la rigidez del sustrato y el TGF β sobre la dinámica colectiva de las células A549 y NHLF. En este caso se comprobó que las monocapas celulares pueden describirse como un cristal líquido nemático.

En particular, para el estudio de la respuesta mecánica del núcleo celular a diferentes escalas de tiempo, se desarrolló un modelo viscoelástico híbrido que integra tanto la mecánica de medios continuos como la teoría de la materia de vidrio blando, con el fin de integrar la respuesta viscoelástica instantánea de los componentes estructurales del núcleo así como la respuesta activa de la envoltura nuclear y la reorganización dinámica del citoesqueleto en diferentes escalas de tiempo. Dado que el H-VM se basa en un modelo viscoelástico con 5 elementos en la representación del modelo generalizado de Maxwell, la calibración con datos experimentales es absolutamente necesaria. Sin embargo, aunque el modelo depende de múltiples parámetros, los únicos parámetros libres son con los que se ajusta el modelo. A su vez, estos definen los parámetros restantes que no están fijados por las condiciones experimentales, evitando así un sobreajuste del sistema. Además, se demuestra que a pesar la formulación del H-VM es 1D, este es capaz de modelar la deformación nuclear a largo plazo. Estos resultados sugieren que la respuesta mecánica del núcleo de las células hepáticas es consistente con la hipótesis de que los elementos

responsables del comportamiento mecánico a largo plazo del núcleo son tanto la respuesta activa de la envoltura nuclear como la continua reorganización espacial de la red de filamentos que rodean el núcleo. Y según la evidencia experimental, el H-VM puede usarse para revelar que el aumento de la deformación nuclear en escalas de tiempo largas implica un decaimiento de la rigidez nuclear, un fenómeno que se acelera si la rigidez del sustrato celular es mayor. Sin embargo, esta respuesta va acompañada de un aumento de las propiedades disipativas del núcleo, otorgándole cierta estabilidad estructural. Además, se observa que los tipos celulares adaptados a sustratos rígidos y originados a partir de un estado mecánico alterado, como las células del carcinoma hepatocelular HepG2, manifiestan un comportamiento temporal más complejo y que incluso se agrava en sustratos suaves y escalas de tiempo más largas. En este contexto, el H-VM fue capaz de revelar procesos de envejecimiento y memoria mecánica, que son consistentes con el comportamiento dinámico del coeficiente de Poisson de los núcleos. Finalmente, este trabajo demuestra la necesidad de utilizar tanto la mecánica continua así como los modelos mesoscópicos para describir los fenómenos disipativos del núcleo.

Se cree que este trabajo será útil para los biólogos celulares y biofísicos que necesitan herramientas para estudiar y modelar el comportamiento de diferentes tipos celulares a corto y largo plazo. Ya que, los resultados de este trabajo, ofrecen un método simple de fabricación de microambientes celulares biomiméticos para el estudio de mecanotransducción.

Referencias

1. M. E. Gurtin, *An Introduction to Continuum Mechanics* (Academic Press, 1982).
2. E. Hecht, *Optics* (Addison-Wesley, 2015).
3. E. K. Paluch, *et al.*, Mechanotransduction: use the force(s). *BMC Biol.* **13**, 47 (2015).
4. His, W. His, *Unsere Koerperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung: Briefe an einen befreundeten Naturforscher* (1874).
5. J. D. Watson, F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
6. D. E. Ingber, N. Wang, D. Stamenovic, Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Rep. Prog. Phys.* **77**, 046603 (2014).
7. T. Iskratsch, H. Wolfenson, M. P. Sheetz, Appreciating force and shape — the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 825–833 (2014).
8. C. C. DuFort, M. J. Paszek, V. M. Weaver, Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 308–319 (2011).
9. U. S. Schwarz, Mechanobiology by the numbers: a close relationship between biology and physics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 711–712 (2017).
10. A. Bershadsky, M. Kozlov, B. Geiger, Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 472–481 (2006).
11. B. Ladoux, R.-M. Mège, Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 743–757 (2017).
12. B. Martinac, Y. Saimi, C. Kung, Ion channels in microbes. *Physiol. Rev.* **88**, 1449–1490 (2008).
13. A. Kloda, B. Martinac, Common evolutionary origins of mechanosensitive ion channels in Archaea, Bacteria and cell-walled Eukarya. *Archaea* **1**, 35–44 (2002).
14. D. E. Discher, P. Janmey, Y.-L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–1143 (2005).
15. J. G. Goetz, *et al.*, Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148–163 (2011).
16. A. J. Engler, P. O. Humbert, B. Wehrle-Haller, V. M. Weaver, Multiscale Modeling of Form and Function. *Science* **324**, 208–212 (2009).
17. S. P. Carey, J. M. Charest, C. A. Reinhart-King, Forces During Cell Adhesion and Spreading: Implications for Cellular Homeostasis. *Cellular and Biomolecular Mechanics and Mechanobiology*, 29–69 (2010).
18. R. G. Wells, The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* **47**, 1394–1400 (2008).
19. R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen, Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).
20. I. Levental, P. C. Georges, P. A. Janmey, Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **3**, 299–306 (2007).
21. J. Fu, *et al.*, Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat. Methods* **7**, 733–736 (2010).
22. C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
23. A. S. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, F. Lawrie, Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J. Cell Biol.* **97**, 1500–1506 (1983).
24. I. Ahmed, *et al.*, Three-dimensional nanofibrillar surfaces covalently modified with tenascin-C-derived peptides enhance neuronal growth in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* **76**, 851–860 (2006).
25. T. Lecuit, P.-F. Lenne, Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 633–644 (2007).
26. , Active biomaterials for mechanobiology. *Biomaterials* **267**, 120497 (2021).
27. L. Li, J. Eyckmans, C. S. Chen, Designer biomaterials for mechanobiology. *Nat. Mater.* **16**, 1164–1168 (2017).
28. S. R. Caliarì, J. A. Burdick, A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods* **13**, 405–414 (2016).
29. H. Xu, J. Wu, C.-C. Chu, M. L. Shuler, Development of disposable PDMS micro cell culture analog

- devices with photopolymerizable hydrogel encapsulating living cells. *Biomed. Microdevices* **14**, 409–418 (2012).
30. Y. Xia, G. M. Whitesides, Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 153–184 (1998).
 31. S. Franssila, *Introduction to Microfabrication* (John Wiley & Sons, 2010).
 32. M. Röhrig, M. Thiel, M. Worgull, H. Hölscher, 3D direct laser writing of nano- and microstructured hierarchical gecko-mimicking surfaces. *Small* **8**, 3009–3015 (2012).
 33. T. Billiet, M. Vandenhoute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 6020–6041 (2012).
 34. R. Gauvin, R. Parenteau-Bareil, M. R. Dokmeci, W. D. Merryman, A. Khademhosseini, Hydrogels and microtechnologies for engineering the cellular microenvironment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 235–246 (2012).
 35. D. E. Ingber, *et al.*, Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng.* **12**, 3265–3283 (2006).
 36. J. Barthes, *et al.*, Cell Microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: The Recent Advances. *Biomed Res. Int.* **2014** (2014).
 37. D. E. Ingber, Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* **20**, 811–827 (2006).
 38. A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
 39. K. H. Vining, D. J. Mooney, Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 728–742 (2017).
 40. G. S. Hussey, J. L. Dziki, S. F. Badylak, Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nature Reviews Materials* **3**, 159–173 (2018).
 41. R. P. Mecham, Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 10**, Unit 10.1 (2012).
 42. M. J. Bissell, H. Glenn Hall, G. Parry, How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* **99**, 31–68 (1982).
 43. G. S. Schultz, J. M. Davidson, R. S. Kirsner, P. Bornstein, I. M. Herman, Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen.* **19**, 134–148 (2011).
 44. B. Yue, Biology of the Extracellular Matrix. *Journal of Glaucoma* **23**, S20–S23 (2014).
 45. O. du Roure, *et al.*, Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2390–2395 (2005).
 46. T. D. Pollard, G. G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
 47. F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, J. Howard, Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120**, 923–934 (1993).
 48. D. S. Fudge, K. H. Gardner, V. T. Forsyth, C. Riekel, J. M. Gosline, The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads. *Biophys. J.* **85**, 2015–2027 (2003).
 49. H. Herrmann, H. Bär, L. Kreplak, S. V. Strelkov, U. Aebi, Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 562–573 (2007).
 50. G. I. Bell, Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**, 618–627 (1978).
 51. G. I. Bell, M. Dembo, P. Bongrand, Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* **45**, 1051–1064 (1984).
 52. M. J. Paszek, D. Boettiger, V. M. Weaver, D. A. Hammer, Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000604 (2009).
 53. S. M. Frisch, R. A. Srean, Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 555–562 (2001).
 54. M. Burute, M. Thery, Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 628–636 (2012).
 55. A. Al-Kilani, O. de Freitas, S. Dufour, F. Gallet, Negative feedback from integrins to cadherins: a micromechanical study. *Biophys. J.* **101**, 336–344 (2011).
 56. N. Wang, Instant integrin mechanosensing. *Nat. Mater.* **16**, 1173–1174 (2017).
 57. A. R. Bausch, W. Möller, E. Sackmann, Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys. J.* **76**, 573–579 (1999).
 58. P. Sollich, Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Phys. Rev. E* **58**, 738 (1998).

59. E. Moeendarbary, *et al.*, The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat. Mater.* **12**, 253–261 (2013).
60. T. E. Angelini, *et al.*, Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4714–4719 (2011).
61. M. Balland, *et al.*, Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **74**, 021911 (2006).
62. E. Moeendarbary, A. R. Harris, Cell mechanics: principles, practices, and prospects. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **6**, 371–388 (2014).
63. Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, Advances in engineering hydrogels. *Science* **356** (2017).
64. B. T. Kurien, R. H. Scofield, Western blotting: an introduction. *Methods Mol. Biol.* **1312**, 17–30 (2015).
65. D. L. Holmes, N. C. Stellwagen, Estimation of polyacrylamide gel pore size from Ferguson plots of normal and anomalously migrating DNA fragments. I. Gels containing 3% N,N'-methylenebisacrylamide. *Electrophoresis* **12**, 253–263 (1991).
66. , Tailoring the mechanical properties of polyacrylamide-based hydrogels. *Polymer* **51**, 2207–2214 (2010).
67. , Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* **6**, 105–121 (2015).
68. C. E. Kadow, P. C. Georges, P. A. Janmey, K. A. Beningo, Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses. *Methods Cell Biol.* **83**, 29–46 (2007).
69. J. R. Tse, A. J. Engler, Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 10**, Unit 10.16 (2010).
70. A. Cretu, P. Castagnino, R. Assoian, Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *J. Vis. Exp.* (2010) <https://doi.org/10.3791/2089>.
71. M. Hautefeuille, *et al.*, New perspectives for direct PDMS microfabrication using a CD-DVD laser. *Lab Chip* **13**, 4848–4854 (2013).
72. D. J. Guckenberger, T. E. de Groot, A. M. D. Wan, D. J. Beebe, E. W. K. Young, Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab Chip* **15**, 2364–2378 (2015).
73. M. J. E. Fischer, Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Methods Mol. Biol.* **627**, 55–73 (2010).
74. E. Y. Liu, S. Jung, H. Yi, Improved Protein Conjugation with Uniform, Macroporous Poly(acrylamide-co-acrylic acid) Hydrogel Microspheres via EDC/NHS Chemistry. *Langmuir* **32**, 11043–11054 (2016).
75. E. E. Charrier, K. Pogoda, R. G. Wells, P. A. Janmey, Control of cell morphology and differentiation by substrates with independently tunable elasticity and viscous dissipation. *Nature Communications* **9** (2018).
76. M. Griffin, Y. Premakumar, A. Seifalian, P. E. Butler, M. Szarko, Biomechanical Characterization of Human Soft Tissues Using Indentation and Tensile Testing. *J. Vis. Exp.* (2016) <https://doi.org/10.3791/54872>.
77. M. Griffin, Y. Premakumar, A. Seifalian, P. E. Butler, M. Szarko, Biomechanical Characterization of Human Soft Tissues Using Indentation and Tensile Testing. *J. Vis. Exp.* (2016) <https://doi.org/10.3791/54872>.
78. D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials. *Journal of Biomechanical Engineering* **129**, 904–912 (2007).
79. Y.-R. Chang, *et al.*, Automated AFM force curve analysis for determining elastic modulus of biomaterials and biological samples. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **37**, 209–218 (2014).
80. K. C. Neuman, A. Nagy, Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods* **5**, 491–505 (2008).
81. K. C. Neuman, A. Nagy, Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods* **5**, 491–505 (2008).
82. L. A. Mihai, A. Goriely, How to characterize a nonlinear elastic material? A review on nonlinear constitutive parameters in isotropic finite elasticity. *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* **473**, 20170607 (2017).
83. L. A. Mihai, A. Goriely, How to characterize a nonlinear elastic material? A review on nonlinear constitutive parameters in isotropic finite elasticity. *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* **473**, 20170607 (2017).

84. P. Roca-Cusachs, V. Conte, X. Trepas, Quantifying forces in cell biology. *Nat. Cell Biol.* **19**, 742–751 (2017).
85. K.-Y. Lee, E. D. Case, Effects of adhesion on the effective Young's modulus in glass slide/glue laminates. *Journal of Materials Science* **31**, 2253–2264 (1996).
86. E. K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, R. S. Chadwick, Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* **82**, 2798–2810 (2002).
87. D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials. *Journal of Biomechanical Engineering* **129**, 904–912 (2007).
88. F. Rico, *et al.*, Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **72**, 021914 (2005).
89. Y. Ding, J. Wang, G.-K. Xu, G.-F. Wang, Are elastic moduli of biological cells depth dependent or not? Another explanation using a contact mechanics model with surface tension. *Soft Matter* **14**, 7534–7541 (2018).
90. , On the DMT adhesion theory: from the first studies to the modern applications in rough contacts. *Procedia Structural Integrity* **12**, 58–70 (2018).
91. D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials. *Journal of Biomechanical Engineering* **129**, 904–912 (2007).
92. , Application of the Johnson–Kendall–Roberts model in AFM-based mechanical measurements on cells and gel. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **134**, 131–139 (2015).
93. , The generalized Tabor parameter for adhesive rough contacts near complete contact. *J. Mech. Phys. Solids* **122**, 126–140 (2019).
94. D. M. Ebenstein, K. J. Wahl, A comparison of JKR-based methods to analyze quasi-static and dynamic indentation force curves. *J. Colloid Interface Sci.* **298**, 652–662 (2006).
95. J. C. Kohn, D. M. Ebenstein, Eliminating adhesion errors in nanoindentation of compliant polymers and hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **20**, 316–326 (2013).
96. D. M. Ebenstein, Nano-JKR force curve method overcomes challenges of surface detection and adhesion for nanoindentation of a compliant polymer in air and water. *Journal of Materials Research* **26**, 1026–1035 (2011).
97. T. Takigawa, Y. Morino, K. Urayama, T. Masuda, Poisson's ratio of polyacrylamide (PAAm) gels. *Polymer Gels and Networks* **4**, 1–5 (1996).
98. M. H. Esteki, *et al.*, A new framework for characterization of poroelastic materials using indentation. *Acta Biomater.* **102**, 138–148 (2020).
99. O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, V. B. Shenoy, Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* **584**, 535–546 (2020).
100. M. V. Flores-Merino, *et al.*, Nanoscopic mechanical anisotropy in hydrogel surfaces. *Soft Matter* **6**, 4466–4470 (2010).
101. T. Takigawa, Y. Morino, K. Urayama, T. Masuda, Poisson's ratio of polyacrylamide (PAAm) gels. *Polymer Gels and Networks* **4**, 1–5 (1996).
102. J. H. Wen, *et al.*, Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat. Mater.* **13**, 979–987 (2014).
103. Michael A. Kraus, Miriam Schuster, Johannes Kuntsche, Geralt Siebert and Jens Schneider, Parameter identification methods for visco- and hyperelastic material models. *Glass Structures & Engineering* **2**, 147–167 (2017).
104. S. Walcott, S. X. Sun, A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7757–7762 (2010).
105. , Unifying the derivations for the Akaike and corrected Akaike information criteria. *Stat. Probab. Lett.* **33**, 201–208 (1997).
106. Michael A. Kraus, Miriam Schuster, Johannes Kuntsche, Geralt Siebert and Jens Schneider, Parameter identification methods for visco- and hyperelastic material models. *Glass Structures & Engineering* **2**, 147–167 (2017).
107. J. H. Wen, *et al.*, Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat. Mater.* **13**, 979–987 (2014).
108. Z. Ilke Kalcioğlu, R. Mahmoodian, Y. Hu, Z. Suo, K. J. Van Vliet, From macro- to microscale poroelastic characterization of polymeric hydrogels via indentation. *Soft Matter* **8**, 3393–3398 (2012).

109. M. H. Esteki, *et al.*, A new framework for characterization of poroelastic materials using indentation. *Acta Biomater.* **102**, 138–148 (2020).
110. Qi-Ming Wang, Anirudh C. Mohan, Michelle L. Oyen, Xuan-He Zhao, Separating viscoelasticity and poroelasticity of gels with different length and time scales. *Acta Mech. Sin.* **30**, 20–27 (2013).
111. M. H. Esteki, *et al.*, A new framework for characterization of poroelastic materials using indentation. *Acta Biomater.* **102**, 138–148 (2020).
112. Chung-Yuen Hui, Yu Yun Lin, Fu-Chin Chuang, Kenneth R. Shull, Wei-Chun Lin, A contact mechanics method for characterizing the elastic properties and permeability of gels. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **44**, 359–370 (2006).
113. , Engineering hydrogel viscoelasticity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **89**, 162–167 (2019).
114. M. H. Esteki, *et al.*, A new framework for characterization of poroelastic materials using indentation. *Acta Biomater.* **102**, 138–148 (2020).
115. B. Piersma, M. K. Hayward, V. M. Weaver, Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1873**, 188356 (2020).
116. , Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer. *Extreme Mechanics Letters* **21**, 25–34 (2018).
117. J. Herrera, C. A. Henke, P. B. Bitterman, Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 45–53 (2018).
118. J. R. Tse, A. J. Engler, Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols in Cell Biology* **47** (2010).
119. E. E. Charrier, *et al.*, A novel method to make viscoelastic polyacrylamide gels for cell culture and traction force microscopy. *APL Bioeng* **4**, 036104 (2020).
120. M. Kim, B.-U. Moon, C. H. Hidrovo, Enhancement of the thermo-mechanical properties of PDMS molds for the hot embossing of PMMA microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **23**, 095024 (2013).
121. Chengyu Jin, Cui Ma, Zhile Yang, Hui Lin, A Force Measurement Method Based on Flexible PDMS Grating. *Appl. Sci.* **10**, 2296 (2020).
122. S. Dupont, *et al.*, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183 (2011).
123. , Role of Actin Filaments in Correlating Nuclear Shape and Cell Spreading. *PLoS One* **9**, e107895 (2014).
124. H. Liu, *et al.*, Control of fibroblast shape in sequentially formed 3D hybrid hydrogels regulates cellular responses to microenvironmental cues. *NPG Asia Materials* **12** (2020).
125. L. Pieuchot, *et al.*, Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
126. , 3D surface topology guides stem cell adhesion and differentiation. *Biomaterials* **52**, 140–147 (2015).
127. B. M. Denker, E. Sabath, The Biology of Epithelial Cell Tight Junctions in the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 622–625 (2011).
128. , Substrate curvature affects the shape, orientation, and polarization of renal epithelial cells. *Acta Biomater.* **77**, 311–321 (2018).
129. , “Kidney Epithelial Cells” in *Methods in Enzymology*, (Academic Press, 2006), pp. 194–207.
130. T. B. Saw, *et al.*, Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion. *Nature* **544**, 212–216 (2017).
131. Y. Aschner, G. P. Downey, Transforming Growth Factor- β : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **54**, 647–655 (2016).
132. A. Saito, M. Horie, T. Nagase, TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2460 (2018).
133. R. J. Akhurst, TGF β signaling in health and disease. *Nat. Genet.* **36**, 790–792 (2004).
134. E. D. Hay, An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* **154**, 8–20 (1995).
135. , “Epithelial–Mesenchymal Transitions: From Cell Plasticity to Concept Elasticity” in *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press, 2015), pp. 273–300.
136. J. Yang, *et al.*, Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 341–352 (2020).
137. S. Boland, *et al.*, TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 9), 2207–2219 (1996).
138. J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang, M. A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions in

- development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
139. A. Sturm, A. U. Dignass, Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 348–353 (2008).
 140. P. Friedl, D. Gilmour, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 445–457 (2009).
 141. K. Campbell, J. Casanova, A common framework for EMT and collective cell migration. *Development* **143**, 4291–4300 (2016).
 142. J. A. Mitchel, *et al.*, In primary airway epithelial cells, the unjamming transition is distinct from the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Commun.* **11**, 1–14 (2020).
 143. J. L. Leight, M. A. Wozniak, S. Chen, M. L. Lynch, C. S. Chen, Matrix rigidity regulates a switch between TGF- β 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* **23**, 781–791 (2012).
 144. J.-P. Ng-Blichfeldt, K. Röper, Mesenchymal-to-Epithelial Transitions in Development and Cancer. *Methods Mol. Biol.* **2179**, 43–62 (2021).
 145. B. Hinz, Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **9**, 137–147 (2012).
 146. N. Q. Balaban, *et al.*, Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–472 (2001).
 147. S. Nehls, H. Nöding, S. Karsch, F. Ries, A. Janshoff, Stiffness of MDCK II Cells Depends on Confluency and Cell Size. *Biophys. J.* **116**, 2204–2211 (2019).
 148. G. Duclos, C. Erlenkämper, J.-F. Joanny, P. Silberzan, Topological defects in confined populations of spindle-shaped cells. *Nat. Phys.* **13**, 58–62 (2016).
 149. X. Li, *et al.*, On the mechanism of long-range orientational order of fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 8974–8979 (2017).
 150. K. Kawaguchi, R. Kageyama, M. Sano, Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures. *Nature* **545**, 327–331 (2017).
 151. A. Doostmohammadi, J. Ignés-Mullol, J. M. Yeomans, F. Sagués, Active nematics. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
 152. C. Bechinger, *et al.*, Active particles in complex and crowded environments. *Rev. Mod. Phys.* **88** (2016).
 153. S. Ramaswamy, The mechanics and statistics of active matter. *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.* **1**, 323–345 (2010).
 154. D. Needleman, Z. Dogic, Active matter at the interface between materials science and cell biology. *Nature Reviews Materials* **2**, 1–14 (2017).
 155. R. Zhang, N. Kumar, J. L. Ross, M. L. Gardel, J. J. de Pablo, Interplay of structure, elasticity, and dynamics in actin-based nematic materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E124–E133 (2018).
 156. L. Giomi, M. J. Bowick, X. Ma, M. C. Marchetti, Defect annihilation and proliferation in active nematics. *Phys. Rev. Lett.* **110**, 228101 (2013).
 157. P. G. de Gennes, J. Prost, *The Physics of Liquid Crystals* (Oxford University Press, 1993).
 158. V. Tomar, S. I. Hernández, N. L. Abbott, J. P. Hernández-Ortiz, J. J. de Pablo, Morphological transitions in liquid crystal nanodroplets. *Soft Matter* **8**, 8679 (2012).
 159. D. S. Miller, N. L. Abbott, Influence of droplet size, pH and ionic strength on endotoxin-triggered ordering transitions in liquid crystalline droplets. *Soft Matter* **9**, 374–382 (2013).
 160. M. Kleman, O. D. Lavrentovich, *Soft Matter Physics: An Introduction*, M. Kleman, O. D. Lavrentovich, Eds., 2003rd Ed. (Springer, 2002) <https://doi.org/10.1007/b97416>.
 161. F. C. Frank, I. Liquid crystals. On the theory of liquid crystals. *Discuss. Faraday Soc.* **25**, 19 (1958).
 162. D. W. Zhou, T. T. Lee, S. Weng, J. Fu, A. J. García, Effects of substrate stiffness and actomyosin contractility on coupling between force transmission and vinculin-paxillin recruitment at single focal adhesions. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1901–1911 (2017).
 163. E. D. Tabdanov, V. Puram, A. Zhovmer, P. P. Provenzano, Microtubule-Actomyosin Mechanical Cooperation during Contact Guidance Sensing. *Cell Rep.* **25**, 328–338.e5 (2018).
 164. J. D. Humphrey, E. R. Dufresne, M. A. Schwartz, Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 802–812 (2014).
 165. M. Murrell, P. W. Oakes, M. Lenz, M. L. Gardel, Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 486–498 (2015).

166. C. T. Mierke, *Cellular Mechanics and Biophysics: Structure and Function of Basic Cellular Components Regulating Cell Mechanics* (Springer Nature).
167. C. Guilluy, *et al.*, Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* **16**, 376–381 (2014).
168. A. J. Maniotis, C. S. Chen, D. E. Ingber, Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 849–854 (1997).
169. N. Wang, J. D. Tytell, D. E. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 75–82 (2009).
170. C. Uhler, G. V. Shivashankar, Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 717–727 (2017).
171. K. N. Dahl, A. J. S. Ribeiro, J. Lammerding, Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ. Res.* **102**, 1307–1318 (2008).
172. B. Burke, C. L. Stewart, Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 575–585 (2002).
173. S. Cho, *et al.*, Mechanosensing by the Lamina Protects against Nuclear Rupture, DNA Damage, and Cell-Cycle Arrest. *Dev. Cell* **49**, 920–935.e5 (2019).
174. S. He, *et al.*, Chromatin organization and nuclear microenvironments in cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **104**, 2004–2015 (2008).
175. M. J. Bissell, *et al.*, Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res.* **59**, 1757–1763s; discussion 1763s–1764s (1999).
176. K.-H. Chow, R. E. Factor, K. S. Ullman, The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 196–209 (2012).
177. G. Captur, *et al.*, Lamin and the heart. *Heart* **104**, 468–479 (2018).
178. I. Xanthis, T. Iskratsch, Lamin-A Mechano-Protects the Heart. *Dev. Cell* **49**, 821–822 (2019).
179. A. D. Stephens, E. J. Banigan, S. A. Adam, R. D. Goldman, J. F. Marko, Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1984–1996 (2017).
180. A. Tajik, *et al.*, Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat. Mater.* **15**, 1287–1296 (2016).
181. A. Buxboim, *et al.*, Coordinated increase of nuclear tension and lamin-A with matrix stiffness outcompetes lamin-B receptor that favors soft tissue phenotypes. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3333–3348 (2017).
182. Y. Gruenbaum, A. Margalit, R. D. Goldman, D. K. Shumaker, K. L. Wilson, The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 21–31 (2005).
183. Y. Y. Shevelyov, S. V. Ulianov, Role of Nuclear Lamina in Gene Repression and Maintenance of Chromosome Architecture in the Nucleus. *Biochemistry* **83**, 359–369 (2018).
184. B. Burke, C. L. Stewart, The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 13–24 (2013).
185. X. Zheng, *et al.*, Lamins Organize the Global Three-Dimensional Genome from the Nuclear Periphery. *Mol. Cell* **71**, 802–815.e7 (2018).
186. , Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **58**, 76–84 (2019).
187. A. D. Stephens, *et al.*, Physicochemical mechanotransduction alters nuclear shape and mechanics via heterochromatin formation. *Mol. Biol. Cell* **30**, 2320–2330 (2019).
188. A. D. Stephens, *et al.*, Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol. Biol. Cell* **29**, 220–233 (2018).
189. P.-H. Wu, *et al.*, A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat. Methods* **15**, 491–498 (2018).
190. J. Rheinlaender, *et al.*, Cortical cell stiffness is independent of substrate mechanics. *Nat. Mater.* **19**, 1019–1025 (2020).
191. H. Liu, *et al.*, In situ mechanical characterization of the cell nucleus by atomic force microscopy. *ACS Nano* **8**, 3821–3828 (2014).
192. R. Prevedel, A. Diz-Muñoz, G. Ruocco, G. Antonacci, Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology. *Nat. Methods* **16**, 969–977 (2019).
193. S. K. Venkatesh, *et al.*, Magnetic resonance elastography: beyond liver fibrosis—a case-based pictorial review. *Abdom Radiol (NY)* **43**, 1590–1611 (2018).
194. C. S. Chen, C. Brangwynne, D. E. Ingber, Pictures in cell biology: squaring up to the

- cell-shape debate. *Trends Cell Biol.* **9**, 283 (1999).
195. S. Neelam, *et al.*, Direct force probe reveals the mechanics of nuclear homeostasis in the mammalian cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5720–5725 (2015).
 196. J. Swift, *et al.*, Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).
 197. T. Baumann, *Viscoelastic Properties of the Type I Mechanoreceptor in Hairy Skin of the Cat* (1978).
 198. J. Swift, D. E. Discher, The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *J. Cell Sci.* **127**, 3005–3015 (2014).
 199. G. V. Shivashankar, Mechanical regulation of genome architecture and cell-fate decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **56**, 115–121 (2019).
 200. P. C. D. P. Dingal, D. E. Discher, Systems mechanobiology: tension-inhibited protein turnover is sufficient to physically control gene circuits. *Biophys. J.* **107**, 2734–2743 (2014).
 201. F. Alisafaei, D. S. Jokhun, G. V. Shivashankar, V. B. Shenoy, Regulation of nuclear architecture, mechanics, and nucleocytoplasmic shuttling of epigenetic factors by cell geometric constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 13200–13209 (2019).
 202. P. Sollich, F. Lequeux, P. Hébraud, M. E. Cates, Rheology of Soft Glassy Materials. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2020 (1997).
 203. B. Fabry, *et al.*, Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148102 (2001).
 204. K. Damodaran, *et al.*, Compressive force induces reversible chromatin condensation and cell geometry-dependent transcriptional response. *Mol. Biol. Cell* **29**, 3039–3051 (2018).
 205. J. Schäpe, S. Prausse, M. Radmacher, R. Stick, Influence of lamin A on the mechanical properties of amphibian oocyte nuclei measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **96**, 4319–4325 (2009).
 206. P. C. Georges, *et al.*, Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G1147–54 (2007).
 207. S. S. Desai, *et al.*, Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology* **64**, 261–275 (2016).
 208. S. Sun, Z. Song, S. J. Cotler, M. Cho, Biomechanics and functionality of hepatocytes in liver cirrhosis. *J. Biomech.* **47**, 2205–2210 (2014).
 209. P. E. Chang, *et al.*, Optimal liver stiffness measurement values for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis in chronic liver disease in Singapore. *Singapore Medical Journal* **60**, 532–537 (2019).
 210. W. Ling, *et al.*, Effects of vascularity and differentiation of hepatocellular carcinoma on tumor and liver stiffness: in vivo and in vitro studies. *Ultrasound Med. Biol.* **40**, 739–746 (2014).
 211. S. J. Lai-Fook, R. E. Hyatt, Effects of age on elastic moduli of human lungs. *J. Appl. Physiol.* **89**, 163–168 (2000).
 212. F. Guilak, J. R. Tedrow, R. Burgkart, Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 781–786 (2000).
 213. J. Swift, *et al.*, Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).
 214. X. Cao, *et al.*, A Chemomechanical Model for Nuclear Morphology and Stresses during Cell Transendothelial Migration. *Biophys. J.* **111**, 1541–1552 (2016).
 215. V. J. Tocco, *et al.*, The nucleus is irreversibly shaped by motion of cell boundaries in cancer and non-cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **233**, 1446–1454 (2018).
 216. N. Bonakdar, *et al.*, Mechanical plasticity of cells. *Nat. Mater.* **15**, 1090–1094 (2016).
 217. C. Lanctôt, T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, T. Cremer, Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 104–115 (2007).
 218. R. Clément, B. Dehapiot, C. Collinet, T. Lecuit, P.-F. Lenne, Viscoelastic Dissipation Stabilizes Cell Shape Changes during Tissue Morphogenesis. *Curr. Biol.* **27**, 3132–3142.e4 (2017).
 219. X. Wang, *et al.*, Mechanical stability of the cell nucleus - roles played by the cytoskeleton in nuclear deformation and strain recovery. *J. Cell Sci.* **131** (2018).
 220. A. Buxboim, *et al.*, Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr. Biol.* **24**, 1909–1917 (2014).
 221. E. Eden, *et al.*, Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science* **331**, 764–768 (2011).
 222. Q. Xu, B. Engquist, A mathematical model for fitting and predicting relaxation modulus and simulating viscoelastic responses. *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* **474**, 20170540 (2018).
 223. K. K. Mandadapu, S. Govindjee, M. R. K. Mofrad, On the cytoskeleton and soft glassy

- rheology. *J. Biomech.* **41**, 1467–1478 (2008).
224. Y. Mulla, F. C. MacKintosh, G. H. Koenderink, Origin of Slow Stress Relaxation in the Cytoskeleton. *Phys. Rev. Lett.* **122**, 218102 (2019).
 225. P. Bursac, *et al.*, Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell. *Nat. Mater.* **4**, 557–561 (2005).
 226. B. Schwanhäusser, *et al.*, Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
 227. T. P. Lele, R. B. Dickinson, G. G. Gundersen, Mechanical principles of nuclear shaping and positioning. *J. Cell Biol.* **217**, 3330–3342 (2018).
 228. Y. H. Chim, *et al.*, A one-step procedure to probe the viscoelastic properties of cells by Atomic Force Microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 14462 (2018).
 229. X. Cao, *et al.*, Multiscale model predicts increasing focal adhesion size with decreasing stiffness in fibrous matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4549–E4555 (2017).
 230. O. Wintner, *et al.*, A Unified Linear Viscoelastic Model of the Cell Nucleus Defines the Mechanical Contributions of Lamins and Chromatin. *Adv. Sci.* **7**, 1901222 (2020).
 231. M. M. Nava, *et al.*, Heterochromatin-Driven Nuclear Softening Protects the Genome against Mechanical Stress-Induced Damage. *Cell* **181**, 800–817.e22 (2020).
 232. J. Zhang, *et al.*, Nuclear Mechanics within Intact Cells Is Regulated by Cytoskeletal Network and Internal Nanostructures. *Small* **16**, e1907688 (2020).
 233. M. Yin, *et al.*, Quantitative assessment of hepatic fibrosis in an animal model with magnetic resonance elastography. *Magn. Reson. Med.* **58**, 346–353 (2007).
 234. W. Y. Wang, C. D. Davidson, D. Lin, B. M. Baker, Actomyosin contractility-dependent matrix stretch and recoil induces rapid cell migration. *Nat. Commun.* **10**, 1186 (2019).
 235. Z. Gong, *et al.*, Matching material and cellular timescales maximizes cell spreading on viscoelastic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E2686–E2695 (2018).
 236. K. P. Burnham, D. R. Anderson, Eds., *Model Selection and Multimodel Inference* (Springer New York, 2004) <https://doi.org/10.1007/b97636>.
 237. P. C. Georges, *et al.*, Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G1147–54 (2007).
 238. M. Mokbel, K. Hosseini, S. Aland, E. Fischer-Friedrich, The Poisson Ratio of the Cellular Actin Cortex Is Frequency Dependent. *Biophys. J.* **118**, 1968–1976 (2020).
 239. H. Wang, *et al.*, Necking and failure of constrained 3D microtissues induced by cellular tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20923–20928 (2013).
 240. V. B. Shenoy, H. Wang, X. Wang, A chemo-mechanical free-energy-based approach to model durotaxis and extracellular stiffness-dependent contraction and polarization of cells. *Interface Focus* **6**, 20150067 (2016).
 241. K. Mandal, Z. Gong, A. Rylander, V. B. Shenoy, P. A. Janmey, Correction: Opposite responses of normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells to substrate viscoelasticity. *Biomater Sci* **8**, 2040 (2020).
 242. Q. Lu, *et al.*, Hepatocellular carcinoma: stiffness value and ratio to discriminate malignant from benign focal liver lesions. *Radiology* **275**, 880–888 (2015).
 243. , Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 279–287 (2018).
 244. J. Schrader, *et al.*, Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **53**, 1192–1205 (2011).
 245. N. Pashine, D. Hexner, A. J. Liu, S. R. Nagel, Directed aging, memory, and nature's greed. *Sci Adv* **5**, eaax4215 (2019).
 246. S. Pagliara, *et al.*, Auxetic nuclei in embryonic stem cells exiting pluripotency. *Nat. Mater.* **13**, 638–644 (2014).
 247. P. Van Eyken, V. J. Desmet, Cytokeratins and the liver. *Liver* **13**, 113–122 (1993).
 248. D. Zink, A. H. Fischer, J. A. Nickerson, Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 677–687 (2004).
 249. L. D. Vuković, P. Jevtić, L. J. Edens, D. L. Levy, New Insights into Mechanisms and Functions of Nuclear Size Regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **322**, 1–59 (2016).
 250. C. Truesdell, W. Noll, *The Non-Linear Field Theories of Mechanics* (Springer Science & Business Media, 2013).
 251. R. P. Martins, J. D. Finan, F. Guilak, D. A. Lee, Mechanical regulation of nuclear structure and function. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14**, 431–455 (2012).

252. H.-H. Lin, *et al.*, Mechanical phenotype of cancer cells: cell softening and loss of stiffness sensing. *Oncotarget* **6**, 20946–20958 (2015).
253. P. Godoy, *et al.*, Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology* **49**, 2031–2043 (2009).
254. A. Kaimori, *et al.*, Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **282**, 22089–22101 (2007).
255. M. Macias-Silva, W. Li, J. I. Leu, M. A. S. Crissey, R. Taub, Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **277**, 28483–28490 (2002).
256. X. Cao, *et al.*, Multiscale model predicts increasing focal adhesion size with decreasing stiffness in fibrous matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4549–E4555 (2017).
257. X. Cao, *et al.*, Multiscale model predicts increasing focal adhesion size with decreasing stiffness in fibrous matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4549–E4555 (2017).
258. X. Cao, *et al.*, A Chemo-Mechanical Model for Extracellular Matrix and Nuclear Rigidity Regulated Size of Focal Adhesion Plaques. *Biophysical Journal* **110**, 622a (2016).
259. H. Lee, *et al.*, Cytoskeletal prestress regulates nuclear shape and stiffness in cardiac myocytes. *Exp. Biol. Med.* **240**, 1543–1554 (2015).
260. P. Neff, B. Eidel, R. J. Martin, Geometry of Logarithmic Strain Measures in Solid Mechanics. *Archive for Rational Mechanics and Analysis* **222**, 507–572 (2016).
261. X. Cao, *et al.*, A Chemomechanical Model of Matrix and Nuclear Rigidity Regulation of Focal Adhesion Size. *Biophys. J.* **109**, 1807–1817 (2015).
262. F. Alisafaei, D. S. Jokhun, G. V. Shivashankar, V. B. Shenoy, Regulation of nuclear architecture, mechanics, and nucleocytoplasmic shuttling of epigenetic factors by cell geometric constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 13200–13209 (2019).
263. J. Swift, *et al.*, Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).
264. A. Elosegui-Artola, *et al.*, Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. *Nat. Mater.* **13**, 631–637 (2014).
265. S. Chiron, *et al.*, Complex interactions between human myoblasts and the surrounding 3D fibrin-based matrix. *PLoS One* **7**, e36173 (2012).
266. X. Cao, *et al.*, Multiscale model predicts increasing focal adhesion size with decreasing stiffness in fibrous matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4549–E4555 (2017).
267. F. Alisafaei, D. S. Jokhun, G. V. Shivashankar, V. B. Shenoy, Regulation of nuclear architecture, mechanics, and nucleocytoplasmic shuttling of epigenetic factors by cell geometric constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 13200–13209 (2019).
268. H. Wang, *et al.*, Necking and failure of constrained 3D microtissues induced by cellular tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20923–20928 (2013).
269. V. B. Shenoy, H. Wang, X. Wang, A chemo-mechanical free-energy-based approach to model durotaxis and extracellular stiffness-dependent contraction and polarization of cells. *Interface Focus* **6**, 20150067 (2016).
270. F. Alisafaei, D. S. Jokhun, G. V. Shivashankar, V. B. Shenoy, Regulation of nuclear architecture, mechanics, and nucleocytoplasmic shuttling of epigenetic factors by cell geometric constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 13200–13209 (2019).
271. N. Caille, O. Thoumine, Y. Tardy, J.-J. Meister, Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J. Biomech.* **35**, 177–187 (2002).
272. R. H. Kirschner, M. Rusli, T. E. Martin, Characterization of the nuclear envelope, pore complexes, and dense lamina of mouse liver nuclei by high resolution scanning electron microscopy. *J. Cell Biol.* **72**, 118–132 (1977).
273. J. Swift, *et al.*, Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).
274. A. H. B. de Vries, B. E. Krenn, R. van Driel, V. Subramaniam, J. S. Kanger, Direct observation of nanomechanical properties of chromatin in living cells. *Nano Lett.* **7**, 1424–1427 (2007).
275. M. A. Digman, P. W. Wiseman, A. R. Horwitz, E. Gratton, Detecting protein complexes in living cells from laser scanning confocal image sequences by the cross correlation raster image spectroscopy method. *Biophys. J.* **96**, 707–716 (2009).
276. N. Otsu, A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* **9**, 62–66 (1979).

277. , Website (August 16, 2020).
278. R. C. Gonzalez, R. E. Woods, *Digital Image Processing* (Pearson Higher Ed, 2011).
279. S. van der Walt, *et al.*, scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* **2**, e453 (2014).
280. T. Smitha, P. Sharada, H. Girish, Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **15**, 26–33 (2011).
281. D. Comaniciu, P. Meer, Mean shift: a robust approach toward feature space analysis. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **24**, 603–619 (2002).
282. F. Pedregosa, *et al.*, Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **12**, 2825–2830 (2011).
283. , Website (August 16, 2020).
284. A. Shrivastava, Introduction to Plastics Engineering. *Introduction to Plastics Engineering*, 1–16 (2018).

Anexo 1. Especificaciones experimentales

Cultivo celular

Aislamiento de hepatocitos de hígado de rata

El Comité de Cuidado y Uso Animal de la Facultad de Ciencias aprobó el protocolo animal PI_2019_02_004 para el aislamiento de hepatocitos de hígado de rata el 27 de febrero de 2019. Por lo cual, se aislaron hepatocitos frescos de hígados de ratas Wistar de 250-300 gramos, utilizando una perfusión de colagenasa, método descrito en (255). Después de la perfusión de colagenasa, los hepatocitos aislados se separaron mediante centrifugación de Percoll de isodensidad en medio E de William y se evaluó la viabilidad celular mediante exclusión con azul tripán. Los hepatocitos viables frescos se resuspendieron en medio de adhesión (DMEM-F12 suplementado con GlutaMAX 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM, 0.5 µg ml⁻¹ de anfotericina B, 1% de insulina-transferrina-selenito de sodio y 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina / estreptomycin). Luego, los hepatocitos se cultivaron a una densidad de 2.5 x 10⁵ en cubreobjetos redondos recubiertos con hidrogeles de poli(acrilamida) de módulo elástico específico y se conjugaron con 0.1 mg / mL de colágeno de cola de rata tipo I. Se dejó que los hepatocitos se adhirieron durante 2 h en medio de adhesión que posteriormente se reemplazó con medio de alimentación (medio de fijación sin FBS). Simultáneamente, se sembraron hepatocitos en placas de poliestireno cubiertas con 1 mg/mL de colágeno tipo I disuelta en ácido acético 20 mM como una condición de control estándar.

Condiciones de cultivo celular

Los hepatocitos se mantuvieron en un medio de alimentación en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C durante diferentes tiempos como se indica en el capítulo 4, y el medio se reemplazó cada 24 h.

La línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 se mantuvo en medio esencial mínimo (*MEM* por sus siglas en inglés) suplementado con piruvato de sodio 1 mM y FBS al 10% más antibióticos. Las células HepG2 también se cultivaron en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C.

La línea celular de epitelio embrionario renal AD-293 se mantuvo en medio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado con piruvato de sodio 1 mM y FBS al 10% más antibióticos. Las células también se cultivaron en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C. Se sembraron 2 × 10⁵ células sobre los hidrogeles de PAM conjugados con [100 µg / ml] colágeno tipo I de cola de rata.

La línea celular de epitelio alveolar A549 se mantuvo en medio F12 suplementado con piruvato de sodio 1 mM y FBS al 10% más antibióticos. Las células A549 también se cultivaron en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C. Se sembraron 4 × 10⁴ células sobre los hidrogeles de PAM conjugados con [100 µg / ml] colágeno tipo I de cola de rata.

Los fibroblastos normales de pulmón de humano (NHLF) se mantuvieron en medio DMEM-F12 suplementado con GlutaMAX 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM, 0.5 µg ml⁻¹ de anfotericina B, 1% de insulina-transferrina-selenito de sodio, FBS al 10% y penicilina / estreptomina). Las células NHLF también se cultivaron en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C. Se sembraron 4 × 10⁴ células sobre los hidrogeles de PAM conjugados con [100 µg / ml] colágena tipo I de cola de rata.

Los fibroblastos humanos inmortalizados, es decir, la línea celular BJ, se cultivaron en medio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* con alto contenido de glucosa complementado con (FBS) al 10% y antibióticos penicilina. estreptomina. Las células BJ también se cultivaron en condiciones de cultivo estándar de CO₂ al 5% a 37 ° C. Se sembraron 5 × 10⁵ células sobre los hidrogeles de PAM conjugados con [100 µg / ml] colágena tipo I de cola de rata.

Inmunofluorescencia

Los fibroblastos BJ y NHLF, y las líneas epiteliales A549, AD-293 y HepG2 se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS a 37 ° C durante 15 min. Después de la fijación, las células se permeabilizaron utilizando Triton X-100 al 0,1% en PBS 1X mediante agitación a temperatura ambiente (TA) durante 10 min y se bloquearon con suero de caballo al 10% en PBS 1X en agitación a TA durante 1 h

Para la inmunotinción, en el caso de los fibroblastos BJ y las células AD-293 las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra YAP a una dilución de 1: 200. Después de eso, se utilizó el anticuerpo secundario acoplado a Alexa-594 para la inmunodetección . Para todos los tipos celulares, los filamentos de actina y núcleos de actina se marcaron de la misma manera con faloidina acoplada a Alexa-488 y los núcleos de todos los tipos celulares fueron marcados con diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Las muestras se montaron con Mowiol sobre un cubreobjetos rectangular.

En el caso de los hepatocitos primarios y las células HepG2 después de la fijación y el bloqueo, las muestras se incubaron con anticuerpo primario contra la citoqueratina 18 1:500 a 4 ° C durante toda la noche. La detección del anticuerpo primario se realizó mediante incubación con anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa-594 1: 500 durante 1 h a TA.

En el caso de las línea A549 después de la fijación y el bloqueo, las muestras se incubaron al mismo tiempo con anticuerpo primario contra la E-cadherina 1:200 y anticuerpo primario contra vimentina 1:400 a 4 ° C durante toda la noche. La detección del anticuerpo primario se realizó mediante incubación con anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa-594 1: 500 durante 1 h a TA y anti-burro acoplado a Alexa-610 1: 500 , respectivamente, durante 1 h a TA.

Adquisición de imágenes y procesamiento de imágenes

Las imágenes de las muestras se obtuvieron mediante microscopía de barrido láser confocal (Leica TCS SP8) y microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ci-L). Para la microscopía confocal, las células se visualizaron de dos formas según se necesitara, usando un objetivo de inmersión en aceite 63x / 1.40 NA o utilizando un objetivos de inmersión en agua 40x / 0.80 NA y 63x / 0.90 NA. Para la microscopía de epifluorescencia, se tomaron las imágenes de las células o núcleos utilizando un objetivo de 40x (5 campos por muestra, utilizando los canales necesarios, azul, rojo y verde).

El apilamiento Z para los núcleos de los hepatocitos fue de 20 imágenes con una distancia en z de ~ 1 μm , esta se adquirió a través del canal azul, mientras que para CK-18 y F-actina se adquirieron a través de los canales rojo y verde, respectivamente. Todas las imágenes fueron procesadas con el software FIJI (ImageJ) utilizando los plugins.

Análisis estadístico

Para los datos presentados, a menos que se especifique lo contrario hay al menos 2 experimentos independientes realizados por duplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8 y Wolfram Mathematica 12.1. Todas las barras de error reflejan la media \pm DE, las comparaciones entre diferentes condiciones se realizaron mediante un análisis de varianza de una vía (oneway ANOVA) con la corrección de Tukey para múltiples comparaciones, se considera estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$

Anexo 2. Solución y validación del H-VM

Representación mecánica del citoesqueleto y complejo de adhesión.

La representación completa de todos los elementos mecánicos de una célula adherente (núcleo-citoesqueleto-adhesión) se basó en la unión del modelo nuclear H-VM con los elementos mecánicos reportados por Cao y colaboradores (256) (ver figura 4.4B). Las ecuaciones constitutivas en una dimensión (1D) que representan estos elementos mecánicos se presentan a continuación:

$$F_a = k_a x_a \quad (\text{A2.1})$$

$$F_c = \varrho + k_{\mu T} x_{\mu T} \quad (\text{A2.2})$$

con

$$\varrho = \frac{\beta \rho_0}{(\beta - \alpha)} + \frac{\alpha k_{\mu T} - 1}{\beta - \alpha} x_{\mu T} \quad (\text{A2.3})$$

Además,

$$F_{FA} = k_{eff} x_{FA} \quad (\text{A2.4})$$

con

$$k_{eff} = \frac{\sqrt{k_p k_s k_c} (k_p + k_s)^{3/2} \sinh(L/L_c)}{(k_p^2 + k_s^2) \cosh(L/L_c) + k_p k_s (2 + (L/L_c) \sinh(L/L_c))} \quad (\text{A2.5})$$

$$L_c = d_c \sqrt{\frac{1}{k_c} \frac{1}{(1/k_s + 1/k_c)}} \quad (\text{A2.6})$$

La ecuación S1 representa la fuerza F_a soportada por los filamentos de actina con una rigidez k_a ejercida por la contractilidad F_c del aparato de actomiosina. Las ecuaciones A2.2 y A2.3 describen un elemento contráctil activo con retroalimentación positiva: ϱ_0 es la contractilidad basal de la célula en ausencia de estrés o restricción externa (puede interpretarse como la tensión contráctil intrínseca o pre-estrés celular). Los parámetros α y β representan los parámetros de acoplamiento mecano-químico y están asociados con un mecanismo molecular que refleja las vías de señalización dependientes del estrés y el acoplamiento de los motores de miosina, estos parámetros satisfacen la condición $0 < \alpha/\beta < 1$. Además, $k_{\mu T}$ representa la rigidez de los microtúbulos, y por lo tanto, ϱ y $k_{\mu T}$ representan la actividad quimio-mecánica de los motores de miosina. Las ecuaciones A2.4 - A2.6 describen la respuesta mecánica del complejo de adhesión focal (FA) causada por la fuerza transmitida al aparato de actomiosina y se denomina rigidez efectiva de las FA y la

ECM (FA-ECM), LC es la longitud del retardo de cizallamiento, que se define como la escala de longitud donde se transmiten las fuerzas de actomiosina. k_s , k_p y k_c son las rigideces asociadas con el sustrato / ECM, la placa de adhesión y el embrague, respectivamente. d_c es el espacio entre integrinas y L es la longitud de adhesión focal.

Finalmente, k_s , k_p y k_c son las deformaciones de los filamentos de actina, de los microtúbulos y de las FA respectivamente. Estas ecuaciones se detallan precisamente en el trabajo del grupo Shenoy en (257, 258). Para calcular la deformación nuclear debida a fuerzas fisiológicas el sistema de ecuaciones se resolvió utilizando un notebook de Wolfram Mathematica 12.1, siguiendo el procedimiento y supuestos que se describen a continuación:

1. Debido a que los componentes están conectados en serie, tenemos:

$$F_n = F_a = F_c = F_{FA} \quad (A2.7)$$

$$x = x_n + x_a + x_c + x_{FA} \quad (A2.8)$$

2. Dado que asumimos que la celda está en un estado estable durante un corto intervalo de tiempo (i.e. $dx/dt = C0 \Rightarrow s\bar{x} = C0$, lo que implica que la célula no cambia de tamaño espontáneamente o si lo hace, lo hace a una tasa constante), entonces es posible imponer una restricción geométrica en el espacio de Laplace:

$$\bar{x} = \bar{x}_n + \bar{x}_a + \bar{x}_c + \bar{x}_{FA} = C0/s \quad (A2-L1)$$

donde $C0$ es una constante, por simplicidad $C0$ se fijó a 0 ya que a tiempos lo suficientemente largos el spreading celular alcanza un valor casi constante.

3. Por simplicidad las se trabajará en el espacio de Laplace y $F_i(t) \wedge x_i(t)$, entonces utilizando la regla de la cadena obtenemos las ecuaciones.

$$\bar{F}_n = \bar{F} = k_l \bar{x}_n + \sum_j \frac{k_j \bar{x}_n}{1+1/s\tau_j} \quad (A2-L2)$$

$$\bar{F}_a = \bar{F} = k_a \bar{x}_a \quad (A2-L3)$$

$$\bar{F}_c = \bar{F} = k_{\mu T} \bar{x}_{\mu T} + \frac{\beta \rho_0}{(\beta - \alpha)} + \frac{\alpha k_{\mu T} - 1}{\beta - \alpha} \bar{x}_{\mu T} \quad (A2-L4)$$

$$\bar{F}_{FA} = \bar{F} = k_{eff} \bar{x}_{FA} \quad (A2-L5)$$

Donde se utilizó la notación $L(F(t)) = \bar{F}$, aquí L es el operador de la transformada de Laplace.

4. Entonces, las ecuaciones A2-L1 - A3-L5 se resolvieron algebraicamente como una función de $\bar{F}(s)$ en el espacio de Laplace.

5. Para encontrar la deformación nuclear, se utilizó la ecuación de Boltzmann (ecuación 4.13 en el texto principal) con $\overline{\varepsilon}(s)$ y el módulo de fluencia $\overline{J}(s)$ del núcleo en el espacio de Laplace, obtenemos que:

$$\overline{J}(s) = F_0 / (k_l + \sum_j^2 \frac{k_j}{1+1/s\tau_j}) \quad (\text{A2-L7})$$

$$\overline{\varepsilon}(s) = \overline{J}(s) * \overline{F}(s) \quad (\text{A2-L8})$$

6. Dado que se ha demostrado experimentalmente que el núcleo celular está sometido a cierto estrés a lo largo del tiempo (pre-estrés nuclear) (259), matemáticamente esto implica que $\varepsilon(t = 0) \neq 0$ debido a que $F(t = 0) \neq 0$. Además, la ecuación A2.7 establece que $\varepsilon(0) = 0 \Leftrightarrow F(0) = 0$, entonces, para ser consistente con la información experimental, es necesario asumir un estado estable de referencia $\varepsilon(\tau_{NE0}, k_{l0} | k_{s0}) = l_0 \neq 0$ que depende de la rigidez del sustrato / ECM (figura 4.1). Entonces, la deformación relativa del núcleo celular toma la siguiente forma:

$$\epsilon_n(t) = \lambda - 1 = \frac{\varepsilon_n(t) - \varepsilon_{n0}(t_0)}{\varepsilon_{n0}(t_0)} \quad (\text{A2.9})$$

donde $\lambda = l/l_0$ es la definición de deformación (*strain*) y $\epsilon_n(t)$ es la definición de la deformación de Cauchy.

7. Para resolver la ecuación A2.9 en la Ecuación A3-L8 usamos la transformada inversa de Laplace L^{-1} . Sin embargo, τ_{NE} y k_l poseen un comportamiento dependiente del tiempo. Sin embargo, dado que F se calculó a partir del supuesto de que la célula se encuentra en un estado estable, entonces es válido suponer que, en un período de tiempo suficientemente corto, el valor de los parámetros η_{LA} , k_{LB} y k_l permanecen constantes. Por tanto, la función de deformación del núcleo se obtiene de la extrapolación de esos momentos específicos t_i calculados con los valores de η_{LA} , k_{LB} y k_l evaluados en el momento t_i . Esta suposición es válida ya que el núcleo presenta una deformación mecánica continua.
8. Finalmente, debido a la naturaleza del H-VM, que se basa en el modelo Generalizado de Maxwell, es necesario calibrar con datos reales y ajustarlos para encontrar los valores de los parámetros de las ecuaciones 4.11 y 4.12. Es importante destacar que estos parámetros caracterizan la configuración nuclear de referencia. El procedimiento para calibrar el modelo se describe a continuación:

- a. Usando el software Wolfram Mathematica, las ecuaciones se resuelven hasta el punto 7, obteniendo una relación de la forma $\overline{\varepsilon}_i = \overline{\varepsilon}_i(k_s, k_l, s)$ (A2.9-1), donde los parámetros k_s y k_l son libres, s es el parámetro de Laplace y el índice i representa cada condición, k_{s0} y k_{l0} son los valores del estado de referencia, y los parámetros k_S rigidez del sustrato denotan la condición de rigidez de cada condición

- b. Luego, los valores k_{s1} y k_{s23} fueron fijados a 1 pN/nm y 23 pN/ nm, la equivalencia de estos parámetros se realizó como se menciona en la Tabla 4.1, entonces un sustrato con un módulo de Young de 1 kPa tiene una rigidez de 1 pN/nm.
- c. Luego, utilizando la transformación inversa de Laplace en la ecuación A29-1, se obtuvo la ecuación de deformación temporal. Por lo tanto, fijamos el tiempo en $t = 129600$ s, que es equivalente a 36 h, luego utilizando la ecuación A2.9, se varía el sistema para ajustarse a los puntos experimentales (figura 4.5F). A partir de esta variación de los parámetros se encontraron los valores k_{s0} , k_{l0} , k_{l1} en $t = 36$ h, por lo que se fijaron los parámetros k_{s0} y k_{l0} .
- d. Finalmente, con k_{s0} y k_{l0} fijos, los valores de k_{l1} y k_{l23} también se encontraron variando estos parámetros a 72 h 120 h. Una vez obtenidos los valores de los tres k_l para cada rigidez, se les ajustaron las ecuaciones 4.11 y 4.12, para determinar cuál de las dos ecuaciones describe mejor la dinámica de $k_l(t)$, se utilizó el parámetro de correlación R^2 y el criterio de información de Akaike (AIC)(236). El parámetro AIC se usa ampliamente para comparar la relevancia de diferentes modelos ajustados a datos experimentales.
9. Una vez que el modelo está calibrado con datos experimentales, es posible predecir los valores de deformación dentro del intervalo de tiempo ajustado y los módulos dinámicos de almacenamiento y pérdida en el espacio de frecuencia.

$$E'(\omega) = k_l(\omega) + \frac{\omega^2 k_{LB}(\omega) \tau_{NE}}{\omega^2 \tau_{NE}^2(\omega) - 1} + \frac{\omega^2 k_{ch} \tau_{ch}}{\omega^2 \tau_{ch}^2 - 1} \quad (A2.10)$$

$$E''(\omega) = \frac{\omega k_{LB}(\omega) \tau_{NE}}{\omega^2 \tau_{NE}^2(\omega) - 1} + \frac{\omega k_{ch} \tau_{ch}}{\omega^2 \tau_{ch}^2 - 1} \quad (A2.11)$$

10. Además, utilizando la deformación de Hencky o la definición de deformación logarítmica (260), es posible calcular la pre-deformación del núcleo.

$$H = dl/L = \ln(\lambda) = \ln\left(\frac{l}{l_0}\right) = \ln(H_0) + \ln(H_1) \quad (A2.12)$$

donde $H_0 \equiv L/l_0$ es la pre-deformación del sistema, $H_i \equiv l/L$ es el incremento de la deformación. Las distancias l , l_0 y L son la deformación total, la longitud original y la longitud del incremento respectivamente. Entonces es posible aplicar la ecuación A2.12 para dos sistemas con la misma deformación previa, ya que el incremento puede asumirse como un incremento lineal. Entonces, la Ecuación S12 adopta la ecuación de una línea y tenemos:

$$\ln(\lambda) = mt + b \quad (A2.13)$$

donde b es la pre-tensión o pre-estrés. Sin embargo, debido a que $t = 0$ es arbitrario, es necesario ajustar la ecuación A2.12 al menos a dos condiciones de rigidez y la interacción entre la línea recta será $\ln(H_0) = b_i$. Finalmente, dado que con el H-VM

es posible obtener el valor k_{l0} , entonces la condición de pre-tensión se puede calcular de la siguiente manera:

$$F_0 = k_{l0} \text{Exp}(b_i) \quad (\text{A2.14})$$

La tabla A2.1 resume los parámetros base utilizados para resolver y ajustar el modelo.

Tabla A2.1 | Parámetros base para la resolución del H-VM

Elementos de la AF			
Parámetro	Descripción	valor	Ref
k_p	Rigidez de la placa de adhesión	~1 pN/nm	(261)
k_c	Rigidez efectiva del clutch	~5 pN/nm	(262)
k_s	Rigidez del sustrato o de la ECM	~0.2-40 pN/nm	(263)
d_c	Espacio entre integrinas	~100 nm	(261)
L	FA length	~1000 nm	(264)
Elementos del citoesqueleto			
$k_{\mu T}$	Rigidez de los microtúbulos	~1 pN/nm	(265, 266)
k_a	Rigidez de los filamentos de actina	~1 pN/nm	(267)
ρ_0	Densidad inicial de los motores de miosina (prestress)	~0.5 pN/nm	(268–270)
β	Parámetros de acoplamiento químico-mecánicos relacionados con los mecanismos moleculares que regulan la activación de motores.	~2.5	(268–270)
α	Parámetros de acoplamiento químico-mecánicos relacionados con los mecanismos moleculares que regulan la activación de motores.	~1.5	(268–270)
Elementos del núcleo			
k_{l0}	Rigidez del núcleo (comportamiento elástico)	2-25 pN/nm	(271)
φ	Fracción de los complejos de poros nucleares	~0.2	(272)
k_{LB}	Rigidez asociada a la lámina B1	0 - 5 pN/nm	(273)
η_{LA}	Viscosidad asociada a la Lámina A/C	0 - 160 pN*s/nm	(263)
k_{Ch}	Rigidez asociada a la cromatina y elementos subnucleares	~1 pN/nm	Estimada de (274)
η_{Ch}	Viscosidad asociada a la cromatina y elementos subnucleares	~5 pN*s/nm	Estimada de (274)

Programa para la segmentación y caracterización de los núcleos celulares

El procesamiento de imágenes de microscopía confocal (segmentación y cuantificación de la intensidad de fluorescencia): se llevó a cabo en un cuaderno de Google Colab utilizando Python 3. Los núcleos se segmentaron en diferentes niveles en el eje Z con la ayuda de una técnica de media móvil (275) y el umbral de Otsu (276)(277), también un algoritmo de cuenca (278), (279) que permitió la separación de objetos que estuvieron en contacto. Para refinar la detección de objetos se implementaron tres filtros: un filtro de número de objetos, un filtro de área y un filtro de circularidad (280). Finalmente, se aplicó una clasificación de contorno a través de un algoritmo de desplazamiento medio (281, 282) para asignar un conjunto de objetos (contornos) a un núcleo único. Se calculó el área, perímetro, circularidad y excentricidad (278) para cada núcleo localizado, adicionalmente se obtuvo la cuantificación de los datos de intensidad de fluorescencia para las canales rojo y verde usando dos círculos concéntricos para cada núcleo, el primer círculo es más pequeño que el el contorno del núcleo más grande, mientras que el segundo círculo es más grande que el contorno del núcleo más grande. Esta información se exportó en archivos "csv" y "png".

Procesamiento de imágenes de imágenes de fluorescencia: el procedimiento fue muy similar al implementado para el procesamiento de imágenes confocal, pero utilizando solo el canal azul. Para la segmentación se implementó un umbral adaptativo ponderado (283), seguido de operaciones morfológicas para la remoción de pequeños objetos y agujeros. También se utilizaron dos filtros para el refinamiento de la segmentación, uno relacionado con el área y otro relacionado con la circularidad. De manera similar al procesamiento confocal, se realizó el cálculo del área, perímetro, circularidad y excentricidad sobre los objetos que quedaron en la última imagen binaria y los datos se exportaron en archivos "csv" y "png".

Análisis de datos: Todos los archivos "csv" generados por el software de segmentación fueron analizados con Wolfram Mathematica 12.1. Cada archivo para analizar se clasificó en una arreglo de matrices. Para el área, factor de forma y excentricidad, se eligió el valor máximo asociado a cada núcleo segmentado. Para calcular la altura del núcleo se restó la media de cada arreglo y se seleccionaron las posiciones en el arreglo de valores positivos, ya que cada posición está relacionada con un valor Z vertical. Curiosamente, los valores calculados con este método coincidieron bien con el valor obtenido manualmente con el software ImageJ. Para analizar los datos, se ajustaron diferentes tipos de distribuciones de probabilidad para cada condición específica. Debido a la naturaleza continua del fenómeno, solo se utilizaron distribuciones continuas, tales como: distribución Normal, Log-Normal, entre otras. En el caso de la distribución mixta, se realizó una deconvolución para revelar las posibles subpoblaciones en cada condición. A partir de estas funciones de probabilidad, se obtuvieron el promedio y la desviación estándar y se compararon con los valores de los datos brutos para verificar si el ajuste no introdujo artefactos o no representó la media de los datos brutos. Finalmente, a partir de estos datos fue posible calcular la deformación en

un plano transversal y tangencial al núcleo, la relación de aspecto, pre-tensión y la relación de Poisson por cada condición.

Cuantificación y análisis

A continuación se presentan los datos completos de la caracterización tanto de los núcleos de los hepatocitos primarios así como los de la línea celular HepG2.

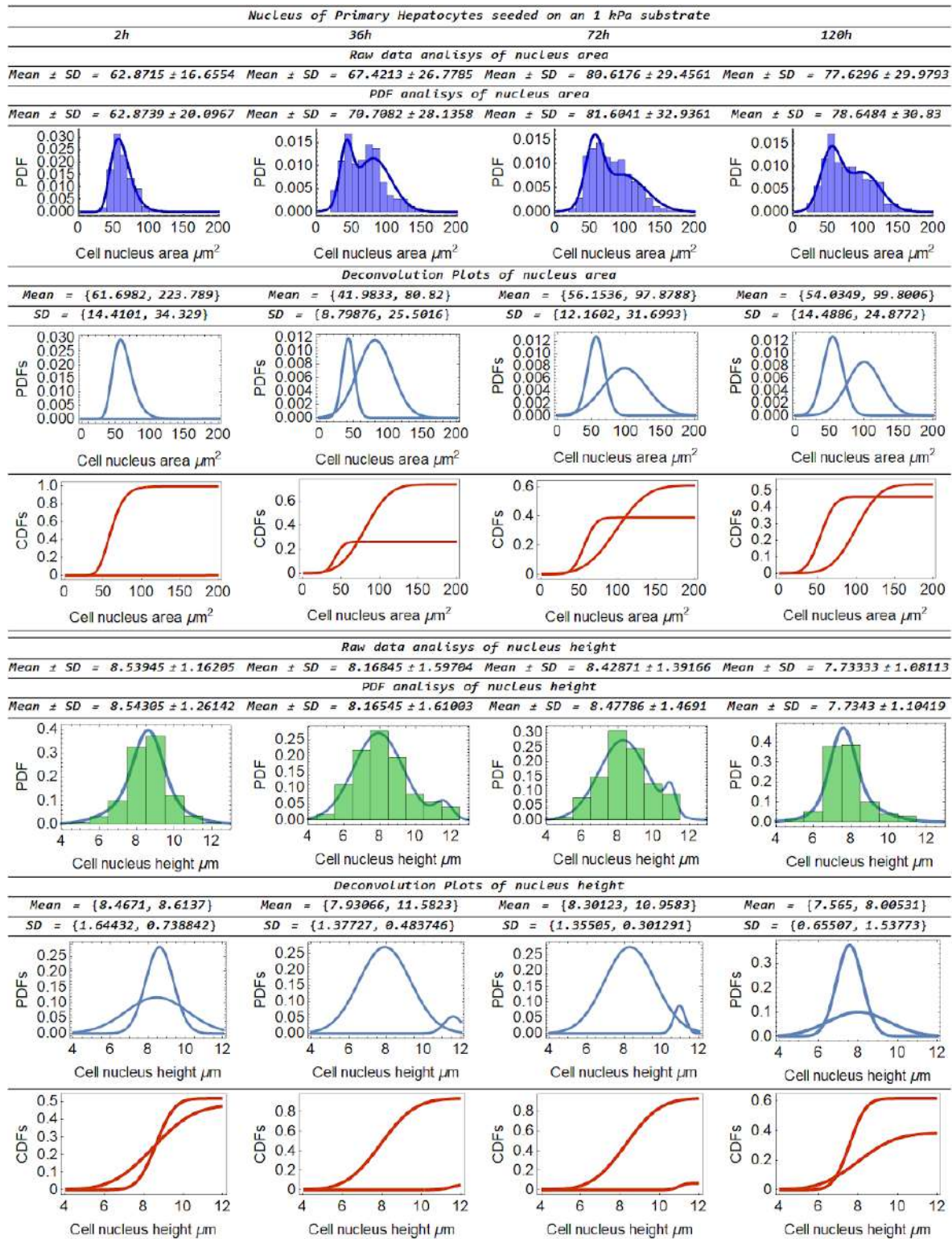


Figura A2.1 | Cuantificación y desconvolución del área proyectada y la altura de los núcleos de hepatocitos primarios sobre hidrogel blandos fijados a las 2, 36, 72 y 120 horas. La altura de cada barra en el histograma es el valor de la PDF ajustado a cada condición. El ancho de la barra se tomó de 10 μm para el área y 1 μm para la altura. El valor de la CDF asociado con cada deconvolución determina la dinámica entre poblaciones. En este caso, la población dominante es la que sufre un mayor cambio en su área proyectada.

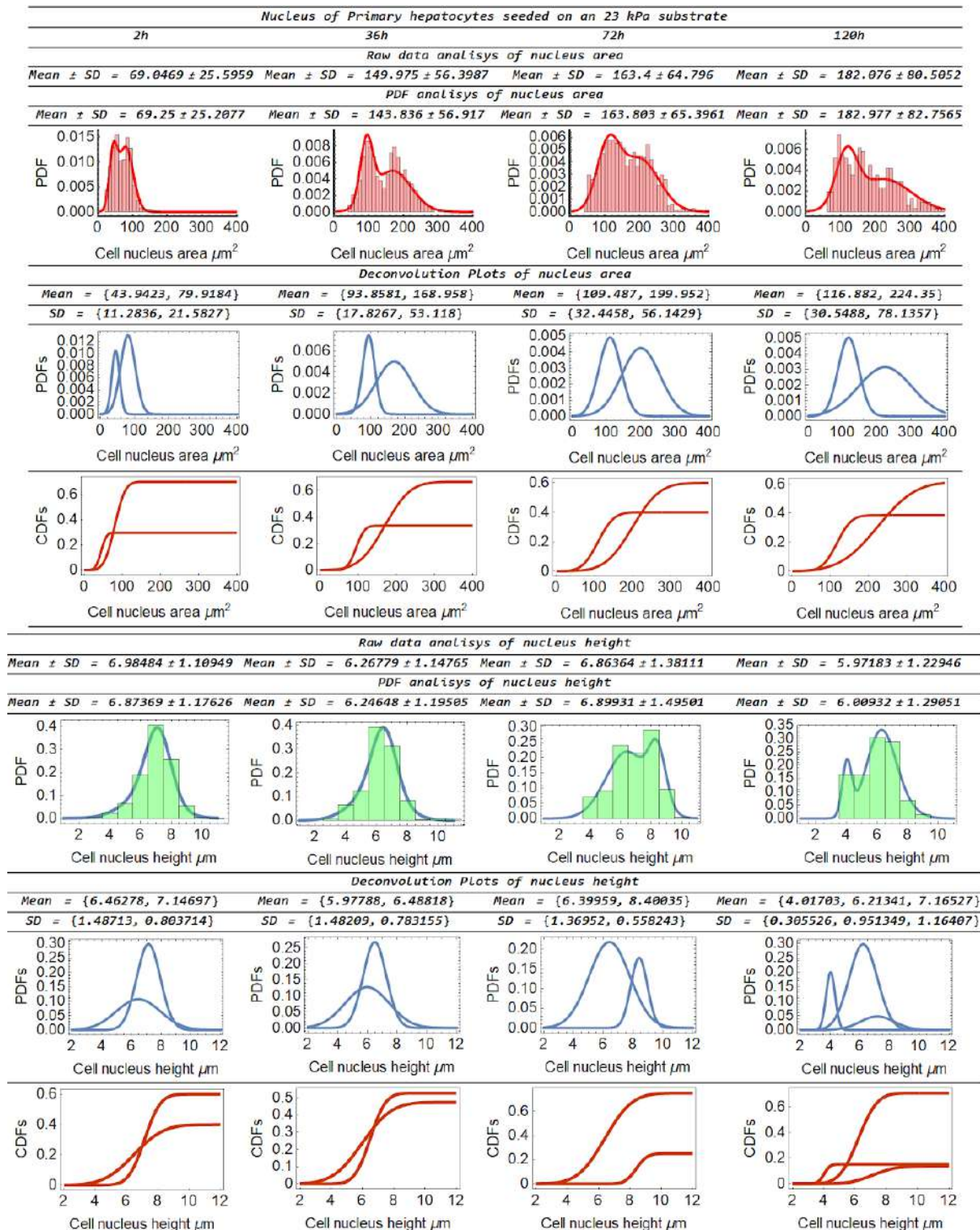


Figura A2.2 | Mismos resultados que en la figura A2.1 pero para un sustrato rígido (23 kPa)

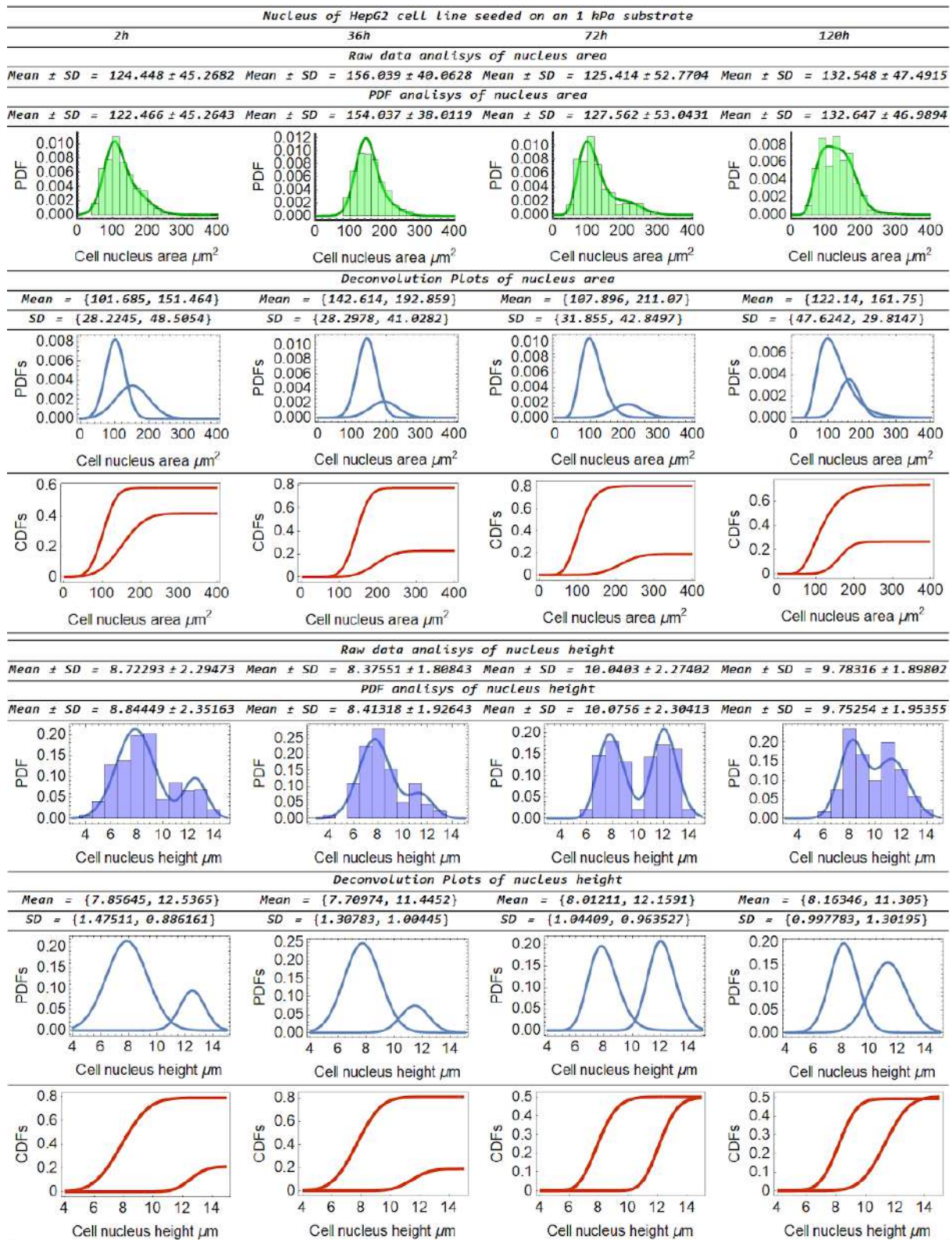


Figura A2.3 | Mismos resultados que en la figura A2.1 pero para células HepG2. El ancho de cada barra fue de 15 μm para el área y 1 μm para la altura. El valor de la CDF asociado a cada deconvolución determina la dinámica entre poblaciones y en este caso, el número de

núcleos que incrementan su área proyectada aumenta a las 72 h y disminuye nuevamente a las 120 h, esta población es igual de probable como la población que no modificó su área. Este comportamiento temporal también se observa para núcleos que incrementan su altura en el tiempo.

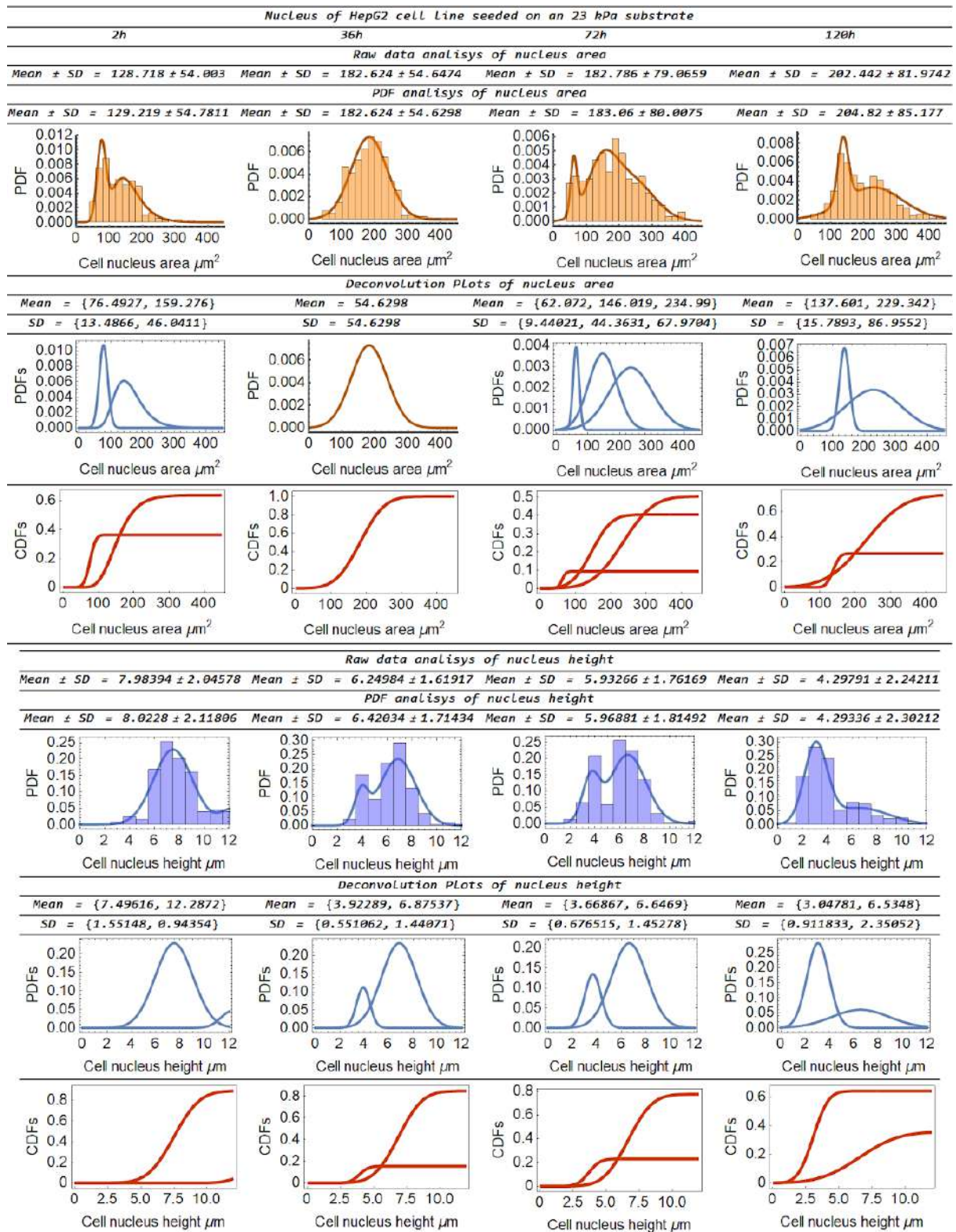


Figura A2.4 | Mismos resultados que en la figura A2.3 pero para un sustrato rígido de 23 kPa. En este caso, todas las poblaciones de células incrementan el área proyectada de su núcleo

hasta las 72 h y la redujeron a las 120 h. Sin embargo, contrariamente a la condición blanda, aquí los núcleos también disminuyen su altura.

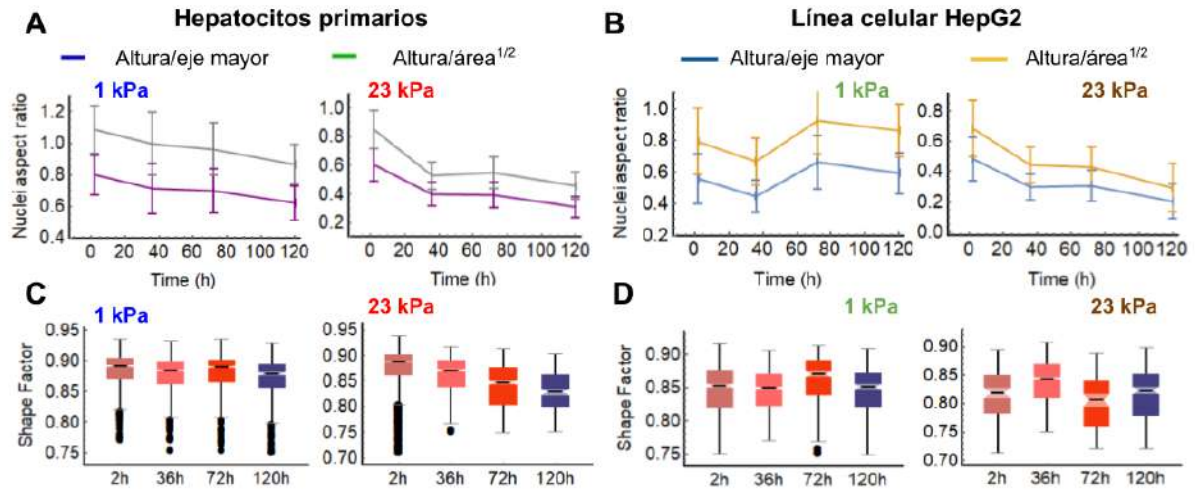


Figura A2.5 | Caracterización morfológica de células hepáticas en cultivo sobre hidrogeles de PAM. A) Relación de aspecto (AR) del núcleo de hepatocitos primarios sembrados en hidrogeles suaves (1 kPa) y rígidos (23 kPa). El principal cambio de la AR se observa en los hepatocitos sembrados con un sustrato rígido. B) AR del núcleo de las células HepG2. En este caso, los núcleos de la condición suave disminuyen su AR antes de las 72 h de cultivo y vuelve a aumentar (reflejado en la disminución del coeficiente de Poisson), por otro lado la AR en sustratos rígidos sigue disminuyendo hasta el final del experimento. C - D) Factor de forma nuclear $sf = 4P / A$ (P es el perímetro y A el área del núcleo) de hepatocitos y células HepG2 en sustratos de 1 y 23 kPa respectivamente. Estos resultados sugieren una disminución en la circularidad del núcleo de ambas células cuando aumenta la rigidez.

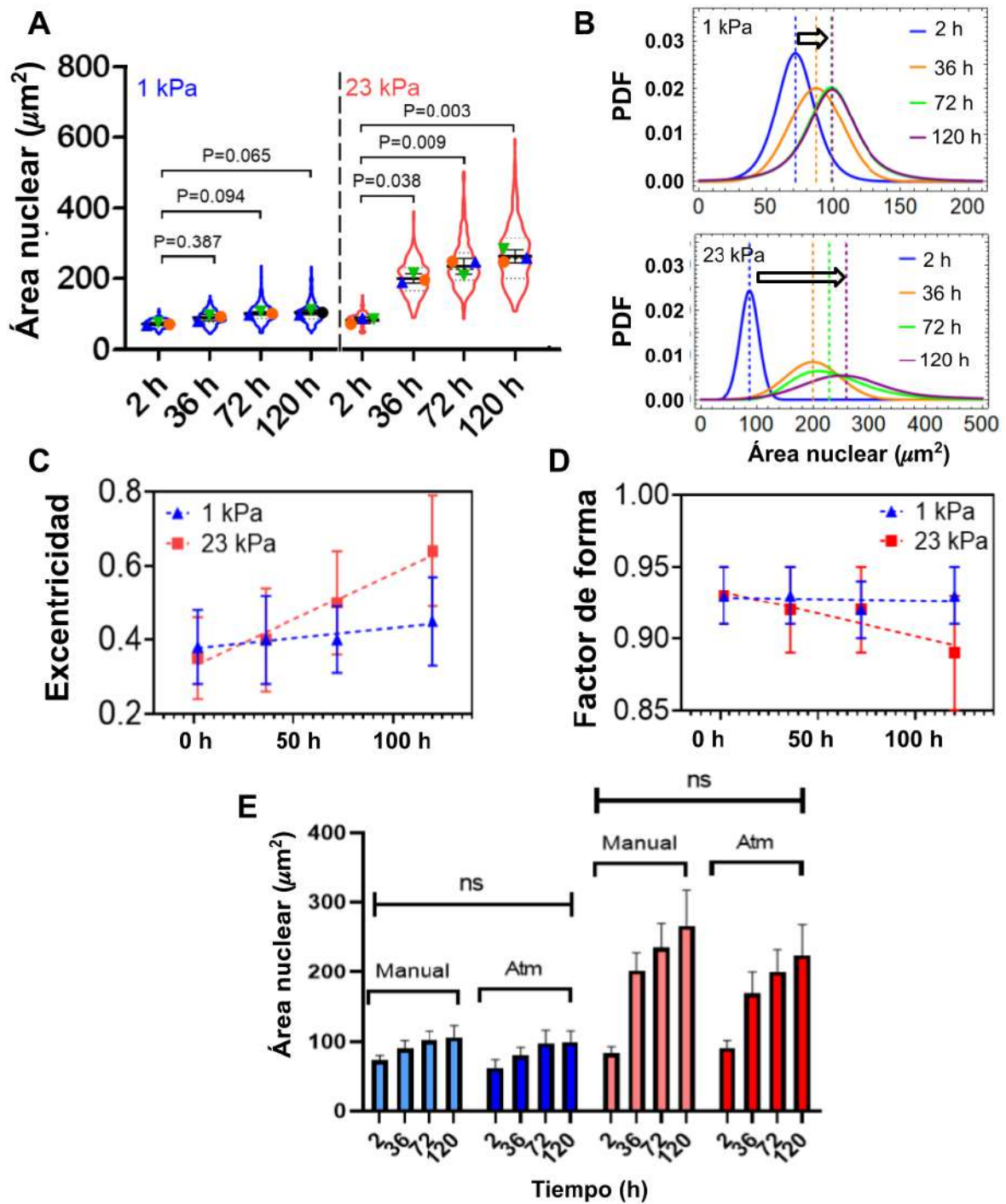


Figura A2.6 | Caracterización manual de los núcleos de hepatocitos primarios. Utilizando el software ImageJ se delimitó manualmente el contorno del área proyectada. A) Área proyectada de los núcleos en las diferentes condiciones de rigidez, se cuantificaron al menos 100 núcleos por condición. B) Comparación de la PDF de las condiciones blandas y rígidas a lo largo del tiempo. C) Evolución de la excentricidad de los núcleos para ambas condiciones. D) Evolución del factor de forma de los núcleos para ambas condiciones. E) Comparación de las áreas proyectadas obtenidas con los datos cuantificados a mano y los datos cuantificados automáticamente.

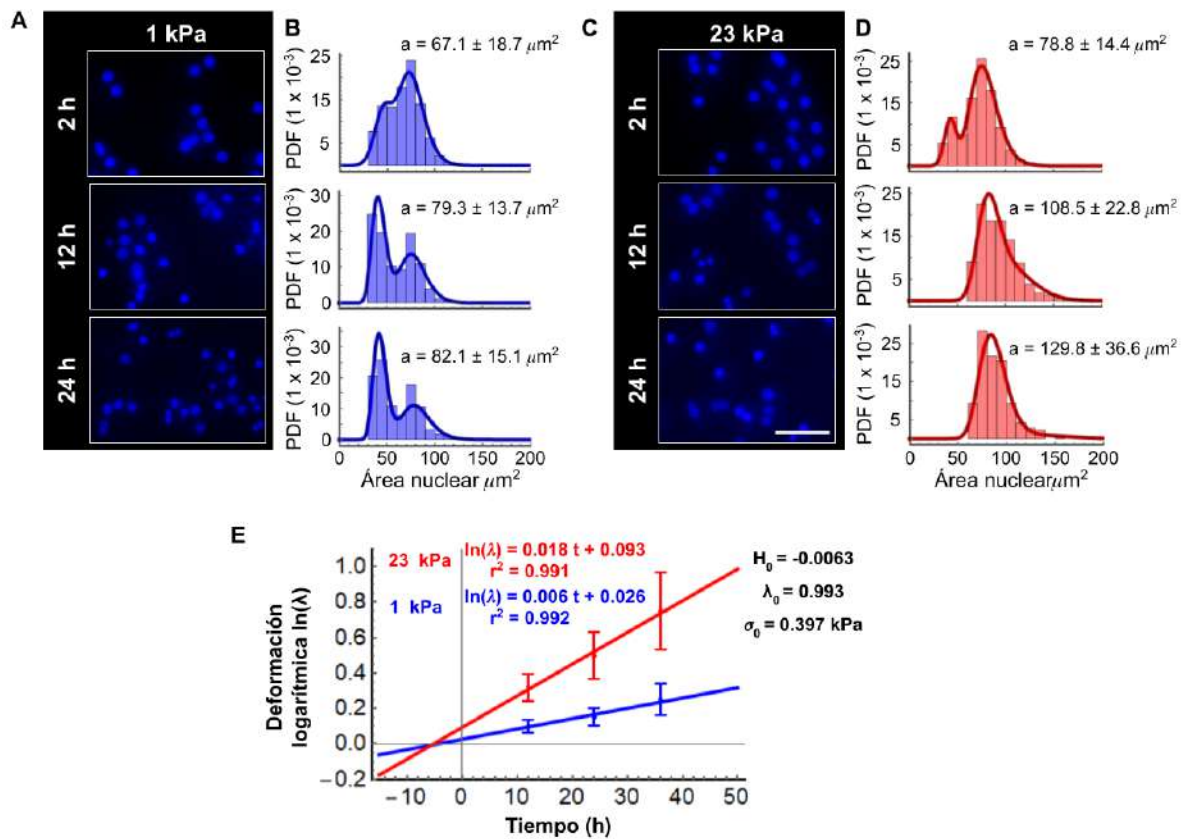


Figura A2.7 | Hepatocitos primarios cultivados sobre hidrogel de 1 y 23 kPa conjugados con colágeno tipo I. A y C) Micrografías de microscopía de epifluorescencia representativas de los núcleos de hepatocitos primarios a las 2, 12 y 24 horas de cultivo. B y D) presentan la cuantificación del área proyectada de los núcleos en las diferentes condiciones de rigidez junto a su PDF mostrando en su mayoría la existencia de dos poblaciones de tamaños.. E) Pretensado en hepatocitos primarios nucleares. Usando la Ecuación A2.13 para 12, 24 y 36 h se calculó la pre-deformación nuclear y luego se obtuvo la pre-tensión conociendo el valor de k_{10} . Barras de la barra 50 μm.

Con respecto a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CK-18, se utilizaron varias distribuciones para identificar el mejor ajuste. En ambos casos (hepatocitos primarios y HepG2) se encontró que la distribución log-Normal y Gaussiana-inversa son los mejores ajustes para los histogramas obtenidos en las figuras A2.8 y A2.9, donde es posible observar que la IF asociada a CK-18 disminuye en ambas condiciones de rigidez, es interesante que el comportamiento de la IF es similar al comportamiento de $k_l(t)$. Esto se puede asociar con el cambio de volumen observado en los resultados de la figura A2.5. En particular para la línea HepG2, hay una diferencia entre ambas condiciones de rigidez y que pueden estar asociada con la dinámica del coeficiente de Poisson que se muestra en las figuras 4.5 y 4.6 y los resultados de AR que se ven en la Figura A2.5.

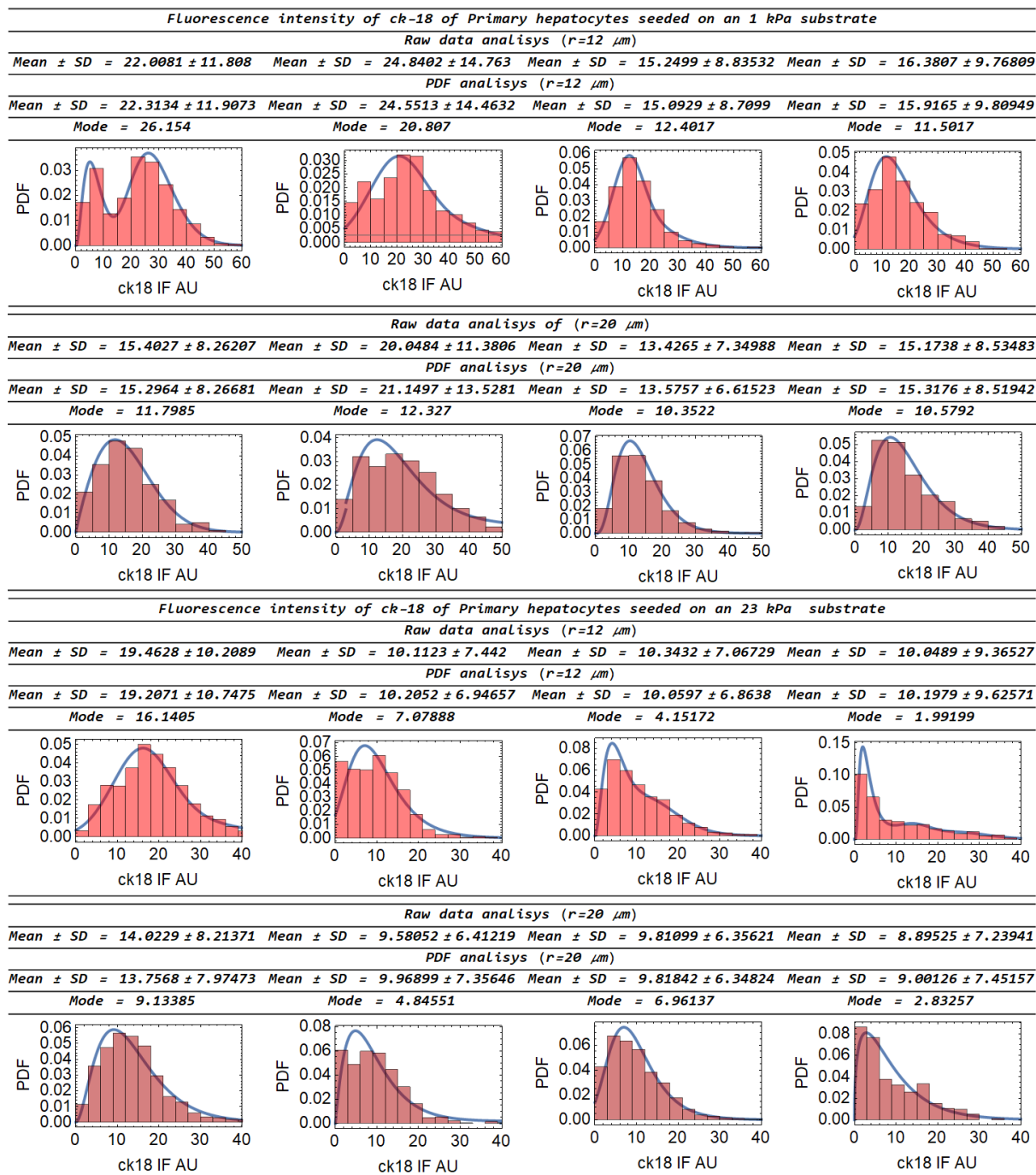


Figura A2.8 | Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CK-18, IF (CK18), para hepatocitos primarios.

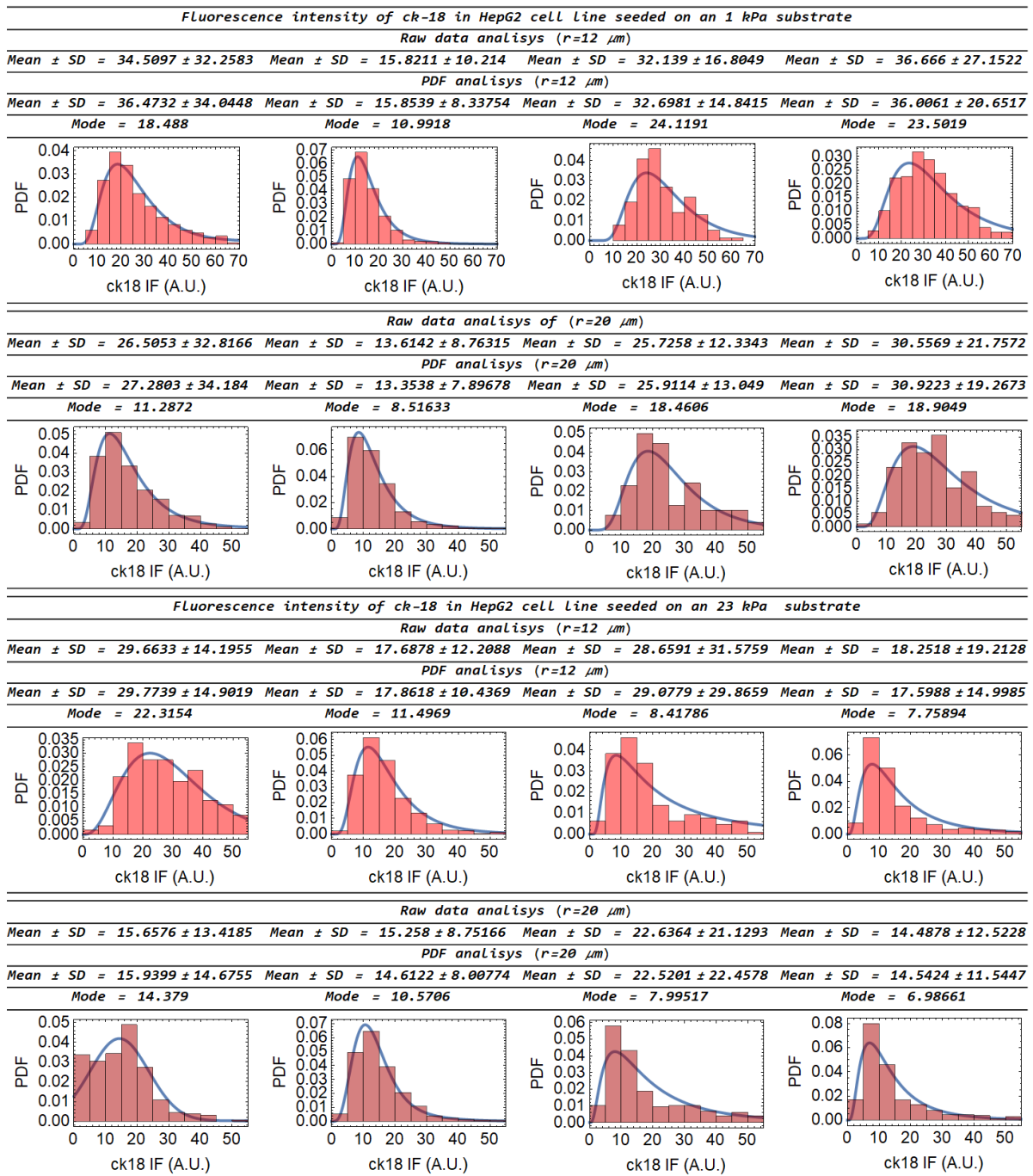


Figura A2.9 | Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CK-18, IF (CK18), para la línea celular HepG2.

Tabla A2.2 | Parámetros ajustados a las ecuaciones 4.11 y 4.12

Hepatocitos primarios					
	Coeficiente de correlación R ²		AIC*		
	Ecuación 4.11	Ecuación 4.12	Ecuación 4.11	Ecuación 4.12	
Suave (1 kPa)	0.999	0.999	-4.77	-.11.11	
Rigido (23 kPa)	0.999	0.993	-3.21	12.37	
HepG2					
	Coeficiente de correlación R ²		AIC*		
	Ecuación 4.11	Ecuación 4.12	Ecuación 4.11	Ecuación 4.12	
Suave (1 kPa)	0.980	0.997	9.60	3.34	
Rigido (23 kPa)	0.989	0.999	17.05	1.43	
		Hepatocitos primarios		HepG2	
Valores de los ajustes					
Parámetro	Suave (1 kPa)		Rigido (23 kPa)		
<i>a</i>	0.202	0.067	0.565	0.053	
<i>b</i>	6.5×10^{-7}	3.1×10^{-7}	-5.5×10^{-7}	1.2×10^{-7}	
<i>x_{eff}</i>	~1.99	~1.99	~1.99	~1.99	
<i>a'</i>	4.65	16.80	5	24	
<i>b'</i>	1.03×10^{-5}	6.31×10^{-5}	2.51×10^{-5}	8.70×10^{-5}	
<i>c'</i>	1.01×10^{-11}	8.37×10^{-11}	4.87×10^{-11}	1.29×10^{-11}	

*El criterio de información akaike (AIC) se utiliza para estimar la calidad del modelo ajustado(236).El modelo cuyo valor AIC está más cercano a 0 es mejor.

Anexo 3. Comportamiento y modelos mecánicos de los materiales

Las propiedades mecánicas de los materiales se describen principalmente por su relación esfuerzo deformación, mediante la cual se clasifica el comportamiento mecánico de los materiales. En la figura A3 se describen los principales comportamientos mecánicos, su origen físico y algunos ejemplos. El panel A2-A muestra el comportamiento de un material clasificado como elástico lineal, este se caracteriza en que si se le aplica un esfuerzo a este material su deformación es directamente proporcional a la fuerza aplicada, y, al desaparecer la fuerza, el material recupera completamente su forma original, sin deformación permanente o residual, por otra parte si la relación esfuerzo deformación es no lineal pero sigue recuperando su forma original al desaparecer el esfuerzo aplicado es un material elástico no lineal como se observa en el panel A3-B. Los materiales viscoelásticos que se presentan en el panel A3-C exhiben tanto propiedades viscosas como propiedades elásticas cuando se deforman. Esto quiere decir que presentan un híbrido entre un comportamiento de un fluido que posee cierta viscosidad y un sólido con una cierta elasticidad. Cabe señalar que la mayor parte de tejidos y materiales biológicos presentan un comportamiento viscoelástico, además, los materiales viscoelásticos poseen cierta disipación de la energía elástica, esto quiere decir que si se deforma un material viscoelástico este no regresa exactamente a su forma original. Físicamente las propiedades elásticas son el resultado de desplazar ligeramente los átomos de su posición de equilibrio a lo largo los diferentes arreglos atómicos, mientras las propiedades viscosas proceden de la difusión de átomos o moléculas en el interior del material.

En un contexto teórico los materiales elásticos en su forma más simple pueden ser representados por el comportamiento de un resorte que sigue una función de Hooke que se muestra en la ecuación A3.1

$$f = k x \quad (\text{A3.1})$$

donde f es la fuerza, k es la constante de Hooke y x es el desplazamiento o la deformación del resorte, en esta ecuación se tiene el convenio que la distancia de equilibrio del resorte (cuando no está deformado) es 0. Por otra parte, los materiales viscoelásticos (figura A3-C) pueden ser representados por la combinación de resortes (ecuación A3.1) y amortiguadores que representan la disipación en función de la velocidad de deformación como se muestra en la ecuación A3.2

$$f = \eta dx/dt \quad (\text{A3.2})$$

donde η es la viscosidad, en el caso de que la viscosidad sea constante se dice que es un amortiguador Newtoniano. La relación esfuerzo-deformación que se da con la combinación de las ecuaciones A3.1 y A3.2 se le llama ecuación constitutiva y predice el comportamiento mecánico de los materiales modelados de esta forma.

Otro tipo de material muy común y con gran relevancia en el campo de la mecanobiología, son los materiales piroclásticos, el comportamiento mecánico de estos materiales se origina por la interacción de una red sólida y el flujo de un fluido por esta, las ecuaciones constitutivas de estos materiales son variadas y algunas se puede consultar (59) para una

explicación más detallada. Finalmente los materiales plásticos son aquellos que se deforman de una manera permanente e irreversiblemente cuando se encuentra sometido a tensiones por encima de su rango elástico, es decir, por encima de su límite elástico (59, 284).

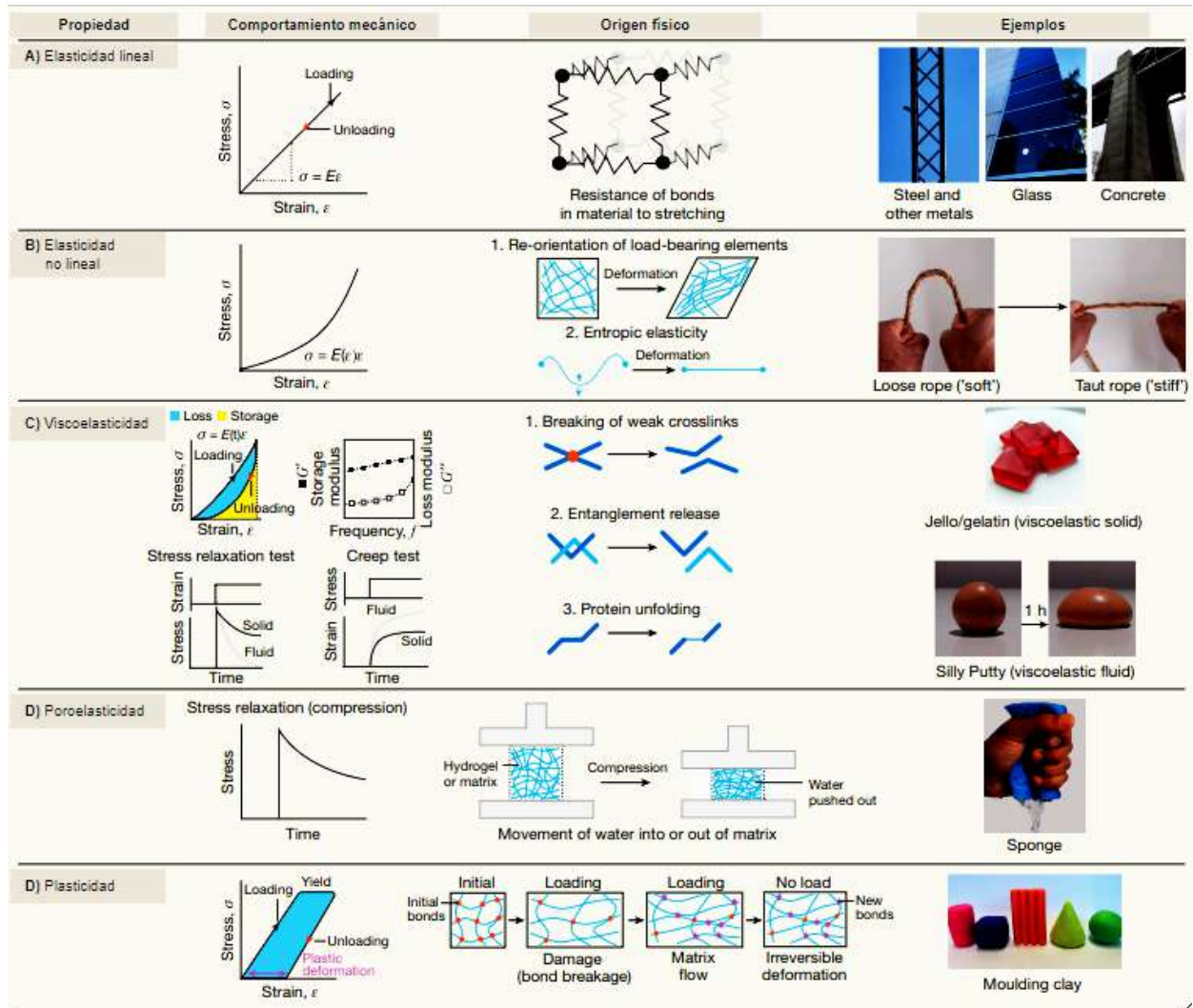


Figura A3 | Propiedades mecánicas de los materiales. A) Comportamiento elástico lineal, el esfuerzo es proporcional a la deformación, y la deformación es totalmente reversible, la energía elástica se almacena en los enlaces moleculares, las curvas de carga y descarga siguen el mismo camino (ver figura 3.9). B) Los materiales elásticos no lineales la deformación es una función no lineal del estrés incluso a pequeñas deformaciones. C) Los materiales viscoelásticos poseen un comportamiento entre un sólido elástico y un fluido viscoso, existe la disipación de la energía elástica observada como una histéresis entre las curvas de carga y descarga. Además, la intensidad de la deformación depende de la velocidad de esta. D) Los materiales poroelásticos exhiben una respuesta mecánica dependiente del tiempo debido al flujo de agua dentro o fuera de una red porosa cuando una deformación induce un cambio de volumen ($\sigma = E (\Delta V, t) \epsilon$; donde ΔV es el cambio de volumen). E), La plasticidad mecánica se refiere a la deformación irreversible de un material después de la aplicación de una carga mecánica. Figura adaptada de (99)

Anexo 4. Código desarrollado

Para acceder a los programas desarrollados para los resultados obtenidos en esta tesis ir al siguiente URL:

https://drive.google.com/drive/folders/1AQdzIPb3d0CEUuSKTKua54C__9Ok0i3x?usp=sharing

https://drive.google.com/drive/folders/1fiSHe_39au-6md7Bnlx7T76Sbw16sMtH?usp=sharing

Anexo 5. Artículos publicados

Derivado del trabajo realizado en este trabajo de tesis se publicó el siguiente trabajo:

1. **Daniel Pérez-Calixto**, Samuel Amat-Shapiro, Diego Zamarrón-Hernández, Genaro Vázquez-Victorio, Pierre-Henri Puech, and Mathieu Hautefeuille. “Determination by Relaxation Tests of the Mechanical Properties of Soft Polyacrylamide Gels Made for Mechanobiology Studies”. *Polymers*, Volume 13, Issue 4, 629, (2021). DOI: 10.3390/polym13040629

y se colaboró en los siguientes trabajos

1. Beatriz Díaz-Bello, Ana Ximena Monroy-Romero, **Daniel Pérez-Calixto**, Diego Zamarrón-Hernández, Nathalia Serna-Marquez, Genaro Vázquez-Victorio, Mathieu Hautefeuille, “Method for the Direct Fabrication of Polyacrylamide Hydrogels with Controlled Stiffness in Polystyrene Multiwell Plates for Mechanobiology Assays”, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Volume 5, Issue 9, 4219-4227, (2019). DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b00988
2. Genaro Vázquez-Victorio, Cindy Peto-Gutiérrez, Beatriz Díaz-Bello, Mariel Cano-Jorge, **Daniel Pérez-Calixto**, Alejandra Jiménez-Escobar, Silvia Espinosa-Matías, Reyna Lara Martínez, Rémi Courson, Laurent Malaquin, Diego Zamarrón-Hernández, Mathieu Hautefeuille, “Building a microfluidic cell culture platform with stiffness control using Loctite 3525 glue”, *Lab on a Chip*, Volume 19, Issue 20, 3512-3525, (2019). DOI:10.1039/C9LC00649D
3. Aarón Cruz-Ramírez, Raúl Sánchez-Olvera, Diego Zamarrón-Hernández, Mathieu Hautefeuille, Lucia Cabriales, Edgar Jiménez-Díaz, Beatriz Díaz-Bello, Jehú López-Aparicio, **Daniel Pérez-Calixto**, Mariel Cano-Jorge, Genaro Vázquez-Victorio. “Progress on the Use of Commercial Digital Optical Disc Units for Low-Power Laser Micromachining in Biomedical Applications”, *Micromachines*, Volume 9, Issue 4, 187 (2018). DOI:10.3390/mi9040187.
4. Mathieu Hautefeuille, Genaro Vázquez-Victorio, Aaron Cruz-Ramírez, Lucia Cabriales, Edgar Jiménez-Díaz, Lidia Escutia-Guadarrama, Jehú López-Aparicio, **Daniel Pérez-Calixto**, Mariel Cano-Jorge, Brenda Nieto-Rivera, Raúl Sánchez-Olvera. "Progress on CD-DVD laser microfabrication method to develop cell culture scaffolds integrating biomimetic characteristics" *Proc. SPIE 10491, Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVI*, 104910F, (2018), DOI: 10.1117/12.2288021.

Article

Determination by Relaxation Tests of the Mechanical Properties of Soft Polyacrylamide Gels Made for Mechanobiology Studies

Daniel Pérez-Calixto ^{1,2,3}, Samuel Amat-Shapiro ^{1,2}, Diego Zamarrón-Hernández ^{1,2} , Genaro Vázquez-Victorio ^{1,2} , Pierre-Henri Puech ⁴ and Mathieu Hautefeuille ^{1,2,*} 

¹ Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; daniel_perez@ciencias.unam.mx (D.P.-C.); samuel_amat@ciencias.unam.mx (S.A.-S.); diego.zamarron@ciencias.unam.mx (D.Z.-H.); genvazquez@ciencias.unam.mx (G.V.-V.)

² Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

³ Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

⁴ Adhesion and Inflammation Lab (LAI), Aix Marseille University, LAI UM 61, Inserm, UMR_S 1067, CNRS, UMR 7333, F-13288 Marseille, France; pierre-henri.puech@inserm.fr

* Correspondence: mathieu_h@ciencias.unam.mx

Abstract: Following the general aim of recapitulating the native mechanical properties of tissues and organs in vitro, the field of materials science and engineering has benefited from recent progress in developing compliant substrates with physical and chemical properties similar to those of biological materials. In particular, in the field of mechanobiology, soft hydrogels can now reproduce the precise range of stiffnesses of healthy and pathological tissues to study the mechanisms behind cell responses to mechanics. However, it was shown that biological tissues are not only elastic but also relax at different timescales. Cells can, indeed, perceive this dissipation and actually need it because it is a critical signal integrated with other signals to define adhesion, spreading and even more complicated functions. The mechanical characterization of hydrogels used in mechanobiology is, however, commonly limited to the elastic stiffness (Young's modulus) and this value is known to depend greatly on the measurement conditions that are rarely reported in great detail. Here, we report that a simple relaxation test performed under well-defined conditions can provide all the necessary information for characterizing soft materials mechanically, by fitting the dissipation behavior with a generalized Maxwell model (GMM). The simple method was validated using soft polyacrylamide hydrogels and proved to be very useful to readily unveil precise mechanical properties of gels that cells can sense and offer a set of characteristic values that can be compared with what is typically reported from microindentation tests.

Keywords: relaxation; dissipation; microindentation; polyacrylamide hydrogels; viscoelasticity



Citation: Pérez-Calixto, D.; Amat-Shapiro, S.; Zamarrón-Hernández, D.; Vázquez-Victorio, G.; Puech, P.-H.; Hautefeuille, M. Determination by Relaxation Tests of the Mechanical Properties of Soft Polyacrylamide Gels Made for Mechanobiology Studies. *Polymers* **2021**, *13*, 629. <https://doi.org/10.3390/polym13040629>

Received: 26 January 2021

Accepted: 11 February 2021

Published: 20 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mechanical characterization has become a fundamental tool for understanding the behavior and organization of living systems [1]. In particular, it is known that the mechanical properties of the cellular microenvironment play a relevant role in cell behavior, fate and function [2–4]. It has become critical to precisely characterize the mechanical properties of biological materials at different scales: the relative/modulations of mechanics of cells, extracellular matrix, basal membrane, tissues and organs are now considered to be powerful indicators of physiological or pathological conditions. The correct determination of the mechanics of biological materials also helps fabricate compliant biomaterials that offer physical properties recapitulating key native conditions found in biological tissues. Thanks to recent progress in technology, the stiffness of biocompatible materials such as polymers or gels can be tuned via an adequate control of their level of crosslinking. The

elastic modulus of polyacrylamide hydrogels made in the laboratory can now lie in the physiological range of the softest tissues, for instance [5]. Gradual, yet controlled, dynamic modulations of mechanical properties can also be engineered in soft gels, as rather simple techniques allow for material stiffening [6], softening [7] or reversible cycling [8] during cell culture, thereby restoring the natural changes occurring during the reconfiguration of a native matrix/tissue during pathological processes or wound healing and regeneration.

To allow all this, the mechanical properties of the biological materials and of their biomimetic counterparts need to be correctly imitated and, therefore, precisely characterized when using model substrates. Indeed, mechanobiology studies have shown that only slight changes in the order of only fractions of kPa of the mechanical moduli of a given substrate may influence cellular behavior greatly [9,10]. Although measuring the stiffness is typically a well established task in the field of materials science and engineering in general, this is challenging for biological materials because they are very soft (in the Pa to kPa range), adherent, wet, porous and generally spatially inhomogeneous [9], besides their temporal stability or even evolution under cell culture conditions [11]. There are several protocols that describe non-destructive mechanical characterization methods for obtaining bulk (tissue level) or local (i.e., at the microscale) information [12]. Microindentation [13] and atomic force microscopy (AFM) [14,15] are the most common, but micropipette indentation techniques [16] as well as magnetic and optical tweezer-based methods [17] were also proposed for performing such indentations in the lower (several pN) range of forces.

When aiming at measuring the mechanical properties of a material, it is important to consider that linear elastic materials can be characterized by two physical constants, their Young's modulus and Poisson's ratio. In contrast, the mechanical properties of non-linear elastic materials cannot be represented by constants, but are described by parameters that are functions of the material's deformation: for example, the non-linear shear modulus and the non-linear stretch modulus [18]. On the other hand, viscoelastic materials present a stress-strain response that changes with the strain rate [18]. This dependence can either be described by the relaxation and creep moduli in the time domain, or by the dynamic storage and loss moduli in the frequency domain. It has to be underlined here that referring to the "stiffness" of a material is probably improper to describe the mechanical properties of cells and tissues. The Young's modulus (elastic modulus) is only a partial view of the actual complex mechanical characteristics of the biological materials under study. For instance, in 2018 Ben Amar revisited the modeling of tissues' hyperelasticity and viscoelasticity and demonstrated that biological materials with a rather disordered structure present strong non-linearities that are absent from the polymeric gels used to imitate them under the same conditions [19]. Cell behavior *in vitro* can also be very much dependent on material dissipation timescales and a precise control of this parameter is now needed [20]. Recently, the use of hydrogels with viscoelastic properties has become very important to increase the fidelity of the culture substrate materials *in vitro* [4]. These materials, indeed, look more similar to real tissues, are dissipative in nature, and restore native cellular behavior in culture [21]. By experimentally controlling the viscous and elastic phases separately [22], biomaterials also help elucidate complex mechanobiology phenomena and will certainly impact the field further [23], as cells sense and respond to dissipative substrates [24]. Storage and loss moduli must then both be reported when characterizing mechanical properties, as cells respond to both elastic and viscous parts of their naturally viscoelastic substrates modifying their internal structures and nuclear envelope [25]. All this has been demonstrated to be of particular importance in tissue engineering [26], cancer research for treatment [27] or diagnostics [28].

Despite all this, the usually reported stiffness of cells and tissues is typically obtained by very simple experiments and one uses the Young's (elastic) modulus that is derived from these measurements using an appropriate model. Indeed, this mechanical property is calculated from experimental curves obtained after measuring force/stress when applying a deformation or vice versa. However, when analyzing the stress-strain data and applying the selected model to it, critical information is necessary to guarantee the fidelity of the

obtained results [29]. Precise control or at least knowledge of speed/rate, amplitude/depth or angle under which the material is deformed must be reported. Moreover, the adhesiveness of the sample to the probe has to be controlled. Then, the measurements that are collected need to be fed into the appropriate model after verification of its main hypotheses, before derivation of the mechanical properties [14]. Also, the nature of the material under test as well as the technical limitations and conditions of the testing equipment and the environment itself do influence the results and need to be accounted for with precision and reported thoroughly. For instance, in a recent paper it was shown that the Hertz model per se is not correct for the measurements of cells on very soft substrates, calling for a more elaborate model [30]. On a more technical point, the methods for calibration and determination of the contact point in the curves (position when the tip first contacts the material under test) are absolutely critical [31]. Unfortunately, they are too rarely, or hardly, mentioned, and very difficult to compare and port from experiments and labs to other contexts.

Moreover, due to the very high sensitivity of biological cells to even small changes in mechanics, controlling with very high precision the scale of deformations and forces employed to characterize the mechanics of living matter is paramount. As reported recently, there are high levels of disparity between measurements, either when performed on the same (a priori) material with different methods or with a similar method but in different laboratories [32]. These discrepancies have critical consequences on the understanding of micromechanics and their origin is thought to lie in the lack of consideration for the importance of two critical variables: setting correct and reproducible sample preparation and measurement conditions, and using the appropriate models to calculate the mechanical properties of the samples from the results obtained. In their review, Guimarães et. al. [32] point that the magnitude, directionality and dynamics of the deformations studied during mechanical tests are not sufficiently accounted for when comparing results, for instance. An additional problem comes from the fact that tissue properties are usually derived from analyses performed only at one scale (macro, micro or nanoscale), although results may differ from one report to another, and also from one scale to another. In the case of model, artificial systems, such as soft porous hydrogels, these differences have been reported to arise from experimental manipulations at small length scales and misinterpretations in the models, because the contact area or surface interactions between the tip of the interrogation probe and the sample surface are underestimated. It was shown, for instance, that the true mechanical properties of soft polyacrylamide hydrogels (poroelasticity and viscoelasticity) can be properly accounted for using indentation at small or large scales (indentation depth and tip diameter) by using indentation-relaxation tests and adjusting the duration of the experiment [33].

In this work, we propose a relatively simple method to characterize the time-dependent mechanical properties of biologically relevant materials based on a rapid and localized indentation-relaxation test using a microindenter. We found that when performed under the right conditions at a correct indentation depth and velocity, a relaxation test provides precise and robust information about the material being tested. Because gels' dissipative properties are critical in mechanobiology as recently shown [20], the relaxation tests also provide more complete information than microindentation about the mechanics of soft gels as perceived by biological cells. This also simplifies the characterization of dissipative soft materials by employing a single force-time test to define the material's behavior in a broad frequency domain without the need for tedious and complex analysis demanding dynamic tests. Finally, we compared our relaxation-based results with those obtained from microindentation. In addition to providing useful supplementary information on the Supplementary Materials under test, we found that the elastic modulus of soft poroelastic hydrogels measured by microindentation shows a positive correlation with the long $E(t = \infty)$ and instantaneous $E(t = 0)$ relaxation modulus and with the storage modulus evaluated at frequencies lower than 1 Hz. Such a relatively simple experiment can be carried out readily at either the beginning or the end of a biological assay and, from it, one

can gather important mechanical characteristic data and potentially verify the absence of bias in obtaining mechanical properties of the substrate. This also provides information in both the time and frequency behavior, within ranges that are relevant in mechanobiology [4]. The method is also much more practical and immediate than performing local oscillating indentations or shear stresses. Finally, data processing is fast and transparent and can be easily adapted to serial measurements (a link to our code is provided at the end of this manuscript).

2. Materials and Methods

2.1. Polyacrylamide (PAM) Hydrogels Preparation

Elastic polyacrylamide (PAM) hydrogels were fabricated as reported by Tse and Engler [5]. Briefly, 4% acrylamide and 2% bis-acrylamide stocks [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] were mixed in deionized water (ddH₂O) and degassed in a desiccator for at least 20 min to fabricate soft PAM hydrogels of *expected* elastic moduli of 1.10 ± 0.34 and 4.47 ± 1.19 kPa [5]. Then, mixtures were polymerized by adding 0.01% (*w/v*) of ammonium persulfate (APS) and 0.001% (*v/v*) of Tetramethylethylenediamine (TEMED). To achieve a thickness of ~ 233 μm , 75 μL of the solution were deposited onto 20 mm round glass coverslips which were treated previously with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES)/glutaraldehyde following [34]; the polymerization reaction was carried out during 20 min at room temperature. Polymerized hydrogels were rinsed with ddH₂O once and immersed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 1 \times at 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight to swell and equilibrate.

Additionally, viscoelastic polyacrylamide hydrogels were also fabricated as reported by Charrier et. al. [4]. First, linear polyacrylamide was obtained by polymerization, from a prepared solution of 5% acrylamide plus 0.025% of APS and 0.05% of TEMED in ddH₂O. The solution was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h to ensure a complete polymerization. Then, mixtures of 4% acrylamide and 2% bis-acrylamide stocks were prepared to fabricate soft viscoelastic PAM hydrogels of *expected* dynamic modulus of $G' = 1.6$ kPa and $G'' = 200$ Pa respectively, in ddH₂O [4]. TEMED was added at the acrylamide/bis-acrylamide and linear polyacrylamide mixture and APS was added just before the deposition; mixtures were incubated for 20 min at room temperature. Once polymerized, hydrogels were rinsed with ddH₂O and immersed in DPBS 1X at 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight to swell and equilibrate. It is possible to define the dynamic moduli that will be calculated here by considering that the relation $E = (1 + 2\nu)G^*$ is true for soft PAM hydrogels [35], with $G^* = \frac{G' + G''}{2}$ and a Poisson ratio of $\nu = 0.457$ [36]. Here, the storage and loss shear moduli that were prepared, therefore, should lead to an expected Young's modulus of the viscoelastic PAM hydrogels of $E = 1.723$ kPa. These gels will be called "soft V-PAM" in the following sections.

2.2. Poly-Dimethylsiloxane (PDMS) Preparation

For comparison with a less porous elastic material commonly used in mechanobiology, the common Sylgard 184 commercial form of poly-dimethylsiloxane (PDMS) was used (Dow Corning). Two different proportions of prepolymer:curing agent were employed, namely 10:1 and 15:1 *w/w* respectively to obtain two different expected elastic moduli of ~ 1.3 MPa and ~ 0.9 MPa, respectively [37]. After mixing the two agents, the mixture was poured on glass slides, degassed and cured at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h in a convection oven.

2.3. Mechanobiology Test with Fibroblast Culture

Immortalized human fibroblast, namely the BJ cell line obtained from Alejandro Cabrera-Wrooman from the Instituto Nacional de Rehabilitación in Mexico, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics penicillin-streptomycin (from Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO₂; 5×10^5 cells were seeded on PAM hydrogel (HG) conjugated with [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] rat tail collagen type I (from Corning Inc, Corning, NY, USA), as described in [38] and after 48 h of culture were fixed with 4%

paraformaldehyde in DPBS at 37 °C for 15 min. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 10% horse serum. For immunostaining, samples were incubated with a monoclonal antibody against Yes-associated protein (YAP) at a dilution of 1:200 (sc-101199, from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After that, Alexa594-coupled secondary antibody was used for immunodetection (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Actin filaments and nuclei were detected by Alexa488-coupled phalloidin and 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining (from Molecular probes, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), respectively. Samples were mounted with Mowiol over a rectangular coverslip following [39]. Samples were visualized with an epifluorescence microscope Eclipse Ci-L coupled to a D750 FX digital SLR camera (from Nikon, Tokyo, Japan). Images were captured by using a Plan Fluor 40× objective. The images were quantified, edited and merged by using the open source image processing package Fiji. The cell spreading was measured as the area detected by phalloidin (actin filaments) in isolated cells only. Cell density was measured by counting the number of nuclei (DAPI) covering an area of 547.95 μm \times 365.3 μm . Finally, localization of nuclear YAP protein was calculated by measuring fluorescence intensity, using the corrected total cell fluorescence [CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell \times Mean fluorescence of background readings)] [40] in the area merged by DAPI.

2.4. Microindentation and Relaxation Tests

Microindentation tests were performed using a commercial microindenter setup, namely the FT-MTA03 Micromechanical Testing and Assembly System (FemtoTools AG, Zürich, Switzerland). The force vs. displacement data were obtained with a FT-S200 tip (spherical tip with a diameter of 50 μm) with a measurement range of ± 200 μN and a maximum resolution of 0.0005 μN (at a low sampling rate of 10 Hz). Measurements were performed with indentation velocities ranging in the 0–100 $\mu\text{m}/\text{s}$, with a sampling frequency of 100 Hz and a 0.2 μm indentation step. Because soft gels were measured, a force limit of 171 μN was set in the experiments.

Relaxation tests were also performed using the same system, however, in this case, the same probe tip was programmed to stop its vertical course and remain static at a fixed indentation depth for the whole duration of the force measurement (fixed strain measurements). The tests thus consisted of an indentation phase at a predetermined speed (in the range of 10–200 $\mu\text{m}/\text{s}$) down to a position where the force sensor detected a predetermined, user-defined force value (in the range of 2–50 μN). The duration of the measurement (10–600 s) and the frequency of the acquisition of data (1, 10, 100 and 300 Hz) being adjustable parameters which play on the time resolution of our generalized Maxwell model (GMM) spectrum, they were defined accordingly for each sample.

2.5. Force Curves Processing

After the tests were performed, collected experimental data were obtained in the form of files containing force and displacement vs. time, that may be easily manipulated and plotted. Those files were then processed using custom-made programs in Python 3.x (Google CoLab, Mountain View, CA, USA) designed to compute the elastic modulus (microindentation tests) as well as the more detailed constitutive mechanical properties (relaxation tests) of the materials under test. From the system, data of force vs. time (FT) and displacement vs. time (DT) could be acquired and plotted to verify the characterization while measuring. All obtained data were then saved and processed to obtain force vs. displacement (FD) curves as well. Before the fitting process, a pre-processing step was implemented to filter and re-sample the data; this represents a critical step for the noisy data typically obtained for very hard materials. Indeed, we observed that the tip tends to present recoiling effects when stopping suddenly or encountering a different local stiffness, which is what happens when the probing tip meets the surface of the sample and just before a relaxation phase begins, respectively. Therefore, the removal of this noise (if present) is needed for finding, with a higher precision, both the tip-surface contact point and the

starting point of the relaxation phase, and in some cases, further removal of intrinsic noise during the relaxation phase, are also prerequisites for the model to be able to robustly fit the data. In these cases, filtering was accomplished using a Gaussian filter on the force data where the user has the option to manipulate the width of the Gaussian kernel.

2.5.1. Determination of the Contact Point

It is widely reported that even very small errors in the selection of the contact point may lead to great changes in the resulting elastic modulus, resulting in apparently stiffer materials [41]. In order to process FD and FT curves, we took a great care in identifying the contact point is the first critical part, as it enables the precise determination of the indentation depth, which is mandatory to calculate the mechanical properties of the material under test (see Appendix A and in particular Figure A1).

2.5.2. Indentation Data Analysis

To fit experimental data obtained from mechanical characterization of materials, the following procedure was used, based on 3 different models typically employed in indentation of soft materials: Hertz model, JKR (Johnson, Kendall and Roberts) and DMT (Derjaguin, Muller, and Toporov) models [14]. Each model has a particular set of hypotheses to be valid and is indeed only appropriate within specific conditions of adhesion between the tip and the indented surface, since the adhesion forces originating at the tip–substrate interface and caused by surface tension or non-specific interactions must be considered in the fitting model for a correct calculation of the material’s mechanical properties [42]. As such, JKR and DMT models are approximations used to describe adhesive contacts during indentation: JKR is useful for contacts on compliant materials with a high surface energy and large contact radius [43] while DMT is employed for contacts on stiff materials with low surface energy and small contact radius [14]. The Tabor parameter μ defined in Equation (1) below [44] serves to discriminate which model is the appropriate one to use: if $\mu < 0.1$ then the DMT model is used but if $\mu > 5$ the JKR model is more correct [45].

$$\mu = (R\Delta\gamma^2/E_r^2z_0^3)^{1/3} \quad (1)$$

To determine μ , the tip radius R , the adhesion work $\Delta\gamma$, the reduced modulus E_r and the separation distance at equilibrium z_0 (defined in [46] as the range of attraction of adhesive forces, close to atomic distance and ranging in 0.1–0.3 nm) must be determined [42,47]. Here, we used $z_0 = 0.3$ nm [48] and $\Delta\gamma$ was determined using the magnitude of the adhesion force F_{adh} in the retraction section of the curve of Figure 2D in the following Equation (2):

$$\Delta\gamma = -2F_{adh}/3\pi R \quad (2)$$

Finally, the reduced modulus E_r can be calculated from Equation (3):

$$E_r = E/(1 - \nu^2) \quad (3)$$

where ν is the Poisson ratio, which for acrylamide has been measured to be 0.457, close to 0.5 [36], and E is the Young’s modulus obtained from a Hertz model fitting applied to the sample measured in the attraction-free detergent solution (Figure A3A). The data analysis was performed using Wolfram Mathematica 12.1 (Wolfram Research, Oxfordshire, UK).

2.5.3. Relaxation Data Analysis

For relaxation tests, the contact point also needed to be precisely and objectively determined to set the relaxation start (see Appendix A). Then, the maximum force value F_{max} was detected to extract its associated time t_{Fmax} and displacement d_{Fmax} values, which in turn allowed us to determine the indentation depth δ as $d_{Fmax} - d_c$ where d_c is the contact

distance, as defined by the microindenter. Then, the GMM was used to determine the relaxation modulus $E(t)$ as follows [49], Equation (4):

$$E(t) = k_{\infty} + \sum_1^N k_i \text{Exp}(-t/\tau_i) \tag{4}$$

where k_{∞} is the long-term stiffness, τ_i is the i -th relaxation time defined as $\tau_i = \eta_i/k_i$ where η_i and k_i are the viscosity and stiffness associated to the time τ_i as represented in Figure 1.

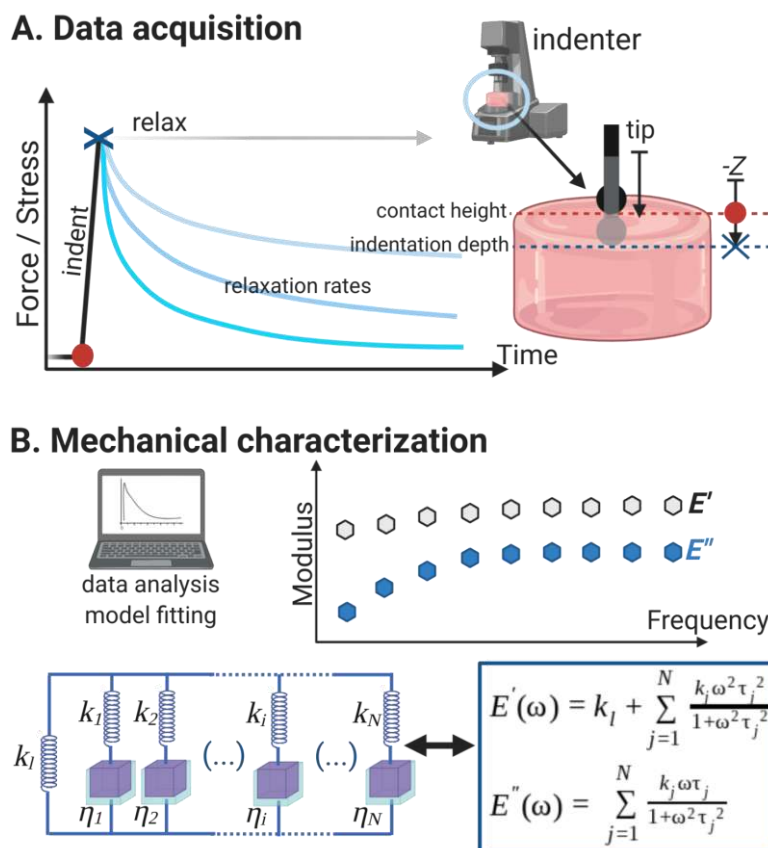


Figure 1. Diagram (not to scale) of the method employed here to study with great precision the mechanical properties and dynamic behavior of polyacrylamide (PAM) hydrogels used in mechanobiology assays. (A) Relaxation test performed with a microindenter; it collects all the information necessary to analyze the hydrogels mechanically. The bead is typically 50 μm in diameter and the gel $\sim 200 \mu\text{m}$ thick. (B) The data collected from the relaxation test is adjusted using a generalized Maxwell model (GMM) with the appropriate relaxation times τ_i that then allows to obtain the corresponding k_i and η_i . The long term stiffness k_l (or k_{∞}) is also determined from the model fitting. Finally, the dynamic storage (E') and loss (E'') moduli that describe the soft material were calculated, assuming a linear viscoelastic behavior. This complete characterization is more accurate than a microindentation and calculation of the elastic (Young's) modulus.

Since the experimental microindenter used in this work measured force instead of stiffness (force per unit area), a form factor was used to transform the obtained parameters to correct for dimensional units. To define this conversion factor, we assumed, following the mode of control set for the microindenter, that the temporal dependence of the relaxation curve was defined entirely by the $k(t)$ of the sample and not by the indentation depth δ , that is $F(t) = k(t)\delta$, where $F(t)$ is the force measured by the microindenter. The probing tip indents a surface area and to recover E from k , a form factor r that depends on the surface-

tip geometry and the Poisson ratio of the material under test was defined, following [50]. We have $k(t) = r E(t)$ with r defined as follows in Equation (5):

$$r = \frac{4\pi a}{7(1+\nu)(1-\nu)} \quad (5)$$

where a is the radius of contact defined by $a = \sqrt{R\delta}$, R is the tip radius and ν the Poisson ratio.

In this particular step, the code that was developed here for the GMM allows the user to define an appropriate number of Maxwell elements (or arms, as depicted in Figure 1B) to be used in the fitting. Once the family of such parameters is defined, it is necessary to scale them using the correct form factor determined above. The plotting of the normalized experimental data together with the obtained GMM fit curve enabled us to verify the accuracy visually but for a less objective decision on the correctness of the fitting, residuals were also calculated (see Appendix B).

From the resulting τ_i and k_i that were calculated from the GMM fitting, it is possible to obtain a discrete relaxation spectrum associated with the GMM that defines the mechanics of the material. The $H(\tau)$ spectrum was constructed for visualization by Dirac delta functions $\delta(t - \tau_i)$ for each relaxation time τ_i with an amplitude k_i/k_{max} normalized with regards to the highest stiffness k_{max} . This allowed us to compare the relaxation times and dynamic behaviors for different conditions and samples.

Finally, by considering that the PAM hydrogels may present a linear viscoelastic behavior during the relaxation tests, it was possible to predict the dynamic moduli of the material over a range of frequencies. The storage modulus $E'(\omega)$ and the loss modulus $E''(\omega)$ were calculated from the τ_i and k_i values obtained above, according to Equations (6) and (7) below [49]:

$$E' = k_\infty + \sum_{i=1}^N (k_i \tau_i^2 \omega^2) / (1 + \tau_i^2 \omega^2) \quad (6)$$

$$E'' = \sum_{i=1}^N (k_i \tau_i \omega) / (1 + \tau_i^2 \omega^2) \quad (7)$$

Thanks to the estimation of a criterion of cross validation (see Appendix B), it was found that $N = 3$ is sufficient to describe the mechanical properties of soft PAM hydrogels using the GMM, and it allows overfitting of the data to be avoided.

2.6. Statistical Analysis

For all the data presented here in every condition, at least 2 samples were characterized independently. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are consistently presented as mean \pm standard deviation. For comparison between different conditions, a variance analysis was achieved (one way analysis of variance, ANOVA) with a Tukey correction for multiple comparisons. Correlation between conditions was quantified using a Pearson correlation.

3. Results

The technique (schematically presented in Figure 1A), and the data it produces, enable the determination of the constitutive elements of a GMM where a long-range spring k_l is combined in parallel with a consecutive association of N parallel dashpots and springs (depicted as $(\eta_i; k_i)$ in Figure 1B). The GMM is advantageous over the simpler viscoelastic linear models, such as the standard linear solid (SLS) model since it considers the non-homogeneous disorder at microscale: the material relaxation occurs according to a time distribution rather than at a single time. This is a definition that falls closer to the mechanics of a substrate as perceived by biological cells, which appear to be able to maximize their spreading if their dissipative timescales match that of the material [20]. Moreover, relaxation tests have been proven to allow the separate quantification of the viscous and poroelastic contributions occurring in soft hydrogels used in mechanobiology [51]. To

validate our relaxation test method, we have tested the mechanical properties of soft polyacrylamide (PAM) hydrogels and compared the results with classical indentation tests, either static or using oscillations over a frequency range, as classically used in material characterization (see Appendix C, Figure A8).

3.1. Force Curves and Correction for Tip Displacement

When analyzing the mechanical data obtained from the microindentation characterization of a soft sample, it is necessary to take several aspects influencing the outcome of the analysis into account. The correct determination of the contact point, the tip displacement and the force of adhesion between the tip and the sample are important parameters to consider. Figure 2 shows representative force curves of typical indentation-relaxation tests carried out on soft hydrogels.

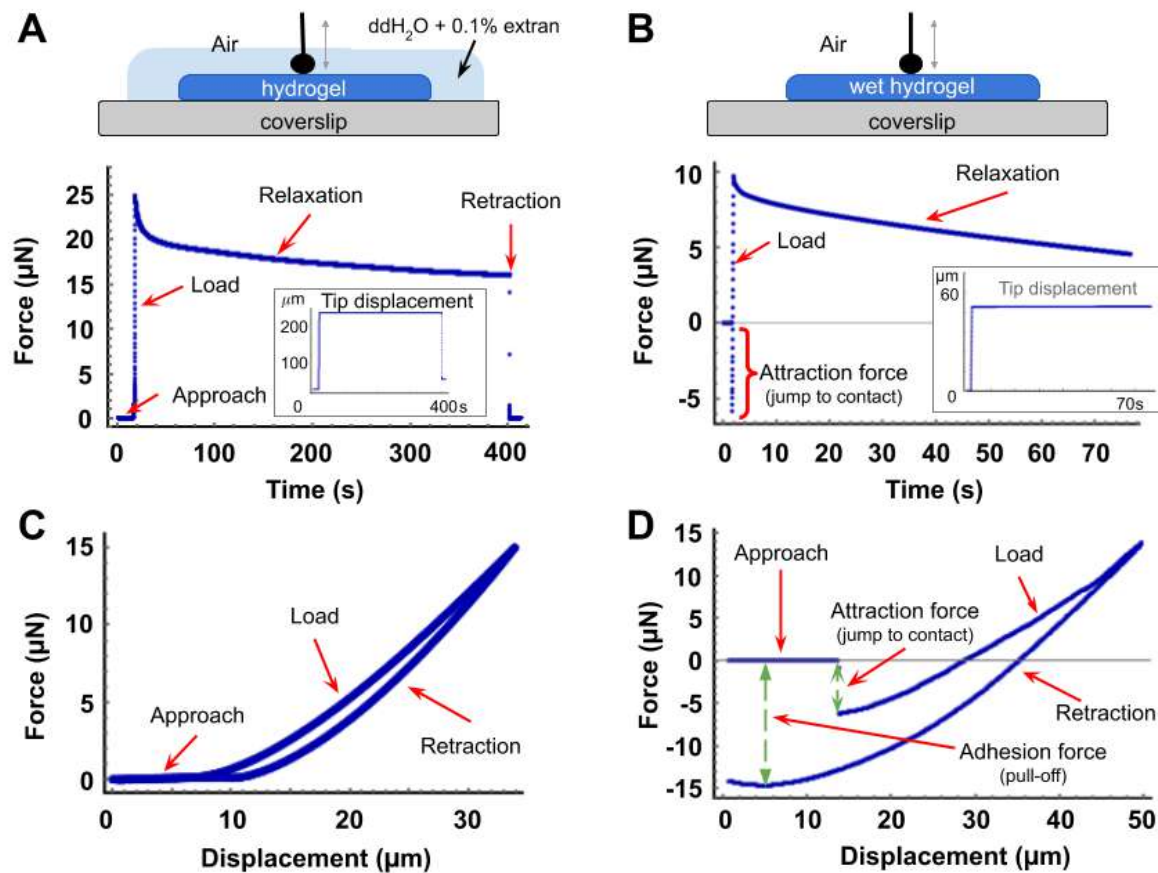


Figure 2. Force curves of microindentation-relaxation assays. Graphs of (A,B) are force-time curves representative of the relaxation of a soft polyacrylamide hydrogel using a spherical tip with a 25 μm radius. Red arrows signal the different sections of the curve and the embedded insets show the constant position of the tip, equivalent to a constant indentation of the sample. (A): relaxation curve obtained from a sample measured when submerged in a detergent solution of ddH₂O and 0.1% Extran. (B): relaxation curve from a measurement in air of a similar hydrogel sample soaked with water (ddH₂O). Graphs of (C,D) are force-displacement curves, representative of the microindentation-retraction cycle of a soft hydrogel using the same tip. Red arrows signal the different sections of the curve and the magnitude of the attraction between the tip and the sample. Hysteresis can be observed between load and retraction in both cases. (C,D) represent the same measurement conditions as in panels (A,B), respectively.

One of the main problems occurring in microindentation is the electrostatic or capillary attraction of the tip by the sample surface, leading to an intermediary complex behaviour between the approach and the contact/loading phase. A reduced adhesion is a prerequisite for mechanical models to be simple and reliable, with as few parameters as possible to input or extract. In order to show how experimental conditions affected our characterization

results, two different conditions were tested for the same hydrogel: one hydrogel sample was measured while submerged in a detergent solution of ddH₂O + 0.1% Extran while an identical soaked sample was measured in air (Figure 2). The role of the detergent solution (Figure 2A,C) was to reduce the surface tension of the liquid and thus avoid the tip–hydrogel attraction that was observed in all the samples moistened with only ddH₂O water (Figure 2B,D).

Figure 2A,B show force-time (FT) curves where different sections are visible. The first corresponds to the approaching of the tip prior to the physical contact. It is immediately followed by the loading phase (where the force increases to a rate that depends on the material under test), up until the displacement of the tip being stopped by the user at a given force or indentation depth. Then, the relaxation stage begins until the tip is displaced again in the opposite direction, at the same speed, for the retraction section (during which the force decreases at a rate that depends on the material). Therefore, when a constant deformation needs to be imposed on the material, the vertical z position of the tip is maintained for as long as the relaxation needs to be evaluated (see embedded inset plots in Figure 2A,B).

Since the indenting tip is placed manually in the system, it is necessary to rule out or account for any unwanted displacement of the tip mechanism that would impact the measurement, and hence the analysis. To address this, the indentation routine was run at least 20 times and at different indentation speeds (1, 50 and 100 $\mu\text{m/s}$) on a very stiff glass slide. Since this material presents a stiffness of ~ 70 GPa [52], it can be considered that within the force sensitivity range of the tip used in the experiments (0–200 μN), there is no indentation of the substrate; hence any measured displacement would correspond to a displacement of the tip mechanism and not of the glass being indented. Figure A2 from Appendix A shows a FD curve obtained from the indentation of a glass slide (panel A) and its corresponding linear fit (panel B) which resulted in a slope of 76.23 ± 0.18 $\mu\text{N}/\mu\text{m}$ ($R^2 = 0.999$). Therefore, the difference between the indentation curve of the samples and the indentation curve of the glass is the real indentation depth (as shown in panel C).

3.2. Influence of Velocity and Depth of Indentation

Once the point of contact has been precisely determined, the influence of experimental conditions like the velocity v and depth d of indentation are important. Figure 3 summarizes the results obtained when measuring the elastic modulus of a soft PAM hydrogel with an expected value of $E = 4.47 \pm 1.19$ kPa. Different indentation depths ($\sim 1, 3, 7, 13$ and 29 μm) and velocities ($\sim 100, 80, 50, 10$ and 1 $\mu\text{m/s}$) were set during the experiments. It is clearly visible that for all velocities the calculated E values decreased with an incrementing indentation depth and rapidly plateaued at a fixed value, which appears to be independent of the depth. An exponential decay fitted very well to the data for each velocity, as shown in Figure 3A–C.

This behavior has already been reported in [53], for AFM indentations of soft agarose gels and lung cells (of similar stiffnesses). In that work, the spherical tips of the pyramidal probes had a 5 μm diameter and the plateau appeared at approximately 200 – 400 nm indentation inside the materials. Interestingly, the dependence with the indentation depth is similar in both our results and Rico et al. with AFM [53]; apparently for hydrogels the plateau appears consistently at a depth of $\sim 10\%$ of the tip diameter. This seems to indicate an estimate of the depth at which the material behaves as bulky, homogeneous and semi-infinite, which is a strong hypothesis of the models used to determine the Young's modulus. This depth-dependence of the apparent elastic modulus seen in soft materials like biological cells and gels is not new, yet hardly mentioned in characterization reports. It is very important to determine, since it indicates a minimal (threshold) indentation depth-dependent on the size and geometry of the interrogator tip and the behavior has been recently attributed to surface tension [54]. Remarkably, in our case, the value of the plateau appeared to be also dependent on the velocity of indentation ($\sim 20\%$ relative variation for velocity variations between 2 and $5\times$). As seen in Figure 3 panels A–C and

presented in the summary of Figure 3D, the deeper and the slower the indentation of the soft material, the lower its apparent elastic modulus, which is, in a way, an index of its viscoelastic behaviour. To try and discriminate the impact of each parameter in these experiments, a mesh separating the Voronoi regions is presented. It was obtained with Wolfram Mathematica zero order interpolation (Wolfram Research, Oxfordshire, UK), yielding a collection of flat regions, with steps at each data point), each region of the mesh representing the influence of each experimental pair $E = E(v, d)$.

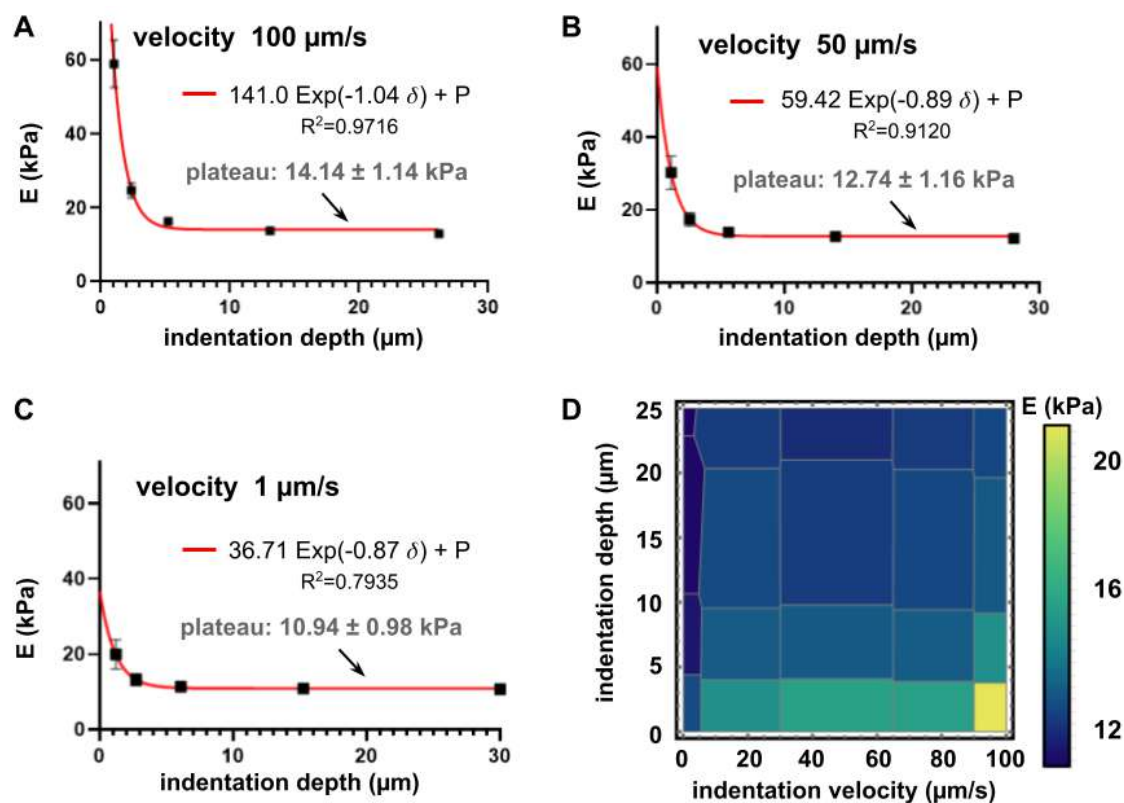


Figure 3. Influence of velocity and depth of indentation on the computed Young's modulus of a 4 kPa PAM hydrogel, measured in a detergent solution of ddH₂O + 0.1% extran. Panels (A)–(C) present the results for velocities of 1, 50 and 100 $\mu\text{m/s}$ respectively. The values presented correspond to calculations using a Hertz model fitting. By increasing the indentation depth, the fitted modulus decreases down to a plateau level of $14.14 \pm 1.14 \text{ kPa}$, $12.74 \pm 1.74 \text{ kPa}$ and $10.94 \pm 0.98 \text{ kPa}$, respectively. It was possible to fit those values to exponential decays as a function of the indentation depth, shown in the legend of each graph. In addition to the velocities shown in panels A–C, velocities of 80 and 10 $\mu\text{m/s}$ were tested and shown in the density diagram of panel (D) This graph is divided into different Voronoi regions (grey mesh) to visually present the influence of velocity and indentation depth. In panels A–C, error bars represent the mean standard deviation and when not visible, they are smaller than the data point visible dimension.

Interestingly, our data demonstrate that beyond the minimal threshold indentation depth of approximately 10% (5 μm with a 50 μm -diameter sphere), the computed elastic modulus E only depends on the velocity of indentation. This suggests that the stress supported by the hydrogels is strain rate-dependent and this is an intrinsic characteristic of viscoelastic materials. The Hertz model that was used here does not suppose any condition on the velocity of indentation and here we used the average of all plateau values in Equation (3) to derive the reduced modulus and obtain the value of the Tabor parameter. For 4 kPa PAM hydrogels measured while only soaked in air (the condition in Figure 2D) we found a value of the Tabor coefficient of $\mu = 31.36 \pm 1.10 \times 10^3$ suggesting the use of a JKR model in order to fit the experimental data. However, the JKR shown in Figure A3 panel B clearly shows that this is far from being perfect to accurately fit the data.

All of this suggests that the mechanical characterization of soft poroelastic hydrogels via microindentation represents a real challenge and that the apparent elastic modulus may still be an incorrect estimator of relative mechanical properties. The hysteresis observed in Figure 2 between the loading and retraction phase (which is a signature of energy dissipation during indentation), as well as the indentation depth-dependency of the value of the elastic modulus clearly indicate that several parameters affect the FD curves, hence the interpretation of the Young's modulus with the microindentation results. The models may not account for the dissipative phenomena happening in the materials that could be poroelastic and are present in the measurements [55], demanding a more complete characterization method. The relaxation tests described below aimed at improving the easy and reliable characterization in this frame.

3.3. Relaxation Tests to Characterize PAM Mechanical Properties

To study the possible viscous origin of the hysteresis found in indentation of soft PAM hydrogels, two other types of hydrogel with distinct, more complex, properties were tested and compared. First, a dissipative viscoelastic PAM hydrogel was fabricated, following [4], see Section 2.1. This V-PAM material is interesting because it offers a crosslinked network PAM with similar elastic properties, but interpenetrated with independent and non-crosslinked linear chains of acrylamide inside the PAM network that are free to move and permit a viscous dissipation. Then, a softer (1 kPa) fully elastic PAM hydrogel was also fabricated, offering a larger pore size in its network than the 4 kPa PAM hydrogels [56]. From relaxation test results, the GMM model can be used to describe the mechanical behavior of soft materials and calculate the storage and loss modulus. To avoid adhesion forces between the tip and the substrate, all samples were characterized while immersed in the attraction-free detergent solution.

Figure 4A presents the normalized FT curves showing the relaxation tests performed during 60 s, for the 3 different PAM hydrogels. The system was forced to stop indenting at a predetermined maximum force F_{max} before relaxation started. We registered the indentation depths for all measurements and they were very similar and varying accordingly with the softest being indented the most: $23.94 \pm 1.17 \mu\text{m}$ for 4 kPa PAM hydrogels, $25.12 \pm 3.85 \mu\text{m}$ for the 1 kPa PAM hydrogels and $28.89 \pm 3.09 \mu\text{m}$ for the viscoelastic gels. As expected, the different soft materials presented distinct temporal relaxation responses and the two purely elastic PAM hydrogels relaxed more rapidly than the viscoelastic one. Also, the stiffest (4 kPa PAM) elastic gel stopped relaxing after $t = 50$ sec and settled to a fixed plateau while the other two materials kept relaxing further, although at different rates. The dissipation of force by an elastic material at a constant strain may seem abnormal, but it has been explained by the poroelastic nature of PAM hydrogels: they are made of a porous elastic matrix interpenetrated by an interstitial fluid that can flow and escape, similar to a sponge [33,51,55]. This behavior may explain the hysteresis found in loading–retracting curves of Figure 2 and the difference between the relaxation rates of the two elastic gels thus lies in their porosity difference [56].

The temporal behavior of such complex materials as PAM hydrogels offers a better way to describe their mechanics, differentiating them appropriately, unlike the apparent elastic modulus often simply called “stiffness” that makes no difference between 1 kPa and 5 V-PAM gels (see Table 1). The 3rd-order GMM model employed here to describe the relaxation results of Figure 4A unveiled temporal clues behind dissipation in PAM hydrogels. First, it was an excellent fit to the data in the full range of the experimental times, as seen in the figure and confirmed with a cross validation calculation of the residuals (see Appendix B, Figure A5 for a representative FT curve with the residuals). Then, without any consideration for the possible different origins behind the relaxation of soft materials (poroelasticity/liquid phase or network viscoelasticity), the technique proposed here seems to enable a precise determination of the intrinsic and characteristic relaxation times of the materials under test (Figure 4B). Again, the obtained spectra seem to precisely assess the nature of each material very well. Interestingly, the relaxation times accounting for porosity

could be those falling in 3–6 s (as shown in Appendix A Figure A4, panel A) because this relaxation time is absent from measurements of soaked samples in air, in which there is no possibility for the medium to be expelled from the structure under pressure. There, the slightly higher relaxation times of 1 kPa and soft V-PAM gels could then be explained by a higher porosity, thus a greater medium outtake effect. In the particular case of the V-PAM hydrogel which is viscous by design, the origin of the relaxation also comes from the presence of linear acrylamide chains delaying or modifying the deformation of the network thus dissipating the energy of its elastic network [4]. The higher relaxation times of the softer and V-PAM gels cause a slower relaxation as observed in Figure 4A. Interestingly, the 1 kPa and soft V-PAM hydrogels also presented very similar elastic behaviors, explained by their similar apparent Young's modulus. Although only a representative result is shown in Figure 4, a distribution of all the measured curves is presented in Appendix A, Figure A4, panel B. A good consistency is found for the relaxation times, with a broader distribution for the softest elastic gels; however, it is probably caused by a lowest reproducibility of such soft gels or by variabilities caused by swelling, impacting more strongly the softest gels than the others [57].

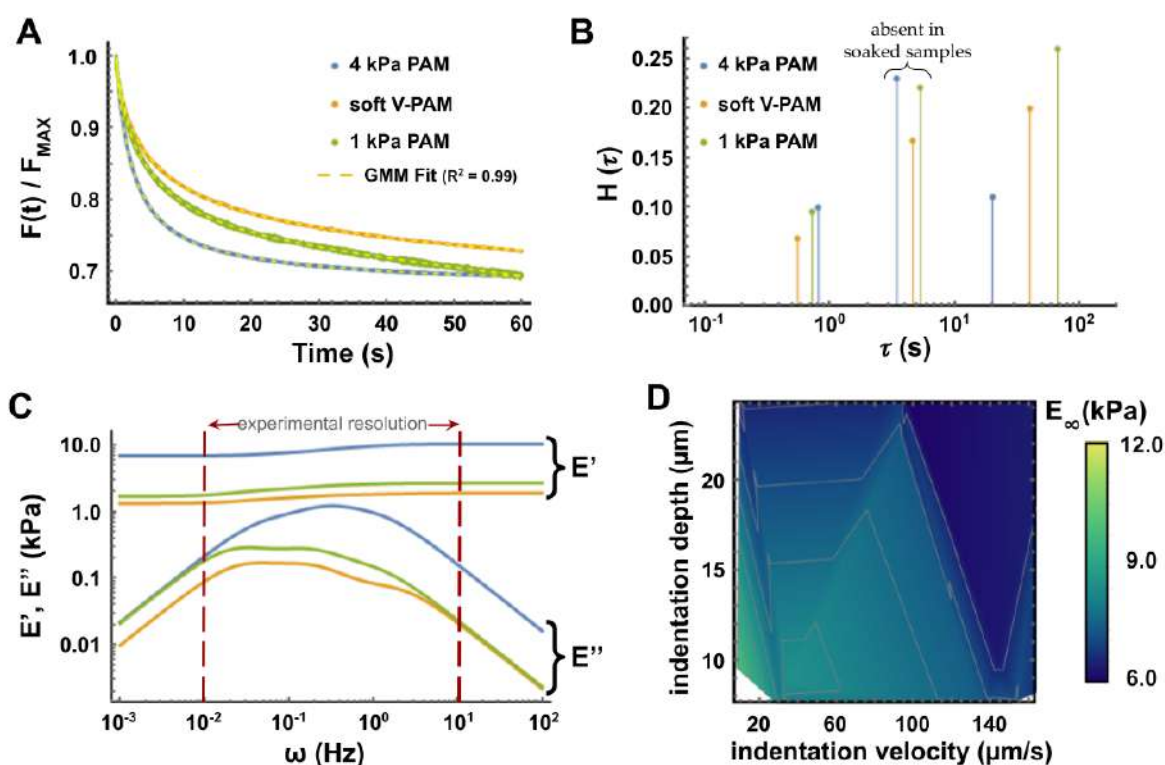


Figure 4. Mechanical characterization of 3 types of PAM hydrogels: 1 kPa elastic PAM, 4 kPa elastic PAM and 4 kPa viscoelastic PAM. (A) Comparison of force-time (FT) curves (60 s relaxation indentation at a velocity of $\sim 100 \mu\text{m/s}$ with a frequency of 100 Hz) with their respective 3rd-order GMM fitting. The curves were normalized to F_{MAX} . (B) Relaxation spectrum obtained from the 3rd-order GMM fitting with Dirac deltas. Distributions of 11 experiments are presented in Appendix A, Figure A4B. (C) From the 3rd-order GMM fittings, the dynamic moduli $E'(\omega)$ and $E''(\omega)$ were calculated for each sample type. The experimental resolution is the range of frequencies corresponding to the actual measurement times (0–60 s at 100 Hz). (D) Influence of the indentation depth and velocity on the long-time stiffness E_{∞} for the 4 kPa PAM sample. For all graphs, 2 independent samples were measured on at least 5 different locations for each condition.

Figure 4C shows the dynamic moduli $E'(\omega)$ and $E''(\omega)$ calculated from the parameters derived from the 3rd-order GMM model with Equations (6) and (7). The experimental resolution represented in Figure 4C depicts the range of frequencies that are physically available, corresponding to actual timescales in which the measurements were achieved; it can be recalled that the characteristic times obtained with the GMM offer only a discrete

representation of the real spectrum (Figure 4B). The graph of Figure 4C thus confirms that the storage modulus of the three materials represents the actual elastic modulus that was expected from the literature from which we extracted the protocols used for the preparations made in this work (see the compilation of literature with experimental data in Table 1). The loss moduli are also represented and present differences between the three materials, with the V-PAM and 1 kPa elastic PAM being very similar to each other, in the range that is expected from the preparation protocol and reported by others [4]. It is known [55] that the characteristic poroelastic relaxation times of permeable gels are strongly dependent on the experimental conditions and especially the diffusivity. This dependence is in the order of $\sim \sqrt{\frac{R_{tip}\delta}{D}}$ where R_{tip} is the radius of the probe tip, δ is the indentation depth and D is the diffusivity of the gel (typically ranging in the 10^{-10} m²/s) [58]. It can be inferred from the data that the nature of each gel (different porosity and free volume) may explain the variations of the relaxation times found here. This also suggests that the viscosity of the medium will probably influence the mechanics of the gels bathed in it, as found in [59,60].

To conclude on the pertinence of our method for obtaining the appropriate frequency behavior of soft materials, we decided to re-analyze published data obtained by another group where both FT curves and discrete frequency results were available [61]. As shown in Appendix C Figure A8, an excellent consistency was found when plotting the extrapolated frequency behavior of the dynamic moduli computed from the FT curve and comparing it to the actual experimental frequency measurements that the authors obtained (in a large range of frequencies).

Finally, Figure 4D shows the influence of the velocity and depth of indentation on the long-term elastic modulus E_{∞} of the 4 kPa PAM sample. When compared with the same graph constructed in Figure 3D for data obtained from the Hertz model, it is clear that the variations are smaller for the GMM-derived modulus, around a value of 6 kPa (which has to be compared to the higher ~ 10 kPa results obtained by indentation and the Hertz model represents at least 50% less variation than that obtained with microindentation). Interestingly, for indentation velocities of ~ 140 $\mu\text{m/s}$ the calculated long-term stiffness E_{∞} is almost independent of the indentation depth. This is consistent with previously reported results showing that a higher indentation velocity is preferable, for such experiments [55].

3.4. Comparison between Microindentation and Relaxation Mechanical Tests

When the determination of Young's modulus of a material is required, for instance for quantifying the influence of substrate mechanics on cell spreading [62,63] or determining forces reliably using traction force microscopy measurements [64], our method also readily enables its determination from the relaxation data and GMM analysis. For that, we compared the calculated values of the elastic modulus obtained with conventional microindentation and with the relaxation tests. The results are shown in Figure 5A for the PAM hydrogels with an expected value of $E = 4$ kPa and in the two configurations of Figure 2 (submerged into a detergent solution and soaked). In the case of microindentation, the Hertz model was used in the attraction- and adhesion-free detergent condition (E_H) while the JKR was preferred for the soaked samples (E_{JKR}). For relaxation tests, two elastic moduli obtained from the relaxation data and 3rd-order GMM fitting are shown: the long-term elastic modulus E_{∞} and the storage elastic modulus at 1 Hz $E'(\omega = 1 \text{ Hz})$. A significant difference between the value of the elastic modulus was obtained with the Hertz model between the data of the microindentation performed in detergent and the results computed from relaxation tests. This may be explained by the fact that relaxation tests results are more robust when adhesion effects have to be taken into account. Indeed, Figure 5A shows that there is no significant difference between the instantaneous modulus calculated from measurements of 4 kPa PAM samples either immersed or soaked. Moreover, the use of the relaxation spectra obtained from the GMM fitting enabled a further analysis of differences between the two conditions that helped explain the impact of the indentation velocity as depicted in Figure 3D. Although the relaxation spectra of the 4 kPa PAM samples measured

in the two different conditions looked very similar, the samples characterized in detergent solution presented an additional relaxation time $\tau_i = 3.43 \pm 0.24$ s which is absent from the soaked samples measured in air (see Appendix A Figure A4A). The GMM viscosity associated with this relaxation time was calculated to be $\eta_i = 5.73 \pm 0.67$ kPa.s, a value very similar to what was reported for other soft hydrogels under compression [65,66], and could explain the increment of the apparent Young's modulus when indentation takes place at higher velocities. Indeed, we recall that the instantaneous modulus sums up all the moduli and it only appears in the immersed samples and not in the soaked ones, suggesting that the material viscosity (resistance to flow) may be playing a role in the excess found here. Therefore, when aiming at describing the intrinsic mechanical properties of a material under test, the long-term modulus E_∞ is clearly an appropriate characteristic property to use as it appears to be mostly independent of the measurement conditions and is almost not impacted by indentation depth for high indentation velocities (as seen in Figure 4D).

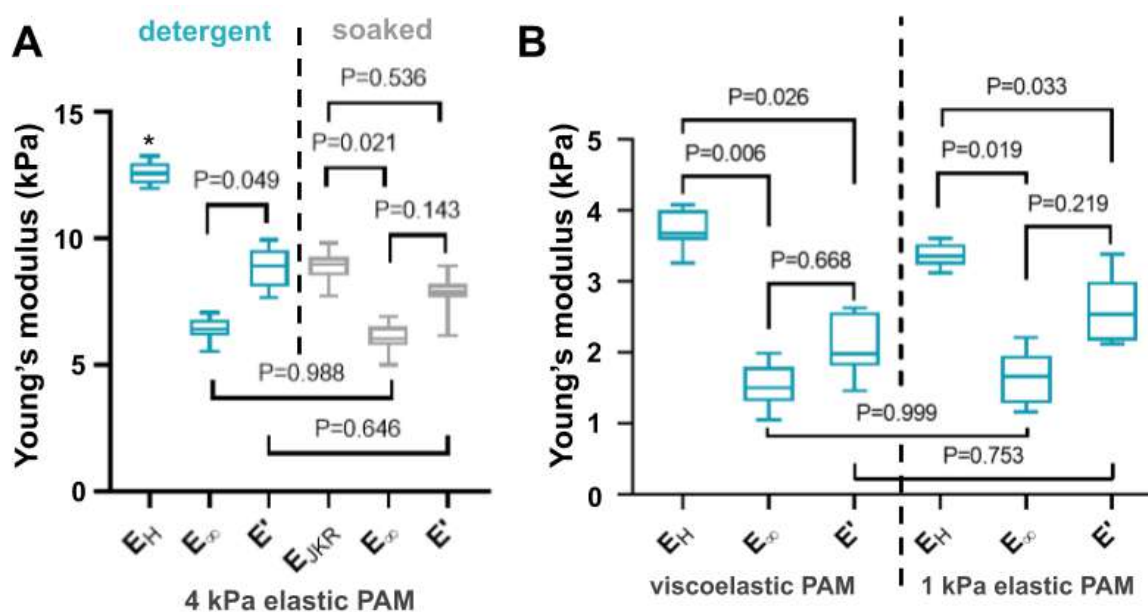


Figure 5. Comparison between the elastic modulus obtained from microindentation and the most relevant model for data fitting, and relaxation tests, using the GMM model. **(A)** Comparison between values calculated for hydrogels immersed in a detergent solution of ddH₂O + 0.1% Extran (cyan) and only soaked with ddH₂O and measured in air (grey). In the case of the microindentation test, the Hertz model was used to determine E_H in immersed samples while the JKR (Johnson, Kendall and Roberts) model was preferred to calculate E_{JKR} for soaked gels. In the case of relaxation tests, the 3rd order GMM model allowed the calculation of long-term elastic modulus E_∞ as well as the determination of $E'(\omega)$ and $E''(\omega)$ for a given frequency range delimited by 10^{-2} – 10^1 Hz. In this graph, $E'(\omega = 1$ Hz) is shown and noted E' . **(B)** Same comparison for the soft viscoelastic PAM and 1 kPa elastic PAM. Their apparent elastic moduli when submerged in detergent are very similar when using microindentation (see Table 1), but are much larger than expected (see text). Boxes are the interquartile range (Q1–Q3) and bars extend to the maximum and minimum values. All the experimental data are presented as scatter plots in the Appendix C Figure A9, for more details. A one-way analysis of variance (ANOVA) analysis with Tukey correction was employed for multiple comparisons. It was considered significant statistically with $p < 0.05$, * stands for $p < 0.01$.

Then, Figure 5B shows the comparison between microindentation and relaxation results for the viscoelastic PAM and the 1 kPa elastic PAM. It is clear that their apparent elastic moduli obtained from microindentation only are very similar (see also Table 1), but are 2 to 3 times larger than expected (1.72 kPa and 1.10 kPa respectively). Relaxation tests, however, provide lower values, much closer to the ones that were expected, as measured by AFM and reported in the literature (Table 1).

All the data obtained from microindentation and relaxation tests are summarized and presented in Table 1. This clearly shows that, in most cases, the Young's modulus obtained from microindentation (using either Hertz or JKR model depending on adhesion

levels observed during measurements) differs from the long-term modulus obtained from relaxation tests and GMM analysis. However, the latter appeared to be the closest to the expected values reported by many groups using AFM measurements. Relaxation tests were observed to be less affected by experimental conditions than microindentation and offered better results. Table 1 also presents the storage modulus E' evaluated at a frequency of 1 Hz using the GMM analysis. This value is particularly relevant for materials which are used to study the mechanosensing of biological cells, as explained in [20]. It also offers a better mode of comparison with the dynamic moduli obtained from rheometer characterizations. Also, it has been reported recently that the exact swelling state, which can be difficult to control, reproduce and quantify, plays a very important role in the mechanical properties of PAM hydrogels, especially the softest ones (below 9 kPa): the elastic modulus measured by AFM showed that after only 9h of swelling the elastic modulus of the PAM gels decreased substantially [57].

Table 1. Comparison of values of elastic moduli obtained for different methods, materials and conditions: E = calculated Young's modulus, E_∞ = long-term stiffness, E' = storage modulus evaluated at 1 Hz and E_{ref} = reported Young's modulus. Detergent and soaked are the conditions depicted in Figure 2 and dry is a condition for which the sample is not moistened and measured in air at room temperature. The JKR model was used to fit experimental data for soaked and dry samples, and the Hertz model was used for samples immersed detergent solution. All reported values are mean \pm standard deviation for each condition (two samples were characterized in at least 6 different locations).

		4kPa PAM (kPa)	4kPa PAM (kPa)	Soft V-PAM (kPa)	1kPa PAM (kPa)	Stiff PAM (kPa)	PDMS 10:1 (MPa)	PDMS 15:1 (MPa)
measurement conditions		soaked	detergent	detergent	detergent	soaked	dry	dry
reported values [reference]	E_{ref}	4.47 \pm 1.19 [5]	-	1.723 ¹ [22]	1.10 \pm 0.34 [5]	34.88 [5]	1.35–2.01 [67]	0.9–1.2 [37]
micro indentation	E	8.92 \pm 0.55	12.60 \pm 0.42	3.73 \pm 0.27	3.37 \pm 0.17	38.72 \pm 8.71	0.91 \pm 0.09	0.63 \pm 0.01
relaxation tests	E_∞	6.00 \pm 0.57	6.41 \pm 0.44	1.55 \pm 0.31	1.63 \pm 0.39	36.01 \pm 2.67	1.61 \pm 0.48	0.61 \pm 0.17
	E'	8.25 \pm 1.47	8.78 \pm 0.80	2.09 \pm 0.40	2.57 \pm 0.50	39.93 \pm 2.54	1.68 \pm 0.47	0.65 \pm 0.16

¹ expected E' , see Section 2.1.

Finally, we demonstrated the applicability of the relaxation tests and GMM analysis to stiffer PAM hydrogels and less porous elastomers. The last three columns of Table 1 show the results obtained for the characterization of 40 kPa PAM samples (expected Young's modulus according to [5]) and two types of MPa-range elastic PDMS slabs. No real difference was observed for these stiffer materials between the results obtained from microindentation and relaxation and the calculated values were in good accordance with the literature. It is thought that those materials are much less porous and thus less sensitive to the hysteresis phenomenon found in soft PAM hydrogels.

3.5. Relevance for Cellular Mechanobiology: Cell Response to PAM Hydrogels of Different Mechanical Properties

In order to demonstrate the relevance of this work for mechanobiology assays, a validation of the PAM hydrogels for cell culture was achieved. We chose immortalized human fibroblasts because they are known to respond strongly to very small changes in the substrate stiffness: they spread more largely on stiffer substrates, which is an easy readout of mechanosensing [68]. A very precise characterization of PAM hydrogels is thus required in this type of mechanobiology assays, within experimental conditions that are as close as possible to the cell culture conditions (immersed in medium) since the chosen substrates have very close rigidities. Moreover, the localization of YAP/TAZ (Yes-associated protein 1 and WW-domain-containing transcription regulator 1) markers and F-actin as well as the change of the size of the cell nuclei were used to visualize a clear difference in the cell mechanoresponse between the two materials. The description provided here only aims at validating the use of our materials in mechanobiology assays and underlying the potential of our precise and robust substrates characterization.

As can be seen from Figure 6, panels A and B, immortalized human fibroblasts presented differences in their behaviour after 48 h of culture on 1 kPa and 4 kPa elastic PAM gels. A first observation was that the cell spreading was significantly greater of the stiffer substrate (panel C). Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) are key effectors of actin polymerization and tensile forces status: the intracellular localization of YAP/TAZ is an important determinant in the regulation of their activity and transduction and it is known to depend on the apparent stiffness sensed by cells. Here, YAP/TAZ proteins showed a stronger nuclear localization (active) in the stiffer material, similar to what is usually reported [69], as shown in panel D (panels A and B, zoomed squares). In addition, the cell density shows a significant difference due to the stiffness of the substrate (panel E). It is also possible to observe that the size of the nuclei of the cells is also greater on the stiffer material and the morphology and size of F-actin fibers are apparently more elongated cells with larger F-actin stress fibers, on the stiffer substrate (panel A vs. panel B). In other experiments, BJ fibroblasts were much more extended with more abundant stress fibers on the 20 kPa PAM hydrogels and on glass, validating a gradual response of such cells on rigidity-tuned substrates (data not shown).

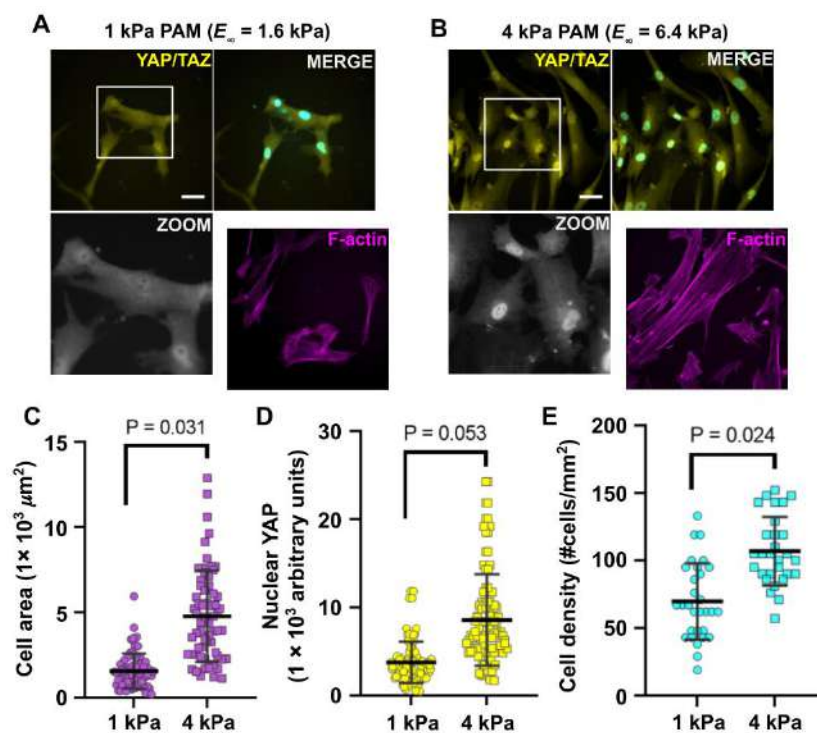


Figure 6. Mechanoresponse of human immortalized fibroblasts on elastic hydrogels with two different apparent stiffness. Human BJ fibroblasts were cultured for 48 h on 1 kPa (panel A) and 4 kPa (Panel B) polyacrylamide hydrogels functionalized with [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] commercial collagen type I. Subcellular localization of Yes-associated protein (YAP)/TAZ (WW-domain-containing transcription regulator) proteins (yellow) were analyzed by immunofluorescence and epifluorescence microscopy DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (cyan) and Alexa488-coupled phalloidin (magenta) were used to stain nuclei and actin filaments (F-actin), respectively. Nuclear localization of YAP/TAZ proteins was highlighted in the zoom squares (gray). (C) Cell spreading (cell area) was quantified Figure 1. kPa and 4 kPa substrates. (D) Quantification of nuclear localization of YAP/TAZ proteins in fibroblasts cultured on 1 and 4 kPa substrates. Fluorescence intensity was presented in arbitrary units derived from the corrected total cell fluorescence (CTCF), see methods. (E) Cell density of fibroblasts cultured on 1 and 4 kPa substrates for 48 h. Data shows that for cells cultured on the stiffer condition there are more cells adhered on the substrates per unit area. Data shown are representative of 3 independent experiments ($n = 3$). In order to prove statistical differences, an unpaired t-test with Welch's correction was performed. Bars presented in plots are mean \pm standard deviation. Scale bar = 50 μm .

The point here is that if only microindentation tests results were used to account for the materials stiffness, the two materials would be thought to be 3.4 kPa and 12.6 kPa PAM hydrogels, that is, having very different rigidities (more than 8 kPa apart). We now know, however, that the mechanical properties of the said gels are more complex and the relaxation tests suggest to consider long-term stiffnesses of $E_{\infty} = 1.6$ kPa and $E_{\infty} = 6.4$ kPa instead, less than a 5 kPa difference. This much smaller stiffness difference between the two gels indicates the large impact on cells of small variations of substrate rigidities, which may occur from one preparation to the other if no particular care is taken in preparing the samples and conserving most stringently the components of gel preparation. These results hence offer a better precision and resolution of the range of the mechanical properties of a material to which the cells respond.

4. Discussion

In this work, we have shown that simple, well controlled, relaxation tests are very useful to characterize soft materials like PAM hydrogels and describe their dynamic behavior in conditions close to those of cell culture. We developed a GMM model and its application to data to extract parameters that are relevant in mechanotransduction studies. We characterized this procedure by designing gels with precise elastic or viscoelastic properties, and obtained results in good agreement with what was expected from literature reports. Careful mechanical characterization tests were performed to compare the values of the actual moduli with the reported ones (see Section 2.1). Consistent values were repeatedly obtained from AFM indentation and microindentation in our laboratories (data not shown). However, slight experimental changes in conditions of preparation and storage, and even small differences in the identification of the contact point, may lead to discrepancies in the determination of the absolute Young's modulus in the softer gels. For this reason, the gels are called 1 kPa and 4 kPa in this report, using those values as indications only and for simplicity. However, it is important to recall here that the underlying ground of this work is the need to determine the actual mechanical properties of each sample in a rapid and simple manner. This is critical to correctly determine possible slight changes from sample to sample that can explain sometimes subtly different cell responses in mechanobiology. It is also interesting to note that the 4-fold difference between "expected" values of 1 kPa and 4 kPa was conserved in measured values for both microindentation in detergent tests (3.37 kPa and 12.6 kPa) and relaxation tests (1.6 kPa and 6.4 kPa). This effect originates from the strong correlation found between the Young's modulus E and the long-term stiffness E_{∞} (Pearson correlation of 0.92, see Appendix C Table A1 and Figure A9) but the absolute values differ by less than expected. Biological cells seem very sensitive to slight changes in absolute gel stiffness, calling for very precise measurements of the mechanics sensed by cells, especially when designing biomimetic materials aiming at recapitulating native tissue properties. In addition to the determination of elastic moduli, PAM hydrogels are known to present dissipation and, here, it was possible to quantify it, as shown in the hysteresis curves in Figure 2. This needs to be accounted for in the characterization of materials as recent findings have shown that the relaxation times of culture substrates are critical in mechanobiology, controlling cell spreading dynamics in culture [20].

We first determined the correct experimental conditions to perform the desired relaxation tests. Adhesion forces must indeed be avoided to limit possible unwanted interactions biasing the measurements and distorting the final results. Also, a minimal indentation depth threshold of ~10% of the diameter of the tip was identified, similar to what had been reported for AFM in soft materials and even cells [53]. Although much larger spherical tips were used here, interestingly the same ratio was found. Indentation speed was also found to be important here, and this is justified by the fact that PAM hydrogels are poroelastic materials with a liquid phase exiting the material during the indentation compression and diffusing in and out of the surrounding liquid in time [55].

Then, our relaxation assays confirmed that soft PAM hydrogels may dissipate elastic energy with different characteristic times and that this dissipation affects the mechanical

characterization by microindentation but cannot be accessed by this only means. Providing more useful information on the mechanical properties of the gels, a GMM was used to describe different materials using their relaxation times with associated stiffnesses and viscosities as depicted in Figure 1B. Dynamic storage and loss moduli were also calculated and found to be accurate in describing the mechanics of the gels in a more general manner than Hertz model or empirical models [55]. Two relaxation mechanisms in soft gels may exist: viscoelastic relaxation due to conformational changes of the polymer chains and fluid-induced poroelastic relaxation. A combination of both is also possible, as seen in soft materials that swell with a solvent. Poroelastic relaxation is considered the dominant relaxation mechanism in PAM gels and it was demonstrated that the mechanical and transport properties of such poroelastic materials can be measured via microscale load relaxation, justifying our approach [33]. We also validated the method for stiffer PAM hydrogels and PDMS, showing that it can be used for other types of material used in mechanobiology.

As a conclusion, when properly performed, the simple relaxation tests proposed here are a very useful tool to describe soft PAM hydrogels, as the results obtained rapidly from this simple, one-step characterization provide a full mechanical characterization of a soft material from a simple FT curve. The practicality and minimal invasiveness of this technique also enables its use at any moment of a biological assay, without perturbing the conditions of the experiment. For comparison with typical microindentation tests, the intrinsic mechanical properties of a material under test may be defined by the long-term modulus E_{∞} , which is clearly an appropriate characteristic, independent of the measurement conditions and almost not impacted by indentation depth for high indentation velocities. It could then be useful to report long-term modulus E_{∞} , in decellularized matrices or tissue slides to correctly mimic this mechanical cue in biomimetic polymers. Finally, the relaxation test method, combined with a correct GMM fitting, provides useful information on the dynamic mechanical behavior in a range of frequencies that is relevant in mechanobiology.

Supplementary Materials: The Python code written and used in this project for the GMM analysis is shared here for use with your own experimental data: <https://colab.research.google.com/drive/143jxHL-BaEsldwxGCFG47H0dKgiUHAJ8#scrollTo=TlOqZSN-Komi>. Feel free to comment and propose improvements.

Author Contributions: Conceptualization, D.P.-C. and M.H.; methodology, D.P.-C., D.Z.-H., P.-H.P. and M.H.; software, D.Z.-H., D.P.-C. and S.A.-S.; validation, D.P.-C., D.Z.-H., P.-H.P. and M.H.; formal analysis, D.P.-C., S.A.-S. and M.H.; investigation, D.P.-C., D.Z.-H., S.A.-S., G.V.-V. and M.H.; resources, G.V.-V., P.-H.P. and M.H.; data curation, D.P.-C., D.Z.-H. and S.A.-S.; writing—original draft preparation, D.P.-C. and M.H.; writing—review and editing, P.-H.P. and M.H.; supervision, P.-H.P. and M.H.; project administration, P.-H.P. and M.H.; funding acquisition, G.V.-V., P.-H.P. and M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by DGAPA-PAPIIT IT102017 and IN223621, CNRS with international collaboration CNRS-PICS project *FibroSension* (PICS07865). D.P.-C. thanks CONACyT for his Doctoral scholarship 594952.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank LaNSBioDyT National Laboratory where the research was performed. Daniel Pérez-Calixto is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank Alejandro Cabrera-Wrooman at the Instituto Nacional de Rehabilitación for the immortalized human fibroblasts cell line (BJ).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Notes on FD Curve Processing and Analysis

In our hands, for all samples measured in a ddH₂O + 0.1% extran solution (to avoid undesired attraction of the tip) the contact point coincides with the position at which indentation begins. However, in the soaked-only samples, it has been reported that the contact point is not necessarily there [14]. We then considered the change of the slope in the FD curve (its first derivative) as a useful way to identify the position of a switch in the force regime. Indeed, when performing indentation tests, the origin of the major contribution of the measured forces is changed from an attraction-led regime in which the force is proportional to the indentation depth δ ($F_{\text{attraction}} \sim \delta$) to an indentation-driven regime in which $F_{\text{indentation}} \sim \delta^{3/2}$. If these two types of forces are the only ones present during the physical characterization, then the maximum of the second derivative precisely and objectively marks the beginning of indentation (see Figure A1). The variations of the slope in the FD curves are also observed in the FT curves. If $F_{\text{indentation}} \sim \delta^{3/2}$ and we suppose that $F_{\text{indentation}} = F(t)$ therefore $F(t) \sim \delta(t)^{3/2} \Rightarrow dF(t) \sim \frac{3}{2}\delta(t)^{1/2}dt$ and so $dF/dt \sim \frac{3}{2}\delta^{1/2}$. On the other hand, we have $dF/d\delta \sim \frac{3}{2}\delta^{1/2}$ leading to $dF/d\delta = dF/dt$. This implies that the procedure to find the contact point in the FD curves for microindentation tests is equivalent for the FT curves obtained in relaxation tests. Figure A1 shows the determination of the contact point associated with the maximum of the 2nd derivative with respect to time computed for a relaxation curve for a 4 kPa PAM hydrogel immersed in detergent solution.

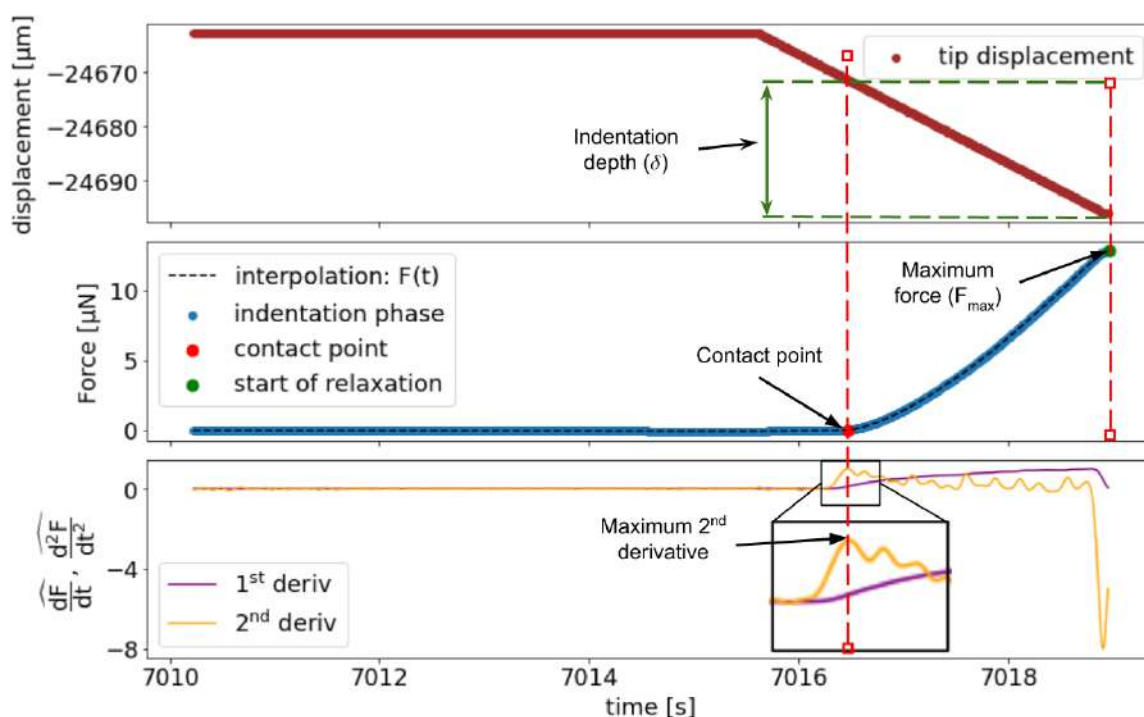


Figure A1. Example of the determination of the contact point, start of relaxation (maximum force) and indentation depth for a relaxation test performed on a 4 kPa PAM hydrogel immersed in ddH₂O + 0.1% extran. The first and second derivatives of the force are calculated as a function of time. The superior graph shows the displacement of the probe tip as a function of time. The middle graph shows the time behavior of the measured force. The 1st and 2nd derivatives are calculated from this graph and shown in the inferior graph. Experimental data were interpolated and it was considered that the maximum of the 2nd derivative implied a concavity change associated with the change in force behavior (a linear behavior for the attractive forces domain and a $F^{2/3}$ for indentation forces domain) Thus the position, representative of the contact point is thus precisely determined by the maximum of the second derivative. Here, raw data are shown and time is therefore equivalent to displacement.

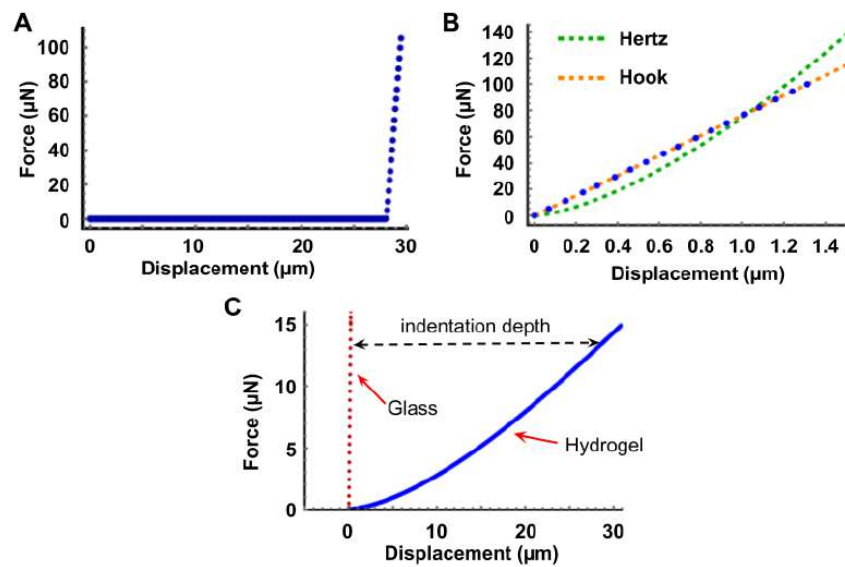


Figure A2. Correction for displacement of the indentation tip. (A) FD curve representative of the indentation of glass (indentation of 100 $\mu\text{m/s}$ and a frequency of data acquisition of 100 Hz). (B) Hertz model and Hook model fittings of glass indentation data. (C) comparison between the FD curve of the indentation of a PAM hydrogel measured immersed in ddH₂O + 0.1% Extran (blue curve) and the FD curve of the indentation of stiff glass (red), associated to the displacement of the probe tip mechanism. The difference between them is the true indentation depth.

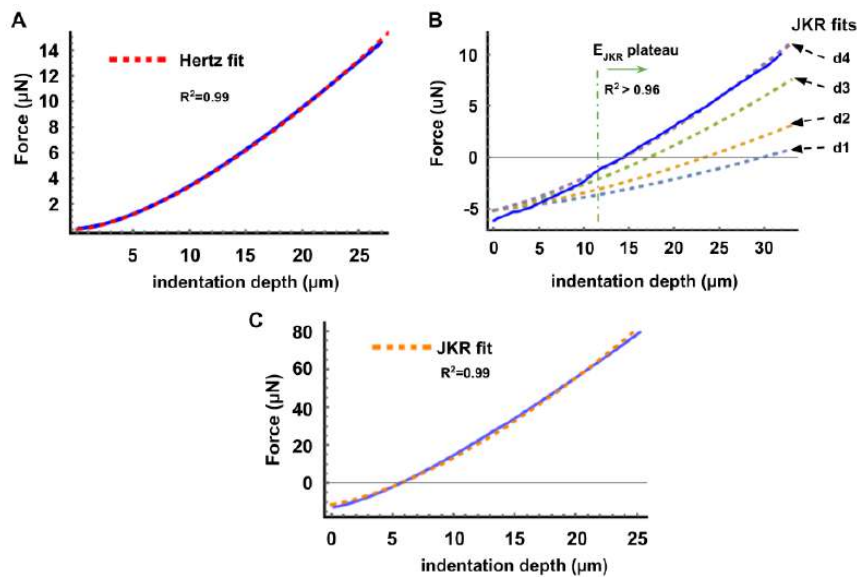


Figure A3. Representative curves of FD fitting processing. (A) Hertz model fitting of the indentation of a 4 kPa PAM hydrogel in ddH₂O + 0.1% Extran. The viscous drag was calculated using the slope of the approach curve (Figure 2C in the main text) obtaining $0.006 \pm 0.005 \mu\text{N}/\mu\text{m}$ at an indentation speed of 100 $\mu\text{m/s}$, which is negligible compared to the $\sim 0.3 \mu\text{N}$ change due to relaxation with the same indentation speed. (B) JKR model fitting of the indentation of the same hydrogel PAM measured while only soaked. There is an underestimation of the slope (therefore the elastic modulus) when modelling data with distances lower than $\sim 10 \mu\text{m}$. Also, for indentation depths greater than $\sim 11 \mu\text{m}$ the Young's modulus reaches a plateau value which is similar to the behavior presented in Figure 3 in the main text. (C) JKR model fitting of a stiffer hydrogel ($\sim 35 \text{ kPa}$, see Table 1) when only soaked in deionized water. There is a clear attraction of $\sim 10 \mu\text{N}$, twice that of the softer PAM hydrogel ($\sim 5 \mu\text{N}$), suggesting a possible dependency of the tip attraction with the stiffness of the sample (acrylamide/bisacrylamide proportions).

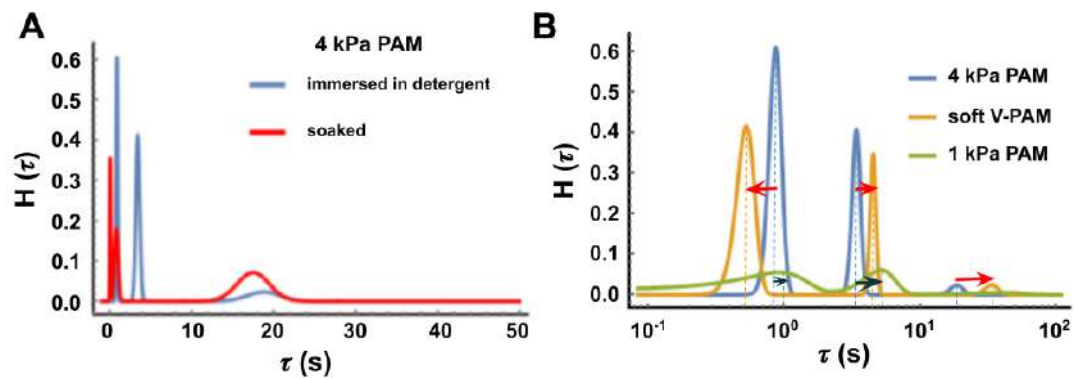


Figure A4. To report on the experimental variability, we plotted a distribution of characteristic relaxation times (represented by Dirac deltas in Figure 4B of the main text), grouping the results of several measurements of different samples. (A) Comparison between the relaxation spectra of a 4 kPa PAM hydrogel when measured either immersed in detergent solution or soaked but in air. While the material is identical, the experimental conditions differ and a relaxation time appears at 3.43 ± 0.24 s when the sample is immersed in detergent. Also, an additional relaxation peak appears at $\tau = 0.05 \pm 0.05$ s in the soaked condition. These differences are probably caused by relaxation effects due to poroelasticity when diffusion happens at different times (see main text). (B) Comparison between the different relaxation spectra of samples measured in detergent solution. Each peak represents a normal distribution centered in τ_i with a standard deviation σ , obtained by gathering values of τ_i from 2 independent samples for each condition ($n = 11$). Note: A normal distribution was supposed, with the standard deviation of the data being the deviation of the distribution and the weight is represented by k_i/k_∞ . Because the distributions are gaussian distributions, a smaller peak represents a greater standard deviation, hence a greater dispersion (variability) of the data.

Appendix B. Notes on the Criterion of Cross Validation to Determine a Proper Fitting

This appendix shows the verification of the correctness of the GMM fitting using the visualization of the residues and the subsequent evaluation of a possible overfitting of experimental data.

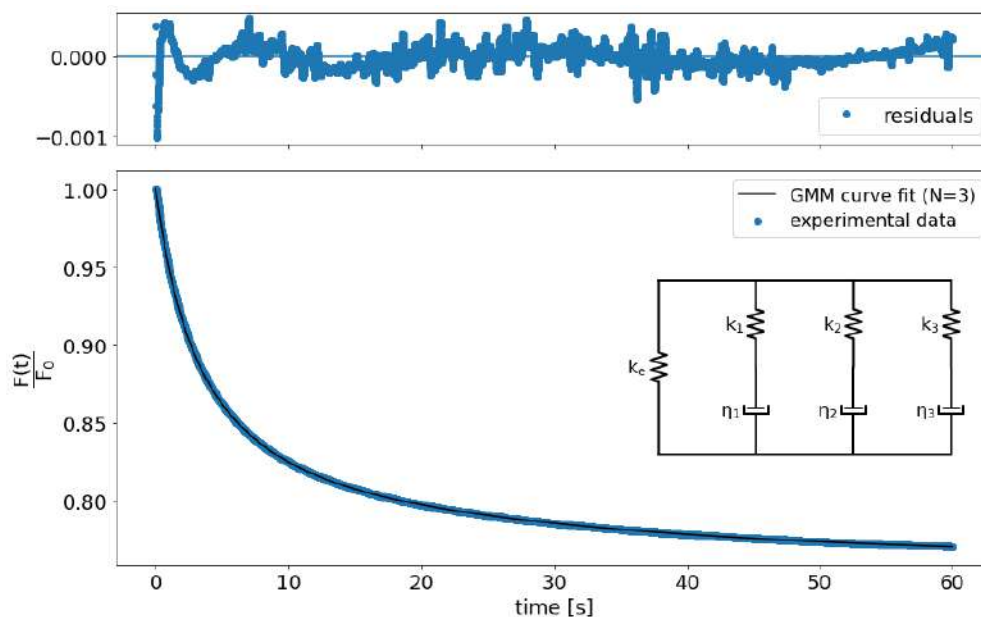


Figure A5. Third order GMM fitting ($N = 3$) to a relaxation curve of a 4 kPa PAM hydrogel immersed in ddH₂O + 0.1% Extran. The superior graph shows the residues of the fitting. Experimental data is normalized before adjusting with a GMM fitting.

In order to evaluate the level of acceptability or correctness of the GMM fitting, we used a criterion of cross validation calculating the mean squared error (MSE) defined in Equation (A1):

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i^{test} - \hat{Y}_i^{test})^2 \tag{A1}$$

where the Y_i^{test} represent the test data and \hat{Y}_i^{test} the validation data out of a total of N data points in i partitions. We have:

$$\hat{Y}_i^{test} = GMM_{fit}(X_i^{test} : \alpha^{test}) \tag{A2}$$

where X_i^{test} represents the set of experimental data used in the fitting using the GMM and α^{test} is the set of fitted parameters.

The criterion of cross validation quantifies a possible overfitting of the data while increasing the number of parameters and coefficients used in the model. The original set data are subdivided in k random samples. Each one of them is used in a validation set (called test), the data of the $k-1$ samples (train) are collected and fitted using the GMM model and the α^{train} variables are obtained. Then, using these parameters, the validation data (the values that were not used) are fitted and the MSE_i^{test} of the validation set is calculated. This is iterated for all the N data points to average the cross validation MSE as a measure of the quality of the fitting.

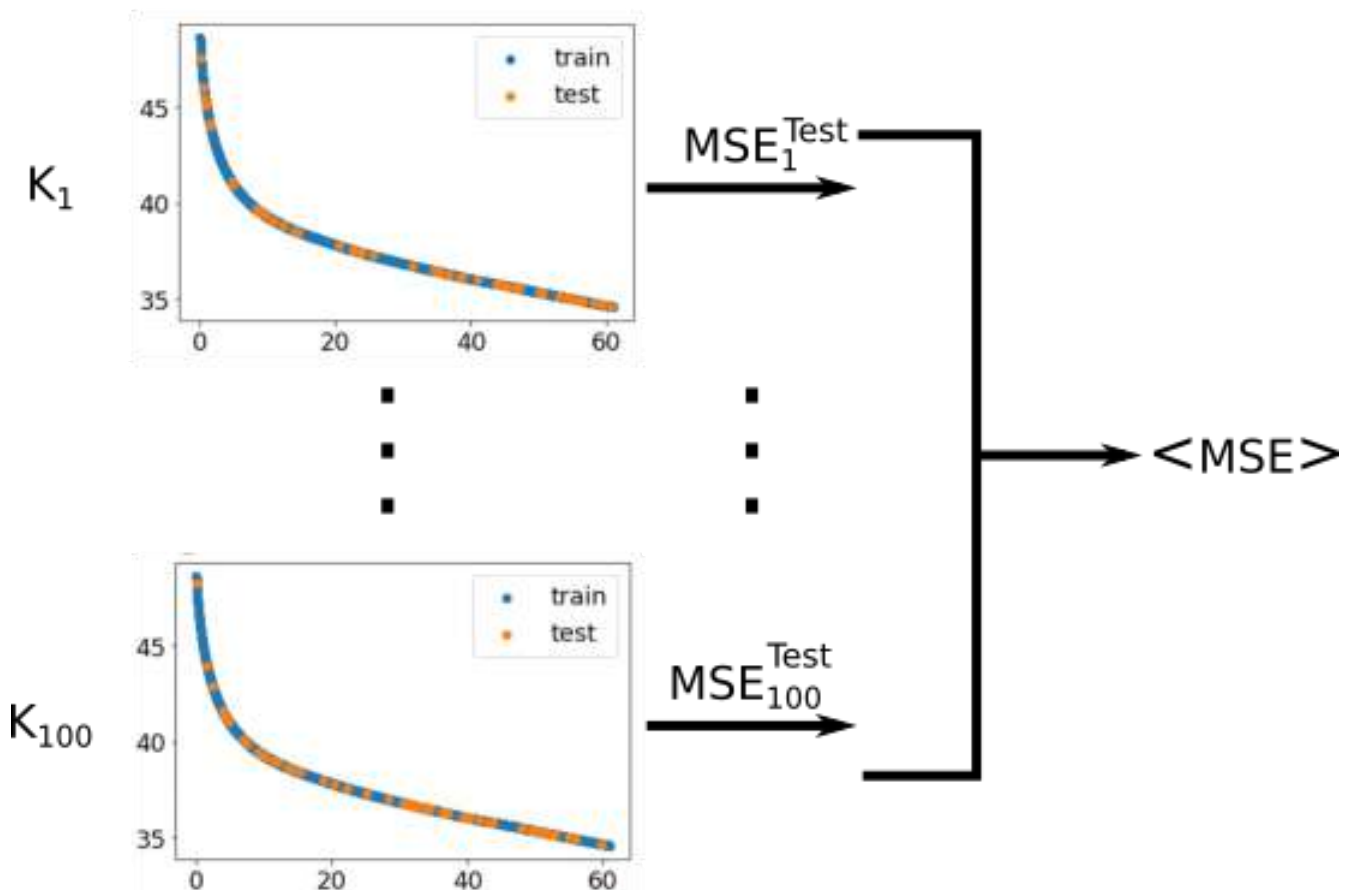


Figure A6. Calculation of MSE as a criterion of cross validation to evaluate the quality of the GMM model fitting.

Therefore, it was possible to define the number of Maxwell elements (arms) required in the GMM model. The order of the model is selected for the MSE to be minimal and the individual values of the fitting not to exceed an error of 10% (with an exception in n , where this threshold had to be increased to 20% because the total number of data of the relaxation

curve was low ($n = 70$) and there was considerable noise on the data). The results of the cross validation were validated with the Akaike information criterion (AIC), as observed in Figure A7. This provides an estimation of the correctness and complexity of the model.

Globally, the best fitting order was for $N = 4$, as depicted by the lowest MSE (and AIC) value shown in Figure A7 below. However, we found that the error of each parameter individually increased with the number of degrees of freedom and it was decided to use a GMM fitting with $N = 3$, for which the parameters always presented an error lower than 10%.

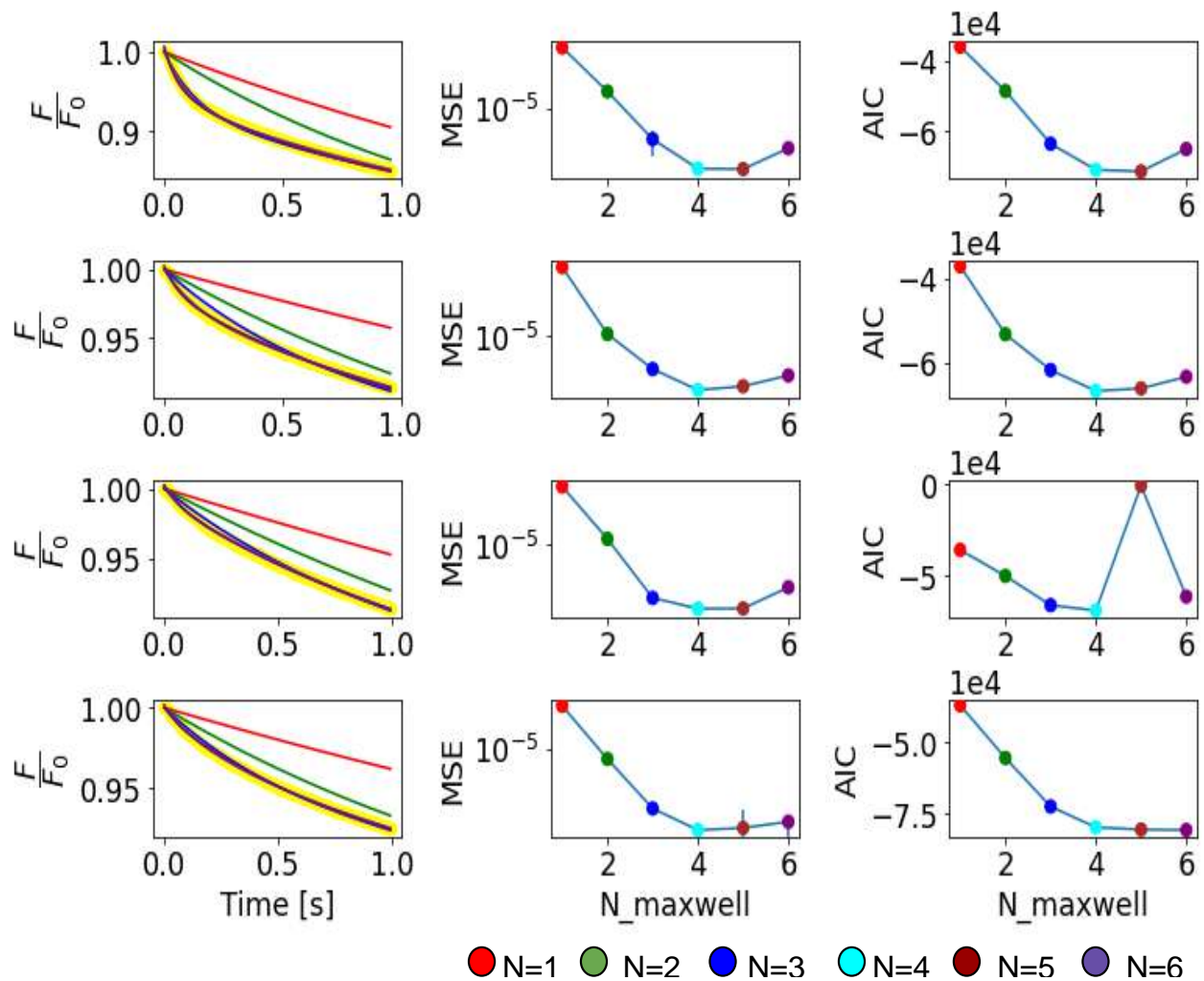


Figure A7. Example of the method of determination of best GMM fitting order for stiff PAM hydrogel samples. The left column shows the experimental data of 4 curves (yellow) together with their GMM fittings of different orders (corresponding to a different number of Maxwell elements, or arms). Each dot presented in the graphs at the center and right columns are the MSE criterion (center) and Akaike information criterion (right) for N arms in the GMM fitting, showing which order is the best.

Appendix C. Validation and Comparison with Other Methods

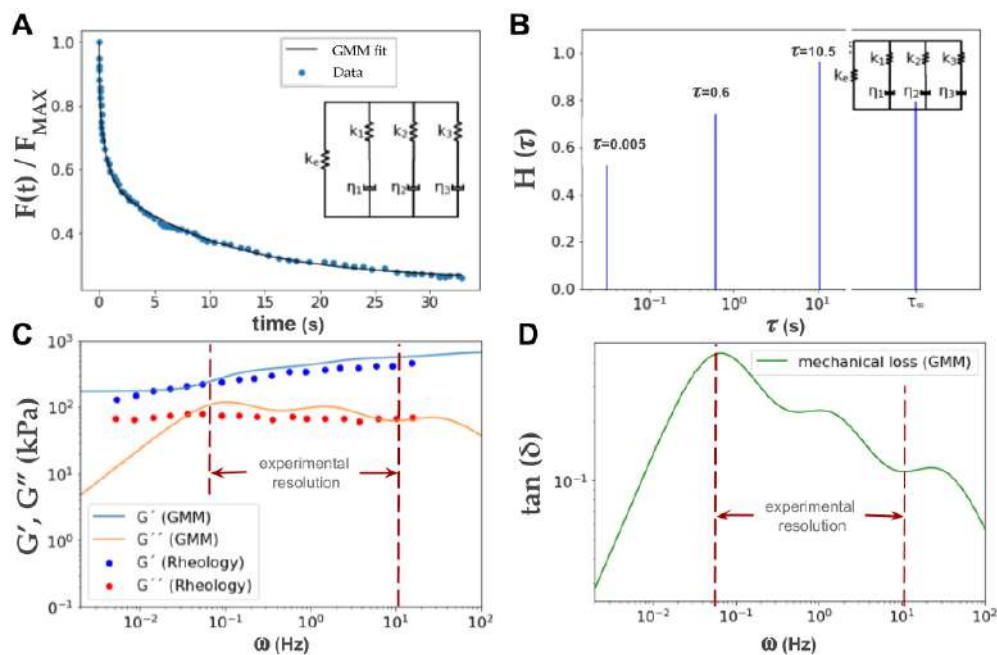


Figure A8. GMM analysis of published experimental data (FT curve) obtained by nanoindentation-relaxation of a biological cell using AFM [61] and comparison of computed frequency behavior with experimental data of dynamic moduli. The data were recovered manually from the published article. This figure corroborates the usefulness of the proposed method to characterize soft materials used in mechanobiology by only using a simple FT curve with relaxation. The raw stress-relaxation data were collected from Figure 1 of reference [61]: a cell was indented and relaxed using an ARROW-TL1 cantilever with an attached 4.7 μm silica bead, and with a spring constant 0.05 N m^{-1} . (A) Graph reproducing the experimental relaxation data obtained from [61] together with the corresponding GMM 3rd order fit. (B) Relaxation spectra associated with the hydrogel sample. We can observe that the relaxation times are of the same order as the ones found in Figures 4 and A4, of our experiments. (C) Representation of the dynamic moduli G' and G'' obtained from our GMM model (calculated from E^* using the relation in Section 2) and compared with the actual experimental data from rheology [61]. From frequencies of $\sim 10^{-1} \text{s}^{-1}$, the tendencies are very similar. It is striking that only with the data of the single relaxation curve of panel A the full frequency characterization is possible. Interestingly, in [61] the sample was indented 0.4 μm at a velocity of 30 $\mu\text{m/s}$; the indentation lasted 0.13 s corresponding to the highest frequency (10 Hz) and the relaxation lasted 30 s ($\sim 10^{-1}$ Hz). It was obtained that $G'(1 \text{ Hz}) = 432.19$ Pa and $G''(1 \text{ Hz}) = 98.75$ Pa, values that are recommended to be used to compare the results obtained with other characterization methods. (D) Losses in elastic energy are defined as $\tan(\delta) = G''/G'$ and it can be observed that the major loss is at frequencies around 10^{-1} Hz and longer times (>10 s) dissipate less elastic energy.

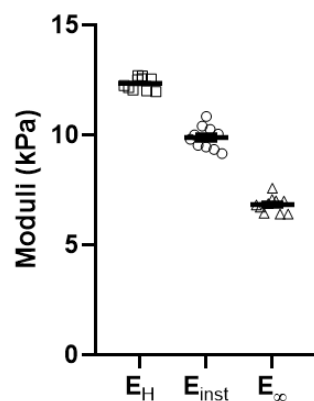


Figure A9. Comparison between the different modules obtained with microindentation (E_H) and relaxation (E_{inst} and E_∞) for a 4 kPa PAM hydrogel immersed in a ddH₂O + 0.1% Extran solution.

Table A1. Pearson’s correlation between the Young’s modulus measured by microindentation (E_H) and relaxation (E_{inst} and E_∞); in both cases a positive correlation was found indicating that if there is a change in the elastic behavior, both the Young’s modulus E and the long-term stiffness E_∞ will be affected in the same proportion since their correlation level is >0.9 . On the other hand, with the instantaneous modulus E_{inst} a correlation ~ 0.5 was obtained, which indicates a similar trend but not precisely in the same proportion. This effect is noted in Table 1 of the main text, where both the values of Young’s modulus and long-term stiffness of the 1 and 4 kPa samples measured in detergent maintained a 4-fold identical proportion between the expected values measured with a different technique (AFM). $r(E_H, E_i)$ = Pearson correlation with E_H .

	E_H	E_{inst}	E_∞
$r(E_H, E_i)$	1.000	0.556	0.924

References

- Roca-Cusachs, P.; Conte, V.; Trepast, X. Quantifying forces in cell biology. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 742–751. [[CrossRef](#)]
- DuFort, C.C.; Paszek, M.J.; Weaver, V.M. Balancing forces: Architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 308–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Iskratsch, T.; Wolfenson, H.; Sheetz, M.P. Appreciating force and shape—The rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 825–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Charrier, E.E.; Pogoda, K.; Wells, R.G.; Janmey, P.A. Control of cell morphology and differentiation by substrates with independently tunable elasticity and viscous dissipation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Tse, J.R.; Engler, A.J. Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2010**, *47*, 10.16.1–10.16.16. [[CrossRef](#)]
- Ondeck, M.G.; Kumar, A.; Placone, J.K.; Plunkett, C.M.; Matte, B.F.; Wong, K.C.; Fattet, L.; Yang, J.; Engler, A.J. Dynamically stiffened matrix promotes malignant transformation of mammary epithelial cells via collective mechanical signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 3502–3507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caliari, S.R.; Perelyuk, M.; Soulas, E.M.; Lee, G.Y.; Wells, R.G.; Burdick, J.A. Gradually softening hydrogels for modeling hepatic stellate cell behavior during fibrosis regression. *Integr. Biol.* **2016**, *8*, 720–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rosales, A.M.; Vega, S.L.; DelRio, F.W.; Burdick, J.A.; Anseth, K.S. Hydrogels with Reversible Mechanics to Probe Dynamic Cell Microenvironments. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12132–12136. [[CrossRef](#)]
- Al Mayah, A. *Biomechanics of Soft Tissues: Principles and Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; ISBN 9781351135818.
- Desai, S.S.; Tung, J.C.; Zhou, V.X.; Grenert, J.P.; Malato, Y.; Rezvani, M.; Español-Suñer, R.; Willenbring, H.; Weaver, V.M.; Chang, T.T. Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology* **2016**, *64*, 261–275. [[CrossRef](#)]
- Chaudhuri, O.; Gu, L.; Klumpers, D.; Darnell, M.; Bencherif, S.A.; Weaver, J.C.; Huebsch, N.; Lee, H.-P.; Lippens, E.; Duda, G.N.; et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 326–334. [[CrossRef](#)]
- Wu, P.-H.; Aroush, D.R.-B.; Asnacios, A.; Chen, W.-C.; Dokukin, M.E.; Doss, B.L.; Durand-Smet, P.; Ekpenyong, A.; Guck, J.; Guz, N.V.; et al. A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 491–498. [[CrossRef](#)]
- Griffin, M.; Premakumar, Y.; Seifalian, A.; Butler, P.E.; Szarko, M. Biomechanical Characterization of Human Soft Tissues Using Indentation and Tensile Testing. *J. Vis. Exp.* **2016**. [[CrossRef](#)]
- Lin, D.C.; Dimitriadis, E.K.; Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials. *J. Biomech. Eng.* **2007**, *129*, 904–912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chang, Y.-R.; Raghunathan, V.K.; Garland, S.P.; Morgan, J.T.; Russell, P.; Murphy, C.J. Automated AFM force curve analysis for determining elastic modulus of biomaterials and biological samples. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, *37*, 209–218. [[CrossRef](#)]
- Sawicka, A.; Babataheri, A.; Dogniaux, S.; Barakat, A.I.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Hivroz, C.; Husson, J. Micropipette force probe to quantify single-cell force generation: Application to T-cell activation. *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 3229–3239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Neuman, K.C.; Nagy, A. Single-molecule force spectroscopy: Optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 491–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mihai, L.A.; Goriely, A. How to characterize a nonlinear elastic material? A review on nonlinear constitutive parameters in isotropic finite elasticity. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2017**, *473*, 20170607. [[CrossRef](#)]
- Amar, M.B. Nonlinear visco-elasticity of soft tissues under cyclic deformations. *Int. J. Non Linear Mech.* **2018**, *106*, 238–244. [[CrossRef](#)]
- Gong, Z.; Szczyzny, S.E.; Caliari, S.R.; Charrier, E.E.; Chaudhuri, O.; Cao, X.; Lin, Y.; Mauck, R.L.; Janmey, P.A.; Burdick, J.A.; et al. Matching material and cellular timescales maximizes cell spreading on viscoelastic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E2686–E2695. [[CrossRef](#)]
- Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* **2020**, *584*, 535–546. [[CrossRef](#)]

22. Charrier, E.E.; Pogoda, K.; Li, R.; Park, C.Y.; Fredberg, J.J.; Janmey, P.A. A novel method to make viscoelastic polyacrylamide gels for cell culture and traction force microscopy. *APL Bioeng.* **2020**, *4*, 036104. [[CrossRef](#)]
23. Mandal, K.; Gong, Z.; Rylander, A.; Shenoy, V.B.; Janmey, P.A. Opposite responses of normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells to substrate viscoelasticity. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 1316–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Swoger, M.; Gupta, S.; Charrier, E.E.; Bates, M.; Hehnlly, H.; Patteson, A.E. Vimentin intermediate filaments mediate cell shape on visco-elastic substrates. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
25. Discher, D.E.; Smith, L.; Cho, S.; Colasurdo, M.; García, A.J.; Safran, S. Matrix Mechanosensing: From Scaling Concepts in 'Omics Data to Mechanisms in the Nucleus, Regeneration, and Cancer. *Annu. Rev. Biophys.* **2017**, *46*, 295–315. [[CrossRef](#)]
26. Kim, S.; Uroz, M.; Bays, J.L.; Chen, C.S. Harnessing Mechanobiology for Tissue Engineering. *Dev. Cell* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rodríguez-Nieto, M.; Mendoza-Flores, P.; García-Ortiz, D.; Montes-de-Oca, L.M.; Mendoza-Villa, M.; Barrón-González, P.; Espinosa, G.; Menchaca, J.L. Viscoelastic properties of doxorubicin-treated HT-29 cancer cells by atomic force microscopy: The fractional Zener model as an optimal viscoelastic model for cells. *Biomech. Modeling Mechanobiol.* **2020**, *19*, 801–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lekka, M.; Laidler, P. Applicability of AFM in cancer detection. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 72. [[CrossRef](#)]
29. Galluzzi, M.; Biswas, C.S.; Wu, Y.; Wang, Q.; Du, B.; Stadler, F.J. Space-resolved quantitative mechanical measurements of soft and supersoft materials by atomic force microscopy. *NPG Asia Mater.* **2016**, *8*, e327. [[CrossRef](#)]
30. Rheinlaender, J.; Dimitracopoulos, A.; Wallmeyer, B.; Kronenberg, N.M.; Chalut, K.J.; Gather, M.C.; Betz, T.; Charras, G.; Franze, K. Cortical cell stiffness is independent of substrate mechanics. *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 1019–1025. [[CrossRef](#)]
31. Gavara, N. Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force-indentation curves obtained on thin samples and adherent cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21267. [[CrossRef](#)]
32. Guimarães, C.F.; Gasperini, L.; Marques, A.P.; Reis, R.L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 351–370. [[CrossRef](#)]
33. Kalcioğlu, Z.I.; Mahmoodian, R.; Hu, Y.; Suo, Z.; Van Vliet, K.J. From macro- to microscale poroelastic characterization of polymeric hydrogels via indentation. *Soft Matter* **2012**, *8*, 3393–3398. [[CrossRef](#)]
34. Cretu, A.; Castagnino, P.; Assoian, R. Studying the Effects of Matrix Stiffness on Cellular Function using Acrylamide-based Hydrogels. *J. Vis. Exp. JoVE* **2010**, *42*, e2089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Flores-Merino, M.V.; Chirasatitsin, S.; Lopresti, C.; Reilly, G.C.; Battaglia, G.; Engler, A.J. Nanoscopic mechanical anisotropy in hydrogel surfaces. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4466–4470. [[CrossRef](#)]
36. Takigawa, T.; Morino, Y.; Urayama, K.; Masuda, T. Poisson's ratio of polyacrylamide (PAAm) gels. *Polym. Gels Netw.* **1996**, *4*, 1–5. [[CrossRef](#)]
37. Jin, C.; Ma, C.; Yang, Z.; Lin, H. A Force Measurement Method Based on Flexible PDMS Grating. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2296. [[CrossRef](#)]
38. Serna-Márquez, N.; Rodríguez-Hernández, A.; Ayala-Reyes, M.; Martínez-Hernández, L.O.; Peña-Rico, M.Á.; Carretero-Ortega, J.; Hautefeuille, M.; Vázquez-Victorio, G. Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels. *Biomimetics* **2020**, *5*, 30. [[CrossRef](#)]
39. Vázquez-Victorio, G.; Rodríguez-Hernández, A.; Cano-Jorge, M.; Monroy-Romero, A.X.; Macías-Silva, M.; Hautefeuille, M. Fabrication of Adhesive Substrate for Incorporating Hydrogels to Investigate the Influence of Stiffness on Cancer Cell Behavior. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2174*, 277–297.
40. Meyer, K.; Morales-Navarrete, H.; Seifert, S.; Wilsch-Braeuninger, M.; Dahmen, U.; Tanaka, E.M.; Brusch, L.; Kalaidzidis, Y.; Zerial, M. Bile canaliculi remodeling activates YAP via the actin cytoskeleton during liver regeneration. *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e8985. [[CrossRef](#)]
41. Dimitriadis, E.K.; Horkay, F.; Maresca, J.; Kachar, B.; Chadwick, R.S. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2798–2810. [[CrossRef](#)]
42. Kohn, J.C.; Ebenstein, D.M. Eliminating adhesion errors in nanoindentation of compliant polymers and hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 316–326. [[CrossRef](#)]
43. Style, R.W.; Hyland, C.; Boltysanskiy, R.; Wettlaufer, J.S.; Dufresne, E.R. Surface tension and contact with soft elastic solids. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2728. [[CrossRef](#)]
44. Tabor, D. Surface Forces and Surface Interactions. In *Plenary and Invited Lectures*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1977; pp. 3–14.
45. Efremov, Y.M.; Bagrov, D.V.; Kirpichnikov, M.P.; Shaitan, K.V. Application of the Johnson–Kendall–Roberts model in AFM-based mechanical measurements on cells and gel. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *134*, 131–139. [[CrossRef](#)]
46. Ciavarella, M.; Xu, Y.; Jackson, R.L. The generalized Tabor parameter for adhesive rough contacts near complete contact. *J. Mech. Phys. Solids* **2019**, *122*, 126–140. [[CrossRef](#)]
47. Ebenstein, D.M.; Wahl, K.J. A comparison of JKR-based methods to analyze quasi-static and dynamic indentation force curves. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 652–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ebenstein, D.M. Nano-JKR force curve method overcomes challenges of surface detection and adhesion for nanoindentation of a compliant polymer in air and water. *J. Mater. Res.* **2011**, *26*, 1026–1035. [[CrossRef](#)]
49. Kraus, M.A.; Schuster, M.; Kuntsche, J.; Siebert, G.; Schneider, J. Parameter identification methods for visco- and hyperelastic material models. *Glass Struct. Eng.* **2017**, *2*, 147–167. [[CrossRef](#)]

50. Walcott, S.; Sun, S.X. A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 7757–7762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wang, Q.M.; Mohan, A.C.; Oyen, M.L.; Zhao, X.H. Separating viscoelasticity and poroelasticity of gels with different length and time scales. *Acta Mech. Sin.* **2014**, *30*, 20–27. [[CrossRef](#)]
52. Lee, K.-Y.; Case, E.D. Effects of adhesion on the effective Young's modulus in glass slide/glue laminates. *J. Mater. Sci.* **1996**, *31*, 2253–2264. [[CrossRef](#)]
53. Rico, F.; Roca-Cusachs, P.; Gavara, N.; Farré, R.; Rotger, M.; Navajas, D. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2005**, *72*, 021914. [[CrossRef](#)]
54. Ding, Y.; Wang, J.; Xu, G.-K.; Wang, G.-F. Are elastic moduli of biological cells depth dependent or not? Another explanation using a contact mechanics model with surface tension. *Soft Matter* **2018**, *14*, 7534–7541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Esteki, M.H.; Alemrajabi, A.A.; Hall, C.M.; Sheridan, G.K.; Azadi, M.; Moendarbary, E. A new framework for characterization of poroelastic materials using indentation. *Acta Biomater.* **2020**, *102*, 138–148. [[CrossRef](#)]
56. Wen, J.H.; Vincent, L.G.; Fuhrmann, A.; Choi, Y.S.; Hribar, K.C.; Taylor-Weiner, H.; Chen, S.; Engler, A.J. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat. Mater.* **2014**, *13*, 979–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Subramani, R.; Izquierdo-Alvarez, A.; Bhattacharya, P.; Meerts, M.; Moldenaers, P.; Ramon, H.; Van Oosterwyck, H. The Influence of Swelling on Elastic Properties of Polyacrylamide Hydrogels. *Front. Mater.* **2020**, *7*. [[CrossRef](#)]
58. Hui, C.Y.; Lin, Y.Y.; Chuang, F.C.; Shull, K.R.; Lin, W.C. A contact mechanics method for characterizing the elastic properties and permeability of gels. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2006**, *44*, 359–370. [[CrossRef](#)]
59. Cacopardo, L.; Guazzelli, N.; Nossa, R.; Mattei, G.; Ahluwalia, A. Engineering hydrogel viscoelasticity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *89*, 162–167. [[CrossRef](#)]
60. Mattei, G.; Cacopardo, L.; Ahluwalia, A.A. Engineering Gels with Time-Evolving Viscoelasticity. *Materials* **2020**, *13*, 438. [[CrossRef](#)]
61. Chim, Y.H.; Mason, L.M.; Rath, N.; Olson, M.F.; Tassieri, M.; Yin, H. A one-step procedure to probe the viscoelastic properties of cells by Atomic Force Microscopy. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)]
62. Vázquez-Victorio, G.; Peto-Gutiérrez, C.; Díaz-Bello, B.; Cano-Jorge, M.; Pérez-Calixto, D.; Jiménez-Escobar, A.; Espinosa-Matías, S.; Lara Martínez, R.; Courson, R.; Malaquin, L.; et al. Building a microfluidic cell culture platform with stiffness control using Loctite 3525 glue. *Lab Chip* **2019**, *19*, 3512–3525. [[CrossRef](#)]
63. Wahl, A.; Dinet, C.; Dillard, P.; Nassereddine, A.; Puech, P.-H.; Limozin, L.; Sengupta, K. Biphasic mechanosensitivity of T cell receptor-mediated spreading of lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 5908–5913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Saez, A.; Anon, E.; Ghibaudo, M.; Du Roure, O.; Di Meglio, J.-M.; Hersen, P.; Silberzan, P.; Buguin, A.; Ladoux, B. Traction forces exerted by epithelial cell sheets. *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, *22*, 194119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mouser, V.H.M.; Melchels, F.P.W.; Visser, J.; Dhert, W.J.A.; Gawlitta, D.; Malda, J. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication* **2016**, *8*, 035003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Valero, D.E. Compression Testing and Measurement of Material Properties of a Double Network Hydrogel. Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA, 2015.
67. Kim, M.; Moon, B.-U.; Hidrovo, C.H. Enhancement of the thermo-mechanical properties of PDMS molds for the hot embossing of PMMA microfluidic devices. *J. Micromech. Microeng.* **2013**, *23*, 095024. [[CrossRef](#)]
68. Grinnell, F.; Ho, C.-H. The effect of growth factor environment on fibroblast morphological response to substrate stiffness. *Biomaterials* **2013**, *34*, 965–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Pocaterra, A.; Romani, P.; Dupont, S. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*. [[CrossRef](#)]