

Tesis Doctoral

Mecanotransducción celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización- dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas

Bianchi, Micaela

2016-03-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bianchi, Micaela. (2016-03-28). Mecanotransducción celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización-dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bianchi, Micaela. "Mecanotransducción celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización-dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Mecanotransducción Celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización-dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas.

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

por ***Micaela Bianchi***

Directora de Tesis: Dra. Lía I. Pietrasanta
Consejera de estudios: Dra. Silvina Ponce Dawson
Lugar de Trabajo: Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN, UBA.

Marzo de 2016

Fecha de defensa: 28 de marzo de 2016

*A mi madre,
Cosme y Kamala*

Resumen

Las células pueden detectar, generar y responder a un amplio rango de señales externas, químicas y físicas, integrar y analizar esta información y, en consecuencia, cambiar su morfología, dinámica, comportamiento y, eventualmente, destino. A nivel celular, las respuestas biológicas a fuerzas externas se originan en dos tipos de estructuras especializadas: adhesiones focales (célula-matriz extracelular) y uniones adherentes (célula-célula). Las adhesiones focales son complejos de proteínas dispuestos en ensamblados multi-moleculares que unen la matriz extracelular, a través de receptores integrales de membrana, a componentes del citoesqueleto. Estos sitios de adhesión son estructuras planas, alargadas de unos pocos micrones cuadrados que a menudo están localizadas en la periferia de las células, y que además funcionarían como organelas de señalización en el proceso de mecanotransducción celular. Uno de los retos que se presenta para estudiar el sistema es el de poder integrar y combinar distintas técnicas que nos permitan analizar la dinámica intracelular, la biomecánica de la célula/sustrato, detección de las fuerzas generadas en/por la célula, y observar la respuesta global de la célula en las distintas condiciones. Entonces, el estudio de la estructura, mecánica y dinámica de las proteínas de adhesiones focales en respuesta a un estímulo mecánico en células vivas requiere de técnicas que permitan visualizar y caracterizar en forma integrada la dinámica de eventos localizados en la célula. Estos métodos deben contar con una resolución espacio-temporal alta, de forma tal que permitan detectar eventos transientes y altamente localizados. En este contexto, se han implementado, en este trabajo de Tesis, distintas microscopías y espectroscopías de alta resolución espacial y temporal, en combinación con técnicas de biología molecular y celular.

Con el objetivo de caracterizar las propiedades mecánicas de sustratos y células, en una primera etapa se implementó un modo de operación avanzado en microscopía de fuerza atómica (AFM), denominado PF-QNM (del inglés, *Peak Force Quantitative Nanomechanical Property Mapping*). Este modo permite obtener simultáneamente la imagen de topografía, junto con los mapas cuantitativos sobre las propiedades de elasticidad, adhesión, dureza, disipación de energía y deformación superficial. Se utilizaron sistemas modelo con distintas propiedades mecánicas de manera tal de cubrir el amplio rango que va desde GPa a kPa, y estudiar las propiedades de sustratos (vidrio, membranas de silicona y geles de poliacrilamina), así también como la línea celular utilizada en la Tesis.

A nivel de adhesión focal, la estrategia fue transfectar células de epitelio mamario de ratón (HC11), con proteínas componentes de la adhesión (por ejemplo, zixina, FAK, vinculina, paxilina) fusionadas a proteínas fluorescentes visibles. De esta forma, empleando microscopías y espectroscopías de fluorescencia, es posible visualizar la expresión de las proteínas, registrar su localización y evolución en el tiempo y, mediante diferentes análisis, extraer información cuantitativa de dinámica, cinética y organización de los complejos de adhesión focal. El análisis de la dinámica y difusión de los complejos de adhesión focal y sus interacciones, fueron realizados mediante la espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS). Se caracterizaron los coeficientes efectivos de difusión de las proteínas mencionadas. El análisis de la correlación cruzada de las fluctuaciones de fluorescencia de pares de proteínas de adhesión focal (FCCS) permitió evidenciar la interacción entre distintas proteínas adhesivas de la adhesión focal. La cinética de disociación de proteínas desde la adhesión focal fue evaluada mediante la recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo (FRAP) en diferentes condiciones.

Para estudiar los cambios generados en la organización y dinámica de adhesiones focales en células vivas en respuesta a un estímulo mecánico externo global, se empleó un dispositivo de tracción equibiaxial adaptado para ser usado en simultáneo con el microscopio confocal FV1000. La tensión mecánica aplicada por el dispositivo de tracción es capaz de inducir cambios en el área de las células vivas al igual que en las adhesiones focales. En respuesta al estiramiento mecánico se observó un mayor reclutamiento y translocación de la proteína zixina acompañado de una disminución significativa de su constante de disociación.

Con el fin de correlacionar las propiedades mecánicas del sustrato y la fuerza de tracción generada por la célula a nivel de las adhesiones focales, sin perder de vista la organización y dinámica de las proteínas en la adhesión focal, se implementó la Microscopía de Fuerzas de Tracción (TFM). Esta técnica posee la sensibilidad necesaria para medir la fuerza de tracción generada por la célula sobre un sustrato elástico y transparente, la cual se puede combinar con otras técnicas de microscopía de fluorescencia como FRAP o FCS. El análisis de los datos TFM para la proteína zixina permitió obtener los mapas de deformación y de fuerzas de tracción, a la vez que se evaluó la cinética de disociación mediante FRAP.

Palabras claves: Microscopía de Fuerza Atómica, Espectroscopía de Fuerza, Mecanotransducción, Células vivas, Microscopía de Fuerzas de Tracción.

Cellular mechanotransduction. Correlation between mechanical properties and organization/dynamics of focal adhesion proteins in living cells

Abstract

Cells can detect, generate and respond to a wide range of external, chemical and physical signals, integrate and analyze this information and, consequently, change their morphology, dynamics, behavior and, eventually, their fate. At the cellular level, biological responses to external forces are originated from two types of specialized structures: focal adhesions (cell-extracellular matrix) and adherens junctions (cell-cell). Focal adhesions are protein complexes arranged in multi-molecular assemblies that bind extracellular matrix, through integral membrane receptors, to cytoskeletal components. These adhesion sites are flat, elongated and few square microns which are often located in the periphery of the cells, and also function as signaling organelles in the cellular mechanotransduction process. One of the challenges presented to study the system is to be able to integrate and combine different techniques that allow us to analyze the intracellular dynamics, biomechanics of the cell/substrate, detection of the forces generated in/by the cell, and observing the global response of the cell in different conditions. Thus, the study of the structure, mechanics and dynamics of focal adhesion proteins in response to a mechanical stimulus in living cells requires to visualize and characterize in an integrated way the dynamics of events located in the cell. These methods must have a high spatial and temporal resolution, so as to detect transients and highly localized events. In this context, they have been implemented in this thesis, different microscopies and spectroscopies with high spatial and temporal resolution, combined with the techniques of molecular and cell biology.

In order to characterize the mechanical properties of substrates and cells, in a first step, an advanced mode operation was implemented in atomic force microscopy (AFM), called PF- QNM (Peak Force Quantitative nanomechanical Property Mapping). This mode allows simultaneously obtaining the topography, together with quantitative maps of the properties such as elasticity, adhesion, hardness, energy dissipation and surface deformation. Various systems were used with different mechanical properties so as to cover the wide range from GPa to kPa, and study the properties of substrates

(glass, silicone membranes and polyacrylamide gels), as well as the cell line used in the Thesis.

At focal adhesion level, the strategy was to transfect mouse mammary epithelial cells (HC11), with adhesion proteins (eg zixina, FAK, vinculin, paxillin) fused to visible fluorescent proteins. Thus, using fluorescence microscopy and spectroscopy, it is possible to visualize the expression of proteins, register their location and evolution over time and through different analysis, extract quantitative information about the dynamics, kinetics and organization of focal adhesion complexes. The analysis of the dynamics and distribution of focal adhesion complexes and their interactions were performed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). The effective diffusion coefficients of the proteins mentioned were characterized. The analysis of the cross-correlation of fluorescence fluctuations of pairs of focal adhesion proteins (FCCS) allowed to demonstrate the interaction between various adhesive proteins in focal adhesion. The dissociation kinetics of proteins from the focal adhesion was evaluated by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) under different conditions.

To study the changes generated in the organization and dynamics of focal adhesions in living cells, in response to a global external mechanical stimulus, an equibiaxial traction device adapted to be used simultaneously with the FV1000 confocal microscope was used. Mechanical tension applied by the pulling device is able to induce changes in the area of living cells as well as in focal adhesions. In response to mechanical stretch increased, the recruitment and translocation of the protein zyxin accompanied by a significant decrease in the dissociation constant was observed.

To correlate the mechanical properties of the substrate and the traction force generated by the cell at a focal adhesions level, without losing sight of the organization and dynamics of proteins in focal adhesion, traction force microscopy was implemented (TFM). This technique has the sensitivity necessary to measure the traction force generated by the cell on an elastic and transparent substrate, which can be combined with other fluorescence microscopy techniques such as FRAP or FCS. Analysis of TFM data for zyxin yielded deformation and traction forces maps, while the dissociation kinetics was evaluated by FRAP.

Keywords: Atomic Force Microscopy, Force Spectroscopy, Mechanotransduction, Living cells, Traction Force Microscopy,

Agradecimientos

Para comenzar quiero agradecer a Lía por aceptarme en el CMA, acompañándome en mi formación, desde la Tesis de Licenciatura hasta la actualidad y por confiar en mí para la siguiente etapa. Estoy infinitamente agradecida por ayudarme a finalizar este trabajo de Tesis, ocupándose incansablemente día y noche.

A Lorena por estar siempre dispuesta a ayudar, analizando datos, discutiendo resultados, corrigiendo resúmenes, posters y principalmente esta Tesis!!! Gracias por darme ánimos en esta etapa final, siempre con la mejor energía. Por explicarme las cosas mil veces sin perder la paciencia. Por acompañarme en las mediciones de los viernes. Por compartir el placer por viajar!

A Catalina por compartir su conocimiento, tanto científico como culinario. Por su infinita paciencia y fortaleza para enfrentar los problemas. Por instaurar el "ohm" en el CMA y las escapadas cerveceras.

A Natalio, Claudia y Silvio, por generar un hermoso clima de trabajo, compartiendo anécdotas, chistes, recuerdos que siempre me sacan una sonrisa. También quiero agradecer a Silvio, Maxi, Eduardo, Pochi y Dani por ayudarme con el laboratorio de electrónica.

A Mauricio Sica por aceptarme en su laboratorio y por ofrecer su ayuda en la recta final.

Al Dr. Omar Azzaroni por su colaboración en el estudio del polímero termosensible.

A Carolina Díaz y Hernán Garate por la buena predisposición para contestar mails y preguntas desde el otro lado del mundo. También quiero agradecer a Laura Gastaldi por sus consejos.

A Yanina, Amparo, Lucía, Martín, Jimena y Juan por ayudarme en el cultivo celular, otorgando consejos y cediendo sus minutos. También por "luchar" a mi lado en el *tetris* del tanque de nitrógeno. Especialmente quiero agradecer a Jimena y Amparo por incluirme más allá del trabajo, compartiendo los sábados voluntariosos.

A Estefy, Cecilia y Lucía por su compañía en el microscopio confocal, por las charlas de becarias y los mates.

A Marta Perdernera por ayudarme y guiarme con los infinitos trámites del doctorado.

A mis amigos, sin ellos no podría hacer nada. Son incondicionales, siempre dispuestos a ayudar, escuchar y debatir, sin importar día ni hora, ofreciendo otra mirada de las cosas. Puedo nombrarlos, pero no puedo escribir cómo me cambiaron la vida. En este trayecto final fue impagable la ayuda y el apoyo que tuve de Romi, Dani, Darío y María Emilia. También quiero destacar la buena voluntad y el apoyo de Rumi que sin saber nada de física ni biología estuvo cuando lo necesité.

A Iván, Sol y Mariana por el apoyo en la nueva etapa.

A mi familia por cuidarme, cada uno a su manera.

A Santu por siempre confiar en mí y soportarme en estos días donde paso de la risa al llanto cada dos minutos. Gracias!!

A mi madre por su apoyo incondicional y por darme la tranquilidad que necesito en momentos difíciles.

Índice General

1. Introducción	3
1.1 Mecanotransducción celular	3
1.2 Estrategia de estudio.....	4
1.3 Referencias	4
2. Objetivos del trabajo de Tesis.....	9
3. Fundamentos de las técnicas experimentales.....	13
3.1 El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	13
3.1.1 Microscopio de Fuerza Atómica. Modos de funcionamiento.....	13
3.1.2 Espectroscopía de fuerza: teoría y modelos de elasticidad.....	15
3.1.3 Mapas cuantitativos de propiedades mecánicas: Modo Peak Force QNM	18
3.1.4 Sensores de fuerza.....	21
3.2 Microscopio Confocal	23
3.2.1 Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP). Teoría y modelo.....	25
3.2.2 Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) y de correlación de fluorescencia cruzada (FCCS).....	29
3.3 Microscopía de Fuerzas de Tracción (TFM)	32
3.4 Referencias	38
4. Cultivo celular y dispositivo estirador	43
4.1 Cultivo celular.....	43
4.2. Proteínas de las adhesiones focales	44
4.3 Dispositivo estirador equibiaxial.....	46
4.4 Referencias	47
5. Mapeo de propiedades nanomecánicas: de polímeros a células	53
5.1 Sistemas multicapas termo-responsivos de microgel	53
5.2 Sistemas nanoestructurados EPOXI-SISe reforzados con nanotubos de carbono .	58
5.3 Mapeo cuantitativo de las propiedades mecánicas de bacterias expuestas a iones y nanopartículas de Ag	66
5.4 Conclusiones.....	74
5.5 Referencias	74

6. Dinámica molecular de las adhesiones focales en equilibrio mecánico: sustrato no deformable.....	79
6.1 Expresión y visualización de las proteínas de las adhesiones focales en células HC11	79
6.2 Cinética de disociación de la proteína zixina mediante la recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP)	81
6.2.1 Implementación del experimentos de FRAP	81
6.2.2 Determinación de la constante de disociación de la proteína zixina en células HC11	84
6.3 Coeficientes de difusión efectivos de las proteínas de las adhesiones focales en células vivas por espectroscopía de correlación de fluorescencia	88
6.3.1 Implementación del experimento de FCS	88
6.3.2 Determinación de la dinámica de distintas proteínas de adhesión focal.....	90
6.3.3 Interacción entre proteínas de adhesiones focales	93
6.4 Conclusiones.....	97
6.5 Referencias	98
7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato	103
7.1 Dispositivo estirador equibiaxial: aplicación de estímulos mecánicos controlados a células vivas.....	103
7.1.1 Caracterización del estímulo mecánico mediante el análisis de PIV	103
7.1.2 Evaluación de la transmisión del estímulo mecánico desde el sustrato a las células	107
7.2 Dinámica y morfometría de las adhesiones focales ante un estiramiento equibiaxial del sustrato.....	108
7.2.1 Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en células sometidas a un estiramiento mecánico.....	108
7.2.2 Análisis morfométrico de las adhesiones focales en células sometidas a un estímulo mecánico externo	110
7.3 Localización y cinética de la proteína zixina ante un estiramiento equibiaxial de sustrato	116
7.3.1 Localización de la proteína zixina en respuesta a un estímulo mecánico.....	116
7.3.2 Cinética de disociación de la proteína zixina en respuesta al estímulo mecánico externo	117
7.4 Conclusiones.....	118
7.5 Referencias	119

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable.....	123
8.1 Caracterización del sistema célula-sustrato deformable	123
8.1.1 Fabricación y caracterización de sustratos deformables para estudiar la adhesión celular	123
8.1.2 Marcadores fluorescentes empleados para la microscopía de tracción.....	125
8.1.3 Determinación del módulo de Young del sustrato deformable mediante Espectroscopía de Fuerza	127
8.1.4 Determinación del módulo de Young de las células HC11	129
8.2 Cinética y dinámica de la proteína zixina en respuesta a la elasticidad del sustrato	132
8.2.1 Cinética de disociación de la proteína zixina evaluada mediante FRAP.....	132
8.2.2 Dinámica de la proteína zixina mediante <i>pointFCS</i>	134
8.3 Correlación entre la tracción celular y la elasticidad del sustrato	136
8.3.1 Mapas de deformación y tracción celular: Microscopía de Tracción (TFM) ...	136
8.3.2 Efecto de la elasticidad del sustrato en la generación de tracción celular	140
8.4 Correlación entre fuerzas de tracción celular y cambios en la cinética de la proteína zixina	142
8.5 Conclusiones.....	145
8.6 Referencias	146
9. Conclusiones generales.....	151

1. Introducción

1. Introducción

1.1 Mecanotransducción celular

Las células sensan activamente y responden a una variedad de señales mecánicas, como fuerzas de corte durante la respiración y el flujo sanguíneo, o de compresión y tensión debido a la contracción muscular. La rigidez mecánica de la matriz extracelular (ECM) que rodea las células determina críticamente la función celular normal, la diferenciación de células madres y la homeostasis del tejido^{i ii}. Por el contrario, los cambios anormales en la rigidez de la ECM contribuyen a la aparición y la progresión de diversas enfermedades, como el cáncer y la fibrosisⁱⁱⁱ. Las fuerzas que experimentan las células juegan también un papel crucial en la regulación de la morfogénesis de los tejidos de embriones en desarrollo^{iv v}.

La conexión entre la célula y la matriz extracelular se da en complejos multiproteicos denominados adhesiones focales, que se forman (inicialmente como complejos focales) a partir del agregado de proteínas transmembrana de la familia de las integrinas^{vi}. Los dominios extracelulares de las integrinas reconocen ligandos presentes en la matriz extracelular (como los dominios de fibronectina) mientras que el dominio citoplasmático de dichas moléculas se ancla al citoesqueleto de actina a través de numerosas proteínas adaptadoras. El acoplamiento entre el citoesqueleto y la matriz extracelular es clave para la integración de las fuerzas mecánicas que median los procesos celulares.

Los cambios en la tracción mecánica (fuerza por unidad de área) generan modificaciones estructurales o químicas que la célula debe detectar y compensar para lo cual reestructura sus componentes, activa vías de señalización, y ajusta su contractilidad, en un proceso complejo llamado mecanotransducción celular. Es aún poco conocido cómo el sensado a través de las fuerzas de tracción permite a las células detectar la rigidez de la matriz y cómo las células transducen esta información mecánica en una respuesta celular. Debido al gran número de mecanosensores y transductores que participan en la mecanotransducción celular^{vii} estas incógnitas plantean un gran desafío. Algunas de las proteínas involucradas son, paxilina^{viii}, vinculina^{ix x}, zixina^{xi}, Talina^{xii}, p130Cas^{xiii}, integrinas^{xiv xv}, y el citoesqueleto de actina^{xvi xvii}. Todavía no está claro cómo estos componentes trabajan juntos para regular el mecanosensado.

1.2. Estrategia de estudio

La caracterización de las propiedades mecánicas de las células y su entorno, es un gran desafío. La gran heterogeneidad en la estructura y en la composición de las células requiere de estudios en una escala de tiempo adecuada (segundos a minutos, y días), en condiciones fisiológicas^{xviii}, y con una resolución en fuerzas en los piconewtons^{xix}. El desafío reside en combinar e integrar diferentes técnicas que poseen una alta resolución espacio-temporal para analizar eventos altamente localizados en una célula viva con las propiedades mecánicas del entorno. En este contexto, en el marco del trabajo de Tesis, se implementarán microscopías y espectroscopías avanzadas en combinación con técnicas de cultivo celular y de preparación de sustratos artificiales para el cultivo de células, para estudiar cómo las propiedades mecánicas del sustrato modulan la organización-dinámica de proteínas en la adhesión focal en células vivas.

1.3. Referencias

ⁱ Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E., "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification", *Cell*, 2006, **126**: 677–689.

ⁱⁱ Orr, A. W., Helmke, B. P., Blackman, B. R., Schwartz, M. A., "Mechanisms of mechanotransduction", *Dev. Cell*, 2006, **10**: 11–20.

ⁱⁱⁱ Lu, P., Weaver, V. M., Werb, Z., "The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression", *J. Cell Biol.*, 2012, **196**: 395–406.

^{iv} Campás, O., Mammoto, T., Hasso, S., Sperling, R. A., O'Connell, D., Bischof, A. G., Maas, R., Weitz, D. A., Mahadevan, L., Ingber, D. E., "Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues", *Nat. Methods*, 2014, **11**: 183–189.

^v Brunet, T., Bouclet, A., Ahmadi, P., Mitrossilis, D., Driquez, B., Brunet, A.-C., Henry, L., Serman, F., Béalle, G., Ménager, C., Dumas-Bouchiat, F., Givord, D., Yanicostas, C., Le-Roy, D., Dempsey, N. M., Plessis, A., Farge, E., "Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in bilateria", *Nat. Commun.*, 2013, **4**: 2821.

^{vi} Hynes, R. O., "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines", *Cell*, 2002, **110**: 673–687.

^{vii} Moore, W., Roca-Cusachs, P., Sheetz, M. P., "Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing", *Dev. Cell*, 2010, **19**: 194–207.

^{viii} Pasapera, A. M., Schneider, I. C., Rericha, E., Schlaepfer, D. D., Waterman, C. M., "Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation", *J. Cell Biol.*, 2010, **188**: 877–890.

^{ix} Diez, G., Auernheimer, V., Fabry, B., Goldmann, W. H., "Head/tail interaction of Vinculin influences cell mechanical

1. Introducción

behavior", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, **406**: 85–88.

^x Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A. M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., Ballestrem, C., "Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner", *Curr. Biol.*, 2013, **23**: 271–281.

^{xi} Smith, M. A., Hoffman, L. M., Beckerle, M. C., "LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse", *Trend in cell biology*, 2014, **24**: 575-583.

^{xii} Del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J. M., Sheetz, M. P., "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding", *Science*, 2009, **323**: 638–641.

^{xiii} Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., Sheetz, M. P., "Force sensing by extension of the src family kinase substrate p130Cas", *Cell*, 2006, **127**: 1015–1026.

^{xiv} Novikova, E. A., Storm, C., "Contractile fibers and catch-bond clusters: a biological force sensor?", *Biophys. J.*, 2013, **105**: 1336–1345.

^{xv} Elosegui-Artola, A., Bazellières, E., Allen, M. D., Andreu, I., Oria, R., Sunyer, R., Gomm, J. J., Marshall, J. F., Jones, J. L., Trepats, X., Roca-Cusachs, P., "Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types", *Nat. Mater.*, **13**: 631–637.

^{xvi} Kim, D.-H., Chambliss, A. B., Wirtz, D., "The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction", *Soft Matter*, 2013, **9**: 5516–5523.

^{xvii} Burridge, K., Wittchen, E. S., "The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers", *J. Cell Biol.*, 2013, **200**: 9–19.

^{xviii} Chen, C. S., Tan, J., Tien, J., "Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2004, **6**, 275–302;

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E., "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification", *Cell*, 2006, **126**, 677–689;

Discher, D. E., Janmey, P., Wang, Y. L., "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate", *Science*, 2005, **310**: 1139–1143.

^{xix} Huang, H., Kamm, R. D., Lee, R. T., "Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology", *Ann. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, **287**: C1-C11.

2. Objetivos del trabajo de Tesis

2. Objetivos del trabajo de Tesis

Las células pueden “*sensar*” y responder a un amplio rango de señales externas, químicas y físicas, integrar y analizar esta información y, en consecuencia, cambiar su morfología, dinámica, comportamiento y, eventualmente, destino. Este fenómeno comprende distintos mecanismos de *sensado* y está ampliamente distribuido en casi todos los tipos de células, desde procariotas a organismos multicelulares. A nivel celular, muchas de las respuestas biológicas a las señales externas se originan en dos tipos de estructuras especializadas: adhesiones focales (célula-matriz extracelular) y uniones adherentes (célula-célula). A nivel de la membrana celular, el agregado de moléculas de integrina es un evento inicial crucial durante la formación de los complejos focales, y su subsiguiente desarrollo en adhesiones focales.

El objetivo general del trabajo de Tesis es estudiar cómo las propiedades mecánicas del sustrato modulan la organización-dinámica de proteínas en la adhesión focal en células vivas.

Objetivos específicos:

- Mapeo de propiedades nanomecánicas: determinación de propiedades mecánicas tanto de las células vivas como de los sustratos.
- Evaluación de la dinámica molecular de las adhesiones focales en un sustrato no deformable.
- Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en respuesta a un estiramiento equibiaxial del sustrato.
- Correlación entre la dinámica molecular de las adhesiones focales y las fuerzas de tracción celular en función de las propiedades mecánicas del sustrato.

El trabajo de Tesis está organizado de la siguiente manera. Los fundamentos de las técnicas empleadas se presentan en el **Capítulo 3**. En primer lugar se describe la microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de fuerza con los distintos modos de operación y los modelos empleados. Luego se describen diferentes técnicas

avanzadas de microscopía confocal junto con los modelos asociados para la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP), la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), y la espectroscopía de correlación de fluorescencia cruzada (FCCS). Finalmente se presenta la técnica de microscopía de fuerzas de tracción (TFM) que permite determinar la tracción generada por las células cultivadas sobre sustratos deformables.

La línea celular y las principales características de las proteínas de adhesión focal estudiadas se introducen en el **Capítulo 4**. En particular se detallan los protocolos de mantenimiento, preservación y transfección utilizados en el cultivo celular. También se describe el dispositivo estirador equibiaxial adaptado para realizar mediciones con el microscopio confocal, que será utilizado para analizar la respuesta de la célula ante un estímulo mecánico externo.

En el **Capítulo 5** se presentan los resultados de la aplicación de la espectroscopía de fuerza en el estudio de propiedades mecánicas de diferentes tipos de muestras: desde sustratos poliméricos termo-responsivos o sistemas nanoestructurados de copolímeros de bloque reforzados con nanotubos de carbono, hasta cultivos de bacterias.

En el **Capítulo 6** se muestran los resultados de la implementación y optimización de las diferentes técnicas avanzadas de microscopía confocal en células de epitelio mamario de ratón HC11, cultivadas sobre un sustrato no deformable. Se determinaron los parámetros cinéticos/dinámicos moleculares que definen el marco de referencia para experimentos realizados sobre sustratos con diferentes propiedades mecánicas.

En el **Capítulo 7** se exponen los resultados de la respuesta en la dinámica molecular de las adhesiones focales de células vivas sometidas a un estímulo mecánico externo generado por el estiramiento equibiaxial del sustrato.

En el **Capítulo 8** se presentan los resultados obtenidos sobre el efecto de la variación de las condiciones de contorno mecánicas para la célula, sobre la dinámica molecular de las adhesiones focales y la generación de fuerzas de tracción celular.

Finalmente en el **Capítulo 9** se resumen las conclusiones generales del presente trabajo.

3. Fundamentos de las técnicas experimentales

3. Fundamentos de las técnicas experimentales

3.1 El Microscopio de Fuerza Atómica

En este trabajo se utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM) de la firma Digital Instruments (Veeco, actualmente Bruker, Santa Barbara, EEUU), modelo Multimode 8 (Figura 3.1 A), con controlador Nanoscope V, Quadrex y un módulo de acceso a señales (SAM) que permite monitorear externamente cualquiera de las señales medidas con el microscopio. Se utilizó un escáner que permite barrer un área de $120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$, y un movimiento en el eje vertical de hasta $4\ \mu\text{m}$.

3.1.1 Microscopio de Fuerza Atómica. Modos de funcionamiento

El principio de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica (AFM), se basa en hacer barrer (en contacto o a una distancia muy próxima) una punta extremadamente filosa sobre la muestra que se quiere estudiar. El AFM consta de tres partes: la cabeza, el escáner, y la base (Figura 3.1 A). En la cabeza del AFM se encuentra la muestra, el sensor de fuerza y el sistema de detección. El sistema de detección consiste en un diodo láser, un espejo y un fotodetector de cuatro cuadrantes. El escáner o barredor permite mover la muestra tanto en el plano X e Y como en Z .

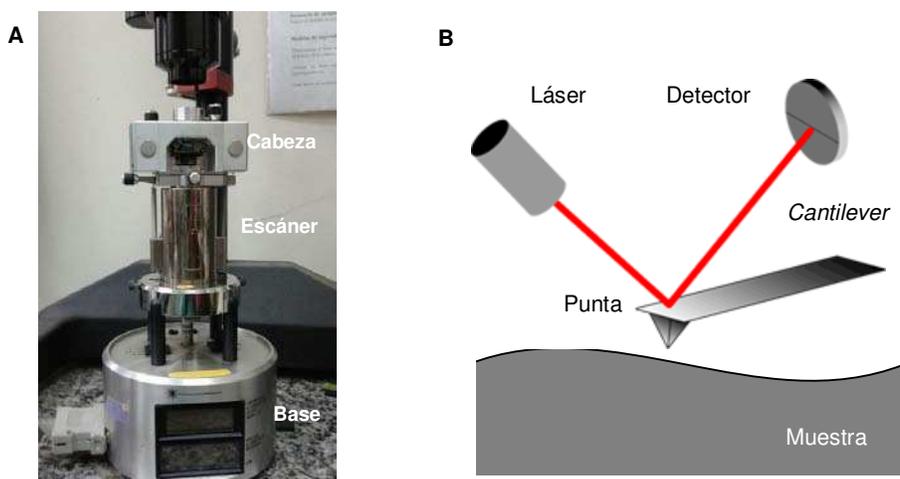


Figura 3.1. Microscopio de Fuerza Atómica. (A) Fotografía del Microscopio de Fuerza Atómica utilizado, en el cual se indican sus partes principales. (B) Diagrama del sistema de detección del AFM.

El sensor de fuerza es una punta unida a un fleje o *cantilever* flexible, por lo general de silicio o nitruro de silicio. Mediante el movimiento del escáner la punta del sensor recorre la superficie registrando la topografía de la muestra. Las variaciones en la altura de la superficie producen la deflexión del fleje que se detecta por la reflexión de un láser que ilumina la punta del sensor (Figura 3.1 B). Registrando de este modo las variaciones de altura se construyen imágenes tridimensionales de la topografía de la superficie.

Mientras que la resolución en las direcciones laterales está dada principalmente por el tamaño y la forma de la punta, la resolución en Z es mayor dada la gran sensibilidad de detección del método óptico. Existen dos modos básicos para la obtención de imágenes de topografía, según se mida la deflexión estática (modo contacto) o la oscilación dinámica del *cantilever* (modo contacto intermitente).

Modo Contacto

En el modo Contacto la imagen de altura se adquiere manteniendo en contacto permanente la sonda con la muestra mientras realiza un barrido en X e Y . Esto se logra manteniendo la deflexión del *cantilever* constante mediante un lazo de retroalimentación. Esta señal se emplea para estimar la altura de la muestra y ajustar la posición en Z del *cantilever*. Las diferencias en el cálculo se utilizan para construir la imagen de deflexión, también conocida como la señal de error. La imagen de altura proporciona una medición cuantitativa de la topografía de la muestra. La imagen de deflexión no responde a ninguna magnitud física, sin embargo, otorga una imagen con mayor contraste donde se perciben detalles de la superficie (Figura 3.2 A).

Modo Contacto Intermitente

En el modo de contacto intermitente (del inglés, *Tapping Mode*[®]) el *cantilever* barre la muestra oscilando a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia. Cuando se aproxima o se aleja de la superficie de la muestra, la amplitud de la oscilación cambia debido a la interacción entre la punta y el campo de fuerza de la muestra. En este caso el escáner ajusta la altura Z a través del lazo de retroalimentación para mantener una amplitud constante, lo que hace que la sonda permanezca a una distancia fija de la muestra (Figura 3.2 B). Al no estar en contacto permanente con la muestra, el modo intermitente se utiliza principalmente para estudiar muestras biológicas ya que el riesgo de dañar la superficie de la muestra es menor.

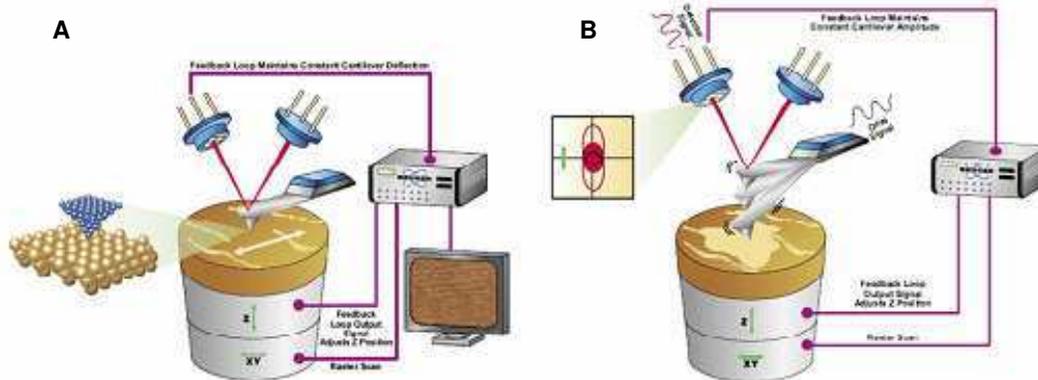


Figura 3.2. Diagramas de los modos de funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica. (A) Modo Contacto. (B) Modo Contacto Intermitente. Imágenes extraídas de <http://www.brukerafmprobes.com>

Además, asociadas a este modo se pueden obtener las señales de la amplitud y de la fase de la oscilación para cada punto del barrido.

3.1.2 Espectroscopía de fuerza: teoría y modelos de elasticidad

Mediante la técnica denominada *Espectroscopia de Fuerza* (FS), se estudian las fuerzas de interacción entre la punta del sensor de fuerza y la muestra. Esta técnica está basada en la precisión que posee el microscopio de fuerza atómica para detectar la deflexión del fleje. Considerando que el *cantilever* cumple la ley de Hook se puede interpretar, mediante la constante elástica (K) del fleje, la deflexión (d) como la fuerza de interacción (F) entre la punta y la muestra

$$F = - K.d \quad (\text{Ec.3.1})$$

Dada la gran sensibilidad con la que puede medirse la deflexión y los rangos de constantes elásticas de los *cantilevers* comerciales (0.01-350 N/m), la FS permite medir fuerzas en un amplio rango que va de los pN a los μN .

Para estimar la fuerza es necesario conocer la constante elástica del *cantilever*. Si bien el fabricante informa un valor nominal, es conveniente determinarlo en cada experimento. En este trabajo la constante elástica del *cantilever* se midió por el método de ruido térmico¹. Este procedimiento consiste en medir la señal de deflexión de la oscilación libre del *cantilever* debida al ruido térmico y realizar el análisis espectral. El nuevo sistema de análisis de datos en vivo *NanoScope 1.4* facilita la

calibración de la constante elástica del sensor de fuerza ya que incluye la herramienta *Thermal Tune* que registra la señal de deflexión y realiza el ajuste lorentziano del espectro, otorgando el valor de la constante elástica.

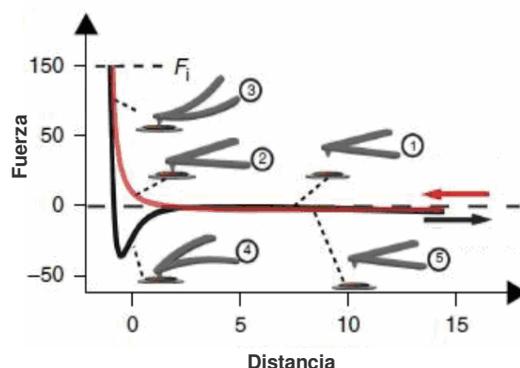


Figura 3.3. Diagrama de una Curva fuerza–distancia. Describe un ciclo de aproximación – retracción de la punta del sensor de fuerza a la muestra. La punta se aproxima a la superficie (1), esta atracción inicial entre la punta y la superficie está dada por fuerzas de tipo Van der Waals que conducen al contacto (2). La punta ejerce presión sobre la superficie, se indenta la muestra, y se produce la deflexión del *cantilever* (3). Luego, la punta se aleja de la superficie (4). Se mide la adhesión entre la punta y la muestra como la diferencia entre el valor de fuerza antes de tocar la muestra, y el valor en el que se desprende la punta de la muestra (5) en el ciclo de retracción. Imagen extraída y modificada de ².

Para medir la interacción entre la punta del sensor de fuerza y la superficie de la muestra se registra lo que se denomina una curva de fuerza, midiendo la fuerza en función de la distancia entre la punta y la muestra. Cuando se adquiere una curva de fuerza el *cantilever* se mueve solamente en el eje vertical, planteando un ciclo de aproximación y retracción entre la punta y la muestra. En la Figura 3.3 se muestra un diagrama de curva de fuerza donde se enumeran las distintas etapas del ciclo. En la aproximación, la punta se acerca a la superficie hasta tomar contacto con la muestra (2). Al continuar el movimiento de acercamiento de la punta más allá del punto de contacto se genera una fuerza aplicada sobre la superficie (3). La pendiente de esta fuerza es una medida de la elasticidad de la muestra. En la retracción se aleja la punta de la muestra, debido a las propiedades de adhesión entre la punta y la muestra, la punta no se separará de la superficie hasta que la fuerza utilizada para alejar la punta sea superior a la fuerza de adherencia entre ellas. La diferencia entre esta fuerza (4) y el valor de la fuerza antes de tocar la superficie (1) se considera como una medida de la fuerza de interacción entre la punta y la muestra. Finalmente, la punta del sensor de fuerza se separa de la superficie volviendo a la posición inicial (5).

Entre las aplicaciones de esta técnica se encuentra la determinación de la elasticidad del material. La forma de la curva de fuerza refleja las propiedades

elásticas de la muestra ya que una vez alcanzado el punto de contacto la indentación de la punta va a depender de la dureza del material. Para el caso de un material rígido, como una muestra de vidrio o mica, la curva de fuerza tiene un comportamiento lineal y una indentación pequeña, mientras que si la muestra es blanda como ser un gel o una célula, la indentación es mayor y presenta una suave curvatura. En la Figura 3.4 se muestran dos curvas de fuerza con estas características.

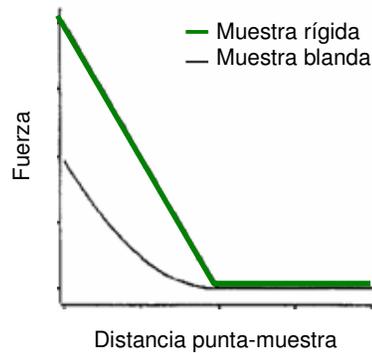


Figura 3.4. Curvas de fuerza según la elasticidad del sustrato. Curvas de fuerza características de un material rígido (verde), y uno blando (negro).

Frente a la variedad de materiales y comportamientos se han desarrollado diferentes modelos de ajuste para extraer los parámetros de elasticidad. En esta Tesis se utilizaron principalmente los modelos de elasticidad de Hertz³ (1882) y el de Sneddon⁴ (1965).

El modelo de Hertz describe la indentación de una punta esférica en una muestra elástica e infinitamente extendida. Este modelo es apropiado cuando la profundidad de indentación es significativamente menor que el radio de curvatura de la sonda o punta. El modelo de Hertz no toma en cuenta la adhesión. Cuando la punta tiene una geometría cónica, al indentar una muestra elástica la profundidad de penetración es del orden o supera el radio de curvatura de la sonda, en este caso el modelo de Sneddon es el más apropiado⁵. Las ecuaciones que relacionan la fuerza aplicada con la indentación de la muestra para cada modelo son:

$$\text{Modelo de Hertz} \quad F = \frac{4}{3} \cdot \frac{E_s}{1-\nu_s^2} \cdot \sqrt{r} \cdot \delta^{3/2} \quad (\text{Ec 3.2})$$

$$\text{Modelo de Sneddon} \quad F = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E_s}{1-\nu_s^2} \cdot \tan(\alpha) \cdot \delta^2 \quad (\text{Ec 3.3})$$

donde E_s es el módulo de Young de la muestra, δ es la indentación, ν_s es el radio de Poisson de la muestra, r es el radio de curvatura de la punta, y α es el ángulo de apertura de la punta del sensor de fuerza.

En la Figura 3.5 se resumen los parámetros geométricos de la punta y propiedades mecánicas de la muestra.

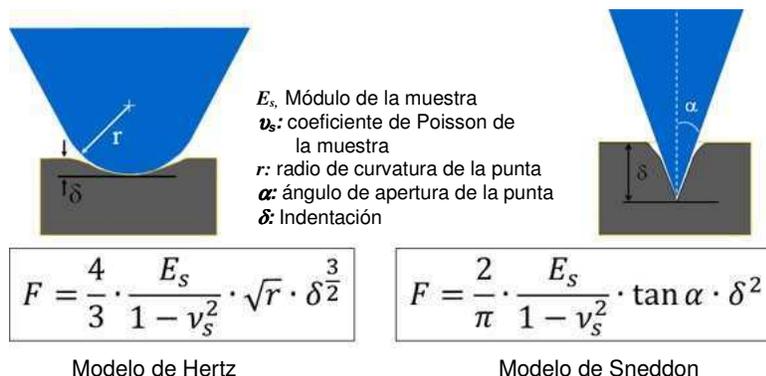


Figura 3.5. Modelos de elasticidad: Modelo de Hertz y modelo de Sneddon. Se presentan las ecuaciones características que se utilizan en cada modelo para ajustar la fuerza, donde E_s es el módulo de Young de la muestra, δ es la indentación, ν_s es el radio de Poisson de la muestra, r es el radio de curvatura de la punta, y α es el ángulo de apertura de la punta del sensor de fuerza. Extraído y modificado de ⁶.

Para poder utilizar el modelo es necesario graficar la fuerza en función de la distancia punta-muestra. Esto significa que se debe corregir la posición en Z , obtenida de la medición, restando la deflexión del *cantilever* en cada punto de la curva. Luego, a partir del modelo correspondiente a la medición realizada se puede calcular el módulo de Young de la muestra.

3.1.3. Mapas cuantitativos de propiedades mecánicas: Modo *Peak Force QNM*

El modo *Peak Force Quantitative Nanomechanical Property Mapping* (PF-QNM) es un modo avanzado de AFM que opera de manera similar al Modo de Contacto Intermitente (TM-AFM), donde el sensor de fuerza realiza un movimiento de oscilación que minimiza el contacto con la muestra y elimina las fuerzas laterales. Sin embargo, a diferencia del TM-AFM funciona en un modo no resonante. La oscilación de *PeakForce QNM* se realiza a frecuencias muy por debajo de la resonancia del *cantilever*, evitando así la dinámica de un sistema resonante. El modo *PeakForce QNM*, combina los beneficios del Modo de Contacto y de Contacto Intermitente: otorga un control directo de la fuerza y reduce los daños generados por las fuerzas laterales.

La diferencia respecto a una curva de fuerza convencional es que la posición Z es modulada por una onda sinusoidal y no una triangular, evitando así resonancias no deseadas en los puntos extremos, cuando cambia el sentido. Estas mejoras permiten adquirir curvas de fuerza para frecuencias entre 1 kHz y 10 kHz, en simultáneo con el registro de imágenes⁷. Los primeros mapas cuantitativos de propiedades nanomecánicas se realizaron en el Modo *Force Volume*, una extensión del Modo Contacto, el cual captura curvas de fuerza para cada píxel de la imagen. Por lo general, obtener un mapa en este modo toma un par de horas, debido a que el tiempo de adquisición de una curva de fuerza suele ser un segundo y un mapa necesita miles de curvas de fuerza para describir la muestra. Esta limitación de velocidad se ha mejorado, la modulación del movimiento en Z del escáner permite la asignación de propiedades en un tiempo mucho más corto, por ejemplo una imagen de 512x512 píxeles requiere aproximadamente 10min. El funcionamiento general del PF-QNM se ilustra en la Figura 3.6.

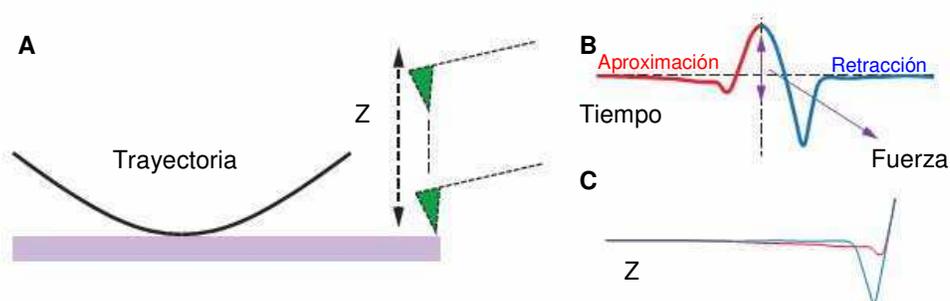


Figura 3.6. Peak Force-QNM. (A) Diagrama de la trayectoria sinusoidal del sensor de fuerza. Fuerza en función del tiempo (B) y de la posición Z del escáner (C). Extraída y modificada de ⁸.

El modo PF-QNM permite obtener simultáneamente la imagen de altura, junto con los mapas de adhesión, módulo de elasticidad, deformación y disipación de la energía. Para ello adquiere y analiza las curvas de fuerza-distancia (F-D) en cada punto de la muestra (Figura 3.7 A), y como las imágenes están correlacionadas, se generan mapas de las propiedades mecánicas con resolución en la nanoescala⁸.

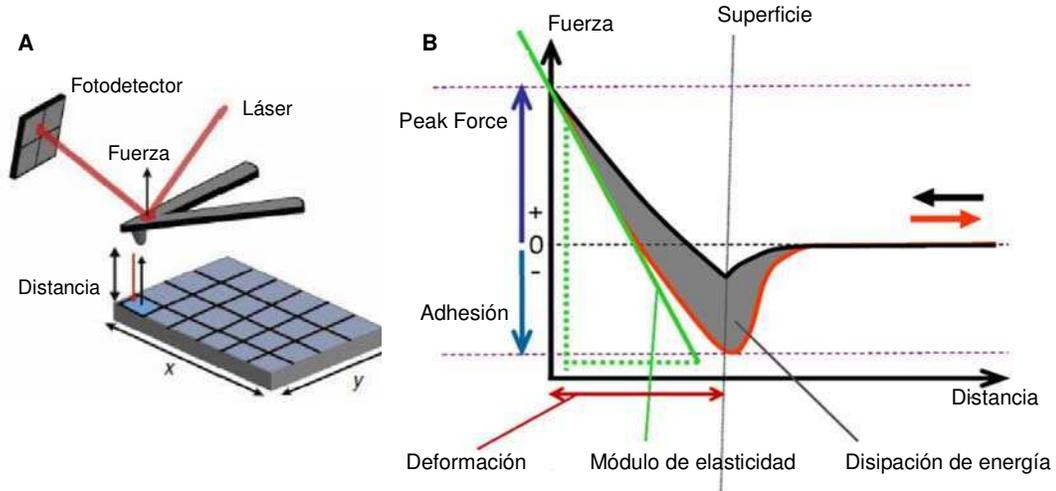


Figura 3.7. Modo PF-QNM. (A) Esquema del movimiento del *cantilever* en el Modo PF-QNM. (B) Curva de F-D aproximación y retracción, donde se destacan las propiedades mecánicas de la muestra extraídas de una curva de F-D. Esquemas extraídos y modificados de ⁸.

Los mapas obtenidos se basan en el análisis de las propiedades mecánicas que se pueden extraer de la curva de fuerza (Figura 3.7 B). A continuación se detallarán las propiedades calculadas.

- El mapa de fuerza de adhesión considera el valor mínimo de fuerza en la curva de retracción para cada píxel. La fuerza de adhesión puede deberse a cualquier fuerza atractiva entre la punta y la muestra. Si la punta está funcionalizada la adhesión refleja la interacción química entre las moléculas específicas entre la punta y la muestra.

- Para obtener el mapa de elasticidad el programa ajusta el modelo Derjaguin–Müller–Toporov⁹ a la curva de retracción de cada píxel. Otorgando un mapa del módulo de Young reducido (DMT, Ec. 3.1.2)

$$F - F_{Adh} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R(d - d_0)^3} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde, $F - F_{Adh}$ es la fuerza sobre el cantilever con relación a la fuerza de adhesión, R es el radio de la punta, y $d - d_0$ es la deformación de la muestra. El resultado del ajuste es el módulo reducido, E^* . Si el radio de Poisson de la muestra (ν_m) es conocido (generalmente varía entre 0,2 y 0,5) se puede obtener el valor del módulo de Young de la muestra, considerando como infinito el módulo de Young de la punta.

$$E^* = \left[\frac{1 - \nu_m^2}{E_m} + \frac{1 - \nu_{pta}^2}{E_{pta}} \right]^{-1} \quad (\text{Ec. 3.5})$$

- La deformación máxima de la muestra generada por la sonda se define, sobre la curva de aproximación, como la diferencia entre la distancia donde la fuerza es nula y la distancia correspondiente a la fuerza máxima. La deformación medida puede incluir contribuciones tanto elásticas como plásticas.

- El mapa de disipación muestra la energía disipada en cada ciclo obtenida mediante la integral del área encerrada entre las curvas del ciclo de interacción (aproximación-retracción)¹⁰. La energía de disipación se puede escribir como la integral de la fuerza por la velocidad para todo el ciclo de interacción:

$$W = \int \bar{F}d\bar{Z} = \int \bar{F}\bar{v}dt \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde, F es el vector de la fuerza de interacción y dZ es el vector desplazamiento. Si las curvas de fuerza de aproximación y retracción coinciden la integral en el ciclo se anula.

3.1.4 Sensores de fuerza

Las características más importantes a la hora de elegir un sensor de fuerza son el radio de curvatura de la punta debido a que determina la resolución lateral, y la constante elástica del fleje que otorga la sensibilidad del sensor en términos de fuerza. Existe una gran diversidad de tipos de sensores de fuerza, y dependiendo de la aplicación, el modo de operación o la resolución en fuerza que se desee obtener, se elegirá el sensor más adecuado (Tabla 3.1).

<i>Modelo</i>	<i>RTESP</i>	<i>NP/SNL</i>	<i>MSNL</i>	<i>OTESPA-R3</i>	<i>OTR4-PG</i>
Material	Silicio	Nitruro de silicio	Nitruro de silicio	Silicio	Nitruro de silicio
Cte. elástica (K)	40 N/m	(0.58; 0.12; 0.32; 0.06)N/m	(0.02; 0.07; 0.01; 0.03; 0.1; 0.6)N/m	26 N/m	(0.08 ; 0.02) N/m
Frec. de resonancia	300 kHz	(57; 20; 56; 18) kHz	(15; 22; 7; 15; 38; 125) kHz	300 kHz	(34 ;11) kHz
Radio de curvatura	8 nm	20 nm / 2nm	2 nm	7 nm	15 nm
Longitud	125 μm	(120; 205; 120; 205) μm	(210; 175; 310; 225; 140; 85) μm	160 μm	(100 y 200) μm
Forma	Rectangular	Triangular	1ra rectangular resto triangular	Rectangular	Triangular
Cobertura	No tiene	Oro	Oro	Aluminio	Oro y en la punta
Modo de operación	MT en aire	MC en aire. MC y MT en sc. FS.	MC en aire. MC y MT en sc. FS.	MT aire	MC aire, MC MT en solución. FS

Tabla 3.1. Características de diferentes tipos de sensores de fuerza utilizados en esta Tesis. Los datos fueron tomados de las especificaciones de los distintos fabricantes.

En la Figura 3.8 se presentan imágenes de microscopía electrónica de barrido de diferentes tipos de sensores de fuerza donde se pueden distinguir claramente las puntas y los *cantilevers*.

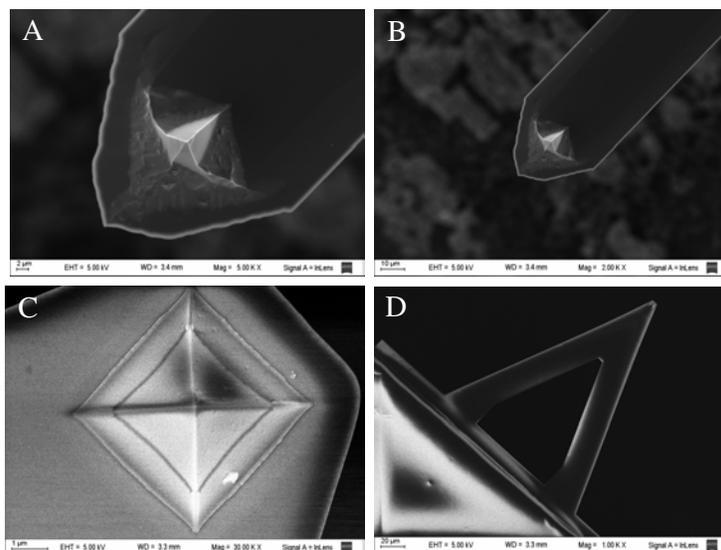


Figura 3.8. Sensores de fuerza. (A-B) Imágenes SEM correspondientes a la punta propiamente dicha (A) y al *cantilever* rectangular (B) de silicio modelo RTESP. (C-D) Imágenes correspondientes a la punta piramidal (C) y un *cantilever* triangular (D) de nitruro de silicio de sensores *OTR4-PG*. Fotos del archivo del CMA.

Para el modo *Peak Force QNM* seleccionar el *cantilever* apropiado es fundamental para obtener los mapas de las propiedades nano-mecánicas. La constante elástica del sensor de fuerza, debe elegirse en base a la elasticidad de la muestra. En la Tabla 3.2, se presentan los sensores de fuerza recomendados para medir muestras según el rango de Módulo de Young (E) esperado.

<i>E de la muestra</i>	<i>Sensor de fuerza</i>	<i>K nominal</i>
1 MPa < E < 20MPa	ScanAsyst-Air	0,5 N/m
5 MPa < E < 500MPa	Tap 150A, P/N MPP-12120-10	5 N/m
200 MPa < E < 2000MPa	Tap300A (RTESPA), P/N MPP-11120-10	40 N/m
1GPa < E < 20GPa	Tap525A, P/N MPP-13120-10	200 N/m
10GPa < E < 100GPa	DNISH-HS	350 N/m

Tabla 3.2. Sensores de fuerza para el modo PF-QNM. Modelos de sensores de fuerza recomendados para medir muestras con diferentes elasticidades. Tabla extraída de ¹⁰.

Existe una amplia gama de sensores de fuerza de AFM para trabajar con muestras biológicas. Dependiendo de su tipo, las células eucariotas pueden exhibir diferentes propiedades mecánicas. Así, las neuronas pueden ser extremadamente blandas (hasta 1kPa), mientras que las células óseas pueden ser tan rígidas como las bacterias. Las sondas más blandas que existen en el mercado son OBL-B, que tiene una constante de elástica nominal de 0.006 N /m.

3.2. Microscopio confocal

Básicamente la microscopía confocal utiliza un láser enfocado que ilumina un pequeño volumen de la muestra, excitando las sondas fluorescentes presentes en él. La fluorescencia emitida es recolectada por el mismo camino óptico, transmitida a través del espejo dicróico y finalmente enfocada en un detector (en general un fotomultiplicador o fotodiodo de avalancha). Delante del detector se coloca una pequeña abertura o *pinhole* para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco. De esta manera la luz dispersada o emitida por las regiones que se encuentran fuera del plano focal es total o parcialmente bloqueada, ver esquema en la Figura 3.9.

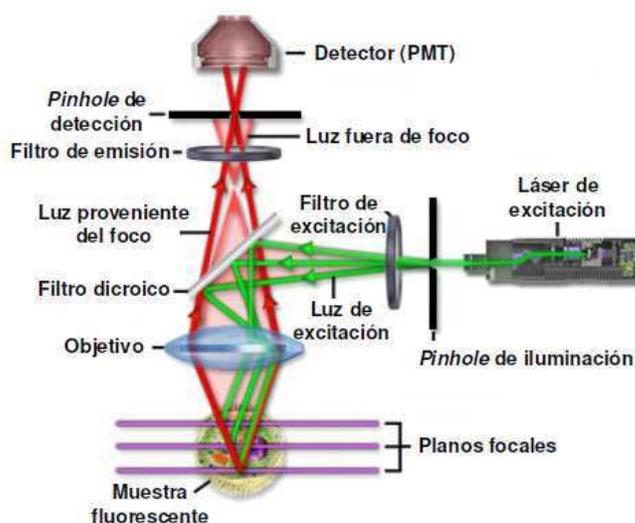


Figura 3.9. Esquema del principio de la microscopía confocal. El esquema pertenece al archivo del CMA, y fue originalmente modificado de la referencia¹¹.

El microscopio confocal espectral de la firma *Olympus*, modelo *FluoView 1000* (FV1000), fue el microscopio utilizado en este trabajo de Tesis, se encuentra instalado en el laboratorio de Microscopías y Microespectroscopías (LMM) del departamento de Física. Este microscopio consta de un módulo confocal espectral, unido a un microscopio invertido IX81 (ver Figura 3.10). Posee dos modos para adquirir imágenes, vinculados a dos sistemas de iluminación diferentes: por una parte el modo confocal, que tiene láseres como fuente de iluminación y por otra parte la adquisición de imágenes convencionales de fluorescencia (*wide field*), que utiliza la luz de una lámpara de mercurio.

El microscopio confocal tiene tres láseres que proveen en total cinco longitudes de onda: láser multilínea de Argón (457 nm, 488 nm, 515 nm), láser de Helio-Neón (543 nm), y un láser diodo de estado sólido (635 nm). Una unidad combinadora de láseres permite iluminar a la muestra simultáneamente con dos o más de las líneas láseres. Consta de tres canales de detección, dos de ellos de detección espectral dotados de una red de difracción y una ranura variable, que permiten una separación de longitudes de onda de alta resolución. Los detectores son fotomultiplicadores de alta sensibilidad con eficiencia cuántica de aproximadamente 100 % para 500nm (Hamamatsu). Un par de espejos galvanómetros permiten generar imágenes por barrido, con una velocidad máxima de 16 cuadros por segundo, para una imagen de

256 x 256 píxeles. La máxima resolución es de 4096 x 4096 píxeles. El mínimo intervalo de detección es de 2 μ s.



Figura 3.10. Microscopio confocal espectral Olympus FluoView 1000. Fotografía del microscopio confocal empleado, indicando la unidad confocal espectral, el microscopio base IX71, y la cámara ambiental.

El microscopio cuenta con diversos objetivos, los empleados en los experimentos mostrados en este trabajo son el objetivo 60x (*UPlanSAPO, Olympus*), apocromático de inmersión en aceite, AN 1.35 y distancia de trabajo 0.15 mm; objetivo 63X C-Apocromático de inmersión en agua AN 1.2 con collar ajustado en 0.17mm (*Zeiss*); o bien un 40X (*UPlanSAPO, Olympus*), AN 0,95 en aire. Además, el microscopio cuenta con una cámara ambiental (*Solent Scientific*) asociada a un controlador de temperatura. De esta manera se pueden realizar mediciones a temperatura constante, fundamental para el trabajo con células vivas.

3.2.1 Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP): teoría y modelo

La movilidad de las proteínas en el interior de células vivas puede ser estudiada mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo¹² (FRAP). Originalmente, dicha técnica hacía posible la medición de la difusión en las membranas celulares^{13,14}. Actualmente, gracias a la tecnología de las proteínas fluorescentes y a la microscopía confocal, se puede estudiar la dinámica molecular *in vivo*. Metodológicamente, la técnica FRAP consiste en fotoblanquear de

forma permanente las moléculas fluorescentes que se encuentran en una región de la célula y luego detectar en el tiempo la recuperación de la fluorescencia (Figura 3.11).

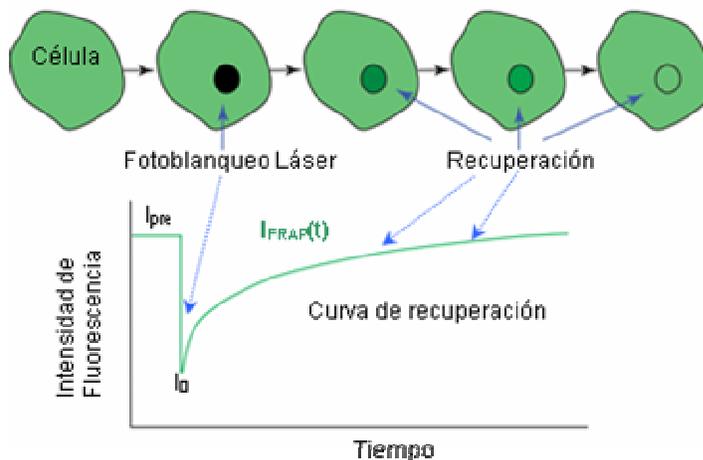


Figura 3.11. Esquema del método FRAP. Evolución temporal asociado a un experimento FRAP. Modificado de ¹⁵.

La rapidez con la que las moléculas fluorescentes se mueven en la región blanqueada puede ser cuantificada por la curva de recuperación de la fluorescencia $F(t)$. Esta se obtiene de los valores de intensidad en función del tiempo según la Ec. 3.7

$$F(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{pre} - I_0} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde, $I(t)$ es la fluorescencia en el volumen de detección, I_0 es la fluorescencia inmediatamente después de fotoblanquear, e I_{pre} es el valor medio de la fluorescencia antes del fotoblanqueo. F toma un valor de 1 antes del fotoblanqueo y de 0 en $t=0$, instante en el que se registra la primer imagen después del fotoblanqueo. En la recuperación, F crece pero la forma en que lo hace depende del proceso o de los procesos involucrados. En el caso de una difusión simple, la recuperación sigue una curva exponencial que retorna al valor inicial, y el tiempo de recuperación está asociado al coeficiente de difusión de las moléculas unidas al fluoróforo.

En general, la tasa de recuperación está regida por la velocidad de difusión y transporte de la molécula fluorescente a través del medio celular al igual que por las interacciones de unión-disociación, que detienen a las moléculas que de otro modo difundirían libremente. Debido a todas estas alternativas se han desarrollado varios

modelos matemáticos para interpretar mejor los procesos subyacentes, y extraer parámetros cuantitativos de una curva de recuperación FRAP.

Modelo de recuperación en adhesiones focales

La cinética de la reacción molecular en un experimento FRAP es no lineal. Lele y colaboradores¹⁶ (2004) establecieron un modelo matemático junto con distintas hipótesis para que las ecuaciones de transporte tengan solución analítica y así simplificar los procesos de estimación. A continuación se detalla parte de este modelo el cual fue empleado para ajustar los datos experimentales.

Las ecuaciones que gobiernan el transporte de proteínas para un sistema de dos estados libres o ligados en una célula son:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C - k_{ON}C\left(1 - \frac{\hat{C}}{\tilde{C}_0}\right) + k_{OFF}\hat{C} \quad (\text{Ec.3.8})$$

$$\frac{\partial \hat{C}}{\partial t} = k_{ON}C\left(1 - \frac{\hat{C}}{\tilde{C}_0}\right) - k_{OFF}\hat{C} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

$$\nabla C \cdot n = 0 \Big|_{\text{en el contorno de la célula}} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

Con C la concentración de proteína libre, \hat{C} la de proteína ligada, \tilde{C}_0 la concentración teórica de las moléculas si están ligadas a todos los sitios disponibles (si puede ligarse una molécula por sitio de unión, \tilde{C}_0 es igual a la concentración de sitios de unión), k_{ON} y k_{OFF} las tasas de asociación y disociación respectivamente entre los estados libres y ligados, y el factor $1 - \frac{\hat{C}}{\tilde{C}_0}$ que indica la fracción de sitios disponibles o la probabilidad de unión. La Ec. 3.10 representa que no hay flujo de proteínas fuera de la célula al menos durante el experimento FRAP.

Después del fotoblanqueo se crean dos conjuntos de moléculas ópticamente diferentes, moléculas fotoblanqueadas y moléculas fluorescentes. Sin embargo, las concentraciones de cada tipo se mantienen constantes, es decir igual a la concentración de equilibrio previo al fotoblanqueo. Si se llama C_P a la concentración de especies libres fotoblanqueadas y a la de moléculas libres fluorescentes C_F ; y análogamente para las especies ligadas \hat{C}_P y \hat{C}_F entonces $C_P + C_F = C_0$ y $\hat{C}_P + \hat{C}_F = \hat{C}_0$

con C_0 y \hat{C}_0 las concentraciones de equilibrio. Estas dos condiciones son válidas en todo el dominio y por lo tanto no existen gradientes de concentración en el total de especies, sólo en las concentraciones individuales (C_P ó C_F). Las moléculas fotoblanqueadas (P) y fluorescentes (F) todavía responden a las ecuaciones de transporte (Ec. 3.8-3.10)

$$\frac{\partial C_{P,F}}{\partial t} = D\nabla^2 C_{P,F} - k_{ON}C_{P,F}\left(1 - \frac{\hat{C}_0}{C_0}\right) + k_{OFF}\hat{C}_{P,F} \quad (\text{Ec. 3.11})$$

$$\frac{\partial \hat{C}_{P,F}}{\partial t} = k_{ON}C_{P,F}\left(1 - \frac{\hat{C}_0}{C_0}\right) - k_{OFF}\hat{C}_{P,F} \quad (\text{Ec. 3.12})$$

$$\nabla C_{P,F} \cdot n = 0 \Big|_{\text{en el contorno de la celula}} \quad (\text{Ec. 3.13})$$

donde los subíndices P,F indican que las ecuaciones valen tanto para P como para F.

Considerando que la cantidad de proteínas fluorescentes en el citoplasma es un orden de magnitud mayor que las proteínas fotoblanqueadas en la adhesión focal, la cantidad de proteínas fluorescentes no perturba la concentración total ($C_F=C_0$)¹⁷. Teniendo en cuenta que k_{ON} se mantiene constante en la escala de recuperación, las ecuaciones quedan independientes y desacopladas. La solución a la ecuación 3.12 es entonces:

$$\hat{C}_{F,Z} = \frac{k_{ON}}{k_{OFF}} C_{0,Z} \left(1 - \frac{\hat{C}_{0,Z}}{C_{0,Z}}\right) (1 - e^{-k_{OFF}t}) = \hat{C}_{0,Z} (1 - e^{-k_{OFF}t}) \quad (\text{Ec. 3.14})$$

que escrita en términos de la concentración normalizada respecto a la concentración inicial da la ecuación:

$$\frac{\hat{C}_{F,Z}}{\hat{C}_{0,Z}} = 1 - e^{-k_{OFF}t} \quad (\text{Ec. 3.15})$$

Es importante remarcar que experimentalmente la recuperación no alcanza el nivel de fluorescencia inicial. Esto podría deberse a que existe una población de proteínas inmóviles que no se contempla en la teoría. Para tener en cuenta esta fracción inmóvil de proteína, en lugar de la Ec. 3.15 se utiliza la:

$$F = m.(1 - e^{-k_{OFF}.t}) \quad (\text{Ec. 3.16})$$

en donde m representa la fracción móvil de la proteína en la adhesión focal.

Finalmente, se define el tiempo de residencia como $\tau_r = 1/k_{OFF}$, y el tiempo medio como el tiempo necesario para el cual la amplitud alcanza la mitad del valor inicial, $\tau_{1/2} = -\ln(0.5)/k_{OFF}$.

3.2.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) y de correlación de fluorescencia cruzada (FCCS).

La Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia (FCS, del inglés *Fluorescence Correlation Spectroscopy*)¹⁸ se basa en la correlación de las fluctuaciones de la intensidad de la fluorescencia en un volumen confocal del orden del femto-litro generado usualmente por un haz de láser enfocado y detección confocal. Las fluctuaciones pueden originarse, entre otros motivos, por el pasaje de las moléculas fluorescentes por el volumen de detección o, por ejemplo, debido a las transiciones entre los estados químicos fluorescentes y no fluorescentes. Dado que se trata de una técnica poco invasiva, resulta adecuada para estudiar la dinámica molecular en células vivas, permitiendo inferir concentraciones locales, coeficientes de transporte (como coeficiente de difusión), estimar parámetros de reacción, cambios conformacionales y reacciones fotoquímicas de moléculas fluorescentes *in situ*^{19,20,21}.

El estudio de las fluctuaciones estadísticas alrededor del equilibrio se realiza mediante la auto-correlación temporal de las fluctuaciones de intensidad²² definida como,

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (\text{Ec 3.17})$$

donde τ es el tiempo de correlación entre las señales, la fluctuación de fluorescencia es $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$, siendo $\langle F \rangle$ el promedio temporal de la fluorescencia en el volumen de detección. La forma de la curva de auto-correlación, dependerá de los procesos que generen las fluctuaciones y para extraer información cuantitativa es necesario ajustarlas por modelos adecuados.

En el caso de moléculas fluorescentes difundiendo libremente en un medio homogéneo, la función de auto-correlación puede ser descripta por la siguiente relación²³:

$$G(\tau) = G_0 \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} = G_0 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \quad (\text{Ec 3.18})$$

donde D es el coeficiente de difusión, ω_0 y ω_z son las cinturas radial y axial del volumen de detección respectivamente y S^2 es el cociente entre ω_0 y ω_z . El tiempo de

relajación característico se define como, $\tau_D = \omega_r^2 / 4 D$. El valor de la auto-correlación para el instante inicial, G_0 , es inversamente proporcional al número de partículas, $G_0 = (V_{eff} C)^{-1}$ donde $V_{eff} = \pi(3/2) \omega_r^2 \omega_z$ y C es la concentración de partículas (Figura 3.12)

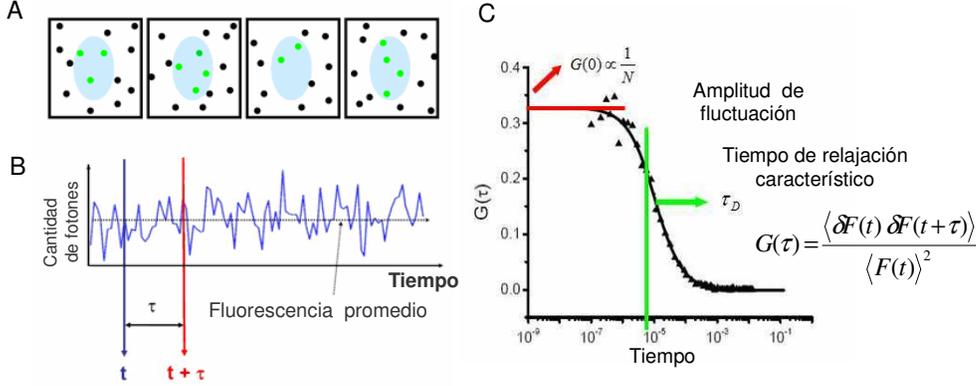


Figura 3.12. Esquema del método de FCS. (A) Diagrama de moléculas difundiendo a través del volumen de detección. (B) Fluctuaciones de fluorescencia en función del tiempo. (C) Función de auto-correlación, amplitud de fluctuación ($G(0)$), y tiempo de relajación característico (τ_D). Imagen extraída y modificada de²⁴.

Considerando que la mayoría de los procesos en la célula implican transporte por difusión de partículas, se considerará para ajustar las curvas experimentales de auto-correlación, modelos de una o dos componentes difusivas:

$$G(\tau) = \sum_i G_{0i} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^{-1/2} \quad i = 1 \text{ o } 2 \quad (\text{Ec 3.19})$$

donde cada componente tendrá un peso G_{0i} , y un tiempo de relajación característico τ_{Di} , que tendrá asociado un coeficiente de difusión efectivo D_i .

La espectroscopía por correlación de fluorescencia cruzada²⁵ (FCCS, del inglés *Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*) es una extensión multicolor de FCS que permite estudiar la interacción de dos especies moleculares etiquetadas con diferentes fluoróforos. En FCCS, se adquieren las señales de fluorescencia de los dos marcadores simultáneamente en dos canales (Figura 3.13), permitiendo realizar el análisis de auto-correlación de cada canal y también la correlación cruzada de ambos, definida como:

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle} \quad (\text{Ec 3.20})$$

donde $\delta F_i(t)$ y $\delta F_j(t)$ son las fluctuaciones de fluorescencia que suceden en el tiempo t para cada canal.

Si las moléculas con diferente etiqueta interactúan formando complejos, al co-difundir a través del volumen de observación las fluctuaciones de fluorescencia en ambos canales se correlacionan en el tiempo, observándose una curva de correlación cruzada. Si las dos moléculas no están físicamente asociadas, la amplitud de la correlación cruzada es prácticamente nula o inclusive puede tener valores negativos.

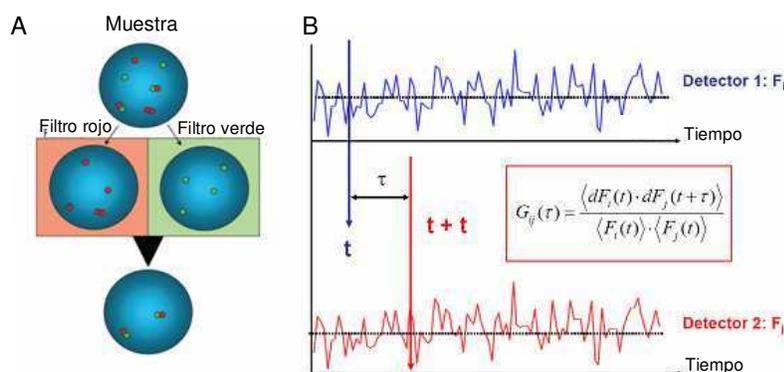


Figura 3.13. Esquema del método de FCCS. A) Diagrama de moléculas difundiéndose a través del volumen de detección. Filtros que seleccionan la fluorescencia correspondiente al rango verde y rojo. B) Fluctuaciones de fluorescencia de cada canal en función del tiempo. Función de cross-correlación $G_{ij}(\tau)$. Imagen extraída y modificada de ²⁴.

En el caso que se observe una correlación cruzada, es posible estimar una constante de asociación aparente K_a a partir del análisis de las amplitudes de las auto-correlaciones de cada canal, G_{o1} y G_{o2} , y de la amplitud de la correlación cruzada G_{o12} ²⁶. Si $[C_1]$ y $[C_2]$ son las concentraciones medias de moléculas libres de cada tipo, y $[C_{12}]$ la concentración media de moléculas asociadas o unidas, la constante de asociación aparente se define como:

$$K_a = \frac{[C_{12}]}{[C_1] \cdot [C_2]} \quad (\text{Ec. 3.21})$$

Teniendo en cuenta los volúmenes confocales correspondientes, las concentraciones totales medias de moléculas de cada especie $[C_{1\text{tot}}]$ y $[C_{2\text{tot}}]$ se estiman a partir de las amplitudes de las auto-correlaciones, y se emplea la amplitud de la correlación cruzada G_{o12} , para inferir la concentración media de moléculas unidas, $[C_{12}]$:

$$\begin{aligned} [C_{1tot}] &= \frac{1}{G_{o1} \cdot V_1} \\ [C_{2tot}] &= \frac{1}{G_{o2} \cdot V_2} \\ [C_{12}] &= \frac{G_{o12}}{G_{o1} \cdot G_{o2} \cdot V_{12}} \end{aligned} \quad (\text{Ecs 3.22})$$

donde V_1 y V_2 son los volúmenes confocales correspondientes a cada láser/fluoróforo mientras que V_{12} es el volumen de superposición de ambos volúmenes, que se podría aproximar por el volumen más pequeño entre V_1 y V_2 . Considerando que $[C_{1tot}] = [C_1] + [C_{12}]$ y $[C_{2tot}] = [C_2] + [C_{12}]$, la constante de asociación aparente expresada en términos de las amplitudes y volúmenes resulta:

$$Ka = \frac{\frac{G_{o12}}{G_{o1}G_{o2}V_{12}}}{\left(\frac{1}{G_{o1}V_1} - \frac{G_{o12}}{G_{o1}G_{o2}V_{12}}\right) \cdot \left(\frac{1}{G_{o2}V_2} - \frac{G_{o12}}{G_{o1}G_{o2}V_{12}}\right)}. \quad (\text{Ec 3.23})$$

3.3. Microscopía de Fuerzas de Tracción (TFM)

La microscopía de tracción celular se basa en el estudio de células adheridas sobre un sustrato elástico y transparente en cuyo interior se encuentran micro o nano esferas fluorescentes que actúan como puntos de referencia (ver Figura 3.14). Si el sustrato es suficientemente blando la tracción que ejercen las células deforma el sustrato entre decenas y centenares de nanómetros. Estas deformaciones se pueden medir a partir del desplazamiento de los marcadores fluorescentes dentro del sustrato, y luego traducir a mapas de tracción, determinando magnitud y dirección de las tracciones ejercidas por las células sobre el sustrato.

La microscopía de fuerza de tracción (TFM) fue iniciada por Harris, Wild, y Stopak (1980)²⁷, que mostraron que los fibroblastos deformaban un sustrato de caucho de silicona elástica, indicando la actividad mecánica de las células. Mediante la aplicación de fuerzas conocidas, Harris y colaboradores fueron capaces de calibrar esta técnica y evaluar la magnitud de las fuerzas de tracción. Sin embargo, las limitaciones de este enfoque incluyen la dificultad en la cuantificación de la fuerza, debido a que la deformación del sustrato no era lineal, y a la baja resolución espacial²⁸²⁹. Debido a las propiedades ópticas y mecánicas, los hidrogeles de poli(acrilamida) (PAA) se han convertido en los sustratos más utilizados para medir fuerzas de

tracción.

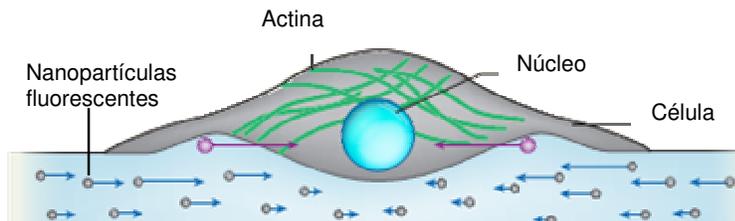


Figura 3.14. Esquema del principio de TFM. Célula adherida sobre un sustrato deformable que contiene marcadores fluorescentes. Esquema extraído y modificado de ³⁰.

Los gels de PAA son ópticamente transparentes, lo que permite una combinación de TFM, con diferentes microscopías (*wide field*, Confocal, etc.) para complementar las medidas de fuerza de tracción con el análisis de la dinámica del citoesqueleto o de las adhesiones focales^{31,32}. Las propiedades mecánicas de la poliacrilamida también son ideales para TFM ya que tiene una respuesta elástica lineal para una amplia gama de deformaciones. Además, su elasticidad se puede elegir para imitar la rigidez de la mayoría de los tejidos biológicos^{33,34}. Por otra parte, la funcionalización de PAA con proteínas específicas de la ECM permite el control de las interacciones bioquímicas entre la célula y el sustrato permitiendo activar distintos receptores de adhesión.

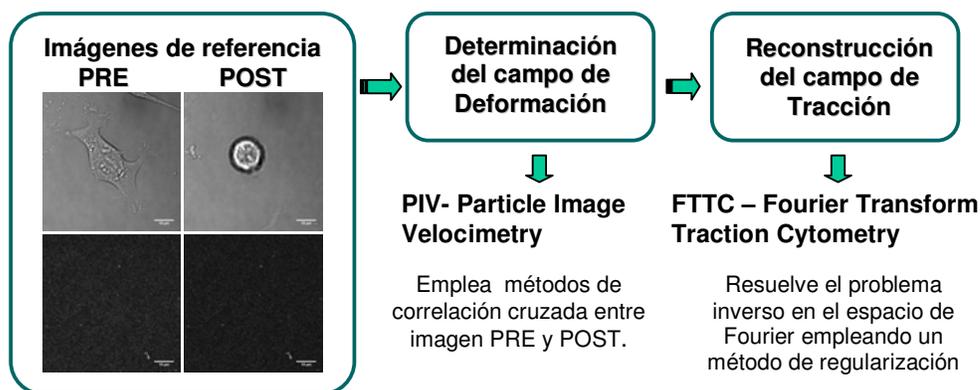


Figura 3.15. Diagrama del procesamiento de imágenes para TFM. *Imágenes del Capítulo 8, Figura 8.7.*

La microscopía TFM utiliza el análisis de imágenes de fluorescencia de marcadores embebidos en el sustrato como referencia, para obtener la dirección y la magnitud de las deformaciones del sustrato, y luego reconstruir la tracción, fuerza por unidad de área, generada por las células. En la Figura 3.15 se presenta el esquema de

procedimientos necesarios para obtener el mapa de tracción, que se describirán a continuación.

Determinación del campo de deformación

Para obtener el mapa de desplazamiento de los marcadores fluorescentes a partir de las imágenes de fluorescencia, se implementó la técnica de velocimetría por imágenes de partículas (PIV por sus siglas en inglés). A continuación se explicarán someramente las bases de esta técnica.

Con el objetivo de identificar el desplazamiento de las partículas se adquieren dos imágenes de la misma región para configuraciones diferentes del sistema, en este caso se evaluarán las imágenes de la fluorescencia de los marcadores fluorescentes con la célula adherida al sustrato (imagen PRE) y sin la célula adherida (imagen POST). El análisis comienza por dividir las imágenes en sub-regiones, llamadas ventanas de interrogación. Luego se correlaciona cada sub-región de la imagen PRE con la correspondiente sub-región de la imagen POST, usando la correlación cruzada para el caso discreto de un par de sub-regiones definida como ³⁵

$$R_{I_{pre}I_{post}}(x, y) = \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} I_{pre}^{ij}(m, n) I_{post}^{ij}(m+x, n+y) \quad (\text{Ec. 3.24})$$

donde I_{pre}^{ij} , I_{post}^{ij} son las subregiones ij correspondientes a la imagen PRE y POST respectivamente y m, n son las coordenadas de cada ventana de interrogación. La localización del máximo de correlación cruzada determina el vector de desplazamiento más probable para cada sub-región (ver Figura 3.16). Al final del proceso se asignará un vector de desplazamiento a cada una de las sub-regiones.

Los algoritmos son iterativos y se basan en la evaluación inicial de los vectores de desplazamiento utilizando ventanas de interrogación más grandes que se van achicando en las sucesivas iteraciones, empleando la información de la iteración anterior. Además, las ventanas de interrogación pueden quedar parcialmente superpuestas con el objetivo de reducir el espacio entre vectores en la grilla de vectores, en general se usa un solapamiento del 50%³⁶.

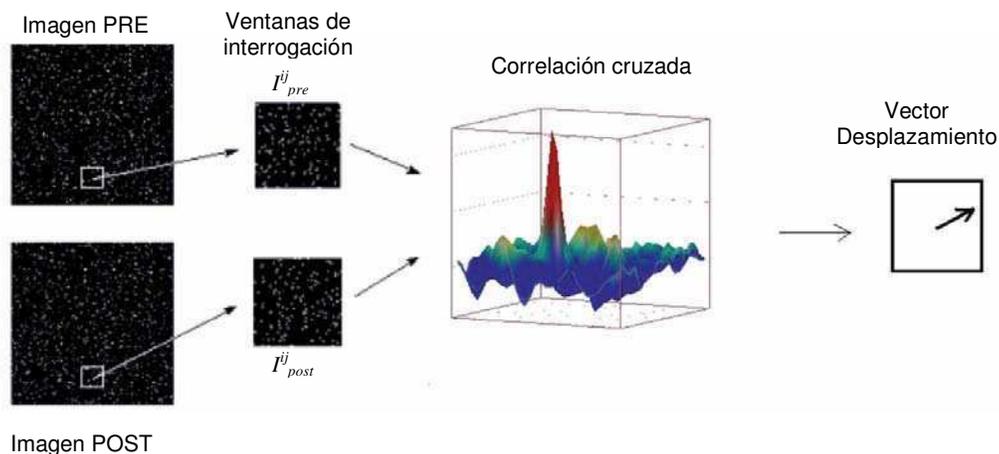


Figura 3.16. Esquema de Método de PIV. Las imágenes PRE y POST de los marcadores se dividen en subregiones, ventanas de interrogación. Se realiza la correlación cruzada y la localización del máximo de correlación determina el vector desplazamiento dentro de esa ventana. Imagen modificada de ³⁷.

De esta manera se configura el mapa de deformación a partir del cálculo del vector desplazamiento de cada ventana de interrogación. En esta tesis se empleó el algoritmo MatPIV V1.6.1 de J. K. Sveen, 2004 de código abierto en *Matlab* (MathWorks Inc., Natick, EE.UU.)³⁵.

Reconstrucción del campo de tracción

Una vez obtenido el campo de deformaciones, se reconstruye el campo de tracción que genera la célula sobre el sustrato, a partir de las propiedades mecánicas del sustrato.

Para sustratos sintéticos como PAA se puede asumir un comportamiento elástico, considerando que el sustrato es homogéneo, isótropo y lineal. De esta forma, el sustrato está caracterizado por dos magnitudes, el módulo de Young E , y el radio de Poisson ν . Se considera que el gel de PAA es incompresible, tomando un valor de radio de Poisson igual a 0.5. En el caso de células adherentes cultivadas sobre un sustrato plano, las células suelen adoptar una morfología aplanada, ejerciendo tracciones que son esencialmente tangenciales a la superficie del sustrato. Por este motivo, se puede asumir que las deformaciones y las fuerzas de tracción son vectores bidimensionales en el plano de la superficie del sustrato, despreciando los desplazamientos y fuerzas en la dirección normal a la superficie del sustrato.

Bajo estas condiciones, la relación entre el campo de tracción T y el campo de desplazamientos u puede escribirse como:

$$u_i(x_1, x_2) = \int \sum_{j=1}^2 G_{ij}(x_1 - x'_1, x_2 - x'_2) T_j(x'_1, x'_2) dx'_1 dx'_2 \quad (\text{Ec. 3.25})$$

donde el sistema en coordenadas cartesianas x_1 y x_2 se define en el plano del sustrato, se denotan con u_i a los desplazamientos a lo largo de la coordenada i . $i=1,2$ y G_{ij} es la función de Green, que depende de las propiedades del sustrato y de las condiciones de contorno. Si el grosor del sustrato es mucho mayor que las deformaciones típicas (que en general son del orden de micrón), se puede considerar al gel como un espacio semi-infinito. La función de Green para un medio elástico, isotrópico y semi-infinito se conoce como la solución *Boussinesq solution*³⁸.

$$G(x_1, x_2) = \frac{(1+\nu)}{\pi E r^3} \begin{pmatrix} (1-\nu)r^2 + \nu x_1^2 & \nu x_1 x_2 \\ \nu x_1 x_2 & (1-\nu)r^2 + \nu x_2^2 \end{pmatrix} \quad (\text{Ec. 3.26})$$

donde $r = |x|$, E es el módulo de Young del sustrato y ν es el radio de Poisson ($\nu=0,5$).

El cálculo de tracción implica resolver la Ec. 3.25, que es una ecuación integral de Fredholm de primera especie. Se trata de un problema inverso, es decir, las mediciones de la deformación del sustrato se utilizan para calcular el campo de tracción más probable que puede dar lugar a las deformaciones observadas³⁹. Un enfoque para calcular la tracción a partir del campo de desplazamiento medido es resolver la Ec. (3.25) en el espacio real (BEM, por las siglas en inglés, Boundary Element Method)⁴⁰, aunque puede llegar a ser computacionalmente costoso. Otra opción es emplear la Citometría de Tracción para la Transformada de Fourier (FTTC)⁴¹, que se basa en resolver las ecuaciones del problema en el espacio de Fourier, en donde la integral de la Ec. (3.25) se convierte en una multiplicación de matrices:

$$\hat{T}(k) = G(k)^{-1} \hat{u}(k) \quad (\text{Ec. 3.27})$$

donde las magnitudes con $\hat{}$ son las correspondientes al espacio de Fourier.

La resolución del problema inverso para el cálculo de la tracción, suele ser muy sensible a pequeñas diferencias en el campo de deformación generadas por el ruido en la determinación experimental de los desplazamientos. El ruido en los datos experimentales puede provenir de diferentes fuentes, como por ejemplo, puede deberse a la falta de homogeneidad del sustrato, a un bajo acoplamiento entre el

sustrato y los marcadores fluorescentes, al sistema óptico, y/o a la rutina PIV. En general es necesario usar un método de regularización para resolver el problema⁴². En este caso, se empleó el método de regularización de Tikhonov⁴³ en el espacio de Fourier:

$$\hat{T}(k) = (G(k)^T G(k) + \lambda^2 L)^{-1} G(k)^T \hat{u}(k) \quad (\text{Ec. 3.28})$$

donde λ es el parámetro de regularización y L es la identidad para el orden cero de regularización. La solución de la Ec. 3.28 dependerá del parámetro λ elegido, un criterio para seleccionar objetivamente el parámetro de regularización es el criterio de la Curva-L⁴⁴. Esta herramienta consiste en graficar para todos los λ posibles los valores que asume la norma de la solución regularizada contra la norma del correspondiente residuo. Esto permite visualizar cuánto se compromete el residuo frente a la solución regularizada del problema. Cuando se grafica utilizando escala logarítmica en cada eje, generalmente se obtiene una curva en forma de L, de ahí el nombre del criterio. El parámetro λ que se utiliza es aquel asociado al punto de mayor curvatura de la Curva-L.

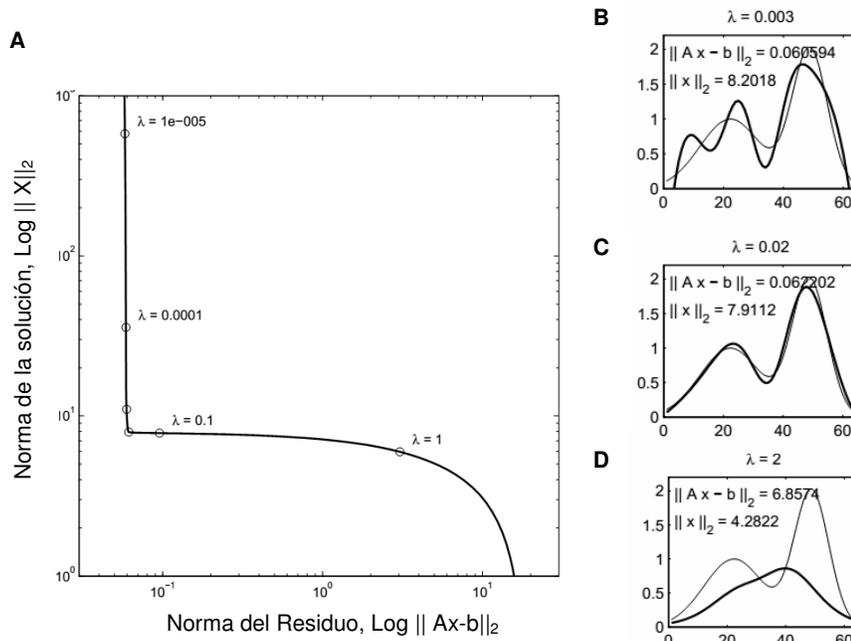


Figura 3.17. Curva-L método para determinar el parámetro de regulación λ . (A) Curva L típica para un problema de regularización de Tikhonov, los puntos marcados con círculos corresponden a los parámetros $\lambda = 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}$, y 1. (B-D) Comparación de la solución exacta (línea de trazo fino) con las soluciones obtenidas para diferentes λ (línea de trazo grueso). Extraído y modificado de ⁴⁴.

En la Figura 3.17 A se presenta una Curva-L típica para el problema de regularización de Tikhonov. La solución óptima se consigue con el valor de λ asociado al vértice de la curva, en la Figura 3.17 A corresponde a 0.01. Para ejemplificar las variaciones generadas por diferentes elecciones del parámetro de regulación se incluye la comparación de la solución exacta con las soluciones halladas para un caso con regulación leve, $\lambda=0.003$, donde la solución presenta el ruido propio de los datos (Figura 3.17 B), y excesiva, $\lambda =2$, donde se obtiene una solución suavizada (Figura 3.17 D).

3.4. Referencias

¹ Hutter, J. L., Bechhoefer, J., "Calibration of Atomic-Force Microscope Tips", *Review of Scientific Instruments*, 1993, **64**:1868.

² Pfreundschuh, M., Martinez-Martin, D., Mulvihill, E., Wegmann, S., Muller, D.J., "Multiparametric high-resolution imaging of native proteins by force-distance curve-based AFM", *Nature Protocol*, 2014, **9**: 1113-1130.

³ Hertz, H., "Über die Betürtmg fester elastischer Körper", *J. Reine Angew. Muthematik*, 1882, **92**: 156-171.

⁴ Sneddon, I. N., "The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile.", *Inr. J. Eng. Sci.*, 1965, **3**: 47-57.

⁵ Radmacher, M., "Measuring the Elastic Properties of Living Cells by the Atomic Force Microscope", Chapter 4 of *Method in cell biology*, 2002, **68**: 67-90

⁶ <http://www.iupui.edu/~bbml/afmintro.shtml>

⁷ Kaemmer, S. B., "Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce Tapping AFM Technology", *Bruker Application Note #133*, 2011.

⁸ Pittenger, B., Erina, N., Su, C., "Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM", *Bruker Application Note #128*, 2011.

⁹ Derjaguin, B. V., Müller, V. M., Toporov, Yu. P., *Journal of Colloid and Interface Science*, 1975, **53**: 314.

¹⁰ "Peak Force QNM. User Guide", Bruker, 2011.

¹¹ Lichtman, J. W., Conchello, J. A., "Fluorescence microscopy", *Nat Methods*, 2005, **2(12)**:910-9.

¹² Brown, E. B., Wu, E. S., Zipfel, W., Webb, W. W., "Measurement of molecular diffusion in solution by multiphoton fluorescence photobleaching recovery", *Biophys J*, 1999, **77**:2837-2849

¹³ Liebman, P. A., Entine, G., "Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes", *Science*, 1974, **185**: 457-459

¹⁴ Poo, M., Cone, R. A., "Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane", *Nature*, 1974, **247**: 438-441

3. Fundamentos de las técnicas experimentales

- ¹⁵ Sprague, B. L., McNally, J. G., "FRAP analysis of binding: proper and fitting", *Trends in Cell Biology*, 2005, **15(2)**: 84-91
- ¹⁶ Lele, T., Oh, P., Nickerson, J. A., Ingber, D. E., "An improved mathematical approach for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP", *Mechanics & Chemistry of Biosystems*, 2004, **1(3)**: 181-190.
- ¹⁷ Lele, T., C. K., Thodeti, J., Pendse, D. E., Ingber, "Investigating complexity of protein-protein interactions in focal adhesions", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **369(3)**: 929-934.
- ¹⁸ Magde, D., Elson, E., Webb, W. W., "Thermodynamic fluctuations in a reaction system measurement by fluorescence correlation spectroscopy", *Phys. Rev. Lett.*, 1972, **29** (11): 705.
- ¹⁹ Elson, E. L., "Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells", *Traffic*, 2001, **2**: 789.
- ²⁰ Krichevsky, O., Bonnet, G., "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications", *Rep. Prog. Phys.*, 2002, **65**: 251.
- ²¹ Kim, S. A., Schwille, P., "Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience", *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2003, **13**: 583.
- ²² Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., Webb, W. W., "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**: 13573-13578.
- ²³ Digman, M. A., Brown, C. M., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Horwitz, A. R., Gratton, E., "Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope", *Biophysical Journal*, 2005, **89**: 1317-1327
- ²⁴ Digman, M. A., Gratton, E., "Correlation spectroscopy", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2011, **62**: 645-668.
- ²⁵ Eigen, M., Rigler, R., "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**: 5740-5747;
Schwille, P., Myer-Almes, F. J., Rigler, R., "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution", *Biophys. J.*, 1997, **72**: 1878-1886.
- ²⁶ Hoffmann, J. E., Fermin, Y., Stricker, R. L., Katja Ickstadt, K., Zamir E., "Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol", *eLife*, 2014, **3**: e02257.
- ²⁷ Harris, A. K., Wild, P., Stopak, D., "Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion", *Science*, 1980, **208**: 177-179
- ²⁸ Beningo, K. A., Wang, Y. L., "Flexible substrata for the detection of cellular traction forces", *Trends in Cell Biology*, 2002, **12**: 79-84.
- ²⁹ Kraning-Rush, C. M., Carey, S. P., Califano, J. P., Reinhart-King, C. A., "Quantifying traction stresses in adherent cells", *Methods in Cell Biology*, 2012, **110**: 139-178.
- ³⁰ Pascal, H., Benoît, L., "Biophysics: Push it, pull it", *Nature*, 2011, **470**: 340-341
- ³¹ Gardel, M. L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U. S., Waterman, C. M., "Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed", *Journal of Cell Biology*, 2008, **183**: 999-1005.

3. Fundamentos de las técnicas experimentales

- ³² Oakes, P. W., Beckham, Y., Stricker, J., Gardel, M. L., "Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template", *Journal of Cell Biology*, 2012, **196**: 363–374.
- ³³ Discher, D. E., Janmey, P. A., Wang, Y. L., "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate", *Science*, 2005, **310**: 1139–1143.
- ³⁴ Flanagan, L. A., Ju, Y. E., Marg, B., Osterfield, M., Janmey, P. A., "Neurite branching on deformable substrates", *Neuroreport*, 2002, **13**: 2411–2415.
- ³⁵ Sveen, F. J., "An introduction to MatPIV v 1.6.1", 2004.
- ³⁶ Brossard, C., Monnier, J.-C., Barricau, P., Vandernoot, F.-X., Le Sant, Y., Champagnat, F., Le Besnerais, G. "Principles and Applications of Particle Image Velocimetry", *Journal AerospaceLab*, 2009, **1**: 1-11.
- ³⁷ Brossard, C., Monnier, J.-C., Barricau, P., Vandernoot, F.-X., Le Sant, Y., Champagnat, F., Le Besnerais, G., "Principles and Applications of Particle Image Velocimetry", *Journal of Aerospace Lab*, 2009, **1**:1-11.
- ³⁸ Landau, L. D., Lifshitz, E. M., "Theory of elasticity: Vol. 7 of Course on Theoretical Physics.", *Pergamon Press*, 1959.
- ³⁹ Kraning-Rush, C. M., Carey, S. P., Caliofano S. P., Reinhart-King, C. A., "Quantifying Traction Stress in Adherent Cells", *Methods Cell Biol.*, 2012, **110**:139-78.
- ⁴⁰ Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A., Jacobson, K., "Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method", *Biophys. J.*, 1996, **70**:2008–2022;
Dembo, M., Wang, Y.-L., "Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts", *Biophys. J.*, 1999, **76**:2307–2316.
- ⁴¹ Butler, J. P., Tolic-Norrelykke, I. M., Fabry, B., Fredberg, J. J., "Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, **282**:C595–C605.
- ⁴² Schwarz, U. S., Balaban, N. Q., Riveline, D., Bershadsky, A., Geiger, B., Safran, S. A., "Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization", *Biophys. J.*, 2002, **83**:1380–1394.
- ⁴³ Tikhonov, A. N., "Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method", *Soviet Math. Dokl.*, 1963, **4**:1035–1038.
- ⁴⁴ Hansen, P. C., "The L-curve and its use in the numerical treatment of inverse problems", *Department of Mathematical Modelling, Technical University of Denmark*, 2008.

4. Cultivo celular y dispositivo estirador

4. Cultivo celular y dispositivo estirador

4.1. Cultivo celular

Hoy en día se define cultivo celular como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *'in vitro'*, manteniendo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas¹. Los estudios que utilizan cultivos celulares incluyen gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular: investigación del cáncer, virología, inmunología, ingeniería de proteínas, aplicaciones médicas.

La mayor parte de las células que se mantienen en cultivo proceden de disgregación tisular o de tumores formados por células adheridas y mantienen esa característica: necesitan adherirse al sustrato para mantenerse. El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, sobre soportes (vidrio, plástico, membranas flexibles, geles de poliacrilamida) o recipientes (botellas o frasco de plástico descartables, placas de Petri, multiplacas) que los contienen y aíslan del medio exterior. La adherencia y crecimiento de las células sobre estas superficies mejora si se las recubre de proteínas de matriz extracelular como fibronectina, colágeno, Matrigel. Para elegir el medio de cultivo adecuado se debe tener en cuenta: la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa, y las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.

En el presente trabajo de Tesis se utilizó la línea celular HC11 de epitelio mamario de ratón BALB/c normales². El medio de cultivo utilizado para su mantenimiento fue RPMI 1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 5 µg/mL de insulina de páncreas bovino. Además, para evitar la contaminación con bacterias se agregaron antibióticos, penicilina (100 IU/mL) y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células se cultivaron en placas de Petri y se guardaron a 37°C en 5% CO₂. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 90% se lavaron con PBS (composición: 137mM NaCl; 2.7mM KCl ; 8.1mM Na₂HPO₄ 2H₂O ; 1.76mM KH₂PO₄, pH7.4) y levantaron con una solución de tripsina (0.25%) con EDTA (0.35mM). Luego con el objetivo de continuar el cultivo se contaron, utilizando la cámara de Neubauer, y sembraron en una nueva placa de Petri con medio RPMI.

Cuando se quiere almacenar las células por un largo período de tiempo se debe realizar el protocolo de crio-preservación. Una vez alcanzado el 90% de

confluencia se colectan las células, del mismo modo descrito previamente, se centrifugan durante 4min a 800 rpm y se resuspende el *pellet* en medio RPMI con 20% de SFB (v/v). Luego se agrega el mismo volumen de medio con 20% de SFB (v/v) y 20% DMSO (v/v). Debido a que el DMSO es tóxico las células deben colocarse rápidamente a -80°C. Pasadas 24hs se pueden traspasar los criotubos con las células al tanque de nitrógeno líquido. Cuando se quieren utilizar las células se deben descongelar rápidamente incubando el criotubo en un baño a 37°C.

Los ensayos de transfección se hicieron con Lipofectamina2000. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en medio RPMI. Al día siguiente se lavaron con PBS y luego se agregó medio Optimem. Para cada pocillo se prepararon las mezclas de transfección en dos viales: 1- 50µl Optimem +4 µg de ADN; 2- 50µl Optimem + 4µl Lipofectamina2000. Se dejaron reposar las soluciones durante 5 min y se mezclaron. Luego de 20min se agregó la mezcla al pocillo con las células. Las células se mantuvieron en la estufa a 37°C durante 5horas. Posteriormente se lavaron con PBS y se agregó medio RPMI. Las células se utilizaron después de transcurrir 24hs de la transfección. Si bien este es el protocolo general, las cantidades de ADN se modificaron para cada plásmido con el fin de optimizar el porcentaje de transfección.

Las células utilizadas en los experimentos de esta Tesis se *plaquearon* en diferentes sustratos como ser cubre objetos de vidrio, membrana de silicona y geles de poliacrilamida de diferentes elasticidades, todos recubiertos previamente con la proteína de matriz extracelular fibronectina.

4.2. Proteínas de las adhesiones focales

Las adhesiones focales (AFs) son estructuras transientes alargadas y de unos pocos micrones cuadrados, localizadas preferentemente en la periferia de las células. Estos sitios de adhesión son complejos de proteínas dispuestos en ensamblados multimoleculares (~150 proteínas) que unen la matriz extracelular, a través de los receptores de membrana de la familia de integrinas, a componentes del citoesqueleto³. El agregado de integrinas promueve el reclutamiento de varias proteínas como talina, vinculina, α -actinina, zyxina y FAK⁴ en sus dominios citoplasmáticos, lo que hace que las integrinas queden unidas mecánicamente al citoesqueleto⁵. De esta manera las AFs, también llamadas *adhesoma de integrina*, establecen una conexión entre la ECM y la actina del citoesqueleto, y sirven como puntos de tracción. Se ha postulado a las AFs como organela de señalización en el proceso de mecanotransducción celular⁶.

Las mismas se ensamblan o reorganizan en forma dinámica en las células⁷, y este continuo remodelado es crucial para la migración celular⁸ y las respuestas a fuerzas mecánicas⁹. Dentro de la célula, el movimiento interno de los filamentos de actina también sería detectado a nivel de las AFs a través de un complejo mecanismo basado en las múltiples interacciones transientes proteína-proteína que tienen lugar en la adhesión focal¹⁰.

La observación de células vivas por microscopía confocal ha permitido describir el ciclo de vida del adhesoma de integrina en cuatro etapas principales: adhesiones nacientes, complejos focales, adhesiones focales, y adhesiones fibrilares. La transformación de una forma de adhesión en otra estaría regulada fuertemente por sistemas de señalización celular, primariamente por las GTPasas pequeñas que incluyen Rac1, Cdc42, and RhoA¹¹.

La proteína marcadora de la adhesión focal madura es la zixina, la cual es reclutada en las AFs en las últimas etapas del ensamblado de la AF, y no aparece en las adhesiones nacientes o en los complejos focales¹². En los últimos años se ha postulado a esta proteína como una potencial proteína mecanosensora, y por lo tanto con una participación protagónica en la respuesta celular a señales mecánicas. Se conoce que: 1) está localizada predominantemente en las adhesiones focales¹³; 2) está involucrada en el reclutamiento a varias proteínas tales como α -actinina y miembros de la familia Ena/VASP¹⁴; 3) interacciona directamente con la proteína p130^{Cas} que es una proteína sensible al estiramiento¹⁵; 4) el estiramiento cíclico de células resulta en la translocación de la zixina hacia las fibras de actina¹⁶ y el núcleo¹⁷; 5) la constante de disociación de esta proteína en las AFs aumenta cuando se reduce la tensión del citoesqueleto (por inhibición de ROCK, ablación láser de una fibra de actina, cultivo celular sobre sustratos deformables)¹⁸; 6) la polimerización de actina depende de la acumulación de zixina inducida por fuerza¹⁹. Estos resultados hicieron que se eligiera a la proteína zixina en particular para los experimentos de este trabajo de Tesis.

La estrategia general para analizar la respuesta mecanotransduccional en distintas condiciones bioquímicas y mecánicas será expresar en las células HC11 la proteína en estudio fusionada a proteínas fluorescentes en el visible²⁰, (VFPs). En las construcciones para las proteínas de adhesión zixina, paxilina, FAK, beta3-integrina y vinculina, las VFPs son EGFP (verde), mCherry (roja), y Turquesa (mTFP). Los plásmidos se recibieron a través de colegas o desde el laboratorio que los diseñó (D. Ingber, J.T. Parsons, B. Geiger, C. Grashoff, E. Gratton, C. Arregui, A. Cáceres). La

visualización de la expresión de las proteínas quimeras, su localización, activación y registro en el tiempo en células vivas se hará por microscopía de fluorescencia multidimensional.

4.3. Dispositivo estirador equibiaxial

Las células en órganos y tejidos están sujetas a diferentes estímulos mecánicos en condiciones fisiológicas normales. La respuesta y la adaptación a estos estímulos son importantes en el crecimiento, en el desarrollo y en la función celular²¹. El estudio sistemático del proceso de la respuesta celular ante estimulación mecánica se basa en el uso de preparaciones *in vitro*, generalmente cultivo celular y una manera controlada de dar el estímulo mecánico. Por ejemplo para aplicar un estrés controlado a nivel del sustrato, las células se cultivan sobre sustratos elásticos que pueden ser estirados de manera estática o cíclica²². El estrés aplicado, uniaxial o biaxial, se transmite a las células en cultivo y, de esta manera, se puede seguir el fenómeno por microscopía. Se ha demostrado que en respuesta a fuerzas uniaxiales, las células se alinean y se producen cambios en el citoesqueleto y en la bioquímica celular, cambios que dependen de la orientación de la célula relativa a la dirección del estiramiento²³. Entonces, si aplicamos la fuerza a lo largo de un solo eje, y las células tienen distintas orientaciones en relación al eje de estiramiento, los resultados representarán una mezcla heterogénea de respuestas. Para evitar estos inconvenientes es que se prefiere trabajar con sistemas que generen tensiones equibiaxiales²⁴.

En este trabajo de Tesis se utilizó un dispositivo estirador equibiaxial con el objetivo de evaluar la dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico global. El diseño del estirador es una modificación del sistema propuesto por Quaglino y colaboradores²⁵, el cual fue adaptado para realizar mediciones en el microscopio confocal espectral Olympus FV1000.

El dispositivo consiste en un soporte roscado de aluminio que contiene: dos piezas cilíndricas (hechas en Delrin®) que sujetan la membrana (diámetro 40mm); un anillo indentador de Teflon® (diámetro 30mm) que forma la pared de la cámara de cultivo y una corona circular (Delrin®) que permite empujar el anillo indentador para estirar la membrana de silicona cuando el soporte de aluminio se enrosca. La magnitud de estiramiento se caracteriza por las vueltas de rosca dadas al soporte de aluminio. Los resultados de la calibración se presentan en el Capítulo 7. En la Figura 4.1 se presentan fotos tomadas a una membrana, el dispositivo estirador con una membrana colocada en el mismo, y la posición del estirador en el microscopio

confocal. Se acompaña también de las imágenes de fluorescencia de una célula HC11 antes y después de estirar equibiaxialmente el sustrato donde están cultivadas las células.

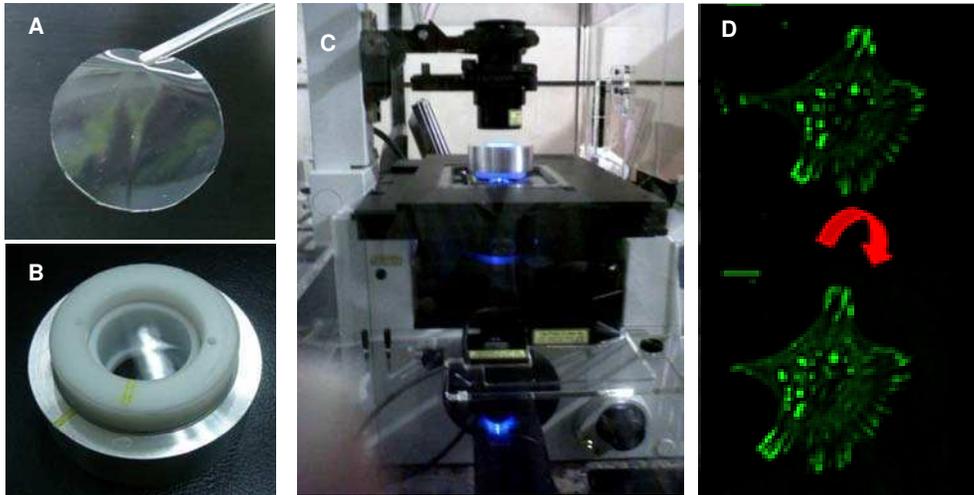


Figura 4.1: Dispositivo estirador equibiaxial. (A) Membrana de silicona utilizada como sustrato. (B) Dispositivo estirador con la membrana. (C) Dispositivo estirador colocado en el microscopio confocal FV1000. (D) Imágenes de una célula HC11, expresando zixina-EGFP, cultivada en la membrana de silicona y observada en el microscopio confocal antes, y después de dar una vuelta de rosca en el dispositivo estirador. Fotos del archivo del CMA.

Como sustrato elástico se utilizó una membrana transparente de silicona flexible con espesor de 127 μm en condición de reposo (Gloss/Gloss láminas de silicona sin reforzar, Specialty Manufacturing Inc., Saginaw, USA). Las membranas vienen en láminas de 27x27cm, y se cortan con un sacabocados para obtener el diámetro adecuado para el dispositivo estirador. Al tener un espesor tan pequeño, las membranas tienden a arrugarse con facilidad por lo que el manejo de las mismas es delicado. Por otro lado, para el cultivo de la línea celular HC11 es necesario modificarlas con la proteína de matriz extracelular fibronectina. Entre otras características, resisten todos los pasos del cultivo celular lo que permite realizar los experimentos con células vivas en el microscopio confocal. Los experimentos y resultados se describen en el Capítulo 7.

4.4. Referencias

¹ Documento de aplicación. Cultivo celular. Cultek, 2007, 1-31.

² Hynes, N. E., Taverna, D., Harwerth, I. M., Ciardiello, F., Salomon, D. S., Yamamoto, T., Groner B., "Epidermal growth factor receptor, but not c-erbB-2, activation prevents lactogenic hormone induction of the beta-casein gene in mouse mammary epithelial cells", *Mol Cell Biol*, 1990, **10**: 4027-4034.

4. Cultivo celular y dispositivo estirador

- ³ Baker, E. L., Zaman, M. H., "Multiple Particle-Tracking Microrheology Reveals that Extracellular Matrix Stiffness and Architecture Govern Intracellular Viscoelasticity", *Biophysical Journal*, 2009, **97(4)**: 1013-21.
- ⁴ Zamir, E., Geiger, B., "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions", *J. Cell Sci.*, 2001, **114**: 3583–3590;
Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B., "Functional atlas of the integrin adhesome", *Nature Cell Biology*, 2007, **9(8)**: 858–867.
- ⁵ Wang, N., Butler, J. P., Ingber, D. E., "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton", *Science*, 1993, **260**: 1124–1127.
- ⁶ Zamir, E., Geiger, B., "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions", *J. Cell Sci.*, 2001, **114**: 3583–3590.
- ⁷ Guo, W., Wang, Y. L., "Retrograde fluxes of focal adhesion proteins in response to cell migration and mechanical signals", *Mol. Biol. Cell*, 2007, **18**: 4519-4527;
Ezratty, E. J., Bertaux, C., Marcantonio, E. E., Gundersen, G. G., "Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells", *J. Cell Biol.*, 2009, **187**: 733–747.
- ⁸ Lauffenburger, D. A., Horwitz, A. F., "Cell migration: a physically integrated molecular process", *Cell*, 1996, **84**: 359–369.
- ⁹ Choquet, D., Felsenfeld, D. P., Sheetz, M. P., "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages", *Cell*, 1997, **88**: 39–48.
- ¹⁰ Hu, K., Ji, L., Applegate, K. T., Danuser, G. Waterman-Storer, C. M., "Differential transmission of actin motion within focal adhesions", *Science*, 2007, **315**: 111-115.
- ¹¹ Jaffe, A. B., Hall, A., "Rho GTPases: biochemistry and biology", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, **21**: 247–269.
- ¹² Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., Geiger, B., "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells", *J. Cell Sci.*, 2003, **116**: 4605–4613.
- ¹³ Beckerle, M. C., "Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion", *Bioessays*, 1997, **19**:949–957;
Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., Geiger, B., "Adhesion-dependent cell mechanosensitivity", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2003, **19**:677–695.
- ¹⁴ Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B., "Functional atlas of the integrin adhesome", *Nat. Cell Biol.*, 2007, **9**: 858-867;
Moody, J. D., Grange, J., Ascione, M. P., Boothe, D., Bushnell, E., Hansen, M. D., "A zyxin head-tail interaction regulates zyxin-VASP complex formation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, **378**: 625–628.
- ¹⁵ Yi, J., Kloeker, S., Jensen, C. C., Bockholt, S., Honda, H., Hirai, H., Beckerle, M. C., "Members of the zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130^{Cas} family of signal transducers", *J. Biol.Chem.*, 2002, **277**: 9580–9589.
- ¹⁶ Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J., Beckerle, M. C., "Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement", *J. Cell Biol.*, 2005, **171**: 209-215.
- ¹⁷ Cattaruzza, M., Latrarch, C., Hecker, M., "Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene

4. Cultivo celular y dispositivo estirador

expression in vascular smooth muscle cells", *Hypertension*, 2004, **43**: 726-730.

¹⁸ Lele, T. P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J., Ingber, D. E., "Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells", *J. Cell. Physiol.*, 2006, **207**: 187-194.

¹⁹ Hirata, H., Tatsumi, H., Sokabe, M., "Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner", *J Cell Sci.*, 2008, **121**: 2795-2804.

²⁰ Tsien, R. Y., "The green fluorescent protein", *Annu Rev Biochem.*, 1998, **67**: 509-44.

²¹ Geiger, B., Spatz, J. P., Bershadsky, A. D., "Environmental sensing through focal adhesions", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2009, **10**(1): 21-33.

²² Brown, T. D., "Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review", *J Biomech*, 2000, **33**: 3-14.

²³ Wang, JH-C., Yang, G., Li, Z., Shen, W., "Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction", *J Biomech*, 2004, **37**: 573-576.

²⁴ Hung, C. T., Williams, J. L., "A method for inducing equi-biaxial and uniform strains in elastomeric membranes used as cell substrates", *J Biomech*, 1994, **27**: 227-232.

²⁵ Quaglino, A., Salerno, M., Pellegrotti, J., Rubinstein, N., Kordon, E. C., "Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells", *BMC Cell Biology*, 2009, **10**: 10-55

5. Mapeo de propiedades nanomecánicas: de polímeros a células

5. Mapeo de propiedades nanomecánicas: de polímeros a células

La posibilidad de evaluar propiedades nanomecánicas en microestructuras resulta de gran interés, tanto para el estudio de materiales como para el análisis de muestras biológicas como células y tejidos. Las células pueden responder a su microentorno mediante cambios en sus propiedades mecánicas. Por ejemplo, el módulo de elasticidad de las células se altera en su transformación de normales a malignas dentro del microambiente del tumor en la progresión del cáncer¹. En el sentido inverso, muchos tipos celulares son sensibles a las propiedades mecánicas del sustrato en el que se cultivan mediante respuestas como su adherencia, proliferación o diferenciación, respuestas celulares estructurales (como el remodelado del citoesqueleto de actina), y respuestas fisiológicas que incluyen la organización de tejidos y la expresión de proteínas específicas en las interfaces célula-sustrato².

La microscopía de fuerza atómica (AFM) en su utilización para espectroscopía de fuerzas, permite mapear fuerzas en un rango desde las decenas de pN hasta las decenas de nN con resolución espacial nanométrica, convirtiéndose en una de las herramientas más utilizadas para el estudio de propiedades nanomecánicas. A través de un análisis cuantitativo de las curvas de fuerza se pueden determinar propiedades mecánicas (como módulos de elasticidad, deformación, adhesión y disipación) tanto de los sustratos como de las células vivas y mapearlas con resolución de nanómetros³.

En este capítulo se describe la utilización de espectroscopía de fuerza/nanomecánica cuantitativa para el estudio de propiedades mecánicas de diferentes tipos de muestras: desde sustratos poliméricos termo-responsivos o sistemas nanoestructurados de copolímeros de bloque reforzados con nanotubos de carbono, hasta cultivos de bacterias.

5.1. Sistemas multicapas termo-responsivos de microgel

Las interfaces moleculares controlan las propiedades químicas, físicas, biológicas y mecánicas de las superficies a toda escala y nivel de complejidad, ya sean moléculas que se adsorben sobre monocapas autoensambladas o superficies multicomponente bio-funcionalizadas. El uso de polímeros para la modificación de superficies con estructuras y propiedades bien definidas resulta un importante campo de investigación básica y aplicada. Actualmente, una de las superficies

termo-responsivas más promisorias para aplicaciones biológicas son las construidas a partir de la utilización de polímeros con una transición de fase en un rango de temperaturas cercano al fisiológico. Estos polímeros termo-responsivos presentan en solución un comportamiento dependiente de la temperatura, cambiando propiedades como su morfología, su hidrofobicidad o su rigidez en respuesta a cambios pequeños en temperatura. Por ejemplo, el poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) tiene una temperatura de transición de volumen de fase (VPTT) de alrededor de 32°C.⁴ Los microgeles de PNIPAM son partículas discretas del polímero con un tamaño en el rango de los nanómetros hasta unos pocos micrones que poseen las mismas propiedades que el PNIPAM, pero debido a su tamaño responden mucho más rápido a los cambios del entorno.⁵ Por debajo de la VPTT se favorecen las uniones de hidrógeno entre la red del polímero y el solvente, dando lugar a partículas más hinchadas. Con el aumento de la temperatura, se rompen las uniones de hidrógeno entre el polímero y el solvente volviéndose dominantes las interacciones hidrofóbicas polímero-polímero, lo que resulta en partículas más comprimidas y rígidas.

En esta sección se describe la utilización de microscopía de fuerza atómica para la caracterización de sustratos termo-responsivos construidos a partir de multicapas intercaladas de microgel. Mediante AFM se logró una caracterización en función de la temperatura, no sólo de la topografía de los sustratos, sino también de sus propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad y sus propiedades de adhesión.

Los sustratos estudiados, fabricados en el grupo de materia blanda del INIFTA (director: Dr. Omar Azzaroni), consisten en multicapas intercaladas de MICROGEL y polialilamina (PAH) sobre sustratos de silicio. En todos los casos, el Si está modificado con APTES (aminopropil tri-etoxisilano, un silano terminado en grupo amina), luego tiene un ensamblado capa por capa inicial de tres bicapas de PSS y PAH: (PSS/PAH)₃. Esto se usa como sustrato base para ensamblar el resto. Finalmente, se ensambla capa por capa el microgel y el PAH, siempre con una última capa de microgel. Entre las muestras estudiadas, lo que varía de una muestra a otra es la cantidad de bicapas ensambladas. Se estudiaron dos tipos de muestras:

1- microgel 4: (PSS/PAH)₃ (MICROGEL/PAH)₄ MICROGEL (esto es, 3 bicapas de PSS/PAH, 4 bicapas de MICROGEL/PAH y una capa de MICROGEL).

2- microgel 9: (PSS/PAH)₃ (MICROGEL/PAH)₉ MICROGEL (esto es, 3 bicapas de PSS/PAH, 9 bicapas de MICROGEL/PAH y una capa de MICROGEL).

Topografía de los sustratos termo-responsivos

Se estudió el comportamiento de los sustratos al variar la temperatura. Para calentar la muestra se utilizó una celda Peltier colocada entre el escáner piezoeléctrico del microscopio de fuerza atómica (AFM) y la muestra. Mediante el controlador de temperatura TED 200 Profile, se varió la temperatura controlando la intensidad de corriente para que no sature ($< 0.6A$). La calibración se realizó comparando la temperatura otorgada por la celda Peltier con la determinada por una termocupla calibrada. Este sistema de calentamiento permite modificar la temperatura entre T mínima $25^{\circ}C$ hasta $50^{\circ}C$, rango acorde a la medición ya que la temperatura de transición esperada según las mediciones de microbalanza de cuarzo de las muestras fue de $\sim 29^{\circ}C$. Las mediciones se realizaron tanto en Modo contacto como en contacto intermitente, en solución de cloruro de potasio (KCl, 5mM, pH 5) utilizando un sensor de fuerza modelo NP de la empresa Bruker con constante elástica $k=0.06N/m$, y frecuencia $f=18kHz$, valores nominales. En la Figura 5.1 se presenta una imagen de topografía a temperatura ambiente de la muestra microgel-4 y un perfil en el que se puede apreciar que el tamaño de las partículas es el esperado, del orden de $0.4\mu m$.

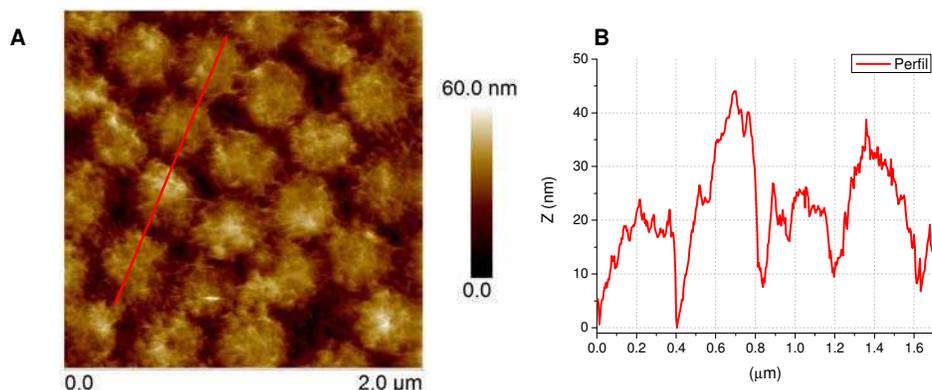


Figura 5.1. Topografía de los sustratos termo-responsivos. (A) Imagen representativa de topografía adquirida con el modo contacto de AFM del microgel-4, a pH5 y temperatura ambiente ($T=25^{\circ}C$). (B) Perfil de altura de la línea marcada en la imagen de topografía. Imágenes procesadas con el *software NanoScope Analysis 1.5*.

En la Figura 5.2 se muestra la evolución de la topografía de los ensamblados de 9 bicapas, antes y después de la transición de fase. Como puede verse en la Figura 5.2, una vez superada la temperatura de transición las partículas de microgel pasan de estar en un estado laxo, muy difícil de registrar mediante el barrido del AFM (sólo a muy bajas fuerzas de contacto), a adquirir una rigidez que permite observarlas claramente con el microscopio.

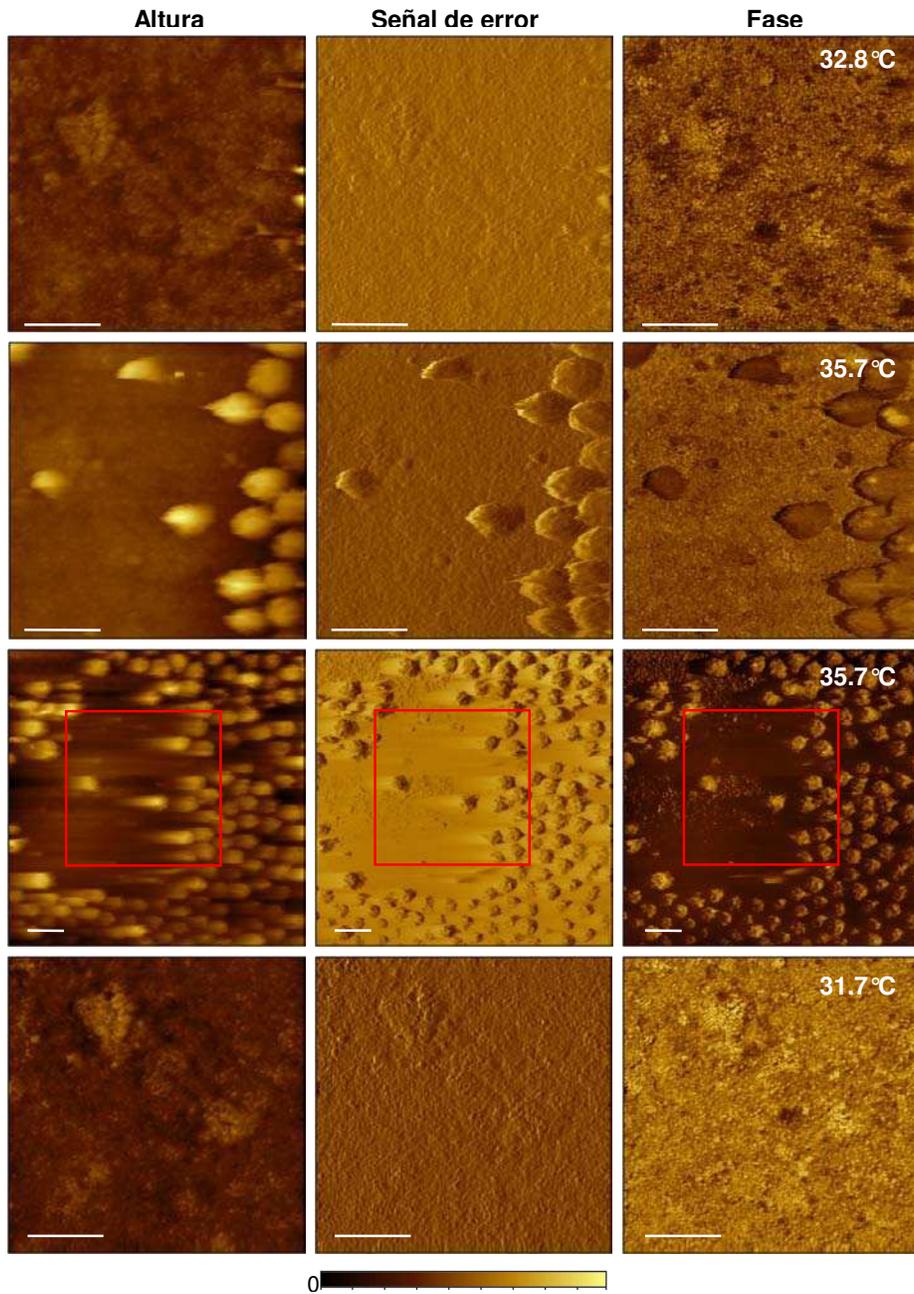


Figura 5.2. Evolución de la topografía de los ensamblados en función de la temperatura. Imágenes adquiridas en modo contacto intermitente, canales de topografía, señal de error y fase para la muestra $(\text{PSS}/\text{PAH})_3$ $(\text{MICROGEL}/\text{PAH})_9$ MICROGEL, en solución de KCl con pH 5, en función de la temperatura (32.8°C; 35.7°C; 31.7°C). El recuadro de la tercera fila corresponde al área del resto de las figuras. Imágenes procesadas con el programa *Gwyddion*. Altura: (0-145); (0-380); (0-320); (0-100)]nm. Error: [(0-70); (0-80); (0-60);(020)]V. Fase: [(0-15); (0-20); (0-10);(0-20)]° Barra de escala: 500nm.

Este cambio tan evidente fue registrado únicamente en la muestra de 9 bicapas, por lo que se seleccionó la misma para realizar un estudio específico de sus propiedades mecánicas en función de la temperatura.

Propiedades nanomecánicas

Mediante espectroscopía de fuerza se estudiaron las propiedades nanomecánicas de la muestra microgel-9. Se realizaron curvas de fuerza para diferentes temperaturas (25, 30; 35) °C. A diferencia de la adquisición de imágenes, para analizar las curvas de fuerza se necesita conocer el valor de la constante elástica del sensor de fuerza. Dado que la constante elástica del sensor depende fuertemente de la temperatura, se debió realizar la calibración para cada temperatura. Se realizó el análisis de la elasticidad de la muestra microgel-9 en función de la temperatura. Las curvas de aproximación se analizaron con el modelo de Hertz. Para obtener un valor de elasticidad representativo de la muestra para cada temperatura, aproximadamente 900 curvas fueron tomadas en diferentes regiones de la muestra. En la Figura 5.3 se presentan las curvas típicas halladas para cada temperatura. El comportamiento observado es un aumento del módulo de Young al aumentar la temperatura, desde un valor de 130kPa, a un valor de 480kPa después de la transición de fase. Estos valores coinciden con los reportados para una monocapa de microgel.⁶

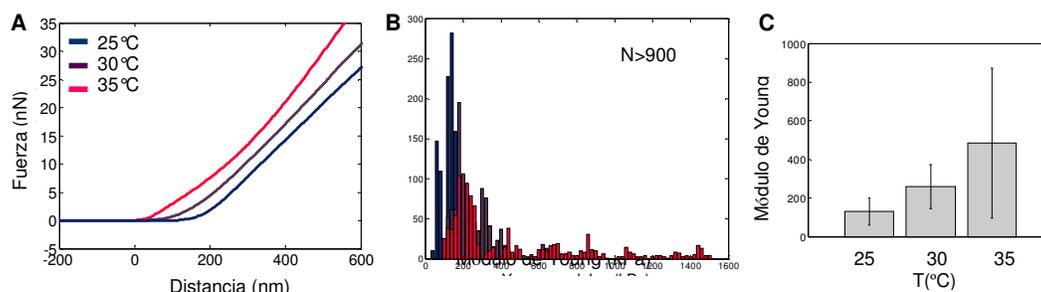


Figura 5.3. Elasticidad del microgel-9 respecto de la temperatura. (A) Curvas de fuerza representativas obtenidas para cada temperatura. (B) Histograma de los módulos de Young calculados mediante el modelo de Hertz. (C) Valores promedios del módulo de Young para cada temperatura.

Se analizó también el cambio en el trabajo de adhesión de la muestra microgel-9 con la temperatura. El trabajo de adhesión se define como el trabajo necesario para separar la punta del sensor de fuerza de la superficie de la muestra. En el ciclo de retracción las fuerzas de adhesión mantienen el contacto entre la punta y la superficie de la muestra hasta que la fuerza de retracción del sensor vence la fuerza de adherencia, y finalmente se separa de la superficie. El área encerrada por la curva de la fuerza y el eje x representa el trabajo de adhesión³. De esta manera se calcularon los trabajos de adhesión en función de la temperatura (Figura 5.4).

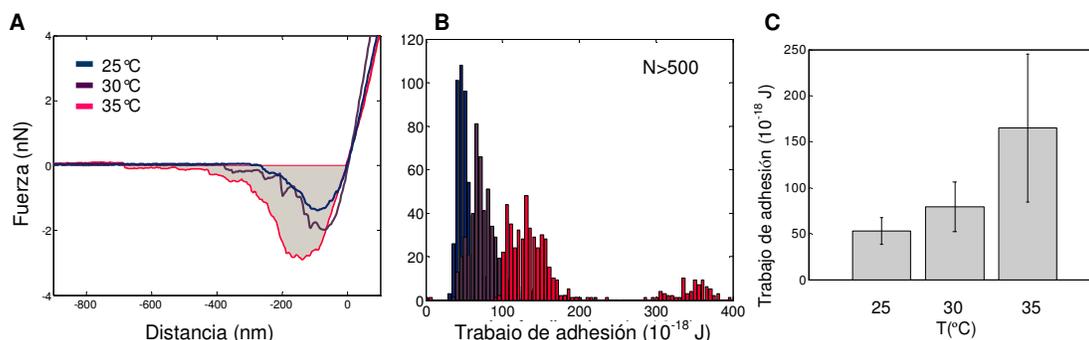


Figura 5.4. Trabajo de adhesión para el microgel-9 respecto de la temperatura. (A) Curvas de fuerza representativas obtenidas para cada temperatura. (B) Histograma del trabajo de adhesión calculado por el área encerrada entre la curva de retracción y el eje de abscisas. (C) Valores promedios del trabajo de adhesión para cada temperatura.

Como puede verse, a medida que aumenta la temperatura, se incrementa el trabajo de adhesión, lo que significa que el ensamblado se vuelve más adherente. Cabe aclarar que el trabajo de adhesión depende fuertemente de las características de la punta del sensor de fuerza, por lo que experimentos con diferentes puntas arrojan valores no comparables. Es por esto que los datos presentados corresponden a un experimento con el mismo sensor de fuerza. Para garantizar que las variaciones en la adhesión sean debido a la muestra y no por la adsorción de partículas a la punta en el transcurso del experimento, se midieron curvas de fuerza aumentando y disminuyendo la temperatura. Si bien los valores absolutos del trabajo de adhesión no fueron comparables entre diferentes experimentos, siempre se observó el comportamiento de un aumento de la adhesión a mayor temperatura.

5.2. Sistemas nanoestructurados EPOXI-SiSe reforzados con nanotubos de carbono

Como primer material de estudio para implementar el modo avanzado de AFM, *Peak Force QNM* se emplearon diferentes muestras de copolímeros de bloque reforzados con nanotubos de carbono preparadas en el Laboratorio de Polímeros de la FCEN-UBA por el Dr. Hernán Garate (directora: Dra. Silvia Goyanes). El grupo diseñó y desarrolló un recubrimiento orgánico novedoso ligero, durable y de bajo costo, con propiedades eléctricas capaces de evitar la acumulación de carga electrostática.

Diseño

El diseño a nanoescala permite desarrollar materiales nanocompuestos estructurados jerárquicamente, cuyas propiedades dependen en gran medida de la nanoestructura generada. Para obtener un material con las características deseadas

se desarrolló un material nanocompuesto de base epoxi integrando copolímero de bloque (CPB) y nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados. Se eligieron NTC debido a sus excelentes propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas, alta relación de aspecto y su baja densidad. Por su parte, el copolímero de bloque mejora la dureza del epoxi y ayuda a dispersar los NTC. Las muestras utilizadas son polímeros nanocompuestos basados en una matriz epoxi modificada con copolímeros de bloque poli(estireno-*b*-isopreno-*b*-estireno) (SIS) previamente epoxidados 85% (SIS85) y reforzados con NTCs. Para poder incorporar, de forma dispersa, los NTCs en materiales compuestos es necesario funcionalizarlos, con este fin se utilizaron cadenas de poli(estireno) (NTC-PS),(Figura 5.5).

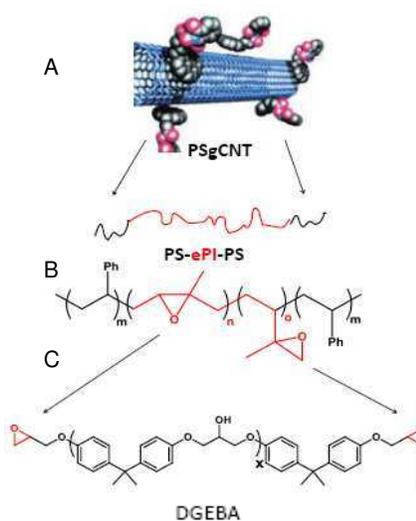


Figura 5.5. Diagrama del nanocompuesto. (A) Esquema NTC funcionalizados con poli(estireno). (B) Secuencia del copolímero de bloque. (C) Monómero epoxi, diglicidil éter de bisfenol A (DGEBA).⁷

Muestra	SIS85 (% en masa)	NTC-PS (% en masa)
<i>epoxi</i>	0	0
<i>epoxi(23)</i>	23	0
<i>epoxi(23; 0,05)</i>	23	0,05
<i>epoxi(23; 0,1)</i>	23	0,1
<i>epoxi(23; 0,3)</i>	23	0,3
<i>epoxi(10)</i>	10	0
<i>epoxi(10; 0,05)*</i>	10	0,05
<i>epoxi(10; 0,1)*</i>	10	0,1
<i>epoxi(10; 0,3)*</i>	10	0,3

Tabla 5.1. Composición de las diferentes muestras de nanocompuestos utilizados. Las muestras con asterisco también se estudiaron con NTC sin funcionalización.

Diferentes cantidades de NTC-PS y de copolímero de bloque SIS85 se incorporaron a los nanocompuestos para estudiar cómo se ven modificadas las propiedades físico-mecánicas. Las muestras presentadas en la Tabla 5.1 fueron preparadas por el Dr. Garate siguiendo las metodologías descritas en los trabajos^{8,9}.

Influencia del sustrato en la morfología del nanocompuesto

Para evaluar el efecto del sustrato en la morfología se adquirieron imágenes topográficas de AFM obtenidas para la muestra epoxi (23; 0,1) colocada por *spray* sobre el sustrato de aluminio, y se compara con una muestra de igual composición colocada por *solvent casting* sobre silicio (Figura 5.6). Como puede observarse, los nanodominios generados a partir del copolímero de bloque SIS85 presentan una morfología irregular para ambos sustratos.

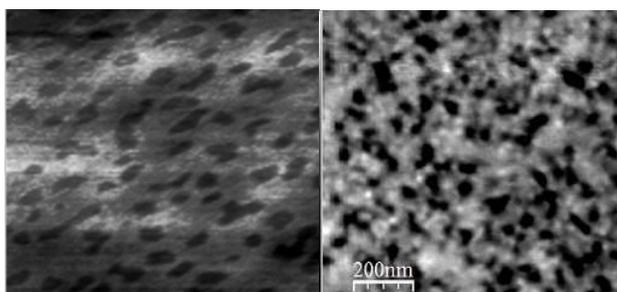


Figura 5.6. Topografía de las muestras. Imágenes topográficas de AFM de la muestra epoxi (23; 0,1) sobre sustrato de aluminio (izquierda) y silicio (derecha). Las imágenes fueron adquiridas en modo de contacto intermitente en atmósfera de nitrógeno seco y su tamaño es 800nm x 800nm

Si bien es conocido que el sustrato puede modificar notablemente la morfología desarrollada por el copolímero de bloque, dicho efecto se produce cuando el espesor del film es inferior a $1\mu\text{m}$. En nuestro sistema el espesor de los films fue de aproximadamente $7\mu\text{m}$, lo que sugiere que la morfología observada no está condicionada por el sustrato.

Propiedades nanomecánicas mediante espectroscopía de fuerza y PF-QNM

La microscopía de fuerza atómica se utilizó para analizar propiedades como el módulo de Young, adhesión y disipación de energía, propiedades muy relevantes en el campo de los recubrimientos. Se implementaron los modos contacto intermitente (*TM*) y *PF-QNM* para estudiar las diferentes muestras. Todas las mediciones se realizaron

en atmósfera de nitrógeno seco. Debido al volumen de los datos obtenidos, se presentan las mediciones representativas correspondientes a las muestras epoxi (23;0.1) y epoxi (10;0.3). En la Figura 5.7, se resume la información que podemos obtener en los distintos modos de operación para analizar cómo se complementan en la descripción del sistema. Por un lado, comenzando con el modo de operación convencional de contacto intermitente *TM*, tenemos las imágenes de topografía (Figura 5.7E) y de fase (Figura 5.7F) que se adquieren simultáneamente. La imagen de fase provee información complementaria a la imagen de topografía poniendo en evidencia las variaciones en las propiedades de la superficie de la muestra epoxi (23;0.1), variaciones asociadas a la elasticidad, la dureza, la adhesión y/o la energía disipada. Como se mencionó en el capítulo 3, la fase provee información sobre la composición y la separación de micro-fases de la muestra. Mientras la fase indica que hay variación en las propiedades superficiales de la muestra, con el modo de operación avanzado *PF-QNM* se puede distinguir y cuantificar estas propiedades. Como se puede ver en la Figura 5.7, la muestra epoxi (23;0.1) presenta variaciones en la fuerza de adhesión punta-muestra (B) y en la elasticidad de su superficie (C). A partir del mapa de elasticidad se obtuvo el histograma del módulo de Young, y de esta forma cuantificar el coeficiente de elasticidad promedio del material (D) en la región analizada de la muestra.

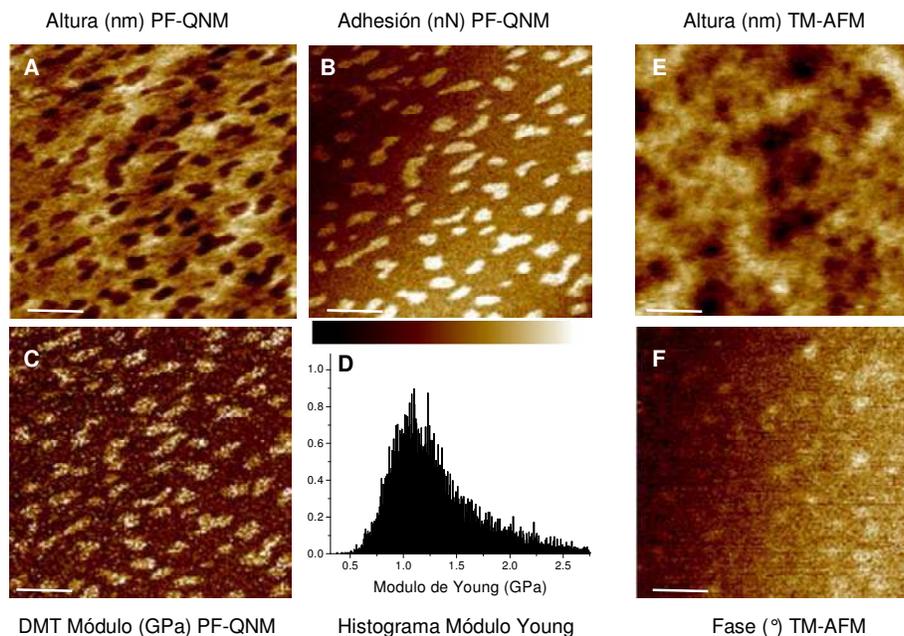


Figura 5.7. Resultados obtenidos con los modos PF-QNM y TM-AFM para la muestra epoxi (23; 0.1). Las imágenes (A-C) corresponden a topografía, adhesión y módulo de elasticidad, respectivamente en una región de la muestra, mientras que las imágenes tomadas en TM son altura (E) y fase (F) adquiridas

en una región diferente de la misma muestra. (D) Histograma del Módulo de Young obtenido con el modelo de Hertz ($R_{tip}=30\text{nm}$, $k=12.25\text{N/m}$, $\nu=0.3$). En el centro de la figura, barra de intensidad. PF-QNM (A) Altura (0; 9)nm, (B) Adhesión (0; 8)nN, (C) Módulo (0; 3)GPa. TM-AFM (E) Altura (0; 3.7)nm, (F) Fase (0; 20)°. Imágenes de ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$). Barra de escala: 200nm.

Este ejemplo pone en evidencia la ventaja de usar ambos modos de operación y, en particular, la posibilidad de cuantificar y obtener mapas mediante PF-QNM, más allá de la velocidad en la adquisición de los datos. Estudios previos de materiales compuestos poliméricos nanoestructurados mostraron que la incorporación del copolímero de bloque SIS85 a una resina epoxi conduce a un sistema de microfases separadas con nanodominios esféricos de poliestireno¹⁰. Se analizó la muestra epoxi (10;0.3) mediante el en comparación con la muestra de igual composición pero con nanotubos de carbono sin funcionalizar. La imagen de fase muestra una apariencia de la superficie diferente a la imagen de topografía, que se traduciría en la presencia de estructuras distorsionadas con cierto grado de interconexión (Figura 5.8.B). Sin embargo, utilizando el modo *PF-QNM*, se logró resolver la estructura interna de los nanodominios del copolímero de bloque como indican los mapas de adhesión (Figura 5.8.D y E).

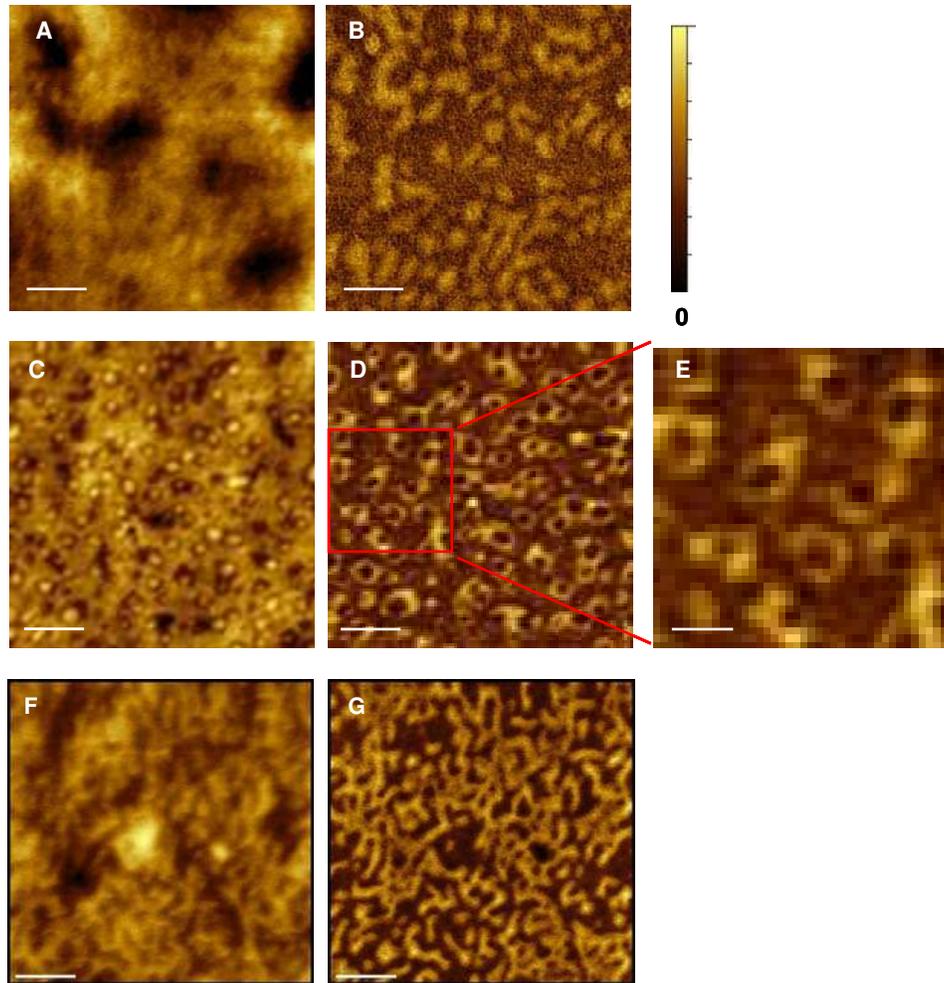


Figura 5. 8. Resultados para la muestra epoxi (10; 0.3) mediante los modos de operación TM-AFM y PF-QNM. (A-B) Imágenes de topografía y fase de una región de la muestra epoxi (10; 0.3) obtenidas mediante TM-AFM. (A-B) Barra= Altura (0; 7)nm, Fase (0; 5)^º. (C-D) Imagen de topografía y su correspondiente mapa de adhesión para una región de la muestra epoxi (10; 0.3) adquiridos por PF-QNM. E) Ampliación realizada para apreciar los nanodominios. (C-E) Barra = Altura (0; 4.5)nm, Adhesión (0; 7)nN. (F-G) Imagen de topografía de la muestra epoxi (10; 0.3) con NTC sin funcionalizar, y su correspondiente mapa de Adhesión. (F-G) Barra =Altura (0; 6)nm, Adhesión (0; 11)nN. Barra de escala: 160nm (A-B-D-F-G), y 64nm para (E).

Las zonas más oscuras corresponderían al centro (*core*) de poliestireno, y las zonas más brillantes a la cáscara (*shell*) de poliisopreno epoxidado. Esta estructura ya se había propuesto trabajos previos⁶ pero es la primera vez que se visualiza. Si ahora analizamos las imágenes adquiridas mediante PF-QNM para la muestra epoxi (10; 0.3), en la que los NTC no están funcionalizados, se distinguen en el mapa de adhesión estructuras alargadas tipo gusano en coexistencia con esferas. La diferencia entre los paneles D y G es muy grande y resulta en una organización o no en nanodominios.

Fuerza de adhesión, módulo de Young y disipación de la energía

Se analizó la influencia del contenido de copolímero y la presencia de nanotubos de carbono funcionalizados en la adhesión de las muestras de epoxi. Para ello se tomaron cientos de curvas de fuerza para las tres muestras: epoxi, epoxi(10) y epoxi(23), y de cada una se determinó la fuerza de adhesión, es decir el mínimo de la curva de fuerza. En la Figura 5.9A se presentan los resultados que indicarían que la fuerza de adhesión aumenta a medida que aumenta el contenido de copolímero de bloque. Teniendo en cuenta que la punta del sensor de fuerza utilizado, está constituida por silicio, que es de naturaleza hidrofóbica, el aumento en la fuerza de adhesión corresponde a un aumento en la hidrofobicidad del material con el agregado de mayor contenido de SIS85. Luego, partiendo de la muestra con 10% en masa de copolímero, epoxi(10), se analizó cómo varía la fuerza de adhesión para un contenido variable de nanotubos de carbono funcionalizados con poliestireno (NTC-PS). Se observa (Figura 5.9.B) que conforme aumenta el contenido de NTC-PS, aumenta la fuerza de adhesión, lo cual está relacionado con el carácter hidrofóbico de los NTCs. Por último, se mantuvo la cantidad de NTC en 0,1% y se midió la fuerza de adhesión para las muestras epoxi(10;0.1) y epoxi(23;0.1). En este caso se ve un fuerte aumento del orden del 90 % al aumentar el contenido de copolímero de bloque. Dicho aumento es significativamente superior al observado entre las muestras epoxi(10) y epoxi(23) (58 % de aumento), y podría estar relacionado a un efecto sinérgico generado por interacciones entre el copolímero de bloque y los nanotubos de carbono. De todas formas, esta situación no resulta evidente y sería necesario un estudio más completo que permitiera comprender este fenómeno.

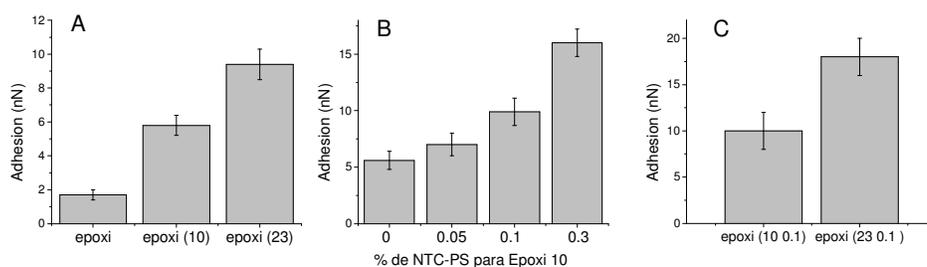


Figura 5.9. Fuerza de adhesión. (A) Adhesión de la resina epoxi respecto de diferente contenido de copolímero de bloque. (B) Para la muestra que contiene 10% de copolímero de bloque se midió la fuerza de adhesión variando la cantidad de NTC-PS. (C) Comparación de la fuerza de adhesión para distinta cantidad de SIS85 manteniendo constante la proporción de NTC-PS.

El Módulo de Young de los nanocompuestos, presentó una ligera reducción de $(3,0 \pm 0,5)GPa$ a $(2,1 \pm 0,2)GPa$ por la incorporación de 10% en peso de SIS

epoxidado. En la Figura 5.10 se muestran los valores promedio de los módulo de Young calculados a partir de los mapas de elasticidad para la muestra epoxi(10) y sus variantes presentando un contenido creciente de NTC-PS. No hubo ningún cambio significativo en el módulo de Young debido a la incorporación de NTC-PS ($2,0 \pm 0,2$ GPa).

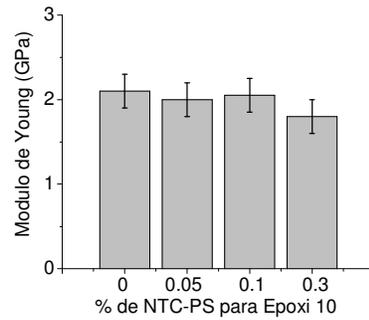


Figura 5.10. Módulo de Young en función del contenido de nanotubos de carbono funcionalizados. Valores promedio de módulo de Young obtenidos a partir del mapa de elasticidad medido con el modo de operación *PF-QNM* para las muestras epoxi(10), epoxi(10; 0,05), epoxi(10; 0,1), y epoxi(10; 0,3).

A partir del análisis de las curvas de fuerza se calculó la energía disipada. La energía disipada por ciclo de interacción se obtuvo a partir del área definida entre la curva de aproximación y la de retracción (capítulo 3). En la Figura 5.11 se presentan los resultados de energía disipada por ciclo de interacción promedio para la resina epoxi, la resina con 10% en peso de copolímero de bloque (SIS85), y distinta proporción de nanotubos de carbono funcionalizados con poliestireno (NTC-PS). La resina epoxi presentó el menor valor de disipación de energía, valor que aumentó significativamente por la incorporación de 10 % de copolímero de bloque.

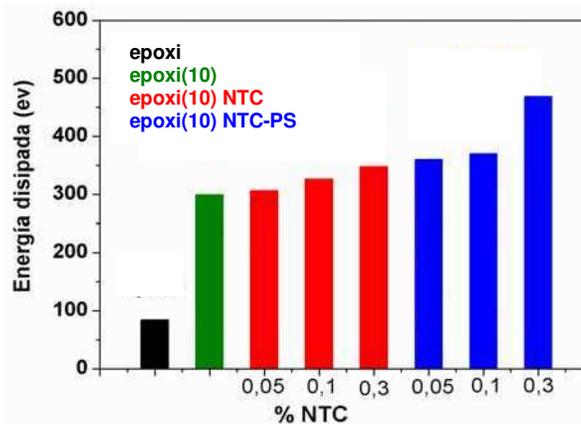


Figura 5.11. Energía disipada por ciclo de interacción al variar la composición del nanocompuesto.

Los materiales compuestos conteniendo NTC presentaron mayor disipación de energía por ciclo de interacción a mayor contenido de nanotubos de carbono (barras en rojo). Por su parte, los materiales conteniendo NTC funcionalizados con PS (barras en azul) presentaron mayor disipación de energía a mayor contenido de NTC. Si se comparan los valores de disipación de energía entre sistemas con NTC y NTC-PS, para un mismo porcentaje de carga, se aprecian diferencias significativas en todos los casos, siendo mayor para NTC-PS. Estos resultados indicarían que la modificación simultánea de una resina epoxi con nanodominios de copolímero de bloque y nanotubos de carbono funcionalizados conducen a un material con mayor disipación de energía, hasta seis veces superior respecto al material epoxi sin modificaciones, por lo que el material tendría mayor tenacidad.

En resumen, el material nanocompuesto de base epoxi integrando copolímero de bloque en un 10% en peso, y conteniendo 0.3% en peso de nanotubos de carbono funcionalizados presentó una fuerza de adhesión de (2 ± 0.2) nN, un mejoramiento de hasta seis veces en la energía de disipación con respecto al material epoxi solo, y un módulo de Young alto (1.8 ± 0.2 GPa).

5.3. Mapeo cuantitativo de las propiedades mecánicas de bacterias expuestas a iones y nanopartículas de Ag

Las bacterias son células procariotas que se pueden clasificar según la composición de su pared celular como Gram (+) y Gram (-). La pared de las bacterias Gram (-) se compone de dos subcapas: la membrana citoplasmática interna, que sirve como la principal barrera a la permeabilidad, y la membrana externa. La pared celular de las bacterias Gram (-) tiene un espesor entre 30 a 80 Å. Las bacterias Gram (+) en cambio, tienen una única membrana plasmática, rodeada por una capa de peptidoglicano que puede medir hasta 250Å¹¹. La función de la pared celular es proporcionar una capa exterior protectora para la célula y evitar la rotura de la membrana celular debida a la gran presión de turgencia osmótica causada por la alta concentración interna de osmolitos.

Por otra parte, cabe recordar que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido; y bacterias sésiles (formadoras de *biofilms* o biopelículas), creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas. La mayoría de los microorganismos existen en la naturaleza bajo la forma de *biofilms* o biopelículas. Un

biofilm se define como una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interface, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica. Las biopelículas constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en medios hostiles. La presencia de *biofilms* en una gran diversidad de ambientes trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas relacionados tanto con la medicina (infecciones), la industria en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento), la industria alimentaria en particular (contaminación microbiana de alimentos), el biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. Cabe aclarar también que los *biofilms* están relacionados con procesos beneficiosos tales como la biolixiviación y la biorremediación.

Se ha demostrado que las bacterias creciendo en *biofilms* son significativamente más resistentes a los agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas. Este hecho hace necesaria la implementación de nuevas estrategias para la erradicación eficiente de biopelículas como así también el estudio en profundidad de los mecanismos involucrados durante la acción antibacteriana de diversos agentes.

Efectos del tratamiento con iones y nanopartículas de Ag en bacterias

Los iones de Ag han sido reportados como letales para una variedad de especies microbianas, tanto bacterias Gram (+) como Gram (-), y son numerosas las aplicaciones en los campos de la medicina clínica y de la vida diaria, que los definen como un agente antibacteriano¹². El estudio del efecto de los iones de Ag en la pared celular bacteriana permitiría explicar algunos aspectos del mecanismo de acción de Ag así también como desarrollar mejores terapias antimicrobianas. La determinación de las propiedades mecánicas de la membrana de las bacterias *in situ*, sin ningún tratamiento de inmovilización, ha sido un desafío desde hace mucho tiempo.

En este trabajo de Tesis se eligieron las bacterias *Pseudomonas aeruginosas* (Gram (-)) y *Staphylococcus aureus* (Gram (+)) para estudiar el efecto de iones de plata (Ag+) y nanopartículas (NPs) de Ag sobre las propiedades mecánicas de la membrana celular. Además, para los microorganismos *Staphylococcus aureus* se analizó la acción del antibiótico ampicilina, un antibiótico que afecta en mayor medida a las bacterias Gram (+) ya que interfiere en la síntesis de la pared celular durante la

replicación celular. Para alcanzar este objetivo se utilizó microscopía y espectroscopía de fuerza. Mediante el uso del modo avanzado de AFM, *PeakForce QNM*, que nos permitirá el mapeo nanomecánico cuantitativo de las propiedades del material, incluyendo el módulo, la adhesión y la deformación, mientras que simultáneamente se adquirirán las imágenes topográficas de la muestra con alta resolución espacial¹³. Las muestras de los *biofilms* fueron preparadas en el INIFTA por la Dra. Carolina Diaz.

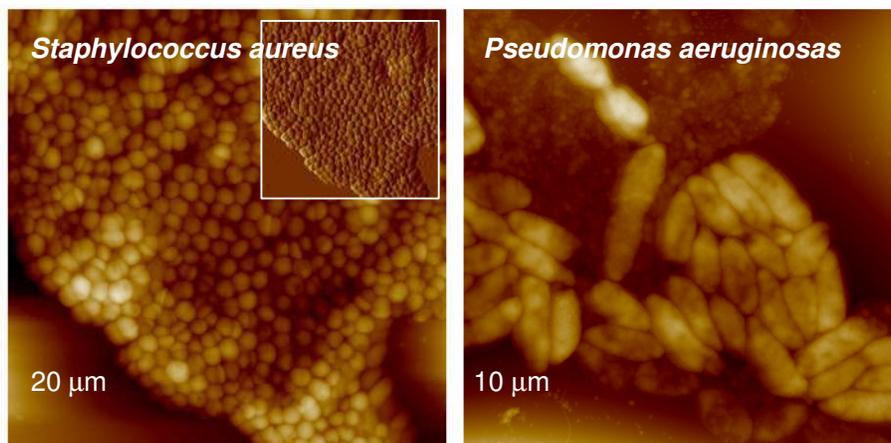


Figura 5.12. Biofilms de bacterias por AFM. Imágenes de topografía de un biofilm de la bacteria *Staphylococcus aureus* (Gram (+)) y de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Gram (-)).

En la Figura 5.12 se presentan imágenes de la topografía de *biofilms* de las bacterias en estudio obtenidas por AFM en el modo de contacto y en solución. Es evidente la geometría y tamaño característicos tanto de los cocos Gram (+) como de los bacilos Gram (-). En la imagen de la izquierda perteneciente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, además, se muestra la información obtenida en simultáneo en el canal de deflexión o señal de error. Las células presentan variaciones en la escala de color, tanto cocos como bacilos, lo que indica que no son superficies lisas u homogéneas, como se espera.

Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de las nanopartículas de plata (NP de Ag) se basó en el trabajo de Kitaev y colaboradores¹⁴, y resultó en una dispersión con dos poblaciones de nanopartículas diferentes, nanoprismas de 60nm y 30nm. El tamaño se determinó mediante AFM en modo *de contacto intermitente TM-AFM* (Figura 5.13A). Por otro lado, se realizó un espectro de absorbancia UV-visible donde la muestra presentó un pico de absorbancia en 760nm, y se siguió en función del tiempo para ver la estabilidad de la dispersión (Figura 5.13B). Es importante, además, que la estabilidad

de la dispersión no esté comprometida cuando se utiliza medio de cultivo mínimo para el crecimiento de las bacterias. Para esto, se hizo una dilución en medio mínimo a la mitad con respecto a la concentración original de nanopartículas $[npAg] = 1/2 [npAg]_{inicial}$ (concentración utilizada en los ensayos posteriores) y se compararon los espectros (Figura 5.13C). Ambos controles presentaron la estabilidad deseada.

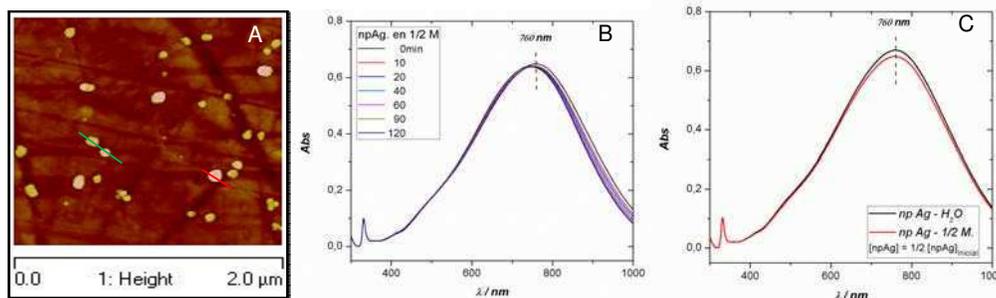


Figura 5.13. Caracterización de las nanopartículas. (A) Imagen de topografía obtenida por AFM de las NP de Ag. (B) Espectros de los nanoprismas para diferentes tiempos. (C) Comparación de los espectros de absorción en el rango UV-visible obtenidos para la solución de nanopartículas en agua y en medio mínimo. Los nanoprismas presentaron estabilidad en medio de cultivo y respecto al tiempo.

Formación de biofilms sobre sustratos de vidrio y mediciones en AFM

Para formar el *biofilm* de bacterias se colocó una gota de bacterias en suspensión de medio nutritivo sobre un sustrato de vidrio durante 2h. Luego se enjuagó con PBS para remover las bacterias que puedan haber estado débilmente adheridas. Posteriormente, se incubó el *biofilm* formado sobre vidrio en una solución conteniendo un medio mínimo (glucosa, manitol y glicina) y los iones Ag⁺ (solución de AgNO₃, 1μM) a 32°C durante 2h. Para la preparación de las muestras control, se incubaron los sustratos de vidrio con *biofilm* en medio mínimo a 32°C durante 2h en ausencia de iones Ag⁺. Un tratamiento análogo se realizó con NPs de Ag. En el caso de las bacterias tratadas con ampicilina se utilizó una concentración de antibiótico de 5μg/ml y el tiempo de incubación fue 24h. Las mediciones preliminares para la caracterización de las distintas muestras se hicieron en atmósfera de nitrógeno. Si bien estos experimentos no tienen relevancia biológica sirvieron para evaluar las condiciones del ensayo; la adhesión de los diferentes microorganismos al vidrio; definir la concentración óptima de bacterias para observarlas individualmente; determinar la constante elástica necesaria para elegir el sensor de fuerza adecuado para la obtención de los diferentes mapas de propiedades nanomecánicas. Una vez adquirida la imagen, se seleccionó una región de interés para el análisis de las curvas de fuerza que permiten extraer las distintas propiedades mecánicas. Como se describe en el

Capítulo 3, la fuerza de adhesión entre la punta y la muestra se obtiene del mínimo de la curva fuerza-distancia. El módulo de Young se calcula en base al modelo Derjaguin-Muller-Toporov (DMT). La disipación de energía de cada ciclo se calcula integrando el área formada entre la curva de aproximación y la de retracción, y la deformación máxima se define como la penetración de la punta en la superficie para la fuerza máxima.

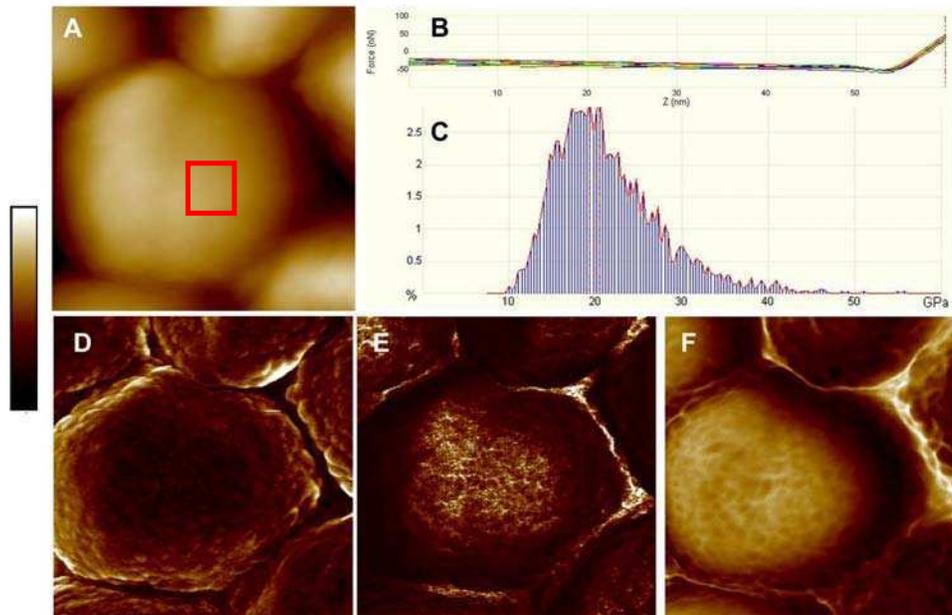


Figura 5.14. Topografía y mapas para bacterias *Staphylococcus aureus* tratadas con Ag+. Las mediciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno. (A) Imagen de topografía de las bacterias sobre la cual se seleccionó una región de interés (en rojo). (B) Curvas de deflexión versus la distancia del piezo (z) para la región seleccionada en A. (C) Histograma del módulo de Young DMT. (D-F) Canales del modo de operación *PeakForce QNM*: deformación, Módulo DMT y adhesión, respectivamente. Barra = Altura (0, 400)nm, Deformación (0, 5) nm, Módulo DMT (0, 50)GPa, Adhesión (0, 40)nN. Tamaño de las imágenes = 1 μ m.

La Figura 5.14 ilustra la información que se obtuvo para la muestra de *Staphylococcus aureus* tratada con Ag+, medición realizada en atmósfera de nitrógeno en el modo *PF-QNM*. El tratamiento de las células *Staphylococcus aureus* con el antibiótico ampicilina tiene un efecto drástico en la morfología como se esperaba, y en las propiedades mecánicas como es el módulo de Young. En la Figura 5.15 se presentan imágenes de topografía y sus correspondientes mapas de elasticidad en cocos tratados (B) y sin tratar (A) con el antibiótico.

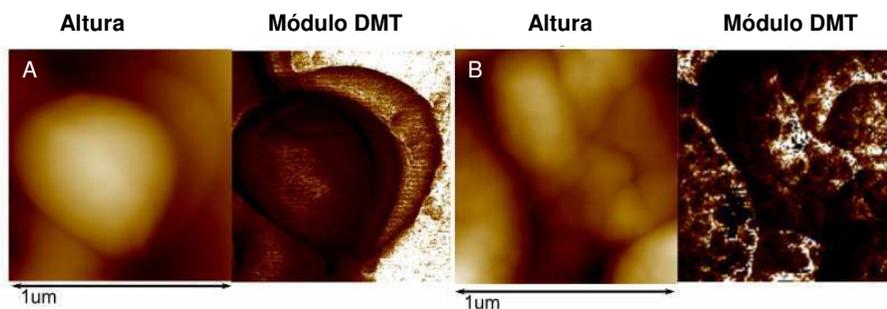


Figura 5.15. Tratamiento con ampicilina de bacterias *Staphylococcus aureus*. Imágenes de altura y mapa del módulo de Young DMT para *Staphylococcus aureus*, control (A) y tratadas con ampicilina (B).

Habiendo definido el tipo de sensores de fuerza y los parámetros de adquisición de los datos, se continuó con los experimentos en solución con células vivas, siempre usando el modo avanzado PF-QNM. Las mediciones se realizaron con las muestras de bacterias *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas aeruginosas* control (bacterias sin Ag⁺ ni NPs de Ag), y con las muestras tratadas con iones Ag⁺ y NPs de Ag. Para el análisis se consideraron los canales de topografía, deformación y elasticidad. En la Figura 5.16 se presentan las imágenes adquiridas con el modo PF-QNM para el tratamiento del *biofilm* con iones de Ag⁺ y NPs de Ag. Junto con las imágenes de elasticidad se muestra el histograma correspondiente, del cual se extrajo el valor del módulo de Young (ver Tabla 5.2). Se observa una disminución en la elasticidad celular en respuesta a los tratamientos con Ag en comparación a las bacterias control. Es interesante comparar entre los distintos tipos de bacteria, donde se encuentra que el valor medio del módulo de Young disminuye un 74% para *P. aeruginosas* tratadas con iones Ag con respecto al control. Para los cocos también hay una disminución del 45% para el tratamiento con iones Ag con respecto al control.

Muestra	Tratamiento	DMT Módulo			Deformación		
		N total	Media (MPa)	SE	N total	Media (nm)	SE
<i>P. aeruginosas</i>	Ctrl	12	6.8	1.5	12	26.1	1.7
<i>P. aeruginosas</i>	Ag ⁺	26	1.8	0.2	26	39.0	1.4
<i>S. aureus</i>	Ctrl	14	5.4	0.7	15	8.2	1.6
<i>S. aureus</i>	Ag ⁺	9	3.0	0.5	7	7.0	1.6

Tabla 5.2. Módulo DMT y Deformación para las bacterias tratadas con plata. Estos valores se obtuvieron a partir de los histogramas de las imágenes de Módulo DMT y de Deformación.

Se conoce que las paredes de las bacterias Gram (+) unen fácilmente iones, y la descripción del mecanismo es un tema de gran interés. Las propiedades mecánicas

de la pared de las bacterias están influenciadas por el grado de hidratación y por la presencia de medio de crecimiento residual¹⁵, por lo que para comparar los resultados con valores publicados es importante analizar las condiciones de los experimentos. Los valores promedio del módulo de Young para *Staphylococcus aureus* concuerdan con el rango de valores publicados en la literatura teniendo en cuenta la medición en células vivas con AFM y usando el modelo de Hertz, entre 1.8MPa a 95MPa¹⁶. No hay en la literatura mediciones con AFM para *Pseudomonas aeruginosas* pero sí para *Escherichia coli*, que también es un bacilo Gram (-). El rango en el módulo de Young informado va de 0.12MPa a 200MPa¹⁷.

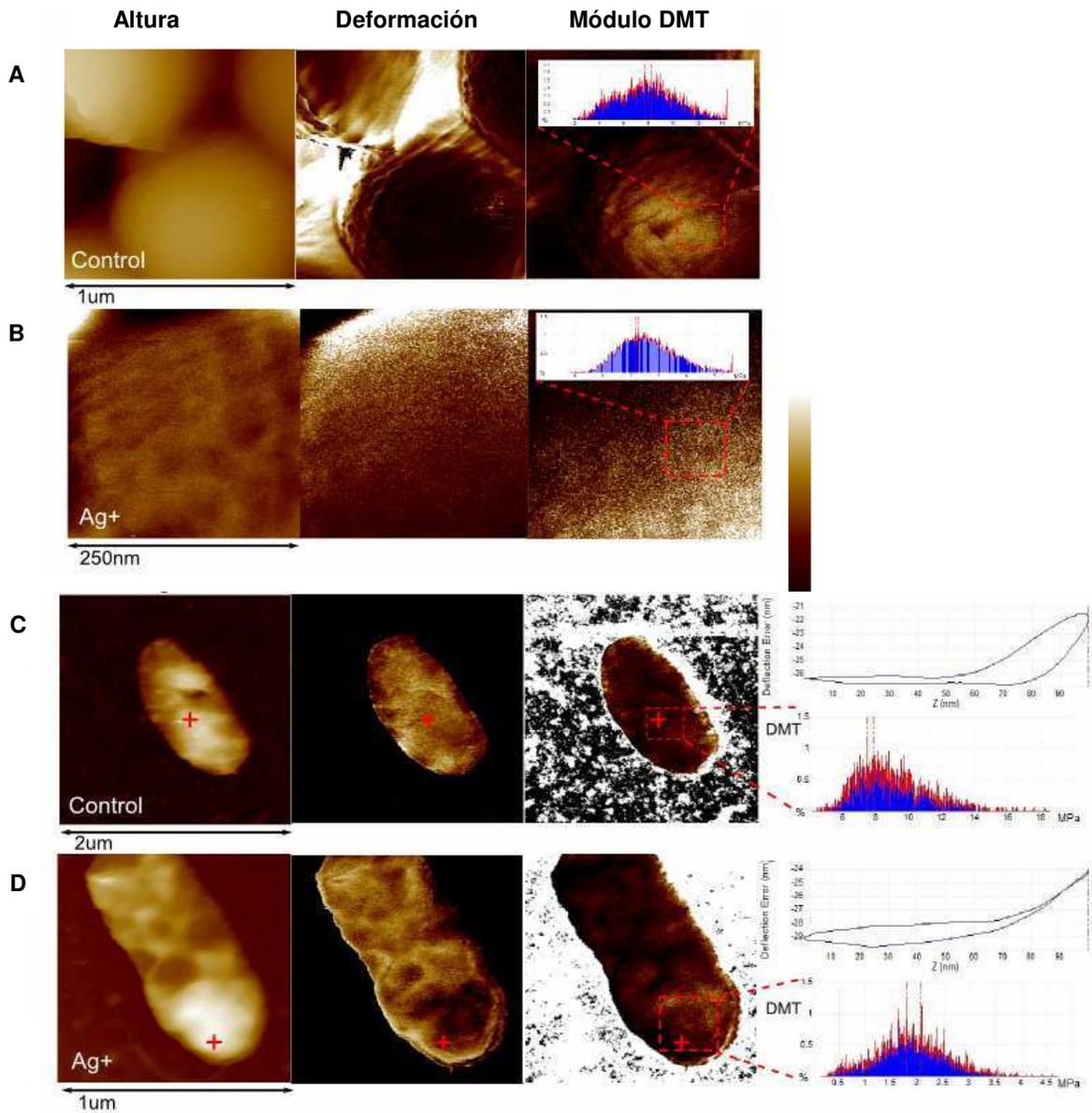


Figura 5.16. Topografía y mapas obtenidos para las distintas bacterias con el modo *PF-QNM*. (A) Altura, Deformación y Módulo de Young en PBS de *Staphylococcus aereus* para el control, y (B) para el

tratamiento con Ag+. (C) Canales de PF-QNM para *Pseudomonas aeruginosa* como control, y en (D) tratadas con Ag+. Curva de fuerza en función del desplazamiento del piezo del punto marcado (+) y en azul el histograma del Módulo DMT de cada región seleccionada.

Al tratar las bacterias con NPs de Ag se observó que la densidad de células adheridas al vidrio es más baja. En la Figura 5.17 se muestra imagen de la topografía y los mapas de deformación y módulo de Young para *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con las NPs de Ag. Para poner en evidencia la presencia de las NPs se puso en perspectiva la imagen de topografía. Debido a la diferencia en tamaño entre las NPs y la célula, se observa que las bacterias saturan en altura la escala de colores. De esta manera se distinguen las NPs sobre el sustrato de vidrio sin dificultad. El tamaño de las NPs coincide con los valores esperados, 30nm y 60nm. A nivel de la bacteria, se seleccionó una región y se tomaron en simultáneo la imagen de topografía y los mapas de módulo de Young, de deformación, y de adhesión como se ve en la Figura 5.17B-C. Es evidente la presencia de NPs sobre la superficie bacteriana cuya distribución no es homogénea.

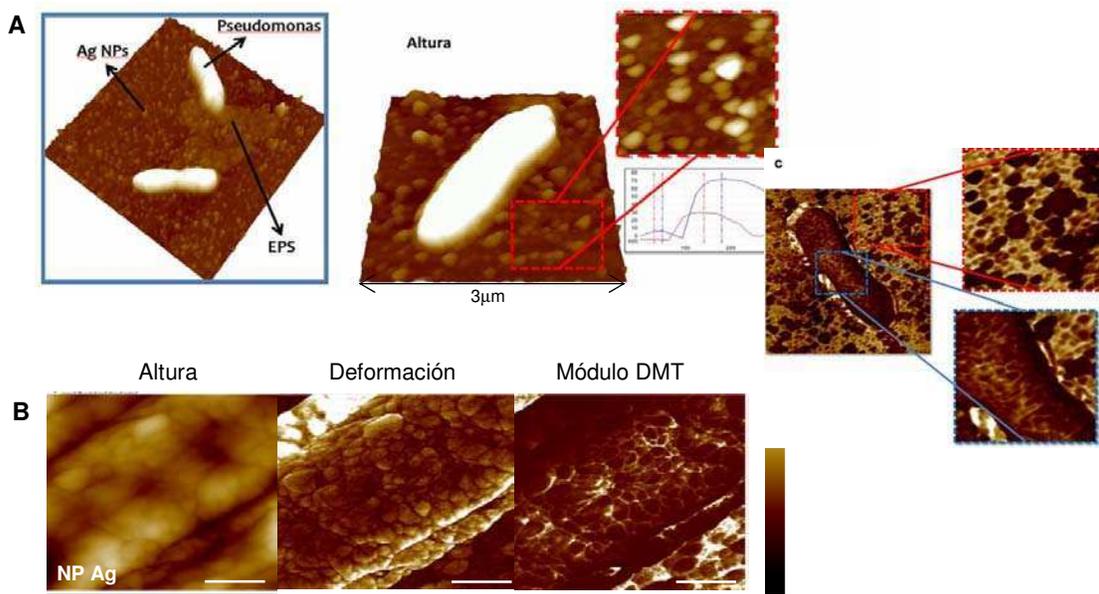


Figura 5.17. Bacterias tratadas con nanopartículas de plata. (A) Visualización 3D de la topografía de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con NPs de Ag. Ampliación de la imagen de las NPs de Ag presentes en el sustrato. El perfil de la imagen de altura muestra dos tamaños de NPs, 30nm y 60nm. (B) Región seleccionada sobre la bacteria en los canales de Altura, Deformación y Módulo, respectivamente. (C) Mapa de Adhesión de la bacteria y el sustrato de vidrio. Detalle del mapa en una región del vidrio donde se ven las NPs (recuadro rojo), y de una región sobre la bacteria (recuadro en azul). Barra de escala: 100 nm.

El valor promedio del módulo de Young varía en las distintas regiones de la superficie bacteriana analizada, de (2.4 ± 0.7) MPa a (9.2 ± 2.8) MPa, que se acompaña con una disminución en los valores de deformación. Para las bacterias Gram (+), es decir para *Staphylococcus aureus* tratadas con NPs de Ag no se pudieron obtener los mapas de las propiedades mecánicas en las condiciones experimentales que probamos. No hay informados, en nuestro conocimiento, tratamientos con iones o nanopartículas de Ag para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosas*.

5.4. Conclusiones

La implementación de la técnica avanzada de espectroscopía de fuerza (*Peak Force QNM*) en las muestras de complejidad creciente: los sustratos poliméricos termo-responsivos, los sistemas nanoestructurados de copolímeros de bloque reforzados con nanotubos, y *biofilms* de bacterias; resultó de gran importancia en el marco de esta Tesis para abordar el estudio de propiedades mecánicas tanto de las células vivas como de los sustratos deformables desarrollados para su cultivo (Capítulo 8).

5.5. Referencias

¹ Plodinec, M., Loparic, M., Monnier, C. A., Obermann, E. C., Zanetti-Dallenbach, R., Oertle, P., Hyotyla, J. T., Aebi, U., Bentires-Alj, M., Lim, R. Y., Schoenenberger, C. A., "The nanomechanical signature of breast cancer", *Nature Nanotechnology*, 2012, **7**: 757-765.

² Engler, A. G., Sen S., Sweeney H. L., Discher D. E., "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification", *Cell*, 2006, **126**: 667-689.

³ Rotsch, C., Radmacher, M., "Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study", *Biophys J.*, 2000, **781**: 520-535;

Almqvist, N., Bhatia, R., Primbs, G., Desai Banerjee, S., Lal, R., "Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties", *Biophysical Journal*, 2004, **86**: 1753-1762.

⁴ Pelah, A., Ludueña, S. L., Jares-Erijman, E. A., Szleifer, I., Pietrasanta, L. I., Jovin, T. M., "Nanoscale memory provided by thermoreversible stochastically structured polymer aggregates on mica.", *Langmuir*, 2006, **22(23)**: 9682-9686.

⁵ Saxena, S., Spears, M. W. Jr., Yoshida, H., Gaulding, J. C., García, A. J., Lyon, L. A., "Microgel film dynamics modulate cell adhesion behavior", *Soft Matter*, 2014, **10 (9)**:1356-64.

⁶ Schmidt, S., Zeiser, M., Hellweg, T., Duschl, C., Fery, A., Möhwald, H., "Adhesion and Mechanical Properties of PNIPAM Microgel films and their potencial use as switchable cell culture substrates", *Advances functional materials*, 2010, **20**: 3235-3243.

- ⁷ Garate, H., Bianchi, M., Pietrasanta, L. I., D'Accorso, N. B., Goyanes, S., "Carbon nanotube reinforced epoxy-block copolymer nanostructured coatings: Tribological, electrical and mechanical properties", *Resumen extendido presentado en COMAT*, 2015.
- ⁸ Garate, H., Fascio, M. L., Mondragon, I., D'Accorso, N. B., Goyanes, S., "Surfactant-aided dispersion of polystyrene-functionalized carbon nanotubes in a nanostructured poly(styrene-b-isoprene-b-styrene) block copolymer", *Polymer*, 2011, **52**: 2214-2220.
- ⁹ Garate, H., Mondragon, I., D'Accorso, N., Goyanes, S., "Exploring Microphase Separation Behavior of Epoxidized Poly(styrene-b-isoprene-b-styrene) Block Copolymer Inside Thin Epoxy Coatings", *Macromolecules*, 2013, **46(6)**: 2182–2187.
- ¹⁰ Garate, H., Mondragon, I., Goyanes, S., D'Accorso, N.B., "Controlled Epoxidation of Poly(styrene-b-isoprene-b-styrene) Block", *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 2011, **49**: 4505-4513.
- ¹¹ Arnoldi, M., Fritz, M., Bauerlein, E., Radmacher, M., Sackmann, E., Boulbitch, A., "Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy", *Physical Review E. V.*, 2000, **62**: 1034-1044.
- ¹² Yang, X., Yang, W., Wang, Q., Li, H., Wang, K., Yang, L., Liu, W., "Atomic force microscopy investigation of the characteristic effects of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*.", *Talanta*, 2010, **81**: 1508–1512
- ³ Pittenger, B., Erina, N., Su, C., "Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM", *Bruker Application Note #128*, 2011.
- ⁴ Frank, A. J., Cathcart, N., Kenneth, E. M., Kitaev, V., "Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: A first year undergraduated experiment exploring plasmonic nanoparticles", *Journal of Chemical Education*, 2010, **87(10)**: 1089-1101
- ¹⁵ Thwaites, J. J., Mendelson, N. H., "Mechanical properties of peptidoglycan as determined from bacterial thread", *Int. J. Biol. Macromol*, 1989, **11**:201-206.
- ¹⁶ Francius, G., Domenech, O., Mingeot-Leclercq, M. P., Dufrene, Y. F., "Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin", *J Bacteriol*, 2008, **190**: 7904–7909;
- Eaton, P., Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E., Malcata, F. X., "Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*", *Ultramicroscopy*, 2008, **108**: 1128–1134;
- Yun, C., Norde, W., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., "Bacterial cell surface deformation under external loading", *mBio*, 2012, **3(6)**:e00378-12.
- ¹⁷ Cerf, A., Cau, J.-C., Vieu, C., Dague, E., "Nanomechanical properties of dead or alive single-patterned bacteria", *Langmuir*, 2009, **25**: 5731–5736;
- Chen, Y.-Y., Wu, C.-C., Hsu, J.-L., Peng, H.-L., Chang, H.-Y., Yew, T.-R., "Surface rigidity change of *Escherichia coli* after filamentous bacteriophage infection", *Langmuir*, 2009, **25**: 4607–4614.

**6. Dinámica molecular de las adhesiones
focales en equilibrio mecánico: sustrato
no deformable**

6. Dinámica molecular de las adhesiones focales en equilibrio mecánico: sustrato no deformable

Los experimentos de este trabajo de Tesis se realizaron en la línea celular HC11, células de epitelio mamario de ratón. Las células fueron cultivadas sobre distintos sustratos modificados con fibronectina: cubreobjetos de vidrio (en el presente capítulo), membranas de silicona (capítulo 7) geles de poliacrilamida (capítulo 8). En este capítulo se evaluará la expresión y distribución de proteínas componentes de las adhesiones focales, así también como su dinámica mediante la determinación de los parámetros cinéticos/dinámicos moleculares que definirán la base para los experimentos en los capítulos siguientes.

6.1 Expresión y visualización de las proteínas de las adhesiones focales en células HC11

Para la transfección de los distintos plásmidos de fusión correspondientes a las proteínas adhesivas en estudio utilizamos lipofectamina. La observación de la expresión de las proteínas fluorescentes en células vivas y las mediciones se hicieron en un microscopio confocal de la firma Olympus, modelo FV1000 espectral que está equipado con una platina motorizada y cuenta con una cámara ambiental para la observación de células vivas.

La expresión individual o de pares de las distintas construcciones se evaluó por microscopía confocal. En la Figura 6.1 se presenta un resumen de imágenes confocales de células HC11 co-transfectadas para diferentes pares de proteínas: paxilina-mCherry + β 3 integrina-EGFP; paxilina-mCherry + vinculina-EGFP; lifeact-mCherry + paxilina-EGFP; paxilina-mCherry + FAK-EGFP, y paxilina-mCherry + zixina-EGFP. Es evidente la localización de las proteínas constitutivas de la adhesión focal como β 3 integrina, paxilina, vinculina, zixina en regiones alargadas distribuidas principalmente en la periferia de las células HC11. También observamos claramente la organización de las fibras de actina con el marcador Lifeact, un péptido de 17 residuos aminoacídicos que deriva de una proteína encontrada en levaduras y permite visualizar actina en células vivas. Es interesante ver el recorrido de los filamentos de actina que se extienden a través del citoplasma, y en la periferia de la célula los extremos co-localizan con paxilina, por ejemplo.

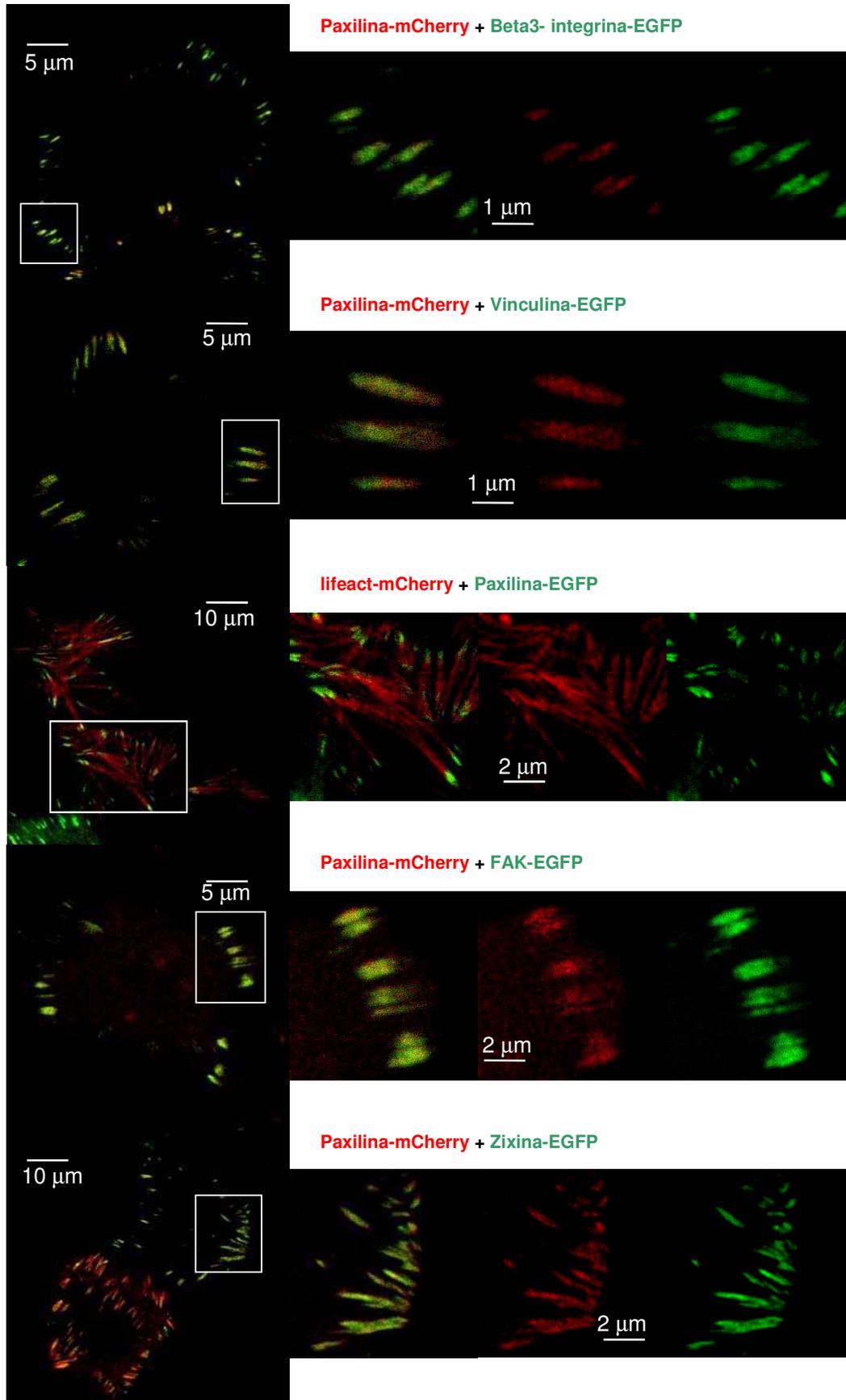


Figura 6.1- Expresión de proteínas de adhesión focal en células HC11. Imágenes confocales obtenidas en el microscopio FV1000 espectral con una lente objetivo de inmersión en aceite 60X y apertura numérica 1.35. En la columna de la izquierda se presenta la célula observada con las regiones de interés seleccionadas y amplificadas en las siguientes columnas (superposición de canales, canal rojo y canal verde).

6.2 Cinética de disociación de la proteína zixina mediante la recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP)

Uno de los objetivos de esta Tesis es evaluar cómo las fuerzas mecánicas afectan la unión y disociación de las proteínas componentes del *adhesoma*, por lo que modularían la composición, la arquitectura molecular y, eventualmente, su función. El primer paso en la descripción de este objetivo es determinar la cinética molecular de la proteína zixina en las células HC11 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio modificados con fibronectina mediante FRAP¹. La proteína zixina, como mencioné anteriormente, es una de las proteínas que se consideran mecanosensoras dentro del *adhesoma*. Analizaremos los parámetros cinéticos moleculares con y sin el tratamiento de las células con un inhibidor de las fuerzas generadas a nivel del citoesqueleto (inhibidor Y-27632 de la enzima Rho-quinasa). Estos estudios se extenderán en los siguientes capítulos a estímulos mecánicos externos basados en el cultivo de las células sobre membranas de silicona (capítulo 7) y en geles de poliacrilamida (capítulo 8).

6.2.1 Implementación del experimento de FRAP

La técnica FRAP consiste en fotoblanquear una *región pequeña dentro de una AF* y luego adquirir imágenes para monitorear la recuperación de la intensidad de la fluorescencia en la región fotoblanqueada. El análisis de la curva de recuperación de la fluorescencia en función del tiempo permite obtener parámetros cinéticos de la proteína en estudio, mediante el ajuste con el modelo para las AF (descrito previamente en la sección 3.2), la constante cinética de disociación (k_{off}) y la fracción móvil (m). El ajuste se realizó mediante una rutina desarrollada en *Matlab*.

Los experimentos de FRAP se realizaron en células HC11 vivas cultivadas sobre cubreobjetos, recubiertos con FN, y transfectadas con zixina-EGFP en el microscopio confocal FV1000 a 37°C. Se utilizó la línea 488 del láser de Argón, el rango de adquisición fue [500-600]nm y la apertura confocal de 120µm. La lente objetivo 63X con una apertura numérica de 1.2 diseñada para inmersión en agua y con collar ajustado por el espesor del cubreobjetos en 0.17mm. Para adquirir las imágenes

se utilizó la herramienta *Time Controller*, del programa *FluoView*, que permite automatizar la medición configurando los pasos del experimento (Figura 6.2). Con el fin de cuantificar la intensidad de fluorescencia inicial (I_{PRE}) se adquirieron 5-10 imágenes antes de fotoblanquear la zona de la AF elegida. Luego se seleccionó la región de interés (ROI) para hacer el experimento de FRAP, y se procedió a fotoblanquear la ROI aplicando un pulso con la línea 488nm del láser de Argón, a 100% de potencia y 200ms de duración. El pulso debería durar el tiempo suficiente para blanquear el fluoróforo en > 90 %, pero se necesita además que sea lo suficientemente corto con respecto a los tiempos del proceso estudiado. Una manera de corroborar que la intensidad ha disminuido lo suficiente es compararla con la intensidad presente en el citoplasma. Por último, se adquirieron imágenes para seguir la evolución de la recuperación. La recuperación se detectó adquiriendo dos series de imágenes sucesivas de la ROI: la primera se realizó con un tiempo de adquisición más corto, 30 imágenes cada 3 segundos, mientras que la segunda se adquirió con un intervalo temporal mayor, 50 imágenes cada 5 segundos, ya que se espera la estabilización de la señal. Las potencias utilizadas estuvieron entre (0.1-0.3)%.

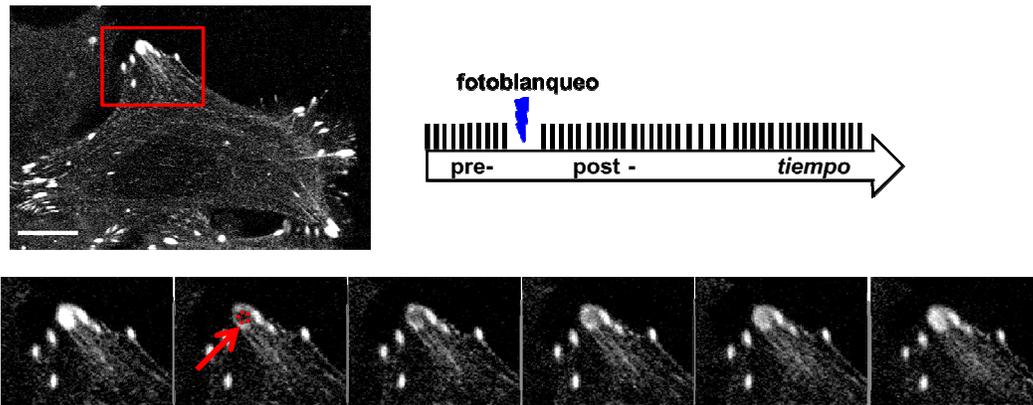


Figura 6.2. Protocolo del experimento de FRAP. Imagen confocal de células HC11 expresando la proteína zixina-EGFP. Barra de escala = 10 μ m. Se selecciona un área de la célula con adhesiones focales donde se realizará la medición de FRAP (recuadro rojo). El protocolo consiste en adquirir varias imágenes antes del fotoblanqueo (*pre-fotoblanqueo*), luego se elige una región de interés (ROI) cuyo tamaño es menor a una de las AFs y se aplica un pulso con la línea 488nm del láser de Argón (100% de potencia y 200ms de duración) (*fotoblanqueo*). A continuación se adquieren imágenes sucesivas de la ROI en función del tiempo (*post-fotoblanqueo*) hasta llegar al estado estacionario. En el panel inferior se presenta una secuencia temporal de imágenes obtenidas con el protocolo de FRAP para la proteína zixina-EGFP. La flecha roja indica la ROI fotoblanqueada en la AF seleccionada, región en la que en imágenes sucesivas posteriores al fotoblanqueo se observa un incremento en la intensidad de la fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia en función del tiempo ($I(t)$) se debe corregir considerando la intensidad de la señal de fondo o *background* (I_{fondo}), para esto se mide la señal de una región fuera de la célula, y este valor se resta a todas las imágenes de FRAP. Por otra parte, coleccionar imágenes sucesivas genera que los fluoróforos sufran fotoblanqueo por adquisición. Para corregirlo se selecciona una AF control, diferente a la AF donde se realiza el fotoblanqueo para FRAP, y se registra la evolución de la señal que varía debido al fotoblanqueo por adquisición ($I_{control}$). Luego se modifica la señal a analizar dividiendo por la intensidad de la AF control Ec. 6.1 con la correspondiente corrección debida a la intensidad de fondo,

$$I_{FRAP}(t) = \frac{I(t) - I_{fondo}}{I_{control}(t) - I_{fondo}} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

de esta forma se considera el fotoblanqueo por adquisición.

Las imágenes elegidas para el análisis quedan sujetas a estas correcciones, ya que deben contener varias AFs y una zona sin células para poder medir la señal de fondo.

De esta manera se utiliza la intensidad de FRAP corregida para calcular la curva de recuperación

$$F(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{pre} - I_0} \quad (\text{Ec. 6.2})$$

Para monitorear la recuperación se deben alinear las imágenes, para esto se empleó el *plugin Template Matching* del programa *Fiji*, usando el método *Normalized cross correlation*. Esta herramienta solicita seleccionar la región de interés, en este caso la ROI, para calcular en cada píxel el coeficiente de correlación cruzada normalizada (NCCC) respecto de los píxeles de las diferentes imágenes de la secuencia adquirida. Si la intensidad de los píxeles coincide, la correlación cruzada normalizada asigna un valor +1, si la imagen es el negativo -1, mientras que para píxeles diferentes da 0. De esta forma se construye una plantilla de la región de interés que luego se utilizará para buscar sobre las imágenes que se desean alinear los objetos que coinciden con la plantilla.

El análisis de las imágenes se realizó mediante una rutina desarrollada en *Matlab*, que por un lado calcula la curva de recuperación considerando las correcciones de la intensidad de fluorescencia, y por otro realiza el ajuste de las curvas de recuperación por el modelo de *Lele* (Ec. 3.16) obteniendo los valores biológicos relevantes, k_{off} y m . A partir de la constante de velocidad se calcularon el tiempo medio $t_{1/2} = -\ln(0.5) / k_{off}$, y el tiempo de residencia como $1/k_{off}$.

6.2.2 Determinación de la constante de disociación de la proteína zixina en células HC11

La Figura 6.3.A presenta una célula HC11 expresando en las adhesiones focales zixina-EGFP en la periferia de la células. El recuadro rojo indica el conjunto de AFs donde se realizó el experimento de FRAP. Las regiones de interés, es decir los ROIs seleccionados se destacan en la Figura 6.3.B: ROI para el experimento (1), y para hacer las correcciones de la intensidad, ROI en la AF control (2), en el citoplasma (4) y la zona exterior a la célula o fondo (3). También se realizó un mapa de intensidad de fluorescencia promedio del área de la célula seleccionada para todo el experimento (Figura 6.2.C). La evolución de la intensidad de fluorescencia para cada una de las regiones mencionadas (1-4) se muestran en el panel D. Se observa la caída abrupta en la intensidad de la fluorescencia como consecuencia del fotoblanqueo en la ROI 1 (curva roja), valor que cae en un 95% con respecto a la intensidad basal medida en el citoplasma. A continuación de esta caída, se ve un aumento gradual de la intensidad de la fluorescencia. Para evaluar cuantitativamente la recuperación de la señal, se construyó la curva de recuperación empleando la ecuación 6.2, y se realizó el ajuste para obtener los parámetros k_{off} y m . (Figura 6.3.E). FRAP es fuertemente dependiente de los modelos usados para ajustar datos experimentales. En este caso se asumió que la recuperación de la fluorescencia está dominada por la reacción de disociación de la proteína a la adhesión focal o que la difusión de las proteínas libres (no asociadas a la adhesión focal) es despreciable. Esta hipótesis de trabajo es razonable teniendo en cuenta que el área del fotoblanqueo es pequeña. En efecto, se corroboró experimentalmente que la recuperación de las proteínas de adhesión focal en el citoplasma es despreciable.

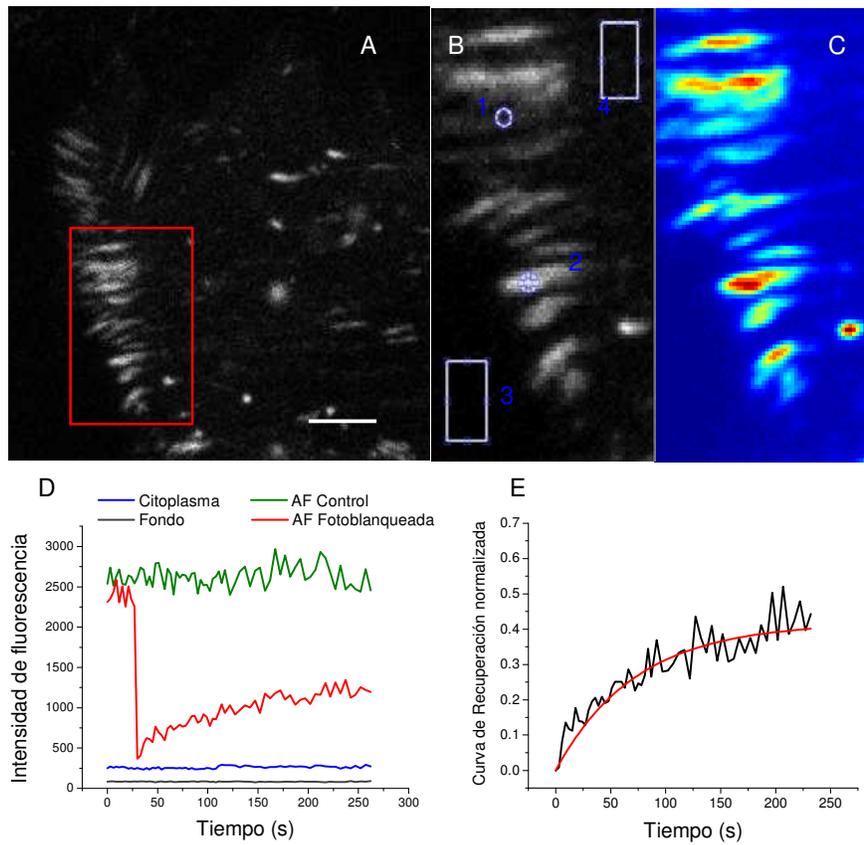


Figura 6.3. Experimento representativo de FRAP. (A) Imagen confocal de fluorescencia de una célula HC11 transfectada y expresando zixina-EGFP (512x512 pixeles, 20 μ s/pixel). Barra de escala = 10 μ m. (B) Ampliación de la zona seleccionada, en azul se marcan las regiones utilizadas para las correcciones de la fluorescencia: ROI 1 para FRAP, ROI 2 como control, ROI 3 para fondo y ROI 4 en citoplasma. (C) Mapa de la intensidad promedio. (D) Intensidad de fluorescencia en función el tiempo para las diferentes regiones de interés consideradas. (E) Curva de recuperación de la intensidad de la fluorescencia normalizada (negro) junto al ajuste (rojo). Los parámetros hallados son: $m=0.42\pm0.03$ y $k_{off} = (0.015\pm0.003)s^{-1}$.

El análisis de 12 adhesiones focales correspondientes a 8 células da un valor promedio de $m=0.41\pm0.04$ y $k_{off} = (0.016\pm0.001)s^{-1}$ para la proteína zixina en células HC11 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina. Para evaluar si los parámetros cinéticos obtenidos son mecano-dependientes en esta línea celular, se realizó un tratamiento químico con el inhibidor Y-27632, el cual disipa la tensión del citoesqueleto².

En una serie de experimentos siguiente en células cultivadas sobre vidrio modificado por fibronectina, que expresan la proteína quimera zixina-EGFP, se hizo la medición de recuperación de la intensidad de la fluorescencia tras el fotoblanqueo en ausencia del inhibidor (tiempo cero). Luego se aplicó el tratamiento con Y-27632, a

una concentración $10\mu\text{M}$ y se realizaron los experimentos de FRAP a 3 y a 14 minutos. Para poder adquirir curvas de recuperación con este intervalo temporal fue indispensable elegir un área de la célula con por lo menos 4 AFs vecinas dentro del área de observación. Un ejemplo de los resultados se resume en la Figura 6.4. En el panel A se observa la imagen confocal de la célula HC11 elegida, a la cual se le aplicó el tratamiento y luego se realizaron los experimentos de FRAP en la región seleccionada (B). En el panel D se comparan las curvas de recuperación normalizadas, para el instante $t=0\text{min}$ (previo al tratamiento, curva negra) y para los tiempos 3min y 14min (curvas roja y azul, respectivamente) luego de aplicar el inhibidor, junto con los ajustes correspondientes. Las curvas presentan un cambio en su curvatura describiendo una recuperación más veloz para tiempos de exposición mayores.

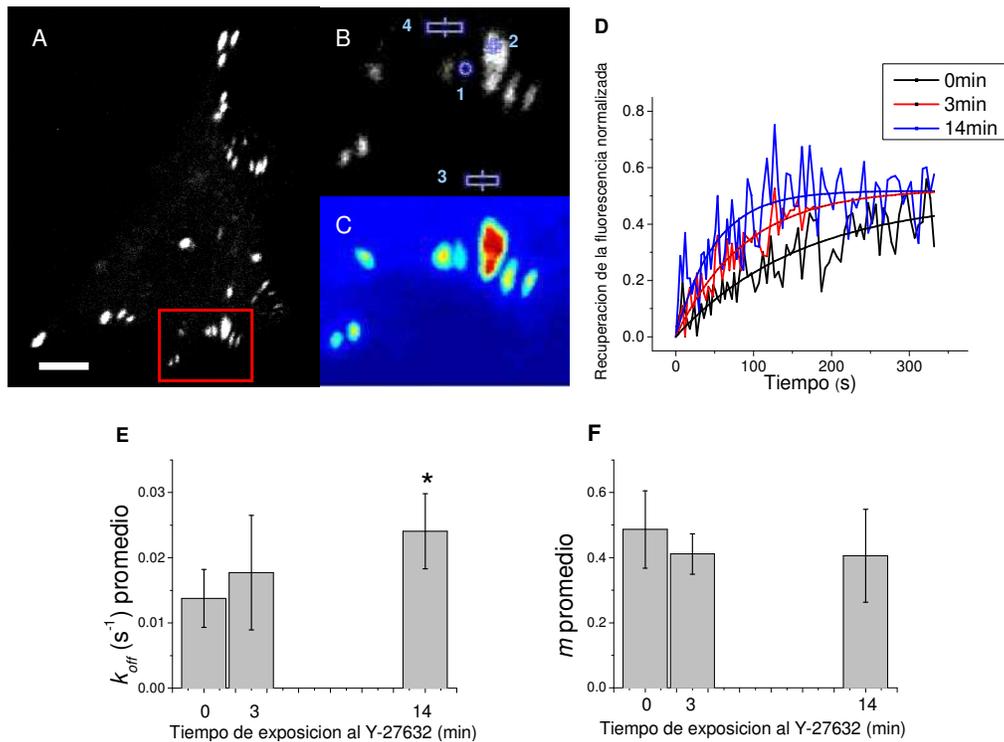


Figura 6.4. Experimentos de FRAP siguiendo al tratamiento con Y-27632. (A) Imagen de fluorescencia de una célula HC11 transfectada con zixina-EGFP. El recuadro rojo indica la región donde se eligieron las AF para el experimento de FRAP. (B) Imagen de fluorescencia luego del fotoblanqueo donde se indican las regiones utilizadas en el análisis; 1) AF seleccionada para realizar el FRAP, 2) AF control, 3) región elegida para estimar el fondo o *background*, y 4) zona en el citoplasma. (C) Imagen promedio de la secuencia completa de FRAP. (D) Curvas de recuperación de la fluorescencia de la zixina sin inhibidor (control, negro) y para células tratadas con Y-27632 para 3min (rojo) y 14min (azul) de exposición, junto con el ajuste correspondiente al modelo de FRAP utilizado para las AFs. (E, F) Valores

promedios de k_{off} y m en función del tiempo de exposición al Y-27632 (las barras de error indican el SEM) (N=6, N=3, N=2; para los tiempos 0, 3 y 14 min). Test de Mann-Whitney *p=0.012 respecto del t=0.

Repitiendo el experimento para distintas células se confeccionó el promedio de los parámetros en función del tiempo de exposición al inhibidor (Figura 6.4, paneles E y F). El resultado general fue un aumento de la constante de disociación de la zixina a la AF donde se ve una variación significativa entre el valor hallado a los 14min de exposición respecto de la configuración inicial, mientras que el valor de la fracción móvil permaneció constante. Las células tratadas presentaron una rápida recuperación de la fluorescencia en la región fotoblanqueada con respecto a las células que no fueron tratadas con el inhibidor.

$t_{1/2}$ (s)		k_{off} (1/s)		m		t_r (s)		tipo celular
control	Y27632	control	Y27632	control	Y27632	control	Y27632	
7.09 ± 0.43	3.75 ± 0.42	0.10 ± 0.01	0.25 ± 0.04	-	-	10.00 ± 1.10	-	células de endotelio capilar ³
0.50	0.80	0.72	0.75	0.95	0.72	-	-	células HeLa ⁴
7	-	-	-	0.8	-	-	-	células fibroblastos embrionarios ⁵
-	-	0.35 ± 0.03	0.18 ± 0.01	-	-	-	-	*células HeLa ⁶
43.32 ± 2.71	28.79 ± 6.88	0.016 ± 0.003	0.024 ± 0.006	0.41 ± 0.04	0.51 ± 0.09	62.50 ± 3.91	41.54 ± 9.92	células HC11

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos medidos para zixina usando FRAP. En la última fila de la tabla se presentan los valores obtenidos en este trabajo de Tesis (última fila) y se comparan con los encontrados en la literatura para $t_{1/2}$, k_{off} , t_r y m en distintas líneas celulares. * En el experimento utilizaron el reactivo blebbistatina que interfiere con la actividad ATPasa de la miosina II-actina dependiente.

Los tiempos de recuperación rápida encontrados, en valores menores al minuto, están en un orden de magnitud menor a lo que necesitan las adhesiones focales para desensamblarse en respuesta a químicos que afectan el citoesqueleto (15 a 30 minutos). Nuestros resultados indican que cuando inducimos químicamente el estado de relajación del citoesqueleto con el inhibidor Y-27632, la recuperación de la fluorescencia es más rápida en la ROI fotoblanqueada en relación a las células control. El valor promedio del k_{off} para zixina aumenta cerca de 1.5 veces con el tratamiento químico, mientras que la fracción móvil aumenta 1.2 veces. Para el tratamiento con el inhibidor Y-27632 y la proteína zixina, encontramos en la literatura que los valores para k_{off} aumentan en presencia del inhibidor, y son de un orden de magnitud mayores para distintos tipos celulares en experimentos realizados en diferentes laboratorios. Es interesante observar que cuando se utiliza otra droga que

reduce la tensión del citoesqueleto como es la blebbistatina, el efecto sobre la constante de disociación para zixina es opuesto y el valor se reduce en células HeLa⁶.

Con esta serie de experimentos encontramos que la proteína adhesiva zixina en la línea HC11 es capaz de *sensar* y responder a fuerzas mecánicas. Al alterar la tensión en el citoesqueleto, la velocidad a la cual la proteína zixina se disocia de las adhesiones focales aumenta. En los siguientes capítulos evaluaremos si efectos similares sobre las constantes de disociación de la proteína zixina podrían ser disparados por señales/estímulos externos. En esta dirección es que cultivaremos las células HC11 sobre sustratos deformables como membranas de silicona (capítulo 7) y geles de poliacrilamida (capítulo 8), en ambos casos recubiertos con la proteína de matriz extracelular, fibronectina.

6.3 Coeficientes de difusión efectivos de las proteínas de las adhesiones focales en células vivas por espectroscopía de correlación de fluorescencia

Aplicando la técnica de FCS en células vivas cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio modificado con fibronectina, se analizaron los coeficientes de difusión de diferentes proteínas de las AFs. Se estudió la interacción de los pares de proteínas de la adhesión focal EGFP-vinculina/mCherry-Paxilina y EGFP-FAK/mCherry-Paxilina mediante FCCS.

6.3.1 Implementación del experimento de FCS

El procedimiento para construir una curva de auto-correlación consiste en medir la intensidad de fluorescencia para un punto, en este caso dentro de una AF, en función del tiempo. Calcular las fluctuaciones de la fluorescencia, $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$, y finalmente la función de auto-correlación definida por la siguiente ecuación definida en el capítulo 3 (Ec. 3.2)

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (\text{Ec. 6.3})$$

Luego para obtener los parámetros de interés, como ser el coeficiente de difusión, es necesario aplicar el ajuste de un modelo que describa el comportamiento medido. En la Figura 6.5 se ejemplifica un experimento de *point FCS*, para una célula transfectada con zixina-EGFP, donde el modelo empleado fue el de una componente (Ec. 3.19 del capítulo 3).

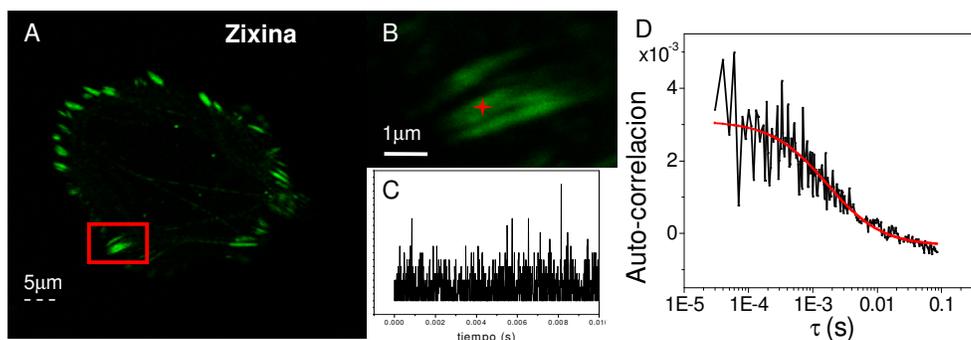


Figura 6.5: Experimento representativo de FCS. (A) Imagen confocal de una célula HC11 expresando Zixina-EGFP. (B) Selección de la AF. (C) Fluctuaciones de la fluorescencia en función del tiempo para un punto en la AF. (D) Función de auto-correlación para zixina-GFP de una AF (negro), y su ajuste (curva roja) por el modelo de una componente Ec. 3.19 del capítulo 3.

Para estimar coeficientes de difusión a partir del análisis de FCS es necesario conocer los parámetros geométricos del volumen de detección confocal. Para ello se debe realizar una calibración que consiste en realizar un experimento de *point* FCS de difusión libre con una muestra de coeficiente de difusión (D) conocido. Al trabajar con una sustancia de la cual se conoce su coeficiente de difusión se pueden hallar las cinturas radial y axial (ω_r y ω_z , respectivamente) para calcular el volumen de detección.

La calibración se realizó con una solución de fluoresceína (*FITC*) cuya concentración y coeficiente de difusión eran conocidos. Se eligió trabajar con la fluoresceína debido a que posee un espectro de fluorescencia similar al de la proteína fluorescente GFP que se empleó para hacer la transfección.

El procedimiento experimental de la calibración consiste en colocar una gota de aproximadamente 50 μl de una solución 100 nM de fluoresceína en borato de sodio, pH 8,8, sobre un cubreobjeto y luego se coloca en el microscopio confocal espectral *FV1000*, empleando un objetivo 60x AN 1,35 inmersión en aceite (UPlanSapo). Si bien los detectores son fotomultiplicadores, el sistema cuenta con un modo para *pseudo* contar fotones que es el utilizado en esta serie de experimentos. Se empleó la línea 488 del láser de Argón para excitar la muestra y se recolectó la fluorescencia en el rango de [500–540] nm. La apertura confocal empleada fue 115 μm. En estas condiciones se realizaron experimentos de *point*FCS, colectando la señal de fluorescencia en un punto fijo a unos 20 μm del cubreobjetos, a una frecuencia de 50 kHz durante aproximadamente 160 s. Finalmente se determinaron los parámetros geométricos del volumen de detección, ω_r y ω_z , mediante el ajuste de la curva de auto-

correlación por el modelo de difusión libre (Ec. 3.18 del capítulo 3) fijando el coeficiente de difusión de la fluoresceína en $D = 300\mu\text{m}^2/\text{s}$. Estos ajustes se realizaron utilizando el software *SimFCS* (*Laboratory of Fluorescence Dynamics, University of California, Irvine, CA*). La calibración se realizó antes de cada medición, los valores obtenidos estuvieron alrededor de $\omega_r \sim 250\text{nm}$ y $\omega_z \sim 1.25\mu\text{m}$.

6.3.2. Determinación de la dinámica de distintas proteínas de adhesión focal

Se realizaron experimentos de *pointFCS* en células HC11 que expresaban la proteína quimera vinculina-EGFP. Como se vio anteriormente, la proteína vinculina se localiza mayoritariamente en las adhesiones focales, pero también se encuentra difundiendo en el citoplasma. Se realizaron experimentos de *point FCS* seleccionando regiones tanto en AF como en citoplasma. Para cada región se realizaron 5 experimentos, para cada uno se confeccionó la curva de auto-correlación y luego se promediaron, obteniendo la curva de auto-correlación promedio tanto para citoplasma como para AF. Estas curvas fueron ajustadas por modelos de una o de dos componentes (Ec.3.19, capítulo3). En los gráficos de la Figura 6.6 se muestran las curvas de auto-correlación promedio junto con los diferentes ajustes y sus correspondientes residuos. El cálculo de las auto-correlaciones promedios y los ajustes de las mismas se realizaron con una rutina escrita en *Matlab*. Los valores de los ajustes se encuentran en la Tabla 6.2.

Como se observa en la Figura 6.6, los datos de auto-correlación correspondientes a la región del citoplasma, no se ajustan bien por un modelo de una componente difusiva, esto podría indicar que la proteína vinculina está sujeta a más de un proceso dinámico. El ajuste de dos componentes, indicaría la presencia de al menos dos tiempos característicos, uno más rápido asociado a un coeficiente de difusión de $D = 44\mu\text{m}^2/\text{s}$ que podría corresponder a la difusión de la proteína (libre o en complejos) en el citoplasma, y otro más lento ($D = 4\mu\text{m}^2/\text{s}$) que se podría relacionar con procesos de asociación y disociación de la vinculina a la AF. El ajuste de la curva de auto-correlación asociada a regiones de la AF, por los modelos de una y de dos componentes, resultó similar. En la Tabla 6.2 se pueden comparar el valor del coeficiente D obtenido del ajuste de una componente ($D = 18.8\mu\text{m}^2/\text{s}$) con la componente rápida del ajuste de dos componentes ($D = 16\mu\text{m}^2/\text{s}$) donde las diferencias están contempladas en el rango de error.

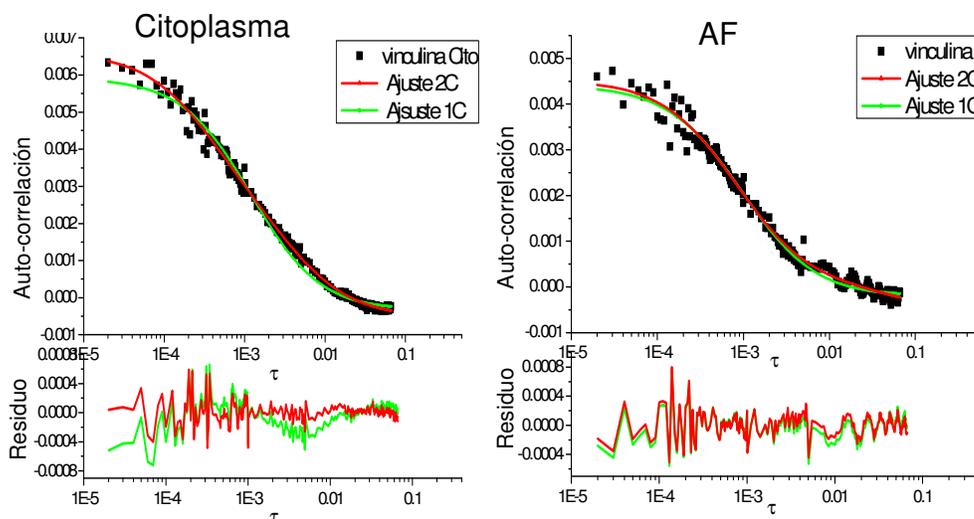


Figura 6.6: Curvas de auto-correlación promedio para vinculina-EGFP expresadas en células HC11.

Curvas obtenidas de experimentos de *pointFCS* realizadas en el citoplasma (A) y en la AF (B). En línea continua roja se muestra el ajuste de los datos mediante un modelo de dos componentes, y en verde el ajuste por un componente. Los residuos correspondientes a cada ajuste se muestran en el panel inferior siguiendo el mismo código de colores.

Vinculina	N	D1, $\mu\text{m}^2/\text{s}$	G _{o1}	D2, $\mu\text{m}^2/\text{s}$	G _{o2}
Citoplasma	5	12.8 ± 2.3	0.00622 ± 0.00030	-	-
AF	5	16.06 ± 0.97	0.00460 ± 0.00008	-	-
Citoplasma	5	44 ± 13	0.00385 ± 0.00058	4.1 ± 1.2	0.00324 ± 0.00064
AF	5	18.8 ± 2.1	0.00447 ± 0.00015	0.21 ± 0.63	0.00066 ± 0.00091

Tabla 6.2. Resultados de experimentos de *pointFCS* para vinculina. Parámetros obtenidos del ajuste del modelo de una y de dos componentes para la auto-correlación promedio de vinculina medida en el citoplasma y en la AF.

Los experimentos de *pointFCS* se extendieron a otras proteínas componentes de las AFs. La Figura 6.7 muestra las curvas promedio para paxilina, FAK, zixina y vinculina. Se utilizaron los modelos de una y de dos componentes para ajustar los datos experimentales. Los parámetros obtenidos para las diferentes proteínas de la AF se presentan en la Tabla 6.3.

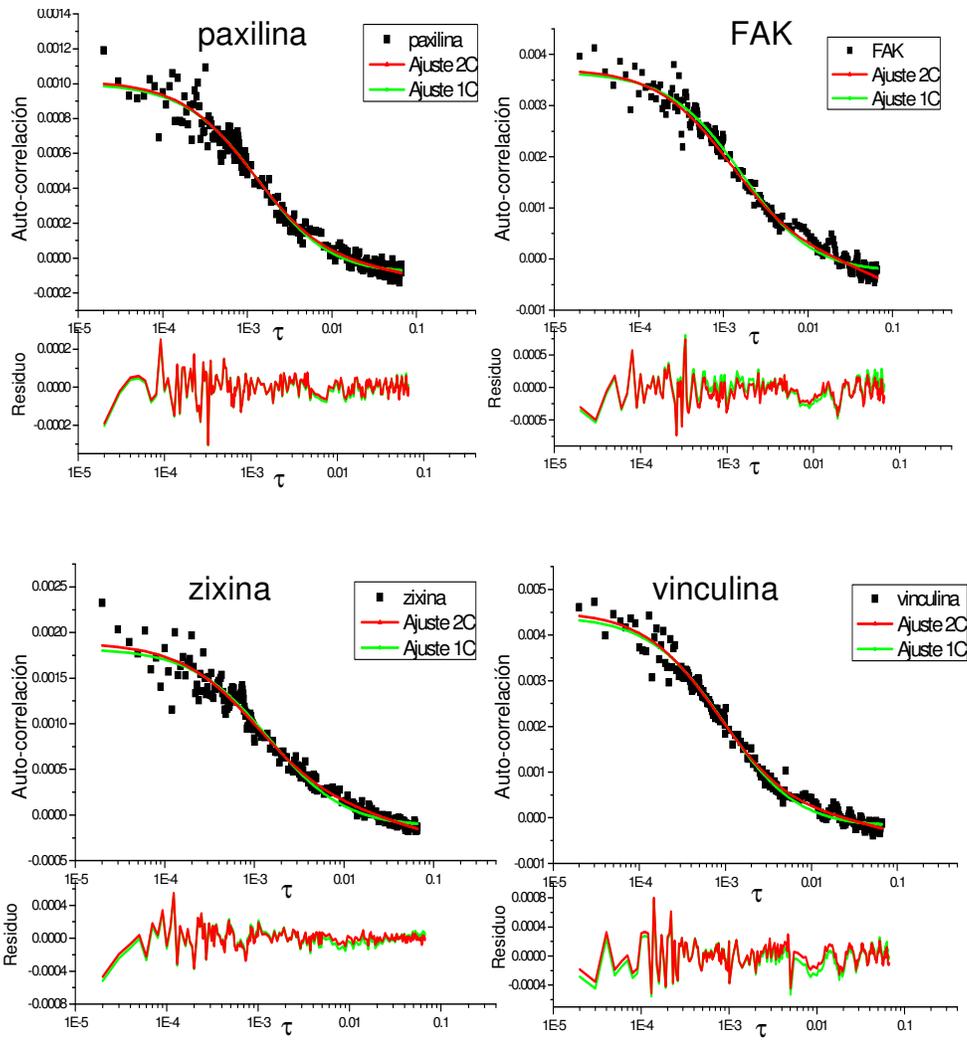


Figura 6.7: Curvas de auto-correlación promedio para diferentes proteínas en la AF en células HC11. (A) paxilina-EGFP, (B) FAK-EGFP, (C) zixina-EGFP, y (D) vinculina-EGFP. En línea continua roja se muestra el ajuste de los datos mediante un modelo de dos componentes, y en verde el ajuste por un componente. Los residuos correspondientes a cada ajuste se muestran en el panel inferior siguiendo el mismo código de colores.

GFP	N	D1, $\mu\text{m}^2/\text{s}$	G _{o1}	D2, $\mu\text{m}^2/\text{s}$	G _{o2}
Vinculina – AF	5	16.06 ± 0.97	0.00460 ± 0.00008	-	-
FAK – AF	6	9.56 ± 0.76	0.00390 ± 0.00008	-	-
Paxilina – AF	10	11.7 ± 1.1	0.001085 ± 0.000026	-	-
Zixina – AF	8	8.25 ± 0.76	0.00195 ± 0.00005	-	-
Vinculina-AF	5	18.8 ± 2.1	0.00447 ± 0.00015	0.21 ± 0.63	0.00066 ± 0.00091
FAK – AF	6	12.9 ± 4.1	0.00362 ± 0.00040	0.19 ± 0.87	0.0011 ± 0.0023
Paxilina – AF	10	13.0 ± 2.4	0.001057 ± 0.000068	0.17 ± 1.30	0.00013 ± 0.00051
Zixina – AF	8	11.1 ± 2.3	0.00181 ± 0.00014	0.26 ± 0.63	0.00041 ± 0.00025

Tabla 6.3. Resultados de los experimentos de *pointFCS*. Parámetros de ajuste de los datos experimentales obtenidos para las diferentes proteínas de la AF, utilizando modelos de una y de dos componentes.

Para todas las proteínas estudiadas en regiones de las adhesiones focales se observa un buen ajuste del modelo de una componente. Al extender el modelo a dos componentes se encuentra que los valores de la componente rápida coinciden con los del modelo de una componente. Esta componente más rápida podría corresponder a la difusión de las proteínas no-asociadas a la AF, mientras que la componente más lenta (columna 5, Tabla 6.3) con $D < 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ podría estar asociado a procesos de unión y disociación de la proteína a la adhesión focal.

6.3.3 Interacción entre proteínas de adhesiones focales

La técnica de Espectroscopía de Correlación Cruzada de la Fluorescencia⁷ (FCCS) permite estudiar la interacción de diferentes moléculas que se encuentran marcadas con distintos fluoróforos. En este método se adquieren simultáneamente las señales provenientes de los fluoróforos que etiquetan a cada proteína en dos canales independientes. Al calcular la correlación cruzada (Ec. 3.20, capítulo 3) se detecta solamente la señal de las moléculas que interaccionan entre sí. Mediante el análisis de la amplitud y el tiempo de decaimiento de las respectivas curvas, FCCS se puede utilizar para determinar las constantes de unión aparente y la movilidad del complejo unido, así como la concentración de las especies ligadas⁸. Se aplicó el método de FCCS para estudiar la interacción de los pares de proteínas de la adhesión focal vinculina-EGFP/paxilina-mCherry y FAK-EGFP/ paxilina-mCherry. Para estudiar la asociación física de proteínas adhesivas, de a pares, se seleccionan las potenciales proteínas en base a sus propiedades biofísicas. Es así que los pares mencionados han sido estudiados por distintos grupos⁹.

Implementación del experimento de FCCS

Implementar FCCS exige co-transfectar las células, en la Figura 6.8 se observan las imágenes confocales representativas de una célula HC11 co-transfectada con FAK-EGFP y paxilina-mCherry, donde se aprecia que las proteínas se encuentran en la AF. También se presentan las curvas de auto-correlación para cada canal y la curva de correlación cruzada calculada mediante la Ec. 3.20 del capítulo 3.

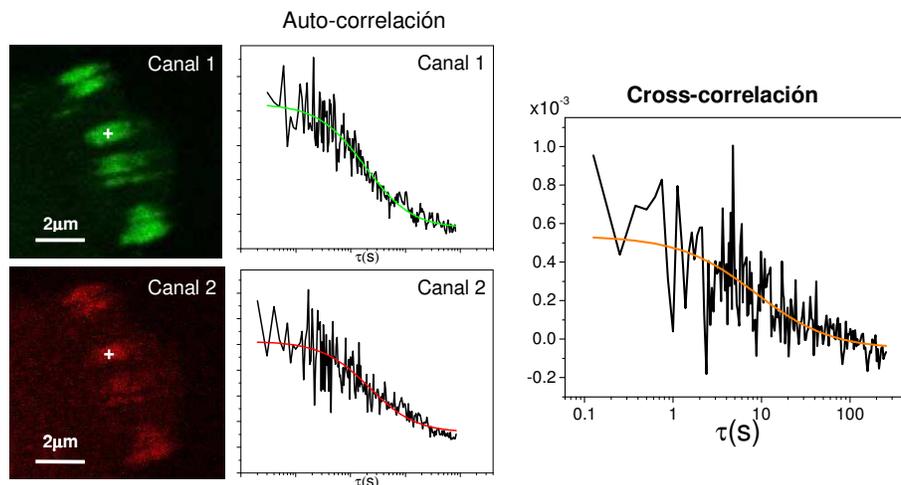


Figura 6.8. Experimento representativo de FCCS. Imágenes confocales de adhesiones focales de una célula co-transfectada con FAK-EGFP (canal 1) y paxilina-mCherry (canal 2), se indica con un signo + en color blanco el punto de la medición. Se adquirió en un rango de longitud de onda de [500-530]nm para el canal 1 (verde), y [570-670]nm para el canal 2 (rojo). Curvas de auto-correlación calculadas para cada canal. Curva de correlación cruzada.

Al trabajar con 2 o más fluoróforos, es muy común que exista una superposición de sus espectros de emisión. La excitación de uno de los fluoróforos, provoca una emisión que puede detectarse en los dos canales impidiendo aislar las señales. A este fenómeno se lo denomina sangrado. La elección de los fluoróforos se realizó en base a su separación espectral para reducir el efecto de sangrado; en la Figura 6.9 se presentan los espectros de fluorescencia de los fluoróforos seleccionados EGFP y mCherry. Como fuentes de excitación se utilizó la línea 488nm del láser de Argón y la línea 543nm del láser de He-Ne. Con el objeto de maximizar la señal y minimizar el sangrado, se seleccionó el rango espectral de detección de cada canal en [500-530]nm y [570-670]nm para el canal de EGFP y el de mCherry respectivamente.

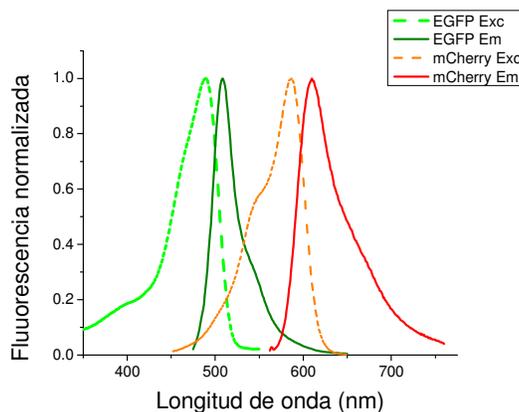


Figura 6.9. Propiedades espectrales de los fluoróforos. Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea continua) para los fluoróforos EGFP (verde) Exc/Em 488 /510 nm, y mCherry (rojo) Exc/Em 588 /610nm. Obtenido de Chroma Technology Corp.

Resultados de FCCS

En la Figura 6.10 se presentan curvas representativas de los experimentos de FCCS realizados. En las columnas 1 y 2 figuran las curvas de auto-correlaciones de cada canal que presentan coeficientes de difusión del orden de los hallados para experimentos de FCS en células HC11 expresando uno solo de los fluoróforo. En la tercera columna se muestran las curvas de correlación cruzada que típicamente tienen mayor ruido (fluctuaciones) que dificultan su análisis. Para evidenciar la existencia de una correlación cruzada se volvieron a analizar las curvas agrupando los datos de fluorescencia. Para ello se sumó la señal de fluorescencia de un determinado número de píxeles consecutivos (Bin) con el objetivo de observar escalas temporales más largas. Al realizar la agrupación de los datos se estarían promediando las fluctuaciones de los procesos rápidos como por ejemplo difusión. En la última columna de la Figura 6.10 (recuadro naranja) se observa que al reagrupar los datos de a 20 píxeles (Bin 20) se aprecia una curva de correlación cruzada con tiempos característicos mayores que los presentes en la difusión.

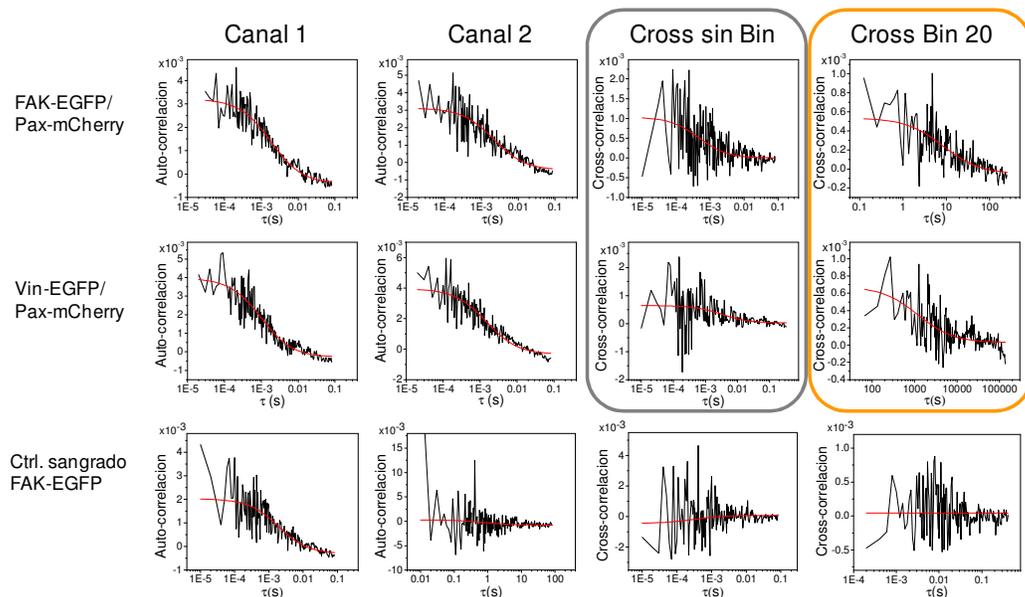


Figura 6.10. Experimento representativo de FCCS. Cada fila corresponde a diferentes experimentos: 1- FAK-EGFP/Paxilina-mCherry, 2-Vin-EGFP/ Paxilina-mCherry, y 3- FAK-EGFP como control de sangrado. En las primeras dos columnas se observa la auto-correlación de cada canal. La tercera

columna presenta la correlación cruzada de cada muestra. Finalmente la cuarta columna contiene las curvas de correlación cruzada calculadas para un agrupamiento de 20 píxeles consecutivos. En las curvas de correlación cruzada (con BIN, recuadro naranja) es más evidente la correlación entre ambas señales de fluorescencia con respecto al análisis sin agrupamiento (recuadro gris). Los parámetros de detección de estas curvas fueron: Rango espectral canal 1: [500-530]nm; Rango espectral canal 2: [570-670]nm; apertura confocal 115µm; tiempo por pixel 10µseg, tiempo de medición 1.5min; las potencias utilizadas para la línea 488nm (canal 1) estuvieron entre 0.1% y 0.4% mientras que las utilizadas para la línea 543nm (canal 2) estuvieron entre 0.5% y 2%.

Los controles realizados fueron por una parte el control de sangrado, utilizando células HC11 expresando sólo la proteína del par FCCS asociada al fluoróforo EGFP. Y por otra parte, dado que la auto-fluorescencia también puede modificar las curvas de correlación cruzada se realizaron las mediciones de FCCS en células no transfectadas. Se realizaron experimentos de FCCS con las muestras controles concluyendo que el sangrado o la auto-fluorescencia no interfieren en la correlación cruzada. En la última fila de la Figura 6.10 se muestra el análisis de una curva control representativa, realizada en una célula HC11 expresando FAK-EGFP en donde se observa correlación sólo en el canal correspondiente a EGFP.

Vin-Pax (N=6)	D, µm ² /s	G _o	FAK-Pax (N=6)	D, µm ² /s	G _o
Auto-correlación Vin	11.9 ± 0.9	0.0029 ± 0.0004	Auto-correlación FAK	4.6 ± 0.9	0.002 ± 0.0004
Auto-correlación Pax	12 ± 2	0.00390 ± 0.0009	Auto-correlación Pax	9 ± 2	0.005 ± 0.002
Cruzada	13 ± 5	0.0007 ± 0.0001	Cruzada	4.1 ± 0.9	0.0007 ± 0.0001
Cruzada BIN	0.27 ± 0.07	0.0009 ± 0.0003	Cruzada BIN	0.8 ± 0.2	0.0007 ± 0.0001
Ka (1/mM)	1950 ± 800		Ka (1/mM)	1560 ± 250	

Tabla 6.4. Resultados de los experimentos de FCCS. Parámetros promedio obtenidos del ajuste por el modelo de una componente de las distintas curvas analizadas en FCCS.

En la Tabla 6.4 se muestran los valores promedio de los ajustes de 6 experimentos de FCCS para cada par de proteínas estudiadas. Para ambos pares de proteínas, vinculina-paxilina y FAK-paxilina, se observan resultados similares. Como cabe esperar, de los ajustes por una componente de las auto-correlaciones de las señales para cada proteína, se obtienen valores de coeficientes de difusión similares a los encontrados en los experimentos realizados con una sola proteína marcada

fluorescentemente por vez (Tabla 6.3), si bien el coeficiente de difusión encontrado para FAK es ligeramente menor, es del orden del coeficiente esperado.

Con respecto a los datos obtenidos en la correlación cruzada, se observa que el coeficiente de difusión asociado, para el par vinculina-paxilina (13 ± 5) $\mu\text{m}^2/\text{s}$, y para el par FAK-paxilina (4.1 ± 0.9) $\mu\text{m}^2/\text{s}$, se corresponde a los obtenidos a partir de las auto-correlaciones. En el caso del par FAK-paxilina, el valor es más cercano al obtenido para la auto-correlación de la proteína FAK. Habiéndose realizado el control de sangrado -que podría dar una falsa correlación cruzada de las señales- esta correlación cruzada, indicaría una asociación física de las proteínas de ambos pares.

Los coeficientes de difusión obtenidos del ajuste de la correlación cruzada de los datos agrupados (correlación cruzada BIN) son (0.27 ± 0.07) $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para el par vinculina-paxilina y (0.8 ± 0.2) $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para el par FAK-paxilina. Estos valores de difusión son del orden de los coeficientes de difusión obtenidos de la componente lenta del ajuste de dos componentes realizados con una sola proteína marcada (quinta columna de la Tabla 6.3). Esto estaría en concordancia con la hipótesis de que al realizar la agrupación de los datos de la señal de fluorescencia, se promedian las fluctuaciones de los procesos más rápido, quedando en evidencia procesos más lentos como podría ser la asociación y disociación de las proteínas de las adhesiones focales.

Por otro lado, a partir del análisis de las amplitudes de las auto-correlaciones de cada canal (G_{o1} y G_{o2}) y la amplitud de la correlación cruzada (G_{o12}), se puede obtener el valor de la constante aparente de disociación K_a (Ec. 3.23 del capítulo 3), obteniéndose valores de (1950 ± 800) $1/\text{mM}$ para el par vinculina-paxilina y (1560 ± 250) $1/\text{mM}$ para el par FAK-paxilina. Estos valores concuerdan con los reportados para los mismos pares de proteínas en células fibroblastos embrionarios de rata⁵.

6.4 Conclusiones

✓ Se realizaron experimentos en células de epitelio mamario de ratón HC11 vivas cultivadas sobre vidrio recubierto con fibronectina. Se observaron mediante microscopía confocal la localización y distribución de las proteínas adhesivas zixina, paxilina, vinculina y FAK en las células HC11.

✓ Se evaluó la cinética de disociación de la proteína zixina en células HC11 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio-fibronectina mediante la recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo. Asimismo, considerando que las adhesiones focales unen la matriz extracelular a componentes del citoesqueleto, mediante los receptores de membrana, se cuantificó y evaluó la variación de la cinética de disociación de zixina al modificar la tensión del citoesqueleto, empleando un inhibidor químico. La disminución en la tensión del citoesqueleto sobre las adhesiones focales mediante el uso del inhibidor resultó en un incremento significativo en la constante de disociación que se evidenció en una recuperación más rápida de zixina en el área fotoblanqueada. En conjunto, estos datos sugieren que el modelo empleado para evaluar la cinética de la zixina en este sistema biológico es adecuado.

✓ Se realizó el análisis de la dinámica y difusión de los complejos de adhesión focal y sus interacciones, mediante la espectroscopía por correlación de fluorescencia. Se implementó *pointFCS* en células vivas HC11 para las proteínas de adhesión focal: zixina, vinculina, FAK y paxilina. A partir del análisis de auto-correlación de las fluctuaciones de la fluorescencia se caracterizaron los coeficientes efectivos de difusión de las mencionadas proteínas de adhesión focal. Mediante FCCS, el análisis se extendió al estudio de la interacción entre proteínas componentes de adhesión focal en células vivas: vinculina-EGFP / paxilina- mCherry, y FAK- EGFP/ paxilina- mCherry. Analizando la correlación cruzada de las fluctuaciones de fluorescencia de los pares de proteínas de adhesión focal se estimó una constante de asociación aparente para cada par de proteínas estudiada.

Estos experimentos en su conjunto permitieron, por un lado la puesta a punto de varias de las técnicas de fluorescencia y por el otro caracterizar al sistema biológico en condiciones de referencia que usaremos como controles en los siguientes capítulos.

6.5 Referencias

¹ Axelrod, D., Koppel, J., Schlessinger, E., Webb, E. W. "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics", *Biophys. J.* 1976, **16**: 1055–1069;

Phair, R., Misteli, T., "High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus", *Nature*, 2000, **404**: 604– 609.

² Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E., Ingber, D. E., "Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics", *Biophysical Journal*, 2006, **90(10)**: 3762–3773.

³ Lele, T. P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J., Ingber, D. E., "Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells", *J. Cell. Physiol.*, 2006, **207**: 187–194;

Lele, T. P., Thodeti, C. K., Pendse, J., Ingber, D. E., "Investigating complexity of protein–protein interactions in focal adhesions", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **369**: 929–934.

⁴ Lavelin I., Wolfenson H., Patla I., Henis, Y. I., Medalia, O., Volberg, T., Livne, A., Kam, Z., Geiger, B., "Differential Effect of Actomyosin Relaxation on the Dynamic Properties of Focal Adhesion Proteins", *PLoS One*, 2003, **8(9)**: e73549

⁵ Hoffmann, J. E., Fermin, Y., Stricker, R. L., Ickstadt, K., Zamir, E., "Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol", *Elife*, 2014, **3**: e02257.

⁶ Wolfenson, H., Bershadsky, A., Henis, Y. I., Geiger, B., "Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions", *J. Cell Sci.*, 2011, **124**: 1425–1432.

⁷ Bacia, K., Kim, S.A., Schwille, P., "Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells", *Nat. Meth*, 2006, **3**: 83-89.

⁸ Kim, S. A., Heinze, K. G., Schwille, P., "Fluorescence correlation spectroscopy in living cells", *Nat. Meth*, 2007, **4**: 963-973.

⁹ Digman, M. A., Gratton, E., "Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy", *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, 2009, **1**: 273–282;

Digman, M. A., Wiseman, P. W., Choi, C., Horwitz, A. R., Gratton, E., "Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106(7)**: 2170-2175.

**7. Dinámica molecular de las adhesiones
focales ante un estímulo mecánico:
estiramiento equibiaxial del sustrato**

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

En presencia de un estímulo mecánico, las adhesiones focales pueden ensamblarse y desensamblarse de forma dinámica. Para estudiar los cambios generados en la organización y dinámica de adhesiones focales en células vivas en respuesta a un estímulo mecánico externo global, se empleó un dispositivo de tracción equibiaxial adaptado para ser usado en simultáneo con el microscopio confocal FV1000. Este dispositivo permite “estirar las células” cultivadas sobre una membrana de silicona y evaluar mediante distintas técnicas de microscopía y espectroscopía, la respuesta en la dinámica de adhesiones focales ante un estímulo mecánico.

7.1 Dispositivo estirador equibiaxial: aplicación de estímulos mecánicos controlados a células vivas

Para realizar un estímulo mecánico controlado y reproducible se utilizó un dispositivo estirador equibiaxial, cuyo diseño es una innovación del sistema modificado por Quaglino *et al.* 2009¹, el cual fue adaptado para realizar mediciones en el microscopio confocal espectral Olympus FV1000. El dispositivo aplica de manera controlada una fuerza equibiaxial a las células adheridas a una membrana flexible de silicona, que se encuentra sujeta al dispositivo, mediante el movimiento de un anillo rígido que forma la pared de la cámara. El dispositivo estirador tiene un soporte roscado de aluminio que, al enroscarlo, empuja al anillo indentador y estira la membrana de silicona, por lo tanto la magnitud de estiramiento se caracteriza por las vueltas de rosca dadas al soporte de aluminio (Figura 7.1). Como sustrato deformable, se eligieron membranas transparentes de silicona con un espesor de 127 μm (Gloss/Gloss láminas de silicona sin reforzar, *Specialty Manufacturing Inc.*, Saginaw, MI, USA) las cuales se modificaron con fibronectina para cultivar la línea celular HC11 y hacer los experimentos de microscopía de fluorescencia.

7.1.1 Caracterización del estímulo mecánico mediante el análisis de PIV

Las deformaciones unitarias en el plano de la membrana de silicona se midieron mediante el seguimiento por microscopía confocal de micro-esferas fluorescentes de 0.5 μm de diámetro (Dragon Green, Ex 480 nm, Em 520 nm, Bangs Laboratories Inc, Fishers, IN, USA) para diferentes condiciones de estiramiento, es

decir aumentando el número de vueltas de rosca. A partir de estas imágenes confocales, las posiciones de los marcadores se rastrearon utilizando la velocimetría de imagen de partículas (PIV). El algoritmo empleado es de código abierto en *Matlab*: código MatPIV V1.6.1 de Sveen, 2004. Este algoritmo se basa en la correlación cruzada de sub-áreas de la imagen entre pares de imágenes consecutivas. Mediante el procesamiento de las imágenes, a través de una grilla regular de pequeñas subregiones, se genera un mapa de desplazamiento vectorial. Para eliminar vectores espurios (en general debido a que las sub-áreas de la imagen carecen o exceden el número de partículas necesarias para crear un buen patrón), se aplica una serie de filtros: un filtro de relación señal-ruido, un filtro del histograma global, un filtro local, y una máscara para desprestigiar las regiones sin marcadores fluorescentes. Finalmente, se identifican e interpolan todos los valores atípicos utilizando una interpolación de primeros vecinos.

Obtenido el campo de desplazamientos, se calcularon las deformaciones unitarias y los esfuerzos empleando una rutina escrita en *Matlab*. En cada punto de la grilla, asumiendo un material elástico lineal se calcularon las deformaciones unitarias normales ε_{xx} y ε_{yy} en la dirección x e y , y la deformación tangencial o de corte, ε_{xy} ²:

$$\begin{aligned}\varepsilon_{xx} &= \frac{\partial u_x}{\partial x} \\ \varepsilon_{yy} &= \frac{\partial u_y}{\partial y} \\ \varepsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right)\end{aligned}\quad (\text{Ec. 7.1})$$

donde, los desplazamientos en las direcciones x e y se denotan como (u_x, u_y) . Considerando un material isótropo que obedece la Ley de Hooke, las deformaciones unitarias (ε) se relacionan con los esfuerzos (σ) por las siguientes ecuaciones³

$$\begin{aligned}\sigma_{xx} &= \frac{E}{1-\nu^2} \cdot (\varepsilon_{xx} + \nu \cdot \varepsilon_{yy}) \\ \sigma_{yy} &= \frac{E}{1-\nu^2} \cdot (\nu \cdot \varepsilon_{xx} + \varepsilon_{yy}) \\ \sigma_{xy} &= \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \frac{1-\nu}{2} \cdot \varepsilon_{xy}\end{aligned}\quad (\text{Ec. 7.2})$$

donde σ_{xx} y σ_{yy} son los esfuerzos normales en las direcciones x e y , y σ_{xy} es el esfuerzo de corte, E es el módulo de Young del sustrato, y ν es el radio de Poisson ($\nu=0,5$). En

el caso de la membrana de silicona, el módulo de Young se estimó a partir de la dureza Shore A de 40 durómetros (ShA) informado por el fabricante, teniendo en cuenta la relación entre la dureza y la rigidez⁴:

$$E = \frac{17.93 \cdot ShA}{(100 - ShA)^{\frac{3}{2}}} \quad (\text{Ec. 7.3})$$

El módulo de Young para la membrana de silicona, estimado de esta forma es de 1.54 MPa.

Caracterización del estiramiento producido por el dispositivo estirador

La caracterización del estiramiento se realizó mediante el estudio del desplazamiento de micro-esferas fluorescentes adsorbidas al sustrato que actúan como referencia. Para este propósito se adquirieron secuencias de imágenes confocales (lente objetivo 10X *UPLanSAPO*, AN 0.4) en función de las vueltas de rosca del dispositivo. La superposición de una serie representativa de imágenes confocales se puede ver en la Figura 7.1.D.

Se calcularon el promedio y la desviación estándar de ϵ_{xx} , ϵ_{yy} y ϵ_{xy} y se graficaron en función de las vueltas de rosca, ver Figura 7.1.I. Como era de esperar, las mediciones de las componentes de deformación unitaria mostraron que no hubo diferencia significativa entre la deformación normal en la dirección x e y , y que la componente de corte del tensor de deformación fue cercana a cero, lo que resulta en un estiramiento equibiaxial⁵. Estos resultados corroboran que la membrana se estira de una manera circularmente simétrica, debido a la acción de tracciones radiales uniformemente distribuidas en el plano de la membrana y que actúan en la periferia⁶. La relación entre la deformación normal unitaria y el número de vueltas se obtuvo a partir del ajuste lineal de los datos presentados en la Figura 7.1, en la que el ajuste lineal arroja una pendiente de $(4.19 \pm 0.08)\%$ de deformación normal unitaria por vuelta de rosca.

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

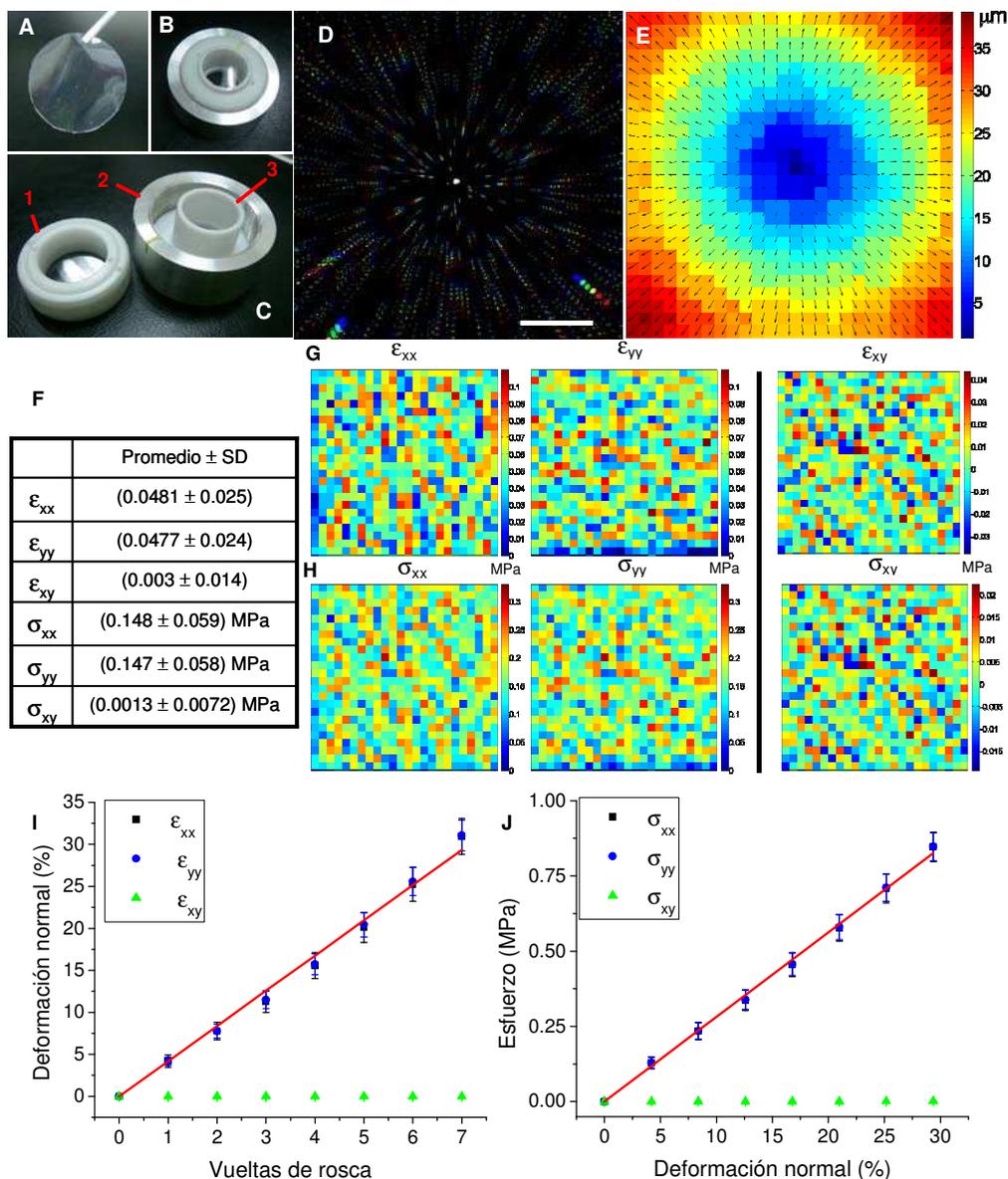


Figura 7.1: Dispositivo Estirador Equibiaxial. (A) Membrana flexible de silicona utilizada como sustrato para el cultivo celular para el dispositivo estirador. (B) Membrana colocada en el dispositivo. (C) Partes del dispositivo estirador (C-1) soporte de Delrin® (C-2), soporte de aluminio, (C-3) anillo de Teflon® mediante el cual se realiza el estiramiento de la membrana. (D) Superposición de las imágenes confocales de las micro-esferas fluorescentes sobre la membrana de silicona para sucesivas deformaciones normales unitarias desde 4% al 30%. Barra de escala: 250 μ m. (E) Mapa de los vectores desplazamiento obtenido al aplicar el análisis de PIV a las imágenes correspondientes a 4% y a 13% de deformación normal unitaria. (G) Como ejemplo, para mostrar la homogeneidad de la deformación se presentan los mapas de deformación normal unitaria en las direcciones x e y, y de deformación de corte para la primera vuelta de rosca. (H) También se calcularon los mapas de esfuerzos normales en las direcciones x e y, y de corte para la misma condición. La tabla (F) resume los valores promedio de cada mapa. (I) Deformación normal unitaria en las direcciones x e y (puntos negros y azules), y de corte (puntos verdes) en función de las

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

vueltas del estirador. Se obtuvo una respuesta lineal y análoga para ambas direcciones normales y una respuesta nula en la dirección de corte. La línea roja es el ajuste lineal de las componentes normal con pendiente $(4.19 \pm 0.08)\%$ de deformación normal unitaria por vuelta. Las barras de error son MSD. (J) Gráfico de las componentes del esfuerzo en función del aumento en la deformación normal unitaria. Se observa el mismo comportamiento en las direcciones normales.

7.1.2 Evaluación de la transmisión del estímulo mecánico desde el sustrato a las células

El dispositivo estirador equibiaxial se utilizó para realizar un estímulo mecánico a las células cultivadas en membranas flexibles de silicona. Las membranas de silicona se incubaron durante 30min en solución de fibronectina $5\mu\text{g/ml}$. Las células se sembraron sobre la membrana recubierta con fibronectina a una densidad de aproximadamente 10×10^5 células/membrana y se dejaron crecer durante 24hs. Para determinar si el estiramiento mecánico se transmite de manera eficiente desde el sustrato elástico a las células cultivadas sobre él, se midió el área de las células HC11 al aumentar la magnitud del estiramiento y luego se comparó con el cambio del área esperado debido al estiramiento del sustrato.

En la Figura 7.2 se presentan las imágenes de transmisión de células vivas cultivadas sobre la membrana para deformaciones normales unitarias de 0% (A) y 30% (B) donde se puede apreciar que las células se separan y que su área aumenta. Se calculó el área promedio para cada condición de estiramiento y la variación del área en función de la deformación normal unitaria se graficó en la Figura 7.2.C, donde se muestran el ajuste cuadrático (línea roja) y el cambio estimado por la calibración (línea azul). El cambio en el área verifica que el estiramiento se transmite a las células.

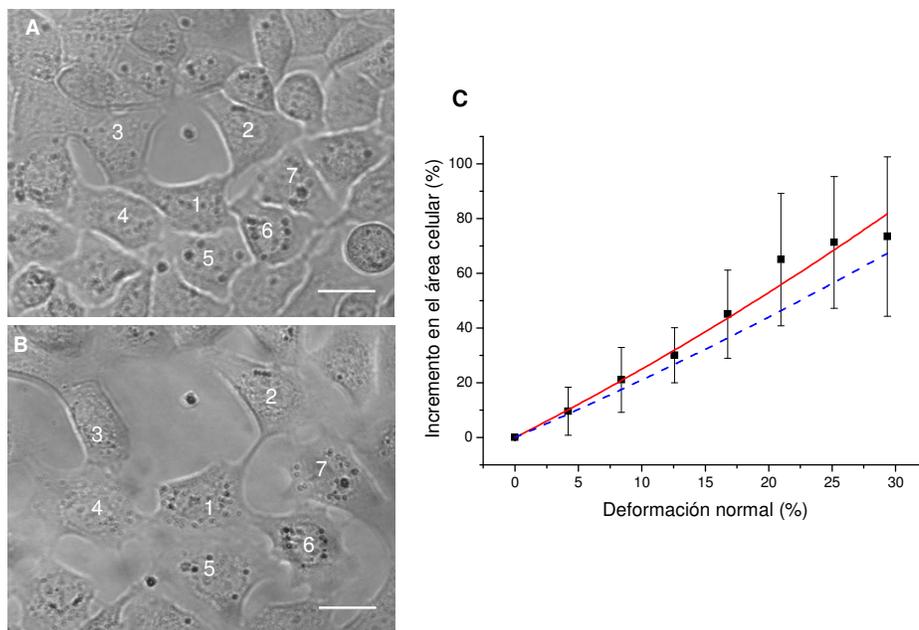


Figura 7.2. Evaluación de la transmisión del estímulo mecánico. Imágenes de transmisión para las células HC11 cultivadas sobre membrana de silicón para deformaciones normales unitarias de 0% (A) y 30% (B). Barra de escala: 20μm. (C) Variación promedio del área de las células en función de la deformación normal unitaria. La línea roja es el ajuste cuadrático mientras que en azul se presenta el cambio esperado para el área del sustrato estimado por la calibración. Las barras de error son MSD.

7.2 Dinámica y morfometría de las adhesiones focales ante un estiramiento equibiaxial del sustrato

7.2.1 Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en células sometidas a un estiramiento mecánico

Los experimentos con células vivas se realizaron en un microscopio confocal espectral FluoView 1000, empleando una lente objetivo 63X C-Apocromático de inmersión en agua NA1.2 o bien una lente objetivo 40X UPLanSAPO AN 0,95. Los siguientes plásmidos de expresión se transfectaron en las células HC11 para poder visualizar las adhesiones focales a través de la proteína vinculina: vinculina-EGFP, biosensor de tensión de vinculina (Vin-TS) y vinculina-TL. Estas dos últimas construcciones se basan en el par FRET: mTFP y Venus diseñados en el grupo del Dr. MA Schwartz⁶. Las imágenes se obtuvieron utilizando el filtro Kalman, el tamaño de píxel estuvo entre 88nm y 165nm, y el tiempo por píxel entre 10μs a 20μs. Se utilizó la línea de 488nm del láser de Argón para visualizar la fluorescencia emitida por EGFP que se detectó para [500-600]nm. Cuando se empleó el biosensor de vinculina o

vinculina-TL, se utilizó la línea 458nm del láser de Argón y las fluorescencias emitidas por mTFP y Venus fueron detectadas en el rango de [470-500] nm y [530-600] nm, respectivamente. Los experimentos de fluorescencia se realizaron entre las 24 y 48 hs después de la transfección. La membrana de silicona con las células crecidas sobre ella se montó en el dispositivo estirador con 2 ml de medio de cultivo con HEPES. Durante los experimentos en el microscopio se utilizó una cámara incubadora para mantener la temperatura a 37°C.

Para evaluar la organización de las adhesiones focales frente al estiramiento del sustrato, se adquirieron secuencias de imágenes confocales de las células en función de sucesivos estiramientos de la membrana, desde deformaciones normales unitarias del 13% hasta el 30%. Como experimento control, se adquirieron secuencias de imágenes confocales de células cultivadas sobre la membrana a una deformación normal unitaria constante (13%) para el mismo intervalo temporal que requirió el experimento en función del estiramiento. A modo de ejemplo en la Figura 7.3 se muestran las secuencias de imágenes confocales adquiridas para una célula que fue estirada (A) y para una célula control (B).

Se observó que las adhesiones focales (AF) tienden a persistir cuando se aplica el estiramiento, lo que nos permitió definir en el marco de este experimento, como *AF persistente* a aquella AF que permanece a lo largo de todo el experimento (aprox. 1 hora), y *AF Transitoria* a aquella que se desensambla completamente o nace durante el experimento.

Se encontró que las adhesiones focales tienden a persistir en respuesta al estiramiento: se presenta un 70% de AFs definidas como persistente mientras que en el caso control hay tan solo el 30%.

Es interesante notar que de toda la población de adhesiones focales, durante el experimento de estiramiento, el 10% de las AFs se desensamblan completamente y el 4% representan las AFs nacientes. Por el contrario, en las células control monitoreadas en el tiempo (a una deformación constante), hay más AFs transitorias (69%), algunas de ellas persisten en el tiempo, sin embargo el 40% de las AFs están completamente desensambladas, y 25% se formaron durante el experimento.

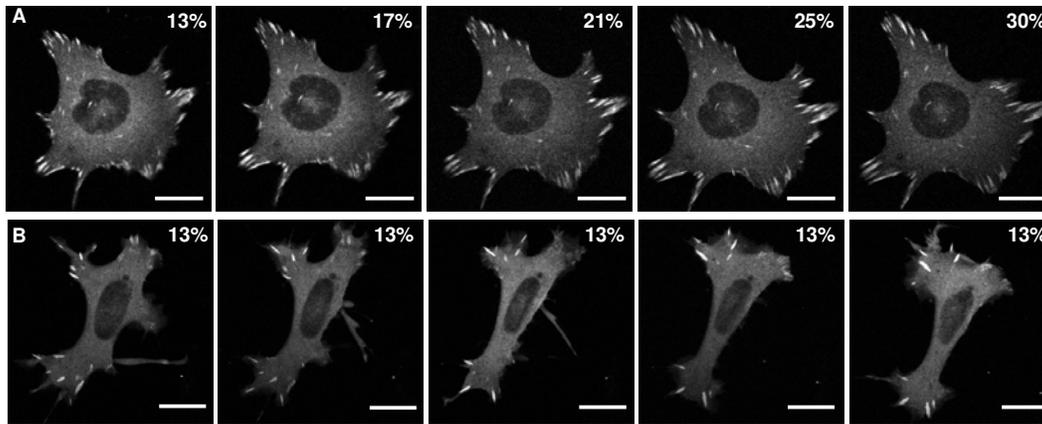


Figura 7.3: Dinámica de las adhesiones focales en células expuestas a un estímulo externo. (A) Secuencia de imágenes confocales de una célula al aumentar la deformación normal unitaria de 13% hasta un 30%. (B) Secuencia de imágenes de una célula control para una deformación normal unitaria de 13% obtenida como una función del tiempo para un lapso de 1h. Células HC11 que expresan vinculina-EGFP. Barra de escala: 20 μ m.

7.2.2 Análisis morfométrico de las adhesiones focales en células sometidas a un estímulo mecánico externo

La detección automática de adhesiones focales y la cuantificación de parámetros morfométricos es fundamental para describir los cambios que se presentan en las adhesiones focales. Para tal fin se utilizaron algoritmos descritos por la Dra. Lorena Sigaut, integrante del grupo de trabajo. La rutina escrita en *Matlab* permite detectar y "etiquetar" a las adhesiones focales para su seguimiento en el tiempo (Figura 7.4). Además pueden ser cuantificadas diferentes propiedades, como por ejemplo: su área, longitud, excentricidad, y su intensidad promedio. También permite confeccionar mapas del cambio de las diferentes propiedades en función del estiramiento como los mostrados en la Figura 7.5.

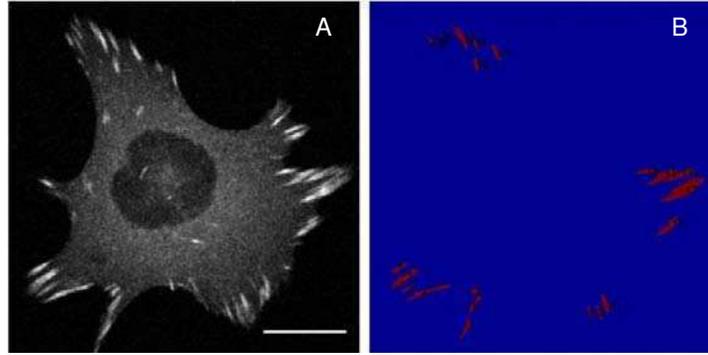


Figura 7.4: Detección automática de adhesiones focales. (A) Imagen confocal de una célula HC11 expresando vinculina-EGFP como marcador de adhesiones focales. Barra de escala: 20 μ m. (B) Máscara de las adhesiones focales detectadas y etiquetadas para su seguimiento.

La rutina en *Matlab* permite identificar automáticamente las AFs y realizar un análisis morfométrico que se aplica a la secuencia de imágenes obtenidas para diferentes condiciones de estiramiento. En primer lugar, se resta el valor promedio de la señal de fondo (región en la imagen libre de células) a cada una de las imágenes de la secuencia y se define un umbral para cada imagen, basado en la desviación estándar de la señal de fondo, para distinguir los píxeles de la imagen que corresponden a la célula de los del fondo (típicamente se utilizó entre 0,75 y 2 veces la desviación estándar).

Luego es necesario distinguir las AFs. Para ello, sobre todos los píxeles que corresponden a una célula, se aplicó el método de Otsu⁷ para calcular automáticamente el umbral óptimo que selecciona las AFs. Este algoritmo asume que la imagen a la que se le quiere determinar el umbral contiene dos poblaciones de píxeles (o histograma bi-modal) en este caso: los píxeles de las adhesiones focales, y el resto de los píxeles de la célula (píxeles blancos). Empleando 2 veces el umbral de Otsu se genera una máscara binaria preliminar para identificar las AFs. Esta máscara divide a la imagen en estructuras 2D conectadas por píxeles blancos. Se descartan las estructuras con áreas más pequeñas que 20 píxeles (aprox. 0,25 μ m²) y los píxeles con menos de 3 píxeles vecinos blancos. Por último, se etiquetan las adhesiones focales de forma manual y se rellenan los huecos que pudieran aparecer en la AF.

Tras la identificación de las adhesiones focales, se calculan las propiedades características de la adhesión, tales como el área, la longitud, la excentricidad. La longitud de la adhesión focal y la excentricidad se definen como la longitud del eje mayor, y como el cociente entre el eje menor y el eje mayor de la mínima elipse que contiene a la AF, respectivamente.

Para el análisis morfométrico se utilizaron células HC11 transfectadas con vinculina-EGFP cultivadas sobre membranas de silicona modificadas con fibronectina. Las imágenes confocales adquiridas de células cultivadas en la membrana permitieron seguir los cambios morfométricos en función del estímulo mecánico generado por el estirador equibiaxial. Una vez obtenida la secuencia de imágenes de células sometidas a una tensión mecánica creciente, se aplicó la rutina de detección automática de adhesiones focales y se analizaron parámetros como área y longitud para las adhesiones persistentes.

En la Figura 7.5.A se muestra la serie de mapas del área calculada para las AFs de una célula HC11. Cada mapa compara el área de las AFs individuales respecto al paso anterior de estiramiento, construyendo la evolución del área para los sucesivos pasos de estiramiento. Mediante un código de colores se puede distinguir el cambio del área, observando que cada AF puede experimentar tanto aumentos, como así también disminuciones de su área en los sucesivos pasos de estiramiento. Sin embargo, al comparar el área del estado inicial (13%) y el final (30%) se observa que la mayoría de las AFs incrementan su área (Figura 7.5.B). Esto refleja el comportamiento dinámico de la organización de las AFs.

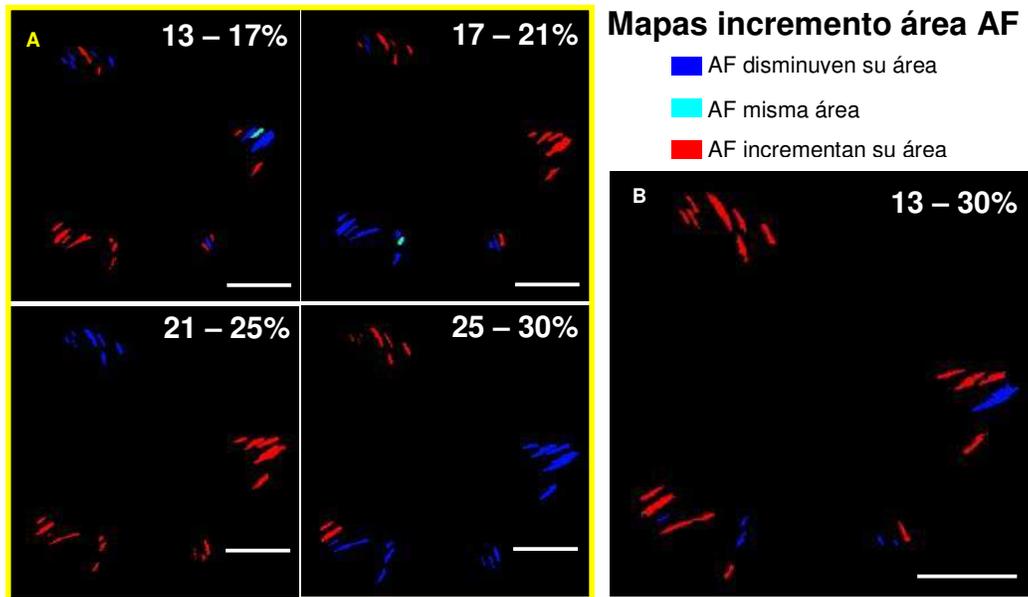


Figura 7.5: Mapa del cambio de área de las adhesiones focales. (A) Mapas de la evolución del área de las AFs en función de los sucesivos estiramientos desde deformaciones normales unitarias de 13% hasta 30%. (B) Mapa de la evolución considerando la configuración inicial (13%) y final (30%). Código de colores para el cambio del área de la AF: aumento del área (rojo), igual área (cian), disminución del área (azul). Barra de escala: 20 μ m.

Extendiendo el análisis a todas las células estudiadas, se graficó el cambio promedio del área y de la longitud de la AF en función de la deformación normal unitaria (Figura 7.6).

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibaxial del sustrato

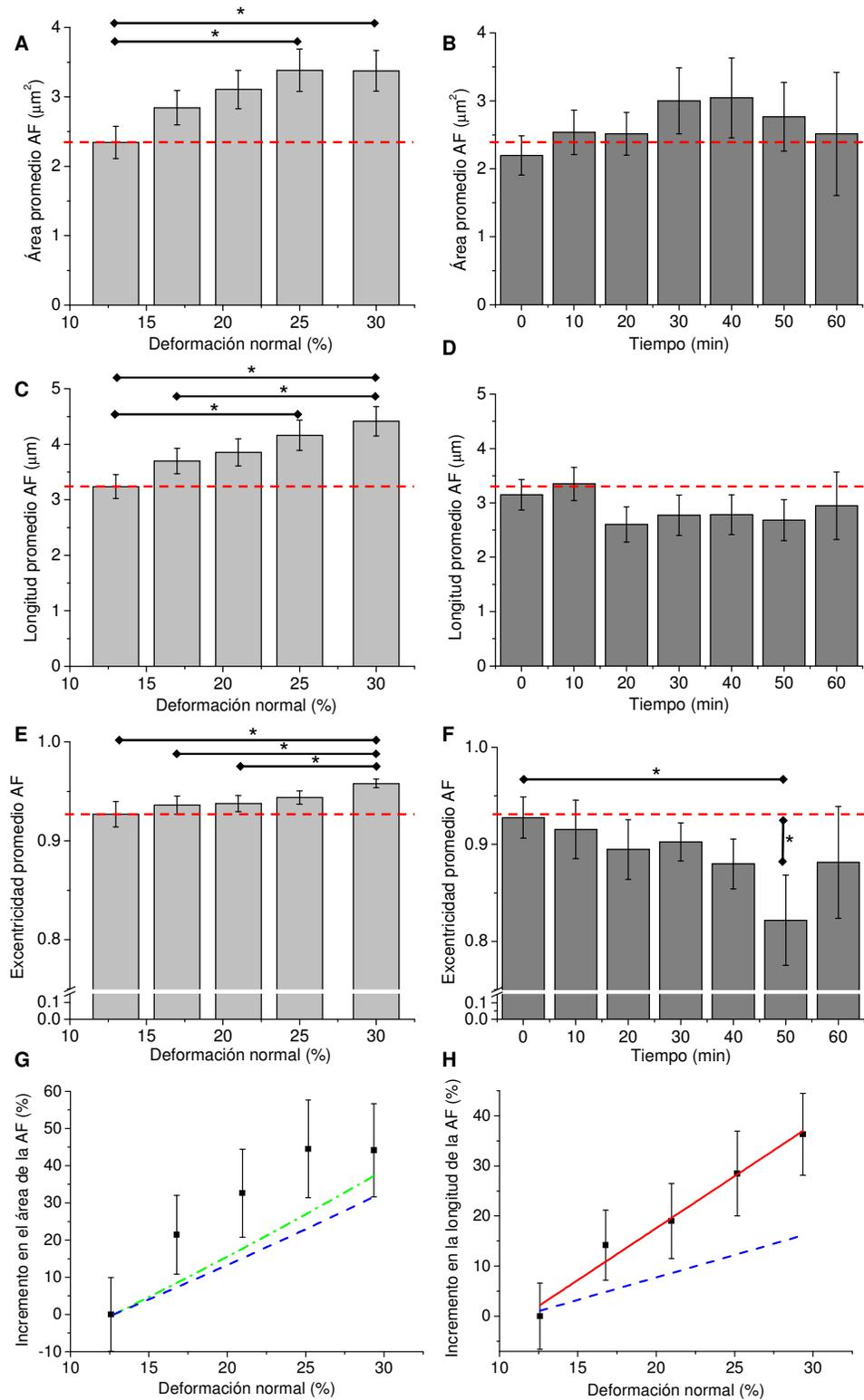


Figura 7.6: Cuantificación de la morfometría de las adhesiones focales. Valores promedio de área, longitud y excentricidad de las AFs respecto de la deformación normal unitaria (A, C, E), y en función del tiempo (para una deformación normal unitaria del 13%) para el experimento control (B, D, F). Las barras

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

con un asterisco marcan las condiciones que otorgaron una diferencia significativa por el test de Student. Como referencia se dibujaron en rojo líneas punteadas que marcan el valor de cada magnitud para la condición inicial de deformación normal unitaria. (G) Incremento promedio en el área de las AFs en función de la deformación normal unitaria. Incremento del área del sustrato esperado a partir de la calibración, línea azul punteada. El incremento del área celular se incluye en línea punteada verde. (H) Incremento en la longitud de la AF respecto a la deformación normal unitaria. La línea roja representa el ajuste lineal, mientras que en azul se presenta el incremento en la longitud del sustrato obtenido a partir de la calibración.

El valor promedio del área para 13% de deformación normal fue $(2.34 \pm 0.23) \mu\text{m}^2$ y la respuesta al estiramiento resultó en un aumento significativo para el 25% y 30% (Figura 7.6.A). También se calcularon los promedios de las longitudes de las adhesiones focales en cada condición (Figura 7.6.C). Se observa un aumento significativo de la longitud entre la condición inicial y los estiramientos normales de 25% y 30%, con una diferencia significativa entre las condiciones 17% y 30%. Los experimentos control para células cultivadas en membrana con una deformación normal unitaria constante de 13%, no presentaron diferencias significativas en el área ni en la longitud, para un intervalo de tiempo equivalente al empleado en la medición en función de la deformación normal (Figuras 7.6. B y C). Para facilitar la comparación se incorporó una línea roja que marca el valor de las magnitudes para la configuración inicial de estiramiento de la membrana, que es la misma condición de estiramiento que en el experimento control.

El promedio de los valores de excentricidad realizado para cada condición de deformación normal otorgó un aumento significativo, siendo (0.957 ± 0.044) para la deformación máxima (Figura 7.6.F). El experimento control presentó una disminución significativa de la excentricidad al transcurrir 50min. Comparando el valor obtenido para este tiempo con el valor inicial del experimento realizado en función de la deformación, también existe una diferencia significativa (se representó con una flecha vertical con asterisco en la Figura 7.6.F). En los paneles G y H se grafican los incrementos del área y de la longitud de la AF en función de la deformación normal unitaria, y se indica en línea de puntos de color azul el incremento del área o de la longitud debido al estiramiento del sustrato calculado a partir de la calibración. Se observa que ambos parámetros aumentan en respuesta al estiramiento, y que el aumento, tanto en la longitud como en el área, es mayor al mero incremento debido al estiramiento mecánico del sustrato sobre el cual crecen las células.

7.3 Localización y cinética de la proteína zixina ante un estiramiento equibiaxial del sustrato

7.3.1 Localización de la proteína zixina en respuesta a un estímulo mecánico

Un aspecto interesante de estudiar en relación a la dinámica de las adhesiones focales es ver si la composición molecular de las AFs cambia en respuesta a fuerzas mecánicas. Mediante el análisis de la localización sub-celular de distintas proteínas adhesivas en función de un estiramiento unidireccional cíclico, se reportó que las proteínas vinculina, talina, paxilina y FAK permanecen concentradas en las AFs tanto en las células estiradas como en las controles, aumentando el número y el tamaño de las AFs. En contraposición a este resultado, observaron que la proteína zixina se moviliza rápidamente desde las adhesiones focales hacia los filamentos de actina en respuesta al estiramiento⁸, lo cual se acompaña con un engrosamiento generalizado de las fibras de actina. Estos estudios contribuyeron a postular a la proteína zixina como mecanosensora y demostraron que tiene un rol activo en la remodelación y refuerzo de las fibras de actina en respuesta de señales mecánicas.

Los cambios en la localización de la proteína zixina en respuesta a un estímulo mecánico externo, se estudió para células HC11 crecidas sobre membranas de silicona-fibronectina, mediante la adquisición de imágenes confocales y la acción del dispositivo de tracción. Se observó que un 86% de las células estudiadas sometidas al estiramiento presentan translocación de zixina desde las AFs a los filamentos de actina. Mientras que en células cultivadas sobre sustrato rígido, no deformable (cubreobjetos de vidrio), sólo el 52% de las células observadas presentan el fenómeno.

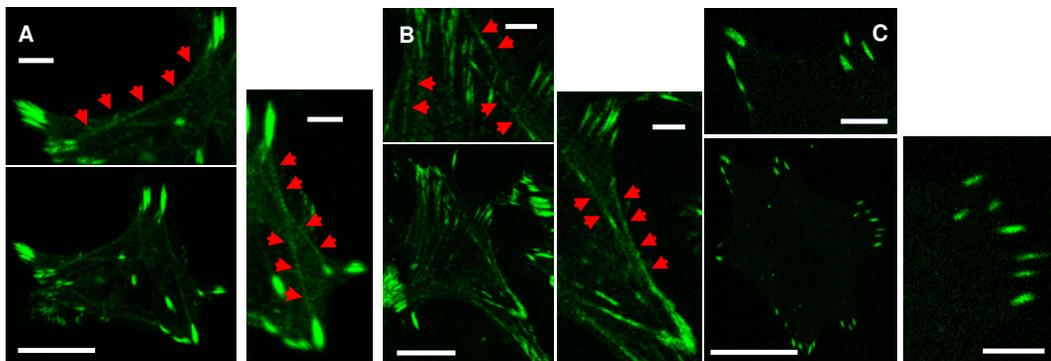


Figura 7.7. Translocación de la proteína zixina en respuesta a un estímulo mecánico. Imágenes de células HC11 expresando zixina-EGFP adquiridas para deformaciones normales unitarias de 13% (A) y 30% (B). En ambos casos, se observa la localización de la proteína zixina en los filamentos de actina (indicado por las flechas rojas). La célula cultivada en cubreobjeto (C) no presenta translocación de la

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

zixina a los filamentos de actina. Barra de escala para las imágenes de la célula entera: 20 μ m; barra de escala para la ampliación de las imágenes: 5 μ m.

En la Figura 7.7 se muestran las imágenes confocales representativas de células HC11 expresando zixina-GFP para un estiramiento correspondiente a la deformación normal unitaria de 13% (A), y de 30% (B). En ambas imágenes se observa la localización de la proteína zixina en los filamentos de actina (indicada con las flechas rojas) en respuesta al estímulo mecánico externo. Por el contrario, en las células control cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, la proteína zixina permanece localizada mayoritariamente en las AFs (Figura 7.7 C).

7.3.2 Cinética de disociación de la proteína zixina en respuesta al estímulo mecánico externo

Con el objetivo de estudiar la cinética de disociación de zixina de la AF se realizaron experimentos de FRAP en células cultivadas sobre la membrana en función del estiramiento producido por el estirador equibiaxial. Siguiendo el protocolo detallado en la sección 6.2 del capítulo anterior, se adquirieron, corrigieron y analizaron las imágenes confocales para un estiramiento de deformación normal unitaria de 13% y de 30%. Las curvas de recuperación fueron ajustadas por el modelo matemático descrito en el capítulo 3 (Ec. 3.2.4.) obteniendo los valores biológicos relevantes, k_{off} y m (Tabla 7.1).

sustrato	t_r (s)	$t_{1/2}$ (s)	k_{off} (1/s)	m
membrana 13%	43 \pm 2	30 \pm 1	0.023 \pm 0.001	0.51 \pm 0.09
membrana 30%	57 \pm 6	39 \pm 4	0.018 \pm 0.002	0.47 \pm 0.05
vidrio	62 \pm 5	43 \pm 3	0.016 \pm 0.001	0.41 \pm 0.04

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos medidos para la proteína zixina usando FRAP. Valores de $t_{1/2}$, k_{off} , t_r y m para células cultivadas sobre membranas de silicona y estiradas, o sobre cubreobjetos de vidrio.

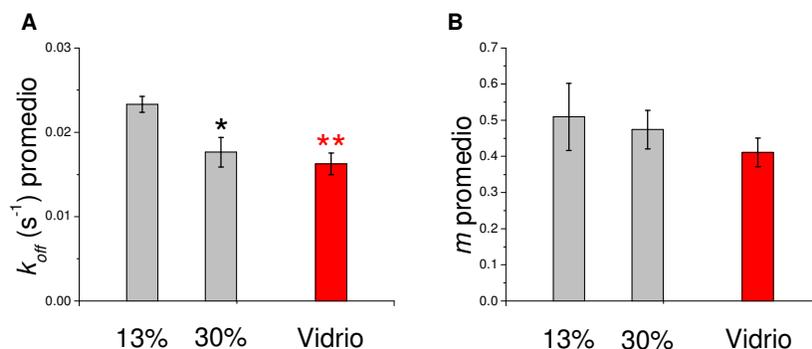


Figura 7.8: Cinética de la proteína zixina en respuesta a un estímulo mecánico evaluado mediante FRAP. Valores promedio de los parámetros cinéticos k_{off} (A) y m (B) estimados del análisis de FRAP para 13% (N° AF=6, N° células=5), y 30% (N° AF=6, N° células=4) de deformación normal unitaria, y para experimentos realizados en células cultivadas sobre vidrio (N° AF=12, N° células=8) (*p=0.026, **p=7.5 E-4 respecto de la deformación unitaria de 13%). Las barras de error indican el SEM.

En la Figura 7.8 se grafican los promedios de los parámetros obtenidos y el análisis estadístico. A medida que aumenta el estiramiento de un 13% al 30% se observa que la constante de disociación de la proteína zixina disminuye significativamente. Este valor es ligeramente más alto que el observado en células sobre un sustrato rígido como el vidrio modificado con fibronectina (Figura 7.8.A). Por otro lado, se observó que la fracción móvil no varía significativamente en las distintas condiciones.

7.4 Conclusiones

✓ Se caracterizó y verificó el estiramiento equibiaxial producido por el dispositivo mecánico sobre las membranas de silicona. Se comprobó que el estiramiento de la membrana producido por el estirador es eficientemente transmitido a las células cultivadas sobre él.

✓ Se encontró que las células sometidas a sucesivos estiramientos mecánicos, presentan un 70% de AFs persistentes, sólo un 4% de las AFs totales son nacientes y un 10% se desensamblan completamente. En contraste, en células control las AFs son más dinámicas, tan sólo el 30% de ellas persisten en el tiempo, el 40% se desensamblan totalmente y un 25% se forman durante el experimento.

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

- ✓ Al incrementar sucesivamente el estiramiento del sustrato, la longitud y área de las adhesiones focales aumenta significativamente en comparación con células control sujetas a un estiramiento constante. Este aumento en la longitud y área es mayor al mero incremento debido al estiramiento mecánico del sustrato sobre el cual crecen las células. Esto indicaría que la tensión mecánica aplicada por el dispositivo de tracción es capaz de inducir cambios en las células vivas.

- ✓ Se observó que en respuesta al estiramiento, el 86% de las células analizadas presentan translocación de la proteína zixina hacia los filamentos de actina, mientras que el 52% de las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio lo presentan.

- ✓ Se observó que al incrementar la magnitud del estímulo mecánico, la constante de disociación disminuye significativamente.

- ✓ Estos experimentos en función de un estímulo mecánico externo equibiaxial permitieron analizar la respuesta en la dinámica y organización de las adhesiones focales, así también como la localización y cinética de la proteína zixina.

7.5 Referencias

¹ Quaglino, A., Salierno, M., Pellegrotti, J., Rubinstein, N., Kordon, E. C., "Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells", *BMC Cell Biology*, 2009, **10**: 10-55.

² Baxter, S. C., Nagatomi, J., "An Introductory Guide to Solid Mechanics", *Mechanobiology Handbook CRC Press*, 2011, 3-22.

³ Hung, C. T., Williams, J. L., "A method for inducing equi-biaxial and uniform strains in elastomeric membranes used as cell substrates", *J. Biomechanics*, 1994; **17(2)**: 227-232.

⁴ Landel, R. F., Nielsen, L. E., "Mechanical Properties of Polymers and Composites", *2nd ed. CRC Press*, 1993, **6**: 337-376.

⁵ Sotoudeh, M., Jalali, S., Usami, S., Shyy, J. Y-J., Shu Chen, "A Strain Device Imposing Dynamic and Uniform Equi-Biaxial Strain to Cultured Cells", *Annals of Biomedical Engineering*, 1998, **26**: 181-189.

7. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante un estímulo mecánico: estiramiento equibiaxial del sustrato

⁶ Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., Schwartz, M. A., "Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics.", *Nature*, 2010, **466**: 263–266.

⁷ Otsu, N., "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms", *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, **9**: 62-66.

⁸ Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J., Beckerle, M. C., "Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement", *J. Cell Biol.*, 2005, **171**: 209-215.

**8. Dinámica molecular de las adhesiones
focales ante variaciones en las
condiciones de contorno mecánicas:
sustrato deformable**

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

Las células detectan, procesan y traducen la información mecánica que es proporcionada por el medio ambiente extracelular para tomar decisiones sobre el crecimiento, la motilidad y la diferenciación¹. Para ello, las células *sensan* activamente la rigidez de su entorno, ejerciendo fuerzas de tracción a través de las adhesiones focales, que unen físicamente componentes del citoesqueleto con la matriz extracelular. La estrategia usada para variar las condiciones de contorno mecánicas para la célula es fabricar y caracterizar hidrogeles de poliacrilamida de distinta elasticidad. En este capítulo se analizará el efecto del sustrato sobre la dinámica de la proteína zixina y las fuerzas de tracción generadas por las células.

8.1 Caracterización del sistema célula-sustrato deformable

8.1.1 Fabricación y caracterización de sustratos deformables para estudiar la adhesión celular

El sustrato deformable es esencial en la microscopía de fuerzas de tracción (TFM) ya que a partir de su deformación se obtiene información de la tracción celular. Los sustratos comúnmente utilizados son los geles de poliacrilamida (PAA) debido a la facilidad con la que se pueden modificar sus propiedades mecánicas de acuerdo a las necesidades del experimento. Pueden imitar las elasticidades de gran parte de los tejidos biológicos, para un módulo de Young entre 0.2Pa a 300kPa, sin perder sus propiedades elásticas.² Las células epiteliales tienen un rango de elasticidades que van desde un módulo de Young de 1kPa para las células epiteliales mamarias hasta 55kPa en queratocitos epidérmicos³. En base a esta información, se eligió confeccionar geles de PAA entre 2 y 55kPa.

La elasticidad de los geles va a depender, principalmente, de la proporción de acrilamida y bisacrilamida. La preparación de los sustratos de PAA estuvo basada en el trabajo del grupo de M. L. Gardel⁴, del cual se extrajeron las proporciones acordes a las elasticidades deseadas (Tabla 8.1). En esta publicación se reportan los valores del módulo G , *shear modulus*, que se relaciona con el módulo de Young por la siguiente fórmula, $E = 2 G (1 + \nu)$. Considerando el radio de Poisson $\nu = 0,5$, se obtiene $E = 3G$.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

	A	B	C	D
G (kPa)	2.286	8.64	16.34	30.07
Agua <i>milliQ</i> (μl)	388	325.8	308.5	274.5
Acrilamida (μl)	94 (7.5%)	94 (7.5%)	150 (12%)	150 (12%)
Bis-acrilamida, (μl)	12.5 (0.05%)	75 (0.3%)	36 (0.14%)	70 (0.28%)
APS (μl)	2.5	2.5	2.5	2.5
Nano-esferas <i>Crimson</i> (μl)	2	2	2	2
TEMED (μl)	1	1	1	1

Tabla 8.1. Composición de los geles utilizados. Cantidades necesarias para preparar un volumen final de 500 μl . Los reactivos que se utilizan para preparar los geles son: Acrilamida; Bis-acrilamida, *N,N*-metileno-bisacrilamida; *N,N,N,N*-tetrametilendiaminae, TEMED; persulfato de amonio, APS; y nanopartículas *Crimson*.

El cultivo de las células HC11 sobre los geles conlleva modificar la superficie del gel con la proteína de la matriz extracelular, fibronectina, para que se forme el adhesoma de integrina. De esta manera se activó la superficie con el reactivo químico sulfo-SANPAH que se comporta como un conector para la molécula de matriz extracelular fibronectina (FN). El esquema de las células cultivadas sobre los geles se muestra en la Figura 8.1. En el interior del gel de PAA se disponen las nanopartículas fluorescentes que servirán como indicadores o puntos de referencia. Como consecuencia de la tracción celular, el gel se deforma y las nanopartículas se desplazan (flechas) con respecto a la posición inicial.

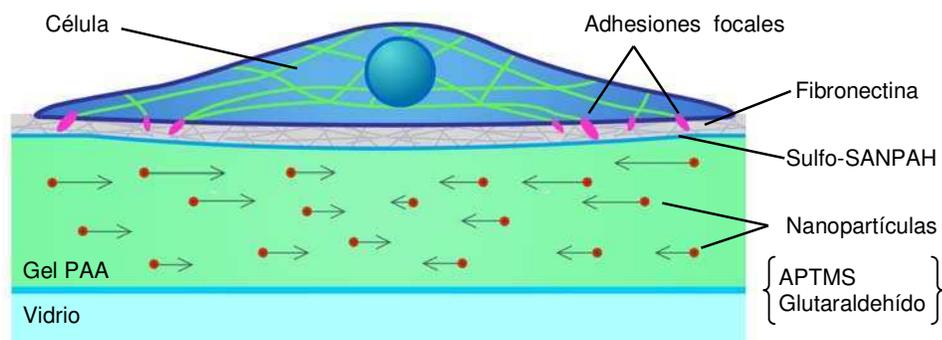


Figura 8.1. Esquema del cultivo de células sobre los geles de PAA. En el gel se marcan las nanopartículas *Crimson* donde las flechas simbolizan el desplazamiento de los marcadores fluorescentes por acción de la tracción celular. Para inmovilizar el gel sobre el cubreobjetos de vidrio se activa con glutaraldehído y APTMS.

8.1.2 Marcadores fluorescentes empleados para la microscopía de tracción

La preparación del sustrato para TFM incluye el agregado de nanopartículas fluorescentes que actúan como referencias. Las propiedades espectrales de las nanopartículas deben ser analizadas en forma conjunta con las de la proteína EGFP fusionada a las proteínas adhesivas en estudio. Entre los marcadores fluorescentes disponibles comercialmente que se probaron en el laboratorio, se encontró que las nanoesferas *Crimson* de 40nm de diámetro (Exc/Em 625/645 nm) son las más adecuadas, debido a su tamaño, su resistencia al fotoblanqueo y sus características espectrales (Figura 8.2).

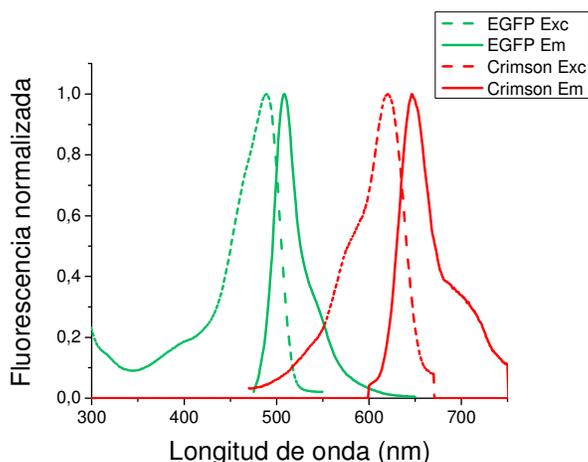


Figura 8.2. Propiedades espectrales de las nanopartículas fluorescentes. Espectros de fluorescencia de excitación y emisión en función de la longitud de onda para la proteína EGFP (Exc/Em 488/ 510nm), y para las nanoesferas *Crimson* (Exc/Em 625/645 nm), obtenidos mediante el software SpectraViewer⁵.

Además, se varió la concentración de nanoesferas encontrándose una concentración óptima de 0.004% (v/v) para el análisis de la microscopía de tracción.

En los experimentos realizados se adquirieron imágenes confocales secuenciales. Se utilizó la línea de 488nm del láser de Argón para visualizar la fluorescencia emitida por EGFP que se detectó para [500-540]nm, y la línea 635nm del láser diodo de estado sólido con una ventana de adquisición de [650-750]nm para detectar las nanopartículas-*Crimson*. Apertura confocal 125 μ m. Se empleó una lente objetivo de inmersión en aceite 60X UPlanSapo NA1.35. Por un lado, se adquirió la imagen de las nanoesferas dentro del gel y por otro la imagen de la célula transfectada con zixina-EGFP. La separación espectral es suficiente para desprestigiar los efectos de sangrado, si bien existe la posibilidad de que la emisión de EGFP excite a las

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

nanopartículas-*Crimson*, las mediciones fueron secuenciales y en planos de adquisición diferentes. En la Figura 8.3 se muestran imágenes confocales adquiridas en manera secuencial y a distintos planos, es decir a distinto z . Para $z=0$ se pueden distinguir en el canal 1 (EGFP) las AFs mientras que en el canal 2 se ven principalmente las irregularidades del gel. Es importante tener en cuenta evitar los primeros planos desde la superficie del gel hacia el interior del mismo. Las nanoesferas se distinguen sin inconveniente en los planos $z = -2$ y -3 .

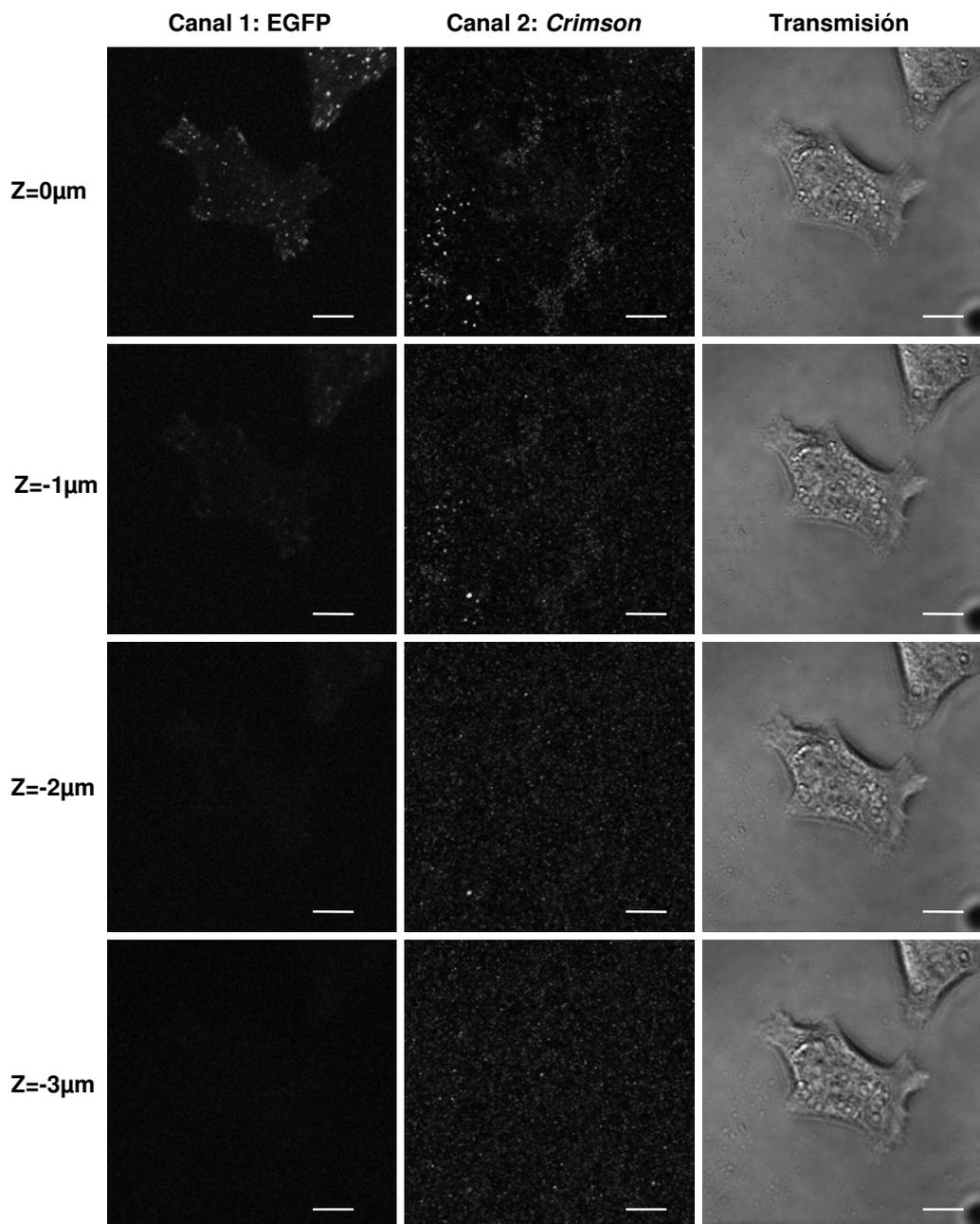


Figura 8.3. Adquisición de imágenes en un experimento representativo de TFM. Células HC11 expresando zixina-EGFP se cultivaron sobre un sustrato de PAA (13kPa) con nanoesferas fluorescentes *Crimson*. Las imágenes fueron adquiridas en los canales de EGFP (izquierda, [500-540]nm), y *Crimson* (medio, [650-750]nm) en forma secuencial. También se presentan las imágenes de transmisión (derecha). Barra de escala: 10 μ m

8.1.3 Determinación del módulo de Young del sustrato deformable mediante Espectroscopía de Fuerzas

El sustrato debe ser lo suficientemente blando para que la célula pueda deformarlo pero por otro lado la deformación producida debe poder detectarse mediante TFM. Lógicamente esto define un rango de elasticidades del sustrato para el cual se puede aplicar TFM, que va a depender de la línea celular estudiada. Para obtener las fuerzas ejercidas por la célula sobre el sustrato mediante el análisis del desplazamiento de los marcadores fluorescentes en el gel es necesario conocer el módulo de Young del mismo. Si bien por construcción se puede obtener una estimación es recomendable medirlo porque el error puede llegar al 50% en la estimación.

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PAA han sido caracterizadas por técnicas tradicionales que incluyen deformación macroscópica⁶, microindentación⁷, reología⁸, así también como AFM⁹. De la misma manera en que se ha descrito en el capítulo 5, la observación y medición de muestras biológicas y materiales con un amplio rango de elasticidad, se realizó la determinación del módulo de Young de los sustratos de PAA. Se adquirieron cientos de curvas de fuerza en solución distribuidas en distintas regiones y para geles fabricados en días diferentes. Las curvas de fuerza fueron obtenidas empleando sensores de fuerza modelo SNL, con un radio de punta nominal de 2nm, y 0.06N/m de constante elástica nominal. Igualmente se calculó el valor particular de cada punta utilizada mediante el método de ruido térmico. Utilizando una rutina escrita en *Matlab* las curvas de aproximación fueron ajustadas por el modelo de Hertz (considerando el radio de Poisson de la muestra como 0,5). En la Figura 8.4 se muestran curvas representativas para cada tipo de sustrato preparado.

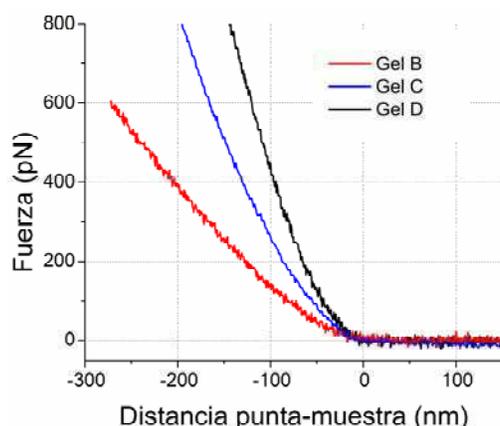


Figura 8.4. Curvas de fuerza representativas para los sustratos deformables geles de PAA. Comparación de las curvas de fuerza realizadas sobre los geles B (13kPa), C (21kPa) y D (54kPa) adquiridas con sensores SNL con un valor nominal de $k=0.06\text{N/m}$.

Los valores obtenidos fueron para el gel B (13 ± 2)kPa (1200 curvas de fuerza tomadas en 5 geles); gel C (21 ± 3) kPa (900 curvas de fuerza en 3 geles); mientras que para el gel D fue (54 ± 8)kPa (1200 curvas de fuerza en 5 geles). También se fabricaron geles con una elasticidad menor pero resultó difícil adquirir curvas de fuerza que alcancen el punto de contacto, esto impidió el ajuste. Por este motivo se estimó el valor del sustrato utilizando la proporción en la que varió el módulo medido respecto al valor de construcción del gel B, siendo la elasticidad del gel A (3.4 ± 0.5)kPa. Los valores hallados de módulo de Young para los geles en mediciones independientes, son reproducibles. Observamos que como esperábamos, el módulo de Young de un hidrogel escala linealmente con la cantidad de "entrecruzador", es decir de bis-acrilamida, y está acorde a datos publicados en la literatura. Este comportamiento lineal de E se encontró para geles preparados con un amplio rango de concentraciones de bis-acrilamida (0.03% a 0.3% w/v) y diferente porcentaje de acrilamida (3%, 5%, 10%), cuando las mediciones en AFM se realizaron con sensores de fuerza con geometría esférica o piramidal, y los datos fueron analizados usando dos algoritmos independientes¹⁰.

8.1.4 Determinación del módulo de Young de las células HC11

En esta sección se presenta el análisis de la elasticidad de las células HC11 en distintas condiciones: 1) al modificar químicamente la tensión del citoesqueleto por la acción del inhibidor Y-27632, y 2) al variar la elasticidad del sustrato, sembrando las células en sustratos deformables de poliacrilamida (PAA).

Las propiedades biomecánicas en células animales están determinadas principalmente por el citoesqueleto, el cual se sabe que se remodela dinámicamente durante distintos procesos biológicos como son la adhesión, la migración celular, la proliferación y la diferenciación¹¹. Existe un número limitado de técnicas que permiten determinar las propiedades mecánicas en células, tales como cito-indentación¹², citometría magnética¹³, pinzas ópticas¹⁴, aspiración con micropipeta¹⁵ y AFM¹⁶. Como se describió en el capítulo 5, AFM con sus distintos modos de operación es una valiosa herramienta para determinar no sólo topografía sino también las propiedades nanomecánicas y su evolución en el tiempo.

Las curvas de fuerza realizadas sobre materiales blandos presentan como característica singular una desviación al comportamiento lineal y una gran indentación. En este tipo de curvas el punto de contacto no se puede definir fácilmente, por lo que es necesario encontrar una región con fuerza constante para establecer el punto de contacto, y así poder extraer la elasticidad mediante el ajuste de la curva de fuerza. En base a los resultados que se obtuvieron en el estudio de las propiedades nanomecánicas de células procariontas (capítulo 5), se pensó en primer lugar implementar el modo avanzado de AFM para la línea celular HC11. Las primeras curvas de fuerza en el modo convencional de contacto revelaron un nivel de indentación muy grande que lamentablemente, se tradujo en inconvenientes para implementar el modo *PF-QNM* en las células HC11 vivas. La amplitud de indentación máxima de este modo (300nm) resultó insuficiente para adquirir curvas de fuerza bien definidas. Frente a esta dificultad se intentó realizar un mapa de fuerza mediante el modo *Force Volumen*. Este modo está diseñado para confeccionar automáticamente un mapa de fuerza de $n \times n$ píxeles registrando una curva de fuerza en cada píxel en un área previamente determinada. Sin embargo, la variabilidad de la elasticidad de la superficie celular condujo a que las configuraciones iniciales no sirvieran para todas las regiones del mapa, ya que al cambiar de región era necesario reconfigurar los parámetros para obtener curvas de fuerza. Debido a estos inconvenientes, y para que se pudieran comparar los resultados obtenidos en las diferentes mediciones, se decidió emplear la espectroscopía de fuerza registrando curvas individuales cuyos

parámetros se modificaron para cada caso. De esta manera se adquirieron cientos de curvas de fuerza en posiciones determinadas de la célula, y a partir de las mismas se obtuvo el módulo de Young mediante el ajuste de la curva de aproximación por el modelo de Sneddon (Ec 3.3 del capítulo 3).

Para analizar el papel del citoesqueleto en la elasticidad celular, se trató a las células HC11 cultivadas sobre vidrio-fibronectina con el reactivo Y-27632 a una concentración 10 μ M, y se adquirieron curvas antes y después del tratamiento. Se trabajó con la celda para líquido en el AFM de manera de mantener las células vivas. A partir de las curvas de fuerza se obtuvieron los módulos de Young para ambas condiciones. Comparando los valores obtenidos a través del histograma de la Figura 8.5D se puede ver una disminución significativa de la elasticidad en las células luego del tratamiento (los valores del módulo de Young con y sin inhibidor corresponden a poblaciones significativamente diferentes según el test de Kolmogorov-Smirnov con $p < 0.05$). Este resultado es el esperado ya que el efecto del Y-27632 es disipar la tensión del citoesqueleto inhibiendo a la proteína quinasa-asociada a Rho (ROCK) pero sin afectar la integridad de los filamentos de actina. Este resultado se correlaciona con lo publicado en la literatura donde drogas que afectan la integridad de los filamentos de actina del citoesqueleto, como citocalasina B y D o latrunculina, tienen un efecto dramático sobre la elasticidad de células fibroblastos de ratón, la cual decrece por un factor de 2-3, dependiendo de la concentración de la droga. No se observa el mismo efecto cuando se utilizan drogas que afectan a los microtubulos¹⁷.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

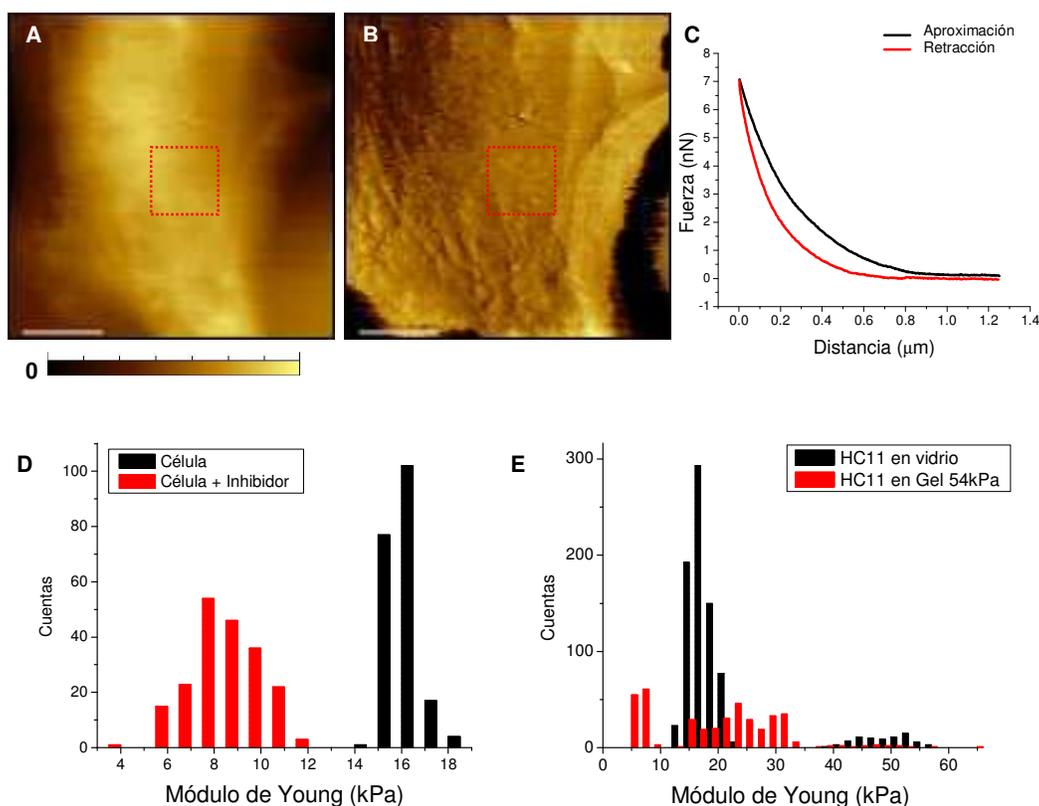


Figura 8.5. Análisis de elasticidad mediante espectroscopía de fuerza para células HC11 vivas. (A) Topografía de una región de una célula HC11 viva cultivada sobre un sustrato deformable de PAA con un módulo de Young de 54kPa, adquirida en el modo contacto del AFM. Escala (0- 3.5) μm . (B) Señal de error, Escala: (0-30) nm. Barra de escala: 5 μm . (C) Curva de fuerza obtenida en la región recuadrada en rojo. Sensor de fuerza modelo MSNL con constante elástica nominal (0.1-0.3)N/m. (D) Histogramas del módulo de Young para 200 curvas de fuerza antes de aplicar el tratamiento con el inhibidor Y-27632 (negro, E promedio = (8.2 ± 1.5) kPa), y 200 curvas después (rojo, E promedio = (16.3 ± 0.7) kPa), cultivadas sobre cubreobjetos. (E) Histogramas del módulo de Young calculado para células cultivadas en vidrio (N=818, E promedio= (20.2 ± 9.5) kPa), y sobre sustratos deformables de 54kPa (N=405, E promedio = (19.5 ± 10.9) kPa).

Los valores promedios obtenidos para elasticidad de las células HC11 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrios-fibronectina se encuentran en el rango de elasticidades informados en la literatura para células CHO¹⁸ (16kPa-35kPa), células HeLa¹⁹ (10kPa a 30kPa), y fibroblastos²⁰ (3-12kPa y 100kPa).

Con el objetivo de evaluar si la elasticidad de las células HC11 depende de la elasticidad del sustrato usado, se cultivaron células sobre hidrogeles de poliacrilamida y sobre cubreobjetos, ambos recubiertos con la proteína fibronectina. Las mediciones

se realizaron principalmente en la región periférica de las células. En la Figura 8.5E se presenta la comparación de los valores obtenidos para células cultivadas sobre vidrio y para células cultivadas sobre un gel de PAA de elasticidad 54kPa. Luego de la adquisición y del análisis de las curvas de fuerza, no se detectó una variación significativa en la elasticidad de las células cultivadas sobre los distintos sustratos (vidrio y gel de PAA de 54kPa). Es interesante este resultado porque se ha demostrado que la elasticidad del sustrato afecta la proliferación de las células, la velocidad de crecimiento, la expresión de genes y la diferenciación osteogénica en células madres embrionarias cultivadas sobre geles de PDMS²¹. Por lo tanto se espera una correlación entre el aumento de la rigidez del sustrato y la elasticidad de la célula. No es lo que observamos en nuestro sistema y concuerda con resultados publicados para células endoteliales cultivadas sobre poliestireno o sobre matrigel donde la elasticidad es ~ 8 kPa cuando para hacer las mediciones tienen en cuenta la altura de la célula²².

8.2. Cinética y dinámica de la proteína zixina en respuesta a la elasticidad del sustrato

8.2.1. Cinética de disociación de la proteína zixina evaluada mediante FRAP

Una vez optimizados la construcción de los geles y el cultivo de las células HC11, se procedió a cultivar células transfectadas para investigar los efectos de la elasticidad del sustrato en la cinética de la proteína zixina de la AF. Se realizaron experimentos de FRAP en células HC11 expresando zixina-EGFP como marcador de AF cultivadas sobre geles con distinto módulo de Young. La Figura 8.5.A presenta la imagen confocal de la región de una célula cultivada en un gel de 3.4kPa donde se realizó el experimento de FRAP, señalando la AF fotoblanqueada y las regiones de control. También se muestran las intensidades en función del tiempo de cada región (Figura 8.6.B). La curva de recuperación de la fluorescencia de zixina normalizada obtenida según el protocolo de la sección 6.2 (capítulo 6) junto con el ajuste del modelo de FRAP en la AF se observa en la Figura 8.6.C.

En la Figura 8.6. D y E se presentan los valores promedio de la fracción móvil y de la constante de disociación de zixina en función de la elasticidad del sustrato. La cantidad de experimentos realizados para los sustratos de 3.4 kPa, 13 kPa, y 54kPa, fue 9, 15 y 10, respectivamente. Para comparar como control se cultivaron las células

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

sobre un sustrato rígido como un cubreobjetos de vidrio recubierto con fibronectina y se hizo el experimento de FRAP. Se aplicó el test de Mann-Whitney que determinó que los valores de k_{off} de la zixina hallados en las AFs de células cultivadas sobre los geles son significativamente mayores al valor para la zixina de las AFs de las células adheridas al vidrio, mientras que los valores de la fracción móvil se mantuvieron constantes.

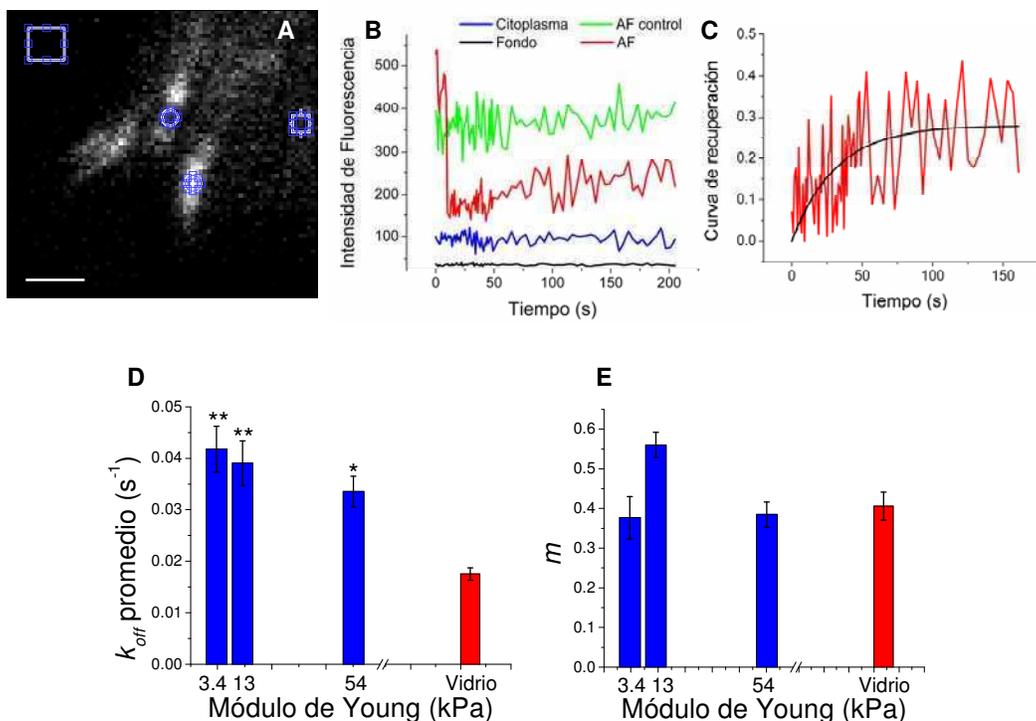


Figura 8.6: Experimento de FRAP para estudiar la proteína zixina en células HC11 cultivadas sobre sustratos de PAA. (A) Imagen confocal de una región de la célula con AFs, en escala Hi-Lo. Barra de escala = 1 μ m. Recuadros azules son las regiones seleccionadas para medir la fluorescencia de fondo (A.1), el citoplasma (A.2), la adhesión control (A.3) y la adhesión fotoblanqueada (A.4). (B) Intensidad de fluorescencia en función del tiempo durante el FRAP para la señal de fondo (negro), el citoplasma (azul), la AF control (verde), que se usa para estimar el fotoblanqueo por adquisición, y la AF fotoblanqueada (rojo). (C) Curva de recuperación de la fluorescencia de la zixina normalizada junto con el ajuste obtenido con el modelo de FRAP en la AF. (D) k_{off} promedio y (E) m promedio de la zixina respecto del módulo de Young del sustrato. Rigidez del vidrio ~70GPa²³. Las barras representan el error SE. Se realizó el test de Mann-Whitney respecto al vidrio donde se indica * para un $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

Los resultados están en concordancia con los publicados por Lele y colaboradores como se aprecia en la Tabla 8.2. Es notable encontrar que la k_{off} para zixina en células cultivadas sobre un gel de ~50kPa da un valor dos veces mayor que en células cultivadas sobre vidrio recubierto con fibronectina, tanto para células endoteliales como en la línea celular HC11. Para geles de 3.4kPa, en nuestro caso, la constante es 2.5 mayor que la medida sobre vidrio.

sustrato	t_r (s)	$t_{1/2}$ (s)	k_{off} (1/s)	m
gel 3.4kPa	24 ± 3	17 ± 2	0.042 ± 0.004	0.38 ± 0.05
gel 13kPa	26 ± 3	18 ± 2	0.039 ± 0.004	0.56 ± 0.03
gel 54kPa	30 ± 3	21 ± 2	0.034 ± 0.003	0.39 ± 0.03
vidrio ~70GPa	57 ± 4	40 ± 3	0.017 ± 0.001	0.41 ± 0.03
Valores publicados en Lele et al., 2006				
gel 50kPa	-	-	0.21 ± 0.04	-
gel 300kPa	-	-	0.13 ± 0.03	-
vidrio ~70GPa	-	-	0.10 ± 0.01	-

Tabla 8.2. Parámetros cinéticos medidos para la proteína zixina usando FRAP. En la parte superior de la tabla se presentan los valores de $t_{1/2}$, k_{off} , t_r y m para zixina-EGFP expresada en células HC11. Las células se cultivaron sobre sustratos con distintas propiedades elásticas. En la parte inferior se muestran los valores de la constante cinética de disociación para zixina en células endoteliales cultivadas sobre geles de PAA o vidrio.

En resumen, se observaron cambios en la constante de disociación de la proteína zixina encontrándose que disminuye a medida que aumenta la rigidez del sustrato.

8.2.2. Dinámica de la proteína zixina mediante *pointFCS*

Para estudiar la dinámica de la zixina al modificar la elasticidad del sustrato se realizaron experimentos de *pointFCS*. Se utilizó el protocolo descrito en la sección 6.3 (capítulo 6) en células HC11 expresando zixina-EGFP, cultivadas en sustratos deformables de PAA de 13kPa. Como control se realizaron experimentos en células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio. Para cada condición de sustrato, se ajustaron las curvas de auto-correlación promedio por los modelos de una o de dos componentes (Ec. 3.19 del capítulo 3), los gráficos se muestran en la Figura 8.7. Del

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

ajuste por una o dos componentes se estimaron los coeficientes de difusión efectivos para la proteína zixina, resumidos en la Tabla 8.3, junto con las correspondientes amplitudes.

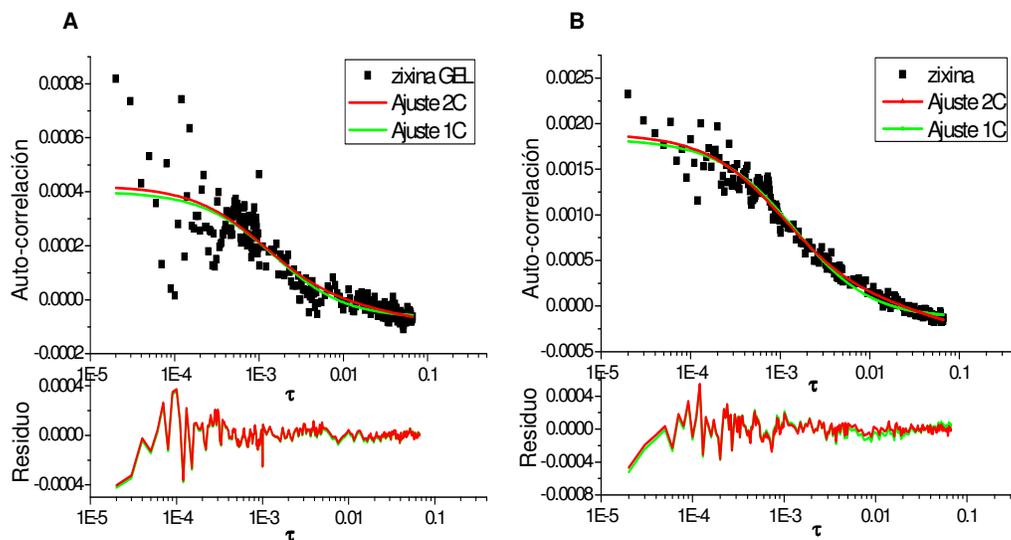


Figura 8.7: Experimento de FCS para células cultivadas sobre sustratos deformables. (A) Curva de auto-correlación promedio para zixina junto con los ajustes para 1 y 2 componentes en línea continua verde y roja, respectivamente. Residuo correspondiente a cada ajuste. (B) Curva de auto-correlación de zixina para células cultivadas en vidrio.

EGFP	N	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	G_0	D_2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	G_{02}
vidrio	8	8.25 ± 0.76	0.00195 ± 0.00005	---	---
gel 13kPa	11	8.1 ± 2.3	0.000464 ± 0.000034	---	---
vidrio	8	11.1 ± 2.3	0.00181 ± 0.00014	0.26 ± 0.63	0.00041 ± 0.0025
gel 13kPa	11	$\cong 11.1$	0.000444 ± 0.000053	$\cong 0.26$	$(7.9 \pm 7.8) \times 10^{-5}$

Tabla 8.3. Análisis de la dinámica de zixina mediante *pointFCS*. Comparación de los parámetros hallados para los experimentos de FCS en células HC11 cultivadas en sustratos deformables de PAA de 13kPa y en vidrio, para los ajustes de 1 y 2 componentes.

No se observan diferencias en los valores de coeficientes de difusión efectivos obtenidos del ajuste por el modelo de una componente, en los distintos sustratos. Al ajustar los datos experimentales obtenidos para el gel mediante el modelo de dos componentes, en ambas componentes se obtuvo el mismo valor de coeficiente de difusión efectivo ($D_1 = D_2$) y este valor fue el mismo que el obtenido del ajuste de 1 componente ($D_1 = D_2 = 8.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Esto sugeriría que los datos no se ajustan por este

modelo. Ahora bien, el ajuste de los datos por el modelo de dos componentes, pero fijando los valores de coeficientes de difusión efectivos a los encontrados en el caso del vidrio, resulta muy similar al ajuste de una componente. Es posible que el modelo de dos componentes se adecue a los datos pero éstos resultan más difíciles de ajustar dado que las curvas de auto-correlación calculadas para las células cultivadas sobre gel son más ruidosas (Figura 8.7 A) en comparación con las obtenidas sobre vidrio (Figura 8.7 B)

Los valores de coeficientes de difusión efectivos para la proteína zixina, obtenidos por los distintos ajustes, son similares para los diferentes sustratos indicando que no hay un efecto significativo de la elasticidad del sustrato.

8.3. Correlación entre la tracción celular y la elasticidad del sustrato

8.3.1. Mapas de deformación y tracción celular: Microscopía de Tracción (TFM)

El algoritmo empleado para reconstruir los campos de tracción considera que la deformación elástica del sustrato es inducida por una sola célula. Por lo tanto, para medir TFM es necesario encontrar una célula aislada, es decir, las células deben estar suficientemente separadas para que las deformaciones generadas por una célula no interfieran en las de otra, se aconseja que la separación entre células sea $20\mu\text{m}^{24}$. Una vez hallada la célula de interés se registra la distribución de los marcadores. Para ello se adquirió una serie de imágenes a diferentes profundidades (*Z stack*), 3 planos en Z cada $0,5\mu\text{m}$ de la superficie (ver Figura 8.3, por ejemplo). Luego se aplicó el tratamiento con tripsina, retirando el medio de cultivo y colocando 1ml de solución de tripsina con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El tiempo necesario para separar las células del sustrato, y permitir que el sustrato se relaje estuvo entre 15-20min. En la Figura 8.8 se ilustra cómo el tratamiento con tripsina y EDTA hace que las células se “desprendan” del sustrato, a la vez que se observa la fluorescencia de las nanoesferas. Una vez realizado el tratamiento con tripsina, se adquirió la serie de imágenes con el fin de encontrar el plano focal correspondiente a las mismas nanoesferas, y de esta manera poder calcular su desplazamiento. Comparando los diferentes planos se buscó mediante la correlación cruzada de imágenes el par de planos que tuvieran un desplazamiento máximo. Las imágenes se adquirieron para 1024×1024 o 1600×1600 píxeles dependiendo del tamaño de la célula conservando siempre un tamaño de píxel menor a 70nm y aplicando un filtro Kalman 2.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

La alineación de las imágenes respecto a la imagen PRE se realizó mediante la función *Template Matching* del programa *Fiji*, para ello se consideró una región en el borde de la imagen que no haya sido afectada por la tracción celular. A partir de las imágenes PRE y POST aplicando el algoritmo *MatPIV v. 1.6.1* de *Matlab* (sección 3.3 del capítulo 3), se calculó el mapa de Deformación. Se configuró el algoritmo para comenzar con ventanas de interrogación grandes 256x256 o 128x128 píxeles (alrededor de $10\mu\text{m}^2$) cuyo tamaño se fue reduciendo, en potencias de 2, hasta obtener ventanas de aproximadamente 32x32 o 16x16 píxeles ($1\mu\text{m}^2$). Con el objetivo de reducir la distancia entre las ventanas de interrogación se utilizó un solapamiento del 50%.

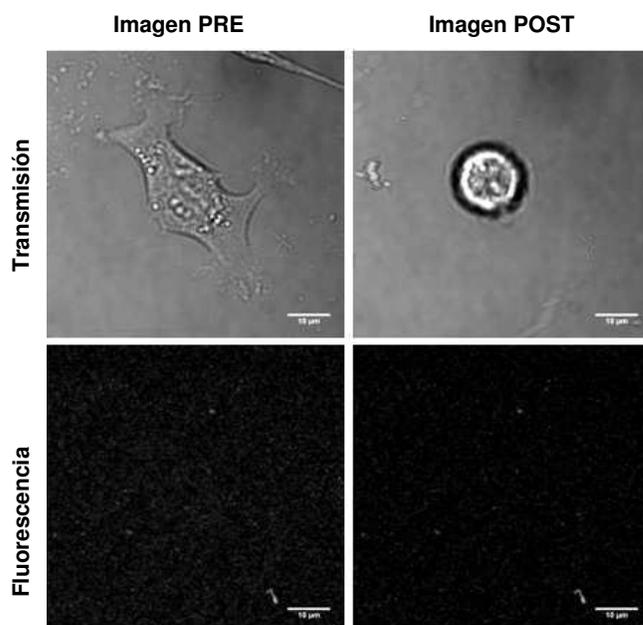


Figura 8.8. Experimento de TFM. En el panel superior se presentan las imágenes de transmisión antes y después del tratamiento con tripsina. En la imagen PRE se observa una célula HC11 completamente extendida y aislada. En la imagen POST se aprecia que la célula se separó del sustrato. El panel inferior el canal de fluorescencia muestra los marcadores dentro del gel de PAA (21kPa). Barra de escala: $10\mu\text{m}$

El mapa de deformación presenta en cada ventana el vector de la deformación obtenido mediante la localización de los picos de la correlación cruzada entre las imágenes PRE y POST de cada ventana de interrogación. El código de colores representa el módulo de la intensidad de la deformación.

El campo de tracción se obtuvo aplicando Citometría de Tracción por Transformada de Fourier (FFTC, del inglés *Fourier Transform Traction Cytometry*), que resuelve el problema inverso (Ec 3.25 del capítulo 3), en el espacio de Fourier.

Dado que el cálculo de la tracción es un problema inverso mal condicionado, muy sensible a errores en las deformaciones, para obtener una estimación fiable se necesita una técnica adicional de regulación. En este trabajo se utilizó el método de regularización de Tikhonov (Ec. 3.28 del capítulo 3) que incorpora un parámetro de regularización, λ , que suaviza la solución encontrada y cuyo valor es arbitrario. La herramienta que se utilizó para seleccionar el valor óptimo del parámetro de regularización fue el criterio de la Curva-L (ver sección 3.3 del capítulo 3).

La reconstrucción de la tracción mediante estos métodos requiere algunas consideraciones. En primer lugar es muy importante la elección de la línea celular con la que se va a trabajar ya que es necesario que las células sean adherentes y se extiendan completamente sobre el sustrato. De esta manera las deformaciones del gel están principalmente contenidas en el plano y se minimizan las fuerzas normales a la superficie del gel. También, se asume que las deformaciones medidas provienen de la célula presente en el campo visual, por este motivo se eligieron células aisladas.

Por otro lado, se considera al sustrato como un material elástico, isótropo y semi-infinito. Los geles de PAA se pueden considerar elásticos para pequeñas deformaciones con respecto a la escala espacial de variación de la deformación, que en este caso está determinado por el tamaño característico de las adhesiones focales. Dado que el tamaño típico de las AFs es aproximadamente de $1\mu\text{m}$ considerar un desplazamiento $u < 1\mu\text{m}$ satisface la hipótesis. Además, si el grosor del gel es mucho mayor que las deformaciones (que en general son del orden de micrón), se puede considerar al gel como un espacio semi-infinito. Por tal motivo se construyeron geles con un espesor de $50\mu\text{m}$ aproximadamente. El espesor del sustrato se midió ópticamente empleando el canal de transmisión en el microscopio confocal. Para hacerlo se ubicó el borde del gel en el campo visual, se enfocó la superficie del gel y luego la del vidrio para obtener el espesor.

Por último, para el cálculo de la tracción es necesario conocer parámetros elásticos del sustrato, como son su módulo de Young y el valor del radio de Poisson. El valor del módulo de Young se determina experimentalmente mediante espectroscopía de fuerza; y se considera al gel como a un material incompresible, siendo su valor de radio de Poisson igual a 0.5.

Como ejemplo, en la Figura 8.9.B se presenta la imagen de transmisión de una célula HC11 viva cultivada sobre el sustrato deformable de 13kPa, antes del tratamiento con tripsina, donde se marcó en línea roja el contorno de la célula. Mediante el análisis de las imágenes confocales, PRE y POST, de los marcadores

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

fluorescentes antes y después del tratamiento con tripsina, se determinó el desplazamiento de los marcadores dentro del sustrato como resultado de la fuerza ejercida por la célula sobre el mismo. En la Figura 8.9.E se puede apreciar la superposición de las imágenes confocales de los marcadores de referencia dentro del gel antes (verde) y después (rojo) de remover la célula, para la región seleccionada en la Fig.8.9.B. Se confeccionó el mapa de deformación (Figura 8.9 A y ampliación D) donde se observa la dirección y magnitud de la deformación del sustrato para cada ventana de interrogación. El mapa de tracción reconstruido, se aprecia en las Figuras 8.9.C y F. Como se espera, los mayores desplazamientos y tracciones se observan principalmente en la periferia de la célula donde se encuentran las adhesiones focales.

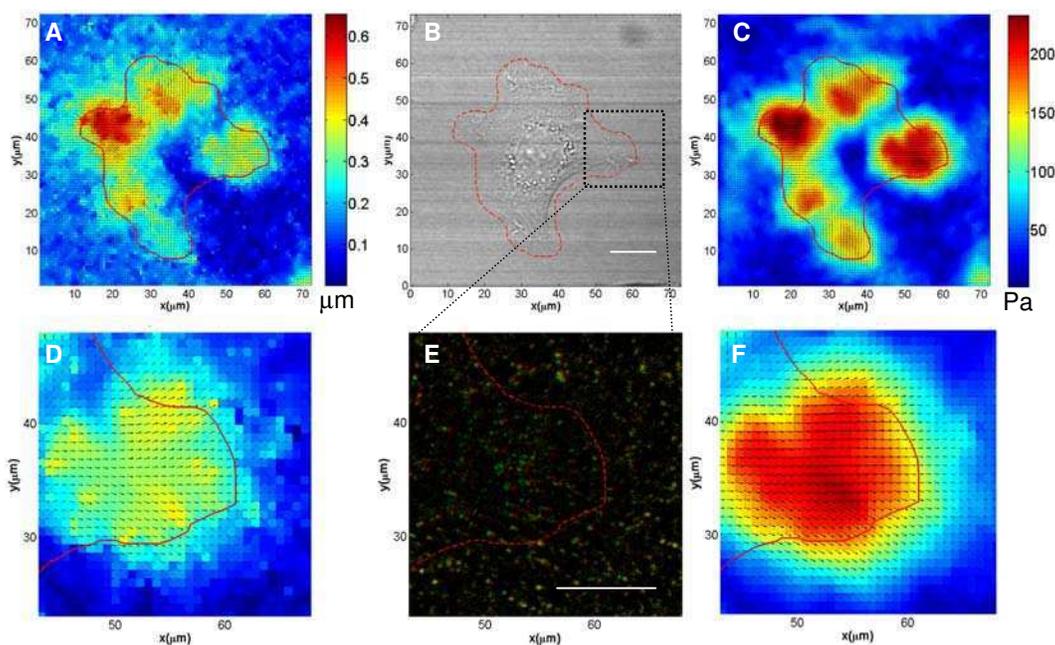


Figura 8.9. Microscopía de Tracción. (B) Imagen de transmisión (1600x1600 píxeles, tamaño del píxel 47nm) de una célula HC11 cultivada sobre un gel de PAA de 13kPa. (A) Mapa de Deformación muestra la dirección e intensidad de la deformación para cada ventana. (C) Mapa de Tracción con el dibujo del contorno de la célula en línea roja. Análisis de la región periférica de la célula delimitada en (B). Mapas de deformación (D) y tracción (F) de la zona ampliada. (E) Superposición de las imágenes confocales de los marcadores de referencia dentro del gel antes (verde) y después (rojo) de remover la célula. Tamaño de la ventana de interrogación $0.77\mu\text{m}$ Barra de escala $10\mu\text{m}$.

Los mapas calculados contienen información vectorial de la deformación y la tracción. Con el fin de extraer información concerniente solamente a la célula, se define manualmente una máscara seleccionando el área de la célula a partir de la

imagen de transmisión. Aplicando la máscara en cada mapa se confeccionan los histogramas del módulo y del valor de cada componente de las magnitudes medidas. Esta máscara también sirve para calcular los valores medios de la magnitud de la deformación y de la tracción ejercida por la célula sobre el sustrato. En la Figura 8.10 A se presenta el campo de tracción en la región correspondiente a la célula, que se utilizó para calcular el valor promedio de la magnitud de tracción ejercida por la célula. En la (Figura 8.10 C) se muestran los histogramas de la magnitud y de las componentes de la tracción. Del mismo modo se aplica la máscara al campo de deformación y se confeccionan los histogramas para la deformación (Figura 8.10 B). En este ejemplo, el valor promedio de la deformación del sustrato es menor al micrómetro, $(0.30 \pm 0.12) \mu\text{m}$ y la magnitud de la tracción promedio ejercida por la célula es de $(129 \pm 51) \text{Pa}$.

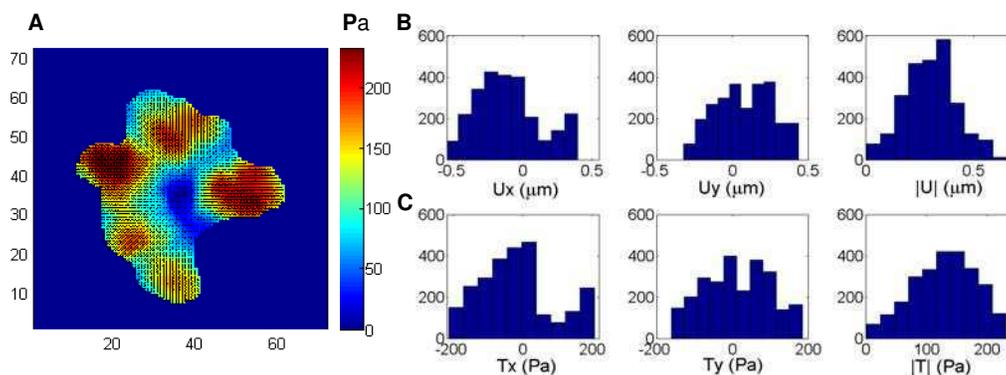


Figura 8.10. Análisis TFM. (A) Campo de tracción limitado a la región de la célula. Barra de escala $10 \mu\text{m}$. (B) Histogramas de las componentes del deformación, U , y su magnitud, $|U|$ y (C) de las componentes de tracción, T , y su magnitud $|T|$. Los valores promedio de las magnitudes de deformación y la tracción fueron $(0.30 \pm 0.12) \mu\text{m}$ y $(129 \pm 51) \text{Pa}$ respectivamente.

8.3.2. Efecto de la elasticidad del sustrato en la generación de tracción celular

Para analizar el efecto de la elasticidad del sustrato en la generación de fuerzas en la célula, se confeccionaron mapas de tracción a partir de experimentos de TFM de células HC11 cultivadas sobre geles de poliacrilamida de diferente módulo de Young (3.4kPa, 13kPa y 54kPa). Para las elasticidades estudiadas se presentan en la Figura 8.11 los mapas de deformación y tracción junto con la imagen de transmisión. En todos los casos se aprecia que las células se encuentran aisladas, completamente extendidas y las deformaciones se encuentran localizadas en la periferia de la célula.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

En este ejemplo, también se puede distinguir que las tracciones generadas aumentan a medida que el sustrato es más rígido.

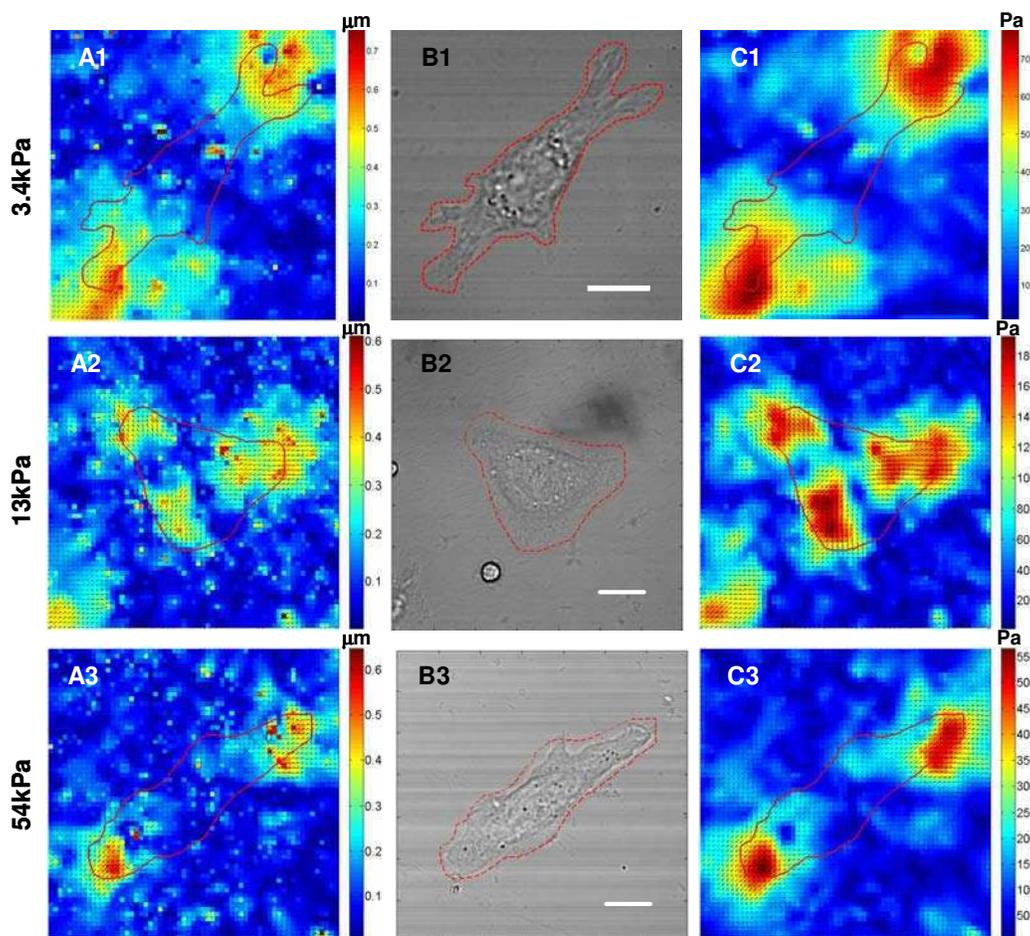


Figura 8.11. TFM para sustratos de diferente elasticidad. Mapas de Deformación (A1, A2, A3) y Tracción (C1, C2, C3) para células cultivadas en sustratos de diferente módulo de Young (3.4kPa, 13kPa y 54 kPa). El contorno de cada célula se dibujó en cada imagen con líneas de puntos roja. Imágenes de transmisión (1024x1024) (Tamaño del pixel:(B1) 51nm, (B2) 48nm, (B3) 59nm). Barras de escala 10 μ m.

Aplicando las máscaras de cada célula se extrajeron los valores medios de deformación y tracción ejercida por la célula en cada gel. Se realizó el análisis de TFM para células de diferentes cultivos y, el promedio se presenta en la Figura 8.12. Los valores medios de las deformaciones disminuyen en función del aumento del módulo de Young del sustrato aunque no se vieron diferencias significativas. Por otro lado, la tracción celular promedio aumenta significativamente al aumentar la rigidez del sustrato.

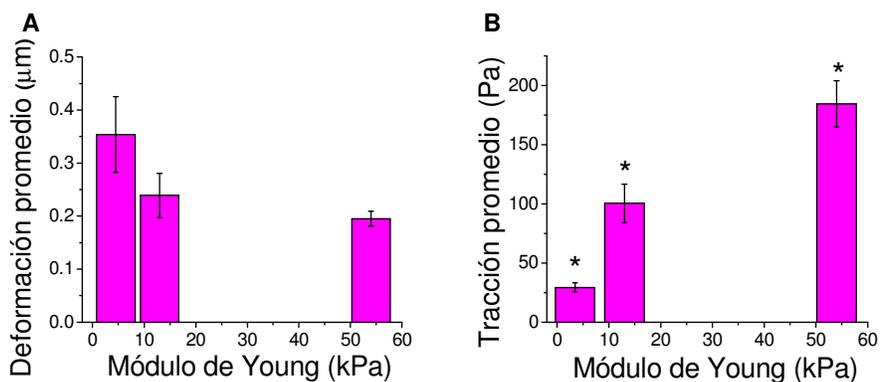


Figura 8.12. Análisis de TFM para sustratos de diferente módulo de Young. (A) Deformación promedio y (B) Tracción promedio generadas por las células HC11 cultivadas sobre sustratos de PAA de diferente elasticidad (N=4, N=8, N=2 células para los geles de 3.4kPa, 13kPa y 54kPa;) (las barras son el error SE). Los valores de deformación y tracción promedio se analizaron mediante el test de Mann-Whitney, con un * se indican las poblaciones que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

Los resultados indican que en las células cultivadas en medio más rígidos se generan fuerzas de tracción mayores. Este resultado está en la misma dirección que lo publicado para un estudio de células normales y tumorales cultivadas en sustratos de diferentes propiedades²⁵ ($E = 1$ a 10 kPa), donde encuentran que las fuerzas de tracción aumentan en función de la rigidez del sustrato, y son mayores para las células tumorales con respecto a las no tumorales.

8.4. Correlación entre fuerzas de tracción celular y cambios en la cinética de la proteína zixina

Hasta este punto del trabajo de Tesis se evaluaron los efectos de la dureza del sustrato en la generación de la fuerza de tracción y en la cinética de disociación de la proteína zixina en forma independiente. En la Figura 8.13 se presenta el gráfico de la tracción celular promedio en función de la constante de disociación de la proteína zixina para los sustratos de PAA con diferentes valores de elasticidad estudiados en las secciones 8.3.2 y 8.2.1. Este gráfico sugeriría que las células que generan mayores tracciones son las que presentarían adhesiones focales con menores valores de la constante de disociación de la proteína zixina, es decir son adhesiones focales en las que la proteína tiene un tiempo de residencia mayor.

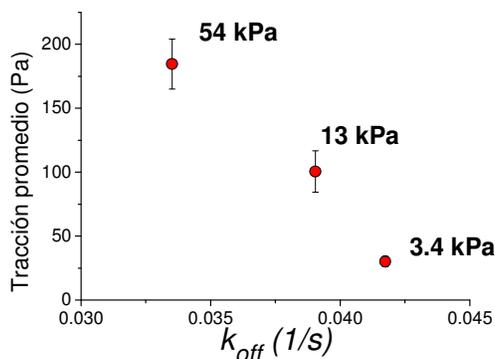


Figura 8.13. Correlación entre tracción celular y cinética de disociación de la proteína zixina.

Gráfico de la tracción celular promedio en función de la constante de disociación de la proteína zixina variando las condiciones de contorno mecánicas.

Con el objetivo de correlacionar las fuerzas ejercidas por las células, con la cinética de disociación de la proteína zixina, se implementaron en forma conjunta TFM y FRAP. El protocolo de medición se modificó levemente, luego de adquirir la serie de imágenes *PRE* para TFM, se realizaron los experimentos de FRAP; mediante el tratamiento de tripsina se eliminaron los contactos adhesivos célula/sustrato, y finalmente se adquirió la serie de imágenes *POST*.

En la Figura 8.14 se resume el experimento conjunto TFM-FRAP realizado para una célula HC11 expresando zixina-EGFP cultivada sobre un sustrato de 3.4kPa. La figura se divide en dos bloques: (I) corresponde a los resultados de FRAP mientras (II) muestra los resultados de TFM. En la Figura 8.14(I) se observa la superposición de las imágenes de transmisión y de fluorescencia donde se resaltan con recuadros de color negro las regiones que contienen las adhesiones focales que se estudiaron mediante FRAP. Su correspondiente mapa de tracción se observa en la Figura 8.14(II) al igual que las ampliaciones de las regiones estudiadas en FRAP. Para cada región estudiada se determinó el valor de tracción promedio.

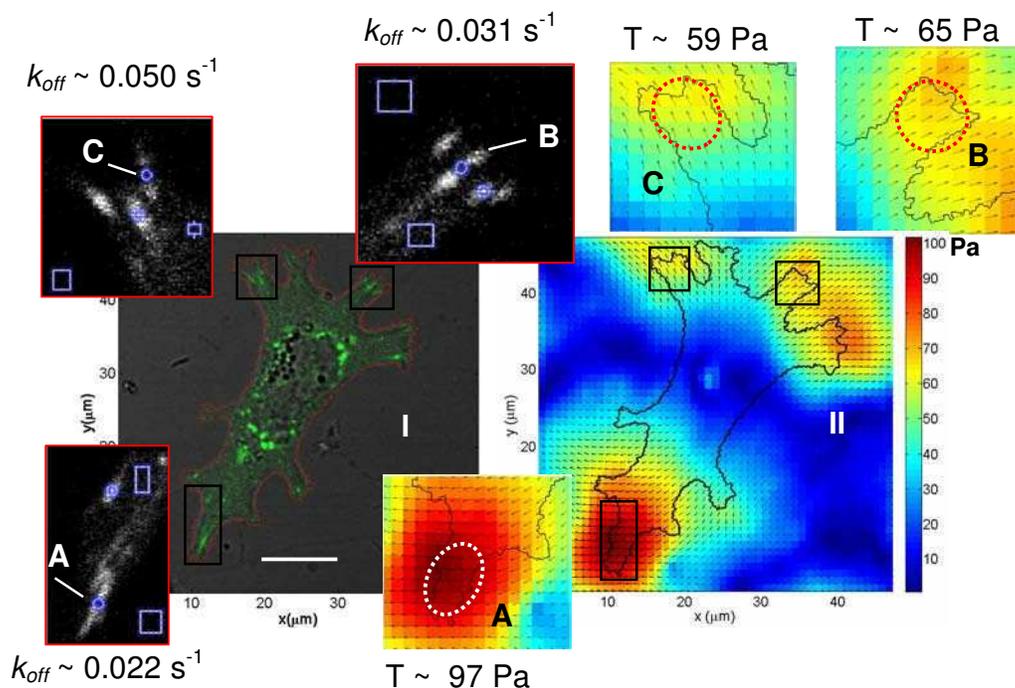


Figura 8.14. Experimento conjunto FRAP y TFM aplicados a la misma célula. (I) Superposición de las imágenes de transmisión y de fluorescencia de una célula cultivada sobre un sustrato de 3.4kPa de elasticidad. Los recuadros indican las regiones seleccionadas para el análisis de FRAP donde se marcan las regiones consideradas en el cálculo de la curva de recuperación. Barra de escala 10 μm . (II) Mapa de tracción. Ampliaciones de las regiones seleccionadas para el cálculo de la tracción promedio.

Finalmente, se confeccionó el gráfico de la tracción promedio, en cada región, respecto del valor de la constante de disociación de zixina de las AFs perteneciente a la misma región. Este gráfico junto con la tabla que resume los resultados del experimento conjunto de TFM y FRAP se presentan en la Figura 8.15.

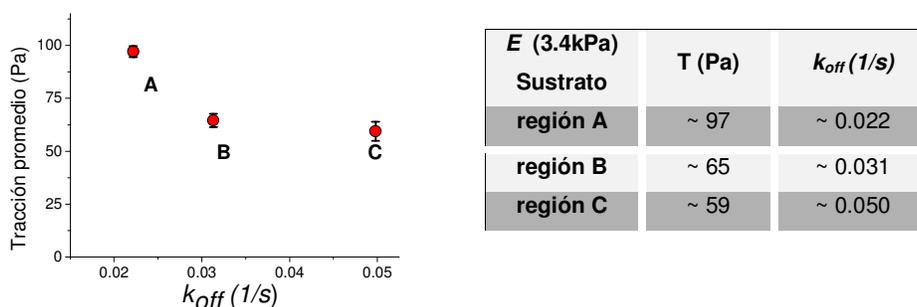


Figura 8.15. Resumen de los resultados TFM y FRAP. Valores promedio calculados en cada región donde se realizó el experimento de FRAP en función de la constante de disociación de zixina calculada en las AFs.

El análisis de los datos indicaría una posible correlación (a nivel de adhesión focal) entre la cinética de disociación de zixina y la magnitud de las fuerzas de tracción ejercida por una adhesión focal: sugiriendo que ejercerían mayor fuerza de tracción las adhesiones focales que presentan una menor constante cinética de disociación para la zixina.

8. 5 Conclusiones

✓ Se fabricaron como sustratos elástico deformables geles de poliacrilamida variando las concentraciones y relaciones entre sus componentes con el fin de obtener sustratos de distinta dureza, incluyendo el agregado de nanopartículas fluorescentes y la modificación química de su superficie para hacerlo compatible con el cultivo de células. Mediante la Espectroscopía de Fuerzas, se caracterizó la elasticidad de los geles de poliacrilamida con el fin de obtener módulos de Young confiables para la reconstrucción de las fuerzas generadas por las células sobre el gel. Además, se evaluó la elasticidad de las células HC11 cultivadas sobre distintos sustratos.

✓ Se evaluaron los efectos de la elasticidad del sustrato en la cinética de disociación de la proteína zixina de la adhesión focal mediante FRAP y en la difusión mediante FCS. Se encontró que la constante de disociación disminuye a medida que aumenta la rigidez del sustrato, mientras que su difusión no se veía alterada.

✓ Se confeccionaron mapas de tracción a partir de experimentos de microscopía de fuerza de tracción (TFM) de células HC11 cultivadas sobre geles de poliacrilamida de diferente dureza. El análisis de los mapas indica que la magnitud de las fuerzas generadas por las células aumenta al cultivarlas sobre sustratos más rígidos.

✓ Se implementaron en forma conjunta TFM y FRAP en células transfectadas que expresan la proteína zixina fusionada a EGFP para correlacionar la generación de tracción con la cinética de la proteína zixina. Los resultados sugerirían que ejercerían mayor fuerza de tracción las adhesiones focales que presentan una menor constante cinética de disociación para la zixina.

Si bien son datos preliminares, los resultados encontrados indicarían una posible correlación entre la dinámica molecular de la adhesión focal y la generación de fuerza de tracción. Cabe destacar que el experimento conjunto TFM-FRAP es pionero en la correlación de información obtenida por la combinación de distintas técnicas para el estudio de mecanotransducción celular.

8.6 Referencias

- ¹ Geiger, B., Spatz, J. P., Bershadsky, A. D., "Environmental sensing through focal adhesions", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, **10**.
- ² Kraning-Rush, C. M., Carey, S. P., Califano, J. P., Reinhart-King, C. A., "Quantifying Traction Stress in Adherent Cells", *Method in cell biology*, 2012, **110**: 139-178.
- ³ Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., Zhdanov, R. I., "Atomic force microscopy probing of cell elasticity", *Micron*, 2007, **38**: 824-833.
- ⁴ Aratyn-Schaus, Y., Oakes, P. W., Stricker, J., Winter, S. P., Gardel, M. L., "Preparation of Compliance Matrices for Quantifying Cellular Contraction", *Journal of Visualized Experiments*, 2010, **46**: 1- 6.
- ⁵ www.lifetechnologies.com
- ⁶ Pelham, R. J., Wang, Y.-L., "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate Flexibility", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **94(25)**: 13661–13665.
- ⁷ Jacot, J. G., Dianis, S., Schnall, J., Wong, J. Y., "A simple microindentation technique for mapping the microscale compliance of soft hydrated materials and tissues", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, **79**: 485–494.
- ⁸ Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., Janmey, P. A., "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion", *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2005, **60**: 24–34.
- ⁹ Sunyer, R., Jin, A. J., Nossal, R., Sackett, D. L., "Fabrication of Hydrogels with Steep Stiffness Gradients for Studying Cell Mechanical Response.", *PLoS One*, 2012, **7(10)**: e46107
- ¹⁰ Engler, A. J., Rehfeldt, F., Sen, S., Discher, D. E., "Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation", *Methods in cell biology*, 2007, **83**: 521-545.
- ¹¹ Bao, G., Suresh S., "Cell and molecular mechanics of biological materials", *Nature Mater*, 2003, **2**: 715-725; Zhu, C., Bao, G., Wang, N., "Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion and molecular deformation", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2000, **2**: 189-226.
- ¹² Shin, D., Athanasiou, K., "Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties", *J. Orthopaed. Res.*, 1999, **17(6)**: 880-890.

8. Dinámica molecular de las adhesiones focales ante variaciones en las condiciones de contorno mecánicas: sustrato deformable

¹³ Lele, T. P., Sero, J. E., Matthews, B. D., Kumar, S., Xia, S., Montoya-Zavala, M., Polte, T., Overby, D., Wang, N., Ingber, D. E., "Tools to study cell mechanics and mechanotransduction", *Methods Cell Biol.*, 2007, **83**: 443-472.

¹⁴ Florin, E. L., Pralle, A., Horber, J. K. H., Stelzer, E. H. K., "Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications", *Journal of Structural Biology*, 1997, **119**: 202-211.

¹⁵ Evans, E. A., Waugh, R., Melnik, L., "Elastic area compressibility modulus of red cell membrane", *Biophys. J.*, 1976, **16(6)**: 585-595.

¹⁶ Radmacher, M., "Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope", *Methods Cell Biol.*, 2002, **68**: 67-90;

Sokolov, I., "Atomic force microscopy in cancer cell research", *Cancer Nanotechnology*, 2007, 1–17

¹⁷ Rotsch, C., Radmacher, M., "Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts-An atomic force microscopy study", *Biophys. J.*, 2000, **78**: 520-535.

¹⁸ "Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy", *JPK Application Note*, 2014.

¹⁹ Yokokawa, M., Takeyasu, K., Yoshimura, S.H., "Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope", *Journal of Microscopy*, 2008, **232(1)**: 82-90

²⁰ Nawaz, S., Sánchez, P., Bodensiek, K., Li, S., Simons, M., Schaap, I. A., "Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations", *PLoS One*, 2012, **7(9)**: e45297.

²¹ Evans, N. D., Minelli, C., Gentleman, E., LaPointe, V., Patankar, S. N., Kallivretaki, M., Chen, X., Roberts, C. J., Stevens, M. M., "Substrate Stiffness Affects Early Differentiation Events In Embryonic Stem Cells", *European Cellas and Materials*, 2009, **18**: 1-14.

²² Qiuquan, G., Xia, Y., Sandig, M., Yang, J., "Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope", *Journal of Biomechanics*, 2012, **45**: 304–309.

²³ Radmacher, M., "Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM", *IEEE Eng Med Biol Mag.*, 1997, **16(2)**:47-57;

Gray, D. E., "American Institute of Physics Handbook", *American Institute of Physics*, 1972.

²⁴ Plotnikov, S. V., Sabass, B., Schwarz, U. S., Waterman, M. C., "High-resolution traction force microscopy", *Methods in cell biology*, **123**: 367-394.

²⁵ Kraning-Rush, C. M., Califano, J. P., Reinhart-King, C. A., "Cellular Traction Stresses Increase with Increasing Metastatic Potential", *PLoS One*, 2012, **7(2)**: e32572.

9. Conclusiones generales

9. Conclusiones generales

El objetivo general del trabajo de Tesis fue estudiar cómo las propiedades mecánicas del sustrato modulan la organización-dinámica de proteínas en la adhesión focal en células vivas. El desafío que se presentó para abordar el trabajo fue combinar e integrar diferentes técnicas que poseen una alta resolución espacio-temporal para correlacionar eventos altamente localizados en la célula viva con las propiedades mecánicas del entorno. En este contexto, en el marco del trabajo de Tesis, se implementaron y optimizaron distintas microscopías y espectroscopías avanzadas en combinación con técnicas de cultivo celular y de preparación de sustratos artificiales para el cultivo de células.

Mediante diferentes muestras, se demostró que la espectroscopía de fuerza, y en particular el modo avanzado *Peak Force QNM*, es una excelente herramienta para mapear/cuantificar las propiedades nanomecánicas de una muestra. Se logró una caracterización en función de la temperatura, no sólo de la topografía, sino también de sus propiedades, de sustratos termo-responsivos construidos a partir de multicapas intercaladas de microgel. Se observó un cambio en la topografía de la superficie que se corresponde con el cambio de fase del polímero. El análisis de las curvas de fuerza permitió determinar que el módulo de Young aumenta y que la muestra se vuelve más adherente, con la temperatura. Para el sistema nanoestructurado EPOXI-SISe reforzado con nanotubos de carbono funcionalizados con poliestireno (NTC-PS), mediante los mapas de adhesión, se resolvió la estructura interna de los nanodominos del copolímero de bloque. Además, se encontró una mayor energía disipada para el material que tiene en su composición mayor proporción de copolímero de bloque y de NTC-PS, valor hasta seis veces superior respecto al material epoxi sin modificaciones, por lo que el material tendría mayor tenacidad. Se realizó también el análisis cuantitativo de las propiedades mecánicas de bacterias Gram (+) y Gram (-) cuando son tratadas con iones y nanopartículas de plata. Se observó una disminución en la elasticidad celular, en *Staphylococcus aureus* y en *Pseudomonas aeruginosas*, en respuesta a los tratamientos con iones Ag en comparación a las bacterias control.

En la línea celular HC11, derivada de epitelio mamario de ratón, se optimizó la expresión de los plásmidos que codifican las proteínas de adhesiones focales (zixina, vinculina, paxilina, FAK, integrina) fusionadas a las proteínas fluorescentes en el

visible (VFPs: EGFP/mCherry/Venus/mTFP). La expresión de las proteínas quimera y su localización en células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio recubierto con fibronectina, se visualizó por microscopía confocal. Mediante la determinación de los parámetros cinéticos/dinámicos moleculares, por espectroscopía de fluorescencia, se evaluó la dinámica de las adhesiones focales de células cultivadas sobre sustrato no deformable. Mediante la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP), se caracterizó la cinética de disociación de la proteína zixina en células HC11 control y células tratadas con el inhibidor Y-27632, el cual disipa la tensión del citoesqueleto. Se observó que el valor promedio del k_{off} para zixina aumenta cerca de 1.5 veces con el tratamiento químico, mientras que la fracción móvil aumenta 1.2 veces con respecto al control. Estos resultados indican que la proteína zixina “sensa” y responde a fuerzas mecánicas en la línea celular HC11. Aplicando la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia (*pointFCS*), se analizaron los coeficientes de difusión efectivos de diferentes proteínas de las adhesiones focales. Se estudió la interacción de los pares de proteínas de la adhesión focal EGFP-vinculina/mCherry-Paxilina y EGFP-FAK/mCherry-Paxilina, mediante la correlación cruzada de las fluctuaciones de fluorescencia (FCCS), y se estimó una constante de asociación aparente para cada par de proteínas estudiado.

Mediante el uso de un dispositivo estirador mecánico, se evaluó la respuesta al estímulo mecánico externo a nivel de la organización y de la dinámica de adhesiones focales en células vivas. Se caracterizó y verificó el estiramiento equibiaxial, producido por el dispositivo, sobre las membranas de silicona/fibronectina en las que se cultivaron las células, y se comprobó que el estiramiento de la membrana es eficientemente transmitido a las células. Se monitorearon células HC11 sometidas a sucesivos estiramientos, en comparación con células control a tensión constante. Se observó que las adhesiones focales tienden a persistir cuando se aplica tensión a la célula, disminuyendo el número de adhesiones focales que se desensamblan y el de adhesiones nacientes. Las adhesiones focales persistentes en respuesta al estiramiento equibiaxial del sustrato, aumentan significativamente en longitud y en área en comparación con células control a tensión constante. Además, se observó que el estímulo mecánico aumenta el reclutamiento de la proteína zixina en las adhesiones focales, y dispara su translocación a los filamentos de actina. Mediante FRAP, se evaluó la cinética de disociación de la proteína zixina en células vivas en función del estiramiento equibiaxial. Se encontró que al incrementar la magnitud del estímulo mecánico, la constante de disociación de la proteína zixina disminuye

significativamente. Estos resultados extienden la naturaleza mecanosensora de la proteína zixina en la línea celular HC11.

Con el fin de correlacionar la dinámica molecular de las adhesiones focales y las fuerzas de tracción celular, en función de las propiedades mecánicas del sustrato, se implementó la microscopía de fuerzas de tracción (TFM). Mediante el uso de geles de poliacrilamida de diferente elasticidad, se generó la variación en las condiciones de contorno mecánicas para las células cultivadas sobre estos sustratos deformables. En primer lugar, se caracterizaron las propiedades mecánicas de los sustratos deformables, y de las células HC11 cultivadas sobre los distintos sustratos. Además, se evaluó el efecto de la elasticidad del sustrato sobre la cinética de disociación de la proteína zixina mediante FRAP, y sobre su difusión por *pointFCS*. Se encontró que la constante de disociación para la proteína zixina disminuye a medida que aumenta la rigidez del sustrato, mientras que su difusión no se veía alterada. Por TFM se obtuvieron mapas bidimensionales de la deformación del sustrato como consecuencia de las fuerzas transmitidas por la célula al sustrato, a partir de ellos y conociendo propiedades mecánicas del sustrato, se reconstruyeron mapas de tracción. El análisis de los mapas indicó que la magnitud de las fuerzas generadas por las células aumenta al cultivarlas sobre sustratos más rígidos. Se graficaron los datos obtenidos independientemente por TFM y por FRAP, para células (zixina) cultivadas en geles de diferente elasticidad. El análisis sugeriría que las células que generan mayores tracciones son las que presentarían adhesiones focales con menores valores de la constante de disociación de la proteína zixina. Para correlacionar en una misma célula, las fuerzas de tracción celular con la cinética de disociación de la proteína zixina, se implementó en forma conjunta un experimento de TFM y FRAP. Los datos indicarían que las fuerzas que genera y transmite la célula al sustrato son mayores en las adhesiones focales que presentan una menor constante cinética de disociación para la zixina.

En resumen, la implementación y puesta a punta de diferentes técnicas de microscopía y espectroscopía avanzadas permitieron analizar la dinámica de las adhesiones focales para correlacionar propiedades moleculares/celulares respecto de las propiedades mecánicas del entorno. Los resultados abren nuevas direcciones en el sistema en estudio de la dinámica de las adhesiones focales y el proceso de mecanotransducción celular. Por ejemplo, el análisis de la correlación de las fuerzas de tracción celular con la medición de la tensión intracelular, a nivel de adhesiones individuales, en función de la rigidez del entorno mecánico daría información sobre el

modulado de los pasos de mecnosensado y mecanotransducción. A nivel bioquímico molecular, mediante el silenciamiento de la expresión de proteínas adhesivas se expondría la regulación de las interacciones entre distintas proteínas de la adhesión focal siempre en función de la variación de las condiciones de contorno mecánico. Sin lugar a dudas, el uso de nanoscopías de super-resolución mejoraría la resolución espacial y los mapas de tracción celular.