



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LOS COACTIVADORES TRANSCRIPCIONALES
MECANOSENSIBLES YAP/TAZ EN EL CONTEXTO DE CÉLULAS EPITELIALES
HEPÁTICAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

ADRIANA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Marina Macías Silva
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. Mathieu Hautefeuille
[Facultad de Ciencias, UNAM](#)

Dr. Victor Julián Váldez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México, septiembre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la Tutoría de la Dra. Marina Macías Silva en el Instituto de Fisiología Celular y bajo la Asesoría del Dr. Genaro Vázquez Victorio en la Facultad de Ciencias. Este trabajo recibió el apoyo financiero del proyecto No. 304023 de CONACYT (FORDECyT-PRONACES) y PAPIIT-DGAPA No. IN219721.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Mathieu Hautefeuille y Dr. V. Julián Valdés, por los comentarios y sugerencias sobre mi trabajo.

A los miembros de mi Jurado de examen: Dr. Luis F. Covarrubias, Dr. Rolando Hernández, Dra. Mayra Furlan, Dr. Leonardo Peraza y Dra. Lorena Aguilar, por la revisión y los comentarios sobre mi trabajo.

A la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, M.V.Z. Héctor Malagón Rivero y M.V.Z. Gabriela Xochitl Ayala Méndez.

A los miembros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortínez Benavides, por su apoyo con el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Ruth Rincón Heredia, Dr. Abraham Rosas Arellano y Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz. Así como la Unidad de Microscopía Cuantitativa de la Facultad de Ciencias por su apoyo técnico: F. Edgar Adán Jiménez Díaz.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su apoyo técnico: Dra. Laura Ongay Larios, Biol. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo, Ing. Ivett Rosas Arciniega e Ing. Francisco Pérez Eugenio.

Al Laboratorio Micro y Nanotecnología por su apoyo en la fabricación y caracterización mecánica de los materiales: Dr. Mathieu Hautefeuille, Dra. Nathalia Serna Márquez y Mtro. Daniel Pérez Calixto.

AGRADEZCO

A Dios por rodearme de seres queridos y grandes amigos que me brindaron siempre un gran apoyo durante este paso en mi vida y me impulsaron a seguir adelante.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio por ser siempre un ejemplo y por el gran ambiente de trabajo.

A los líderes del grupo de trabajo en el cual me desarrolle, Dra. Marina, Dr. Genaro y Dr. Mathieu por ser excelentes guías y grandes maestros que no limitan sus enseñanzas y experiencias.

A la UNAM mi orgullosa casa de estudios, por permitirme seguir adquiriendo y puliendo conocimientos y por las grades vivencias que nos permiten un desarrollo integral y humano.

RESUMEN

El hígado realiza múltiples funciones, tales como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, la síntesis de proteínas del plasma sanguíneo, la detoxificación de xenobióticos, entre otras. El hígado, se compone de varios tipos celulares, dentro de los cuales destacan los hepatocitos, quienes llevan a cabo la mayoría de las funciones hepáticas y constituyen el parénquima. Por otro lado, las células no parenquimatosas se encargan de proveer a los hepatocitos tanto de la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular matrix*) como de los factores solubles, para mantener las funciones hepáticas (Kuntz E. & Kuntz HD., 2008). El hígado es capaz de regenerar sus componentes celulares (duplicación celular) y la ECM (fibrogénesis), debido a que el tejido hepático es susceptible a un daño frecuentemente. Sin embargo, cuando el daño es crónico, se deposita la ECM de manera exacerbada y con características fibrilares, alterando las propiedades mecánicas de ésta, conduciendo al proceso conocido como *fibrosis hepática*. Actualmente se sabe que los cambios en la mecánica extracelular están relacionados con el desarrollo de procesos fisiopatológicos tales como la fibrosis, la tumorigénesis y la metástasis. En el contexto hepático, se sabe que las células estrelladas hepáticas (HSC) se activan en respuesta a cambios en la rigidez del tejido y a través de factores de crecimiento como el TGF- β , siendo ambos los principales factores responsables de la fibrogénesis exacerbada (Perepelyuk M. et al., 2013). El fenotipo de los hepatocitos y sus funciones están reguladas por varias vías de señalización, como las vías de Wnt/ β -catenina, TGF- β /Smads, Notch e Hippo (YAP/TAZ) (Colnot S. & Perret C., 2011). Cabe mencionar que durante el proceso de fibrosis hepática existe una pérdida progresiva de las funciones de los hepatocitos (Noce V. et al., 2019). Adicionalmente, los hepatocitos son capaces de responder a la rigidez de su sustrato, incrementando su área celular (esparcimiento) como respuesta al contacto con sustratos con rigidez mayor a la fisiológica, lo cual está directamente relacionado con una disminución en la expresión del factor transcripcional HNF4 α , un regulador maestro de la función hepática (Natarajan V. et al., 2015; Desai S. et al., 2016). Las proteínas YAP/TAZ son coactivadores transcripcionales mecanosensibles, que tras el aumento en la rigidez de la ECM y la consecuente polimerización del citoesqueleto de actina, son capaces de traslocarse al núcleo, en donde forman un complejo activo con los factores transcripcionales TEAD, regulando positivamente la expresión de genes blanco implicados en la proliferación celular (Zhao B. et al., 2008). El objetivo de este proyecto fue estudiar si las alteraciones en la rigidez extracelular y el esparcimiento del área celular de los hepatocitos, tienen implicaciones en la regulación de las proteínas YAP/TAZ. Empleando un modelo *in vitro* con hidrogeles de poliacrilamida para el cultivo de hepatocitos primarios se investigaron los umbrales de rigidez del sustrato de cultivo para la activación de las proteínas mecanosensibles YAP/TAZ. Los resultados mostraron que la respuesta de los hepatocitos normales a los cambios en la rigidez de su sustrato a través del aumento en su área celular y nuclear, está relacionado con una activación diferencial (traslocación nuclear) de las proteínas YAP/TAZ, aumentando en los sustratos más rígidos. El estudio de la activación de estas proteínas es relevante debido a que juegan un papel importante en los procesos de organogénesis y de regeneración hepática, así como en el desarrollo de procesos fibróticos y del carcinoma hepatocelular (Lu L. et al., 2010; Dupont S. et al., 2011).

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	3
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Comunicación celular y transducción de señales	10
1.2. Mecanobiología	12
1.3. Introducción a la mecanotransducción	13
1.3.1 Propiedades mecánicas de los materiales	14
1.3.2 Propiedades mecánicas de las células y de su ECM circundante	15
1.4. Mecanotransducción	17
1.4.1 Matriz extracelular: estructura y componentes	18
1.4.2 Adhesiones focales (uniones célula - ECM) a través de integrinas	19
1.4.3 El citoesqueleto como estructura mecanosensible	21
1.5. Vías de mecanotransducción	22
1.6. El hígado: arquitectura y funciones	25
1.6.1 La mecanotransducción en el hígado	27
2. ANTECEDENTES	27
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos particulares	34

	Página
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7. MÉTODOS	37
7.1. Hidrogeles de poliacrilamida (HGPAAm)	37
7.2. Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de rata	39
7.3. Cultivo celular	40
7.4. Marcaje por fluorescencia	40
7.5. Toma y análisis de imágenes	41
8. RESULTADOS	45
9. DISCUSIÓN	60
10. CONCLUSIONES	65
11. PERSPECTIVAS.....	66
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Fig.1 Representación esquemática de la señalización celular	11
Fig. 2 Diagrama del módulo de elástico o módulo de Young	15
Fig. 3 Representación esquemática del proceso de mecanotransducción ...	18
Fig. 4 Unión célula-sustrato mediada por integrinas	20
Fig. 5 Representación esquemática de la ruta Hippo	24
Fig. 6 Esparcimiento del área celular de hepatocitos en respuesta a modificaciones en la rigidez de su matriz	29
Tab.1 Proporciones para hidrogeles de poliacrilamida	38
Fig. 7 Los hepatocitos primarios de rata responden a la rigidez (módulo elástico) mediante el esparcimiento del área y su deformación celular	47
Fig. 8 La línea celular HepG2 (hepatocitos transformados) responde a las variaciones de rigidez en su sustrato mediante deformación y esparcimiento celular	48
Fig. 9 Los hepatocitos primarios forman agregados celulares con diferencias en su área dependiente de la rigidez del sustrato	50
Fig. 10 Los hepatocitos primarios de rata cultivados en sustratos suaves presentan una estructura tipo canalículo biliar	52
Fig. 11 Reorganización del citoesqueleto de actina de los hepatocitos primarios en condiciones de cultivo de rigidez variable	53
Fig. 12 Los hepatocitos primarios cultivados en valores de rigidez variable sufren deformación nuclear	55

	Página
Fig 13. La línea celular HepG2 cultivada en valores de rigidez variable sufre deformación nuclear	56
Fig 14. La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ se modifica en hepatocitos primarios cultivados en sustratos de rigidez variable	58
Fig 15. La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ en células HepG2 está distribuida de forma similar entre núcleo y citoplasma, y no se modifica en cultivos en sustratos de rigidez variable	59

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
AFM	microscopía de fuerza atómica (del inglés <i>Atomic Force Microscope</i>)
ALD	hepatitis de origen alcohólico (por sus siglas en inglés <i>alcoholic liver disease</i>)
α -SMA	proteína actina de músculo liso alfa (del inglés <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
CHB	hepatitis B (por sus siglas en inglés <i>chronic hepatitis B</i>)
CHC	hepatitis C (por sus siglas en inglés <i>chronic hepatitis C</i>)
Col. I	colágena tipo I
CIP	inhibición por contacto celular (del inglés <i>contact inhibition of proliferation</i>)
CSC	células madre cancerosas (del inglés <i>Cancer Stem Cells</i>)
dH ₂ O	agua desionizada
ECM	matriz extracelular (del inglés <i>extracellular matrix</i>)
EMT	transición epitelio-mesénquima (del inglés <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
FA	adhesiones focales (del inglés <i>Focal adhesions</i>)
FAK	cinasa de adhesiones focales (del inglés <i>focal adhesion kinase</i>)
GEF	factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés, <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
HCC	carcinoma hepatocelular (del inglés <i>hepatocarcinoma</i>)
HGPAAm	hidrogel de poliacrilamida
HSC	células estrelladas (del inglés <i>hepatic stellate cells</i>)
HNF4 α	factor nuclear 4 alfa de hepatocito
LATS	del inglés <i>Large Tumor Suppressors</i>

LINC	del inglés <i>Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
NAFLD	hepatitis de origen no alcohólico (por sus siglas en inglés <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	esteatohepatitis no alcohólica (del inglés <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>)
Pa, kPa	pascal, kilopascal
PBS	del inglés <i>Phosphate-buffered saline</i>
PDMS	polidimetilsiloxano (del inglés <i>polydimethylsiloxane</i>)
PC	zona pericentral
PMMA	polimetilmetacrilato (del inglés <i>polymethylmethacrylate</i>)
PP	zona periportal
PH	hepatectomía parcial (del inglés <i>partial hepatectomy</i>)
TA	temperatura ambiente
TAZ	del inglés <i>Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif</i>
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>transforming growth factor beta</i>)
UPS	sistema ubiquitina-proteasoma (del inglés <i>ubiquitin-proteasome system</i>)
YAP	del inglés <i>Yes-associated protein</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Comunicación celular y transducción de señales

Las células son la unidad funcional de cualquier ser vivo y se encuentran dentro de un microambiente tridimensional complejo, expuestas a constantes cambios físicos y químicos, intra y extracelulares. La supervivencia celular depende de la capacidad de adaptación de las células y para ello emplean sistemas dinámicos de comunicación y transducción de señales, permitiéndoles percibir y procesar la información, transducir los mensajes, responder y desempeñar sus funciones fisiológicas, manteniendo la homeostasis dentro del tejido, órgano, sistema u organismo que integran, pese a las variaciones ambientales y a los posibles daños a los que se enfrentan (Alberts, 2017). El estudio de la transducción de señales ha permitido conocer cómo la célula es capaz de percibir, interpretar, responder, transmitir y/o adaptarse a señales que pueden provenir de otras células (a través de proteínas de membrana, mensajeros solubles u hormonas), o de la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular matrix*) en la que se encuentran inmersas. Las vías de señalización que emplean las células, se pueden describir en general de la siguiente manera: una **señal o ligando** que puede ser de carácter hidrofílico o hidrofóbico es reconocido por **receptores**, proteínas de membrana plasmática o proteínas nucleares, respectivamente. Esta unión **ligando-receptor** desencadena cambios conformacionales en la estructura de la proteína receptora, permitiendo la unión o interacción con otras proteínas río abajo conocidas como **proteínas adaptadoras o de andamiaje** generando una **cascada de señalización**, que puede o no incluir mecanismos de amplificación de señales, activando **proteínas efectoras** con o sin actividad enzimática; o bien, generando mensajeros químicos intracelulares conocidos como **segundos mensajeros**. Finalmente, la activación de estos mecanismos moleculares de las vías de señalización permitirá a las células generar una **respuesta** ante el estímulo percibido, que generalmente implica la regulación de la expresión genética, controlando o modulando funciones y procesos específicos dependiendo del tipo y función celular ([Fig.1](#)) (Pollard, 2016).

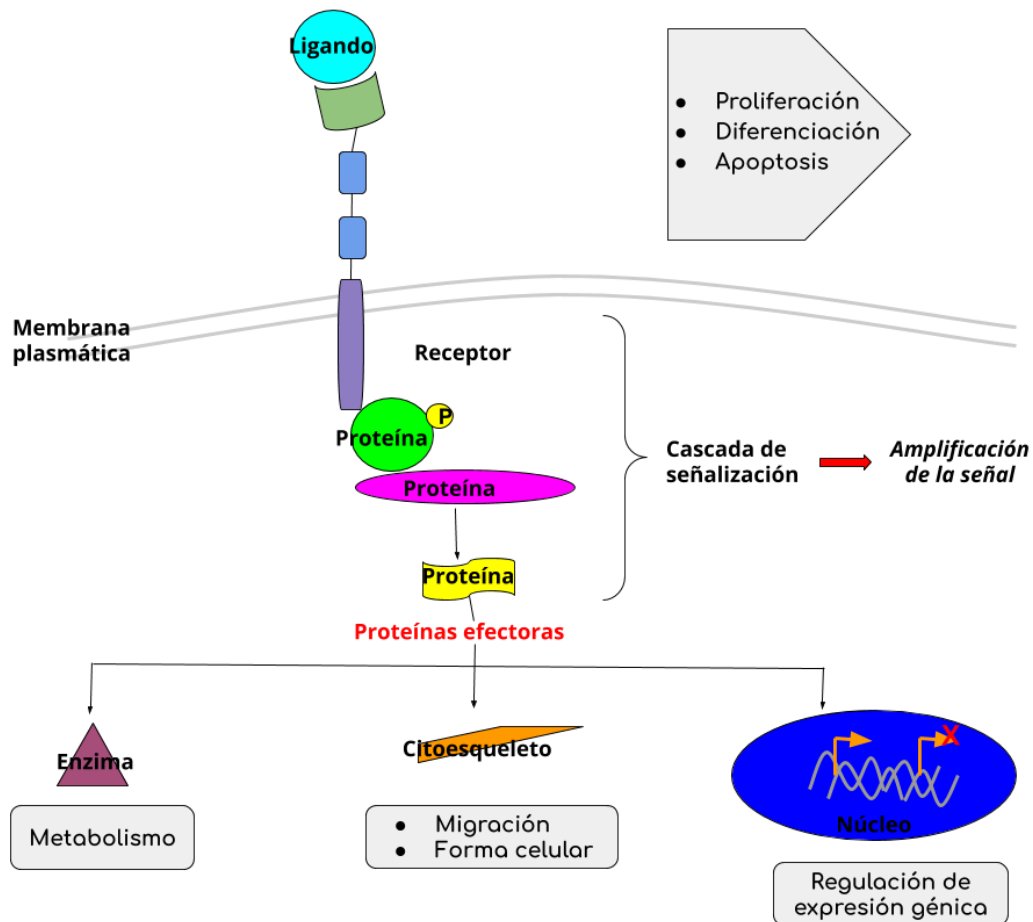


Fig.1. Representación esquemática de la señalización celular. Se muestran los principales participantes en el proceso de transducción de señales, comenzando con el ligando, que es reconocido por un receptor, la activación de las proteínas adaptadoras encargadas de amplificar la señal y la activación de las proteínas efectoras que finalmente regularán procesos o funciones celulares o incluso la transcripción de genes blanco.

Como se mencionó anteriormente, las células tienen la capacidad de comunicarse con sus células vecinas para responder de manera conjunta y así mantener el funcionamiento correcto del tejido u órgano que constituyen. Las células emplean varios tipos de comunicación: la comunicación celular *autocrina*, en donde la señal es generada y percibida por el mismo tipo celular, dentro del mismo tejido; la comunicación celular *paracrina*, donde la señal se genera y se percibe por distintos tipos celulares dentro de un espacio contiguo definido; la comunicación celular *endocrina* que implica la secreción de hormonas al torrente sanguíneo, permitiendo que la señal tenga alcance a un órgano o tejido distante; y finalmente, la comunicación celular *yuxtacrina*, comunicación dependiente de los contactos célula-célula o célula-sustrato que es la interacción directa entre los componentes de la membrana celular de una célula con los de otra célula vecina o con la matriz extracelular (Vázquez G. et al., 2015).

1.2 Mecanobiología

Durante muchos años el estudio del comportamiento celular se centró en la influencia de los factores solubles, como: factores de crecimiento, citocinas y moléculas quimiotácticas, sobre las funciones biológicas de las células y los tejidos (Wang N. 2017). Después, los estímulos mecánicos tomaron importancia ya que también son percibidos por las células, y esto lo podemos observar ya que a pesar de que las células contienen las instrucciones de su fenotipo codificadas en su genoma, los estímulos microambientales físicos y químicos influyen en la forma y la función celular (Discher D. et al., 2009). La interacción dinámica entre las células a través de los factores solubles, la ECM y las fuerzas mecánicas del microambiente celular (un fenómeno crucial durante la organogénesis, la regeneración y la reparación de tejidos, así como la angiogénesis), permitió el surgimiento de la **mecanobiología**, ya que los mismos componentes bioquímicos pueden tener diferentes efectos sobre las células cuando los aspectos mecánicos extracelulares son alterados. La **mecanobiología**, es una rama multidisciplinaria que permite "el entendimiento de los efectos de los esfuerzos mecánicos, la geometría y la arquitectura presentes en el microambiente celular sobre las funciones y los procesos celulares", entre ellos: el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular (Iskratsch T. et al., 2014).

Cabe mencionar que el surgimiento de la mecanobiología como disciplina tiene antecedentes desde 1874, cuando Wilhem His postuló por primera vez que la célula estaba sujeta a leyes de la física; posteriormente, en 1917 D'Arcy Thompson publicó su libro titulado "*On Growth and Form*" en donde intenta describir la forma orgánica determinada por modelos matemáticos y leyes de la física, correlacionando la formación de un organismo como un material y configuración mecánica. En la década de los 50's, los efectos de la mecánica a nivel celular tuvieron mayor atención, cuando Hugh Huxley y Andrew Huxley elucidaron los elementos del aparato de actomiosina (Iskratsch T. et al., 2014). Aunado a estos hallazgos, se observó por primera vez, que algunas de las células que requieren de ECM para su anclaje y correcta función, al volverse cancerosas pueden crecer en agar suave de manera independiente de anclaje. Lo que llevó al estudio de las aberraciones de la mecanopercepción adquiridas por las células transformadas, como la formación de mamíferas; es decir, las células sobreviven y proliferan en condiciones de cultivo en suspensión, lo cual

está asociado a la desdiferenciación celular, así como la adquisición de características de malignidad por las células cancerosas y en la actualidad sigue vigente como herramienta en los estudios del cáncer (Weiswald L. et al., 2015). Posteriormente alrededor de 1970, se incrementaron los estudios dirigidos al entendimiento de la comunicación célula-ECM, con lo que se descubrieron los puntos de adhesión o complejos multiproteicos que interaccionan con las **integrinas** y que en conjunto forman las **adhesiones focales**, las cuales son responsables de establecer la unión mecánica entre la ECM y el interior celular. Poco tiempo después, se descubrió la maquinaria del **aparato de actomiosina** encargado de generar las fuerzas contráctiles durante la motilidad celular. No obstante, fue hasta los años 90's cuando se dilucidaron los procesos de mecano-transducción, gracias a nuevas herramientas y métodos como el uso de perlas magnéticas fluorescentes embebidas en sustratos elásticos empleados para cultivo celular, que al ser observadas mediante microscopía de fuerza de tracción permitieron la integración de estímulos tanto bioquímicos como de esfuerzos mecánicos a los que está expuesta la célula (Iskratsch T. et al., 2014).

1.3 Introducción a la Mecanotransducción

La **mecanotransducción**, estudia cómo la célula percibe un estímulo físico, en particular un fenómeno mecánico y lo convierte en señales bioquímicas para generar una respuesta. Los procesos moleculares dinámicos involucrados en la mecanotransducción se estudian de manera integrada empleando conocimientos de biofísica, química, biología y bioingeniería, con enfoques teóricos, experimentales y computacionales para entender la biomecánica celular (Paluch EK. et al., 2015; Parpaite T. & Coste B., 2017). Por ello, resulta importante definir algunos términos de física y mecánica, como las propiedades mecánicas de los materiales, para un mejor entendimiento de los eventos involucrados en la percepción y adaptación a un estímulo mecánico por parte de la célula.

1.3.1 Propiedades mecánicas de los materiales

En la mecanotransducción se necesita emplear materiales que permitan estudiar a las células en ambientes biomiméticos, es decir, el uso de materiales con propiedades físicas y químicas similares a los tejidos; por lo tanto, un aspecto importante en esta área es conocer las **propiedades mecánicas** de los biomateriales. El estudio de los materiales de manera general describe cómo se deforma un material en respuesta a un **esfuerzo**, el cual se define como la fuerza o tensión aplicada en una dirección, y cómo esta deformación evoluciona en el tiempo. Experimentalmente, **la pendiente** de la curva resultante de la relación entre el esfuerzo o tensión aplicada (en inglés *stress*) y la deformación (en inglés *strain*) de un material sólido **es una constante** para un material elástico y se denomina **módulo de Young o módulo elástico** (denotado como **E**) (ver [Fig.2](#)). Como su nombre lo indica, esta propiedad de los sólidos determina su **elasticidad**, es decir, su capacidad de resistencia a la deformación bajo condiciones de estrés mecánico, por lo que esencialmente es una medida de **rigidez** (en inglés *stiffness*) y su unidad de medida son los **pascales (Pa)**, lo que va directamente asociado a los métodos experimentales con los que se obtiene. Así podemos definir a un material elástico como aquel que después de deformarse, posterior a la aplicación de cierto esfuerzo, es capaz de regresar a su estado inicial cuando el esfuerzo es eliminado sin la disipación de energía (Moeendarbary E. & Harris A. 2014). Por otro lado, los fluidos bajo la aplicación de tensión ceden y no pueden almacenar energía elástica; es así que, en los **fluidos** se determina su **viscosidad**; donde dicha propiedad representa una medida de resistencia a la deformación gradual producida por otro tipo de fuerza llamada **tensión cortante** (en inglés *shear stress*). Existen materiales con ambos comportamientos, elásticos y viscosos, llamados **viscoelásticos**, que sí almacenan energía y tras la aplicación de un esfuerzo o tensión sufren deformación; se dice que estos materiales ceden, es decir, la tensión mecánica se relaja con el tiempo y cada vez se requiere menor esfuerzo para generar el mismo grado de deformación (Mohammed D. et al., 2019), un ejemplo biológico es la piel.

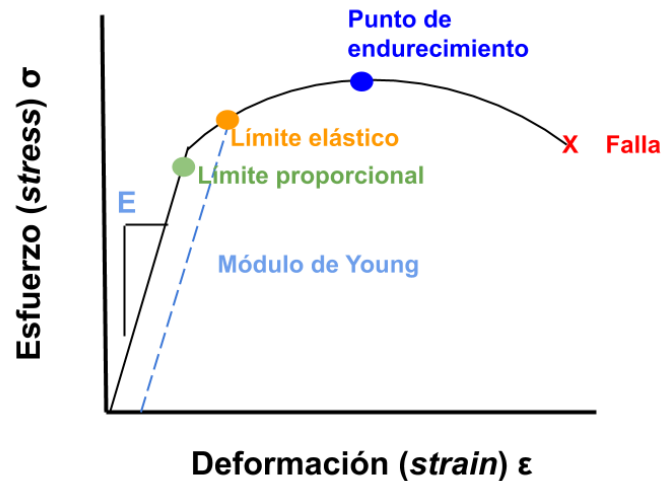


Fig. 2. Diagrama del módulo de elástico o módulo de Young. Pendiente de la *curva* resultante de la relación *esfuerzo-deformación* que nos permite conocer las propiedades mecánicas de un material. Límite proporcional (verde) y límite elástico (naranja) indican los puntos donde la deformación aún puede ser revertida por completo, generalmente pueden estar muy juntos e incluso ser los mismos; punto de endurecimiento (azul) indica la fuerza en donde el material adquiere cierta deformación irreversible y finalmente el punto de falla (rojo) es la fuerza máxima en la cual el material sufre una deformación excesiva e irreversible e incluso puede llegar a la ruptura.

1.3.2 Propiedades mecánicas de las células y de su ECM circundante

Las células han tenido que desarrollar mecanismos adaptativos para mantener su viabilidad y homeostasis, de forma interesante, siguiendo también principios de mecánica. La célula es un sistema dinámico y complejo, que está constantemente bajo condiciones de remodelación, adaptándose a las variaciones medioambientales. Por su composición y comportamiento se han definido a las células y a los tejidos como materiales viscoelásticos; por lo tanto, cuando son sometidos a una deformación almacenan y disipan energía, lo cual conduce a una relajación del estrés mecánico (Moeendarbary E. & Harris A., 2014). Sus propiedades viscoelásticas provienen de la combinación de los altos contenidos de agua con los componentes moleculares (citosol) y la matriz estructural polimerizada (citoesqueleto). El citoesqueleto está constituido por biopolímeros que le permiten a la célula tener forma y también le proporcionan propiedades mecánicas para resistir a las presiones o fuerzas ambientales (Mohammed D. et al., 2019). En conjunto, la ECM, que es una estructura reticular dinámica compuesta por una serie de proteínas que sirven de anclaje a las células, proporciona el soporte, y da el volumen, la forma y la resistencia a los tejidos, es decir, la ECM contribuye a la arquitectura y a las propiedades mecánicas características de los tejidos (Kim SH. et al., 2011).

Actualmente se conocen **las propiedades elásticas de varios órganos o tejidos**, las cuales han sido calculadas experimentalmente mediante diferentes técnicas o herramientas de medición; por lo tanto, estas aproximaciones pueden cambiar entre una técnica y otra. Sin embargo, se observó que el módulo de Young, puede variar incluso hasta en órdenes de magnitud, entre los diferentes tejidos u órganos. Es decir, la rigidez óptima para cada uno de los diferentes tipos celulares es diferente; por ejemplo, para el pulmón se ha calculado un módulo elástico de 2 kPa, para el músculo de >12 kPa, para el tendón y cartílago se eleva hasta el orden de los megapascuales, mientras que para un **hígado sano está entre 400 - 600 Pa** (Wells R. 2008; Levental I. et al., 2010; Duscher D. et al., 2014; Cantini M. et al., 2019; Janmey PA. et al., 2013). Estos datos resultan importantes para el planteamiento de modelos físico-matemáticos que se ajusten a algunas funciones celulares; así como, mediciones aproximadas valiosas para las aplicaciones biomiméticas que permitan estudiar y predecir el comportamiento de una célula o de sus componentes (procesos físico-moleculares) bajo distintos estímulos mecánicos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En los estudios de mecanotransducción se emplean distintos sustratos, como: matrices extracelulares naturales o sintéticas; estas últimas están basadas en polímeros sintéticos elásticos, que si bien no mimetizan del todo a una ECM nativa, su empleo ha sido fundamental en el estudio de la mecanotransducción. Las propiedades mecánicas de estos materiales pueden ser moduladas variando su grado de rigidez, lo que se logra modificando las proporciones de los monómeros y/o su grado de entrecruzamiento. Entre los sustratos sintéticos están los **hidrogeles de poliacrilamida** (HGPAAm), cuya estructura se define por una red tridimensional que resulta de la polimerización y el entrecruzamiento de la acrilamida y la bis-acrilamida. El nombre de estas moléculas se relaciona a su alto contenido de agua, propiedad que les confiere una consistencia blanda y elástica, siendo un material muy versátil y de gran utilidad para el cultivo celular. Otros materiales sintéticos utilizados son: 1) el **polidimetilsiloxano** (PDMS, del inglés *polydimethylsiloxane*), un elastómero de silicona biocompatible, comúnmente empleado en microfluídica y en cultivo celular; y 2) el **polimetilmetacrilato** (PMMA, del inglés *polymethylmethacrylate*) que es un termoplástico transparente de la familia de los poliacrilatos, utilizado principalmente en ortopedia (Osorio MA. et al., 2017; Wells R. 2008).

1.4 Mecanotransducción

Todos los tipos celulares se encuentran sometidos a estímulos mecánicos constantes, entre los cuales destacan: los efectos de **compresión** (presente en el tejido óseo), de **tensión** (fuerzas a las que se encuentra sometido el tejido cardiaco), de **cizallamiento** (también llamado esfuerzo o tensión cortante - en inglés *shear stress*- ejercido por el flujo sanguíneo), y de **torsión**. Existen también otros estímulos como la **presión osmótica**, el **estiramiento** (como en el caso del tejido pulmonar) y la **vibración**, entre otros (Wells R. 2008; Jansen KA. et al., 2017). Las células están activamente detectando las propiedades mecánicas de su entorno y son capaces de generar esfuerzos internos constantes **mediante el uso de su citoesqueleto y su aparato de actomiosina**, manteniendo su estrés mecánico mediante la aplicación de **fuerzas de empuje** entre sus células vecinas y ejerciendo **fuerzas de tracción** con la ECM en la que se encuentran ancladas y embebidas. La capacidad de las células de mantener su forma y estructura, les permite realizar diversos procesos celulares, tales como: el crecimiento y la división, así como, adaptarse a su microambiente para llevar a cabo sus funciones de forma óptima (Janmey PA. et al., 2013; Paluch EK. et al., 2015; Alberts, 2017; Jansen KA. et al., 2017).

El **proceso de mecanotransducción** está integrado por una serie de pasos o mecanismos moleculares que inician con un **estímulo mecánico extracelular**, el cual es percibido y convertido a señales bioquímicas por **complejos proteicos de unión** inter e intra celulares. Estos complejos transducen el estímulo intracelularmente mediante la **reorganización del citoesqueleto**, activando **efectores o factores transcripcionales** por medio de la transmisión de esfuerzos intracelulares al núcleo, regulando así procesos celulares como la proliferación, la contractilidad y la migración ([Fig.3](#)). La mecanotransducción desempeña un papel importante en el desarrollo de procesos fisiológicos como la embriogénesis, la remodelación ósea, la reparación de heridas, la fibrogénesis y la regeneración de tejidos; así como en diversos procesos patológicos, incluidos la fibrosis, la tumorigénesis y la metástasis (Díaz D. et al 2015; Pegoraro AF. et al., 2017; Wells R. 2018).

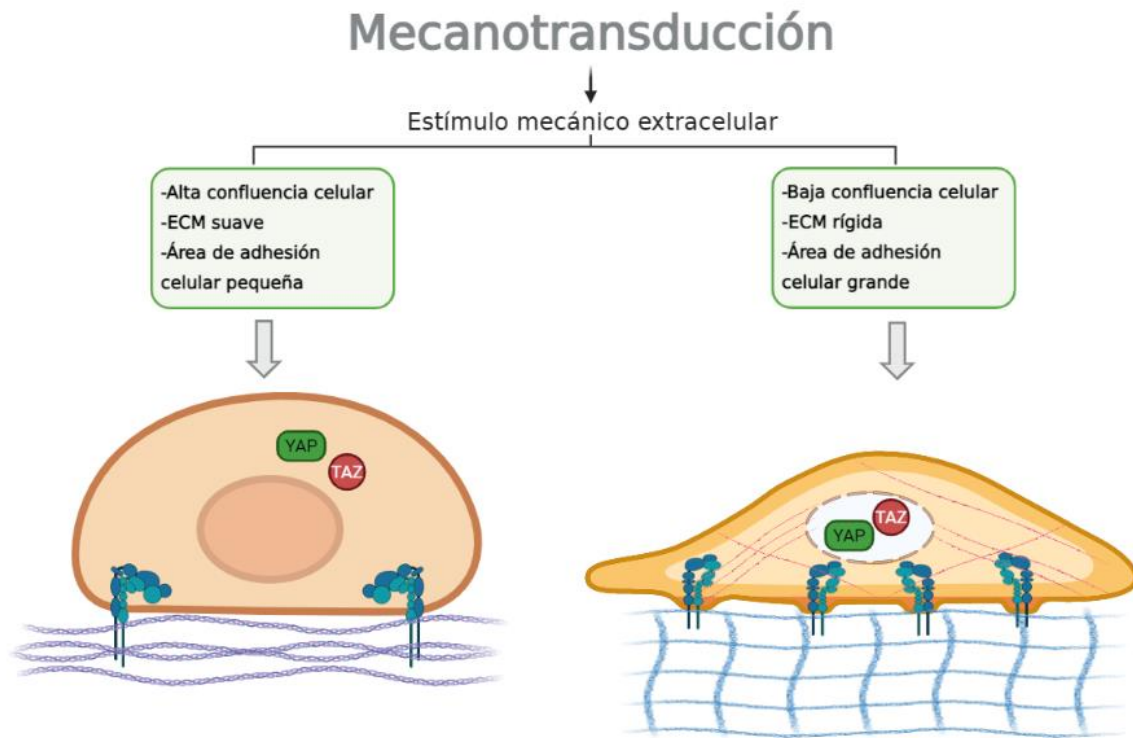


Fig. 3. Representación esquemática del proceso de mecanotransducción. Un estímulo mecánico (rigidez y entrecruzamiento de la ECM) es percibido y transformado por la célula, formando complejos de unión célula-célula o célula-MEC (integrinas), los cuales transducen el estímulo en señales bioquímicas generando el re-arreglo de su citoesqueleto; permitiéndole responder y adaptarse al medio extracelular (Creada en BioRender.com).

A continuación se describe de manera más detallada el funcionamiento y la importancia de cada uno de los componentes estructurales y moleculares involucrados en el proceso de mecanotransducción.

1.4.1 Matriz extracelular: estructura y componentes

La matriz extracelular (ECM) es una estructura dinámica de soporte mecánico para los tejidos, en la que se encuentran embebidas las células. La ECM, además, proporciona los ligandos que serán reconocidos por los receptores membranales conocidos como integrinas. Existen células especializadas en sintetizar y secretar a los componentes de la ECM; como por ejemplo, los **fibroblastos** que sintetizan principalmente colágena. La ECM está integrada principalmente por proteínas como las colágenas, la elastina, la fibronectina, las lamininas, las glicoproteínas, los proteoglicanos y los glucosaminoglicanos. Sus propiedades mecánicas son conferidas por su composición y por el diferente arreglo o entrecruzamiento de sus componentes fibrilares (Bual RP. & Ijima H., 2019). La composición, topografía y

propiedades mecánicas de la ECM dependen del tejido que conforman; estas características son determinantes en procesos de crecimiento y desarrollo, así como en la remodelación de la propia ECM. Los cambios locales de la ECM en su composición y mecánica funcionan como un sistema de retroalimentación entre la célula y su matriz circundante. Estos cambios modifican la interacción célula-ECM mediada por las integrinas, causando cambios en la forma celular y en la arquitectura tisular, lo que determinará la función celular (Díaz D. et al., 2015). Recientemente, ha sido reportada la importancia de la composición y las propiedades mecánicas de la ECM en el pronóstico de los tumores sólidos (Reid SE. et al., 2017). Los tumores poseen diferentes poblaciones celulares, algunos incluyen células madre cancerosas (CSC por sus siglas en inglés). La ECM dentro del microambiente tumoral es distinta bioquímicamente, su composición y dureza se modifican; la ECM del tumor es más rígida que la del tejido normal debido a la sobreexpresión de componentes de la ECM. La evidencia indica que estas características favorecen las condiciones para las CSC cuyas características incluyen la capacidad de autorrenovación, iniciación de tumores y la quimioresistencia (Nallanthighal S. et al., 2019).

1.4.2 Adhesiones focales (uniones célula - ECM) a través de integrinas

Como se mencionó anteriormente, las características microambientales, en particular las propiedades mecánicas extracelulares, son percibidas por las células. Para esto, las células emplean complejos multiproteicos implicados en la unión célula-matriz, dentro de los cuales tenemos a los complejos de adhesión basados en integrinas o adhesiones focales (FA, del inglés *Focal adhesions*), que están altamente relacionados con el citoesqueleto de actina. Las FA comprenden toda una maquinaria molecular que permite reconocer no sólo la composición bioquímica (ligandos), sino también características mecánicas y topográficas, como la flexibilidad y la dimensionalidad o la organización espacial del exterior celular. En conjunto, la ECM y los complejos de adhesión participan en múltiples procesos celulares, como el anclaje, la locomoción o la migración, la deformación del sustrato y la remodelación de la ECM (Geiger B. et. al., 2009). Las FA están conformadas por **heterodímeros** (subunidades α y β) **de proteínas receptoras de un cruce transmembranal**, llamadas **integrinas**. En mamíferos existen 18 subunidades α y 8 subunidades β teniendo un total de 24

heterodímeros, la combinación de las subunidades determina la afinidad del receptor por los diferentes ligandos de la ECM (Hynes RO., 2002).

Las FA se consideran complejos mecanosensores dinámicos y su funcionamiento se explica de la siguiente manera: los heterodímeros de integrinas en su estado activo, es decir, posterior a los cambios conformacionales inducidos por la unión con sus ligandos de la ECM, inician una cascada de eventos que reclutan y acoplan una serie de proteínas adaptadoras citoplasmáticas, tales como las proteínas **talina**, **vinculina**, **paxilina** y **FAK (cinasa de adhesiones focales)** (Sun Z. et al., 2016) (Fig.4). La formación de este complejo intracelular permite el ensamblaje con el citoesqueleto de actina acoplado al aparato de actomiosina (actividad de la miosina II), que activa la vía de señalización de la GTPasa Rho, permitiéndole a la célula generar esfuerzos (fuerzas de tracción) intracelulares, para percibir las propiedades mecánicas extracelulares (suavidad o dureza del sustrato) y adaptarse a ellas o comenzar la migración. Dependiendo de la propiedad de rigidez que presente la ECM, es decir, la fuerza de tracción que la célula requiera ejercer, los heterodímeros de integrinas se agruparan para reforzar los enlaces moleculares en la interfaz célula-matriz, formando un adhesoma que se recambia constantemente gracias a la retroalimentación positiva de los eventos moleculares mencionados anteriormente; la cantidad de FA formadas determina el grado de esparcimiento celular (área celular) (Cavalcanti A. et al., 2007; Zhou J. et al., 2015).

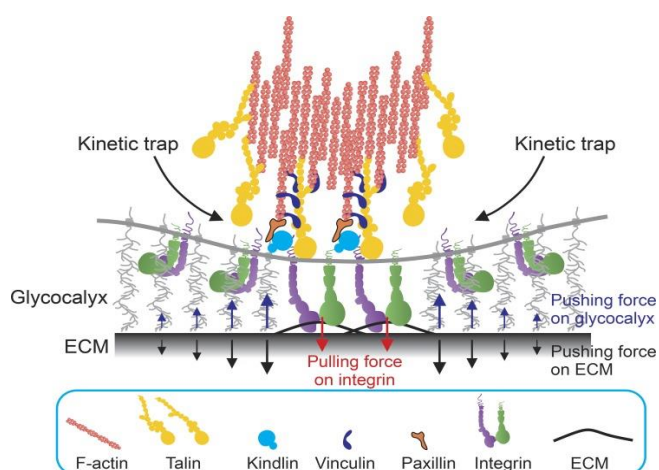


Fig. 4. Unión célula-sustrato mediada por integrinas. Complejo proteico compuesto por integrinas que unen y anclan a la célula directamente a su MEC, las colas citoplasmáticas del heterodímero de integrinas α y β que interactúan con las proteínas talina y kindlina, que a su vez reclutan a paxilina y vinculina, finalmente interactuando con el citoesqueleto de actina y el aparato de actomiosina que en conjunto ejercerán fuerzas de tracción al sustrato. Tomado de Sun Z. et al. 2016 (Fig.3).

1.4.3 El citoesqueleto como estructura mecanosensible

El citoesqueleto tiene funciones múltiples como: a) organizar en tiempo y espacio el contenido celular; b) comunicar bioquímica y físicamente a la célula con su medio extracelular; c) conferir la forma y la polaridad celular. Es una estructura que forma una red tridimensional dinámica que genera fuerzas intracelulares de empuje y tracción, que le permiten a la célula adaptarse a los cambios ambientales (Díaz D. et al., 2015).

El **citoesqueleto**, está constituido por tres principales estructuras proteicas poliméricas: 1) los **microtúbulos**, de ~ 25 nm de diámetro conformados por dímeros de tubulina α y β , son tubos huecos que emergen del centrosoma y se extienden radialmente, confiriéndoles polaridad. Los microtúbulos además tienen una gran longitud (~600 μm), lo que permite el transporte vesicular mediante las proteínas motoras cinesina y dineína, del centro a la periferia o viceversa, respectivamente. 2) Los **filamentos intermedios** son estructuras heterogéneas conformadas por más de 70 proteínas diferentes de ~ 12 nm de diámetro, que proveen la fuerza mecánica; estos filamentos unen la membrana plasmática con la lámina nuclear. Por último, 3) los **filamentos de actina o microfilamentos** de ~ 3 a 7 nm de diámetro, los cuales forman estructuras filamentosas (**F-actina**) que funcionan bajo un principio dinámico de ensamble y desensamble conocido como **polimerización y despolimerización** de monómeros de actina (**G-actina**), que junto con sus motores moleculares, las **miosinas**, tienen la capacidad de resistir a la deformación mecánica y transmitir esfuerzos (Pollard, 2016; Alberts, 2017).

El citoesqueleto es una estructura importante que participa en los mecanismos de mecanotransducción, ya que permite a la célula percibir el grado de **rigidez del sustrato**. Posterior a un estímulo mecánico, la célula transduce esta señal gracias a modificaciones, principalmente en la polimerización de sus filamentos de actina, es decir, la respuesta implica la **reorganización del citoesqueleto**, formando filamentos de actina o **fibras de estrés**, que son estructuras contráctiles gracias al acoplamiento con el aparato de actomiosina (Kumar S. et al., 2006). La dinámica del citoesqueleto se regula por varias proteínas de unión a actina, como los factores promotores de la nucleación (Arp2/3, profilina) y los factores despolimerizantes (ADF/cofilina) (Pollard, 2016). Las fuerzas de tracción encienden la vía Rho/ROCK activando a la cinasa LIM

(LIMK) que fosforila constantemente a la proteína cofilina, manteniéndola en su estado inactivo. La inhibición de la actividad de la cofilina evita la despolimerización de los filamentos de actina, ya que en su estado activo (desfosforilada) corta las fibras de actina formando G-actina (Hayakawa K. et al., 2011). La vía de Rho/ROCK también activa la proteína miosina II, ya sea por fosforilación directa de la cadena ligera (MLC) en su residuo Ser19, o por inhibición de la fosfatasa de la MLC fosforilada. La fosforilación de MLC induce la activación del aparato de actomiosina, generando la fuerza contráctil. A su vez, la formación de nuevos filamentos en forma de fibras de estrés, tienen la capacidad de transmitir la señal mecánica hasta el núcleo, ya que existen complejos proteicos llamados LINC (del inglés *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*), conformados principalmente por las proteínas SUN y Nespirina, que unen directamente el citoesqueleto con la envoltura nuclear y tienen la capacidad de deformarlo (Sosa B.A et al., 2012; Mathieu S. & Maneville JB. 2019). Esto resulta en cambios en la forma celular y tiene funciones importantes como controlar cambios fenotípicos (transición epitelio- mesénquima o EMT - por sus siglas en inglés, *epithelial-mesenchymal transition*), cambios en la tasa de proliferación, la polaridad, la capacidad de adhesión, la regulación del tráfico vesicular, el control del tamaño de los tejidos, la migración y la reparación de heridas (Speight P. et al., 2016). La alteración de la organización del citoesqueleto puede provocar cambios en la expresión génica y, por consiguiente, la alteración en la respuesta biológica. En resumen, la respuesta mecánica celular sigue el eje ECM-integrina-citoesqueleto-expresión génica (Martino F. et al., 2018).

1.5 Vías de mecanotransducción

Los estudios de las vías de mecanotransducción se enfocan en entender cómo las células responden a las señales mecánicas extracelulares y cómo los estímulos mecánicos pueden controlar múltiples aspectos del comportamiento celular incluyendo: el crecimiento y la diferenciación celular, así como, la progresión de la malignidad del cáncer. Cabe señalar que la relación final entre la mecanopercepción y la actividad transcripcional no es muy clara.

En 2011, Dupont y colaboradores, identificaron dos proteínas que responden a la polimerización y tensión del citoesqueleto de actina (**mecanotransductores**): los cofactores transcripcionales **YAP** (del inglés *Yes-associated protein*) y **TAZ** (del inglés *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*). Ambos cofactores parálogos comparten dominios estructurales altamente conservados, así como mecanismos de regulación, y son las proteínas efectoras de la ruta Hippo (Kakiuchi S. et al., 2020).

La ruta Hippo es la principal vía encargada de la regulación del tamaño de los órganos y es conocida como una importante vía supresora de tumores. La ruta Hippo está compuesta por una cascada de cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina (*Ser/Thr*). La ruta inicia con Mst-1/2 (del inglés *Mammalian Ste20-like*), que en asociación con la proteína de andamiaje Sav1 (*Salvador 1*) o WW45, fosforila a las cinasas LATS-1/2 (del inglés *Large Tumor Suppressors 1 y 2*). Las proteínas LATS-1/2 se asocian con las cinasas MOB1A y MOB1B, para fungir como reguladores negativos de YAP/TAZ (Pan D. 2010). Las cinasas LATS-1/2 fosforilan a estos coactivadores transcripcionales en residuos de serina (Ser127 principalmente); la fosforilación de los cofactores YAP/TAZ puede tener dos efectos: a) mantener su localización citoplasmática mediante su unión con la proteína 14-3-3 y b) inducir su degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteasome system*). Por otro lado, cuando las proteínas YAP/TAZ se encuentran desfosforiladas son capaces de translocarse al núcleo formando complejos transcripcionales con varios factores transcripcionales, incluyendo los miembros de la familia con dominio-TEA (**TEAD 1-4**), los cuales son los más estudiados (Zhao B. et al., 2008; Piccolo S. et al., 2014; Yu F. et al., 2015). Algunos de los genes blanco del complejo transcripcional **YAP/TAZ/TEAD** son: *CTGF*, *CYR61*, *MYC*, *AXL*, *BIRC5* y *CCND1* ([Fig.5](#)), los cuales desempeñan funciones principalmente implicadas en el crecimiento celular, polaridad, proliferación y migración celular (Zhao B. et al., 2008).

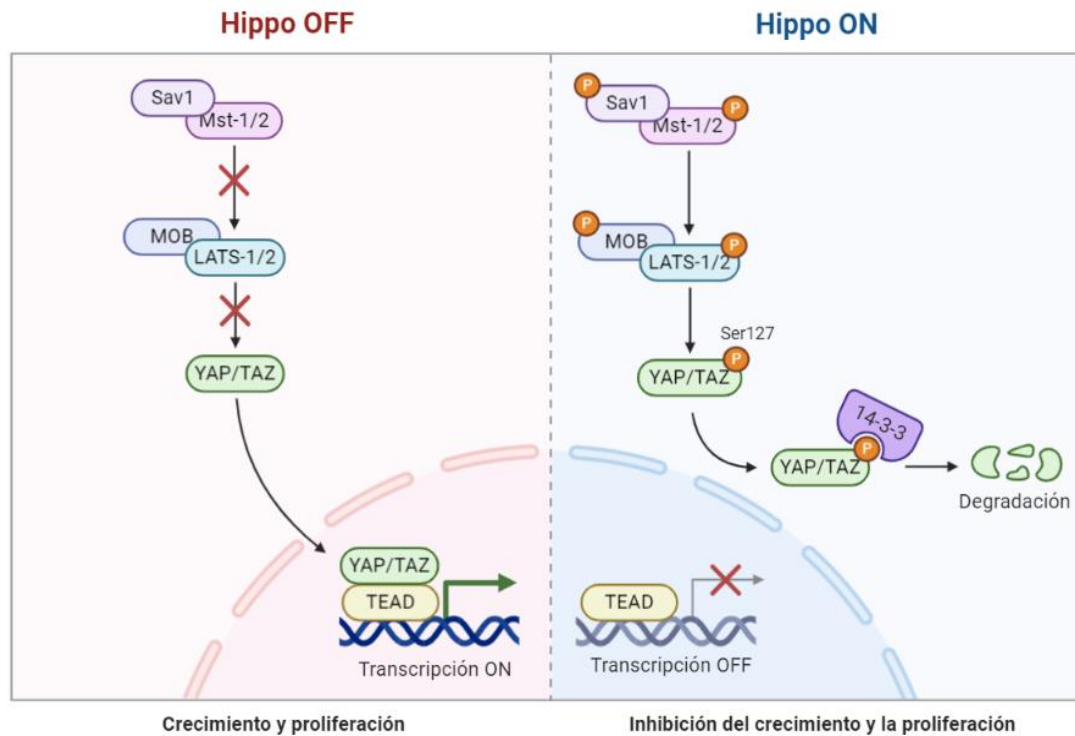


Fig. 5. Representación esquemática de la ruta Hippo. El panel de la izquierda representa la ruta en su estado apagado, es decir, las cinasas inactivas, permitiendo que las proteínas YAP/TAZ se transloquen a núcleo y se unan a su factor transcripcional TEAD; mientras que el panel de la derecha muestra la ruta Hippo encendida, las cinasas se encuentran activas y YAP/TAZ se encuentra fosforilado evitando así su entrada a núcleo. (Creada y modificada en BioRender.com)

Actualmente se ha demostrado que las proteínas YAP/TAZ responden a varios estímulos mecánicos como: el esfuerzo cortante, la forma celular, la rigidez de la ECM y la confluencia o el esparcimiento celular. Algunos autores sugieren que la **regulación de YAP/TAZ mediada por la mecánica** puede ser independiente de la ruta Hippo. Sin embargo, los mecanismos que explican la correlación entre la mecánica y la regulación de YAP aún continúan siendo tema de debate, y aunque los mecanismos están pobremente estudiados, regulan procesos fisiológicos y patológicos dependientes del contexto celular (Dupont S. et al., 2011; Aragona M. et al., 2013). Adicionalmente, otro mecanismo, como la inhibición de la proliferación por contacto celular (CIP), que presentan las células epiteliales, se podría explicar molecularmente por la inactivación de YAP/TAZ, como respuesta al confinamiento celular producido por el contacto célula-célula, ya que al inhibir o evitar su esparcimiento del área celular, su citoesqueleto tendría una menor contractilidad, manteniendo a las proteínas YAP/TAZ localizadas en el citoplasma y evitando así la transcripción de sus genes blanco (Zhao B. et al., 2007).

La activación de los cofactores YAP/TAZ, es decir, su localización subcelular nuclear, desempeña un papel importante en la proliferación y la diferenciación celular. Se ha observado que YAP/TAZ son capaces de conferir **plasticidad celular** (Pancieri T. et al., 2016), definida como la capacidad que tiene el genotipo de una célula para producir células con diferentes fenotipos en respuesta a variaciones microambientales (Ríos DG. et al., 2020). Estudios recientes en modelos *in vitro* han mostrado que TAZ es capaz de potenciar el desarrollo del cáncer en el contexto de tumores mamarios, en donde las células troncales cancerosas (CSC, del inglés *Cancer Stem Cells*) impulsan la iniciación y la progresión tumoral. En células epiteliales, TAZ forma un complejo con *Scribble* (complejo de polaridad) induciendo el proceso de EMT (Cordenonsi M. et al., 2011). Las múltiples funciones y procesos que regulan a los co-reguladores transcripcionales YAP/TAZ están altamente asociados con el desarrollo, progresión y metástasis de tumores, por eso son conocidos por ser oncoproteínas. Además, se sabe que YAP/TAZ regulan la reprogramación metabólica celular, permitiendo a las células adaptarse al microambiente tumoral (Koo J.H. & Guan K.L., 2018). Recientemente, Yamaguchi y Taouk sugirieron que la actividad de YAP/TAZ muestra un rol importante en el desarrollo de metástasis y alteraciones metabólicas, proponiendo que YAP/TAZ participan como "un eje central para el desarrollo de la metástasis, al regular tanto la adaptación metabólica celular como los cambios fenotípicos requeridos en el microambiente tumoral" (Yamaguchi & Taouk, 2020).

1.6 El hígado: arquitectura y funciones

El hígado es un órgano de arquitectura compleja, responsable de múltiples funciones metabólicas, como el metabolismo de carbohidratos y lípidos, almacenamiento de vitaminas, secreción de ácidos biliares, síntesis de proteínas del plasma sanguíneo (albúmina, urea), biotransformación de fármacos, detoxificación, entre otras (Kuntz E. & Kuntz HD., 2008). Este órgano está integrado por diferentes tipos celulares, los cuales se distribuyen en una porción parenquimatosa (hepatocitos) y una porción no parenquimatosa (células de sustento). Los hepatocitos, que representan aproximadamente el 80% del total de la composición del hígado, son las células más representativas con un fenotipo epitelial y son los encargados de mantener las principales funciones del órgano.

Además, los hepatocitos están en constante comunicación con las células de sustento, quienes proveen de la ECM y de los factores solubles necesarios para el correcto funcionamiento de los hepatocitos (Colnot S. & Perret C., 2011).

La unidad funcional del hígado es el **lobulillo hepático**, una estructura hexagonal que consiste en 6 triadas portales en la periferia (cada arista) y una vena central en el centro del lobulillo, la triada portal a su vez está conformada por la rama de la vena porta, la rama de la arteria hepática y el conducto biliar. Los hepatocitos se encuentran formando cordones distribuidos de manera radial, donde su cara apical (entre los hepatocitos) forma la red de canalículos biliares. A lo largo de los cordones, el flujo sanguíneo unidireccional (desde la triada portal hacia la vena central) es distribuido por la red vascular que contiene gradientes de oxígeno (O₂) y nutrientes, confiriendo diferentes microambientes que generan un fenómeno llamado "**zonación metabólica**", lo que se relaciona con la capacidad que tienen los hepatocitos de realizar diferentes funciones metabólicas especializadas dependiendo de la zona que conforman. Existen 3 zonas: la zona 1 o zona periportal (PP), su función es el metabolismo del glucógeno y la síntesis de colesterol; la zona 3 o pericentral (PC), su función es el metabolismo de glucosa y la síntesis de sales biliares; y la zona 2 que es la zona intermedia entre la zona 1 y 3 (Colnot S. & Perret C., 2011).

La ECM del lobulillo hepático está constituida por una red de proteínas (principalmente colágenas tipo III -reticulina- y tipo IV, fibronectina y laminina) y glucoproteínas (proteoglicanos), importantes para que los hepatocitos y las células no parenquimatosas lleven a cabo procesos celulares de adhesión, migración, diferenciación, proliferación y sobrevivencia (Delgado BA. et al., 2017). Una característica particular del hígado es su gran capacidad de regeneración, ya que por sus características funcionales y fisiológicas, es un órgano expuesto a daños constantemente, ya sea por infecciones virales, desórdenes metabólicos o por la presencia de xenobióticos. La regeneración del hígado involucra la fibrogenesis, un proceso que si se desregula puede afectar las propiedades mecánicas del hígado, dando origen a patologías y motivo por el cual se han realizado diversos estudios de investigación sobre el papel de la mecánica en este órgano.

1.6.1 La mecanotransducción en el hígado

El proceso de fibrogénesis durante la reparación o regeneración del hígado es mediado principalmente por la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC), que forman parte de las células no parenquimatosas. Su diferenciación a miofibroblastos les permite sintetizar la ECM (principalmente colágena tipo I) que sustituye el tejido dañado por tejido cicatrizal, y su activación resulta de la señalización mediada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), así como de estímulos mecánicos provenientes de la misma ECM que generan una retroalimentación positiva. Cuando el hígado se expone a un daño e inflamación crónica, el proceso de fibrogénesis se desregula, favoreciendo procesos patológicos como **fibrosis**, que a su vez predispone al desarrollo de **cirrosis** y finalmente puede progresar a un **carcinoma hepatocelular** (HCC, del inglés *hepatocarcinoma*) (Hernández V. & Friedman SL., 2011; Koyama Y. & Brenner DA., 2017).

2. ANTECEDENTES

El fenotipo de los hepatocitos está regulado por diferentes vías de señalización entre las que destacan las vías de TGF β /Smad, Wnt/ β -catenina, Notch, Hedgehog (Hh) y la ruta Hippo/YAP/TAZ (Ríos DG. et al., 2020). Fitamant y colaboradores en 2010 describieron que, en el hígado adulto, los hepatocitos expresan a los cofactores YAP y β -catenina de manera diferencial a lo largo del eje porto-central, es decir, los hepatocitos cercanos a la zona PC expresan principalmente a la proteína β -catenina, mientras que los hepatocitos de la zona PP expresan a la proteína YAP, y ambos cofactores transcripcionales muestran una localización nuclear. Experimentalmente, se ha sugerido que la especialización de las funciones metabólicas de los hepatocitos está regulada por esta distribución diferencial (Monga SPS., 2015; Colnot S. & Perret C., 2011). Además, la expresión y localización nuclear de la proteína YAP en los hepatocitos PP, se atribuye a una mayor capacidad proliferativa asociada a la generación del carcinoma hepatocelular.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de fibrosis hepática está mediado principalmente por la activación de las HSC, donde la modificación de las propiedades mecánicas de lobulillo hepático resulta en una retroalimentación positiva en la activación de las HSC para adquirir un fenotipo de miofibroblasto. Sin embargo, no ha sido demostrada una respuesta del parénquima hepático a los cambios en la rigidez dentro del tejido hepático, tal como, la EMT o el depósito de ECM fibrilar. No obstante, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que los hepatocitos experimentan una EMT parcial, o *EMT-like*, mediante el estímulo por TGF-beta (Kaimori A. et al. 2007). Taura y colaboradores en 2010 demostraron que tras el estímulo con TGF β , los hepatocitos eran capaces de sintetizar colágena tipo I, aunque no expresan a la proteína actina de músculo liso alfa (α -SMA, del inglés *alpha-smooth muscle actin*), marcador del fenotipo mesenquimal, que permite adquirir una capacidad altamente contráctil (Taura K. et al., 2010). Este fenotipo mesenquimal parcial también es promovido por las condiciones de alta rigidez presentes en las cajas de cultivo de poliestireno, con colágena I depositada en la superficie. Cultivos 3D de geles de colágena o matrigel (baja rigidez) atenúan la transdiferenciación de los hepatocitos primarios y la inducción del proceso de EMT parcial (Kim Y. & Rajagopalan P., 2010).

Se ha reportado ampliamente que los hepatocitos pierden progresivamente sus funciones metabólicas debido a las condiciones de alta rigidez presentes en las condiciones de un cultivo estándar (placas de poliestireno tratado) (Wells R. 2008). No obstante, se desconoce si los hepatocitos son capaces de percibir los cambios en la rigidez de la ECM del lobulillo hepático en el proceso de fibrosis hepática, y si estas modificaciones repercuten en su fenotipo epitelial. Desai y colaboradores en 2016 reportaron los valores de rigidez de matrices de tejido hepático sano (150 Pa en promedio) y tejido fibrótico (con un intervalo de 1 a 6 kPa, dependiendo del modelo de fibrosis hepática), ambos obtenidos mediante mediciones realizadas con microscopía de fuerza atómica (AFM). Los autores demostraron que los cambios en las propiedades de la ECM del lobulillo hepático (como la rigidez) son heterogéneos, generando microambientes mecánicos distintos; además, observaron que los hepatocitos si responden a los cambios de rigidez en microambientes mayores a 150 Pa mediante el incremento de su área celular (esparcimiento, del inglés *spreading*). El principal aporte de este grupo fue demostrar que los hepatocitos son capaces de percibir el aumento de la rigidez en su microambiente extracelular, mediante el uso de

modelos *in vitro* e *in vivo*, empleando hidrogeles de poliacrilamida (HGPAAM) con grados de rigidez controlada comparables a los de un tejido sano, un tejido fibrótico y valores de rigidez por encima de estos (<60 kPa). La respuesta de los hepatocitos, exhibida por el esparcimiento del área celular, mostró una relación entre la rigidez del tejido hepático (valores superiores a los de tejido sano) y la disminución de la expresión del factor transcripcional HNF4 α , lo que concuerda con la disminución en las funciones metabólicas de los hepatocitos como: la síntesis de albúmina, la síntesis de urea y la actividad de citocromos para el metabolismo de xenobióticos (ver Fig.6). Esto podría explicar la correlación entre la pérdida de la expresión de HNF4 α y la progresión del proceso de fibrosis en el hígado, observado en estudios con modelos *in vivo* (Yue HY. et al., 2010). Cabe señalar que en el artículo de Desai y colaboradores no se evaluó si existía alguna correlación entre el aumento en el esparcimiento celular de los hepatocitos, como respuesta a la rigidez del sustrato, y la regulación o localización subcelular de los coactivadores transcripcionales mecanosensibles YAP y TAZ (Dupont S. et al., 2011; Raghunathan VK. et al., 2014; Szeto S. et al., 2016; Kurotsu S. et al., 2020).

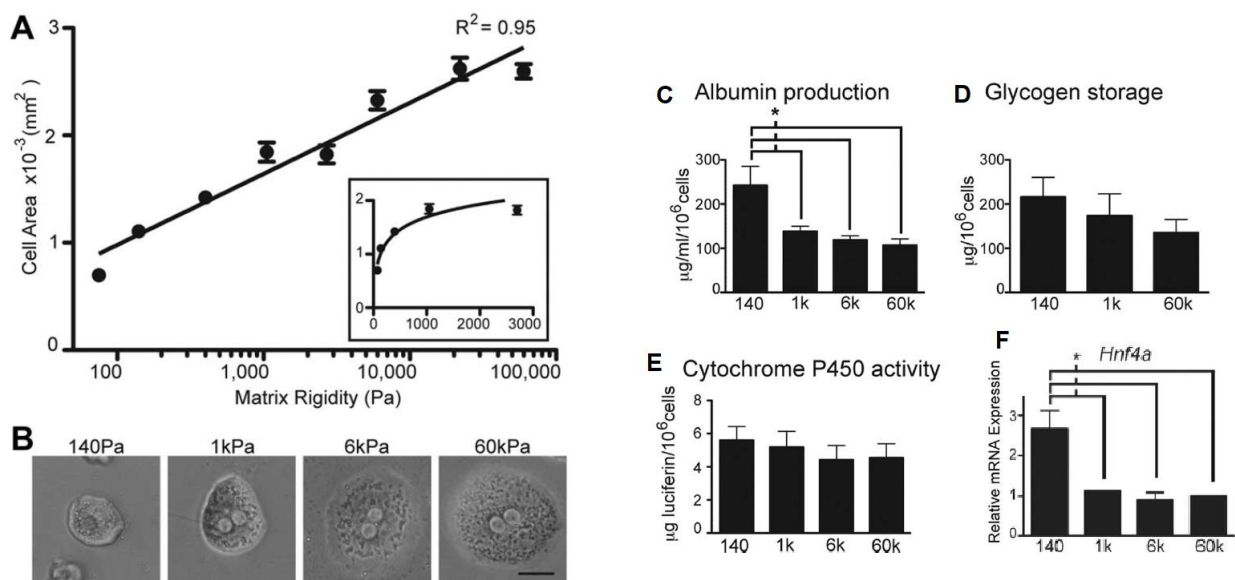


Fig. 6. Esparcimiento del área celular de hepatocitos primarios en respuesta a modificaciones en la rigidez de su matriz. A y B) Hepatocitos primarios cultivados por 24 h sobre HGPAAM de 140 Pa, 1, 6 y 60 kPa, donde el gráfico muestra la correlación del aumento de la rigidez del sustrato con el aumento en el área celular de los hepatocitos; por otro lado, en C) disminución de la síntesis de albúmina, D) disminución del almacenamiento de glucógeno, E) disminución de la actividad del citocromo P450 y F) expresión relativa del transcrito de HNF4 α ; en donde se observa que estas disminuciones están relacionadas con el aumento en el valor de rigidez del sustrato. (Modificado de Desai S. et al., 2016 Figs. 3, 4 y 5)

Los cofactores transcripcionales YAP y TAZ tienen un papel importante en los procesos fisiopatológicos del hígado; los niveles altos de la proteína YAP en los hepatocitos coincide con la pérdida de las funciones de los hepatocitos y, probablemente, esto podría explicarse porque el cofactor transcripcional YAP regula negativamente los niveles del factor transcripcional HNF4 α (Lee D. et al., 2016).

En 2018, Tschour y colaboradores sugirieron que YAP1 es indispensable para que los hepatocitos entren en la fase S del ciclo celular durante el proceso de regeneración en un modelo de hepatectomía parcial (PH). Demostraron que los hepatocitos entran en la fase S a las 32 h post-PH y a la fase M a las 48 h posteriores a la PH; esto a su vez coincide con el incremento de los marcadores de proliferación ciclina A y ciclina B en los hepatocitos.

Adicional a los trabajos mencionados anteriormente, en el año 2019 varios grupos de investigación realizaron aportaciones importantes. El grupo de Kim, utilizando un modelo de daño hepático, inducido ya sea por CCL₄ (tetracloruro de carbono) o por hepatectomía parcial (PH), sugiere la relevancia específica del cofactor transcripcional TAZ durante el proceso de regeneración hepática, siendo necesario para incrementar la proliferación celular e inhibir la apoptosis de los hepatocitos. Estos autores observaron que posterior al daño hepático (hepatectomía parcial), los niveles de la proteína TAZ incrementan a las 24, 36 y 72 h, estimulando un infiltrado inflamatorio mediado por macrófagos, que resulta en la producción de la citocina IL-6, favoreciendo el proceso de regeneración hepática. Además mencionan que, a diferencia de YAP, TAZ parece no ser necesario durante los procesos de desarrollo hepático (Kim AR. et al., 2019).

Mooring y colaboradores sugieren que existe una relación directa entre los niveles de las proteínas YAP/TAZ y la expresión la quimiocina CYR61 (uno de los principales genes blanco de YAP/TAZ/TEAD) en modelos *in vivo* de daño hepático, ya que los niveles de YAP/TAZ/CYR61 aumentan en los hepatocitos, favoreciendo el reclutamiento de los macrófagos al órgano y promoviendo la inflamación y la fibrosis. Los hallazgos muestran una correlación directa entre los niveles de YAP/TAZ y CYR61 en tejido hepático de pacientes con alto grado de esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés, *non-alcoholic steatohepatitis*) (Mooring M. et al., 2020).

Posteriormente, Noce y colaboradores, sugieren que la proteína YAP muestra una regulación directa sobre el aumento en la expresión de Snail (regulador maestro de la EMT) y la represión de HNF4 α , mediada por la ocupación directa de los promotores de dichos genes. Por otro lado, sus resultados también sugieren que HNF4 α además de mantener el estado diferenciado de los hepatocitos, es capaz de regular negativamente la expresión de los genes Snail y YAP, inhibiendo la inducción del proceso de EMT en células de cáncer hepático, al competir por la unión al factor transcripcional TEAD. Debido a que sus datos del análisis *in silico* mostraron que el promotor de Snail no presenta dominio de unión a TEAD, sugieren que la interacción de YAP con el promotor de Snail puede estar mediada por el factor transcripcional STAT3 (Noce V. et al., 2019).

Durante la realización de este proyecto, un artículo publicado por Sun y colaboradores (Sun P. et al., 2019), sugirió que el aumento en la tensión mecánica del citoesqueleto de los hepatocitos activa a la proteína YAP, desencadenando su desdiferenciación. En esta investigación, emplearon un modelo *in vitro* utilizando micropatrones para confinar el área de esparcimiento celular de los hepatocitos, con lo que lograron inhibir el proceso de desdiferenciación. Además, utilizando un cóctel molecular para inhibir la polimerización de actina y el aparato de actomiosina (Latrunculina B y Blebistatina); así como el uso de inhibidores de la ruta Hippo que llevan a la activación de YAP (Dasatinib, XAV939, LY294002), lograron mantener a los hepatocitos funcionales alrededor de 4 semanas. Latrunculina B puede unir a monómeros de actina y prevenir la polimerización; Blebistatina es un inhibidor de la actividad de la ATPasa de la miosina II y es capaz de inhibir la contracción del aparato de actomiosina; Dasatinib es un inhibidor de la cinasa *Src*, la cual tiene un papel importante en la reorganización del citoesqueleto de actina, factores de crecimiento río abajo y adhesiones focales (FA); XAV939 puede suprimir la actividad de YAP estabilizando a las proteínas de la familia de la angiomiotina a través de la inhibición de la enzima tankirasa (Wang W. et al., 2015); y LY294002 es un inhibidor de PI3K, ya que varios factores solubles pueden inducir la acumulación nuclear de YAP vía PI3K (Fan et al., 2013). De forma interesante, proponen que estos hallazgos podrían ser probados utilizando sustratos con diferente módulo elástico.

Recientemente, el grupo de Meyer y colaboradores observaron que en el proceso de regeneración hepática la red de canalículos biliares se contrae, como un mecanismo compensatorio a la sobreexposición a sales biliares, mediado por el aumento en la contracción del aparato de actomiosina, la formación de fibras de estrés (F-actina) y a la fosforilación de la proteína miosina. Sus datos mostraron que el aumento en la tensión del citoesqueleto de actina, así como, el enriquecimiento de la proteína YAP nuclear coincide con la región de la superficie apical de los hepatocitos situados en el eje PC-PP, misma que forma al canalículo biliar. Estas observaciones sugieren que dicha tensión promueve la activación del **cofactor transcripcional YAP** (localización nuclear), actuando como un **interruptor molecular en el proceso de regeneración hepática** a través de favorecer procesos de proliferación celular (Meyer K. et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento detallado del desarrollo de los procesos fisiopatológicos, como la fibrosis y el cáncer, resulta de gran interés en las áreas médico-biológicas, particularmente, en el estudio del desarrollo de las enfermedades hepáticas. Según el *National Center for Health Statistics*, las muertes relacionadas con una enfermedad hepática representan la segunda causa de muerte a nivel mundial, alcanzando una cifra de 2 millones de muertes por año. Las enfermedades hepáticas crónicas principales son: **1)** de origen viral (hepatitis B -*CHB*, por sus siglas en inglés- y hepatitis C -*CHC*, por sus siglas en inglés-); **2)** hepatitis de origen no alcohólico (*NAFLD*, por sus siglas en inglés *non-alcoholic fatty liver disease*) y **3)** hepatitis de origen alcohólico (*ALD*, por sus siglas en inglés *alcoholic liver disease*). En general, estas enfermedades evolucionan a **cirrosis hepática**, una enfermedad de alta incidencia en México y el mundo, que representa una de las principales causas de muerte debido a que da origen a cerca del 90% de los **carcinomas hepatocelulares** (HCC, por sus siglas en inglés *Hepatocellular carcinoma*) y el tratamiento está limitado al trasplante hepático (Paik JM. et al. 2020; Rev.Fac.Med 2017). De aquí, que es importante que la investigación básica continúe sus esfuerzos en el estudio de los procesos biológicos y moleculares involucrados en la pérdida de la función hepática a causa del depósito exacerbado de ECM, para poder dar pauta al desarrollo y prueba de nuevos métodos

terapéuticos y/o diagnósticos oportunos de las alteraciones generadas. Para entender los mecanismos moleculares implicados, muchas veces es necesario el uso del cultivo de las células hepáticas y, particularmente, el cultivo de hepatocitos ha representado un gran reto, esto debido a que los hepatocitos una vez que son cultivados (bajo condiciones de cultivo convencional) pierden gran parte de sus funciones y su morfología a las pocas horas de cultivo. Debido a esto, muchos grupos de investigación han empleado técnicas novedosas con ambientes biomiméticos, incluyendo las propiedades mecánicas extracelulares, que permiten el mantenimiento de la función y morfología de los hepatocitos; sin embargo, los resultados obtenidos han sido limitados en la preservación de las funciones hepáticas (Kim Y. & Rajagopalan P., 2010; Desai S. et al., 2016; Sun P. et al., 2019). El mantenimiento de las funciones de los hepatocitos *in vitro* permitirá estudiar de modo sistemático los efectos que tienen los factores de crecimiento y los factores mecánicos que participan en los diferentes procesos fisiopatológicos y en la regulación del fenotipo de los hepatocitos.

Actualmente se sabe que el desarrollo de procesos fisiopatológicos en otros tipos celulares, tales como: el cambio de su fenotipo (transición epitelio-mesénquima), la migración y la proliferación de células tumorales, está relacionado con cambios en la composición y la estructura de los tejidos, así como con la activación de los efectores de la ruta Hippo, las proteínas YAP y TAZ. La transcripción de sus genes blanco está altamente asociada a la progresión y la malignidad de diferentes tipos de cáncer (Zhao B. et al., 2008; Piccolo S. et al., 2014; Yu F. et al., 2015). Esto ha hecho que las proteínas YAP y TAZ sean un blanco molecular muy estudiado. Sorprendentemente, todavía no se ha estudiado el umbral de activación de estas proteínas en el contexto de los hepatocitos primarios regulados por la mecánica, aún no ha sido estudiado. El presente estudio tiene la finalidad de conocer si la mecánica del sustrato de cultivo, las condiciones de rigidez propiamente, ejercen una regulación sobre los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ en los hepatocitos primarios.

4. HIPÓTESIS

Los estímulos mecánicos son interpretados de manera diferencial dependiendo del contexto y función celular, **si** las células epiteliales hepáticas normales y transformadas responden diferencialmente a los cambios en la rigidez mediante el esparcimiento y la reorganización de su citoesqueleto de actina **entonces** en estas células existirá una activación diferencial de las proteínas mecanosensibles YAP y TAZ que será dependiente de la rigidez del sustrato de cultivo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

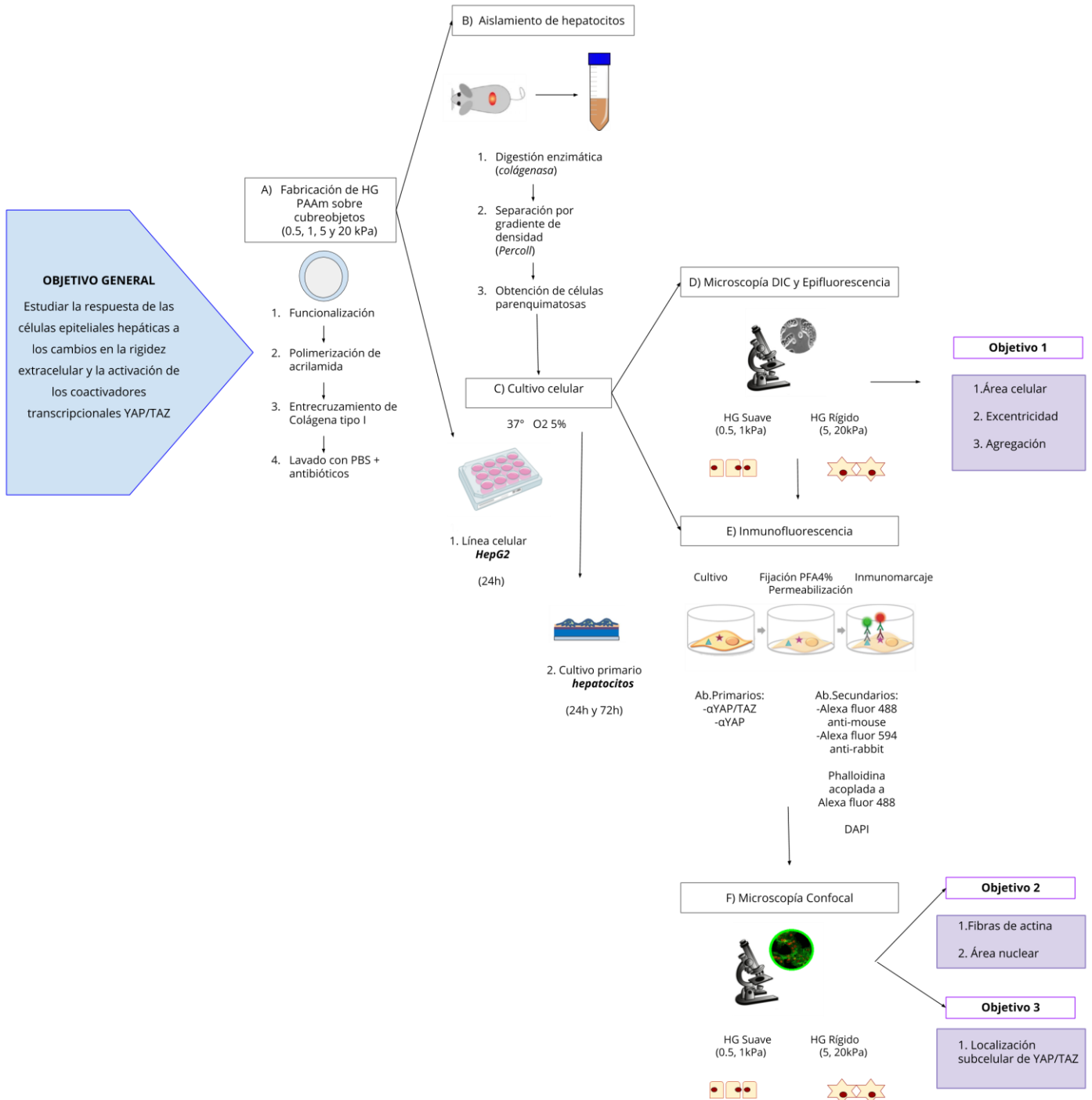
Estudiar los cambios morfológicos de hepatocitos normales y transformados, así como la activación de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ, en respuesta a los cambios en la rigidez de los sustratos de cultivo.

5.2 Objetivos particulares:

1. Evaluar la respuesta temprana y tardía de hepatocitos normales y transformados cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez, mediante cambios en el esparcimiento (área), la circularidad (excentricidad) y la agregación celular.
2. Evaluar la respuesta de los hepatocitos primarios normales cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez, mediante la formación de filamentos de actina (F-actina) y la deformación nuclear.
3. Caracterizar la localización subcelular de las proteínas YAP y TAZ en hepatocitos primarios normales y transformados cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama ilustra la metodología aplicada para la obtención de cada objetivo planteado en este proyecto:



Para el cumplimiento de los objetivos particulares se realizaron las siguientes metodologías:

A) La fabricación de HGPAAm con rigidez de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa.

B) El aislamiento de hepatocitos primarios de rata Wistar mediante la digestión enzimática de la ECM con colagenasa y la separación del parénquima hepático por gradiente de densidad.

C) Cultivo celular de las células epiteliales hepáticas, el cual se dividió en:

1) Cultivo primario de hepatocitos de rata.

2) Cultivo de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

Ambos tipos celulares se sembraron sobre los HGPAAm, previamente fabricados.

Específicamente para el objetivo 1, se realizó la siguiente metodología:

C) Microscopía de contraste de interferencia diferencial (*DIC*, por sus siglas en inglés)

Para el cumplimiento de los objetivos 2 y 3 se procedió a la realización de las siguientes metodologías:

E) Marcaje fluorescente, el cual se dividió en:

1. Inmunofluorescencia de las proteínas YAP/TAZ.

2. Marcaje de la actina filamentosa (F-actina) mediante el uso de faloidina acoplada a Alexa-488.

3. Marcaje de núcleo mediante el uso de DAPI, fluorocromo que se intercala en el DNA de doble cadena.

F) Microscopía Confocal, empleada para detectar la localización subcelular de las proteínas YAP/TAZ; la detección de la disposición de la F-actina y el área nuclear.

7. MÉTODOS

7.1 Hidrogeles de poliacrilamida (HGPAAm)

Los hidrogeles de poliacrilamida se fabricaron mezclando los monómeros de acrilamida presentes en una solución del 40% y bis-acrilamida al 2% (Sigma-Aldrich). Para obtener los diferentes grados de rigidez (0.5, 1, 5 y 20 kPa) se utilizaron diferentes proporciones de cada solución según lo recomienda [Tse JR & Engler AJ 2010](#) (ver [Tabla 1](#)); los stocks de las diferentes mezclas de poliacrilamida se desecaron durante 20 min y se almacenaron a 4 °C.

Los HGPAAm fueron polimerizados sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 20 mm con un tratamiento previo con una solución de NaOH 0.1M, 3-Aminopropiltrietoxisilano (APTES) al 100% y glutaraldehído al 0.5%, para adicionar radicales libres y así favorecer la unión con la poliacrilamida. Para la polimerización de los HGPAAm, en un microtubo de 1.5 ml se colocaron 989 µL de la mezcla de poliacrilamida, 10 µL del agente entrecruzante APS al 10% (persulfato de amonio) y 1 µL del catalizador TEMED al 1%; finalmente se mezcló con vortex por 10 seg. Se depositaron 100 µL sobre un portaobjeto previamente silanizado (la silanización es un tratamiento químico en el cual se prepara la superficie del portaobjetos exponiéndolos a Diclorodimetilsilano (DCDMS) durante 1 h, para evitar que el hidrogel quede adherido a la superficie de vidrio), se colocó el cubreobjeto redondo con la cara funcionalizada sobre la gota durante 30 min a temperatura ambiente (TA) (Cretu A. et. al., 2010). Una vez polimerizados se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X (del inglés *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) en agitación orbital a TA.

Posteriormente la proteína comercial colágena tipo I (Col. I), aislada de tendón de cola de rata (Corning ®) se conjugó sobre la superficie del HGPAAm, utilizando una concentración de 0.1 mg/ml de Col. I disuelta en ácido acético 20 mM y empleando el fotoiniciador Irgacure 2959. En un microtubo de 1.5 ml, se realizó una mezcla con 833.33 µL de Col. I (0.1mg/ml), 95.24 µL del fotoiniciador Irgacure 2959 al 10% (*2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone*) y 71.43 µL de ácido acrílico NHS-esterificado al 2%. Inmediatamente se colocaron 100 µL de la mezcla en cada HGPAAm y la conjugación se llevó a cabo mediante el método de entrecruzamiento

por exposición a luz UV, con una longitud de onda de 365 nm durante 3 min (UVP *cross-linker* CL-1000L).

Finalmente los HGPAAm fueron esterilizados realizando 5 lavados con PBS 1x más antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina 10,000 U/ml) previo al cultivo celular.

	500 Pa	1 kPa	5 kPa	20 kPa
Acrilamida 40%	75 μ L	125 μ L	125 μ L	200 μ L
Bis-acrilamida 2%	30 μ L	15 μ L	75 μ L	132 μ L
dH ₂ O	895 μ L	860 μ L	800 μ L	668 μ L

Todas las mezclas fueron polimerizadas con:
10 μ L de APS al 10% + 1 μ L de TEMED

Tabla 1. Proporciones para hidrogeles de poliacrilamida. Se muestran las cantidades específicas utilizadas para preparar 1 ml de mezcla para los diferentes módulos elásticos de los HGPAAm, las cantidades fueron adaptadas según [Tse JR & Engler AJ 2010](#).

Las propiedades elásticas de los HGPAAm son verificadas en el **LaNSBioDyT** (Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia de la Facultad de Ciencias, UNAM), mediante la técnica de **microindentación** se estima su módulo de Young, empleando el equipo FT-MTA02 de la marca Femto Tools. Se realizaron 4 mediciones por cada HGPAAm, sobre el centro de la muestra en un área de 1 mm² (datos generados por Cabriales L. y Zamarrón D. en el LaNSBioDyT).

NOTA: Como control (CT) se utilizaron condiciones de cultivo tradicional, es decir, cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena comercial tipo I, los cuales poseen una rigidez dentro del orden de los gigapascales (Gpa) (Iskratsch T. et al., 2014, Guimarães CF. et al., 2020, Taura K. et. al., 2010)

7.2 Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de rata

Los Comités Institucionales del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular (IFC) y de la Facultad de Ciencias (UNAM), aprobaron todos los protocolos animales de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999, con el número PI_2019_02_004 aprobado el 27 de febrero del 2019. Se aislaron los hepatocitos primarios de ratas Wistar CRL-WI jóvenes (250 g), mediante una adaptación del método descrito por Berry y Friend (1969) y Seglen (1972). El hígado se perfundió a través de la canulación de la vena porta, con una primera solución amortiguadora fisiológica, libre de Ca^{2+} (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, HEPES pH 7.5 10 mM) a 37 °C, durante 10 min, aproximadamente. Posteriormente, se realizó la digestión enzimática de la ECM del hígado, así como la extracción de las células parenquimatosas y no parenquimatosas, para lo que se perfundió, por aproximadamente 8 min más, con la misma solución fisiológica a la que se le añadió Ca^{2+} (CaCl_2 3 mM y MgSO_4 1.2 mM) y la enzima colagenasa IV a 0.6 mg/ml (Sigma-Aldrich). Ambas soluciones se perfundieron a 37 °C, con un flujo de 8 ml/min utilizando una bomba peristáltica. Una vez que el hígado alcanzó una consistencia suave, se maceró en una caja petri de 100 mm y el contenido se filtró y se depositó en un tubo cónico de 50 ml, empleando un filtro para células, con un poro de 100 μm . Los hepatocitos se separaron por centrifugación a 18 x g (400 rpm) por 2 min a 37 °C y a partir de este paso se trabajó en condiciones de esterilidad; se realizaron 4 lavados con medio Williams' E (Sigma Aldrich) para eliminar debris celulares. Los hepatocitos con una viabilidad > 60% se separaron en una solución 1:1 mediante un gradiente de densidad por Percoll (GE Healthcare) (10:1:0.1 Percoll:HBSS:HEPES), centrifugados a 72 x g (800 rpm) por 5 min a 37 °C. Se evaluó la viabilidad celular usando la tinción con azul de tripano al 0.4%, en una solución 1:1 (Shen L. et al., 2012).

7.3 Cultivo celular

Cultivo celular de hepatocitos primarios de rata

Los hepatocitos primarios aislados se resuspendieron en medio *attachment* (DMEM-F12 suplementado con GlutaMAX (L-glutamina) 2.5 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 100 mM, anfotericina B 0.5 µg/ml, insulina, transferrina y selenito de sodio al 1%, suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS por sus siglas en inglés) al 10% y antibióticos (gentamicina 0.5 µg/ml, sulfametoxazol y trimetoprima 0.2 mg/ml). Los hepatocitos fueron cultivados a una densidad de 2.5×10^5 células/HGPAAm en placas de cultivo de 12 pozos durante 2 a 4 h para su adhesión. Posteriormente, los hepatocitos se mantuvieron en cultivo con medio *feeding* (medio *attachment* libre de FBS) en condiciones estándar de cultivo en una atmósfera húmeda (80% humedad), CO₂ 5% a 37 °C, y las células se analizaron a 24, 48 y 120 h, después de haberse adherido.

Cultivo celular de la línea HepG2

La línea celular HepG2, proveniente de un carcinoma hepatocelular humano con morfología epitelial, se cultivó a una densidad de 3.5×10^3 células/HGPAAm en placas de cultivo de 12 pozos. Las células HepG2 se mantuvieron en cultivo con medio MEM (*Minimum Essential Media*), 1 mM de piruvato de sodio, suplementado con FBS al 10% más antibióticos al 1% (penicilina-estreptomina 10,000 U/ml), bajo condiciones de cultivo estándar de 80% de humedad, CO₂ 5% a 37 °C, durante 24h.

7.4. Marcaje por fluorescencia

La detección de las proteínas YAP/TAZ se realizó mediante inmunofluorescencia, para lo cual las células fueron procesadas de la siguiente manera: se lavaron con PBS 1X a 37 °C, e inmediatamente se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X a 37 °C durante 20 min. Una vez fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X durante 10 min en agitación a TA. Posteriormente se realizó el bloqueo con albúmina bovina fracción V al 0.1% más suero de caballo al 10% en PBS 1X incubado por 60 min en agitación a TA. Las células se incubaron en cámara húmeda toda la noche, con un anticuerpo primario anti-YAP (63.7) de Santa Cruz (SC-101199, monoclonal de ratón) que reconoce a ambas proteínas YAP y TAZ, diluido 1:200 en solución de bloqueo a 4 °C. El anticuerpo secundario (anti-ratón) acoplado a

Alexa-fluor 488, diluido 1:500 en PBS 1X fue incubado durante 90 min a TA, cubierto de la luz.

La detección de la actina filamentosa (F-actina) se realizó mediante un marcaje fluorescente utilizando el fluoróforo Alexa-fluor 488-acoplado a Faloidina. Las células se procesaron de manera similar a la inmunofluorescencia, hasta el paso de permeabilización con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X; posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y se incubaron con faloidina a una dilución 1:250 en PBS 1X durante 60 min TA, cubierto de la luz.

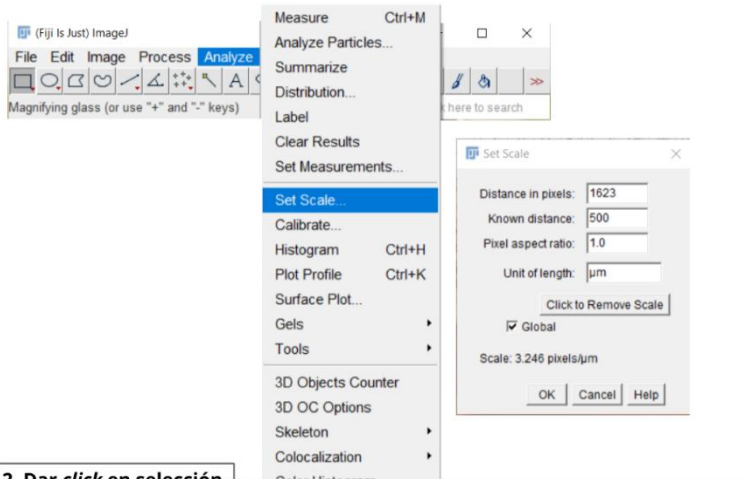
Para ambos procedimientos se continuó con el marcaje del núcleo con DAPI 1:500 en PBS 1X durante 10 min a TA, y en seguida se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 10 min cada uno y 1 enjuague con agua desionizada para retirar el exceso de sales. Finalmente, las muestras fueron montadas y preservadas con Mowiol (hidrocoloide mucoadhesivo soluble en agua basado en poli-vinil-alcohol, biocompatible con muestras de fluorescencia) 120 μ L/HGPAAm (Nota: se utiliza un volumen alto para evitar la deshidratación del HGPAAm) sobre cubreobjetos rectangulares, ya que esto nos permitirá estar dentro de la distancia de trabajo de enfoque en el microscopio invertido, evitando enfocar a través del HGPAAm.

7.5 Toma y análisis de imágenes

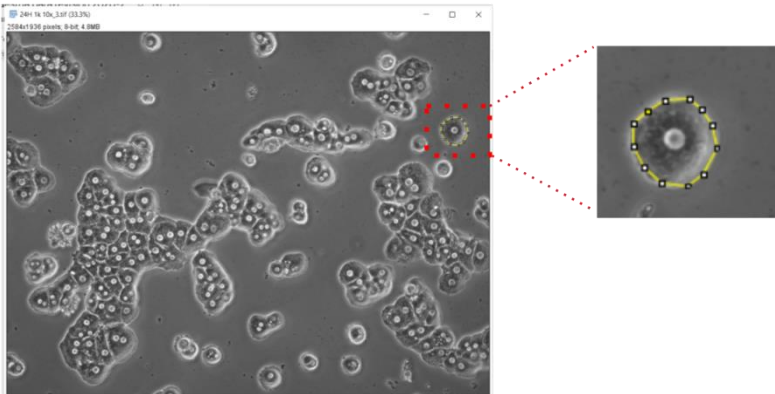
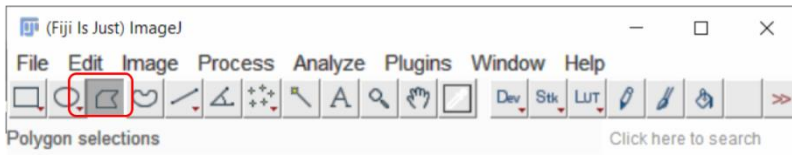
Microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC)

Las imágenes de campo claro se obtuvieron con el microscopio invertido *Nikon Eclipse Ti-S system*, empleando el objetivo 10x se tomaron 5 campos por condición. Las imágenes se utilizaron para la medición manual del área celular y la circularidad de la célula; el criterio para el análisis fue incluir sólo células individuales y/o binucleadas. El método se describe en el siguiente diagrama, se cuantificaron 5 células por foto con un total de 50 células:

1. Ajustar escala
 Dar *click* en "Analyze" → "Set scale"
 → Introducir datos: a) Distancia en pixeles
 b) Distancia conocida en μm



2. Dar *click* en selección poligonal

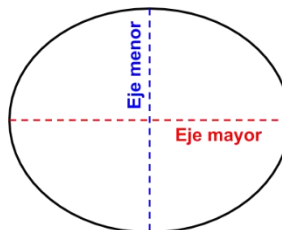


3. Seleccionar manualmente el contorno de la célula

4. Medición del área y excentricidad celular
 a) Dar *click* en "Analyze" → "Set Measurements"
 → Seleccionar "Area" y "Fit ellipse"
 b) Dar *click* en "Analyze" → "Measure" los datos obtenidos se colocan en una hoja de excel para su posterior análisis.

	Area	Major	Minor	Angle
1	16119	147.668	138.983	108.784

NOTA: Para estimar la "excentricidad celular" se considera a las células como una elipse, el resultado de la división del eje menor entre el eje mayor nos permite conocer qué tan circular es, por lo que, célula circular será toda aquella que posea valores cercanos o iguales a 1, y valores cercanos a 0 menor circular.



Microscopía de epifluorescencia

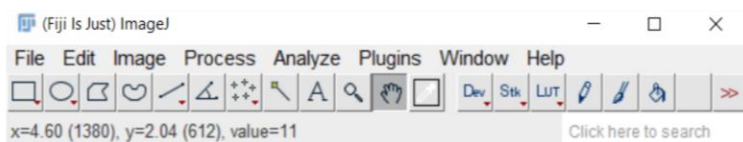
Las imágenes de epifluorescencia se tomaron con un microscopio *Nikon Eclipse Ci-L*, utilizando el objetivo 40x y se tomaron 5 campos por condición. Se procesaron las imágenes de la marca nuclear DAPI, fueron procesadas para la cuantificación semiautomática de agregados celulares. Se realizó con el programa Image J, empleando una máscara binaria, en donde por medio de un filtro Gaussiano permite que el programa reconozca solo estructuras circulares de un área determinada y finalmente se filtra por umbral de intensidad de fluorescencia. El procedimiento se explica en el siguiente diagrama:

1. Ajustar imagen a escala de grises 8-bit
Dar click en "Image" → "Type" → 8-bit
Crear una copia de la imagen actual →
"Ctrl+Shift+D"
*Se trabajará sobre la copia

2. Ajustar barra de escala
Dar click en "Analyze" → "Set scale"
→ Introducir datos: a) Distancia en pixeles
b) Distancia conocida

3. Aplicar máscara binaria

- Aplicar filtro Gaussiano → "Process" → "Filters" → "Gaussian Blur"
Se abrirá ventana emergente "Sigma (radius)" ajustar ~0.5
- Invertir imagen → "Edit" → "Invert" o "Ctrl+Shift+I"
- Ajustar el umbral (a incluir) → "Image" → "Adjust" → "Threshold" "Ctrl+Shift+T"
(Modificar algoritmos (Barras de intensidad para cubrir la mayoría de céls) → "Apply" = *Máscara binaria*)
- Algoritmo de Watershed (para separar núcleos) → "Process" → "Binary" → "Watershed"
- Filtrar por A² de núcleos
A² mayor y menor → "Analyze" → "Set measurements"
→ "Measure"

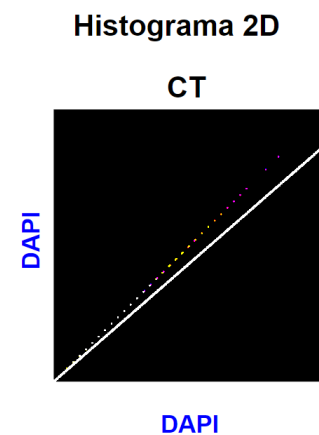


Una vez definidos los núcleos se cuantificaron los agregados celulares de manera manual, utilizando 5 fotos por cada condición de 2 experimentos independientes.

Microscopía confocal

Las muestras fueron analizadas a través de microscopía confocal (*TCS-SP8, Leica*), para lo cual se obtuvieron **cortes en z** utilizando el objetivo de inmersión 63x, obteniendo reconstrucciones 3D y proyecciones máximas. Se utilizaron las imágenes para analizar la disposición de la F-actina, la localización subcelular de las proteínas YAP/TAZ, la correlación de la marca nuclear de YAP/TAZ y DAPI, empleando el Coeficiente de Pearson y el área nuclear.

Coeficiente de correlación ρ (fuerza y sentido de relación lineal)	
$\pm 0.96-1.0$	Perfecta
$\pm 0.85-0.95$	Fuerte
$\pm 0.70-0.84$	Significativa
$\pm 0.50-0.69$	Moderada
$\pm 0.20-0.49$	Débil
$\pm 0.10-0.19$	Muy débil
$\pm 0.0-0.09$	Nula



Nota: El histograma muestra la correlación utilizada como control de la prueba de coeficiente de correlación de Pearson, en el cual se tomó la fluorescencia del núcleo marcada con DAPI, contra la misma marca fluorescente de DAPI, cuya ρ es igual a 1, es decir, la marca tiene una correlación perfecta.

Cuantificación y estadística

Todas las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el *software* libre ImageJ. Los análisis y resultados mostrados fueron obtenidos a partir de al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado a través del *software* GraphPad Prism 8, empleando ANOVA de una vía y el método de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluar la respuesta temprana y tardía de los hepatocitos normales y transformados cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez, mediante cambios en el esparcimiento (área), la circularidad y la agregación celular.

8.1.1 Los hepatocitos normales y transformados responden a la rigidez mediante el esparcimiento del área y su deformación celular.

Estudios recientes han reportado que los hepatocitos primarios de ratón responden a la rigidez de su sustrato (hidrogeles de PAAm) con un módulo elástico ≥ 10 kPa (Li CY. et al., 2014; Desai S. et al., 2016), incrementando hasta el doble de su área celular posterior a 12 h de cultivo. Para confirmar previos resultados, se decidió evaluar la respuesta de los hepatocitos primarios de rata, utilizando hidrogeles de PAAm con los siguientes valores de rigidez 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa, conjugados con la proteína comercial colágena tipo I (Col. I), como se describe previamente; considerando como sustratos suaves los hidrogeles con un módulo elástico de < 1 kPa y rígidos los de 20 kPa. Se decidió no utilizar módulos elásticos < 500 Pa, debido a que la población de los hepatocitos primarios adheridos al sustrato disminuyó considerablemente. Conforme a los resultados esperados, los hepatocitos cultivados durante 24 h en sustratos rígidos mostraron una diferencia significativa en el aumento de su área celular ($1332 \pm 199.7 \mu\text{m}^2$), comparado con el área de los hepatocitos cultivados en sustratos suaves de 500 Pa ($504.5 \pm 96.9 \mu\text{m}^2$) ([Fig.7 A y B](#)). Por otro lado, la respuesta fue menor en los hepatocitos transformados derivados de un hepatocarcinoma (línea celular humana HepG2) cultivados durante 24 h, pues sólo aumentaron 1.4 veces más su área celular en sustratos rígidos, en comparación con los hepatocitos normales que aumentaron su esparcimiento celular 2.2 veces más ([Fig.8 A y B](#)); sin embargo, los resultados en las HepG2 también muestran una diferencia significativa en el incremento de su esparcimiento celular, pasando de un área de $648.3 \pm 168.2 \mu\text{m}^2$ en sustratos suaves de 500 Pa a $926.2 \pm 265.1 \mu\text{m}^2$ en sustratos rígidos de 20 kPa, como respuesta a las condiciones mecánicas ([Fig.8 B](#)). Para evaluar si el aumento en el esparcimiento del área celular se mantiene a lo largo del tiempo, se decidió analizar la respuesta de los hepatocitos primarios normales en cultivo durante 48 y 72 h. Los resultados permitieron observar que los hepatocitos

normales cultivados en sustratos con un módulo elástico de 500 Pa mantuvieron un área celular menor a las 1000 μm^2 ($804.3 \pm 141.1 \mu\text{m}^2$ para el cultivo de 48 h y $976.6 \pm 214.8 \mu\text{m}^2$ para 72 h de cultivo). En contraste, los hepatocitos normales cultivados sobre sustratos rígidos incrementaron su área superando las 3000 μm^2 ($2221 \pm 787.9 \mu\text{m}^2$ para 48 h y $3023 \pm 1035 \mu\text{m}^2$ para 72 h de cultivo), mostrando un aumento de casi el 100% en su área celular ($\sim 1000 \mu\text{m}^2$) por día de cultivo ([Fig.7 B](#)).

Adicionalmente, se observó que los hepatocitos normales y transformados cultivados sobre sustratos de 500 Pa y 1 kPa parecían mantener su forma celular casi circular a lo largo del tiempo, mientras que los hepatocitos cultivados sobre HGPAAm con un módulo elástico de 5 y 20 kPa, además de mostrar un aumento en su área celular, sus características morfológicas se modificaron hacia un fenotipo tipo mesénquimal, donde cambia su forma circular a estrellada, pasando de circular a elíptica (excentricidad) ([Fig.7 A y C](#)). Para comprobar dichas observaciones se decidió evaluar la característica de excentricidad celular, indicando el aspecto de su eje mayor contra su eje menor; es decir, que tan circulares se mantienen, de esta manera un hepatocito circular será todo aquel que posea valores cercanos o iguales a 1. El análisis mostró que efectivamente los hepatocitos normales cultivados sobre sustratos suaves a lo largo del tiempo mantuvieron valores cercanos a 1, su valor promedio en cultivo de 24 h fue de 0.93 ± 0.05 , el cual disminuyó a 0.83 ± 0.10 en cultivo de 72 h; a diferencia de los hepatocitos cultivados sobre sustratos rígidos los cuales pasaron de un valor de 0.85 ± 0.08 en 24 h de cultivo a 0.37 ± 0.17 en 72 h de cultivo, es decir, su circularidad disminuyó más de un 50% ([Fig.7 C](#)). Por otro lado, los hepatocitos transformados parecieron responder más rápido en términos de deformación ([Fig.8 A](#)), ya que al ser analizados posterior a 24 h de cultivo, pasaron de un valor promedio de 0.92 ± 0.08 en sustratos suaves, muy similar a los resultados obtenidos en hepatocitos normales, a un valor de 0.60 ± 0.18 en HGPAAm de 20 kPa, cercano al valor promedio de excentricidad obtenido para hepatocitos normales cultivados por 48 h en el mismo valor de rigidez (0.65 ± 0.20) ([Fig.8 C](#)).

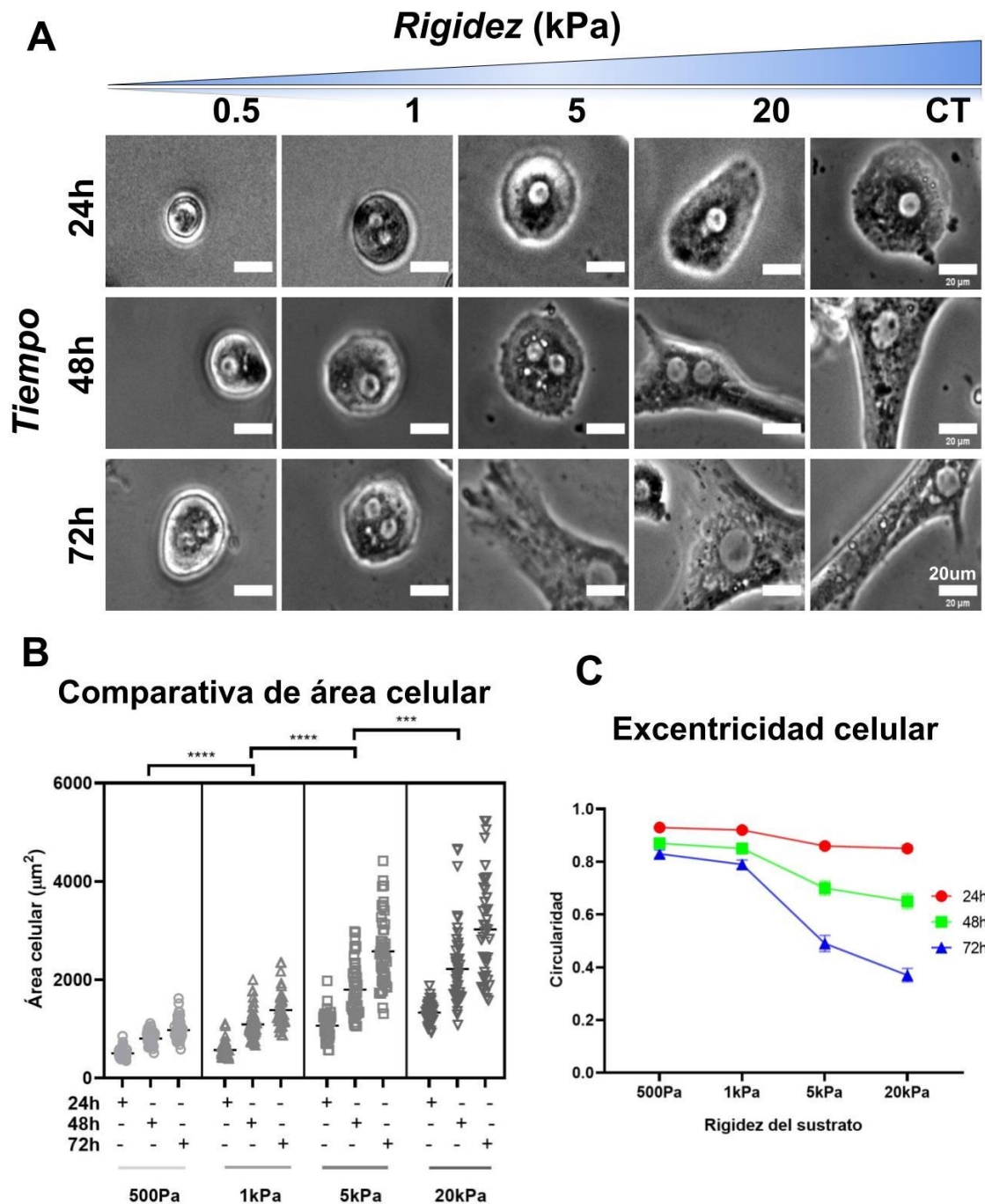


Fig. 7. Los hepatocitos primarios de rata responden a la rigidez (módulo elástico) mediante el espaciamiento del área y su deformación celular. A) Magnificaciones de imágenes representativas de hepatocitos (célula individual) cultivados sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24, 48 y 72 h de cultivo, utilizando como control (CT) condiciones de cultivo tradicional (cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena comercial tipo I), tomadas por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). Barra de escala 20 μm . B) Análisis estadístico de mediciones de área celular, mostrando media y SEM de datos representativos de 3 experimentos individuales $n=50$, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$. C) Análisis de excentricidad celular de hepatocitos normales (célula individual) cultivados sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24, 48 y 72 h de cultivo; ambas gráficas muestran los datos comparativos entre rigidez y tiempo de cultivo.

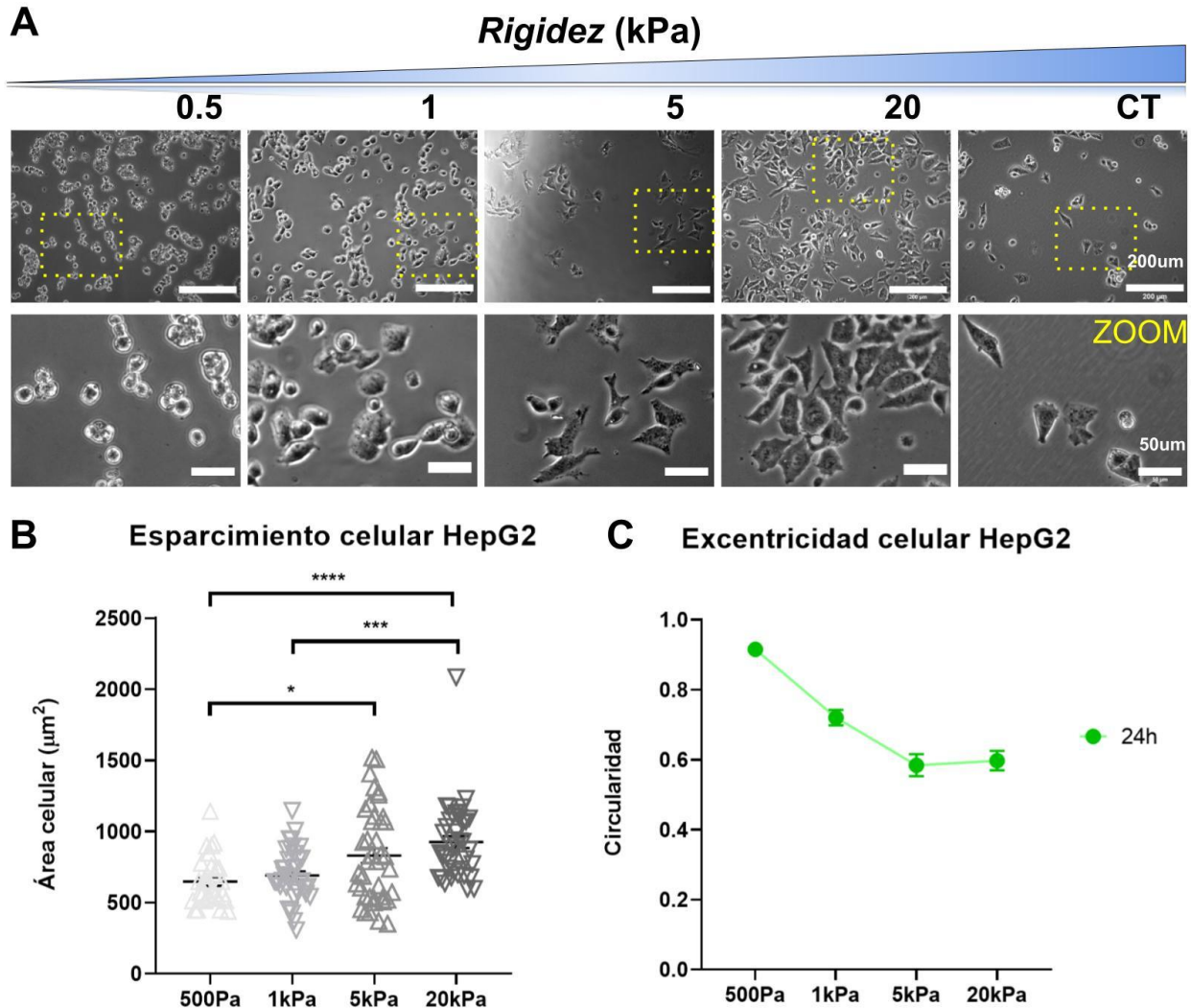


Fig. 8. La línea celular HepG2 (hepatocitos transformados) responde a las variaciones de rigidez en su sustrato mediante deformación y esparcimiento celular. A) Imágenes y magnificaciones representativas de HepG2 cultivadas sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24 h de cultivo, utilizando como control condiciones de cultivo tradicional (cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágena comercial tipo I), tomadas por microscopía DIC. Barra de escala 200 μm, magnificación 50 μm. B) Análisis estadístico de mediciones de área celular, mostrando media y SEM de datos representativos de 2 experimentos individuales $n=40$, **** $p<0.0001$, *** p 0.003, * p 0.0153. C) Análisis de excentricidad celular de HepG2 (célula individual) cultivadas sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24 h de cultivo; ambas gráficas muestran los datos comparativos entre rigidez.

8.1.2 Los hepatocitos primarios forman agregados celulares con diferencias en su área dependientes de la rigidez del sustrato.

Inicialmente, un hallazgo del LaNSBioDyT fue que los hepatocitos primarios cultivados por 24 h sobre HGPAAm de 1 kPa se disponen en forma de pequeños cordones, similares a su organización dentro del lobulillo hepático, y estos cordones son más largos en sustratos de 5 y 20 kPa. Como se puede observar en las micrografías de la [Fig.9 A](#), la formación de estos cordones en los cultivos de 48 y 72 h se mantienen únicamente en los hepatocitos cultivados sobre HGPAAm de 1 kPa. Mientras que los hepatocitos cultivados >24 h sobre HGPAAm de 5 y 20 kPa forman agregados que presentan diferencias en su tamaño. Los resultados de la cuantificación de las áreas de los agregados celulares formados en las diferentes condiciones de cultivo mostraron un comportamiento similar a los datos obtenidos de las áreas de células individuales. El tamaño de los agregados que forman los hepatocitos normales cultivados sobre sustratos suaves de 500 Pa se mantiene similar en cultivos de 24 h ($2148 \pm 243.3 \mu\text{m}^2$); 48 h ($2703 \pm 168.5 \mu\text{m}^2$) y 72 h ($3011 \pm 159.2 \mu\text{m}^2$), los cuales muestran diferencias significativa con respecto al incremento de las áreas de los agregados formados por hepatocitos primarios cultivados sobre sustratos rígidos de 20 kPa durante 24 h ($32,249 \pm 4589 \mu\text{m}^2$); 48 h ($124,991 \pm 35,557 \mu\text{m}^2$) y 72 h ($119,661 \pm 19,897 \mu\text{m}^2$) de cultivo ([Fig.9 B](#)). El aumento más significativo en el área de los agregados se observó en los hepatocitos cultivados sobre sustratos de 5 y 20 kPa por 48 h, los cuales aumentaron su área casi 4 veces con respecto al área de los agregados formados a las 24 h de cultivo. Cabe resaltar que se observó la presencia de hepatocitos aislados principalmente en sustratos de 500 Pa; en contraste, la tendencia a que los hepatocitos formen agregados aumenta conforme se incrementa el módulo elástico de los HGPAAm, al igual que el tiempo de cultivo. De forma interesante, los hepatocitos cultivados en HGPAAm de 1 kPa durante 24 h ($6382 \pm 503.2 \mu\text{m}^2$) mostraron una reducción en el área de los agregados a las 48 h de cultivo ($5522 \pm 333.4 \mu\text{m}^2$). Este hallazgo pudiera deberse a que los hepatocitos que se mantienen en cultivo por más tiempo comienzan a formar aglomerados celulares tipo esferoides en 3D (Bual R. & Ijima H., 2019), más que sólo agrupaciones o agregados en 2D (monocapa), principalmente los hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves (500 Pa y 1 kPa) (ver [Fig.9 B](#)).

8.2 Evaluar la respuesta de los hepatocitos primarios normales cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez, mediante la formación de filamentos de actina (F-actina) y la deformación nuclear.

La respuesta celular ante estímulos mecánicos, como la rigidez y el confinamiento, involucra la reorganización del citoesqueleto de actina (Kimata T. et al., 2006; Degan D. et al., 2015; Pocaterra A. et al., 2019); los hepatocitos que son cultivados bajo condiciones estándar (cajas de poliestireno) sufren una reorganización de su citoesqueleto de actina, formando fibras de estrés, las cuales conectan directamente con complejos de adhesión (integrinas) (Sun P. et al., 2019). En diversos estudios, que buscan preservar las funciones de los hepatocitos, una de las características que buscan mantener es la presencia de actina cortical, ya que actualmente se ha descrito que la remodelación de la actina es un proceso importante para mantener la red canalicular, para que el hepatocito lleve a cabo sus funciones y para controlar su diferenciación, así como conferirle polaridad (Meyer K. et al., 2020).

Los resultados mostrados previamente, indican que los hepatocitos primarios responden a cambios en la rigidez de los HGPAAm conjugados con Col. I, mediante el aumento en su área celular (esparcimiento) y su deformación o excentricidad. Para comprobar si en los hepatocitos primarios de rata existe una relación entre los cambios morfológicos observados y la reorganización de su citoesqueleto de actina, se evaluó cualitativamente la disposición de la F-actina, mediante el uso de faloidina marcada fluorescentemente en los hepatocitos normales cultivados sobre sustratos con diferentes módulos elásticos durante los tiempos de 24, 48 y 72 h ([Fig.11](#)). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, nos permitieron observar que los hepatocitos cultivados en sustratos suaves (≤ 1 kPa) presentan una disposición de actina cortical y esta organización se mantiene a lo largo del tiempo, explicando probablemente la presencia de células más circulares. Realizando una reconstrucción 3D de los hepatocitos cultivados en sustratos suaves, fue posible observar claramente la formación de una estructura similar al canalículo biliar o *canaliculi-like*, en cultivos de 24 h y, de forma interesante esta estructura se mantuvo en cultivos de hasta 72 h ([Fig.10](#)).

Meyer y colaboradores recientemente describieron que el canalículo biliar está formado por las superficies apicales de los hepatocitos situados en el eje PC-PP, y es una estructura que responde a la exposición a las sales biliares, aumentando la tensión de su citoesqueleto; además, dichas estructuras tipo canalículo biliar están asociadas a los complejos de polaridad, unión célula-célula y célula-ECM, en células cultivadas *in vitro* ([Fig.10](#)) (Aragona M. et al., 2013; Meyer K. et al., 2020).

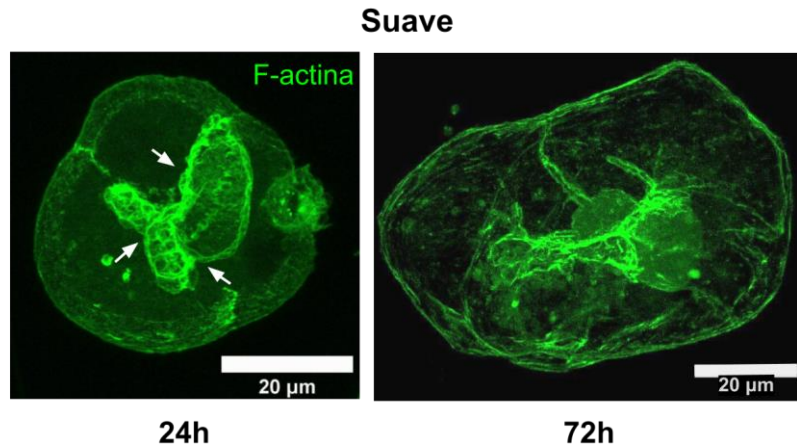


Fig. 10. Los hepatocitos primarios de rata cultivados en sustratos suaves presentan una estructura tipo **canalículo biliar**. Magnificaciones de imágenes representativas de hepatocitos cultivados sobre HGPAAM conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, posterior a 24 y 72 h de cultivo, tomadas por microscopía confocal, proyección 3D. Barra de escala 20 µm. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos individuales.

En contraste, la F-actina de los hepatocitos primarios normales cultivados en sustratos rígidos se encuentra formando fibras de estrés y los hepatocitos adquieren cambios morfológicos similares a las células tipo mesenquimales. Además, probablemente las fibras de estrés incrementan la tensión intracelular en los hepatocitos cultivados por 72 h, siendo esta la causa de los cambios en la deformación (área) nuclear ([Fig.11](#)) (Sosa B.A et al., 2012; Mathieu S. & Maneville JB., 2019).

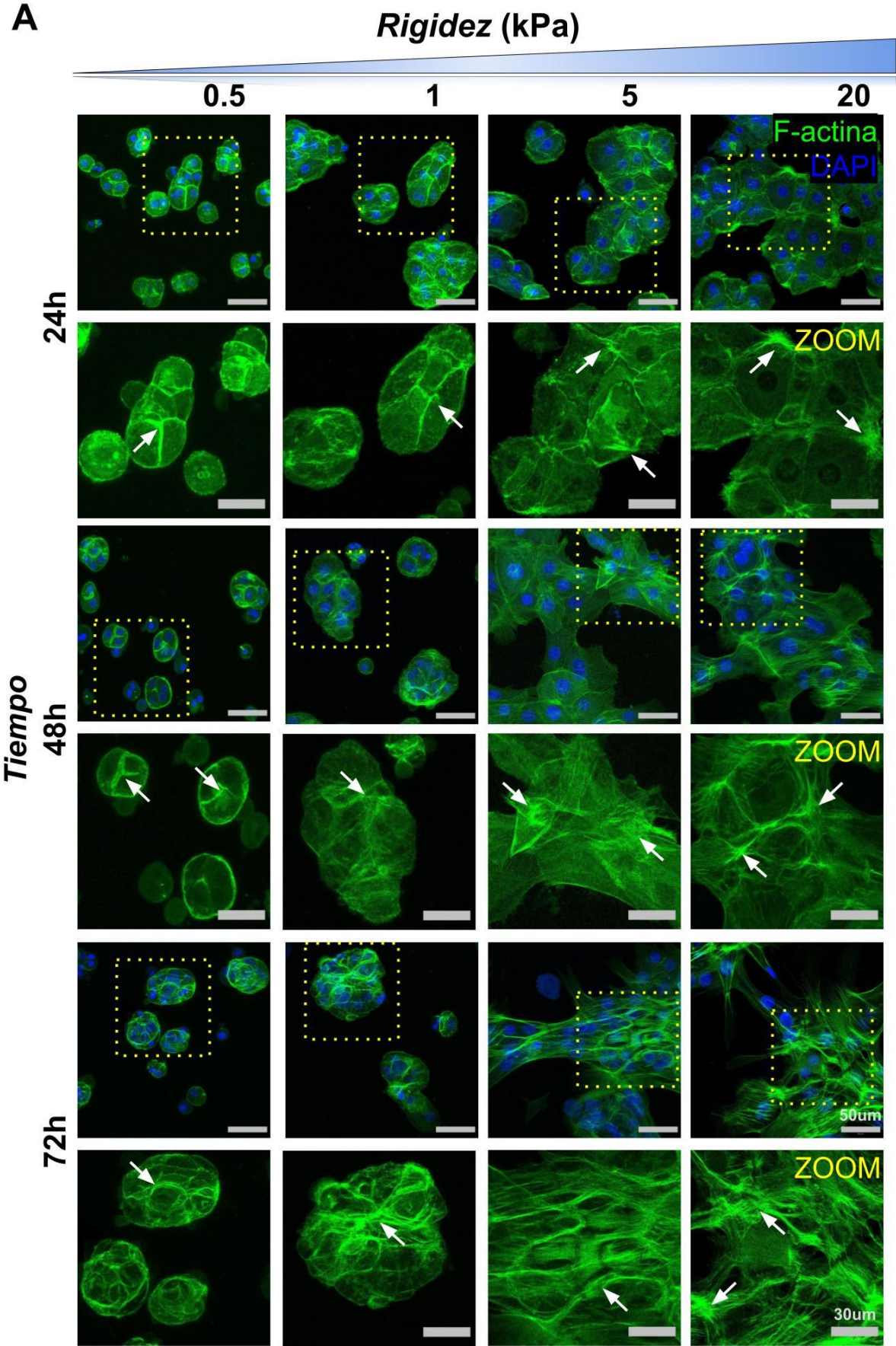


Fig. 11. Reorganización del citoesqueleto de actina de los hepatocitos primarios en condiciones de cultivo de rigidez variable. A) Imágenes y magnificaciones de imágenes representativas de hepatocitos cultivados sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24, 48 y 72 h de cultivo, tomadas por microscopía confocal; las flechas muestran la disposición de la actina filamentosa, siendo cortical en los hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves y formando fibras de estrés en sustratos rígidos. Barra de escala 50 μm , magnificación 30 μm . Imágenes representativas de al menos 3 experimentos individuales.

La formación de fibras de estrés asociada con el esparcimiento celular y la contractilidad, como respuesta de adaptación a las propiedades mecánicas externas a las que está expuesta la célula, ha demostrado tener un impacto en la deformación nuclear, tal como se mencionó en la introducción. Los complejos proteicos llamados LINC, unen al citoesqueleto de actina directamente a la envoltura nuclear, permitiendo que los esfuerzos ejercidos por las fibras de estrés sean transmitidos al núcleo, regulando programas transcripcionales o la reorganización de territorios cromosómicos (Cho S. et al., 2017). Dado que los hepatocitos primarios de rata, presentan la formación de dichas fibras tensiles, lo cual pudiera ser una explicación del incremento en el esparcimiento celular, se decidió analizar si existían diferencias en el tamaño del núcleo de los hepatocitos que mantienen la actina cortical, comparándolos con los hepatocitos con formación de fibras de estrés ([Fig.12 A](#)). De acuerdo a los resultados esperados, existió un aumento significativo en el área nuclear de los hepatocitos primarios cultivados sobre sustratos suaves durante 24 h ($64.69 \pm 2.80 \mu\text{m}^2$), 48 h ($72.11 \pm 2.23 \mu\text{m}^2$) y 72 h ($73.10 \pm 1.68 \mu\text{m}^2$) comparados con los hepatocitos cultivados sobre sustratos rígidos por los mismos tiempos: 24 h ($132.3 \pm 3.87 \mu\text{m}^2$), 48 h ($149.7 \pm 7.90 \mu\text{m}^2$) y 72 h ($210.4 \pm 14.10 \mu\text{m}^2$), los cuales aumentaron su área nuclear poco más de 2 veces con respecto a los hepatocitos cultivados en sustratos suaves, en los 3 tiempos de cultivo ([Fig.12 B](#)). El aumento en el área del núcleo en los hepatocitos primarios que adquieren características morfológicas tipo mesenquimales cuando son cultivados sobre sustratos rígidos, pudiera exponer sitios del DNA y esto a su vez repercutir en cambios en la regulación transcripcional, lo que podría ser una explicación a la pérdida de sus funciones.

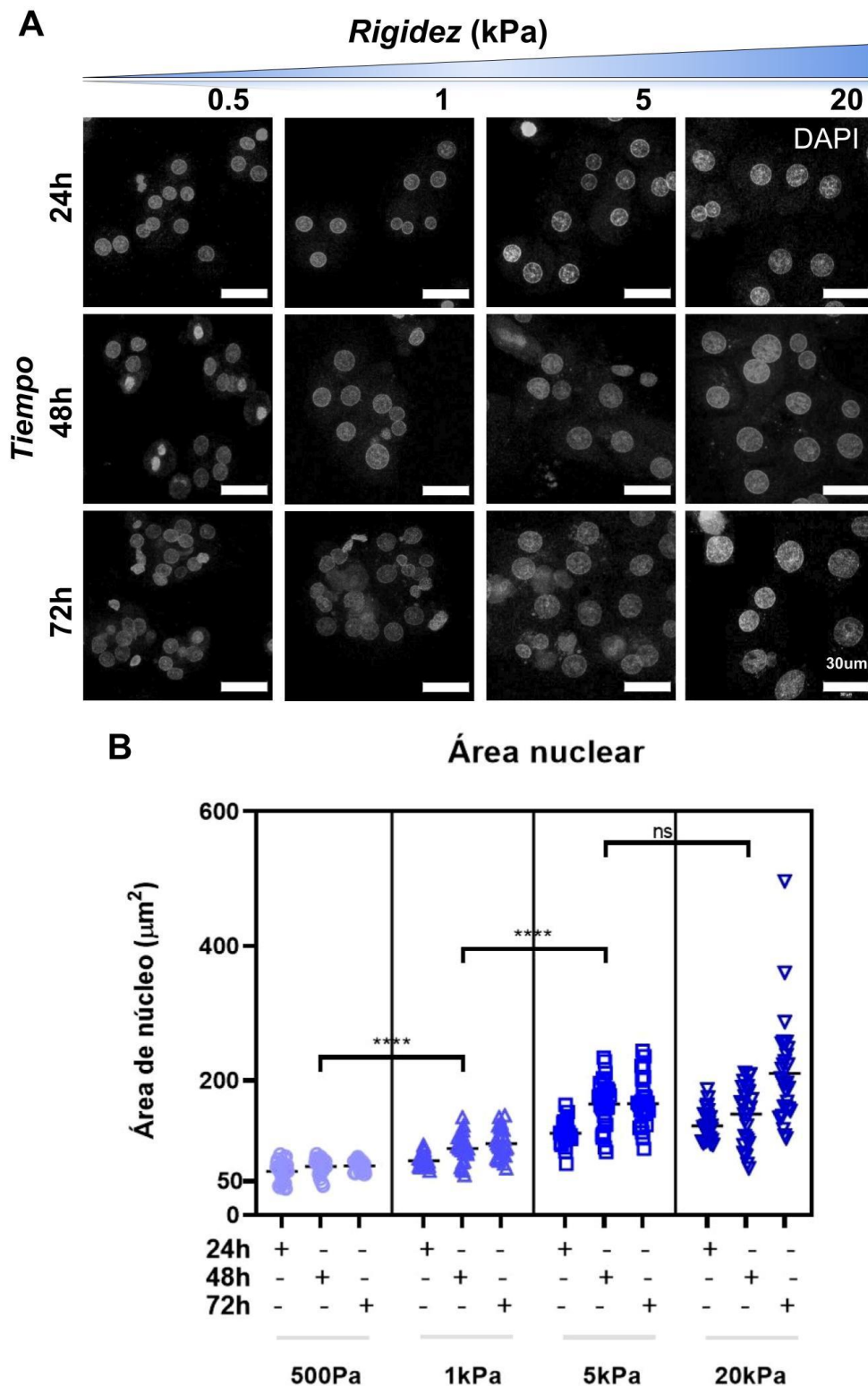


Fig. 12. Los hepatocitos primarios cultivados en valores de rigidez variable sufren deformación nuclear. A) Magnificaciones de imágenes representativas de hepatocitos cultivados sobre HGPAAM conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24, 48 y 72 h de cultivo, tomadas por microscopía confocal. Barra de escala 30 μm . B) Análisis estadístico de mediciones de área nuclear, mostrando media y SEM de datos representativos de 2 experimentos individuales $n=30$, **** $p<0.0001$.

Por estas razones y porque los resultados anteriores mostraron que la línea celular humana transformada HepG2 también responde a los cambios en la rigidez de su sustrato, se decidió evaluar el área nuclear. Los datos obtenidos de las áreas nucleares de las células HepG2 cultivadas por 24 h, mostraron un comportamiento similar a los hepatocitos primarios, es decir, en sustratos suaves tuvieron un área nuclear de $88.57 \pm 5.37 \mu\text{m}^2$, mientras que en sustratos rígidos presentaron un área de $165.8 \pm 11.58 \mu\text{m}^2$ (Fig.13) aumentando cerca de 2 veces su área nuclear.

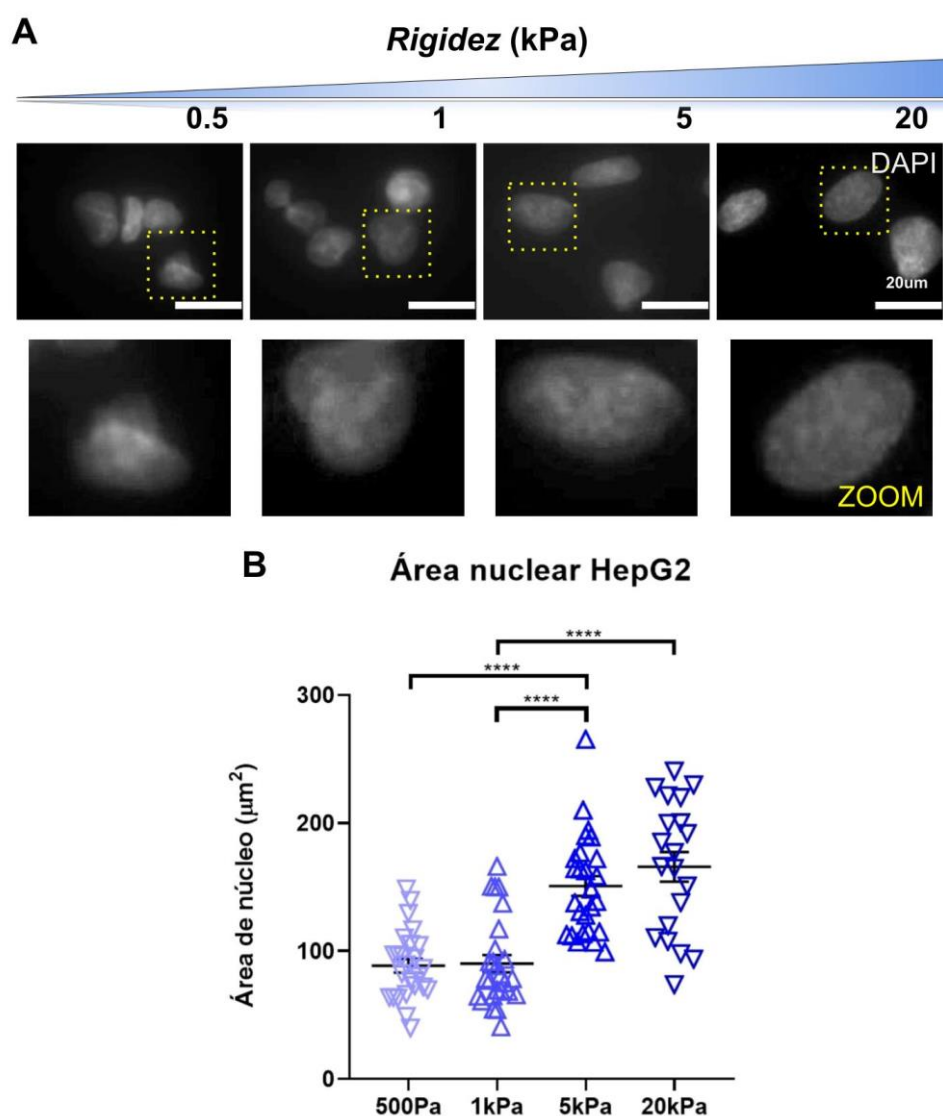


Fig. 13. La línea celular HepG2 cultivada en valores de rigidez variable, sufre deformación nuclear. A) Magnificaciones de imágenes representativas de HepG2 cultivadas sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con diferente módulo elástico posterior a 24 h de cultivo, tomadas por microscopía de epifluorescencia. Barra de escala 20 μm . B) Análisis estadístico de mediciones de área nuclear: 500 Pa ($88.57 \pm 5.37 \mu\text{m}^2$), 1 kPa ($90.15 \pm 6.73 \mu\text{m}^2$), 5 kPa ($150.8 \pm 7.71 \mu\text{m}^2$) y 20 kPa ($165.8 \pm 11.58 \mu\text{m}^2$) mostrando media y SEM de datos representativos de 2 experimentos individuales $n=30$, **** $p<0.0001$.

8.3 Caracterización de la localización subcelular de las proteínas YAP y TAZ en hepatocitos normales y transformados cultivados en sustratos con diferentes valores de rigidez.

Los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ son dos mecanorreceptores que permiten a las células percibirse entre ellas mismas y percibir su ambiente tisular, así como comunicarse entre sí. La regulación de YAP/TAZ responde directamente a la forma y la polaridad celular, las cuales están directamente relacionadas con la reorganización del citoesqueleto de actina (Totaro et al., 2018). Los hepatocitos, que son células con un fenotipo epitelial (Colnot S. & Perret C., 2011), requieren adquirir polaridad apico-basal para la correcta formación y función del epitelio. Como se mencionó anteriormente, la ruta Hippo es la ruta de regulación canónica de las proteínas YAP/TAZ mediante su fosforilación por las cinasas LATS-1/2. Sin embargo, recientemente se ha descrito que también pueden ser reguladas positivamente por las propiedades mecánicas del microambiente celular, independientemente de LATS. Es decir, la reorganización del citoesqueleto de actina que llevan a cabo las células cuando son expuestas a sustratos rígidos podría favorecer su traslocación al núcleo; por el contrario, bajo condiciones de cultivo sobre sustratos suaves, las proteínas YAP/TAZ permanecerán principalmente en el citoplasma. Por lo tanto, una vez que se comprobó que los hepatocitos primarios son capaces de responder a los cambios en la propiedades de rigidez de los sustratos en los que son cultivados, se analizó la localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ ([Fig.14 A y B](#)).

De aquí, se obtuvieron los siguientes resultados: los hepatocitos analizados después de 24 h de cultivo, mostraron un enriquecimiento significativo en los porcentajes de fluorescencia de la marca nuclear de YAP/TAZ, cuando fueron cultivados sobre sustratos rígidos (18%) comparado con los hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves (12%) ([Fig.14 C](#)). A pesar de que los datos obtenidos de los porcentaje de YAP y TAZ nuclear son bajos, comparados con los porcentajes citoplasmáticos, nuestros resultados son similares a los que obtuvo el equipo de [Meyer](#), en donde tras analizar los porcentajes de fluorescencia de la marca nuclear de YAP/TAZ y obtener porcentajes menores al 20%, cuantificaron los niveles de las proteínas YAP/TAZ mediante la técnica de fraccionamiento celular y observaron que la proporción

citoplasmática de YAP/TAZ es muy alta, lo cual probablemente podría explicar los porcentajes de translocación observados en nuestros ensayos.

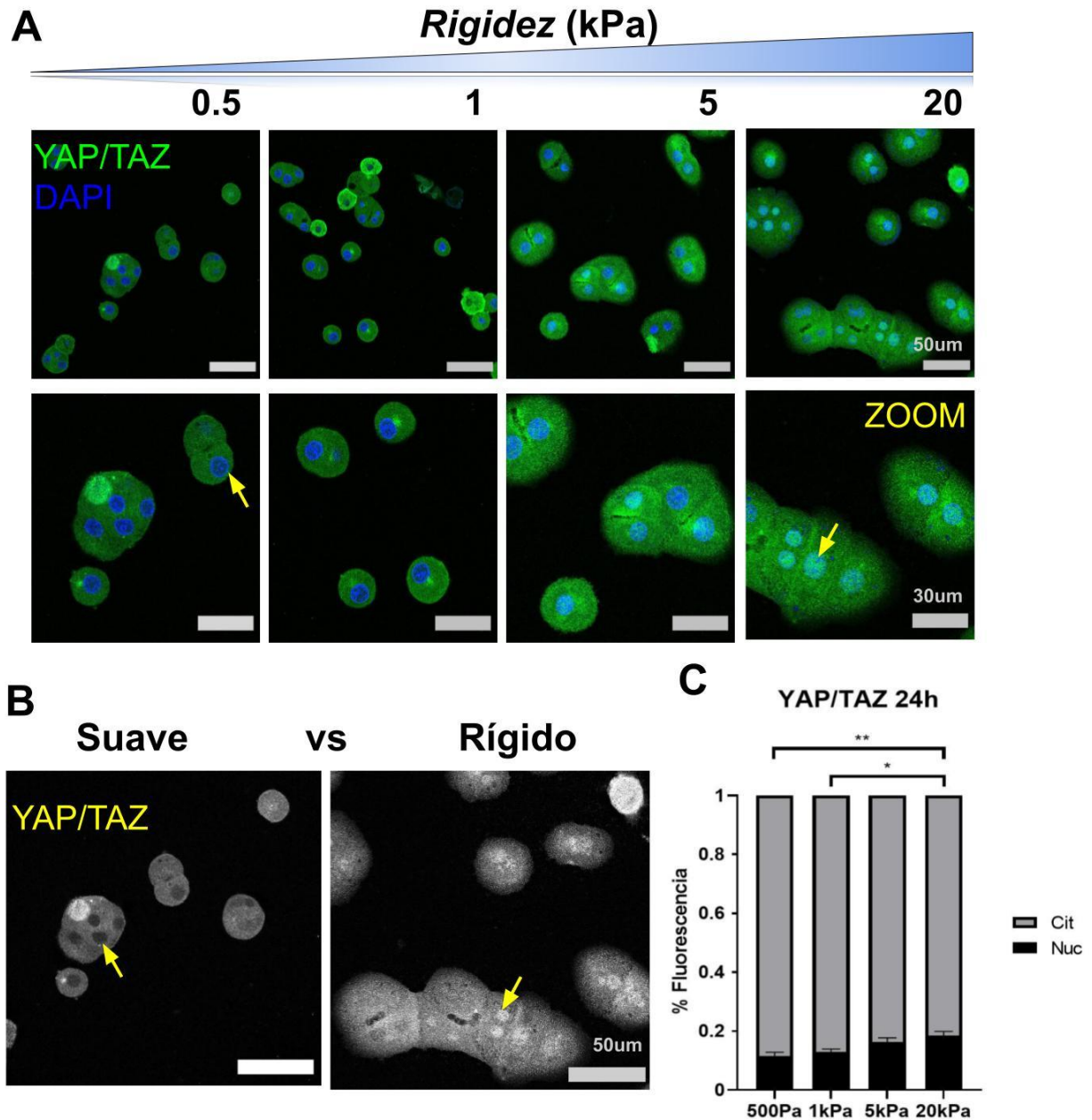


Fig. 14. *La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ se modifica en hepatocitos primarios cultivados en sustratos de rigidez variable.* A) Imágenes y magnificaciones de imágenes representativas de hepatocitos cultivados sobre HGPAAM conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24 h de cultivo marcados fluorescentemente anti-YAP/TAZ, tomadas por microscopía confocal, mostrando 1 sólo corte en el eje z, las flechas muestran núcleos representativos en donde se puede observar la ausencia o presencia de la marca fluorescente. Barra de escala 50 μ m, magnificación 30 μ m. B) Imagen comparativa de marcaje fluorescente de YAP/TAZ en escala de grises en hepatocitos primarios cultivados durante 24 h sobre sustrato suave y rígido. C) Análisis estadístico de cuantificación de marca inmunofluorescente nuclear y citoplasmática de YAP/TAZ, mostrando media y SEM de datos representativos de 1 experimento individual $n=15$, ** $p<0.0031$, * $p 0.0239$.

Adicionalmente, la línea celular HepG2 cultivada por 24 h sobre los HGPAAm de los diferentes grados de rigidez, también mostró cambios significativos en los porcentajes de fluorescencia de la marca de las proteínas YAP/TAZ en núcleo, observándose un mayor porcentaje de traslocación nuclear pasando de un 31% en sustratos de 500 Pa a un 39% en sustratos de 20 kPa) (Fig.15). Este hallazgo coincide con otras líneas celulares que han sido caracterizadas, no obstante, es interesante que pese ser células transformadas de un hepatocarcinoma, las cuales son una línea celular inmortalizada adaptada al cultivo en caja petri (con una rigidez en el orden de los gigapascales), son capaces de responder a las diferencias de rigidez de su sustrato. Siendo probable que su programa transcripcional sea diferente al igual que ocurre en cultivo primario.

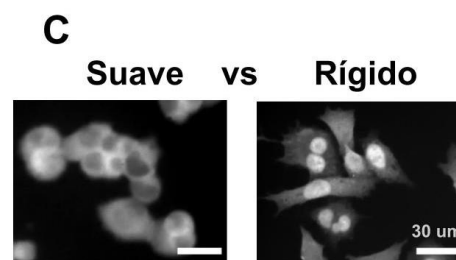
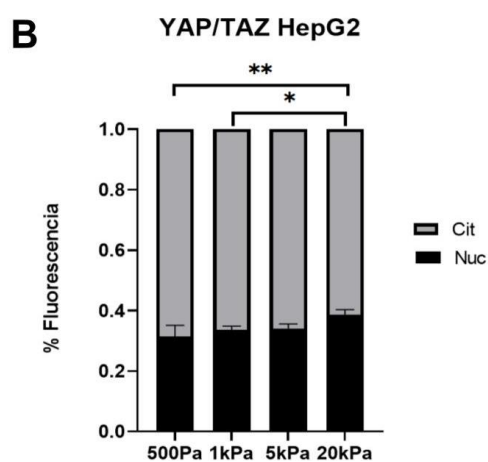
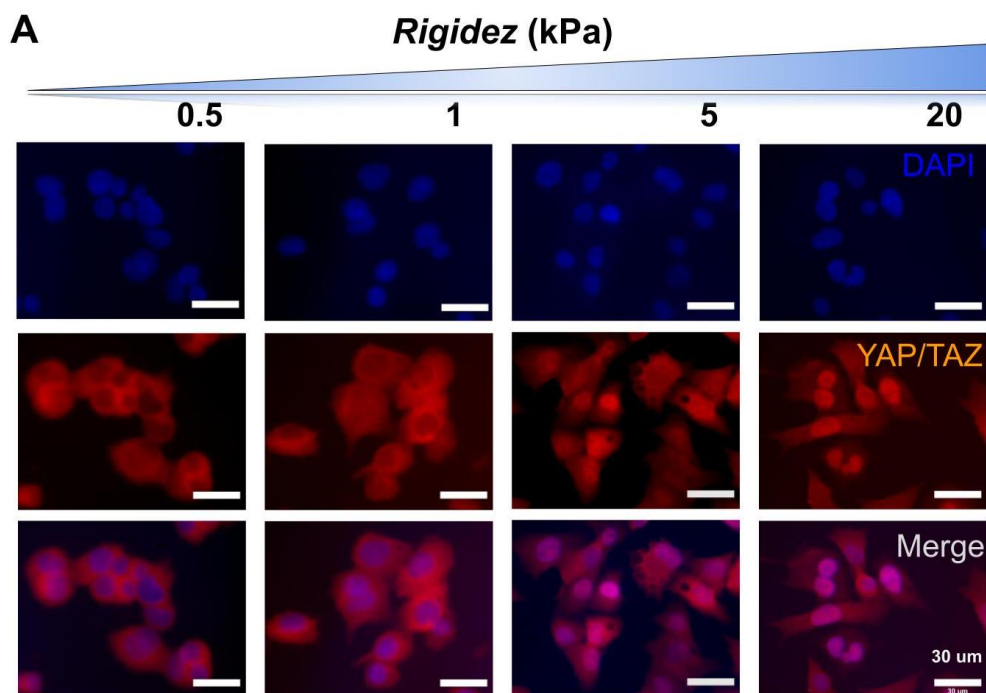


Fig. 15. La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ en células HepG2 se modifica entre núcleo y citoplasma, en cultivos en sustratos de rigidez variable. A) Imágenes y magnificaciones de imágenes representativas de células HepG2 cultivadas sobre HGPAAm conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa posterior a 24 h de cultivo, tomadas por microscopía de epifluorescencia. Barra de escala 30 μ m. B) Análisis estadístico de cuantificación de la marca inmunofluorescente nuclear y citoplasmática de YAP/TAZ, mostrando media y SEM de datos representativos de 2 experimentos individuales $n=15$, ** $p<0.0031$, * $p 0.0239$. C) Imagen comparativa de marcaje fluorescente de YAP/TAZ en escala de grises en HepG2 cultivadas durante 24 h sobre sustrato suave y rígido.

9. DISCUSIÓN

Algunos de los procesos fisiológicos que puede llevar a cabo el hígado son la regeneración y la fibrogénesis, ya que el daño del tejido hepático predispone al órgano a desarrollar desbalances en la síntesis y la composición de la ECM que rodea a las células hepáticas, incluidos los hepatocitos. Además, el daño hepático desencadena distintos procesos como por ejemplo, la infiltración de células fagocíticas (macrófagos), que secretan citocinas inflamatorias como el TGF β y la IL-6, entre otras, que en conjunto activan a las HSC, las cuales pasan de un estado quiescente a un fenotipo fibrogénico (miofibroblasto) promoviendo así la síntesis y degradación de ECM (Hernández V. & Friedman SL., 2011; Koyama Y. & Brenner DA., 2017). La síntesis y degradación de ECM o fibrogénesis es un proceso que tiene un asa de regulación positiva, por lo que, cuando el daño se vuelve crónico, el proceso de fibrogénesis se exagera dando origen a procesos patológicos como la fibrosis o cirrosis hepática. Dicha alteración además de modificar las propiedades químicas de la ECM, altera también las propiedades físicas de la ECM, como su rigidez (Wells R. 2008; Dey A. et al., 2020). De manera interesante, el depósito de ECM ocurre de manera heterogénea acumulándose en los espacios periportales del lobulillo hepático (de la periferia al centro) (Desai et al., 2016). Estudios recientes *in vitro* han propuesto que los hepatocitos experimentan una respuesta a los cambios en la rigidez del sustrato, como por ejemplo el incremento en su área celular, mediada por el aumento en adhesiones focales y la contractibilidad del aparato de actomiosina (Natarajan V. et al., 2015; Desai S. et al., 2016). Por tal razón, el objetivo de este proyecto fue el investigar si los hepatocitos normales (hepatocitos primarios de rata) y los hepatocitos transformados (línea celular HepG2) perciben y responden a la mecánica extracelular (rigidez). También se investigó si existe una diferencia en la activación de los coactivadores YAP/TAZ dependiente de la rigidez, así como un umbral de activación, e investigar los cambios en la reorganización de su citoesqueleto de actina al utilizar

sustratos de hidrogeles de poliacrilamida con módulos elásticos de 500 Pa, 1, 5 y 20 kPa, entrecruzados con la proteína comercial Col. I (0.1mg/ml). Aunque la Col. I no es tan abundante en el hígado sano, en el laboratorio (LaNSBioDyT) se evaluó la eficiencia de la adhesión de los hepatocitos con otras ECM (matrigel, colágena tipo IV y laminina) y se demostró que en condiciones suaves <1 kPa los hepatocitos no son capaces de adherirse a los hidrogeles de manera eficiente (Serna M. et al., 2020). Se seleccionaron los módulos elásticos tomando como base las mediciones del módulo de Young de tejido hepático sano (150 Pa) y fibrótico (de 1 a 6 kPa), reportados en el artículo de Desai y colaboradores. En el presente trabajo se decidió utilizar sustratos ≥ 500 Pa, debido a que en los sustratos menores a 500 Pa las células pierden su capacidad de agregación, lo que no representa el estado fisiológico de este tipo epitelial, el cual establece su polaridad a partir del canalículo biliar. Los hepatocitos normales y transformados mostraron diferencias significativas en su área celular al ser cultivados en sustratos de ≤ 1 kPa (suaves) en comparación con los cultivados sobre sustratos de 5 y 20 kPa (rígidos). La literatura menciona que los procesos de mecanotransducción, es decir, el cómo la célula percibe e interpreta los estímulos mecánicos, involucran la reorganización del citoesqueleto de actina y cambios en los esfuerzos internos (actomiosina), a través de un proceso que además puede llevar a la regulación de algunas proteínas y repercutir en la expresión génica, permitiéndole a la célula responder y adaptarse a los cambios en su microambiente (Janmey PA. et al., 2013; Sun P. et al., 2019). Por lo cual, se decidió evaluar si existían diferencias cualitativas en la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) en los hepatocitos normales. Conforme a los resultados esperados, los hepatocitos cultivados sobre HGPAAm suaves mantuvieron sus características morfológicas (forma poligonal) y la organización de la actina filamentosa próxima a la membrana plasmática (cortical) por hasta 3 días de cultivo, características similares a las de una célula con fenotipo epitelial. Otro hallazgo interesante fue que entre las uniones célula-célula los hepatocitos parecieron formar una estructura similar a un canalículo biliar (del inglés *canaliculi-like*), lo que podría indicar que el hepatocito mantiene cierta polaridad celular (Meyer K. et al., 2020). En contraste, los hepatocitos cultivados sobre HGPAAm rígidos, así como los hepatocitos transformados, experimentaron cambios morfológicos similares a los que han sido reportados en hepatocitos cultivados bajo condiciones de cultivo estándar (en caja de petri), es decir, presentaron una forma estrellada y la formación de fibras de estrés (Wells R. 2008).

Diversos estudios han sugerido que los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ, dos proteínas mecanosensibles, podrían estar reguladas de manera independiente de la ruta Hippo, a través de la vía de la GTPasa de Rho encargada de la reorganización del citoesqueleto (Dupont S. et al., 2011; Aragona et al., 2013).

Feng y colaboradores en 2014, describieron un mecanismo que apoya la influencia mecánica y la subsecuente reorganización del citoesqueleto sobre la regulación de YAP/TAZ. Su trabajo sugiere que la tumorigénesis de melanoma uveal asociada a alteraciones del oncogen GNAQ (receptor acoplado a proteína $G\alpha_q$) podría deberse a la acumulación de YAP en el núcleo a través de la activación de TRIO, un complejo proteico que posee dos dominios con actividad GEF (del inglés, *guanine nucleotide exchange factor*), y de la participación de las GTPasas RhoA y Rac1. En este trabajo realizaron el silenciamiento de los genes GNAQ, TRIO, RhoA y Rac1, obteniendo así una disminución en la acumulación nuclear de YAP, por lo que propusieron que la disminución de YAP podría ser una regulación independiente de la ruta Hippo, así como de PLC β . Para comprobar dicha hipótesis, silenciaron la expresión de las cinasas LATS1/2, observando que GNAQ inducía la activación transcripcional de YAP, aún bajo el silenciamiento de la cinasa LATS; sugiriendo la existencia de otros mecanismos de regulación de YAP independientes de la ruta Hippo (LATS). Además, los autores observaron que esta activación de YAP mediada por GNAQ podía ser inhibida si se bloqueaba la polimerización de actina, y por el contrario, se favorecía si se promovía la polimerización de actina (Feng X. et al., 2014).

En el presente trabajo, los cofactores YAP y TAZ mostraron una aparente regulación diferencial en los hepatocitos primarios y transformados, la cual parece ser dependiente de la rigidez del sustrato en el que son cultivados, ya que se observó una mayor translocación nuclear de YAP/TAZ en hepatocitos cultivados por 24 h sobre sustratos rígidos, en comparación con los hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves. Dicho hallazgo podría ser explicado por las diferencias observadas en la reorganización de la F-actina, pues adicionalmente a lo discutido anteriormente, las fibras de estrés tensiles en los hepatocitos cultivados sobre sustratos rígidos, podrían ser las responsables de la deformación nuclear (aumento del área nuclear), permitiendo la entrada al núcleo de las proteínas YAP/TAZ y exponiendo sitios de la cromatina, lo cual finalmente podría dar origen a la regulación de la expresión de

genes blanco de los coactivadores YAP/TAZ, impactando en la función celular como resultado de los cambios percibidos en su mecánica extracelular (Sosa BA et al., 2012; Cho S. et al., 2017; Mathieu S. & Maneville JB., 2019). Por otro lado, otros autores sugieren que podrían coexistir mecanismos de regulación dependientes e independientes de las cinasas LATS1/2. Por ejemplo, YAP/TAZ pueden responder a cambios en la polimerización de actina (F-actina) resultando en la traslocación nuclear de estos coactivadores transcripcionales. Asimismo, la proteína angiomotina (AMOT, por sus siglas en inglés), además de unir a los filamentos de actina (F-actina), también es capaz de unir e inhibir a YAP manteniéndolo secuestrado en el citoplasma o en las uniones celulares, o bien AMOT puede favorecer la unión de LATS a YAP (Fulford A. et al., 2018). Otros mecanismos que se han propuesto incluyen la regulación de YAP/TAZ mediada por las uniones célula-célula, pues dichas uniones en condiciones de alta densidad celular inducen el arresto del crecimiento celular, conocido como CIP (del inglés *contact inhibition of proliferation*), un control homeostático de la densidad celular y del tamaño del órgano que ha sido explicado por la fosforilación y la activación de las cinasas LATS-1/2 por Mst-1/2 y MAP4K1/2/3/4/6/7 que mantienen a YAP/TAZ fosforilados (inactivos) (Zhao B. et al., 2007; Dupont S. et al., 2011).

Además, las uniones adherentes se encuentran constituidas por complejos moleculares integrados por proteínas como E-cadherina, β -catenina y α -catenina, las cuales unen directamente al citoesqueleto de actina y son capaces de transmitir los esfuerzos generados por el aparato de actomiosina de manera muy similar a las FA. La regulación de YAP/TAZ mediada por estos complejos se ha explicado por la participación de la proteína Merlín, la cual puede unirse directamente con el cofactor YAP localizado en el núcleo y favorecer su exportación al citoplasma (Zhang N. et al., 2010). También podría deberse a la participación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, como una co-regulación positiva entre β -catenina y YAP/TAZ, ya que la activación de la vía Wnt/ β -catenina puede inducir la acumulación nuclear de los cofactores YAP/TAZ y la expresión de los genes blanco de Wnt/ β -catenina y YAP/TAZ. O bien negativa, cuando la vía Wnt/ β -catenina está apagada, donde YAP/TAZ participan en la inactivación de β -catenina, permitiendo la formación del complejo de degradación de β -catenina vía UPS, manteniendo a YAP/TAZ en citoplasma (Azzolin L. et al., 2014). Cabe mencionar que esta regulación es importante en la zonación

metabólica del hígado, así como en la diferenciación y la proliferación de los hepatocitos (Ríos DG. et al., 2020).

Existen otras evidencias que asocian la dinámica del citoesqueleto de actina a la regulación de YAP, Sun y colaboradores observaron que en las agrupaciones de hepatocitos *in vitro*, los hepatocitos que se encontraban localizados en la periferia del agregado presentaban un mayor esparcimiento, y la consecuente localización subcelular nuclear de las proteínas YAP/TAZ. Lo que indica que el citoesqueleto de actina juega un papel importante en la regulación de estas proteínas; por lo que empleando un coctel molecular que inhibe la vía de Rho/ROCK, lograron mantener a YAP/TAZ inactivos (Sun P. et al., 2019).

No obstante, no debemos olvidar que el tejido hepático está conformado por múltiples estructuras conocidas como lobulillos hepáticos, donde los hepatocitos, así como las células de sustento experimentan condiciones heterogéneas tanto bioquímicas (gradientes de oxígeno y nutrientes; diferentes señalizaciones celulares) como microambientales (rigidez de la ECM, presión del flujo sanguíneo). Estas condiciones también están relacionadas con gradientes de perfiles de expresión genética a lo largo del eje portal-central lo cual permite la zonación o especialización en las funciones de los hepatocitos. Adicionalmente, estudios cronobiológicos recientes, han sugerido que la heterogeneidad espacial, también tiene una regulación temporal, es decir, que las funciones metabólicas del hígado están reguladas por el ciclo circadiano. Y dentro de las funciones celulares reguladas por las horas de luz-oscuridad, se encuentra la polimerización de actina, en donde los autores han mostrado que en ratones la polimerización de actina es mayor durante el día con respecto a la noche, regulando algunos factores transcripcionales como el factor de respuesta a suero (*SRF* por sus siglas en inglés). Por dicha razón, los cambios en la morfología y el tamaño de los hepatocitos, también se les ha dado una explicación temporal por la asociación con el ciclo circadiano (Gerber A. et al., 2013; Droin C. et al., 2021). Por lo que la regulación de las proteínas YAP/TAZ pudieran estar reguladas indirectamente por el ciclo circadiano que mantiene una dinámica en la actina a través de la vía de la GTPasa Rho.

Adicionalmente, Meyer demuestra la importancia de la formación de fibras de estrés en la cara apical de los hepatocitos que conforman el canalículo biliar, lo que a su vez favorece la localización nuclear de YAP (Meyer K. et al., 2020). Finalmente, estudios previos han sugerido una regulación negativa de la expresión del gen HNF4 α , un regulador maestro de los hepatocitos mediada por la proteína YAP, ya que proponen que esta puede interactuar físicamente con el promotor del gen HNF4 α (Lee D. et al., 2016; Noce V. et al., 2019). Por lo tanto, nuestros resultados podrían sugerir que algunos de los mecanismos de mecanotransducción pueden regular la disminución en la expresión de HNF4 α y consecuente la pérdida de funciones (disminución en producción de albúmina, urea, actividad de citocromos) de los hepatocitos, cuando son cultivados *in vitro* (Natarajan V. et al., 2015; Desai S. et al., 2016). Estos datos apoyan el desarrollo de investigaciones sobre la participación *in vivo* de los hepatocitos en el proceso de fibrosis hepática o en el progreso de patologías como la cirrosis o el HCC.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos comprobaron que tanto los hepatocitos normales como los hepatocitos transformados perciben los cambios en la rigidez del sustrato de cultivo y responden con un mayor esparcimiento de su área celular a mayor módulo elástico. El cultivo de los hepatocitos normales sobre sustratos suaves ≤ 1 kPa mostró permitir en el mantenimiento de sus características morfológicas, ya que mantuvieron una forma poligonal y la organización de su actina cortical, favoreciendo la formación de estructuras semejantes al canalículo biliar; aunado a estos hallazgos, también se observó la formación de agregados o cordones de los hepatocitos, similares a la disposición que presentan los hepatocitos bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. Adicionalmente, los resultados en los hepatocitos primarios y transformados sugieren una regulación diferencial de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ entre sustratos suaves y rígidos. Los hallazgos observados en hepatocitos de cultivo primario nos permiten proponer que el umbral de activación de las proteínas YAP/TAZ mediada por la rigidez del sustrato es a partir de un módulo elástico ≥ 5 kPa.

11. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar estudios complementarios que permitan confirmar si los hallazgos obtenidos en este proyecto tienen repercusión en el mantenimiento de las funciones de los hepatocitos *in vitro*, como son: el fenotipo celular en cultivos por períodos más largos y la caracterización de la función hepática (almacenamiento de glucógeno, producción de albúmina, actividad de citocromo P450, expresión de HNF4 α , etc.). Además podría evaluarse si el cultivo de los hepatocitos normales, sobre sustratos rígidos, favorece la expresión de genes blanco del complejo transcripcional YAP/TAZ/TEAD, como por ejemplo, *CYR61* o *CTGF*; o por el contrario, investigar si en los hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves se inhibe la expresión de dichos genes.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition. Garland Science.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., & Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*, *154*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, *158*(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
- Bual, R. P., & Ijima, H. (2019). Intact extracellular matrix component promotes maintenance of liver-specific functions and larger aggregates formation of primary rat hepatocytes. *Regenerative Therapy*, *11*. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.08.006>
- Cantini, M., Donnelly, H., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2020). The Plot Thickens: The Emerging Role of Matrix Viscosity in Cell Mechanotransduction. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 9, Issue 8). <https://doi.org/10.1002/adhm.201901259>
- Cavalcanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., & Spatz, J. P. (2007). Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophysical Journal*, *92*(8). <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.089730>
- Cho, S., Irianto, J., & Discher, D. E. (2017). Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 216, Issue 2). <https://doi.org/10.1083/jcb.201610042>
- Colnot, S., & Perret, C. (2011). *Liver Zonation*. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7107-4_2
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A. R., Poletti, A., Daidone, M. G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2011). The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, *147*(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>
- Cretu, A., Castagnino, P., & Assoian, R. (2010). Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *Journal of Visualized Experiments*, *42*. <https://doi.org/10.3791/2089>
- Deegan, D. B., Zimmerman, C., Skardal, A., Atala, A., & Shupe, T. D. (2016). Stiffness of hyaluronic acid gels containing liver extracellular matrix supports human hepatocyte function and alters cell morphology. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *55*. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.10.016>

- Delgado Coello, B. A. (2017). Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática. In *Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática*. <https://doi.org/10.22201/ifc.9786070290763e.2017>
- Desai, S. S., Tung, J. C., Zhou, V. X., Grenert, J. P., Malato, Y., Rezvani, M., Español-Suñer, R., Willenbring, H., Weaver, V. M., & Chang, T. T. (2016). Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology*, *64*(1). <https://doi.org/10.1002/hep.28450>
- Dey, A., Varelas, X., & Guan, K. L. (2020). Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 19, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0070-z>
- Discher, D. E., Mooney, D. J., & Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. In *Science* (Vol. 324, Issue 5935). <https://doi.org/10.1126/science.1171643>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350). <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Duscher, D., Maan, Z. N., Wong, V. W., Rennert, R. C., Januszyk, M., Rodrigues, M., Hu, M., Whitmore, A. J., Whittam, A. J., Longaker, M. T., & Gurtner, G. C. (2014). Mechanotransduction and fibrosis. *Journal of Biomechanics*, *47*(9). <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.03.031>
- Dylan, D.-C., Ana, R.-H., Mónica, B.-P., Oliva, R.-D., Jorge, F.-R., & Javier, A. (2015). Mecanotransducción: Cómo la célula percibe los estímulos. *Tame*, *4*(11).
- Fan, R., Kim, N. G., & Gumbiner, B. M. (2013). Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1216462110>
- Feng, X., Degese, M. S., Iglesias-Bartolome, R., Vaque, J. P., Molinolo, A. A., Rodrigues, M., Zaidi, M. R., Ksander, B. R., Merlino, G., Sodhi, A., Chen, Q., & Gutkind, J. S. (2014). Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a Trio-regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell*, *25*(6). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.016>
- Fitamant, J., Kottakis, F., Benhamouche, S., Tian, H. S., Chuvin, N., Parachoniak, C. A., Nagle, J. M., Perera, R. M., Lapouge, M., Deshpande, V., Zhu, A. X., Lai, A., Min, B., Hoshida, Y., Avruch, J., Sia, D., Campreciós, G., McClatchey, A. I., Llovet, J. M., ... Bardeesy, N. (2015). YAP Inhibition Restores Hepatocyte Differentiation in Advanced HCC, Leading to Tumor Regression. *Cell Reports*, *10*(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.027>
- Fulford, A., Tapon, N., & Ribeiro, P. S. (2018). Upstairs, downstairs: spatial regulation of Hippo signalling. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.10.006>

- Geiger, B., Spatz, J. P., & Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrm2593>
- Hayakawa, K., Tatsumi, H., & Sokabe, M. (2011). Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *Journal of Cell Biology*, 195(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.201102039>
- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Iskratsch, T., Wolfenson, H., & Sheetz, M. P. (2014). Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrm3903>
- Janmey, P. A., Wells, R. G., Assoian, R. K., & McCulloch, C. A. (2013). From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation*, 86(3). <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.004>
- Jansen, K. A., Atherton, P., & Ballestrem, C. (2017). Mechanotransduction at the cell-matrix interface. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 71). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.027>
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J. Y., Wang, C., Mezey, E., & Koteish, A. (2007). Transforming growth factor- β 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30). <https://doi.org/10.1074/jbc.M700998200>
- Kakiuchi-Kiyota, S., Schutten, M. M., Zhong, Y., Crawford, J. J., & Dey, A. (2019). Safety Considerations in the Development of Hippo Pathway Inhibitors in Cancers. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00156>
- Kim, A. R., I Park, J., Oh, H. T., Kim, K. M., Hwang, J. H., Jeong, M. G., Kim, E. H., Hwang, E. S., & Hong, J. H. (2019). TAZ stimulates liver regeneration through interleukin-6–induced hepatocyte proliferation and inhibition of cell death after liver injury. *FASEB Journal*, 33(5). <https://doi.org/10.1096/fj.201801256RR>
- Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 209, Issue 2). <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>
- Kim, Y., & Rajagopalan, P. (2010). 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015456>
- Kimata, T., Nagaki, M., Ogiso, T., Naiki, T., Kato, T., & Moriwaki, H. (2006). Actin organization and hepatocyte differentiation are regulated by extracellular matrix via PI-4,5-bisphosphate in the rat. *Hepatology*, 44(1). <https://doi.org/10.1002/hep.21215>

- Koo, J. H., & Guan, K. L. (2018). Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. In *Cell Metabolism* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.010>
- Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 1). <https://doi.org/10.1172/JCI88881>
- Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E., & Ingber, D. E. (2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical Journal*, 90(10). <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071506>
- Kuntz, E., & Kuntz, H.-D. (2008). Hepatology Textbook and Atlas. In *Hepatology Textbook and Atlas*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76839-5>
- Kurotsu, S., Sadahiro, T., Fujita, R., Tani, H., Yamakawa, H., Tamura, F., Isomi, M., Kojima, H., Yamada, Y., Abe, Y., Murakata, Y., Akiyama, T., Muraoka, N., Harada, I., Suzuki, T., Fukuda, K., & Ieda, M. (2020). Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures. *Stem Cell Reports*, 15(3). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.07.022>
- Lee, D. H., Park, J. O., Kim, T. S., Kim, S. K., Kim, T. H., Kim, M. C., Park, G. S., Kim, J. H., Kuninaka, S., Olson, E. N., Saya, H., Kim, S. Y., Lee, H., & Lim, D. S. (2016). LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGF β signaling and Hnf4 α expression during liver development. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11961>
- Levental, I., Levental, K. R., Klein, E. A., Assoian, R., Miller, R. T., Wells, R. G., & Janmey, P. A. (2010). A simple indentation device for measuring micrometer-scale tissue stiffness. *Journal of Physics Condensed Matter*, 22(19). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/19/194120>
- Li, C. Y., Stevens, K. R., Schwartz, R. E., Alejandro, B. S., Huang, J. H., & Bhatia, S. N. (2014). Micropatterned cell-cell interactions enable functional encapsulation of primary hepatocytes in hydrogel microtissues. *Tissue Engineering - Part A*, 20(15–16). <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0667>
- Lu, L., Li, Y., Kim, S. M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., Wang, Y., Halder, G., Finegold, M. J., Lee, J. S., & Johnson, R. L. (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.0911427107>
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: From tension to function. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>
- Mathieu, S., & Manneville, J. B. (2019). Intracellular mechanics: connecting rheology and mechanotransduction. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.007>
- Meyer, K., Morales-Navarrete, H., Seifert, S., Wilsch-Braeuninger, M., Dahmen, U., Tanaka, E. M., Bruschi, L., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2020). Bile canaliculi

- remodeling activates YAP via the actin cytoskeleton during liver regeneration . *Molecular Systems Biology*, 16(2). <https://doi.org/10.15252/msb.20198985>
- Moeendarbary, E., & Harris, A. R. (2014). Cell mechanics: Principles, practices, and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1275>
 - Mohammed, D., Versaevel, M., Bruyère, C., Alaimo, L., Luciano, M., Vercruysse, E., Procès, A., & Gabriele, S. (2019). Innovative tools for mechanobiology: Unraveling outside-in and inside-out mechanotransduction. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00162>
 - Monga, S. P. (2015). β -catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis. In *Gastroenterology* (Vol. 148, Issue 7). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.056>
 - Mooring, M., Fowl, B. H., Lum, S. Z. C., Liu, Y., Yao, K., Softic, S., Kirchner, R., Bernstein, A., Singhi, A. D., Jay, D. G., Kahn, C. R., Camargo, F. D., & Yimlamai, D. (2020). Hepatocyte Stress Increases Expression of Yes-Associated Protein and Transcriptional Coactivator With PDZ-Binding Motif in Hepatocytes to Promote Parenchymal Inflammation and Fibrosis. *Hepatology*, 71(5). <https://doi.org/10.1002/hep.30928>
 - Natarajan, V., Berglund, E. J., Chen, D. X., & Kidambi, S. (2015). Substrate stiffness regulates primary hepatocyte functions. *RSC Advances*, 5(99). <https://doi.org/10.1039/c5ra15208a>
 - Noce, V., Battistelli, C., Cozzolino, A. M., Consalvi, V., Cicchini, C., Strippoli, R., Tripodi, M., Marchetti, A., & Amicone, L. (2019). YAP integrates the regulatory Snail/HNF4 α circuitry controlling epithelial/hepatocyte differentiation. *Cell Death and Disease*, 10(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2000-8>
 - Osorio-Delgado, M. A., Henao-Tamayo, L. J., Velásquez-Cock, J. A., Cañas-Gutierrez, A. I., Restrepo-Múnera, L. M., Gañán-Rojo, P. F., Zuluaga-Gallego, R. O., Ortiz-Trujillo, I. C., & Castro-Herazo, C. I. (2017). Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. *DYNA (Colombia)*, 84(201). <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n201.60466>
 - Paik, J. M., Golabi, P., Biswas, R., Alqahtani, S., Venkatesan, C., & Younossi, Z. M. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Alcoholic Liver Disease are Major Drivers of Liver Mortality in the United States. *Hepatology Communications*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/hep4.1510>
 - Paluch, E. K., Nelson, C. M., Biais, N., Fabry, B., Moeller, J., Pruitt, B. L., Wollnik, C., Kudryasheva, G., Rehfeldt, F., & Federle, W. (2015). Mechanotransduction: Use the force(s). *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0150-4>
 - Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. In *Developmental Cell* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
 - Panciera, T., Azzolin, L., Fujimura, A., Di Biagio, D., Frasson, C., Bresolin, S., Soligo, S., Basso, G., Bicciato, S., Rosato, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S.

- (2016). Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Cell Stem Cell*, 19(6). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.009>
- Parpaite, T., & Coste, B. (2017). Piezo channels. In *Current Biology* (Vol. 27, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.048>
 - Pegoraro, A. F., Janmey, P., & Weitz, D. A. (2017). Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>
 - Perepelyuk, M., Terajima, M., Wang, A. Y., Georges, P. C., Janmey, P. A., Yamauchi, M., & Wells, R. G. (2013). Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00222.2012>
 - Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiological Reviews*, 94(4). <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
 - Pocaterra, A., Santinon, G., Romani, P., Brian, I., Dimitracopoulos, A., Ghisleni, A., Carnicer-Lombarte, A., Forcato, M., Braghetta, P., Montagner, M., Galuppini, F., Aragona, M., Pennelli, G., Bicciato, S., Gauthier, N., Franze, K., & Dupont, S. (2019). F-actin dynamics regulates mammalian organ growth and cell fate maintenance. *Journal of Hepatology*, 71(1). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.022>
 - Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. T. (2016). Cell Biology: Third Edition. In *Cell Biology: Third Edition*.
 - Raghunathan, V. K., Dreier, B., Morgan, J. T., Tuyen, B. C., Rose, B. W., Reilly, C. M., Russell, P., & Murphy, C. J. (2014). Involvement of YAP, TAZ and HSP90 in contact guidance and intercellular junction formation in corneal epithelial cells. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109811>
 - Reid, S. E., Kay, E. J., Neilson, L. J., Henze, A., Serneels, J., McGhee, E. J., Dhayade, S., Nixon, C., Mackey, J. B., Santi, A., Swaminathan, K., Athineos, D., Papalazarou, V., Patella, F., Román-Fernández, Á., ElMaghloob, Y., Hernandez-Fernaud, J. R., Adams, R. H., Ismail, S., ... Zanivan, S. (2017). Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *The EMBO Journal*, 36(16). <https://doi.org/10.15252/embj.201694912>
 - Ríos-López, D. G., Aranda-López, Y., Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2020). La plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.225>
 - 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. (2020). Fibrillar collagen type I participates in the survival and aggregation of primary hepatocytes cultured on soft hydrogels. *Biomimetics*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS5020030>

- Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q. H., & Liu, M. (2012). Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *Journal of Visualized Experiments*, 64. <https://doi.org/10.3791/3917>
- Sosa, B. A., Rothballer, A., Kutay, U., & Schwartz, T. U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, 149(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.046>
- Speight, P., Kofler, M., Szászi, K., & Kapus, A. (2016). Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGF β -regulated Smad3. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11642>
- Sun, P., Zhang, G., Su, X., Jin, C., Yu, B., Yu, X., Lv, Z., Ma, H., Zhang, M., Wei, W., & Li, W. (2019). Maintenance of Primary Hepatocyte Functions In Vitro by Inhibiting Mechanical Tension-Induced YAP Activation. *Cell Reports*, 29(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.128>
- Sun, Z., Guo, S. S., & Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 215, Issue 4). <https://doi.org/10.1083/jcb.201609037>
- Szeto, S. G., Narimatsu, M., Lu, M., He, X., Sidiqi, A. M., Tolosa, M. F., Chan, L., De Freitas, K., Bialik, J. F., Majumder, S., Boo, S., Hinz, B., Dan, Q., Advani, A., John, R., Wrana, J. L., Kapus, A., & Yuen, D. A. (2016). YAP/TAZ are mechanoregulators of TGF- β -smad signaling and renal fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(10). <https://doi.org/10.1681/ASN.2015050499>
- Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Ö Sterreicher, C. H., Kodama, Y., Penz-Ö Sterreicher, M., & Brenner, D. A. (2010). Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 51(3). <https://doi.org/10.1002/hep.23368>
- Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. In *Current Protocols in Cell Biology* (Issue SUPPL. 47). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>
- Vázquez-Victorio, G., Caligaris, C., Del Valle-Espinosa, E., Sosa-Garrocho, M., González-Arenas, N. R., Reyes-Cruz, G., Briones-Orta, M. A., & Macías-Silva, M. (2015). Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin cytoskeleton dynamics in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(7). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579532>
- Wang, N. (2017). Review of cellular mechanotransduction. In *Journal of Physics D: Applied Physics* (Vol. 50, Issue 23). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa6e18>
- Wang, W., Li, N., Li, X., Tran, M. K., Han, X., & Chen, J. (2015). Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomin Family Proteins. *Cell Reports*, 13(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.014>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. In *Neoplasia (United States)* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>

- Wells, R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. In *Hepatology* (Vol. 47, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/hep.22193>
- Yamaguchi, H., & Taouk, G. M. (2020). A Potential Role of YAP/TAZ in the Interplay Between Metastasis and Metabolic Alterations. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00928>
- Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. In *Cell* (Vol. 163, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Yue, H. Y., Yin, C., Hou, J. L., Zeng, X., Chen, Y. X., Zhong, W., Hu, P. F., Deng, X., Tan, Y. X., Zhang, J. P., Ning, B. F., Shi, J., Zhang, X., Wang, H. Y., Lin, Y., & Xie, W. F. (2010). Hepatocyte nuclear factor 4 α attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut*, 59(2). <https://doi.org/10.1136/gut.2008.174904>
- Zhang, N., Bai, H., David, K. K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R. A., & Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 Tumor Suppressor Functions through the YAP Oncoprotein to Regulate Tissue Homeostasis in Mammals. *Developmental Cell*, 19(1). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.015>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes and Development*, 21(21). <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J. D., Wang, C. Y., Chinnaiyan, A. M., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes and Development*, 22(14). <https://doi.org/10.1101/gad.1664408>
- Zhou, J., Aponte-Santamaría, C., Sturm, S., Bullerjahn, J. T., Bronowska, A., & Gräter, F. (2015). Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLoS Computational Biology*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004593>
- Enfermedad por hígado graso no alcohólico (HGNA). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. Revista de la Facultad de Medicina (México) vol. 60 Issue 2 (2017) pp: 43-46 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000200043