



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

# Nanomecánica celular determinada por Microscopía de Fuerzas Atómicas - Aplicaciones en Biomedicina -

Carlos R. Guerrero Rodríguez

Tesis doctoral para optar al título de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid

Supervisada por  
Ricardo García García

Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

# Resumen / Abstract

Una de las fortalezas de la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) radica en su capacidad de obtener y evaluar propiedades mecánicas de materiales de forma cuantitativa. Este hecho ha abierto las puertas a la implantación de este tipo de instrumentación a campos como la biomedicina y los biomateriales, no solo proporcionando imágenes topográficas de alta resolución, sino también caracterizando la respuesta mecánica de gran variedad de muestras.

Esta tesis doctoral ha estado basada en la caracterización de las propiedades mecánicas tanto de células como de tejidos biológicos, teniendo como objetivo el dar una mayor precisión y consistencia a los análisis basados en medidas realizadas por AFM. El primer capítulo introduce de forma general la relación entre la microscopía y la biología a lo largo de la historia. Se centra en la configuración del AFM, la calibración del instrumento, su uso como herramienta cuantitativa y el experimento denominado como curva de fuerza-distancia. Posteriormente, se introduce lo denominado como “espectroscopía de fuerzas clásicas” en mecánica de contacto y el concepto de módulo de Young, incluyendo gráficas con las durezas de los materiales más emblemáticos.

En el segundo capítulo se discuten las diferencias que hay entre los modelos infinitos puramente elásticos y las muestras biológicas a la que nos enfrentamos (efecto del sustrato, corteza celular y comportamiento viscoelástico). Se describen los distintos conceptos que abarca la viscoelasticidad, introduciendo los modelos mecánicos constitutivos usados más frecuentemente. Y se finaliza con una introducción a los distintos procedimientos y técnicas experimentales existentes en la actualidad para obtener información viscoelástica de células.

El conocimiento introducido en los dos primeros capítulos ve su fruto en el tercero. En este capítulo se desarrolla una metodología para la determinación de propiedades mecánicas en materiales viscoelásticos (células) a partir de experimentos de indentación con AFM. Se estudia el comportamiento reológico de fibroblastos para frecuencias en el rango de 0.2 a 4 Hz, y se analizan los cambios en las propiedades mecánicas de dichos fibroblastos ante modificaciones químico-temporales en el entorno celular.

Hasta ahora se había analizado la respuesta mecánica de la célula de forma global. En el cuarto capítulo se utiliza la teoría elaborada en el capítulo anterior con el fin de desarrollar una metodología capaz de obtener mapas tridimensionales de información mecánica, que lleven a visualizar y analizar heterogeneidades propias de las células. Esta metodología, que además de AFM combina técnicas como fluorescencia y simulaciones por elementos finitos, tendrá como

fin último el detectar contribuciones de estructuras y arquitecturas internas de la célula a partir de los mapas de propiedades mecánicas.

La tesis concluye con dos aplicaciones dentro del mundo de la biomedicina y los biomateriales, correspondientes al quinto y sexto capítulo. Primero, se estudiará desde el punto de vista mecánico la influencia y posibles ventajas que tienen los implantes basados en espumas tridimensionales porosas de óxido de grafeno reducido en la regeneración neural de ratas con una hemisección crónica de la médula espinal. Y segundo, se investigará el papel que juega la Caveolina-1 y las caveolas en los mecanismos, principalmente mecanobiológicos, relacionados con el almacenamiento de grasa. Todo ello conteniendo estudios de la respuesta mecánica, tanto a nivel tisular como celular.

# Índice

<b>Resumen / Abstract</b> .....	1
---------------------------------	---

<b>Capítulo 1. Introducción al microscopio de fuerzas atómicas y su aplicación en sistemas biológicos</b> .....	1
---	---

1.1. Introducción general a la microscopía relacionado con la biología.....	1
1.2. Principios y magnitudes básicas del AFM .....	3
1.3. Calibración del instrumento.....	5
1.4. El AFM como herramienta cuantitativa – La curva de fuerza-distancia .....	9
– 1.4.1. Determinación del punto de contacto .....	10
1.5. Modelos de mecánica de contacto .....	12
1.6. El Modulo de Young (elasticidad) de muestras biológicas.....	17
– 1.6.1. Tejidos biológicos del cuerpo humano.....	19
1.7. Referencias.....	20

<b>Capítulo 2. Viscoelasticidad y diferencias respecto al modelo infinito - hertziano</b> .....	25
---	----

2.0. Introducción .....	25
2.1. Limitaciones de los modelos hertzianos para la extracción de propiedades mecánicas de células con AFM .....	27
– 2.1.1. Corrección debido a los efectos del substrato.....	27
– 2.1.2. Efecto del “ <i>actin cortex</i> ” en los valores extraídos de Modulo de Young .....	30
2.2. Viscoelasticidad.....	32
– 2.2.1. Modelos mecánicos constitutivos.....	34
2.3. Métodos experimentales para medir las propiedades viscoelásticas de células con un AFM .....	38

2.4. Otros métodos para lograr extraer propiedades mecánicas de células más allá del AFM .....	40
2.5 Referencias.....	44

<b>Capítulo 3. Determinación de propiedades mecánicas de células vivas y su evolución ante la despolimerización del citoesqueleto .....</b>	<b>47</b>
3.0. Introducción .....	47
3.1. Teoría viscoelástica para indentaciones 3D .....	49
3.2. Métodos Experimentales .....	53
– 3.2.1. Cultivo celular y preparación de muestras.....	53
– 3.2.2. Microscopía y espectroscopía de fuerzas .....	53
– 3.2.3. La presencia del “ <i>drag</i> ”, efectos y corrección.....	55
– 3.2.4. Tratamiento químico para la depolimeración del citoesqueleto.....	58
3.3. Resultados y discusión .....	58
– 3.3.1. Cálculo de propiedades viscoelásticas de células vivas ( $E$ , $E_{loss}$ , $\eta$ y $\tau$ ) .....	58
– 3.3.2. Estudio reológico de MEFs a baja frecuencia de modulación (0.2 - 4 Hz) .....	60
– 3.3.3. Estudio temporal de la respuesta celular ante la acción de la “ <i>Cyt-D</i> ” .....	63
3.4. Conclusiones.....	67
3.5. Referencias.....	68

<b>Capítulo 4. Visualización tridimensional de la arquitectura celular. Estudio tomográfico para la detección directa de los nucléolos y el citoesqueleto .....</b>	<b>71</b>
4.0. Introducción .....	71
4.1. Modos de obtención de mapas de propiedades mecánicas en células con un AFM .....	73
4.2. Métodos experimentales .....	76
– 4.2.1. Cultivo celular y preparación de muestras.....	76
– 4.2.2. Imagen óptica y de fluorescencia.....	76
– 4.2.3. Espectroscopía de fuerzas y “ <i>Force Volume</i> ” .....	77
– 4.2.4. Análisis de los datos experimentales .....	78
– 4.2.5. Efectos de “ <i>drag</i> ” hidrodinámico para distintos tamaños de micropalanca ....	78
– 4.2.6. Simulaciones por elementos finitos .....	79
4.3. Resultados y discusión .....	79
– 4.3.1. Metodología para caracterización de las propiedades mecánicas de la célula 79	
– 4.3.2. “Pseudotopografía” y caracterización del citoesqueleto.....	81

– 4.3.3. Correlación de las propiedades mecánicas y topográficas con las imágenes de fluorescencia .....	83
– 4.3.4. Coeficiente de viscosidad, tiempo de relajación y nucléolos.....	85
– 4.3.5. Estudio del posicionamiento tridimensional de los elementos internos de la célula .....	87
4.4. Conclusiones.....	92
4.5. Referencias.....	93

## **Capítulo 5. Biomedicina y Biomateriales I: Regeneración neural mediada por espumas de óxido de grafeno reducido en médula espinal de ratas con hemisección cervical crónica .....**

5.0. Introducción .....	99
5.2. Métodos experimentales .....	101
– 5.2.1. Fabricación de puntas esféricas de gran diámetro para aplicaciones biológicas con AFM .....	101
– 5.2.2. Microscopía de fuerzas atómicas y espectroscopía de fuerzas. ....	104
– 5.2.3. Análisis estadístico .....	107
5.3. Resultados y discusión .....	108
– 5.3.1. Caracterización mecánica de los rGO “ <i>scaffolds</i> ” y su comparación con el tejido de médula espinal y neuronas corticales individuales.....	108
– 5.3.2. Estudio del efecto del implante de rGO “ <i>scaffolds</i> ” sobre la respuesta mecánica del tejido de la médula espinal lesionada .....	110
– 5.3.3. Caracterización de la regeneración neural más allá de las propiedades mecánicas.....	112
5.4. Conclusiones.....	113
5.5. Referencias.....	114

## **Capítulo 6. Biomedicina y Biomateriales II: Principios mecanobiológicos de la lipodistrofia analizados por AFM .....**

6.0. Introducción .....	117
6.1. Teoría. Deformación de membranas (modelo de tensiones) .....	120
6.2. Métodos experimentales .....	123
– 6.2.1. Modelos de ratón, dietas y seguimiento de la evolución de pesos.....	123
– 6.2.2. Obtención de tejidos, procesado histológico, imágenes TEM y cuantificación de fibrosis.....	124
– 6.2.3. Protocolo de diferenciación para obtención de adipocitos cultivados <i>in vitro</i> .....	124

– 6.2.4. Espectroscopía de fuerzas por AFM .....	125
– 6.2.5. Análisis estadístico .....	126
6.3. Resultados y discusión .....	126
– 6.3.1. Estudio de masa corporal y pesos de depósitos grasos .....	127
– 6.3.2. Caracterización mecánica de tejidos adiposos de ratones tipo WT, KI y KO ..	129
– 6.3.3. Caracterización de adipocitos diferenciados <i>in vitro</i> de los tres genotipos (WT, KI y KO) .....	132
– 6.3.4. Análisis alternativo de los adipocitos por medio del modelo de tensiones....	134
6.4. Conclusiones.....	136
6.5. Referencias.....	137
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>139</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>141</b>
A.1. Información suplementaria al Capítulo 2 .....	141
– A.1.1. Experimentos para la detección de los efectos del “ <i>actin cortex</i> ” sobre las medidas del módulo de Young .....	141
– A.1.2. Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida (PA).....	144
A.2. Información suplementaria al Capítulo 3 .....	145
– A.2.1. Protocolo de cultivo celular .....	145
A.3. Información suplementaria al Capítulo 4 .....	148
– A.3.1. Protocolo de tinción de células fijadas .....	148
– A.3.2. Protocolo de tinción de células vivas.....	149
– A.3.3. Detalles sobre la obtención del canal de “pseudotopografía” .....	150
– A.3.4. Aplicabilidad de la metodología de estudio tridimensional a células vivas....	153
A.4. Información suplementaria al Capítulo 5 .....	154
– A.4.1. Tablas de los estudios estadísticos desarrollados .....	154
A.5. Información suplementaria al Capítulo 6 .....	155
– A.5.1. Tablas de los estudios estadísticos desarrollados .....	155
– A.5.2. Comparativa por ajustes lineales entre el modelo elástico de Hertz y el modelo de tensiones .....	157
A.6. Referencias.....	157
<b>Lista de símbolos y acrónimos.....</b>	<b>159</b>
<b>Lista de publicaciones.....</b>	<b>163</b>

# Capítulo 1

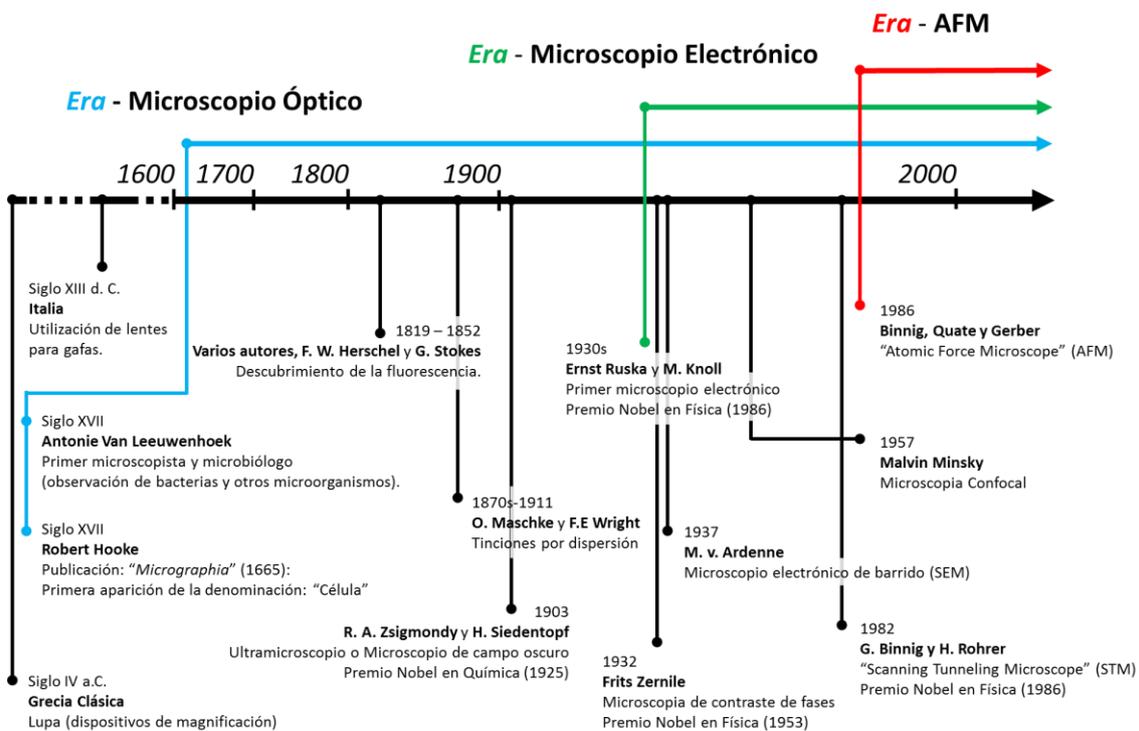
## Introducción al microscopio de fuerzas atómicas y su aplicación en sistemas biológicos

### 1.1. Introducción general a la microscopía relacionado con la biología

La historia y el desarrollo de la biología han estado siempre ligados al potencial de poder visualizar y observar seres vivos. Esto ha supeditado el avance en el campo de la biología al desarrollo de todo tipo de microscopías. Es más, aventurándonos incluso a decir que los avances en microscopía han revolucionado la biología, hasta el punto de ser responsables de la aparición de una de sus principales áreas de investigación, como es la histología o estudio de la anatomía de tejidos y células tanto animales como vegetales.

En los albores de la civilización occidental, los primeros dispositivos de magnificación, o lupas, fueron ideados en la Grecia de la Edad Antigua<sup>1</sup>. Habría que esperar hasta bien entrada la Baja Edad Media, s. XIII italiano, para que se fabricarán las primeras lentes para uso en gafas<sup>2</sup>. En el s. XVII de la mano de Antoine Van Leeuwenhoek, utilizando un microscopio de una sola lente fabricado por el mismo, se establecieron las primeras investigaciones relacionadas con la microbiología: observaciones de bacterias, protistas y diversos microorganismos (“*animálculos*” fue la denominación aportada por el propio A. V. Leeuwenhoek a dichas observaciones)<sup>3,4</sup>. Este pionero de la ciencia está considerado el precursor de la microbiología y biología celular. Simultáneamente, el físico Robert Hooke en 1665 publicó el libro titulado “*Micrographia*”, en el cual describe un trabajo original de biología usando un microscopio. En este trabajo, introdujo por primera vez el término “*célula*”, observando células vegetales

muerdas con su típica forma poligonal<sup>5</sup>. En el s. XIX se inventaron las tinciones por dispersión, basándose en los distintos índices de refracción de los materiales (O. Maschke y F. E Wright)<sup>6</sup>. R. A. Zsigmondy y H. Sidentopf en 1903 desarrollaron el “*ultramicroscopio*” o microscopio de campo oscuro<sup>7,8</sup>, uno de los primeros intentos de superar el límite de difracción de Abbe (1873), que establece el límite de resolución de los sistemas ópticos en aproximadamente 200 nm. Mención especial merecen los trabajos de nuestro Premio Nobel en medicina (1906), Santiago Ramón y Cajal, quien utilizando microscopios ópticos y distintos sistemas de contraste llegó a establecer la estructura del sistema nervioso<sup>9</sup>. Entre 1911-1913, las compañías Carl Zeiss y Karl Reichert desarrollaron la microscopía de fluorescencia<sup>10</sup>. Posteriormente, el método de contraste de fases fue inventado por Frits Zernile, siendo una técnica microscópica muy útil para células vivas, permitiendo identificar componentes o partes de las mismas con distinto índice de refracción<sup>11</sup>. Esto le valió para obtener el Premio Nobel de Física en 1953. En 1957 gracias a la contribución de Malvin Misky, el microscopio confocal vio la luz, representado en su utilización junto con la microscopía de fluorescencia, una de las principales técnicas de caracterización de sistemas biológicos en la actualidad<sup>12</sup>.



**Figura 1.1.** Línea temporal que abarca los mayores hitos de la microscopía que han jugado un papel importante en el desarrollo de la biología. Se ha destacado la invención del microscopio óptico en azul, el desarrollo del primer microscopio electrónico en verde y la invención del primer microscopio de fuerzas atómicas en rojo. Cada una de las tres representa grandes avances tanto en el mundo de la microscopía como de la biología.

Uno de los grandes saltos en el mundo de la microscopía fue dado durante la década de los años 30 (siglo XX). Ernst Ruska y M. Knoll desarrollaron el primer microscopio electrónico, valiéndole a E. Ruska para obtener el Premio Nobel de Física en 1986<sup>13</sup>. En 1937 M. v. Ardenne construyó el primer microscopio electrónico de barrido (SEM; por siglas en inglés: “*Scanning Electron Microscope*”)<sup>14</sup>. Este microscopio presentó toda una revolución en el campo de la biología, principalmente como herramienta en la investigación de componentes sub-celulares como proteínas y la estructura del virus.

En 1982, con la invención del microscopio de efecto túnel (STM por sus siglas en inglés “*Scanning Tunneling Microscope*”) una nueva rama de la ciencia emergía para convertirse en uno de los grandes focos de actividad, creatividad y conocimiento en las décadas venideras. La comunidad científica dio la bienvenida al STM de una forma prácticamente inmediata. La extraordinaria capacidad que el STM presentaba para la visualización de estructuras a escala atómica en superficies metálicas y superconductores<sup>15-17</sup>, no encontraba rival en aquellos momentos. Incluso actualmente, sigue siendo un referente. Años después, en 1986, el microscopio de fuerzas atómicas (AFM por sus siglas en inglés “*Atomic Force Microscope*”) fue desarrollado por Binnig y colaboradores<sup>18</sup>, siendo capaz de conseguir resolución molecular y atómica en superficies sólidas. La gran ventaja que el AFM representó respecto al STM, fue su operatividad sobre muestras no conductoras, mientras que el STM requería de forma imperativa un material electro conductor.

A pesar del mencionado límite de difracción, en la actualidad existen una serie de técnicas englobadas en lo denominado como microscopía de super-resolución capaces de superar dicho límite y llegar a resoluciones de 20 a 50 nm. Estas son técnicas basadas en marcadores de fluorescencia, y entre las más conocidas están “*stimulated emission depletion*” (STED), “*photoactivated localization microscopy*” (PALM) y “*stochastic optical reconstruction microscopy*” (STORM). Todas ellas representan un competidor directo del AFM para la visualización de estructuras internas de la célula a escala nanométrica<sup>19-21</sup>.

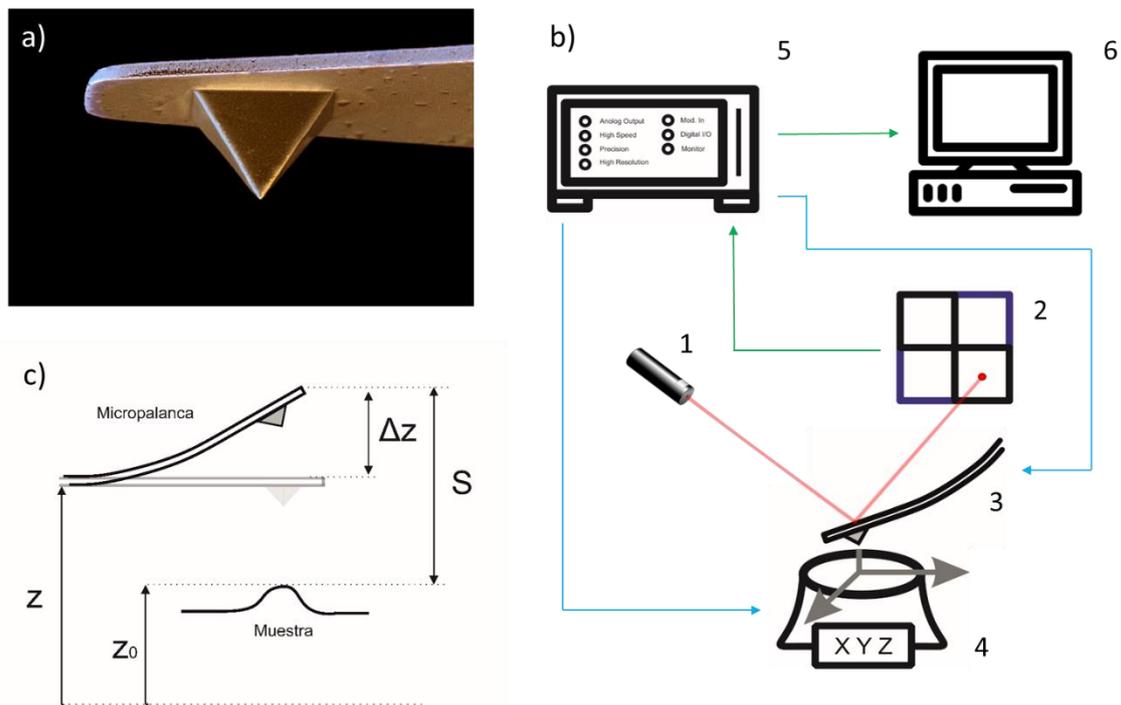
En este primer capítulo introduciremos los principios básicos que rigen la física de un microscopio de fuerzas atómicas, incluyendo la calibración de los elementos constitutivos del mismo. Asimismo, presentaremos el experimento fundamental alrededor del cual orbita esta tesis doctoral: la curva de fuerza-distancia; y los principales modelos de mecánica de contacto que nos permitirán extraer información intrínseca y cualitativa de los materiales estudiados. Para terminar, comentaremos la importancia que han tenido las propiedades mecánicas de los materiales, particularmente relacionadas con la rigidez (módulo de Young), a la hora de investigar los mecanismos que rigen los comportamientos de los sistemas biológicos.

## 1.2. Principios y magnitudes básicas del AFM

El principio que rige el funcionamiento del instrumento científico conocido como AFM tiene cierta similitud con el sentido del tacto. Si una persona se viese privada de la visión, tendería a recurrir a utensilios, como una guía o bastón blanco, para poder discernir la forma y localización de los objetos que le rodean. Este comportamiento es la base sobre la cual se ha desarrollado el AFM, un instrumento que consta de una sonda (figura 1.2.a) que realizará un movimiento o barrido sobre una muestra, a la vez que detecta simultáneamente la topografía de la misma. Como es de esperar, el AFM es un maquina altamente sofisticada asistida por una electrónica puntera que realiza un escaneo con un control exhaustivo y minucioso. Este tipo de microscopios está comúnmente formado por una serie de elementos principales, los cuales se encuentran representados y enumerados en el esquema expuesto en la figura 1.2.b.

A continuación, se describirá más en detalle estos componentes esenciales del AFM. Para empezar, la sonda consiste en una micropalanca o “*cantilever*” terminada en una punta con una geometría determinada, normalmente cónica o esférica. El sistema de detección, en su configuración más extendida, está basado en la detección de un haz láser (OBD, por sus siglas

inglés: “*Optical Beam Deflection*”) que ha sido reflejado en la parte trasera de una micropalanca. El ángulo con el que se refleja el haz nos permitirá medir cambios en la deflexión del micropalanca<sup>22,23</sup>. Para registrar estos cambios en la posición del haz se utiliza un sistema de fotodiodos. Dicho sistema está dividido en cuatro diferentes secciones o paneles pudiendo medir deflexiones tanto flexurales como torsionales del micropalanca. Por su parte, el escáner está compuesto por un sistema de transductores piezoeléctricos que permiten un posicionamiento espacial altamente preciso de la punta con respecto a la muestra (llegando a resolución atómica), tanto en el eje horizontal x-y como el vertical z. Por último, el controlador proporcional-integral-derivativo (PID) detecta la señal recogida por el fotodiodo y calcula los cambios necesarios para mantener el parámetro de retroalimentación o “*feedback*” en el valor requerido (previamente establecido por el usuario).



**Figura 1.2.** a) Imagen SEM modificada de una micropalanca típica de AFM con punta piramidal (fuente: © Science Photo Library). b) Ilustración esquemática de un AFM con cada uno de sus principales componentes marcados: 1. Laser; 2. Fotodiodo; 3. Micropalanca; 4. Escáner; 5. Controlador; y 6. Ordenador (PC). c) Representación de las distancias y magnitudes presentes en la configuración de un AFM típico.

Con el fin de procurar análisis cuantitativos de la información adquirida por el microscopio de fuerzas atómicas es necesario definir una serie de magnitudes físicas y consideraciones geométricas. En la configuración que presentamos en la figura 1.2.c,  $S(t)$  representa la distancia punta muestra instantánea,  $Z_0$  la posición de la muestra respecto a un sistema de referencia determinado,  $Z(t)$  la posición de la base de la micropalanca conforme al mismo sistema de referencia y  $\Delta z$  representa la variación en la deflexión de la micropalanca. Tanto  $Z(t)$  como  $\Delta z$  son magnitudes directamente obtenidas por el microscopio, una gracias a la lectura de los piezoeléctricos ( $Z(t)$ ) y la otra mediante la lectura de la deflexión de la micropalanca por parte del sistema de detección de fotodiodos ( $\Delta z$ ). Como es de esperar, para obtener valores fiables de estos parámetros será necesaria una apropiada calibración del equipo (ver sección 1.3. de este capítulo: Calibración del instrumento). En cambio,  $Z_0$  es una magnitud que no es aportada directamente por el microscopio, para determinar la posición de

la muestra será necesario hacer experimentos complementarios (en general mediante curvas de fuerza-distancia, explicado en la sección 1.4). La relación matemática entre estas magnitudes viene determinada por la ecuación 1.1.

$$S(t) = Z(t) + \Delta z(t) - Z_0 \quad (1.1)$$

### 1.3. Calibración del instrumento

El AFM es una herramienta analítica capaz de medir propiedades locales de forma precisa a escala nanométrica e incluso inferior. Uno de los pasos más importantes y clave para un correcto uso de un AFM es la calibración de los distintos parámetros, especialmente, si se requiere de una extracción de propiedades cuantitativas a raíz de los observables. En concreto, existen tres elementos principales que deben ser calibrados: el escáner piezoeléctrico, la sensibilidad del fotodiodo y la constante de fuerza de la micropalanca.

**Escáner piezoeléctrico.** Para llevar a cabo movimientos precisos en la escala de los nanómetros e inferior, el AFM está equipado con un sistema de piezoeléctricos, el cual permite movimientos altamente precisos en las tres direcciones espaciales (x-y-z). La sensibilidad de los transductores piezoeléctricos está directamente relacionada con cuanto se ha expandido o contraído el piezoeléctrico por voltio aplicado<sup>24</sup>. Desafortunadamente esta relación es exclusivamente lineal para unos rangos muy pequeños de desplazamiento. Como consecuencia, es necesaria una calibración rutinaria y cuidadosa. Existen diferentes procedimientos para calibrar los piezoeléctricos de un sistema de este tipo, entre los que se encuentran métodos basados en interferometría óptica<sup>25</sup>, en sensores de desplazamiento por inductancia<sup>24</sup> y, los más comúnmente usados, basados en el escaneo de muestras o especímenes de calibración<sup>26,27</sup>.

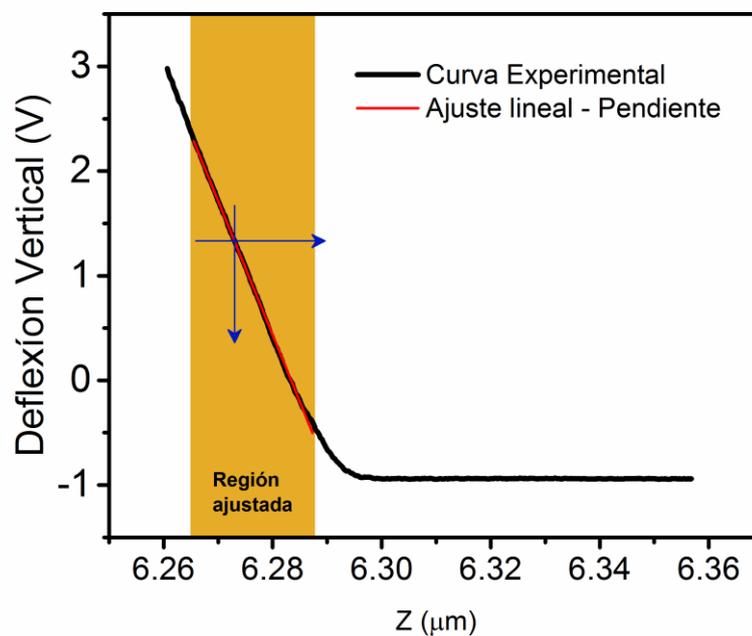
**Sensibilidad del fotodiodo.** La calibración de la sensibilidad del fotodiodo nos permite correlacionar los cambios en voltaje medidos por el fotodiodo (relacionados con la deflexión de la micropalanca) con valores de distancia realizados por los piezo-actuadores. El valor obtenido para la sensibilidad será exclusivo y dependerá del tipo de micropalanca que estemos utilizando. Además, el camino óptico realizado por el láser del fotodiodo también afectará la sensibilidad. Esto implica que la calibración y, por consiguiente, el valor obtenido para la sensibilidad, dependerá de la posición en la cual coloquemos el haz del láser sobre la micropalanca.

El método más extendido entre los usuarios de AFM para obtener la sensibilidad del fotodiodo consiste en la realización de curvas de fuerza-distancia sobre una muestra hecha de un material no deformable, típicamente se usa mica<sup>28</sup>. La figura 1.3 muestra un ejemplo de curva de fuerza-distancia. Una vez la punta de la micropalanca toca la muestra (considerada indeformable), todo el movimiento que hacen los piezos es debido a que el micropalanca se está curvando (deflectando). Por tanto, midiendo la pendiente de la curva en la zona de contacto es posible determinar la relación entre el desplazamiento del piezo ( $\Delta z$  [nanómetros]) y el voltaje medido en el fotodetector ( $\Delta V$  [voltios]), lo cual nos dará información sobre cuanto se ha deflectado la micropalanca para un cierto cambio en voltajes del fotodiodo. Los valores que se obtengan para la sensibilidad del fotodiodo vendrán

determinados por la configuración experimental utilizada; como por ejemplo el tipo de punta que estemos usando, el medio en el cual se trabaja o la posición del haz de laser sobre la micropalanca. La sensibilidad viene determinada por la siguiente expresión:

$$S_d \equiv \text{Sensibilidad} = \frac{\Delta V}{\Delta z} \left( \frac{\text{voltios}}{\text{nm}} \right) \quad (1.2)$$

Existen métodos más elaborados y no invasivos, pero menos frecuentes, para medir la sensibilidad. Estos están basados en las fluctuaciones térmicas de la posición de la micropalanca<sup>29-31</sup>.



**Figura 1.3.** Curva de calibración ilustrativa del método. En concreto esta curva fue tomada con una punta tipo BL-AC40TS-C2 inmersa en un buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés: “Phosphate Buffered Saline”) y sobre una muestra de vidrio. La sensibilidad se obtuvo ajustando por regresión lineal la curva experimental en la zona sombreada. En concreto la sensibilidad obtenida para el fotodiodo de nuestro JPK Nanowizard 3 fue de aproximadamente 8 nm/V.

**Calibración de la constante de fuerzas del micropalanca.** El objetivo de esta última calibración es ser capaces de transformar la deflexión de la micropalanca ya obtenida (nanómetros) en valores de fuerza ejercida por la punta (comúnmente nanonewtons, para experimentos en células y tejidos biológicos). Si consideramos la micropalanca como un elemento acorde a la ley de Hooke, con una constante de fuerzas  $k$ , y una deflexión  $\Delta z$ , la fuerza nos viene dada por:

$$F = -k \Delta z \quad (1.3)$$

A raíz de esta expresión y a fin de obtener la fuerza ejercida por la micropalanca, necesitamos un procedimiento para calcular la constante de fuerza del mismo ( $k$ ). A continuación, introduciremos los dos métodos más populares y extendidos en la comunidad de AFM para

determinar el valor de  $k$  de una micropalanca, que son el denominado método de Sader y el método del ruido térmico.

Método de Sader. Conociendo tanto la geometría de la micropalanca como sus propiedades intrínsecas es posible determinar la constante de fuerza de la micropalanca ( $k$ ). Sader et al.<sup>32</sup> desarrollaron un método capaz de obtener el valor de la constante de fuerza de una micropalanca rectangular, sabiendo la masa de la micropalanca ( $m$ ) y su frecuencia de resonancia en vacío ( $\omega_{vac}$ ), basándose en consideraciones dimensionales y definiendo ciertos parámetros invariantes a la longitud de escala. Para una micropalanca rectangular oscilando en vacío la solución viene dada por la ecuación 1.4. Dicha expresión está constituida por la constante de la micropalanca expresada en función de la densidad de la micropalanca ( $\rho_c$ ), la masa efectiva normalizada  $M_e$  ( $M_e = 0.2427$  si  $L/b_c > 5$ ), y sus dimensiones ( $h_c$ ,  $b_c$  y  $L$ : grosor, anchura y longitud, respectivamente),

$$k = M_e \rho_c b_c h L \omega_{vac}^2 \quad (1.4)$$

Posteriormente, extendieron el problema al caso de la micropalanca rectangular rodeado por un fluido, con cierta viscosidad y densidad<sup>33,34</sup>. Esto permitió su aplicación en el campo de la biología, ya que comúnmente, las muestras biológicas se encuentran sumergidas en algún tipo de buffer o medio de cultivo. En la ecuación 1.5 podemos observar como en este caso la constante de fuerza depende de la frecuencia de resonancia de la micropalanca en el fluido ( $\omega_f$ ), la parte imaginaria de la función hidrodinámica ( $\Gamma_i$ ; dependiente de la forma de la micropalanca) y el factor de calidad en dicho fluido ( $Q_f$ ).

$$k = 0.1906 \rho_f b_c^2 L Q_f \Gamma_i(\omega_f) \omega_f^2 \quad (1.5)$$

Recientemente, el método ha sido modificado para aceptar una forma arbitraria de la micropalanca (triangular entre ellas), adaptando la función hidrodinámica para las distintas geometrías<sup>35</sup>. Asimismo, el grupo de Sader ha introducido modificaciones en la formulación que permiten obviar la función hidrodinámica, usando en su lugar calibraciones de micropalancas de referencia con la misma geometría<sup>36,37</sup>.

Método del ruido térmico<sup>38-40</sup>. Una micropalanca vibrando bajo efectos de ruido térmico obedece el teorema de equipartición. Este teorema establece que, dado un sistema en equilibrio térmico, cada uno de los términos cuadráticos independientes en su energía total tiene una contribución media igual a  $\frac{1}{2} k_B T$ . Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. Esto implica que cada uno de los modos vibracionales de la micropalanca tiene una energía cinética y potencial igual a  $\frac{1}{2} k_B T$ , para cada una de ellas.

Para el caso particular de una micropalanca vibrando, la media de la energía potencial del sistema viene determinada por la media de la deflexión al cuadrado  $\langle z^2 \rangle$  (en la dirección vertical) multiplicada por la constante de fuerza  $k$ . Por tanto, el teorema de equipartición nos relaciona la amplitud del ruido térmico con la constante de la micropalanca por medio de la siguiente expresión:

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle z^2 \rangle \quad (1.6)$$

El desplazamiento cuadrático medio  $\langle z^2 \rangle$  puede ser calculado en el espacio real, o través de su equivalente en el espacio de Fourier (frecuencias) por medio de la “*power spectral density*” (por sus siglas en inglés: PSD; también conocido como señal espectral definida en potencia). Una vez obtenido la PSD de la micropalanca nos centraremos en el pico de menor frecuencia de resonancia, correspondiente al modo fundamental<sup>41,42</sup>. Sobre él ajustaremos una función tipo oscilador armónico. Esto nos permitirá extraer la  $\langle z^2 \rangle$  debido al ruido térmico, y por tanto, la constante de fuerza  $k$  de nuestra micropalanca mediante la ecuación (1.6).

S. M. Cook et al.<sup>42</sup> compararon los dos métodos expuestos para calcular la constante de fuerza en una gran variedad de micropalancas, caracterizadas por pertenecer a un amplio rango de órdenes de magnitud en  $k$ . Encontraron una buena concordancia entre los valores obtenidos por ambos métodos concluyendo que ambos deberían usarse como norma para la calibración de la constante de fuerza en el campo del AFM.

#### Otras consideraciones.

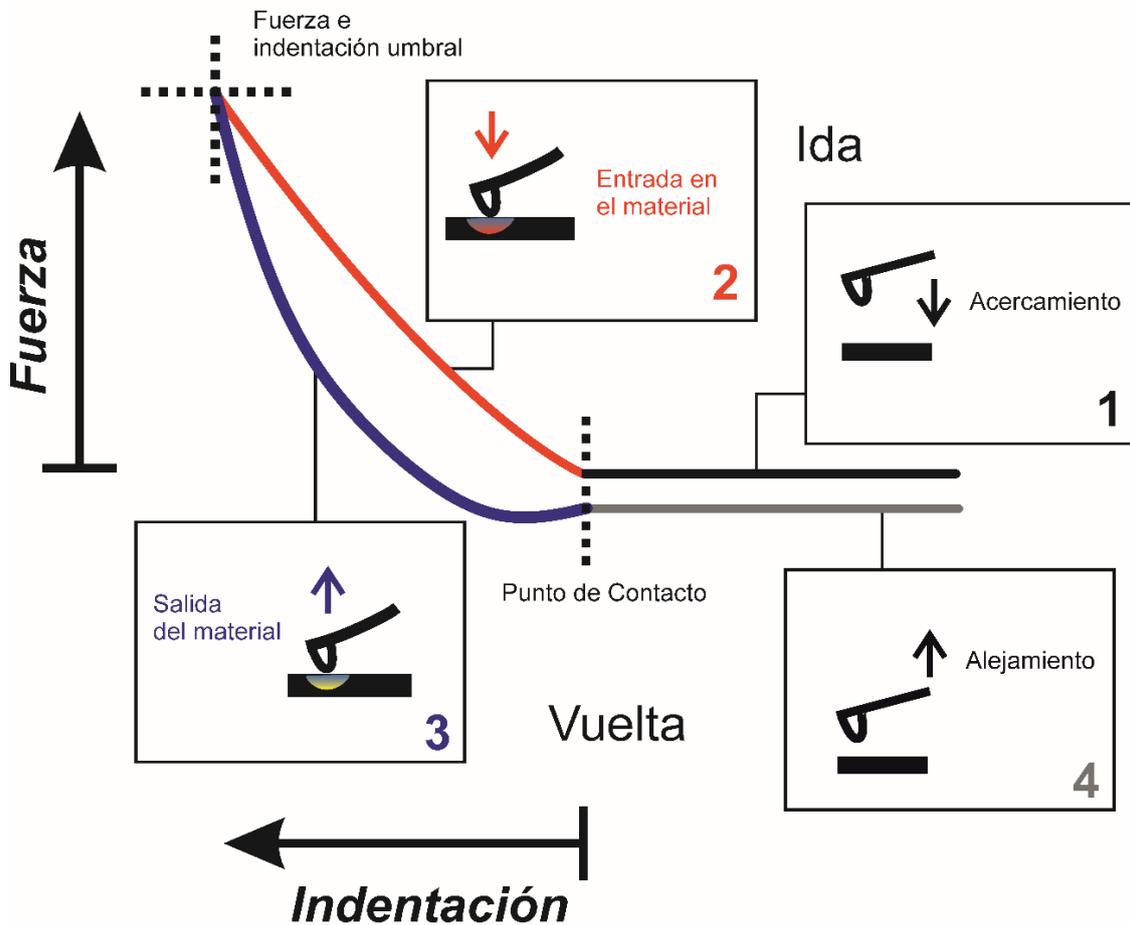
Inclinación de la micropalanca. En la configuración de un microscopio de fuerzas atómicas, la micropalanca se encuentra inclinada con respecto al eje horizontal  $\alpha$  grados. Esto es un factor que a priori debería tomarse en consideración para la calibración de la constante de fuerzas, pero utilizando el ruido térmico medido por el AFM para obtener dicha constante nos ahorra este factor<sup>43</sup>. Al medir la deflexión aparente con el fotodiodo, únicamente obtendremos una de las componentes de la verdadera deflexión de la micropalanca. Por tanto, mediante el método del ruido térmico (utilizando un fotodiodo) no obtendremos la  $k$  real, sino una aparente o efectiva,  $k_{AFM}$  (subestimada respecto a la real). Esta última es en realidad la válida para las medidas tomadas al trabajar con un AFM. Sin embargo, si queremos comparar este constante de fuerza aparente con la real (por ejemplo: calculada por el método de Sader o con un interferómetro, el cual mide la deflexión real y exacta de la micropalanca) tendremos que aplicar la siguiente corrección<sup>44</sup>:

$$k_{AFM} = \frac{k_{real}}{\cos^2 \alpha} \quad (1.7)$$

Función para ajustar en el espectro de ruido térmico de la micropalanca. La función más comúnmente usada para ajustar este tipo de espectros es la del oscilador armónico amortiguado. Este sistema puede representar de forma aproximada el comportamiento para un único modo de vibración, cuando la micropalanca se encuentra inmersa en un medio viscoso. Para el caso de aire, con un factor de calidad cercano a 100, este modelo se ajusta de forma precisa a los datos experimentales del espectro de ruido térmico. En cambio, para micropalancas con constante de fuerza menor (como los usados en muestras biológicos) inmersos en un medio acuoso con una  $Q$  del orden de 1, existen modelos más acertados para describir esta señal. Pirzer and Hugel<sup>45</sup> propusieron la utilización de una función Lorentziana en vez del oscilador armónico amortiguado.

## 1.4. El AFM como herramienta cuantitativa – La curva de fuerza-distancia

Aunque inicialmente fuese diseñado para ello, el AFM no es exclusivamente una herramienta de adquisición de imágenes de topografía a alta resolución. Puede ser igualmente usada para extraer información cuantitativa sobre la respuesta mecánica de cualquier muestra. El AFM es capaz de medir curvas de fuerza versus distancia, o como es comúnmente denominado, curvas de fuerza (FC por sus siglas en inglés “Force Curves”). Estas curvas pueden proporcionar información perteneciente a parámetros como elasticidad, viscosidad, adhesión, constante de Hamaker<sup>46</sup>, densidad de carga superficial<sup>47,48</sup>, entre otros. Esta capacidad es la razón por la cual este tipo de técnica experimental se ha convertido en una pieza esencial en campos de investigación tan variados como la ciencia de superficies, la biología y la ingeniería de materiales<sup>49,50</sup>.



**Figura 1.4.** Procedimiento detallado de la aplicación de una curva de fuerza-distancia. Los pasos 1 y 4 corresponden con periodos de ausencia de contacto entre la punta y la muestra, uno para realizar el acercamiento, y otro el alejamiento. Por otro lado, las etapas 2 y 3 corresponden con fases de contacto punta-muestra, en las cuales se está indentando dicha muestra, sea para entrar o salir de la misma. Lo que se denomina como ida engloba los pasos 1 y 2, y la vuelta los pasos 3 y 4. Todos ellos, en su conjunto, forman un ciclo entero de curva fuerza-distancia.

La curva de fuerza-distancia es uno de los experimentos más comunes cuando se está operando un AFM. El proceso está basado en el uso de una punta de AFM con el fin de aplicar una fuerza sobre la muestra, mientras que simultáneamente se mide cómo dicha muestra se deforma en respuesta a esta tensión. Como ya pudimos observar con anterioridad, la fuerza ejercida sobre la muestra no es uno de los observables directos medidos por el AFM. Son variaciones en ángulos debido a cambios en la deflexión de la micropalanca lo que realmente se mide, hecho que otorga un rol fundamental a la calibración para obtener magnitudes físicas cuantitativas con el AFM mediante las curvas de fuerza-distancia (ver sección 1.3 sobre calibración). Detalles sobre el proceso que envuelve la curva de fuerza-distancia se encuentran ilustrados en la figura 1.4. Inicialmente, la punta de AFM se irá acercando paulatinamente al material (1). Por consiguiente, al no existir aún contacto entre ambos, la fuerza medida es nula y se manifiesta como una línea plana en la curva de fuerzas (“*baseline*”). En el preciso instante en que la punta de AFM empieza a ser afectada por fuerzas repulsivas, se considera que está en contacto con la muestra (punto de contacto). Los piezos seguirán moviendo la base de la micropalanca en la misma dirección hasta que se alcance un umbral de fuerza o indentación (parámetro a elección del usuario) (2). En este segundo tramo, la punta de AFM se encuentra penetrando o indentando la muestra. Una vez es alcanzado este umbral predefinido, la dirección del movimiento de la punta es revertida, empezando el camino de vuelta (3). La fuerza aplicada sobre el material irá disminuyendo hasta perder de nuevo el contacto con la muestra. Finalmente, la punta se alejará de la muestra presentando de nuevo una línea plana en la curva de fuerza, ya que vuelve a no existir contacto entre ambos elementos (4).

El procedimiento descrito es comúnmente realizado de forma continuada y cíclica. Cada uno de los ciclos se puede dividir en dos etapas bien diferenciadas correspondientes a diferentes direcciones de movimiento de la micropalanca, antes y después de alcanzar el umbral de fuerzas o indentación. La primera etapa, cuando la punta se mueve en dirección a la muestra y antes de alcanzar el valor umbral, se denomina aproximación o ida (en la literatura científica se suele hablar de “*approach*” o “*extend*”). La segunda parte del ciclo, cuando la punta se mueve en dirección contraria a la muestra, y después de haber alcanzado este valor umbral, se denomina alejamiento o vuelta (en la literatura científica se suele hablar de “*retraction*” o “*withdraw*”).

Para la extracción de propiedades mecánicas pertenecientes a la muestra, o material estudiado (en nuestro caso particular serán sistemas biológicos como células o tejidos), tendremos que analizar la zona de la curva de fuerzas correspondiente al contacto entre la punta y la muestra mediante una serie de modelos teóricos. Esto nos introduce en el amplio mundo de la mecánica de contacto, en posteriores secciones de esta tesis describiremos con más detalle la física que envuelve esta clase de fenómenos.

#### – 1.4.1. Determinación del punto de contacto

Determinar con exactitud la posición del punto de contacto (definido en la sección 1.2 como  $Z_0$ ) es uno de los pasos claves previos a la aplicación de modelos mecánicos para la extracción de información cualitativa de la muestra. Este es un parámetro que no es obtenido directamente de las medidas de AFM, pero puede ser calculado con una inspección adecuada de las curvas de fuerza-distancia. Para el caso de muestra duras no deformables, la identificación del punto de contacto es prácticamente inmediata. El problema aparece cuando nos encontramos ante muestras blandas deformables. Al medir muestras blandas nos vemos

forzados a usar micropalancas con menor constante de fuerza, lo cual implica un aumento del nivel de ruido en la señal adquirida, siendo esta relación señal-ruido especialmente baja en la zona de inicio del contacto punta-muestra. Además, existe otro factor añadido que dificulta aún más la obtención de este punto de contacto. A no ser que nos encontremos ante el caso de un indentador con geometría cilíndrica (plano), la relación entre la fuerza y la indentación deja de ser lineal. Convirtiéndose en una función u otra dependiendo de la geometría de la punta<sup>51,52</sup>. Todo esto hace altamente complicado la identificación de este punto de contacto de forma precisa, incluso habiéndose descontado efectos experimentales desfavorables como la presencia de adhesiones, efectos eléctricos inherentes, etc.

Una mala o inexacta determinación del punto de contacto puede llevar a grandes errores en los valores obtenidos para los parámetros mecánicos<sup>52,53</sup>. Mediante simulaciones por efectos finitos, Yin et al. demostraron que, para materiales puramente elásticos y módulos de Young del orden de decenas de kPa (esta es una magnitud que será introducida en la sección 1.5 sobre mecánica de contacto), indeterminaciones de decenas de nanómetros en el punto de contacto pueden acarrear errores hasta de un orden de magnitud en el módulo de Young obtenido para los primeros 200 nm de indentación. A partir de estos 200 nm y conforme incrementamos la indentación, el valor obtenido para el módulo de Young tiende asintóticamente al valor esperado.

Resumiendo, a lo largo de los años se han ido proponiendo diferentes metodologías o procedimientos para calcular de forma precisa el punto de contacto<sup>54</sup>. Estas pueden ser divididas en cuatro grandes grupos:

Detección visual: esta es la forma más simple e inmediata de obtener el punto de contacto. Consiste básicamente en la inspección visual de la curva para detectar la zona de no contacto de forma manual<sup>53,55,56</sup>. Este método tiene dos grandes inconvenientes al representar un alto coste temporal (imposibilidad de automatización) y al estar sujeto a la subjetividad del usuario.

Estudio de las derivadas de la deflexión: existen otros procedimientos que analizan directamente la deflexión de la curva de fuerzas mediante sus derivadas. En este sentido existen distintos criterios para determinar el punto de contacto<sup>57,58</sup>. El más común, consiste en escoger el contacto inicial como el punto con la máxima variación de la deflexión con respecto a la posición de los piezos. El principal problema al que se enfrentan este tipo de procedimientos es el alto nivel del ruido que tienen las derivadas de la deflexión, sobre todo en muestras blandas (como la mayoría de sistemas biológicos).

Ajuste de funciones por tramos: este método consiste en ajustar algún tipo de función a la curva de fuerzas, de manera que el punto de contacto se incluya como parámetro libre. Y, por tanto, la convergencia nos determine la posición del punto de contacto. El comportamiento para ajustar a la curva de fuerzas va desde simples funciones lineales y cuadráticas para, respectivamente, la zona de no contacto y la zona de indentación<sup>59</sup>. Hasta funciones más elaboradas como los modelos de Hertz o Sneddon (introducidos en la sección 1.5 de este capítulo de la tesis)<sup>53,56,60,61</sup>. El principal inconveniente de este tipo de métodos es la suposición de un comportamiento para el material restringido al marco de una física determinada. Lo cual conlleva que, para cualquier discrepancia o diferencia entre la realidad observada y la teoría asumida, se introducirá un error directamente en la colocación del punto de contacto.

Ratio de variaciones: este último procedimiento está basado en el estudio estadístico por intervalos del comportamiento de la curva de fuerza-distancia. Básicamente, dividiremos la curva de fuerzas en pequeñas ventanas en función del desplazamiento del piezo. Una vez dividida, estudiaremos la variación en la señal de la deflexión (de forma puramente estadística<sup>62</sup> o realizando regresiones locales por tramos<sup>63</sup>). De esta manera para la zona de no contacto no deberíamos medir cambios en la señal de deflexión, más allá de los debidos al ruido instrumental. Y para la zona de contacto, una vez la punta ha empezado la indentación, deberíamos observar un incremento en la deflexión. Y, por tanto, obteniendo una variación en la deflexión mayor en esta segunda región que en la zona de no contacto.

Uno de los puntos clave de este método es que dentro de una misma zona (contacto o no contacto), las variaciones medidas en dos distintos intervalos deberían ser equivalentes. Esto nos permite comparar de forma inequívoca ventanas pertenecientes a las dos regiones, y obtener claras diferencias. Una vez dividida la curva en intervalos, el tamaño de los mismos determinará la precisión con la cual obtendremos el punto de contacto.

Para concluir esta sección, caben destacar enfoques más recientes como el de Gavara<sup>62</sup>. El cual propone la combinación de diferentes tipos de metodologías para de forma comparativa e iterativa, obtener un valor más fiable del punto de contacto en nuestras curvas de fuerza-distancia.

## 1.5. Modelos de mecánica de contacto

Hasta ahora hemos dado las claves para poder medir con un AFM tanto la deformación como la fuerza aplicada sobre un material de forma precisa. Por tanto, es el momento de incluir algunas teorías capaces de transformar estos observables en propiedades mecánicas características del material. El comportamiento de cualquier material ante un conjunto de fuerzas que lo deforman puede ser expresado mediante una ecuación constitutiva. Esta ecuación proporciona información intrínseca del material y, por tanto, depende únicamente de la naturaleza del mismo y no del tamaño o forma del objeto medido. En concreto, para el caso más sencillo, la respuesta de un material puramente elástico puede expresarse mediante una ecuación constitutiva del tipo:

$$\sigma = E \varepsilon \quad (1.8)$$

Que relaciona la tensión aplicada ( $\sigma$ ; “*stress*”) con la deformación producida ( $\varepsilon$ ; “*strain*”) en el material, a través de una constante  $E$  (indicador de dureza y resistencia a la deformación). A continuación, introduciremos la solución particular de un experimento de carácter tridimensional, estando basada en la mecánica de contacto y correspondiente al tipo de estímulo o deformación que aplicaremos con nuestras puntas de AFM sobre los distintos sistemas biológicos.

La mecánica de contacto es la disciplina que estudia la deformación de sólidos que se encuentran en contacto entre ellos por uno o más puntos. Uno de los problemas fundamentales de esta área de la ingeniería mecánica es el de un semiespacio infinito (representado por un material isotrópico puramente elástico) indentado por un cuerpo rígido.

Este problema clásico fue tratado por Hertz (1881)<sup>64</sup> y Boussinesq (1885)<sup>65</sup> en primera instancia, resultando en expresiones explícitas para la fuerza y el área de contacto en función de la indentación. Más recientemente, numerosos autores han contribuido al desarrollo de este marco teórico, el cual es actualmente aplicado en infinidad de problemas de indentación para todas las longitudes de escala. Landau<sup>66</sup> re-analizó y resumió todo el enfoque Hertziano, derivando otra vez sus resultados y obteniendo expresiones para los campos de desplazamiento y tensiones. Sneddon<sup>67,68</sup> continuó el enfoque abierto por Boussinesq y desarrolló una metodología basada en transformaciones integrales. Finalmente derivando soluciones para indentadores con diferente simetría axial. Asimismo, se han obtenido soluciones aproximadas para casos con geometrías más complejas como la piramidal<sup>69,70</sup>.

Las soluciones al problema de indentación de un semiespacio infinito por un indentador axisimétrico están recogidas en la ecuación 1.9, permitiéndonos representar de forma compacta muchas de las soluciones para la indentación de materiales elásticos con respuesta lineal<sup>49,55</sup>.

$$F = \lambda \delta^\beta \tag{1.9}$$

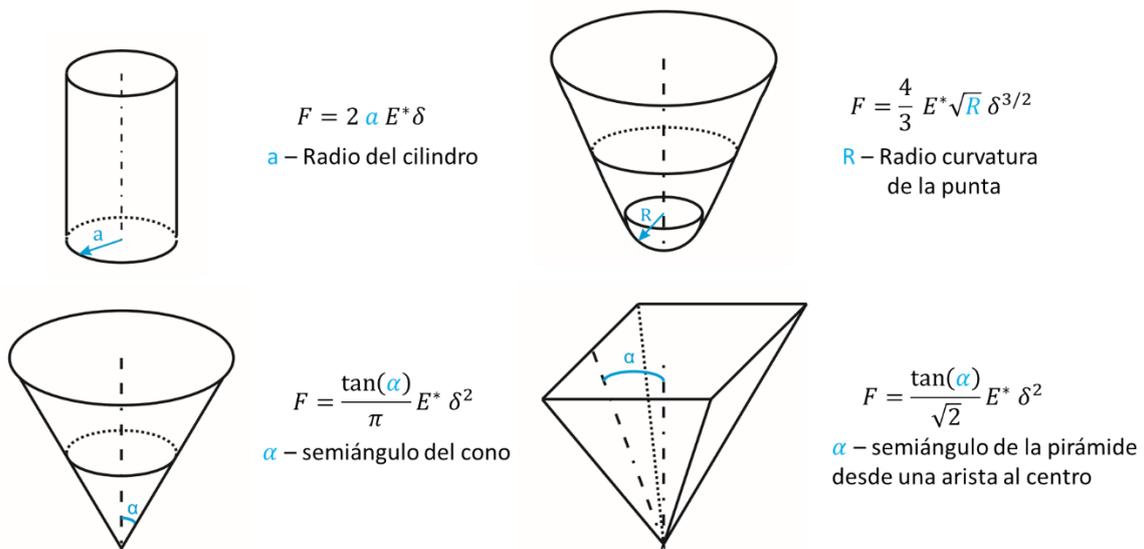
En la ecuación 1.9  $F$  es la fuerza aplicada por el indentador y  $\delta$  la indentación realizada en el material.  $\lambda$  y  $\beta$  son dos coeficientes que dependen de la geometría del problema y del coeficiente de Poisson del material ( $\nu$ ). Este coeficiente es una constante elástica y parámetro característico de cada material que indica la relación entre las deformaciones transversales a la dirección de carga, o fuerza externa aplicada sobre el material, y las longitudinales. Para materiales blandos, como geles, polímeros y células,  $\nu$  suele asumir un valor de 0.5 (incomprensible; dada una compresión en una determinada dirección acabará originando la mitad de extensión en la dirección ortogonal)<sup>55,57,71,72</sup>. Para la mayoría de metales se encuentra entre 0.25 y 0.35; para cemento y cerámicas alrededor de 0.10; y para corcho,  $\nu \approx 0$ .

Modelo - Geometría	$\lambda$	$\beta$	Radio de Contacto
<b>Cilindro plano ("Punch")</b>	$2a E^*$	1	$a = \text{radio del cilindro (constante)}$
<b>Hertz -Paraboloide</b>	$\frac{4}{3} E^* \sqrt{R}$	3/2	$a = \sqrt{\delta R}$
<b>Sneddon - Cónico</b>	$\frac{\tan(\alpha)}{\pi} E^*$	2	$a = \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \delta$
<b>Piramidal (cuatro caras)</b>	$\frac{\tan(\alpha)}{\sqrt{2}} E^*$	2	$a = \frac{\tan(\alpha)}{\sqrt{2}} \delta$

**Tabla 1.1.** Soluciones para el problema de indentación de un semiespacio infinito isótropo y elástico por medio de indentadores axisimétricos. Están recogidos los cuatro casos más comunes de geometrías axisimétricas utilizadas como sonda de AFM. Se han incluido tanto los valores del coeficiente  $\lambda$ , del exponente  $\beta$  (ecuación 1.9) así como del radio de contacto para estas cuatro geometrías más comunes. Dichas configuraciones geométricas están descritas en la figura 1.5 con todo detalle.  $E^* = \frac{E}{1-\nu^2}$ <sup>67,69,70</sup>.

En la tabla 1.1 podemos observar distintos valores adoptados por el término  $\lambda$  y el exponente  $\beta$  de la ecuación 1.9, en función de la configuración del problema a resolver. Empezaremos analizando el exponente  $\beta$ , dependiente de la geometría del problema (indentador). Trataremos las distintas formas posibles para el indentador, asumiendo siempre deformaciones sobre un material elástico semi-infinito. Las indentaciones realizadas mediante un cilindro plano se caracterizan por un área de contacto constante en función de cuanto penetremos el material, dando lugar a la obtención de un exponente  $\beta$  igual a 1 para la modelización teórica. En contraposición, para el caso de un indentador esférico (tratado en la teoría original de Hertz) el exponente adquiere un valor de 3/2, lo cual lo hace claramente diferenciable de los casos piramidal y cónico (Sneddon), en los cuales el exponente es de 2. Esto es debido a que el área de contacto evoluciona de una forma completamente distinta en función de la indentación para las distintas geometrías de indentador.

Por otro lado, no solo  $\beta$  está afectado por consideraciones geométricas del problema. Sino que existen también aspectos geométricos que afectan al valor de  $\lambda$ . Como podemos observar en la tabla 1.1 (con ayuda de la figura 1.5), para cada uno de los distintos casos,  $\lambda$  tiene una dependencia o bien con radio del cilindro (caso del "punch"), con el radio de la esfera (indentador esférico o paraboloides), con el semiángulo del cono (indentador cónico) o con el semiángulo de la pirámide definido desde una de las aristas al centro (caso de indentador piramidal con cuatro caras).



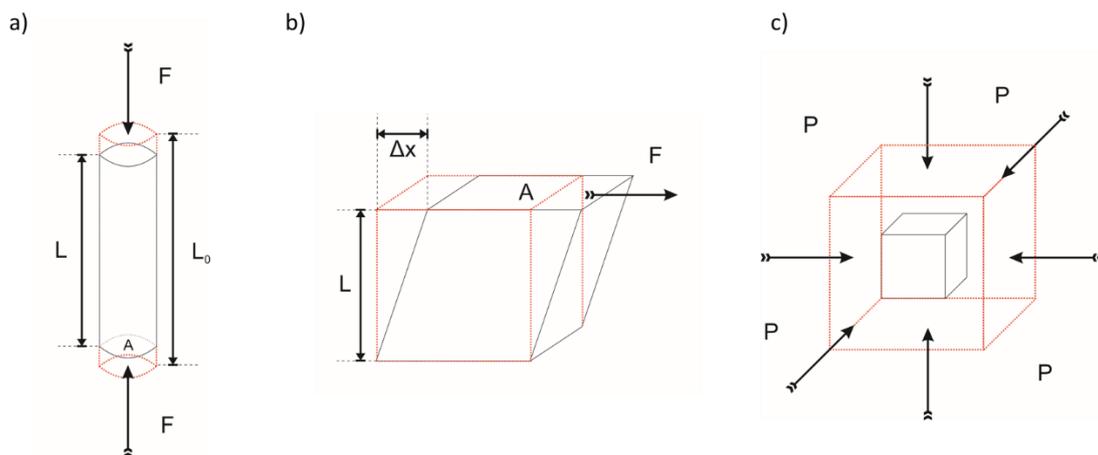
**Figura 1.5.** Principales geometrías con las que se suelen modelizar las puntas de AFM. Para cada uno de los casos incluimos la expresión para la respuesta del material a una fuerza determinada según describimos en la ecuación (1.9). En azul se ha destacado el principal factor geométrico que influye la respuesta mecánica para cada configuración.

El área de contacto entre el material y el indentador ha sido resuelta matemática y analíticamente para todas estas configuraciones axisimétricas expuestas en la tabla 1.1. Siendo el radio de contacto la magnitud apropiada para indicarnos cómo evoluciona esta área de contacto conforme se va penetrando el material. Como es de esperar, para el caso del indentador cilíndrico el radio de contacto se mantiene constante al igual que el área. Por otro lado, para los casos cónico, piramidal y paraboloidal, el radio de contacto se comporta de una forma concreta en función de la indentación.

Las diferencias en el término  $\lambda$  no son puramente geométricas, sino que dependen de dos parámetros intrínsecos del material, como son el coeficiente de Poisson  $\nu$  y el módulo de Young  $E$  (módulo de elasticidad).  $E$  es una propiedad mecánica de los materiales sólidos elásticos lineales y un indicador de la rigidez del mismo. En un problema unidimensional, se define como el ratio entre la tensión y la deformación para un comportamiento perfectamente elástico (ecuación 1.8)<sup>73</sup>. El módulo de Young puede ser calculado para un caso muy concreto y controlado (barra uniforme), resultando bastante académico y explicativo, y permitiéndonos definirlo de forma intuitiva. El experimento de compresión longitudinal de una barra uniforme y las magnitudes físicas que lo engloban se encuentra recogido en la siguiente expresión:

$$E \equiv \frac{\sigma(\epsilon)}{\epsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} = \frac{F L_0}{A \Delta L} \quad (1.10)$$

donde  $F$  es la fuerza ejercida sobre el objeto,  $A$  es el área de la sección transversal (perpendicular a la fuerza aplicada),  $\Delta L$  es la longitud que el material se ha comprimido o estirado y  $L_0$  la longitud inicial del objeto. Un esquema ilustrativo para este tipo de experimento de obtención del módulo de Young se encuentra expuesto en la figura 1.6.a).



**Figura 1.6.** Esquemas de experimentos típicos para la obtención de los tres distintos módulos de elasticidad. a) Módulo de Young, experimento de compresión longitudinal en una única dirección. b) Módulo de cortadura, respuesta a esfuerzos transversales (como el realizado por unas tijeras romas). c) Módulo de compresibilidad, experimento de aplicación de una presión homogénea ( $P$ ) sobre todas las caras del objeto<sup>74</sup>.

Si empezamos a incluir direccionalidades en este problema mecánico, tenemos que empezar a tomar en consideración tres módulos distintos para describir un material (recogidos en la figura 1.6). Las definiciones que haremos a continuación presuponen un material elástico lineal e isotrópico:

Módulo de Young ( $E$ , comúnmente denominado como módulo de elasticidad, debido a su extensa utilización en comparación con los otros dos casos): definido para el caso de tensiones y deformaciones longitudinales.

Módulo de cizalla o cortadura ( $G$ , módulo de rigidez transversal o segunda constante de Lamé): constante elástica que nos da información sobre los cambios experimentados

debido a esfuerzos cortantes. Definido como la relación entre la fuerza tangencial por unidad de área y la deformación angular del cuerpo.

$$G \equiv \frac{\tau_m}{\Theta} = \frac{F/A}{\Delta x/L} = \frac{F L}{A \Delta x} \quad (1.11)$$

Donde  $\tau_m$  es la tensión cortante,  $\Theta$  es la deformación angular,  $F$  y  $A$  son la fuerza y el área sobre la que actúa, respectivamente,  $L$  es la longitud inicial y  $\Delta x$  es el desplazamiento transversal. Conceptualmente, la forma más sencilla de entender este módulo es considerando la configuración de la figura 1.6.b, donde tenemos un cubo sometido a una fuerza cortante.

Módulo de compresibilidad ( $B$ ): constante elástica de un material que mide su resistencia a una compresión uniforme. Indica el aumento de presión necesaria para aplicar una disminución unitaria de volumen sobre un objeto.

$$B = -V \frac{dP}{dV} = -\frac{P}{\Delta V/V_0} \quad (1.12)$$

Donde  $P$  es la presión homogénea ejercida sobre todas las caras,  $V$  es el volumen,  $\Delta V$  es la variación del volumen,  $V_0$  es el volumen inicial y  $dP/dV$  es la derivada de la presión respecto al volumen. Una ilustración de la compresión uniforme puede observarse en la figura 1.6.c.

Las propiedades elásticas de los materiales lineales isótropos ante pequeñas deformaciones vienen determinadas únicamente por dos constantes. Estos pueden ser, por ejemplo, los denominados parámetros de Lamé:  $\lambda_L$  y  $G$ .  $\lambda_L$ , conocido como primer parámetro de Lamé, no tiene una interpretación física directa o simple; o cualquier pareja de los ya introducidos: coeficiente de Poisson, módulos de elasticidad, módulo de cizalla y módulo de compresibilidad. Al estar todos relacionados entre sí, es posible calcular a partir de dos de ellos, todos los demás. A continuación, se introducirán las fórmulas de conversión que relacionan los tres módulos descritos con anterioridad.

$$E = 2G(1 + \nu) = 3K(1 - 2\nu) = \frac{9KG}{3K + G} \quad (1.13)$$

En un experimento típico de AFM, la punta ejerce una fuerza penetrando y ocasionando deformaciones en el material en las tres distintas direcciones del espacio. Por tanto, exponiéndonos a un completo problema tridimensional. Este problema fue resuelto por Hertz, como ya expusimos al principio de esta sección, para un tipo reducido de materiales (puramente elásticos e isótropos) bajo una configuración concreta (asumiendo que la muestra representa un espacio semi-infinito). De esta manera existe la posibilidad de que, mediante un experimento de curva de fuerza-distancia, seamos capaces de obtener información sobre magnitudes como el módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson (expresiones derivadas de la ecuación 1.9 con ayuda de la tabla 1.1). A partir de la ecuación 1.13, seremos capaces de extraer información también concerniente al resto de módulos de elasticidad.

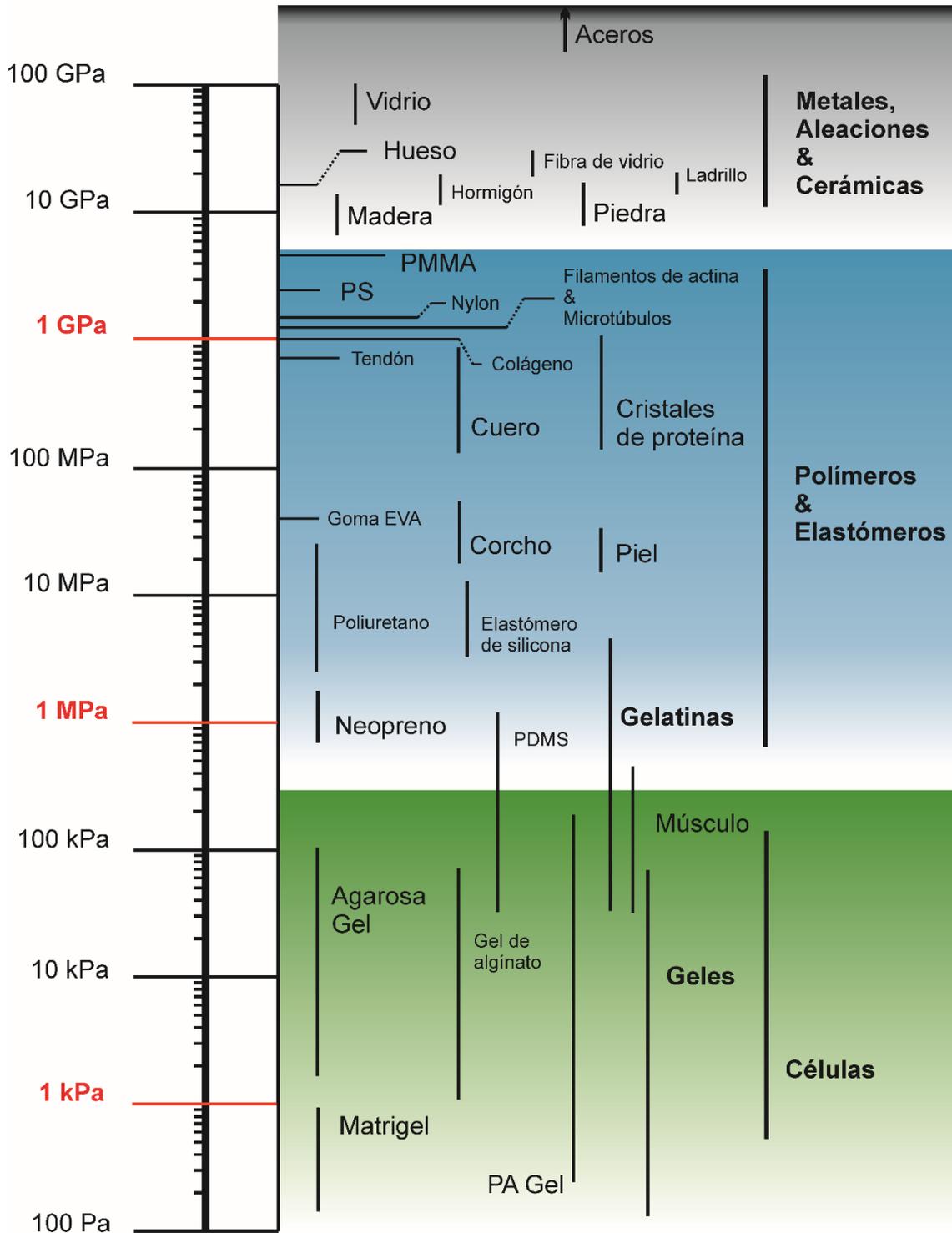
## 1.6. El Modulo de Young (elasticidad) de muestras biológicas

Uniendo todos los elementos que se han ido introduciendo a lo largo de este capítulo da pie a considerar el AFM como una potente herramienta para extraer propiedades elásticas de todo tipo de materiales, entre los que se encuentran las muestras biológicas. Aplicando una correcta calibración, utilizando la metodología experimental adecuada y empleando un marco teórico apropiado, nos permitirá extraer información cuantitativa del módulo de Young de un material de forma intuitiva, sencilla y fiable.

Previamente, se ha demostrado que existen parámetros mecánicos conectados a propiedades biológicas. Una gran variedad de trabajos avala este hecho. Análisis de propiedades mecánicas han sido partícipes en estudios relacionados con artritis<sup>75</sup>, diabetes<sup>76</sup>, asma<sup>77</sup>, malaria<sup>78-81</sup>, cáncer<sup>82-84</sup> y anemia<sup>85</sup>, entre otros<sup>86-88</sup>. En la comunidad científica relacionada con el microscopio de fuerzas atómicas, el módulo de Young ha sido ampliamente utilizado para caracterizar una gran variedad de procesos, afecciones y muestras biológicas. El caso más sonado, es el de la distinción entre células cancerosas (malignas) y no cancerosas (benignas). En lo que atañe a este tema en particular, podemos encontrar una amplia literatura, existiendo estudios sobre cáncer de vejiga, próstata, mama, útero, pulmón, páncreas, riñón, tiroides, ovarios, esófago, condrocitos<sup>89-91</sup>... En general, casi todas las células cancerosas tienen en común una disminución de rigidez (módulo de Young) respecto a su equivalente sana. Dependiendo de dónde esté localizado el cáncer, el cociente entre el módulo de Young para células malignas y benignas adquirirá un valor determinado. También se ha demostrado que  $E$  puede ser utilizado para estudios relacionados con el potencial migratorio de las células cancerígenas (metástasis)<sup>92</sup>. Por otra parte, la elasticidad de las células viene afectada por la edad de las mismas, con diversos estudios apoyándolo<sup>93</sup>. Y, por último, cabe destacar la utilización del módulo de Young para la evaluación de los efectos de ciertas drogas sobre las células, como por ejemplo citocalasina D, citocalasina B, latrunculina, paclitaxel, flucitosina, colchicina, sustancias antifúngicas, etcétera<sup>91,94-98</sup>.

La gran versatilidad que representan las medidas de AFM nos permite caracterizar la respuesta mecánica de, desde tejidos biológicos con tamaños de milímetros, hasta filamentos pertenecientes al citoesqueleto de una célula, con tamaños que rondan la decena de nanómetros. Dándonos la oportunidad de estudiar todo tipo de elementos y materiales biológicos distintos<sup>99,100</sup>. Esta reciente irrupción del AFM en campos del conocimiento como la biomecánica puede llevarlo a ser una pieza fundamental a la hora de mejorar el entendimiento de las fisiopatologías de una gran variedad de enfermedades. En la figura 1.7 exponemos de forma resumida el módulo de Young de diferentes materiales representativos con el fin de dar una idea de su rigidez, hecho que ayudará al lector en su periplo a lo largo de esta tesis doctoral. Para finalizar, en la siguiente subsección haremos especial hincapié en el módulo de Young de tejidos biológicos ya que parte de la investigación que discutiremos se realizará en este tipo de materiales.

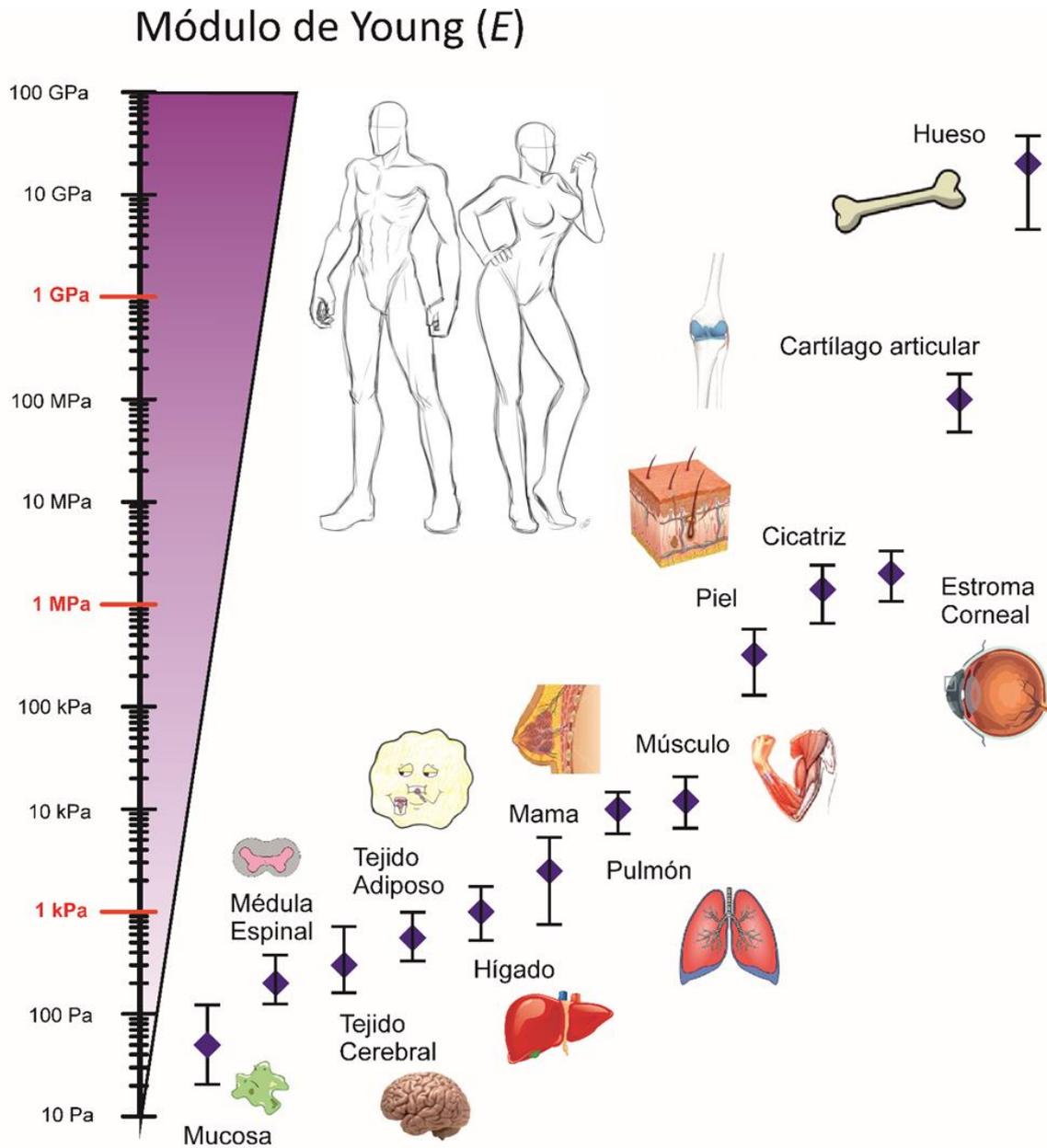
## Módulo de Young ( $E$ )



**Figura 1.7.** Diagrama de Módulos de Young en escala logarítmica de una amplia variedad de materiales. El espectro barre valores desde 100 GPa (materiales muy duros) hasta 100 Pa (materiales extremadamente blandos y fáciles de deformar)<sup>99,101-106</sup>.

### – 1.6.1. Tejidos biológicos del cuerpo humano

En la figura 1.8 introducimos una gráfica que contiene los módulos de Young para una serie de tejidos representativos, presentes en el cuerpo humano. La posibilidad de medir propiedades mecánicas de cada uno de estos tejidos representa una de las fortalezas del AFM a la hora de afrontar su aplicabilidad al mundo de la biomedicina.



**Figura 1.8.** Representación de las propiedades biomecánicas de una selección de tejidos biológicos en términos del módulo de Young. Indicador de la cantidad de fuerza requerida para deformar una sustancia, es decir, su rigidez. Cada tejido presenta un  $E$  diferente relacionado con sus propiedades físicas intrínsecas y la función específica que tiene que desempeñar, siendo las diferencias entre ellos de varios órdenes de magnitud<sup>107-112</sup>.

Los tejidos más rígidos del cuerpo son los dientes y los huesos, con un  $E$  superior a los  $10^9$  Pa<sup>113,114</sup>. En un segundo plano, y sin llegar al umbral de los GPa, se encuentra el tejido de los cartílagos articulares<sup>114,115</sup>. Con una rigidez intermedia alrededor de los  $10^6$  Pa tenemos tejidos como la piel o el estroma corneal, hasta llegar a los músculos<sup>116–118</sup>. En un nivel intermedio bajo se encuentran los tejidos pulmonar, mamario y hepático, con valores de módulo de Young superiores a los  $10^3$  Pa<sup>119–123</sup>. Finalmente, entre los tejidos más blandos tenemos el tejido adiposo, cerebral, de médula espinal y la mucosa estomacal ( $<10^3$  Pa)<sup>124–127</sup>. Los datos relativos a la médula espinal y el tejido adiposo en la figura 1.8 han sido incluidos gracias a los trabajos desarrollados en los capítulos 5 y 6 de la presente tesis doctoral.

Excepcionalmente, el AFM ha tenido una gran repercusión en temas relacionados con la diagnosis del cáncer, aumentando el conocimiento de este tipo de enfermedades desde un punto de vista mecánico, facilitando un diagnóstico precoz y demostrando la existencia de una marca mecánica única en los tumores para cada uno de los diferentes estados de progresión del cáncer<sup>121,125,128,129</sup>.

## 1.7. Referencias

- Aristophanes. *Aristophanes: Clouds (Sir Kenneth J. Dover edition)*. (Oxford University Press, 1968). doi:10.1093/actrade/9780198143956.book.1
- Kriss, T. C. & Kriss, V. M. History of the Operating Microscope: From Magnifying Glass to Microneurosurgery. *Neurosurgery* **42**, 899–907 (1998).
- van Leewenhoek, A. Observations, Communicated to the Publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a Dutch Letter of the 9th of Octob. 1676. Here English'd: concerning Little Animals by Him Observed in Rain-Well-Sea. and Snow Water; as Also in Water Wherein Pepper Had Lain In. *Philos. Trans. R. Soc. London* **12**, 821–831 (1677).
- Lane, N. The unseen world : reflections on Leeuwenhoek ( 1677 ) ' Concerning little animals '. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **370**, (2015).
- Ford, B. J. The Royal Society and the Microscope. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* **55**, 29–49 (2001).
- Wright, F. E. *The methods of petrographic-microscopic research, their relative accuracy and range of application*. (Washington, D.C., Carnegie Institution of Washington, 1911).
- Zsigmondy, R. A. Properties of colloids. *Nobel Lect.* **1**, 45–57 (1926).
- Mappes, T. *et al.* The invention of immersion ultramicroscopy in 1912-The birth of nanotechnology? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 11208–11212 (2012).
- Golgi, C. & Ramón y Cajal, S. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1906. *NobelPrize.org* (1906).
- Renz, M. Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective. *Cytom. Part A* **83**, 767–779 (2013).
- Zernike, F. How I Discovered Phase Contrast. *Science (80- )*. **121**, 345 LP-349 (1955).
- Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
- Hawkes, P. W. Ernst ruska. *Phys. Today* **43**, 84–85 (1990).
- Mulvey, T. Baron Manfred Von Ardenne (1907-1997). *J. Microsc.* **188**, 94–95 (1997).
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57–61 (1982).
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E.  $7 \times 7$  Reconstruction on Si(111) Resolved in Real Space. *Phys. Rev. Lett.* **50**, 120–123 (1983).
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl. Phys. Lett.* **40**, 178–180 (1982).
- Binnig, G. & Quate, C. F. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
- Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science (80- )*. **319**, 810–813 (2008).
- Li, M., Dang, D., Xi, N., Wang, Y. & Liu, L. Nanoscale imaging and force probing of biomolecular systems using atomic force microscopy: From single molecules to living cells. *Nanoscale* **9**, 17643–17666 (2017).

21. Dufrène, Y. F. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 295–307 (2017).
22. Meyer, G. & Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 1045–1047 (1988).
23. Meyer, G. & Amer, N. M. Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The NaCl (001) surface. *Appl. Phys. Lett.* **56**, 2100–2101 (1990).
24. Van De Leemput, L. E. C., Rongen, P. H. H., Timmerman, B. H. & Van Kempen, H. Calibration and characterization of piezoelectric elements as used in scanning tunneling microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **62**, 989–992 (1991).
25. Riis, E., Simonsen, H., Worm, T., Nielsen, U. & Besenbacher, F. Calibration of the electrical response of piezoelectric elements at low voltage using laser interferometry. *Appl. Phys. Lett.* **54**, 2530–2531 (1989).
26. Pal, S. & Banerjee, S. A simple technique for height calibration for z piezo with Angstrom resolution of scanning probe microscopes. *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 589–590 (2000).
27. Alliaia, D., Cecconi, C. & Nicolini, C. A simple method for preparing calibration standards for the three working axes of scanning probe microscope piezo scanners. *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 748–751 (1996).
28. Higgins, M. J. M. *et al.* Noninvasive determination of optical lever sensitivity in atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 013701 (2006).
29. Attard, P., Pettersson, T. & Rutland, M. W. Thermal calibration of photodiode sensitivity for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **77**, (2006).
30. Attard, P. Measurement and interpretation of elastic and viscoelastic properties with the atomic force microscope. *J. Phys. Condens. Matter* **19**, (2007).
31. JPK Instruments. A practical guide to AFM force spectroscopy and data analysis. *Tech. Note* 1–8 (2016).
32. Sader, J. E., Larson, I., Mulvaney, P. & White, L. R. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3789–3798 (1995).
33. Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *J. Appl. Phys.* **84**, (1998).
34. Sader, J. E., Chon, J. W. M. & Mulvaney, P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 3967–3969 (1999).
35. Sader, J. E. *et al.* Spring constant calibration of atomic force microscope cantilevers of arbitrary shape. *Rev. Sci. Instrum.* **83**, (2012).
36. Sader, J. E. & Friend, J. R. Note: Calibration of atomic force microscope cantilevers using only their resonant frequency and quality factor. *Rev. Sci. Instrum.* **85**, (2014).
37. Sader, J. E. & Friend, J. R. Note: Improved calibration of atomic force microscope cantilevers using multiple reference cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 2014–2016 (2015).
38. Butt, H.-J. & Jaschke, M. Calibration of Thermal Noise in atomic force microscopy. (1995).
39. Walters, D. A. *et al.* Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 3583–3590 (1996).
40. Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1868–1873 (1993).
41. Lozano, J. R., Kiracofe, D., Melcher, J., Garcia, R. & Raman, A. Calibration of higher eigenmode spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Nanotechnology* **21**, (2010).
42. Cook, S. M. *et al.* Practical implementation of dynamic methods for measuring atomic force microscope cantilever spring constants. *Nanotechnology* **17**, 2135–2145 (2006).
43. Ohler, B. Practical Advice on the Determination of Cantilever Spring Constants. *Veeco Instruments Inc.* **AN94**, 1–12 (2007).
44. Schillers, H. *et al.* Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
45. Pirzer, T. & Hugel, T. Atomic force microscopy spring constant determination in viscous liquids. *Rev. Sci. Instrum.* **80**, (2009).
46. Ducker, W. A., Senden, T. J. & Pashley, R. M. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature* **353**, 239–241 (1991).
47. Butt, H. J. Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a scanning force microscope. *Biophys. J.* **63**, 578–582 (1992).
48. Rotsch, C. & Radmacher, M. Mapping Local Electrostatic Forces with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **13**, 2825–2832 (1997).
49. Butt, H. J., Cappella, B. & Kappl, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* **59**, 1–152 (2005).
50. Cappella, B. & Dietler, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* **34**, 1–104 (1999).
51. Gavara, N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc. Res. Tech.* **80**, 75–84 (2017).
52. Crick, S. L. & Yin, F. C. P. Assessing micromechanical properties of cells with atomic force microscopy: Importance of the contact point. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **6**, 199–210 (2007).

53. Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B. & Chadwick, R. S. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* **82**, 2798–2810 (2002).
54. Rudoy, D., Yuen, S. G., Howe, R. D. & Wolfe, P. J. Bayesian change-point analysis for atomic force microscopy and soft material indentation. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* **59**, 573–593 (2010).
55. Lin, D. C., Dimitriadis, E. K. & Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis — I. Non-adhesive Indentation of Soft ,. **129**, (2007).
56. Melzak, K. A., Moreno-Flores, S., Yu, K., Kizhakkedathu, J. & Toca-Herrera, J. L. Rationalized approach to the determination of contact point in force-distance curves: Application to polymer brushes in salt solutions and in water. *Microsc. Res. Tech.* **73**, 959–964 (2010).
57. Nyland, L. R. & Maughan, D. W. Morphology and transverse stiffness of Drosophila myofibrils measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **78**, 1490–1497 (2000).
58. Jaasma, M. J., Jackson, W. M. & Keaveny, T. M. Measurement and characterization of whole-cell mechanical behavior. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 748–758 (2006).
59. Costa, K. D., Sim, A. J. & Yin, F. C.-P. Non-Hertzian Approach to Analyzing Mechanical Properties of Endothelial Cells Probed by Atomic Force Microscopy. *J. Biomech. Eng.* **128**, 176 (2006).
60. Lin, D. C., Dimitriadis, E. K. & Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials. *J. Biomech. Eng.* **129**, 904 (2007).
61. Rotsch, C., Jacobson, K. & Radmacher, M. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 921–926 (1999).
62. Gavara, N. Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force-indentation curves obtained on thin samples and adherent cells. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
63. Benítez, R., Moreno-flores, S., Bolós, V. J. & Toca-Herrera, J. L. A new automatic contact point detection algorithm for AFM force curves. *Microsc. Res. Tech.* **76**, 870–876 (2013).
64. Hertz, H. *Ueber die Beruehrung elastischer Koerper (On Contact Between Elastic Bodies)*. (1882).
65. Boussinesq, J. *Application des potentiels*. (1885).
66. Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. *Theory of Elasticity*. Pergamon Press **7**, (1970).
67. Sneddon, I. N. Boussinesq's problem for a rigid cone. *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.* **44**, 492 (1948).
68. Sneddon, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* **3**, 47–57 (1965).
69. Rico, F. *et al.* Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **72**, 1–10 (2005).
70. Bilodeau, G. G. Regular Pyramid Punch Problem. *J. Appl. Mech.* **59**, 519–523 (1992).
71. Radmacher, M. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **16**, 47–57 (1997).
72. Domke, J. & Radmacher, M. Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **14**, 3320–3325 (1998).
73. Johnson, K. L. *Contact Mechanics*. (Cambridge University Press, 1985). doi:10.1017/CBO9781139171731
74. Tschoegl, N. W. *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior An Introduction*. (Springer, Berlin, Heidelberg, 1989). doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-73602-5
75. Trickey, W. R., Lee, G. M. & Guilak, F. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J. Orthop. Res.* **18**, 891–898 (2000).
76. Jin, H. *et al.* Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1698–1702 (2010).
77. An, S. S., Fabry, B., Trepatt, X., Wang, N. & Fredberg, J. J. Do biophysical properties of the airway smooth muscle in culture predict airway hyperresponsiveness? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 55–64 (2006).
78. Chwee Teck, L. Single Cell Mechanics Study of the Human Disease Malaria. *J. Biomech. Sci. Eng.* **1**, 82–92 (2006).
79. Glenister, F. K., Coppel, R. L., Cowman, A. F., Mohandas, N. & Cooke, B. M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* **99**, 1060–1063 (2002).
80. Shelby, J. P., White, J., Ganesan, K., Rathod, P. K. & Chiu, D. T. A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14618–14622 (2003).
81. Suresh, S. *et al.* Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomater.* **1**, 15–30 (2005).
82. Wottawah, F. *et al.* Characterizing single suspended cells by optorheology. *Acta Biomater.* **1**, 263–271 (2005).
83. Guck, J. *et al.* Optical deformability as an inherent

- cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys. J.* **88**, 3689–3698 (2005).
84. Lekka, M.; Laidler, P.; Gil, D.; Lekki, J.; Stachura, Z.; Hryniewicz, A. Z. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.* **28**, 312–316 (1999).
85. Brandão, M. M. *et al.* Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: Application to the study of drug response in sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* **70**, 207–211 (2003).
86. Lee, G. Y. H. & Lim, C. T. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol.* **25**, 111–118 (2007).
87. Haase, K. & Pelling, A. E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20140970–20140970 (2015).
88. Zhang, C. *et al.* Simultaneous Measurement of Multiple Mechanical Properties of Single Cells Using AFM by Indentation and Vibration. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **64**, 2771–2780 (2017).
89. Cross, S. E., Jin, Y. S., Rao, J. & Gimzewski, J. K. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 780–783 (2007).
90. Lekka, M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience* **6**, 65–80 (2016).
91. Quan, F.-S. & Kim, K. S. Medical applications of the intrinsic mechanical properties of single cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 865–871 (2016).
92. Goetz, J. G. *et al.* Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148–163 (2011).
93. Phillip, J. M., Aifuwa, I., Walston, J. & Wirtz, D. The Mechanobiology of Aging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 113–141 (2015).
94. Rotsch, C. & Radmacher, M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* **78**, 520–535 (2000).
95. Ramachandran, S., Quist, A. P., Kumar, S. & Lal, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir* **22**, 8156–8162 (2006).
96. Kim, Y. S. *et al.* Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. *PLoS One* **7**, 1–8 (2012).
97. El Kaffas, A., Bekah, D., Rui, M., Carl Kumaradas, J. & Kolios, M. C. Investigating longitudinal changes in the mechanical properties of MCF-7 cells exposed to paclitaxol using particle tracking microrheology. *Phys. Med. Biol.* **58**, 923–936 (2013).
98. Ganier, O. *et al.* Structural centrosome aberrations promote non-cell-autonomous invasiveness. *EMBO J.* e98576 (2018). doi:10.15252/embj.201798576
99. Alonso, J. L. & Goldmann, W. H. Feeling the forces: Atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci.* **72**, 2553–2560 (2003).
100. Perrino, A. P. & Garcia, R. How soft is a single protein? the stress-strain curve of antibody pentamers with 5 pN and 50 pm resolutions. *Nanoscale* **8**, 9151–9158 (2016).
101. Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. *JPK Instruments Appl. Note* 1–9 (2008).
102. Bufi, N. *et al.* Human primary immune cells exhibit distinct mechanical properties that are modified by inflammation. *Biophys. J.* **108**, 2181–2190 (2015).
103. Application Note # 135 Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy. *Bruker Appl. Note* 1–10
104. Kolahi, K. S. *et al.* Effect of substrate stiffness on early mouse embryo development. *PLoS One* **7**, (2012).
105. Rus, D. & Tolley, M. T. Design, fabrication and control of origami robots. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 101–112 (2018).
106. Ashby, M. F. Chapter 5 - Materials Selection—The Basics. in *Materials Selection in Mechanical Design (Fourth Edition)* (ed. Ashby, M. F.) 97–124 (Butterworth-Heinemann, 2011). doi:https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-663-7.00005-9
107. Zajac, A. L. & Discher, D. E. Cell differentiation through tissue elasticity-coupled, myosin-driven remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 609–615 (2008).
108. Butcher, D. T., Alliston, T. & Weaver, V. M. A tense situation: Forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 108–122 (2009).
109. Cox, T. R. & Ertler, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* **4**, 165–178 (2011).
110. Janmey, P. A. & Miller, R. T. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J. Cell Sci.* **124**, 9–18 (2011).
111. Barnes, J. M., Przybyla, L. & Weaver, V. M. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J. Cell Sci.* **130**, 71–82 (2017).
112. Fekete, N., Béland, A. V., Campbell, K., Clark, S. L. & Hoesli, C. A. Bags versus flasks: a comparison of cell culture systems for the production of dendritic cell-based immunotherapies. *Transfusion* **58**, 1800–1813 (2018).
113. Hengsberger, S., Kulik, A. & Zysset, P. h. Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. *Bone* **30**,

- 178–184 (2002).
114. Nemir, S. & West, J. L. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 2–20 (2010).
  115. Park, S., Costa, K. D., Ateshian, G. A. & Hong, K. S. Mechanical properties of bovine articular cartilage under microscale indentation loading from atomic force microscopy. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **223**, 339–347 (2009).
  116. Grant, C. A., Twigg, P. C. & Tobin, D. J. Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy: Effect of scarring in the upper dermis. *Acta Biomater.* **8**, 4123–4129 (2012).
  117. Lombardo, M. *et al.* Biomechanics of the anterior human corneal tissue investigated with atomic force microscopy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 1050–1057 (2012).
  118. Engler, A. J. *et al.* Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **166**, 877–887 (2004).
  119. Liu, F. & Tschumperlin, D. J. Micro-Mechanical Characterization of Lung Tissue Using Atomic Force Microscopy. *J. Vis. Exp.* 1–7 (2011). doi:10.3791/2911
  120. Sicard, D., Fredenburgh, L. E. & Tschumperlin, D. J. Measured pulmonary arterial tissue stiffness is highly sensitive to AFM indenter dimensions. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **74**, 118–127 (2017).
  121. Plodinec, M. *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 757–765 (2012).
  122. Roy, R. & Desai, J. P. Determination of mechanical properties of spatially heterogeneous breast tissue specimens using contact mode Atomic Force Microscopy (AFM). *Ann. Biomed. Eng.* **42**, 1806–1822 (2014).
  123. Georges, P. C. *et al.* Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G1147–G1154 (2007).
  124. Christ, A. F. *et al.* Mechanical difference between white and gray matter in the rat cerebellum measured by scanning force microscopy. *J. Biomech.* **43**, 2986–2992 (2010).
  125. Ciasca, G. *et al.* Nano-mechanical signature of brain tumours. *Nanoscale* **8**, 19629–19643 (2016).
  126. Holtzmann, K. *et al.* Brain tissue stiffness is a sensitive marker for acidosis. *J. Neurosci. Methods* **271**, 50–54 (2016).
  127. Sotres, J., Jankovskaja, S., Wannerberger, K. & Arnebrant, T. Ex-Vivo Force Spectroscopy of Intestinal Mucosa Reveals the Mechanical Properties of Mucus Blankets. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
  128. Lekka, M. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 691–692 (2012).
  129. Tian, M. *et al.* The nanomechanical signature of liver cancer tissues and its molecular origin. *Nanoscale* **7**, 12998–13010 (2015).

# Capítulo 2

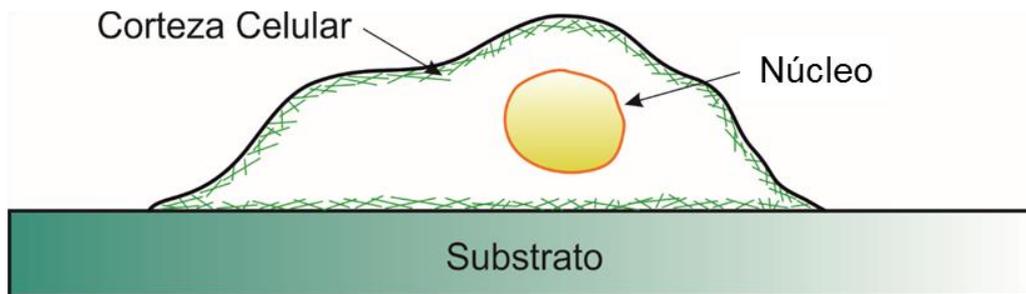
## Viscoelasticidad y diferencias respecto al modelo infinito - hertziano

### 2.0. Introducción

El modelo puramente elástico introducido en el capítulo 1 representa una primera aproximación para caracterizar la rigidez de los sistemas biológicos, y en concreto de las células. Uno de los objetivos del trabajo elaborado durante esta tesis, consiste en elaborar alternativas a este modelo puramente elástico e infinito, de manera que sea posible aportar una descripción más fiable, y acorde con la realidad, de la respuesta mecánica de este tipo de sistemas. Para ello intentaremos extender las conexiones existentes entre el mundo biológico y el mundo mecanofísico relacionando ciertos comportamientos observados en las células con distintos parámetros mecánicos.

A continuación, se intentarán introducir y abordar dos problemas distintos que se nos presentan al caracterizar las células con un modelo exclusivamente hertziano. El primero se centra en el grosor finito de las células. Como pudimos apreciar en la sección 1.5, una de las suposiciones durante el desarrollo del modelo de Hertz radica en el carácter ilimitado de la anchura de la muestra objeto de estudio. Asumir que la célula se extiende hasta el infinito representa una aproximación no realista, la cual puede ser evitada mediante una serie de inteligentes correcciones y extensiones de la teoría existente para la mecánica de contacto. El segundo punto a considerar está relacionado con el carácter heterogéneo de la célula. Inicialmente el modelo de Hertz asume las hipótesis de un material perfectamente homogéneo e isótropo. Esto difiere con la estructura de una célula, la cual está constituida por una gran variedad de elementos diversos que forman un material altamente heterogéneo. En

la investigación expuesta sobre este segundo punto, trataremos la influencia que tiene un elemento en particular de la célula (la corteza celular) sobre los valores de dureza que obtenemos mediante las medidas de AFM. Esta corteza celular, también llamada corteza de actina (“*actin cortex*”) o corteza de actomiosina, consiste en una región interna de la célula con una alta densidad de filamentos de actina conformando una capa justo debajo de la membrana plasmática. Esta es una estructura muy común en células eucariotas, se encuentra adherida a la membrana celular y juega un papel muy importante en el control de la forma y morfología que adquiere la misma. En la mayoría de los casos, el grosor de esta corteza de actina se encuentra entre los cientos de nanómetros y la micra<sup>1-6</sup>.



**Figura 2.1.** Esquema de una célula típica cultivada *in vitro* destacando el substrato y la corteza de actina. La contribución de estos dos elementos a la respuesta mecánica de la célula ante un experimento de AFM será estudiada en este capítulo.

Aunque hayamos corregido parcialmente algunos de los principales problemas que nos encontramos al extraer la respuesta elástica de nuestro sistema experimental, sigue siendo muy optimista modelizar el alto grado de heterogeneidad que corresponde con una célula exclusivamente mediante una respuesta de carácter elástico. En el interior de la célula coexisten componentes como fibras pertenecientes al citoesqueleto, el núcleo, los nucléolos, diferentes orgánulos, ribosomas, el citosol, etc... Esto da cabida a una modelización viscoelástica de la respuesta mecánica de células, permitiendo estudiar y tener en cuenta la contribución de cada uno de los componentes subcelulares a la respuesta global.

El primer paso para llevar a cabo una modelización viscoelástica de las células es introducir las nociones básicas sobre esta materia. En la sección 2.2 de este capítulo incluiremos los principales conceptos físicos relacionados con la viscoelasticidad para un problema estrictamente unidimensional. Además, se incluirán los modelos mecánicos constitutivos más emblemáticos, y que, por ende, pueden ser de más utilidad cuando nos enfrentemos al estudio del comportamiento de las células.

Para finalizar este segundo capítulo discutiremos diversas metodologías experimentales, tanto basadas en la microscopía de fuerzas atómicas como ajenas a dicha técnica, que nos permiten extraer información viscoelástica de células biológicas. Primero, centrándonos en el AFM, se introducirán dos clases de metodologías experimentales, una basada en métodos de fuerza oscilatoria y otra en estudios de la respuesta temporal (sección 2.3). En cuanto a técnicas ajenas al AFM, se discutirán métodos basados en conceptos físicos diversos como la óptica, el magnetismo o la microfluídica (sección 2.4). Algunos ejemplos destacados son: el estiramiento por medios ópticos, la reometría por planos paralelos, la microreología por seguimiento de partículas o torsión magnética, la citometría por microfluídica, entre otros.

## 2.1. Limitaciones de los modelos hertzianos para la extracción de propiedades mecánicas de células con AFM

Como ya hemos adelantado, a continuación, trataremos dos de los principales desafíos que nos encontramos al abordar la adquisición de un valor fiable para la rigidez o dureza de las células. Estos son: (1) los efectos debidos a la rigidez del sustrato de cultivo, sobre el cual yace la célula; y (2) la contribución de la corteza celular sobre los datos obtenidos a partir de curvas de fuerza-distancia mediante un AFM.

### – 2.1.1. Corrección debido a los efectos del sustrato

Los modelos mecánicos de contacto semi-infinitos desprecian la influencia de la dureza del sustrato, usado para cultivar las células, sobre las medidas de propiedades elásticas. El problema mecánico de la indentación de capas gruesas fue planteado en campos de la ingeniería<sup>7</sup> mucho antes de la aplicación del AFM para extraer propiedades nano mecánicas de células. Más recientemente, Gavara & Chadwick<sup>8</sup> demostraron que la influencia del sustrato introduce un error en las medidas de módulo de Young en células. En este tipo de experimentos de AFM, la tensión ejercida por la punta se propaga a través de la célula hasta alcanzar al sustrato. Una vez alcanzado, el efecto de la tensión se ve reflejado de vuelta hacia la superficie celular en contacto con la punta, modificando de esta forma la deflexión registrada por el AFM.

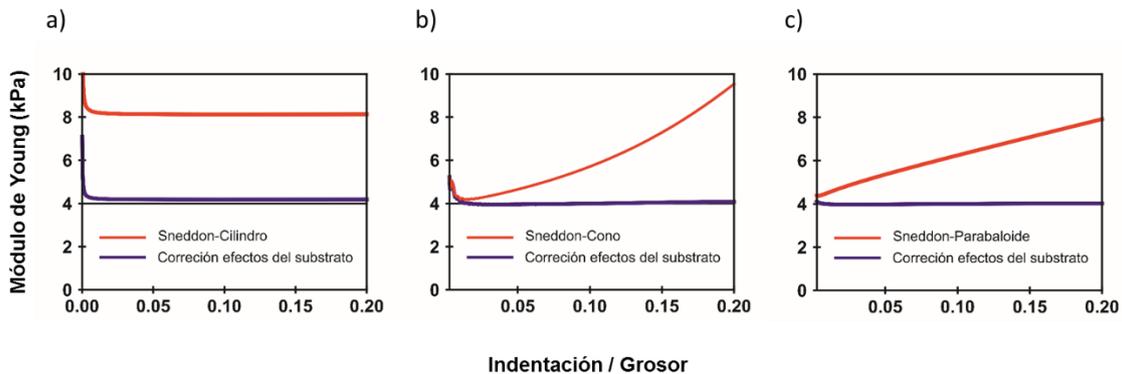
Las células de mamíferos cultivadas sobre soportes rígidos (usualmente una placa *Petri*) tienen un grosor finito de 2-20  $\mu\text{m}$ , mientras que los experimentos de curvas de fuerzas por AFM penetran una profundidad de 0.2-3  $\mu\text{m}$ <sup>9,10</sup>, lo cual corresponde con un  $\sim 10\text{-}20\%$  del grosor total de la célula. Por otro lado, el módulo de Young de una célula viva se encuentra en el orden de los kPa (ver sección 1.6 sobre módulo de Young en el capítulo 1), mientras que el soporte adquiere valores de decenas de GPa, representando una diferencia de alrededor de 6-7 órdenes de magnitud entre ambos materiales. Tanto el alto porcentaje de indentación como la gran diferencia en valores de rigidez célula-soporte hacen que el efecto del sustrato deba ser tenido en cuenta y evaluado con precisión, de forma que se puedan aportar propiedades mecánicas fiables de las células que son objeto de medida.

Inicialmente, la influencia del sustrato sobre medidas mecánicas de células fue tratado por Dimitriadis et al<sup>11</sup>, resolviendo el problema para una geometría esférica del indentador. Posteriormente, Garcia & Garcia<sup>12</sup> generalizaron la solución para una gran variedad de geometrías, a la vez que validaban el método por medio de simulaciones numéricas. Este último trabajo presenta una teoría válida para cualquier tipo de indentador con simetría axial, exponiendo en concreto los casos esférico, cónico, indentador plano, nano-hilo y aguja.

La tabla 2.1 recoge las expresiones para un material puramente elástico corregidas por su grosor finito (asumiendo un coeficiente de Poisson de 0.5 y, por tanto, incompresibilidad) para cuatro tipos de escenarios geométricos posibles. En cada una de esas ecuaciones se expresa la fuerza real  $F$  en función de la fuerza ( $F_0$ ) que correspondería al modelo hertziano (caso infinito) multiplicada por una corrección ( $Cor$ ).  $F_0(\delta, P_{Geo})$  depende de la indentación  $\delta$  y de un parámetro geométrico relevante  $P_{Geo}$ , el cual viene determinado por el caso que se esté estudiando. Para el indentador plano  $P_{Geo} \equiv a$ , correspondiendo con el radio del cilindro. Para

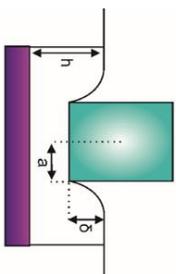
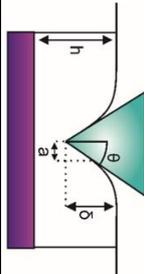
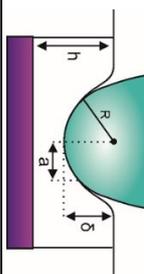
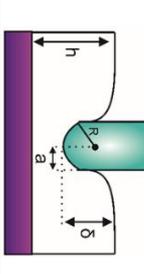
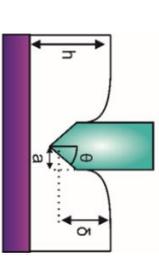
la punta cónica  $P_{Geo} \equiv \theta$ , correspondiendo con el semiángulo del cono. Para el caso esférico  $P_{Geo} \equiv R$ , correspondiendo con el radio de la esfera. Lo que aquí denominamos caso esférico está referido al caso de un indentador de tipo paraboloides, aplicado dentro de la condición  $\delta \leq R$ . En la tabla 2.1, hemos incluido también dos geometrías adicionales, las cuales pueden ser interesantes para la extracción o el mapeo de propiedades nanomecánicas con el AFM. Por un lado, tenemos la geometría de aguja (“needle”) que corresponde con un indentador plano cubierto o finalizado por un cono. Y, por otra parte, lo que denominamos como nanohilo corresponde a un indentador plano taponado por una esfera. Dadas estas descripciones es esperable que las expresiones para ambos sean algún tipo de combinación de las tres básicas (indentador plano, esfera y cono), con las apropiadas condiciones de contorno.

La teoría expuesta anteriormente ha sido validada mediante simulaciones FEM (método de elementos finitos, por sus siglas en inglés: “*Finite Element Method*”). Garcia & Garcia<sup>12</sup> simularon una curva de fuerzas distancia sobre un material con una rigidez de 4 kPa y un grosor de 5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente ajustaron, por un lado, modelos hertzianos y, por otro lado, modelos que incluyen la influencia del substrato sobre las medidas de propiedades mecánicas. Los resultados que obtuvieron están recogidos en la figura 2.2. Esta figura nos muestra que el error que se cometería al no asumir este tipo de comportamiento no debe ser despreciado. La no aplicación de esta corrección implicaría una cuantificación errónea de las propiedades mecánicas de la célula aportando un valor sobreestimado del módulo de Young. En la figura 2.2 también se observa como este es un artefacto que afecta todas las posibles geometrías del indentador.



**Figura 2.2.** Resultados de la determinación del módulo de Young comparando modelos hertzianos con la teoría que considera efectos del substrato. a) Cilindro con  $a = 2.5 \mu\text{m}$ . b) Cono de  $\theta = 76^\circ$ . c) Paraboloides con  $R = 5 \mu\text{m}$ . El grosor del material simulado por FEM es de  $5 \mu\text{m}$  con un módulo de Young de 4 kPa. Se ajustaron las curvas de fuerza simuladas, por un lado, a los modelos de mecánica de contacto expuestos en el capítulo 1 de esta tesis; y, por otro lado, a las ecuaciones expuestas en la tabla 2.1. Adaptada del trabajo de Garcia & Garcia<sup>12</sup>.

Para concluir esta subsección cabe destacar que la corrección debida al efecto del substrato aumenta conforme se va incrementando el área de contacto entre la punta y la muestra. En el caso cilíndrico, al ser el área de contacto constante la corrección se mantiene constante, ver figura 2.2.a). Esto implica que para una misma indentación, el caso cónico siente en menor grado la presencia del substrato en comparación con el caso esférico (mayor área de contacto), viéndose reducido el artefacto añadido a las medidas.

Geometría	Expresión matemática		Esquema ilustrativo
	$F_0(\delta, P_{Geo})$	$F = F_0(\delta, P_{Geo}) \cdot Cor(\delta, P_{Geo}, h)$ $Cor(\delta, P_{Geo}, h)$	
Indentador plano	$F_{punch}$ $\frac{8a}{3} E_{cell} \delta$	$\frac{1}{h^0} + \frac{1.133a}{h} + \frac{1.283a^2}{h^2} + \frac{0.598a^3}{h^3} - \frac{0.291a^4}{h^4}$	
Punta cónica	$F_{cone}$ $\frac{8}{3\pi} \tan\theta E_{cell} \delta^2$	$\frac{1}{h^0} + \frac{0.721\delta \tan\theta}{h} + \frac{0.650\delta^2 \tan^2\theta}{h^2} + \frac{0.491\delta^3 \tan^3\theta}{h^3} + \frac{0.225\delta^4 \tan^4\theta}{h^4}$	
Parabololoide	$F_{sphere}$ $\frac{16}{9} E_{cell} \sqrt{R} \delta^{3/2}$	$\frac{1}{h^0} + \frac{1.133\sqrt{\delta R}}{h} + \frac{1.497\delta R}{h^2} + \frac{1.469\delta R \sqrt{\delta R}}{h^3} + \frac{0.755(\delta^2 R^2)}{h^4}$	
Nanohilo	$F_{nw}$	$F_{nw}(\delta) = \begin{cases} F_{sphere}(\delta) & \text{if } \delta \leq \delta_c \\ F_{sphere}(\delta) + F_{punch}(\delta - \delta_c) & \text{if } \delta > \delta_c \end{cases}$	
Nanoaguja	$F_{nw}$	$F_{needle}(\delta) = \begin{cases} F_{cone}(\delta) & \text{if } \delta \leq \delta_c \\ F_{cone}(\delta) + F_{punch}(\delta - \delta_c) & \text{if } \delta > \delta_c \end{cases}$	

**Tabla 2.1.** Formulario de las correcciones debidas al efecto del sustrato para las principales geometrías de puntas de AFM (cilindro, cono, esfera, nanohilo y nanoaguja). Esquemas, desde una perspectiva lateral del experimento de indentación que se simula y resuelve teóricamente en el trabajo de García & García<sup>12</sup>.

### – 2.1.2. Efecto del “*actin cortex*” en los valores extraídos de Modulo de Young

Mediante técnicas de caracterización bioquímica se demostró que el principal componente de la corteza celular es la actina. La actina es una familia de proteínas globulares que tienen como función principal su polimerización en diferentes tipos de fibras. Se encuentran fundamentalmente en las células eucariotas en forma de monómeros libres (G-actin) o como parte de polímeros lineales denominados microfilamentos (F-actin). Los microfilamentos son uno de los tres componentes primordiales del citoesqueleto (compuesto por: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos) jugando un rol esencial en la movilidad celular, durante la división celular y en la integridad estructural de la célula. Una gran variedad de cofactores celulares ensambla la F-actin en configuraciones de distinta morfología, conformando la arquitectura y estableciendo la respuesta tanto mecánica como dinámica de las células eucariotas.

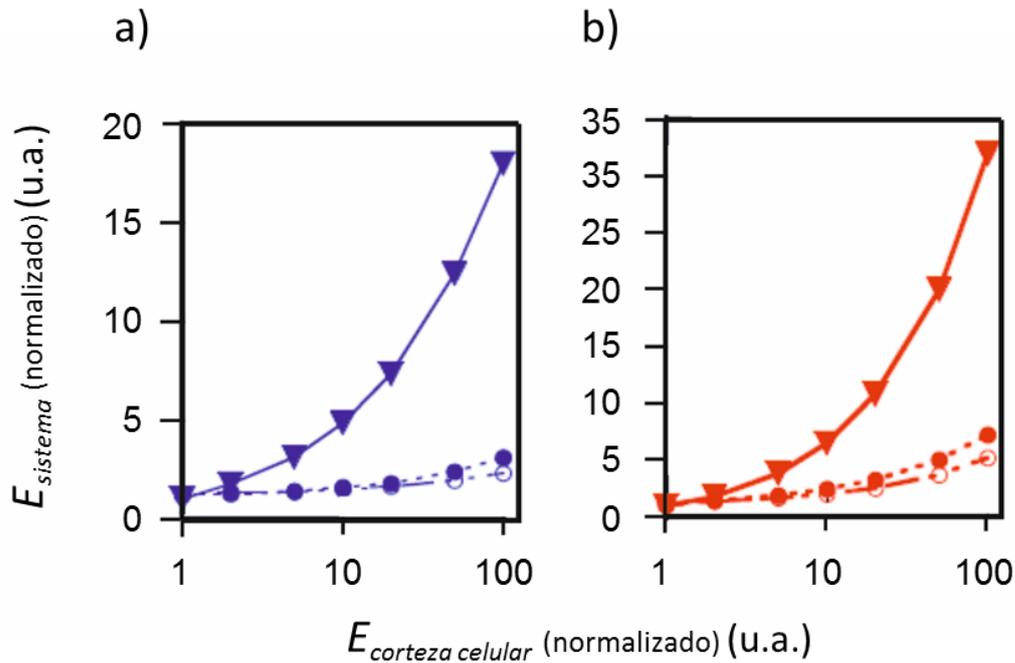
El grosor de la corteza celular ubicada justo debajo de la membrana plasmática ha sido determinado por diferentes técnicas de microscopía. Estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés: “*Transmission Electron Microscopy*”) sugieren valores en torno a los 100 nm en células de tipo *Dictyostelium*<sup>13,14</sup> y células de melanoma humano<sup>15</sup>. Estudios basados en microscopía de fluorescencia estiman valores mayores de 100 nm en *HeLa Cells*<sup>2,16</sup>. Estudios de microscopía electrónica de barrido han aportado valores de 30-150 nm en células redondeadas<sup>17,18</sup>.

Una de las maneras más accesibles para observar la acción de la corteza celular en la respuesta mecánica de la célula es a través de cambios en la geometría de la punta AFM. Diferencias en las medidas del módulo de elasticidad de células, entre geometrías caracterizadas por ser, o afiladas, o romas, es una fenomenología previamente observada y bien conocida en la comunidad de espectroscopia de fuerzas en células. Existe una gran variedad de estudios que han observado un substancial incremento en los valores obtenidos para el módulo de Young en puntas afiladas (cónicas, piramidales...) con respecto a los obtenidos con puntas romas (esféricas, paraboloides...) <sup>19-27</sup>. En nuestro caso particular, decidimos comprobar el alcance de este tipo de comportamiento en una de las líneas celulares comerciales de las cuales disponíamos: NIH 3T3 fibroblastos, realizando diversas secuencias de curvas de fuerza-distancia. No se llegó a realizar un estudio sistemático en cada una de las líneas celulares, pero sí que se observó, cualitativamente, este tipo de tendencia en cada una de ellas. Para más información sobre los experimentos mencionados consultar el Apéndice A.1.1.

Tanto los resultados expuestos en la bibliografía como los resultados del apéndice A.1.1. son prueba de la influencia de la corteza celular en la respuesta mecánica de células medidas por AFM. No obstante, existe aún bastante controversia sobre el posible origen de este fenómeno de obtención de distinto módulo de Young dependiendo de la geometría del indentador. Diversos estudios justifican que este comportamiento pueda ser atribuido a artefactos: en el proceso de medida como endurecimiento por deformación (relacionado con plasticidad)<sup>20,28,29</sup>, en el proceso de estimación del área de contacto<sup>19</sup>, en la determinación del punto de contacto<sup>11</sup> o en las interacciones con el sustrato<sup>28-30</sup>.

Como argumento a favor de nuestra hipótesis, tenemos simulaciones por elementos finitos que demuestran como este comportamiento experimental es compatible con la presencia de

la corteza celular<sup>16,23</sup>. Boccaccio et al.<sup>16</sup> han mostrado cómo afectan distintos grosores de la corteza celular a las medidas de curva de fuerzas (manteniendo invariante la geometría de la punta). Es posible observar en este trabajo cómo para la misma indentación, el módulo de Young equivalente, obtenido al ajustar el comportamiento mediante un modelo hertziano, sería mayor cuanto más gruesa sea la corteza celular. A su vez, Vargas-Pinto et al<sup>23</sup> observan como un aumento de la rigidez de la corteza celular conlleva un incremento del módulo de Young equivalente de todo el sistema. Este efecto se ve amplificado al utilizar puntas afiladas, ya que con este tipo de puntas las medidas están más fuertemente afectadas por la corteza celular (figura 2.3).



**Figura 2.3.** Resultados de simulaciones FEM ( $\nu=0.49$ ) para el módulo de Young aparente del sistema ( $E_{\text{sistema}}$ , normalizado por la dureza del citoesqueleto, siendo simulado como todo el material que se encuentra bajo la corteza celular) en función de la dureza del "actin cortex" ( $E_{\text{corteza celular}}$ , normalizado de igual manera que  $E_{\text{sistema}}$ ) que se le ha asignado. Se realizaron las simulaciones con tres distintas geometrías de indentador. Los triángulos representan la solución para indentaciones con una punta afilada. En cambio, los círculos, tanto sólidos como sin rellenar, representan los resultados para puntas esféricas con diámetro de 4.5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El grosor de la corteza celular simulada es de: a) 200 nm, y b) 400 nm. Figura adaptada de Vargas-Pinto et al<sup>23</sup>.

Como conclusión de este apartado se puede afirmar que se ha aportado información complementaria al hecho de que las medidas de AFM en células están afectadas por la corteza celular, observando un aumento del módulo de Young efectivo medido con las puntas afiladas con respecto a las puntas esféricas o romas. Las puntas afiladas activan o sienten principalmente zonas de la corteza celular mientras que las medidas con puntas esféricas están influenciadas por una combinación de la corteza celular y el citoesqueleto que yace justo bajo ella. Nuestros resultados y la bibliografía expuesta sugieren que, al realizar medidas de cuantificación del módulo de Young en células mediante AFM, se deben considerar efectos debido a la corteza celular.

## 2.2. Viscoelasticidad

La viscoelasticidad es el estudio de las propiedades de los materiales que exhiben comportamientos tanto viscosos como elásticos ante una deformación dada. Un material puramente elástico posee una ecuación constitutiva independiente del tiempo. Por ejemplo, no hay diferencia alguna al aplicar una tensión durante un segundo o un día, o al hacerlo rápida o lentamente, la deformación resultante será exactamente la misma. Esto da lugar a que un material elástico se deforme instantáneamente ante una tensión aplicada, a la vez que recuerda su configuración inicial. Y, por tanto, una vez se elimine dicha tensión volverá también instantáneamente a su estado original. En este tipo de materiales, la energía debida a la deformación es almacenada y recuperada completamente una vez dejen de actuar las fuerzas externas sobre el material (no existe disipación). El metal y la fibra de cuarzo, son algunos de los materiales que más se asemejan al perfecto material elástico

Por otro lado, la respuesta de un material viscoso sí que depende de la velocidad con la cual se ha aplicado la tensión, sin ser capaz de recuperar la configuración inicial una vez es eliminada la tensión aplicada y dando lugar a que se mantenga el estado deformado. En un material puramente viscoso, toda la energía requerida para producir la deformación es disipada como energía no recuperable (por ejemplo: calor). Entre los ejemplos más conocidos de materiales viscosos tenemos la brea o la miel.

La combinación de componentes tanto elásticos como viscosos en un mismo material da lugar a hablar de la viscoelasticidad, implicando una dependencia temporal en la respuesta suministrada al observador y una cierta pérdida de energía en el proceso de deformación. La relación dada por la ecuación constitutiva entre la tensión y la deformación no puede ser expresada como una constante, como hicimos en el capítulo anterior para el caso elástico (ecuación 1.8). En el caso más general posible la tensión se convierte en un funcional de la deformación y, por tanto, dependiente del historial de la deformación o, en otras palabras, cómo ha sido aplicada la deformación a lo largo del tiempo. Podemos expresar esta idea con la siguiente expresión<sup>31</sup>:

$$\sigma(t) = \mathbb{E} \int_{-\infty}^t [\epsilon(u)] \quad (2.1)$$

En la ecuación 2.1 denotamos  $t$  como el tiempo en el que estamos midiendo y  $u$  como todos los tiempos pasados, desde el inicio del experimento hasta el momento actual.  $\sigma$  y  $\epsilon$  representan componentes de los tensores de tensiones y deformaciones, respectivamente. Dependiendo de las direcciones en las que estén actuando dichas tensiones y deformaciones, entrarán en juego una u otra componente del tensor. Por ejemplo, podrían hacer referencia a un experimento de compresión o de “*shear*”. Manteniendo una nomenclatura genérica para las componentes de ambos tensores hará que las expresiones que introduzcamos en este apartado hagan referencia a un problema exclusivamente unidimensional.

Asumir un comportamiento viscoelástico lineal (aproximación precisa para deformaciones infinitesimales) implica que los funcionales deben satisfacer dos condiciones. Primero, un incremento en el estímulo por un factor arbitrario  $\alpha$  debe incrementar la respuesta de igual medida (ecuación 2.2.1). Segundo, una suma arbitraria de estímulos provoca una respuesta

que es equivalente a la suma de las diferentes respuestas obtenidas, si cada estímulo hubiera actuado independientemente (ecuación 2.2.2).

$$\mathbb{E} \int_{-\infty}^t [\alpha \epsilon(u)] = \alpha \mathbb{E} \int_{-\infty}^t [\epsilon(u)] = \alpha \sigma(t) \quad (2.2.1)$$

$$\mathbb{E} \sum_{n=1}^{\infty} [\epsilon(u_n)] = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbb{E} \int_{-\infty}^t [\epsilon(u_n)] \quad (2.2.2)$$

Análogamente, en ambas expresiones podríamos intercambiar la deformación por la tensión, teniéndose que cumplir también esta condición de linealidad.

Si el comportamiento mecánico del material objeto de estudio se ajusta a las condiciones de linealidad, podemos expresar la respuesta a un estímulo dado en forma de integral de convolución, aplicando el principio de superposición de Boltzmann<sup>32</sup>. Esto da pie a que la ecuación 2.1 pueda expresarse mediante las expresiones contenidas en 2.3.1 y 2.3.2. De esta forma, describimos la tensión, como la respuesta a una superposición lineal de las deformaciones presentes y pasadas.

$$\sigma(t) = \int_0^t Q(u) \epsilon(t-u) du \quad (2.3.1)$$

$$\epsilon(t) = \int_0^t U(u) \sigma(t-u) du \quad (2.3.2)$$

De la ecuación 2.3.1 podemos interpretar que la tensión  $\sigma$  en el tiempo presente  $t$ , afectada por un historial de deformaciones  $\epsilon$  arbitrario, es una superposición lineal de todas las deformaciones aplicadas en momentos anteriores, multiplicado por unos valores que vienen determinados por una función de ponderación (“*weighting function*”),  $Q(t)$ . La ecuación 2.3.2 es interpretada de forma análoga, simplemente intercambiando tensiones por deformaciones, y aplicando la correcta función de ponderación,  $U(t)$ . Más en detalle,  $Q(t)$ , es conocida como “*relaxance*”, representando la respuesta del material a un pulso (función delta) de deformación. Por otro lado,  $U(t)$ , es conocida como “*retardance*”, representa la respuesta a un pulso de tensión.

Experimentalmente, aplicar una excitación sobre un material en forma de pulso (o delta de Dirac) resulta complejo y acarrea ciertas complicaciones. Por esta razón, se suelen aplicar otros tipos de excitaciones para extraer las propiedades mecánicas de materiales. Normalmente están caracterizadas por una imposición espontánea (o bien en forma de deformación o en forma de tensión), la cual se mantendrá constante en el tiempo indefinidamente. Si la excitación escogida es una deformación constante, estaremos ante un experimento de “*load relaxation*”, y la respuesta del material vendrá determinada por la función de relajación (“*relaxation function*”,  $K(t)$ ). Sin embargo, si aplicamos una tensión constante sobre el material, estaremos ante un experimento de “*creep compliance*”, y la respuesta del material

vendrá dada por la función de “creep”,  $J(t)$ . Ambas funciones, independientemente, aportan información completa sobre la respuesta del material. Pudiéndose usar ambos métodos de forma indistinta, y dando lugar a un estudio equivalente.

Aplicando el adecuado procedimiento matemático, es posible expresar las ecuaciones 2.3.1 y 2.3.2, en función de  $K(t)$  y  $J(t)$ , de manera que la respuesta del material venga determinada por la función de relajación o de “creep” (ecuación 2.4.1 o 2.4.2).

$$\sigma(t) = \int_0^t K(t-u) \frac{d\epsilon(u)}{du} du \quad (2.4.1)$$

$$\epsilon(t) = \int_0^t J(t-u) \frac{d\sigma(u)}{du} du \quad (2.4.2)$$

Históricamente, estas dos funciones han sido los medios más comunes de expresar la distinta respuesta viscoelástica de los materiales. Dependiendo del modelo constitutivo atribuido al material les corresponderán unas funciones de relajación y de “creep” específicas, permitiéndonos determinar el comportamiento del material relativo a tensiones y deformaciones, y caracterizarlo con los apropiados parámetros mecánicos. A continuación, introduciremos los modelos mecánicos más comunes y el tipo de respuesta que representan.

### – 2.2.1. Modelos mecánicos constitutivos

En esta sección se introducirá la representación del comportamiento viscoelástico mediante modelos mecánicos unidimensionales, también conocidos como reológicos. Cada uno de estos modelos predice la repuesta del material ante diversas condiciones de excitación. El comportamiento viscoelástico tiene componentes elásticas y viscosas, las cuales se pueden modelar como combinaciones de distintos elementos mecánicos (muelles para elasticidad y amortiguadores para viscosidad). Cada modelo tiene una configuración característica de estos elementos, que puede ser equivalentemente representado por medio de circuitos eléctricos análogos. En el circuito eléctrico equivalente, la tensión representa el voltaje, y la velocidad de deformación la intensidad. A su vez, el módulo de elasticidad del muelle es análogo a la capacitancia (almacena energía) y la viscosidad del amortiguador a la resistencia eléctrica (disipa energía).

Como ya se ha mencionado con anterioridad las componentes elásticas se pueden modelizar como muelles (lineales, “*Hookean springs*”), teniendo tanto una masa como una energía disipada despreciables. Este comportamiento viene representado por la ecuación 1.8, que ya introdujimos en el capítulo anterior, y en el cual únicamente tratábamos el caso puramente elástico. Por otro lado, las componentes puramente viscosas están modelizadas por amortiguadores (lineales, “*Newtonian dashpot*”) con una masa despreciable. En este segundo caso, la relación entre la tensión y la deformación vendrá dada por la siguiente ecuación constitutiva,

$$\sigma = \eta \frac{d\epsilon}{dt} \quad (2.5)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del material y  $d\epsilon/dt$  es la primera derivada de la deformación. A mayor rapidez en la deformación, mayor será la tensión aplicada.

Distintas combinaciones de muelles y amortiguadores dan lugar a diferentes modelos reológicos. A continuación, discutiremos algunos de los más representativos, entre los que se encuentran: el modelo Maxwell, el modelo Kelvin-Voigt, el SLS (por sus siglas en inglés: “*Standard Linear Solid*”) y los modelos tipo “*Power Law*”<sup>31,32</sup>.

**Maxwell:** este modelo mecánico está caracterizado por un muelle y un amortiguador en serie (ver Tabla 2.2, representación del modelo Maxwell). En esta configuración, la tensión que sienten ambas partes del sistema es equivalente  $\sigma_{total} = \sigma_{damper} = \sigma_{spring}$ . Mientras que la deformación total vendrá dada por la suma de ambas contribuciones  $\epsilon_{total} = \epsilon_{damper} + \epsilon_{spring}$ . Estas dos expresiones pueden ser rescritas en una única ecuación (2.6), representando la relación tensión-deformación para este tipo de materiales.

$$\frac{d\epsilon(t)}{dt} = \frac{\sigma(t)}{\eta} + \frac{1}{E} \frac{d\sigma(t)}{dt} \quad (2.6)$$

**Kelvin-Voigt:** este modelo es representado por un muelle y un amortiguador en paralelo, como esta mostrado en la tabla 2.2. Dado que ambas componentes se encuentran en paralelo la deformación en ambas será equivalente  $\epsilon_{total} = \epsilon_{damper} = \epsilon_{spring}$ . Sin embargo, la tensión total será la suma de ambas contribuciones  $\sigma_{total} = \sigma_{damper} + \sigma_{spring}$ . Gracias a estas propiedades un material Kelvin-Voigt está gobernado por la siguiente expresión o ecuación constitutiva:

$$\sigma(t) = E\epsilon(t) + \eta \frac{d\epsilon(t)}{dt} \quad (2.7)$$

El modelo Kelvin-Voigt predice de forma más realista un experimento de “*creep*” (aplicación de una tensión constante,  $\sigma_0$ ), ya que en el límite de tiempos infinitos se aproxima a la deformación constante mientras que el modelo Maxwell crece linealmente como función del tiempo de forma ininterrumpida. No obstante, para un experimento de “*load relaxation*” (deformación constante a lo largo del tiempo,  $\epsilon_0$ ) un material Maxwell presenta un decaimiento exponencial, mientras que en este caso es el Kelvin-Voigt el que no presenta relajación de la tensión con respecto al tiempo.

**“Standard Linear Solid” (SLS):** también conocido como modelo Zener, es un modelo viscoelástico que es capaz de predecir realísticamente tanto el “*creep*” como el “*load relaxation*”, combinando tres diferentes elementos mecánicos. El SLS aglomera los aspectos positivos de los dos modelos previamente introducidos. Existen dos posibles representaciones para el SLS; la Maxwell y la Kelvin (figura en tabla 2.2). En la configuración Maxwell se presenta el conjunto como dos sistemas en paralelo; primero un muelle solitario, y posteriormente, un muelle y un amortiguador en serie. Por otro lado, en la configuración Kelvin invertimos los órdenes, presentamos el conjunto como dos sistemas en serie, primero un muelle, y después, un muelle y un amortiguador en paralelo. Dado que ambas configuraciones presentan un

comportamiento mecánico equivalente (modelos conjugados que pueden obtenerse uno a partir del otro<sup>31</sup>), introduciremos exclusivamente la matemática de la configuración Maxwell, la cual suele usarse cuando el estímulo aplicado es una deformación. En la ecuación 2.8 se describe la relación entre tensión y deformación para el caso previamente mencionado.

$$\sigma(t) + \frac{\eta}{E_2} \frac{d\sigma(t)}{dt} = E_1 \epsilon(t) + \frac{\eta (E_1 + E_2)}{E_2} \frac{d\epsilon(t)}{dt} \quad (2.8)$$

Ley de Potencias (“Power Law”): todos los modelos viscoelásticos presentados hasta ahora están basados en redes de muelles y amortiguadores conectados en serie o en paralelo con distintas configuraciones. Para los casos de los modelos con una gran variedad de estos elementos se puede demostrar que la función de relajación del sistema puede resumirse en el tiempo elevada a una potencia<sup>33-35</sup>. La gran diferencia de este modelo respecto a los anteriores, es que, al englobar el comportamiento de una gran cantidad de elementos, no tendremos un único tiempo de relajación. Análogamente al muelle y el amortiguador, este modelo puede representarse por un elemento fraccional (“*Scott-Blair*” o “*spring-pot*”) con una ecuación constitutiva del tipo 2.9<sup>36-40</sup>.

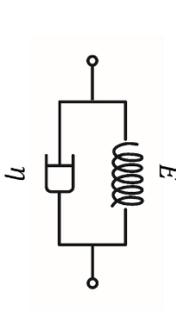
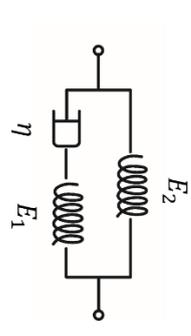
$$\sigma(t) \propto \frac{d^\gamma \epsilon}{dt^\gamma} \quad (2.9)$$

Donde  $0 \leq \gamma \leq 1$  es el elemento fraccional actuando sobre la derivada. Esta expresión se traduce en una función de “*creep*” para el sistema modelizado conforme a la ecuación 2.10.

$$J(t) = J_0 \left( \frac{t}{t_0} \right)^\gamma \quad (2.10)$$

El pre-factor  $J_0$  caracteriza la blandura del material (magnitud con un significado inverso al módulo de elasticidad), la constante  $t_0$  normaliza la variable temporal, y el exponente  $\gamma$  (parámetro más relevante) expresa como de cercano es el comportamiento del sistema a un muelle “*Hookean*” ( $\gamma = 0$ ) o un amortiguador “*Newtonian*” ( $\gamma = 1$ ). Se puede observar como para  $\gamma = 0$  la ecuación constitutiva 2.9 se reduce a una del tipo 1.8 (toda la energía debido a la deformación es almacenada de forma elástica), mientras que para  $\gamma = 1$  se convierte en una expresión similar a 2.5 (el sistema es incapaz de almacenar elásticamente la energía de deformación, disipándola en forma de calor).

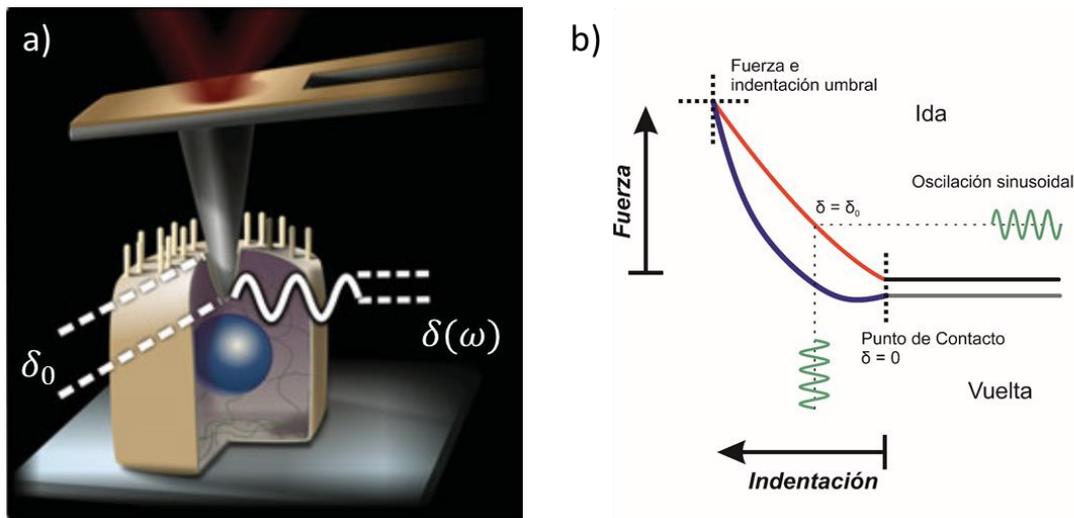
Una vez introducidos algunos de los modelos mecánicos más básicos, y otros con especial relevancia en la modelización de sistemas biológicos, es momento de resumir toda la información previamente descrita. En la tabla 2.2 se pueden encontrar los cuatro modelos que hemos discutido en el texto incluyéndose la función de relajación y la función de “*creep*” de cada uno de los ellos. Estas expresiones tendrán un papel crucial en el desarrollo del capítulo 3, que es cuando aplicaremos los conceptos viscoelásticos para modelizar el comportamiento de células vivas. Finalmente, cabe mencionar que en esta misma tabla están representados cada uno de los modelos como conjuntos de varios amortiguadores y/o muelles conectados en serie y/o paralelo entre sí.

Modelo Reológico	Expresiones matemáticas		Representación del Modelo
	$K(t)$ (Función de Relajación)	$J(t)$ (Función de "creep")	
Maxwell	$K_M(t) = E e^{-t/\tau_M}$	$J_M(t) = \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta}$	
Kelvin-Voigt	$K_{KV}(t) = E + \eta \delta_{dirac}(t)$	$J_{KV}(t) = \frac{1}{E} (1 - e^{-t/\tau_{KV}})$	
"Standard Linear Solid" (SLS)	$K_{SLS-M}(t) = E_1 + E_2 e^{-t/\tau_{SLS}}$	$J_{SLS-M}(t) = \frac{1}{E_1} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_{SLS}}} \right) + \frac{1}{E_1 + E_2} \left( e^{-\frac{t}{\tau_{SLS}}} \right)$	
"Power Law"	$K_{PL}(t) = \frac{1}{J_0 \Gamma(\gamma + 1) \Gamma(1 - \gamma)} \left( \frac{t}{t_0} \right)^{-\gamma}$	$J_{PL}(t) = J_0 \left( \frac{t}{t_0} \right)^\gamma$	

**Tabla 2.2.** Comparación de los distintos modelos reológicos introducidos. La tabla contiene tanto la función de relajación como la de "creep" para cada uno de los modelos. A su vez, la representación del modelo en función de muelles, amortiguadores o "spring-pot" se encuentra incluida. Para el caso particular del SLS, las expresiones matemáticas están referidas a la configuración Maxwell ( $\tau_{SLS} = \frac{E_1 + E_2}{E_1} \tau_{SLS}$ ).

## 2.3. Métodos experimentales para medir las propiedades viscoelásticas de células con un AFM

La comunidad científica que basa sus trabajos y aportaciones en la técnica de AFM ha ido proponiendo, a lo largo de las últimas décadas, diversos métodos para extraer las propiedades mecánicas de una gran variedad de materiales. Entre estos están tanto células como tejidos biológicos. A continuación, se introducirán y enumerarán una serie de estudios de AFM dedicados a la obtención de las propiedades viscoelásticas de células. Estas contribuciones pueden ser clasificadas en dos categorías principales, métodos de estudio de la respuesta temporal y métodos basados en la aplicación de una fuerza oscilatoria.



**Figura 2.4.** Esquema del procedimiento experimental de los denominados métodos de fuerza oscilatoria. a) Ilustración de como inicialmente indentamos la célula una profundidad  $\delta_0$ , para posteriormente aplicar una excitación con amplitud de  $\delta(\omega)$  sobre la célula. Adaptada de Rother et al.<sup>41</sup>. b) Curva de fuerzas-distancia que ejemplifica el mismo protocolo experimental, la amplitud de las oscilaciones inducidas a una determinada indentación  $\delta = \delta_0$  suelen ser del orden de decenas de nanómetros.

Lo que denominamos **métodos de fuerza oscilatoria** son todos aquellos procedimientos en los cuales la punta penetra la célula hasta una profundidad preseleccionada o indentación ( $\delta = \delta_0$ ), seguido de una posterior perturbación de la misma en forma sinusoidal (la figura 2.4 contiene un esquema representativo de esta metodología). Los primeros en introducir esta metodología fueron Shroff et al.<sup>42</sup> y Mahaffy et al.<sup>43</sup>, permitiéndonos el estudio reológico de la dependencia en frecuencias tanto de geles como de células. En este trabajo obtienen información sobre el módulo complejo o módulo dinámico  $E^*(\omega)$ , propiedad que hace referencia al cociente entre deformaciones y tensiones en condiciones vibratorias ( $\omega =$  velocidad angular).

$$\sigma(\omega) = E^*(\omega) \epsilon(\omega) \quad (2.11)$$

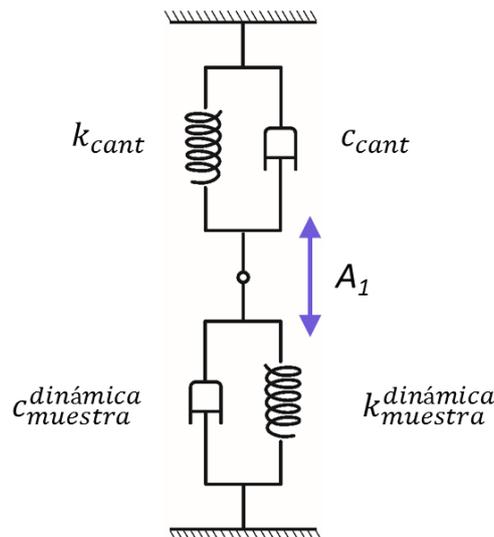
Como se indica en la ecuación 2.11,  $E^*(\omega)$  se define como la respuesta sinusoidal de la tensión en estado estacionario debida a una deformación sinusoidal de amplitud unidad. Para un material puramente elástico toda la respuesta se encuentra en fase con el impulso, por ejemplo, para una deformación del tipo  $\epsilon(\omega) = \epsilon_0 \sin(\omega t)$ , la consecuente tensión ejercida

(ecuación 2.11) será  $\sigma(\omega) = \sigma_0 \sin(\omega t + \lambda) = E^* \epsilon_0 \sin(\omega t)$ , con  $\lambda = 0$  y  $E^*(\omega) = E'$ . En cambio, para un material puramente viscoso, la tensión es proporcional a la velocidad de la deformación (ecuación 2.5), y por tanto toda la respuesta se encuentra fuera de fase. Aplicando el mismo ejemplo, la tensión provocada en el material será del tipo  $\sigma(\omega) = \sigma_0 \sin(\omega t + \lambda) = E^* \epsilon_0 \omega \cos(\omega t)$ , con  $\lambda = 90^\circ$  y  $E^*(\omega) = E''$ . Por tanto, un material viscoelástico, exhibirá un comportamiento intermedio (ecuación 2.12), con una componente en fase que viene dada por el “storage modulus”,  $E'$ , relacionada con la parte real del módulo complejo y representando la energía almacenada por el sistema; y una segunda componente que viene determinada por el “loss modulus”,  $E''$  o  $E_{loss}$ , relacionada con la parte imaginaria del módulo dinámico y representando la energía disipada durante el estímulo.

$$E^*(\omega) = E' + i E'' \quad (2.12)$$

El ratio entre el “loss” y el “storage modulus” es definido como la tangente de pérdidas:  $\tan \lambda = E''/E'$ , aportándonos información sobre el grado de amortiguamiento que presenta el material.

Extrapolando esta idea, Mahaffy et al.<sup>43</sup> estudiaron la diferencia entre la señal oscilatoria que aplicaban a la muestra con la señal de repuesta leída en la micropalanca, pudiendo obtener información completa del módulo complejo del material medido. Asimismo, en este trabajo asumen un área de contacto constante durante las oscilaciones, ya que las amplitudes de las mismas se mantienen muy bajas. De esta forma evitan las complicaciones derivadas de la tridimensionalización del problema, lo que conllevaría un área de contacto dependiente de la indentación. Este aspecto en concreto del problema de indentación será abordado en el capítulo 3 de la presente tesis doctoral. Finalmente, cabe destacar que este procedimiento experimental, clasificado en métodos de fuerzas oscilatorias, ha sido ampliamente usado en gran cantidad de trabajos científicos para el estudio de propiedades mecánicas de una gran variedad de células<sup>41-46</sup>.



**Figura 2.5.** Modelo equivalente utilizado en los experimentos siguiendo el método denominado “multi-harmonic AFM experiments” para el contacto con la célula para extraer las propiedades viscoelásticas ( $k_{muestra}^{dinamica}$ : gradiente de fuerzas repulsivas dinámico; y  $c_{muestra}^{dinamica}$ : amortiguamiento dinámico). En esta configuración miden tres observables: deflexión media ( $A_0$ ), amplitud del primer armónico ( $A_1$ ) y la diferencia de fase ( $\phi_1$ ); para obtener información sobre las propiedades viscoelásticas.

Existen otra clase de experimentos que también pueden ser englobados en métodos de fuerza oscilatoria, son los denominados “*multi-harmonic AFM experiments*”. A diferencia de la anterior metodología, en este caso no se utiliza una indentación previa a la oscilación de la micropalanca, sino que es la propia oscilación la que se usa para indentar la muestra y extraer las propiedades mecánicas. Requiriendo del uso de un elaborado marco teórico, y en muchos casos no siendo posible la extracción de propiedades constitutivas del material como son el módulo de Young y la viscosidad, o como el “*storage*” y “*loss modulus*”. La configuración experimental usada mediante este método está representada en la figura 2.5, utilizando una teoría de vibración lineal (oscilador armónico de masa puntual) e información de varios armónicos para extraer información mecánica del material deseado<sup>47-50</sup>.

Como ya se introdujo al principio de esta sección, existen otro tipo de procedimientos destacables en lo referido a la extracción de propiedades viscoelásticas de células, estos son los denominados **métodos de estudio de la respuesta temporal**<sup>51-55</sup>. Estos métodos están basados en los conceptos experimentales previamente introducidos en la sección 2.2 sobre modelos mecánicos (“*load relaxation*” y “*creep compliance*”). A continuación, expondremos el caso concreto de cómo realizar este experimento con una técnica en particular, el AFM. Para un experimento de “*load relaxation*”, la punta es acercada a la muestra y posteriormente penetrada hasta una cierta indentación. Una vez alcanzada, el microscopio se encargará de mantener la posición de la punta constante (para ello se mantiene la indentación constante:  $S(t) = const$ ), mientras que los cambios en la fuerza ejercida por el material sobre la punta serán registrados. Por el contrario, en un experimento de “*creep*”, realizamos el proceso inverso. También acercamos la punta a la muestra y la penetramos. Sin embargo, esta vez el microscopio tiene que mantener constante la fuerza ejercida sobre el material ( $F = const$ ), mientras que se miden los cambios en indentación.

El principal inconveniente o desventaja al cual se tienen que enfrentar este tipo de procedimientos es el largo tiempo de adquisición al cual es expuesta la muestra. Para un experimento de ambos tipos (“*creep*” o relajación) es necesaria la actuación periodos de tiempo que pueden rondar los segundos. Y, por tanto, abocando estas metodologías a la imposibilidad de un mapeo o adquisición de imágenes de propiedades mecánicas de alta resolución.

## 2.4. Otros métodos para lograr extraer propiedades mecánicas de células más allá del AFM

Más allá de los estudios realizados por la comunidad científica de AFM, existen una gran variedad de técnicas y herramientas dedicadas a la extracción de propiedades mecánicas de células o muestras biológicas. En esta sección se introducirán las técnicas más comunes utilizadas en el ámbito científico para este propósito. Métodos experimentales como “*Magnetic Twisting Cytometry*” (MTC), microreología por seguimiento de partículas (PTM, por sus siglas en inglés: “*Particle-Tracking Microrheology*”), reometría de planos paralelos (PPR, por sus siglas en inglés: “*Parallel-Plate rheology*”), reología de capas celulares (CMR, por sus siglas en inglés: “*Cell Monolayer Rheology*”), aspiración con micropipetas, (MA, por sus siglas en inglés: “*Micropipette Aspiration*”), substratos elastoméricos, (ES, por sus siglas en inglés: “*Elastomeric Substrate*”), citometría por microfluidica, (MC, por sus siglas en inglés: “*Microfluidic Cytometry*”) o estiramiento óptico (OS, por sus siglas en inglés: “*Optical*”).

*Stretching*”). Todas las técnicas mencionadas pueden englobarse en tres distintas categorías: medidas basadas en partículas submicrométricas (MTC y PTM), métodos dedicados a medidas de monocapas celulares (CMR y ES) y procedimientos capaces de medir la respuesta de una célula completa (PPR, OS, MA y MC)<sup>39,56-59</sup>.

La comparación entre las diferentes técnicas experimentales expuestas puede resultar complicada y distar en muchos de los casos de lo trivial. Como ya se comentó en la subsección sobre la influencia de la corteza celular, dentro de las propias medidas de AFM, hay que tener especial cuidado y atención al comparar experimentos realizados con diferente tipo de puntas o con distintas velocidades. No obstante, existen más factores que pueden cambiar el módulo de Young de las células que medimos experimentalmente. Entre este tipo de factores se encuentran por ejemplo si trabajamos con una población o con una célula individual; si la célula se encuentra flotando o adherida a un sustrato; si estamos midiendo la respuesta celular de forma global o local; si se está usando una área de contacto célula sonda grande o pequeña; si se están evaluando zonas concretas como el núcleo, citoplasma, lamelipodios, corteza celular, etc.; si se están ejerciendo mayores o menores tensiones; o simplemente cuál es el ambiente extracelular y como está influenciando nuestras medidas. Todos estos factores o condiciones experimentales deben ser tenidos en cuenta y evaluadas cuidadosamente para poder llegar a una comparación exitosa entre las distintas técnicas experimentales. A continuación, se describirán brevemente las bases de cada una de las metodologías que se han mencionado previamente.

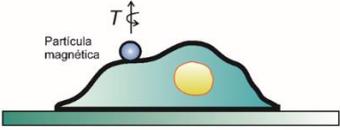
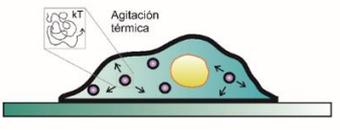
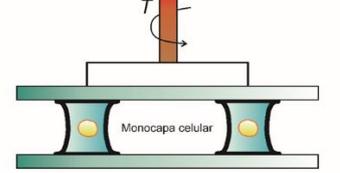
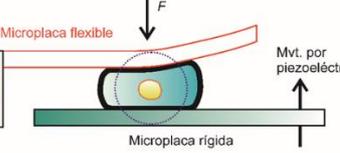
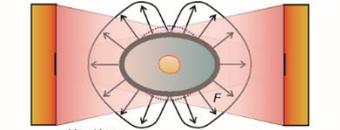
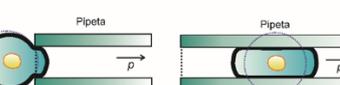
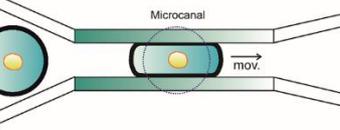
#### **Métodos basados en el seguimiento de partículas:**

MTC (“*Magnetic Twisting Cytometry*”): Esta técnica se basa en la aplicación de un campo magnético homogéneo sobre un sistema previamente configurado, el cual está compuesto por una partícula ferromagnética colocada sobre la superficie de una célula. Mediante la exposición a un campo magnético originado por unas bobinas, se produce el movimiento y rotación de la partícula ferromagnética, a la vez que interacciona con la célula. Con esta metodología es posible obtener valores del módulo de cortadura del material, conociendo el desplazamiento de la partícula, el campo magnético aplicado y el área de contacto entre la partícula y la célula<sup>33,60-65</sup>.

PTM (“*Particle-Tracking Microrheology*”): Este segundo método consiste en la medida del movimiento espontáneo de una serie de partículas submicrométricas previamente inyectadas en la célula. Sencillamente, unas partículas fluorescentes se introducen en la célula, núcleo o citoplasma, y se mide su movimiento y evolución dentro de la misma. Para analizarlo se suele evaluar el desplazamiento cuadrático medio de las trayectorias de cada una de las partículas, pudiéndose obtener valores de elasticidad y viscosidad para la célula<sup>66-70</sup>.

#### **Método de medida de monocapas celulares:**

CMR (“*Cell Monolayer Rheology*”): En este caso se utilizará un reómetro para intentar calcular el módulo de cizalla de las células. La configuración experimental consiste en un plano o placa y un anillo, entre los cuales se colocarán las células formando una monocapa dispersa. En algunos casos habrá que utilizar compuestos como la fibronectina para mejorar la adhesión de las células a los platos del reómetro (anillo y plano). Una vez colocadas las células se realizará una rotación del anillo sobre su eje de simetría, y, por tanto, aplicando una deformación transversal sobre las células<sup>71</sup>.

Técnica	Categoría	Ventajas / Inconvenientes
 <p>Partícula magnética</p> <p>T</p> <p>“Magnetic Twisting Cytometry”</p>	Seguimiento de partículas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir propiedades locales de células.</li> <li>• Amplio rango de frecuencias (0.01 -1000 Hz).</li> <li>• Medida de hasta ~100 células en paralelo, rendimiento: 2000 células por hora.</li> <li>• Alta resolución en cambios de dureza (~1 s).</li> <li>• Bajo torque máximo aplicable.</li> <li>• Trabaja en la superficie celular.</li> </ul>
 <p>Agitación térmica</p> <p>kT</p> <p>“Particle-Tracking Microrheology”</p>	Seguimiento de partículas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intracelular, medidas locales y cuantitativas del módulo de cortadura.</li> <li>• Altas frecuencias (hasta 100 kHz).</li> <li>• Rendimiento: 30 células por hora.</li> <li>• Limitado a materiales transparentes.</li> <li>• Solo para materiales blandos (<math>G \ll 100</math> Pa).</li> </ul>
 <p>T</p> <p>Monocapa celular</p> <p>“Cell Monolayer Rheology”</p>	Monocapa celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de medir toda una capa de células.</li> <li>• Rendimiento: 5-6 horas por monocapa.</li> <li>• No tiene resolución subcelular.</li> </ul>
 <p>Fuerzas de tracción</p> <p>“Elastomeric Substrate”</p>	Monocapa celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Habilidad de medir las fuerzas de tracción de células tanto individual como colectivamente.</li> <li>• Principalmente para células adherentes.</li> <li>• Propiedades de las células afectadas por la topografía del sustrato.</li> </ul>
 <p>Microplaca flexible</p> <p>F</p> <p>Mvt. por piezoeléctricos</p> <p>Soporte</p> <p>Microplaca rígida</p> <p>“Parallel-Plate Rheometry”</p>	Deformación Global	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlar el pre-estrés de la célula.</li> <li>• Amplio rango de fuerzas (hasta ~ 1 <math>\mu</math>N).</li> <li>• No tiene resolución subcelular.</li> <li>• Bajo rendimiento: 6 células por hora.</li> </ul>
 <p>Haz láser</p> <p>“Optical Stretching”</p>	Deformación Global	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medidas con alta precisión a bajas fuerzas (<math>10^{-2}</math>-<math>10^3</math> pN).</li> <li>• Alta resolución en cambios de dureza (~1 s).</li> <li>• Rendimiento: 60-300 células por hora.</li> <li>• Fuerza máxima &lt; 500 pN.</li> <li>• Calentamiento de la célula causado por el láser.</li> </ul>
 <p>Pipeta</p> <p>p</p> <p>“Micropipette Aspiration”</p>	Deformación Global	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple y económico.</li> <li>• Amplio rango de fuerzas (hasta ~ 100 nN).</li> <li>• Posible daño a las células.</li> <li>• Capacidad: menos de 6 células.</li> <li>• Bajo rendimiento: &lt;1 célula/10 minutos</li> </ul>
 <p>Microcanal</p> <p>mov.</p> <p>“Microfluidic Cytometry”</p>	Deformación Global	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendimiento: ~ 3600 células por hora.</li> <li>• Posible daño a las células.</li> <li>• Propenso a la adhesión de células y obstrucciones.</li> </ul>

**Tabla 2.3.** Resumen comparativo de las técnicas más comunes de la literatura científica para extraer propiedades mecánicas de células a parte de la microscopía de fuerzas atómicas.

ES (“Elastomeric Substrate”): Técnica que permite determinar las fuerzas de tracción tanto de una célula como de una población de las mismas mediante la deformación que ejercen sobre un determinado sustrato. Dicho sustrato estará formado por micro-postes o micro-pilares verticales (normales a la superficie) que se vencerán en una dirección u otra según la célula ejerza una tensión sobre ellos<sup>72</sup>.

#### **Métodos basados en la deformación de toda la célula de forma individual:**

PPR (“Parallel-Plate Rheometry”): Mediante esta técnica se usa un reómetro de planos paralelos para medir la deformabilidad y dureza de las células. El sistema experimental consiste en dos placas, una rígida y una flexible (previamente calibrada), entre las cuales se introducirá una única célula. La célula es presionada y estirada entre ambas placas mediante una serie de movimientos tanto oscilatorios como a velocidad constante. Analizando y comparando el movimiento introducido por la placa rígida y la consecuente respuesta en forma de deflexión en la placa flexible, es posible obtener información sobre valores relacionados con la elasticidad y viscosidad de la célula que está siendo estudiada<sup>73-76</sup>.

OS (“Optical Stretching”): el estiramiento óptico es una técnica de la misma familia que las pinzas ópticas (“Optical Tweezers”), todas ellas consistiendo en trampas ópticas (“Optical traps”). Las trampas ópticas aprovechan la diferencia en el índice de refracción entre una partícula y su medio circundante, para mover o mantener inmóviles objetos microscópicos. Para ello se usa un haz láser altamente focalizado, el cual pasa a través del objeto transfiriéndole momento debido a estos cambios en el índice de refracción. Esta transferencia de momento implica una fuerza neta sobre la interfase objeto-medio (segunda ley de Newton), ocurriendo tanto a la salida como a la entrada del haz en el objeto. Si el objeto posee un índice de refracción mayor que el medio circundante, el haz del láser gana momento al entrar en el objeto, ocasionando una transmisión de momento a la superficie del material (interfase) en la dirección opuesta a la del haz. De forma análoga, el haz al salir del material pierde momento transfiriéndoselo a la superficie de salida del material en la dirección de la propagación de la luz. Aprovechando este fenómeno físico, el OS se caracteriza por colocar en el mismo eje dos haces láser no focalizados completamente idénticos y provenientes de direcciones opuestas. En medio de ambos haces divergentes se posicionará una célula, cada uno de los haces por separado intentará mover la célula en una dirección, contrarrestándose uno al otro y manteniendo la célula estabilizada en el eje (mecanismo descrito en la figura sobre OS en la tabla 2.3). Esta trampa óptica origina unas tensiones sobre la célula ocasionando deformaciones y elongaciones de la misma a lo largo de la dirección del eje sobre el cual están trabajando los haces láser. Conociendo las deformaciones originadas, las tensiones aplicadas y algunos factores geométricos es posible obtener información de las propiedades viscoelásticas de la célula<sup>77-82</sup>.

MA (“Micropipette Aspiration”): Mediante esta técnica experimental se usa una micropipeta para succionar una célula individual gracias a la utilización de una diferencia de presión. Normalmente, la célula se aspira mediante la aplicación de una presión negativa o succión con ayuda de una jeringa (bomba de infusión de jeringa). Una vez atrapada la célula se encontrará deformada llegando a cierta longitud de aspiración. Todo el proceso será monitorizado por microscopía óptica, permitiéndonos conocer propiedades como la tensión superficial de la célula<sup>83</sup>.

MC (“Microfluidic Cytometry”): Este tipo de citometría consiste en la creación de un conjunto de micro túneles por los cuales pueden moverse células vivas flotantes. Dentro de

esta red de túneles existen zonas en las cuales el conducto se estrecha, quedándose la célula atrapada y deformada, y permitiéndose medir propiedades mecánicas de la misma<sup>84</sup>. Esta técnica representa una extensión de la técnica anterior (MA) para la medida simultánea de varias células.

## 2.5 Referencias

1. Pesen, D. & Hoh, J. H. Micromechanical architecture of the endothelial cell cortex. *Biophys. J.* **88**, 670–679 (2005).
2. Clark, A. G., Dierkes, K. & Paluch, E. K. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophys. J.* **105**, 570–580 (2013).
3. Kronlage, C., Schäfer-Herte, M., Böning, D., Oberleithner, H. & Fels, J. Feeling for Filaments: Quantification of the Cortical Actin Web in Live Vascular Endothelium. *Biophys. J.* **109**, 687–698 (2015).
4. Eghiaian, F., Rigato, A. & Scheuring, S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys. J.* **108**, 1330–1340 (2015).
5. Tsvirkun, D., Grichine, A., Duperray, A., Misbah, C. & Bureau, L. Microvasculature on a chip: Study of the Endothelial Surface Layer and the flow structure of Red Blood Cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
6. Fritzsche, M. *et al.* Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics. *Nat. Commun.* **8**, 17–19 (2017).
7. Dhaliwal, R. S. & Rau, I. S. The axisymmetric boussinesq problem for a thick elastic layer under a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* **8**, 843–856 (1970).
8. Gavara, N. & Chadwick, R. S. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 733–736 (2012).
9. Guz, N., Dokukin, M., Kalaparthy, V. & Sokolov, I. If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments. *Biophys. J.* **107**, 564–575 (2014).
10. Fuhrmann, A. *et al.* AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells. *Phys. Biol.* **8**, 15007 (2011).
11. Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B. & Chadwick, R. S. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* **82**, 2798–2810 (2002).
12. Garcia, P. D. & Garcia, R. Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophys. J.* **114**, 2923–2932 (2018).
13. Hanakam, F., Albrecht, R., Eckerskorn, C., Matzner, M. & Gerisch, G. Myristoylated and non-myristoylated forms of the pH sensor protein hisactophilin II: intracellular shuttling to plasma membrane and nucleus monitored in real time by a fusion with green fluorescent protein. *EMBO J.* **15**, 2935–43 (1996).
14. Medalia, O. *et al.* Macromolecular Architecture in Eukaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography. *Science (80-. )*. **298**, 1209 LP-1213 (2002).
15. Charras, G. T., Coughlin, M., Mitchison, T. J. & Mahadevan, L. Life and times of a cellular bleb. *Biophys. J.* **94**, 1836–1853 (2008).
16. Boccaccio, A. *et al.* Nanoindentation characterisation of human colorectal cancer cells considering cell geometry, surface roughness and hyperelastic constitutive behaviour. *Nanotechnology* **28**, 45703 (2017).
17. Morone, N. *et al.* Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* **174**, 851–862 (2006).
18. Bovellan, M. *et al.* Cellular control of cortical actin nucleation. *Curr. Biol.* **24**, 1628–1635 (2014).
19. Harris, A. R. & Charras, G. T. Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology* **22**, (2011).
20. Carl, P. & Schillers, H. Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: Data acquisition and processing. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **457**, 551–559 (2008).
21. Rico, F. *et al.* Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **72**, 1–10 (2005).
22. Darling, E. M., Topel, M., Zauscher, S., Vail, T. P. & Guilak, F. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. *J. Biomech.* **41**, 454–464 (2008).
23. Vargas-Pinto, R., Gong, H., Vahabikashi, A. & Johnson, M. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements. *Biophys. J.* **105**, 300–309 (2013).
24. Lekka, M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience* **6**, 65–80 (2016).

25. Krause, M., Te Riet, J. & Wolf, K. Probing the compressibility of tumor cell nuclei by combined atomic force-confocal microscopy. *Phys. Biol.* **10**, (2013).
26. Targosz-Korecka, M., Malek-Zietek, K. E., Brzezinka, G. D. & Jaglarz, M. Morphological and nanomechanical changes in mechanosensitive endothelial cells induced by colloidal AFM probes. *Scanning* **38**, 654–664 (2016).
27. Ng, L. *et al.* Nanomechanical properties of individual chondrocytes and their developing growth factor-stimulated pericellular matrix. *J. Biomech.* **40**, 1011–1023 (2007).
28. Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B. & Chadwick, R. S. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J* **82**, 2798–2810 (2002).
29. Costa, K. D. & Yin, F. C. P. Analysis of Indentation: Implications for Measuring Mechanical Properties With Atomic Force Microscopy. *J. Biomech. Eng.* **121**, 462 (1999).
30. Akhremitchev, B. B. & Walker, G. C. Finite sample thickness effects on elasticity determination using atomic force microscopy. *Langmuir* **15**, 5630–5634 (1999).
31. Tschoegl, N. W. *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior An Introduction*. (Springer, Berlin, Heidelberg, 1989). doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-642-73602-5>
32. Lakes, R. *Viscoelastic materials*. (Cambridge University Press, 2009).
33. Fabry, B. *et al.* Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* **87**, 1–4 (2001).
34. Djordjević, V. D., Jarić, J., Fabry, B., Fredberg, J. J. & Stamenović, D. Fractional derivatives embody essential features of cell rheological behavior. *Ann. Biomed. Eng.* **31**, 692–699 (2003).
35. Jaishankar, A. & McKinley, G. H. Power-law rheology in the bulk and at the interface: Quasi-properties and fractional constitutive equations. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **469**, (2013).
36. Hu, K. X. & Zhu, K. Q. Mechanical analogies of fractional elements. *Chinese Phys. Lett.* **26**, 1–3 (2009).
37. Prentice, J. H. Dimensional Problem of the Power Law in Rheology. *Nature* **217**, 157 (1968).
38. Scott Blair, G. W. The role of psychophysics in rheology. *J. Colloid Sci.* **2**, 21–32 (1947).
39. Kollmannsberger, P. & Fabry, B. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 75–97 (2011).
40. De Sousa, J. S. *et al.* Analytical model of atomic-force-microscopy force curves in viscoelastic materials exhibiting power law relaxation. *J. Appl. Phys.* **121**, (2017).
41. Rother, J., Nöding, H., Mey, I. & Janshoff, A. Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. *Open Biol.* **4**, 0–6 (2014).
42. Shroff, S. G., Saner, D. R. & Lal, R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **269**, C286–C292 (1995).
43. Mahaffy, R. E., Shih, C. K., MacKintosh, F. C. & Käs, J. Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Phys. Rev. Lett.* **85**, 880–883 (2000).
44. Alcaraz, J. *et al.* Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **84**, 2071–2079 (2003).
45. Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G. & Grütter, P. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: Stiffening induced by contractile agonist. *Biophys. J.* **88**, 2994–3007 (2005).
46. Rigato, A., Miyagi, A., Scheuring, S. & Rico, F. High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells. *Nat. Phys.* **13**, 771–775 (2017).
47. Raman, A. *et al.* Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 809–814 (2011).
48. Cartagena, A. & Raman, A. Local viscoelastic properties of live cells investigated using dynamic and quasi-static atomic force microscopy methods. *Biophys. J.* **106**, 1033–1043 (2014).
49. Cartagena-Rivera, A. X., Wang, W. H., Geahlen, R. L. & Raman, A. Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical mapping of live cells using the atomic force microscope. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
50. Dokukin, M. & Sokolov, I. High-resolution high-speed dynamic mechanical spectroscopy of cells and other soft materials with the help of atomic force microscopy. *Sci. Rep.* **5**, 1–14 (2015).
51. Vadillo-Rodríguez, V., Beveridge, T. J. & Dutcher, J. R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **190**, 4225–4232 (2008).
52. Moreno-Flores, S., Benitez, R., Vivanco, M. D. M. & Toca-Herrera, J. L. Stress relaxation and creep on living cells with the atomic force microscope: A means to calculate elastic moduli and viscosities of cell components. *Nanotechnology* **21**, (2010).
53. Moeendarbary, E. *et al.* The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat. Mater.* **12**, 253–261 (2013).
54. Hecht, F. M. *et al.* Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: Power-law rheology on the nanoscale. *Soft Matter* **11**, 4584–4591 (2015).
55. Rianna, C. & Radmacher, M. Comparison of viscoelastic properties of cancer and normal

- thyroid cells on different stiffness substrates. *Eur. Biophys. J.* **46**, 309–324 (2017).
56. Darling, E. M. & Di Carlo, D. *High-Throughput Assessment of Cellular Mechanical Properties. Annual Review of Biomedical Engineering* **17**, (2015).
57. Li, M., Dang, D., Liu, L., Xi, N. & Wang, Y. Atomic force microscopy in characterizing cell mechanics for biomedical applications: A review. *IEEE Trans. Nanobioscience* **16**, 523–540 (2017).
58. Wu, P.-H. *et al.* A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat. Methods* **15**, 491–498 (2018).
59. Guck, J., Lautenschläger, F., Paschke, S. & Beil, M. Critical review: Cellular mechanobiology and amoeboid migration. *Integr. Biol.* **2**, 575–583 (2010).
60. Boyde, L., Chalut, K. J. & Guck, J. Interaction of Gaussian beam with near-spherical particle: an analytic-numerical approach for assessing scattering and stresses. *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.* **26**, 1814–26 (2009).
61. Wang, N., Butler, J. P. & Ingber, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science (80-. )*. **260**, 1124–1127 (1993).
62. Wang, N. & Ingber, D. E. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys. J.* **66**, 2181–2189 (1994).
63. Wang, N. & Ingber, D. E. Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 327–335 (1995).
64. Deng, L. *et al.* Fast and slow dynamics of the cytoskeleton. *Nat. Mater.* **5**, 636–640 (2006).
65. Fabry, B. *et al.* Selected Contribution: Time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* **91**, 986–994 (2001).
66. Crocker, J. C. *et al.* Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Phys. Rev. Lett.* **85**, 888–891 (2000).
67. Yamada, S., Wirtz, D. & Kuo, S. C. Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophys. J.* **78**, 1736–1747 (2000).
68. Wirtz, D. Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications. *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 301–326 (2009).
69. Wu, P. H. *et al.* High-throughput ballistic injection nanorheology to measure cell mechanics. *Nat. Protoc.* **7**, 155–170 (2012).
70. Cicuta, P. & Donald, A. M. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter* **3**, 1449–1455 (2007).
71. Fernández, P., Heymann, L., Ott, A., Aksel, N. & Pullarkat, P. A. Shear rheology of a cell monolayer. *New J. Phys.* **9**, (2007).
72. Fu, J. *et al.* Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat. Methods* **7**, 733–736 (2010).
73. Thoumine, O. & Ott, A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J. Cell Sci.* **110 ( Pt 1)**, 2109–2116 (1997).
74. Desprat, N., Richert, A., Simeon, J. & Asnacios, A. Creep function of a single living cell. *Biophys. J.* **88**, 2224–2233 (2005).
75. Fernández, P., Pullarkat, P. A. & Ott, A. A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts. *Biophys. J.* **90**, 3796–3805 (2006).
76. Bui, N., Durand-Smet, P. & Asnacios, A. *Single-cell mechanics: The parallel plates technique. Methods in Cell Biology* **125**, (Elsevier Ltd, 2015).
77. Guck, J., Ananthakrishnan, R., Moon, T. J., Cunningham, C. C. & Käs, J. Optical deformability of soft biological dielectrics. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5451–5454 (2000).
78. Guck, J., Ananthakrishnan, R., Moon, T. J., Cunningham, C. C. & Käs, J. The Optical Stretcher - A Novel, noninvasive tool to manipulate biological materials. *Biophys. J.* **81**, 767–784 (2001).
79. Guck, J. *et al.* Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys. J.* **88**, 3689–3698 (2005).
80. Wottawah, F. *et al.* Optical rheology of biological cells. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 1–4 (2005).
81. Balland, M. *et al.* Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **74**, 1–17 (2006).
82. Remmerbach, T. W. *et al.* Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping. *Cancer Res.* **69**, 1728–1732 (2009).
83. Guevorkian, K. & Maître, J. L. Micropipette aspiration: A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. *Methods Cell Biol.* **139**, 187–201 (2017).
84. Hu, S. *et al.* Multiparametric Biomechanical and Biochemical Phenotypic Profiling of Single Cancer Cells Using an Elasticity Microcytometer. *Small* **12**, 2300–2311 (2016).

## Capítulo 3

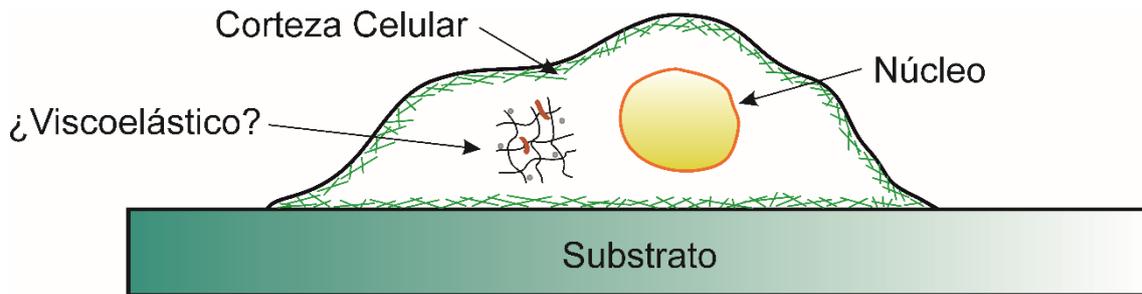
### **Determinación de propiedades mecánicas de células vivas y su evolución ante la despolimerización del citoesqueleto**

#### 3.0. Introducción

Toda célula viva está constantemente sujeta a la acción de fuerzas mecánicas de índole tanto compresivo, extensivo, de cortadura... La habilidad de las células para responder a este tipo de acciones y deformarse es un punto crítico en campos como homeostasis de tejidos y órganos adultos<sup>1,2</sup>, o como desarrollo embrionario<sup>3</sup>. Incluso en trabajos recientes, se han revelado que cambios en la mecánica celular son sellos distintivos para diversas enfermedades del ser humano, en particular cáncer metastático, afecciones cardiovasculares, inflamación, laminopatía y la fragilidad relacionada con la edad<sup>4-8</sup>. Esta respuesta celular ante fuerzas mecánicas (ejercida directamente sobre la célula o a través del ambiente circundante: células vecinas o matriz extracelular<sup>9</sup>) viene definida por la mecánica celular, pudiendo ser de tipo viscoso, elástico o viscoelástico. A lo largo de este capítulo confirmaremos la hipótesis sobre un carácter viscoelástico en la respuesta de células biológicas.

En capítulos anteriores se han ido introduciendo una gran variedad de metodologías que combinándolas nos harán capaces de extraer información mecánica de células. En primer lugar, el capítulo 1 engloba toda la información referente a indentaciones tridimensionales de materiales puramente elásticos. Por otro lado, el capítulo 2 introdujo los conceptos básicos de la respuesta viscoelástica, ciñéndose a un caso unidimensional.

La propuesta que vamos a plantear a continuación, y en la cual se basa el proyecto desarrollado en esta sección, radica en la idea de usar uno de los protocolos más extendidos en la comunidad de AFM a la hora de extraer información mecánica de cualquier tipo muestra. Desde muestras consideradas como materia blanda, rango de kPa, hasta materiales con módulos de elasticidad cercanos a los GPa. Este procedimiento es el conocido como curva de fuerza-distancia, el cual consiste en indentaciones cíclicas del material midiendo al mismo tiempo tanto la fuerza ejercida sobre el mismo como la distancia recorrida por el indentador. En el caso que exista contacto entre el indentador y la muestra, la distancia recorrida por el indentador corresponderá con la deformación causada sobre el material objeto de estudio.



**Figura 3.1.** Esquema de una célula típica cultivada *in vitro* destacando el substrato, la corteza de actina y el núcleo. En este tercer capítulo de la tesis se abordará la cuestión sobre el tipo de respuesta mecánica que se manifiesta en una célula individual y demostrando que la misma tiene carácter viscoelástico.

Aunque previamente se ha introducido el concepto de curva de fuerza-distancia, a continuación, explicaremos con detalle los pasos y mecanismos en los cuales está basado este procedimiento para la obtención de las propiedades mecánicas de una única célula viva. Para un material puramente elástico, existe una superposición entre la curva de ida y de vuelta. No obstante, como ya se comentó en el capítulo 2 la respuesta de un material viscoelástico conlleva una disipación de energía. Este tipo de mecanismos se traduce en una histéresis en las curvas de fuerza-distancia<sup>10,11</sup>. La transformación o la cuantificación de esta histéresis, encerrada entre las curvas de aproximación y retirada, en propiedades físicas conocidas conlleva un proceso con dos etapas principales. Primero, es necesario un modelo físico para procesos inherentes a la disipación de energía<sup>12</sup>. Y segundo, estos modelos requieren que el área de contacto entre punta-muestra se conozca de manera que se pueda cuantificar de forma precisa la energía involucrada. Actualmente, no existe ningún tipo de modelo para saber de forma cualitativa cuál es el área de contacto entre un material de carácter viscoelástico y la punta o indentador, este será una de los grandes problemas que resolveremos en el presente capítulo. Con la ayuda de los conceptos introducidos tanto el capítulo 1 como el 2 podremos abordar estos problemas de manera eficaz, dando lugar a la resolución del problema tridimensional de indentación en un material viscoelástico.

Una vez resuelto el problema de indentación tridimensional de materiales viscoelásticos y teniendo como finalidad comprobar su validez, realizaremos un estudio del comportamiento reológico a bajas frecuencias de modulación de células vivas individuales. Y ya para concluir, le daremos una segunda aplicación a la solución obtenida, monitorizando la evolución de las propiedades mecánicas de las células vivas cuando se encuentran sometidas a una despolimerización de su citoesqueleto.

### 3.1. Teoría viscoelástica para indentaciones 3D

En el capítulo 1 se introdujeron las principales soluciones al problema de mecánica de contacto para distintas geometrías de indentador. En ese caso, nos remitíamos al caso puramente elástico, sin ningún tipo de consideración viscosa o dependiente del tiempo. Por tanto, mediante la utilización de esas contribuciones (modelos mecánicos clásicos) obtuvimos la solución para el problema tridimensional de penetración en un material con un comportamiento elástico. Por otro lado, en el capítulo 2 se incluyen los conceptos básicos de la viscoelasticidad, limitándonos exclusivamente a soluciones para un problema estrictamente unidimensional. A continuación, trataremos de combinar ambas teorías, las cuales están ya bien establecidas en la literatura científica, para obtener la solución de un problema tridimensional de indentación sobre un material viscoelástico.

En primera instancia Lee<sup>13</sup> propuso basarse en el método de la transformada de Laplace para resolver el problema de la indentación viscoelástica. Este consiste básicamente en eliminar la dependencia explícita del tiempo, transformándolo en una especie de análogo elástico en el espacio de Laplace y resolverlo. La principal limitación de este procedimiento se encuentra en la condición de contorno, ya que únicamente funciona si dicha condición no depende del tiempo (como ejemplo tenemos el caso de un indentador cilíndrico en el cual el área de contacto no cambia a lo largo de la penetración). Para una condición de contorno dependiente del tiempo, Radok<sup>14</sup> propuso usar el método de ecuaciones funcionales, siendo completada la solución por Lee & Radok<sup>15</sup>. El método de ecuaciones funcionales está basado en resolver el problema viscoelástico, usando como punto de partida el elástico y reemplazando el módulo de elasticidad en la solución por su correspondiente operador integral.

La respuesta de un material viscoelástico está ejemplificada en la ecuación 2.4, si nos ceñimos a la solución basada en la función de relajación podemos definir un operador viscoelástico ( $\Psi_K(t)$ ) siguiendo la ecuación 3.1, siendo este un operador integral que actuará sobre la deformación. Nótese que se podría realizar un tratamiento totalmente análogo con la función de “creep”.

$$\Psi_K(t) = \int_0^t K(t-u) \frac{d}{du} du \tag{3.1}$$

Donde  $t$  es el tiempo actual y  $u$  es una variable muda que recorre todos los tiempos pasados.

La ecuación general para un indentador axisimétrico actuando sobre un material puramente elástico viene dada por (1.9):  $F = \lambda \delta^\beta$ . Si reescribimos esta ecuación en función del módulo de elasticidad obtendremos:

$$F = \lambda' E \delta^\beta. \tag{3.2}$$

Donde  $\lambda'$  depende del coeficiente de Poisson y algunas consideraciones geométricas, mientras que  $\beta$  es el exponente que únicamente depende de la geometría del indentador. Aplicando la

solución de Lee & Radock, intercambiamos el módulo de Young ( $E$ ) en el problema elástico por su equivalente operador viscoelástico en la ecuación 3.2:

$$E \rightarrow \Psi_K(t) \quad (3.3.1)$$

$$F(t) = \lambda' \int_0^t K(t-u) \frac{d}{du} [\delta(u)^\beta] du \quad (3.3.2)$$

La expresión 3.3.2 nos muestra cual es la fuerza ejercida sobre un material viscoelástico en función del tiempo mediante la observada integral de convolución.

Una vez disponemos de la ecuación general que describe el problema, para resolverla necesitaremos determinar tres puntos importantes relativos al modo de penetración o excitación que estamos realizando sobre el material. Primero, deberemos conocer la forma de la indentación pudiendo ser, por ejemplo, triangular (velocidad constante con el tiempo) o sinusoidal. Los experimentos realizados en este capítulo, los cuales están basados en curvas de fuerza-distancia estándar, se realizarán a velocidad constante. Segundo, tenemos que conocer la forma o geometría del indentador (obviamente restringiéndonos a los casos con simetría axial). En la tabla 1.1 y la figura 1.5 podemos encontrar información referente a este tipo de indentadores, aportándose la información necesaria para determinar que valores se deben dar a los parámetros de la ecuación 3.3.2 ( $\lambda'$  y  $\beta$ ) según cual sea la geometría elegida. Para nuestro caso particular, utilizaremos puntas con forma cónica, las cuales describiremos con más detalle en el apartado experimental. Por último, el tercer aspecto a tener en cuenta es el modelo viscoelástico constitutivo que queremos aplicar a nuestro material, en concreto, células vivas. Dicha información se encuentra representada por la función de relajación  $K(t)$ . Diferentes funciones de relajación fueron introducidas en la tabla 2.2, junto con representaciones de los distintos modelos constitutivos más usuales encontrados en la bibliografía.

La elección del Kelvin-Voigt como modelo constitutivo para la respuesta de nuestras células se realizó por dos razones principales. Primero, este modelo mecánico nos proporciona unas soluciones analíticas, lo que hace todo más simple de analizar e interpretar. La segunda razón es por simplicidad del modelo y el tipo de parámetros que obtenemos a partir de los observables. Tanto la viscosidad como el módulo de Young son parámetros que dan información fácilmente interpretable sobre la mecánica del sistema. Uno de los principales objetivos que se persigue al representar la mecánica de un objeto mediante modelos mecánicos constitutivos es poder relacionar la respuesta mecánica de cada uno de los elementos del modelo con distintos elementos estructurales de la muestra. En el caso concreto de una célula podríamos atribuirlos a la membrana, corteza celular, citoesqueleto, etc. Para el Kelvin-Voigt, como comentaremos más adelante en la sección de resultados y discusión, es posible realizar este tipo de correlación mediante la asunción de un comportamiento poroelástico de la célula.

Más allá de estas dos razones, existe un último argumento a favor de la elección del Kelvin-Voigt. Este radica en la generalidad que posee este modelo a una única frecuencia y su consiguiente compatibilidad con otros modelos más complejos como SLS, modelo Maxwell-Wiechert, modelo "power law", etcétera. Es posible demostrar que trabajando a una única frecuencia y aplicando una perturbación de tipo triangular, todo modelo más elaborado puede

ser reducido a un Kelvin-Voigt. De forma que sería equivalente a tener un conjunto de Kelvin-Voigts, teniendo uno distinto para cada frecuencia. Para más información, la demostración matemática puede encontrarse en la información suplementaria del artículo de García, Guerrero & García<sup>16</sup>.

Como ya introdujimos en la tabla 2.2, la función de relajación para un Kelvin-Voigt ( $K_{KV}$ ) viene dada por:

$$K_{KV}(t) = E + \eta_E \delta_{dirac}(t) \quad (3.4)$$

Dicha ecuación viene expresada en función del módulo de Young del material ( $E$ ) y el correspondiente coeficiente de viscosidad para un experimento de compresión ( $\eta_E$  coeficiente viscoelástico elongacional o coeficiente de "Trouton"). Sin embargo, en la mayoría de contribuciones científicas la viscosidad se describe en términos del modelo para un flujo laminar unidimensional. En dicho modelo el parámetro a tener en cuenta es el coeficiente de viscosidad específico para un experimento de cortadura ( $\eta_{sh}$ ). Para relacionar ambos parámetros podemos recurrir a la expresión 1.13, funcionando de manera completamente análoga al caso que engloba la relación entre  $E$  y  $G$ . Por tanto, para un material incompresible ( $\nu = 0.5$ ) la relación entre ambos coeficientes viscosos será:

$$\eta_E = 3 \eta_{sh} \quad (3.5)$$

A partir de ahora, por simplicidad expresaremos  $\eta_{sh}$  como  $\eta$ . Como ya se comentó en el capítulo 1, el coeficiente de Poisson normalmente asumido para una célula es de un valor entre 0.3 y 0.5<sup>17-22</sup>. Fundamentalmente las células están compuesta por un 70% de agua, existiendo trabajos que las describen como un material incompresible<sup>23</sup>. No obstante, si se aplica el estímulo adecuado durante grandes periodos de tiempo es posible observar cambios volumétricos en la célula. Fenómenos que están relacionados con la exudación del líquido citoplasmático<sup>24</sup>. En otros estudios se intuyen, incluso, oscilaciones intrínsecas de masa-volumen en células vivas<sup>25</sup>. Afortunadamente, las medidas de AFM que realizaremos en esta tesis doctoral tendrán una duración corta, evitando que este fenómeno de exudación tenga un papel importante, y permitiéndonos suponer un volumen constante para nuestras células durante los experimentos de penetración (material incompresible,  $\nu = 0.5$ ).

Dado que hemos elegido modelizar el comportamiento mecánico de la célula como un Kelvin-Voigt, la solución que obtendremos para la ecuación 3.3.2 adoptará en primera instancia una forma del tipo:

$$F(t) = \lambda' \delta(t)^{\beta-1} [3 \beta \eta \dot{\delta}(t) + E \delta(t)] \quad (3.6)$$

Al mismo tiempo, y como ya se mencionó previamente, se usará una punta cónica dando a lugar a que 3.6 se transforme en:

$$F(t) = \frac{4}{3} \frac{2 \tan(\alpha)}{\pi} \delta(t) [6 \eta \dot{\delta}(t) + E \delta(t)] \quad (3.7)$$

Esta fuerza de interacción punta-célula incluye dos distintas contribuciones: una elástica  $F_c(t)$  (procesos conservativos) y  $F_{dis}(t)$  una inelástica (procesos disipativos). En general la fuerza puede expresar como:

$$F(t) = F_c(t) + F_{dis}(t) \quad (3.8)$$

Donde:

$$F_c(t) = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} E \delta^2(t) \quad (3.9.1)$$

$$F_{dis}(t) = 16 \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \eta \delta(t) \dot{\delta}(t) \quad (3.9.2)$$

El resultado expuesto en la ecuación 3.9.2 para la fuerza disipativa difiere de otros previamente deducidos, en los cuales no se ha tenido en cuenta la tridimensionalidad del problema viscoelástico<sup>12</sup>. Más en concreto, la tridimensionalidad del problema de indentación al que nos enfrentamos. En trabajos recientes, se ha optado también por una derivación similar para caracterizar la respuesta viscoelástica de células<sup>26,27</sup>.

A partir de la ecuación 3.7 es posible extraer los valores de dos parámetros viscoelásticos independientes:  $E$  y  $\eta$ . No obstante, existe la posibilidad de también obtener información de dos magnitudes físicas más, el tiempo de relajación ( $\tau$ ) y el "loss modulus" ( $E_{loss}$ ).

El tiempo de relajación definido en un material tipo Kelvin-Voigt viene dado por el cociente entre la viscosidad y el módulo de Young (ecuación 3.10). Básicamente, equivale al tiempo que tardaría el sistema en recuperar el estado de reposo después de una excitación determinada.

$$\tau = \frac{\eta E}{E} \quad (3.10)$$

Por otro lado, el "loss modulus" está relacionado con las pérdidas energéticas sufridas en el material a lo largo de un ciclo, habiéndosele aplicado una excitación de tipo oscilatorio. Para el caso concreto de un modelo Kelvin-Voigt, viene dado por:

$$E_{loss} = | -i \omega \eta E | \quad (3.11)$$

## 3.2. Métodos Experimentales

### – 3.2.1. Cultivo celular y preparación de muestras

Las células escogidas para este estudio han sido “*Mouse Embryonic Fibroblasts*” (MEFs). Han sido cultivadas en un medio compuesto principalmente por “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium – DMEM*” (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con un 10% de “*Fetal Bovine Serum – FBS*” (Gibco Life Technologies) y un 1% “*penicilin/streptomycin*”. Este cultivo se ha realizado en una incubadora encargada de mantener una atmosfera del 90% de humedad, 5% de CO<sub>2</sub>, y temperatura de 37 °C (más detalles sobre el procedimiento de cultivo celular puede ser encontrado en el apéndice A.2.1).

Una vez que las muestras eran sacadas de la incubadora para ser llevadas al AFM, se añadía un elemento extra al medio de cultivo celular para mantener constante el pH del mismo en un valor entorno a 7.4-7.7. El elemento mencionado es un compuesto químico denominado HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y la concentración utilizada fue de 10 mM.

### – 3.2.2. Microscopía y espectroscopía de fuerzas

Los experimentos se realizaron en un AFM comercial (JPK NanoWizard 3, JPK Instruments AG, Berlin, Germany) montado sobre un microscopio invertido tipo Axio Vert. A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Como los estudios se realizaron en células vivas, un control de la temperatura adecuado es esencial para el éxito de los mismos. En nuestro caso, se usó el sistema BioCell (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) acoplado a nuestro AFM. Este sistema permite controlar la temperatura del medio de cultivo con una precisión de 0.1°.

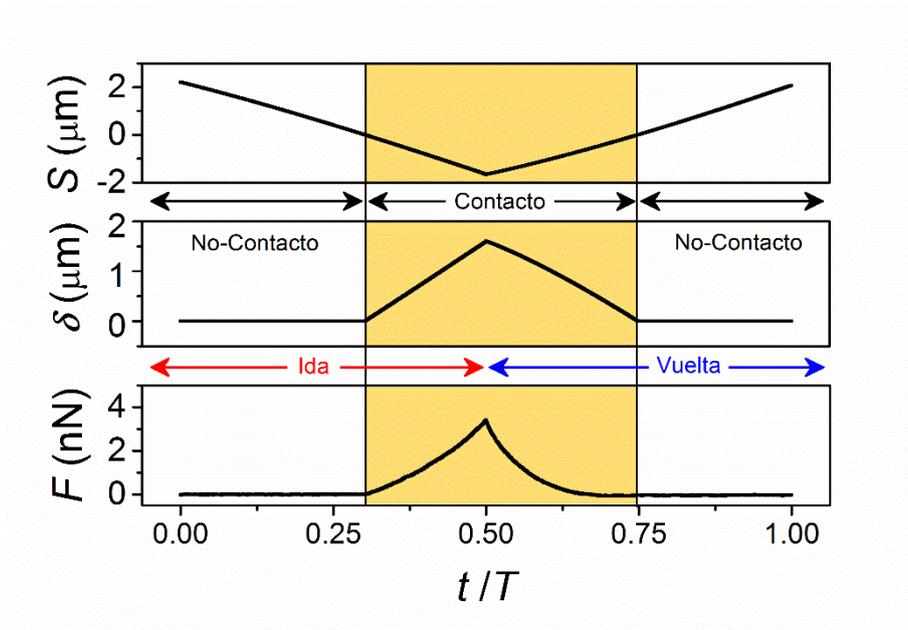
Las micropalanca escogidos fueron del tipo MLCT-B (Bruker, Camarillo, CA, USA) que se caracterizan por una constante de fuerza nominal en torno a 0.02 N m<sup>-1</sup> y una geometría cónica en su punta. Concretamente, el semi-ángulo de abertura de este tipo de puntas es de alrededor de 18°.

Para obtener información cualitativa de propiedades mecánicas en los experimentos de AFM existe un elemento clave, la calibración. En nuestro caso la calibración se produjo por el método de análisis de ruido térmico, el cual permite obtener un valor de la constante de fuerza de la micropalanca en las condiciones experimentales elegidas (ver sección 1.3 sobre calibración del instrumento).

Como ya se anticipó en la introducción, el método experimental escogido para obtener información de las propiedades mecánicas es la bien conocida curva de fuerza-distancia (sección 1.4 de esta tesis). Esta se basa en inducir un movimiento oscilatorio triangular en la punta de AFM, dicho con otras palabras, la punta se acerca y se aleja de la muestra a una velocidad constante. En la figura 3.2 podemos observar cual es el tipo de movimiento oscilatorio que está llevando a cabo en nuestro sistema experimental: onda triangular caracterizada por una velocidad constante. En este tipo de experimentos se puede definir una frecuencia de modulación para el movimiento de la punta, la cual depende de la amplitud y velocidad escogidas. Esta frecuencia de modulación es el parámetro que da un carácter reológico a las curvas de fuerza-distancia. Por último, dentro de este contexto cabe remarcar

que la utilización de curvas de fuerza-distancia con una oscilación triangular de la micropalanca es una elección, ya que se sería posible utilizar cualquier tipo de señal temporal en la perturbación aplicada sobre la muestra (por ejemplo: tipo sinusoidal) para extraer las propiedades mecánicas del material con nuestra metodología.

Para la determinación del punto de contacto seguiremos la metodología ya descrita en el capítulo 1 (sección 1.4.1), denominada ratio de variaciones, basada en el estudio estadístico por intervalos de la evolución de la curva de fuerza-distancia.



**Figura 3.2.** Distancia punta-muestra,  $S(t)$ , indentación,  $\delta(t)$ , y fuerza,  $F(t)$ , en función del cociente entre el tiempo transcurrido y el periodo de modulación. Resultados de las magnitudes involucradas en una curva de fuerza-distancia para un único ciclo.

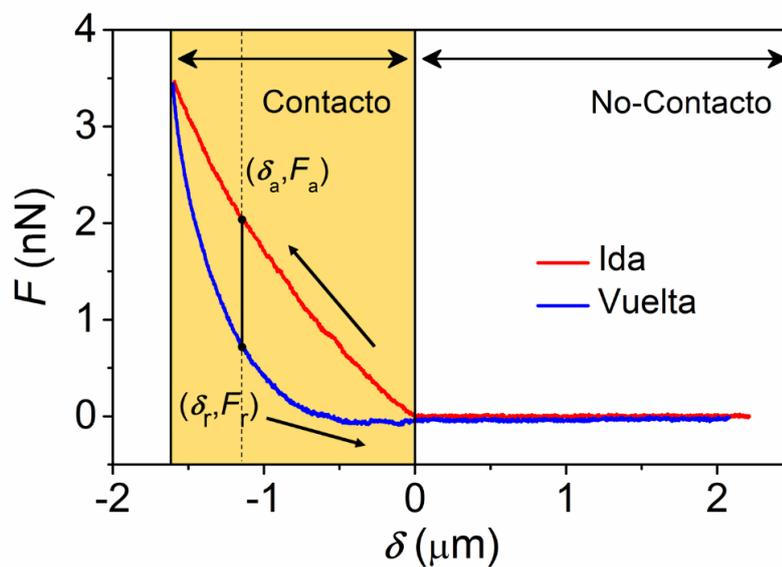
A partir de la configuración y definiciones que se hicieron en la sección 1.2 de esta tesis, y las consideraciones geométricas de la figura 1.2.c podemos definir matemáticamente la clase de experimento que es una curva de fuerza-distancia. Partiendo de la magnitud  $S(t)$  (ver ecuación 1.1) la cual representa la distancia punta-muestra instantánea (definición únicamente válida para la zona de no contacto). En la región de contacto material-muestra  $S(t)$  representa la indentación ejercida sobre le material. Por tanto, podemos definir otra magnitud física  $\delta(t)$ , la indentación, (figura 3.2) definida como:

$$\delta(t) = -S(t) \text{ para } S \leq 0 \quad (3.12)$$

$\delta(t)$  se caracteriza por ser nula en la zona de no contacto y convertirse en la inversa de  $S(t)$  en la zona de contacto y, por tanto, cuantificando la penetración que se ha realizado sobre la célula. Una vez se han convertido los datos experimentales obtenidos del microscopio en magnitudes físicas relevantes, podemos representar la fuerza en función del tiempo y, por consiguiente, la ansiada, curva de fuerza-distancia.

En la figura 3.3 tenemos representado una curva de fuerza-distancia realizada sobre una célula viva. Es posible observar como en la zona de no contacto la fuerza medida es nula, tanto en la ida como en la vuelta. Este es un resultado esperable, siempre y cuando no halla presentes

fuerzas adicionales más allá de las que se derivan de la mecánica de contacto (la curva de fuerza-distancia presentada ha sido corregido por el efecto del “drag” hidrodinámico, más detalles sobre este fenómeno serán expuestos en la siguiente subsección perteneciente de los métodos experimentales). Por otro lado, en la zona de contacto podemos observar un comportamiento muy interesante, ya que las secciones de acercamiento y alejamiento en esta zona no coinciden, en otras palabras, no se solapan. Por tanto, es posible observar un efecto de histéresis en el ciclo de indentación realizado sobre la muestra. En el caso hipotético de un solapamiento entre ambas secciones de la curva de fuerza, esto sería el resultado de una respuesta puramente elástica del material. Por tanto, nuestra observación experimental previa revela la existencia de interacciones disipativas entre la punta y la célula (perdidas de energía), implicando la existencia de mecanismos viscoelásticos en la respuesta mecánica de nuestras células vivas. El área encerrada (histéresis) entre las secciones de ida y de vuelta en la curva de fuerza-distancia coincide con la energía disipada en la muestra.



**Figura 3.3.** Curva de fuerza versus distancia tomada en una célula tipo MEF. La histéresis presenta entre la curva de ida y la de vuelta indica la presencia de procesos disipativos en la interacción entre la punta y la célula.

A raíz de esta observación es innegable la presencia de comportamientos viscoelásticos en muestras medidas experimentalmente sobre células vivas y, por consiguiente, la necesaria aplicación de un modelo constitutivo que incorpore comportamientos viscosos.

### – 3.2.3. La presencia del “drag”, efectos y corrección

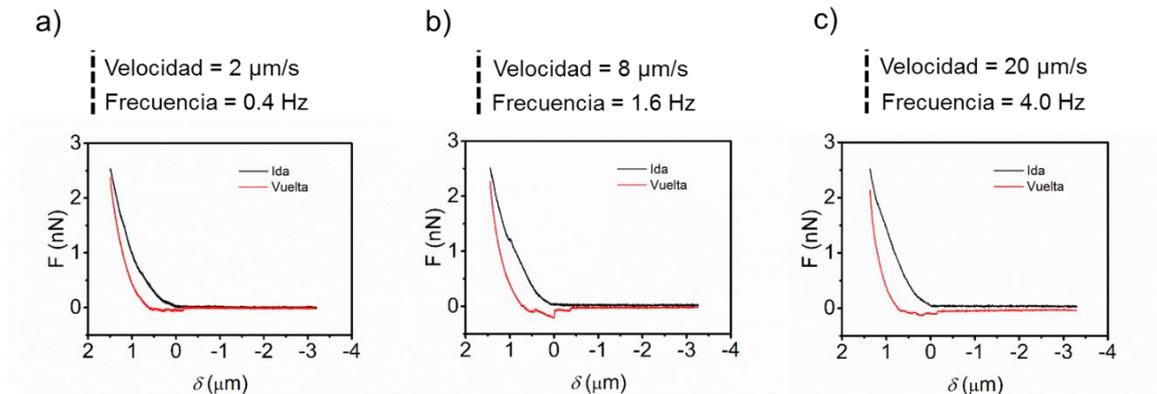
La presencia de una diferencia entre las curvas de aproximación y de retracción en la zona de no contacto evidencia la presencia de un efecto de fuerzas de arrastre (resistencia al movimiento). Este es un efecto de histéresis debido a comportamientos hidrodinámicos. La micropalanca al estar en movimiento dentro de un líquido está afectado por el rozamiento con el propio líquido (es un efecto análogo al que tendría una vela cuando el viento actúa sobre ella).

La fuerza de arrastre se caracteriza por oponerse al movimiento de un cuerpo a través de un líquido. En ausencia de turbulencias (bajo Número de Reynold  $< 1$ , fluido puramente laminar) este tipo de efecto, también llamado “*Stoke’s drag*”, se puede aproximar según la siguiente expresión:

$$F_{drag} = -b v \quad (3.13)$$

Donde  $b$  es el factor de rozamiento y  $v$  es la velocidad de la micropalanca. En la configuración presente en un experimento de AFM, el factor de rozamiento es un parámetro empírico que depende de la forma y el tamaño de la micropalanca y de las propiedades de la muestra.

En la figura 3.4 presentamos un ejemplo de curva de fuerza-distancia afectada por este tipo de efectos hidrodinámicos. El arrastre hidrodinámico introduce una fuerza “repulsiva” durante el acercamiento y una “atractiva” durante el alejamiento. Oponiéndose siempre al movimiento llevado a cabo por la micropalanca. Este efecto, como cabe esperar, aumenta con la frecuencia de modulación (velocidad de movimiento inducida sobre la micropalanca).

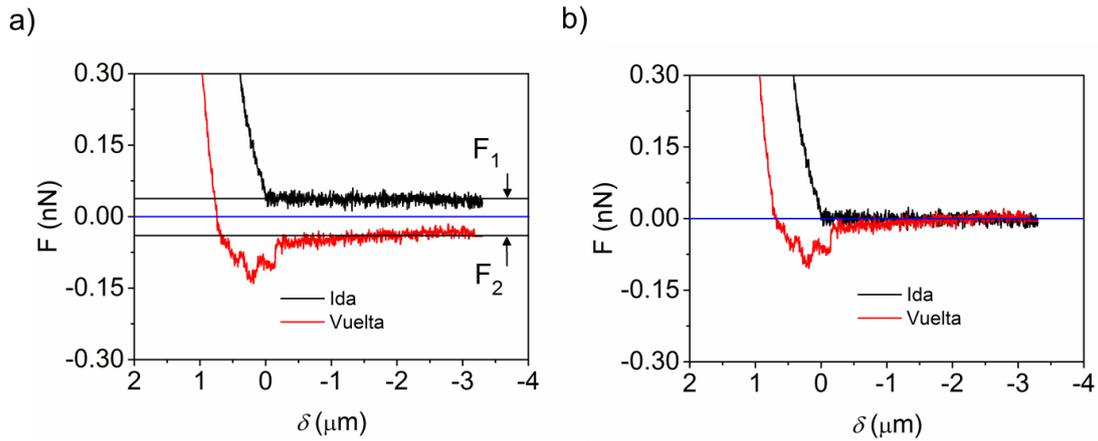


**Figura 3.4.** Curvas de fuerza-distancia en una misma célula para diferentes frecuencias de modulación. Datos sin filtrar por el “drag”. a) - c) Ejemplos representativos de este tipo de curvas para tres diferentes velocidades. A medida que incrementamos la frecuencia de modulación, la separación entre los “baselines” de la ida y la vuelta va aumentando. Este es la huella experimental que el efecto del “drag” hidrodinámico deja en nuestros resultados.

El método para corregir este “drag” hidrodinámico se ilustra en la figura 3.5<sup>16</sup>. Primero, hemos calculado la diferencia en los “baselines” entre la curva de ida y la de vuelta (los “baselines” corresponden a la sección de no contacto de la curva de fuerzas,  $F_1$  y  $F_2$ ). Una vez obtenido, determinaremos el valor absoluto de la fuerza de arrastre mediante la ecuación 3.14.

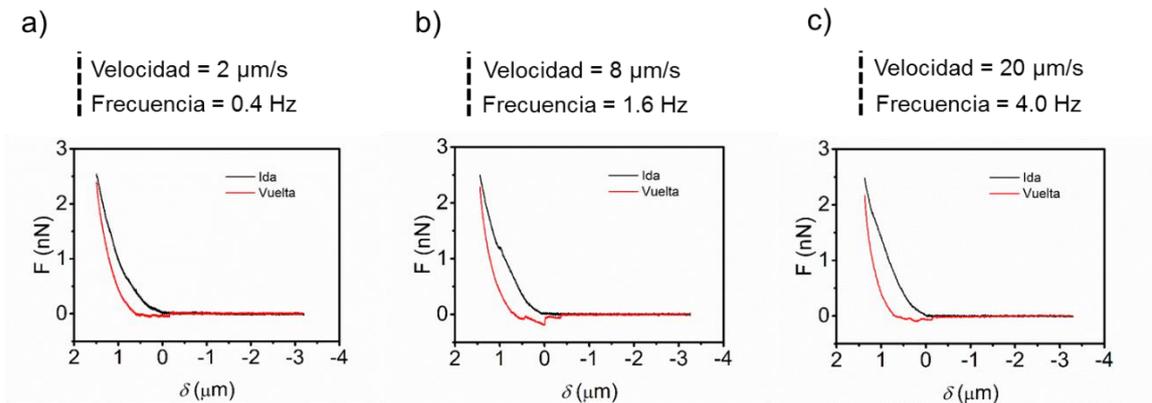
$$|F_{drag}| = \frac{F_1 - F_2}{2} \quad (3.14)$$

Posteriormente, substraeremos el valor absoluto de la fuerza de arrastre a la sección de la curva de fuerza-distancia correspondiente con el acercamiento, y lo añadiremos a la zona de alejamiento. Una vez suprimida la contribución de este tipo de efecto hidrodinámico, los “baselines” para las curvas resultantes deben solaparse quedando como lo mostrado en la figura 3.5.b.



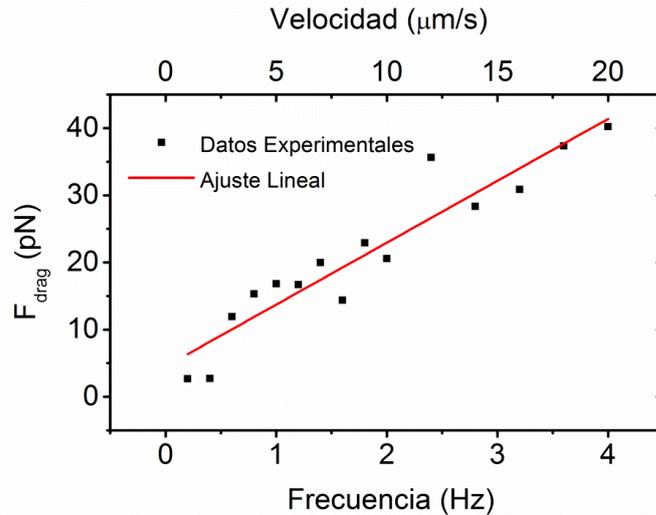
**Figura 3.5.** a) Curva de fuerza-distancia tomada en un MEF a 4Hz de frecuencia de modulación. Lejos de la superficie de la célula podemos observar una separación significativa entre ambas secciones de la curva (ida y vuelta). b) Curva de fuerza-distancia corregida mediante el método que se ha descrito en el texto.

En la figura 3.6 podemos observar distintas curvas de fuerza-distancia para diferentes frecuencias modulación. En todas ellas se ha sustraído este efecto de rozamiento hidrodinámico presente en nuestro sistema experimental.



**Figura 3.6.** Curvas de fuerza-distancia en una misma célula para diferentes frecuencias de modulación. a) - c) Ejemplos representativos de este tipo de curvas afectadas por el “drag” una vez han sido corregidas.

El factor de amortiguamiento puede ser determinado representando los valores de  $b$  para distintas velocidades, y posteriormente, ajustando los resultados experimentales a la ecuación 3.13 (figura 3.7). El resultado de este ajuste nos proporciona un valor de  $b = 1.8 \pm 0.2$  Kg/s, caso particular para una micropalanca del tipo MLCT-B.



**Figura 3.7.** Fuerza del “drag” en función de la frecuencia de modulación de las curvas de fuerza-distancia. Micropalanca empleada: MLCT-B. La línea roja representa el ajuste lineal realizado sobre la dispersión de valores experimentales.

#### – 3.2.4. Tratamiento químico para la depolimeración del citoesqueleto

Durante uno de los estudios reológicos llevados a cabo en esta sección se procedió a despolimerizar una parte de citoesqueleto, en concreto, el compuesto por F-actin. Este proceso se realizó mediante el uso de  $5 \mu\text{M}$  “cytochalasin-D” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), la cual se añadió directamente al medio de cultivo celular.

### 3.3. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos aplicando la teoría introducida y el método experimental descrito anteriormente se dividirán en tres apartados. Primero, introduciremos la forma de calcular y determinar los cuatro parámetros viscoelásticos ( $E$ ,  $E_{\text{loss}}$ ,  $\eta$  y  $\tau$ ) que se describen en la teoría. Continuaremos con los resultados obtenidos con un estudio reológico realizado sobre MEFs barriendo valores de frecuencia de modulación comprendidos entre 0.2 y 4 Hz. Finalizaremos con un último experimento sobre la misma línea celular (MEFs), realizando un estudio en tiempo real de la evolución de las propiedades mecánicas de estas células cuando están afectadas por la depolimerización de su citoesqueleto.

#### – 3.3.1. Cálculo de propiedades viscoelásticas de células vivas ( $E$ , $E_{\text{loss}}$ , $\eta$ y $\tau$ )

Para obtener las propiedades mecánicas  $E$ ,  $E_{\text{loss}}$ ,  $\eta$  y  $\tau$  partiendo de las curvas de fuerza-distancia, tendremos que resolver un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas de forma local. Nos basaremos en las expresiones de la fuerza en función de la indentación tanto para la curva de aproximación como para la de alejamiento: 3.15.1 y 3.15.2, respectivamente

(expresiones que parten de la ecuación 3.7). Están caracterizadas por depender de dos parámetros independientes  $E$  y  $\eta$ . Esto implica que nos basaremos en un proceso exclusivamente analítico.

$$F_a(t) = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \delta_a(t) [6 \eta \dot{\delta}_a(t) + E \delta_a(t)] \quad (3.15.1)$$

$$F_r(t) = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \delta_r(t) [6 \eta \dot{\delta}_r(t) + E \delta_r(t)] \quad (3.15.2)$$

Si para cada una de ellas fijamos un valor de indentación (trabajamos de forma local:  $\delta = \delta_a = \delta_b$ ), es posible sustituir un valor de fuerza para ambas expresiones, ya que los conocemos experimentalmente. Por tanto, pasamos a encontrarnos ante un problema en cual tenemos dos ecuaciones, y únicamente dos incógnitas (variables), que son  $E$  y  $\eta$ .

$$\begin{cases} F_a(\delta) = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \delta(t) [6 \eta \frac{d\delta_a}{dt} + E \delta(t)] \\ F_r(\delta) = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \delta(t) [6 \eta \frac{d\delta_r}{dt} + E \delta(t)] \end{cases} \quad (3.16)$$

La forma más sencilla de resolver nuestro sistema de ecuaciones consiste en dividir todo el problema de mecánica de contacto en su contribución conservativa ( $F_c$ ) y disipativa ( $F_{dis}$ ). Con ayuda de ciertas transformaciones matemáticas, se combinarán tanto las fuerzas en la parte del acercamiento como en la del alejamiento durante un ciclo de la curva de fuerza-distancia obteniendo la siguiente:

$$F_c(\delta) = \frac{F_a(\delta) + F_r(\delta)}{2} \quad (3.17.1)$$

$$F_{dis}(\delta) = \frac{F_a(\delta) - F_r(\delta)}{2} \quad (3.17.2)$$

Las expresiones 3.17.1 y 3.17.2 son tanto la componente disipativa como la conservativa de la fuerza a lo largo de un ciclo completo de acercamiento y alejamiento en función de las fuerzas medidas experimentalmente para cada una de las partes de dicho ciclo oscilatorio. Si nos remitimos al caso de un indentador cónico (situación ya presentada en las discusiones a largo de este capítulo) las expresiones adquieren la forma descrita a continuación:

$$F_c(\delta) = \frac{F_a(\delta) + F_r(\delta)}{2} = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} E \delta^2 + 8 \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \eta \delta \left[ \frac{d\delta_a}{dt} + \frac{d\delta_r}{dt} \right] \quad (3.18.1)$$

$$F_{dis}(\delta) = \frac{F_a(\delta) - F_r(\delta)}{2} = \frac{8}{3} \frac{\tan(\alpha)}{\pi} \eta \delta \left[ \frac{d\delta_a}{dt} - \frac{d\delta_r}{dt} \right] \quad (3.18.2)$$

La ecuación 3.18.1 nos permite obtener el valor del módulo de Young local a partir de la media entre la fuerza de aproximación y alejamiento, sabiendo que velocidad es constante durante todo un ciclo  $\dot{\delta} = \frac{d\delta_a}{dt} \approx -\frac{d\delta_r}{dt}$  (simetría entra la ida y la vuelta).

$$E(\delta) = \frac{3\pi(F_a(\delta) + F_r(\delta))}{16 \tan(\alpha)\delta^2} \quad (3.19)$$

Por otro lado, la ecuación (3.18.2) nos permite despejar el valor del coeficiente de viscosidad local a partir de todos nuestros datos experimentales y conociendo el valor exacto de la velocidad. Si nos fijamos en la expresión 3.20 de forma más detallada, podemos concluir intuitivamente que estamos cuantificando la diferencia entre ambas curvas, en otras palabras, la histéresis presente en nuestro procedimiento experimental.

$$\eta(\delta) = \frac{\pi(F_a(\delta) - F_r(\delta))}{8 \tan(\alpha)\delta\dot{\delta}} \quad (3.20)$$

$E_{loss}$  y  $\tau$  serán calculados a partir de las expresiones 3.10 y 3.11, introducidas previamente en la sección teórica de este capítulo, y que relacionan ambos parámetros secundarios con  $E$  y  $\eta$ .

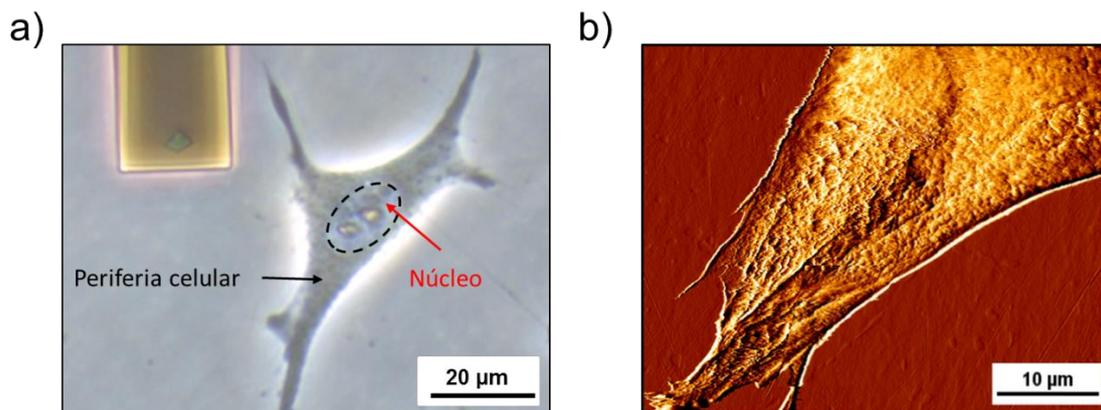
Finalmente, para determinar un valor de cada uno de los cuatro parámetros viscoelásticos en cada una de las curvas de fuerza-distancia, procederemos a hacer una media aritmética de todos los valores obtenidos para cada indentación. La fortaleza de este método radica en su potencial uso tomográfico. Si se deseara, sería posible hacer un estudio en función de la profundidad de la evolución de cada uno de los parámetros.

### – 3.3.2. Estudio reológico de MEFs a baja frecuencia de modulación (0.2 - 4 Hz)

El primer experimento que se realizó aplicando el marco teórico descrito consistió en un estudio reológico en células vivas de los cuatro diferentes parámetros viscoelásticos. En concreto, se estudió la respuesta de una célula ante una fuerza cíclica externa, pudiendo variar la frecuencia de modulación del movimiento triangular aplicado, barriendo valores desde 0.2 a 4 Hz. Los experimentos se llevaron a cabo en la zona del núcleo del fibroblasto (figura 3.8.a), se obtuvieron alrededor 10 curvas de fuerza-distancia distintas a cada frecuencia. Cada una de las curvas se realizó en un punto distinto de la región nuclear (con una separación de cientos de nanómetros entre cada una de ellas), de manera que obtuviésemos una estadística representativa de la respuesta mecánica global del fibroblasto. Nótese que se escogió el núcleo de la célula como región de medida para minimizar los efectos del substrato sobre las propiedades medidas, y para hacer la comparación con otros grupos celulares más fácil y menos propensa a incertidumbres debidas a las medidas experimentales.

En este rango de frecuencias, el módulo de elasticidad de los MEFs vivos se mantiene prácticamente constante alrededor de 5 kPa (figura 3.9.a). No obstante, el coeficiente de viscosidad decrece desde un valor cercano a 460 Pa·s hasta 60 Pa·s para una frecuencia de 4Hz (figura 3.9.b). Este resultado puede ser interpretado como muestra del carácter poroelástico

de las células eucariotas<sup>28</sup>. En este modelo, el citoplasma está formado por una arquitectura porosa de material elástico (citoesqueleto) inmersa todo ella en fluido intersticial (citósol), el cual se mueve a través de esta estructura porosa en respuesta a gradientes de presión. El comportamiento poroelástico puede relacionarse con el modelo Kelvin-Voigt de forma muy directa, de manera que cada elemento estructural queda representado por un parámetro del modelo mecánico. Siguiendo esta línea interpretativa tendremos por un lado la contribución elástica ( $E$ ) del modelo Kelvin-Voigt que caracteriza la respuesta del citoesqueleto o estructura celular, mientras que la parte viscosa ( $\eta$ ) estará relacionada con movimientos internos del citósol. En esta interpretación, una mayor viscosidad estará relacionada con una mayor dificultad del citósol para fluir a lo largo de la red que compone el citoesqueleto.

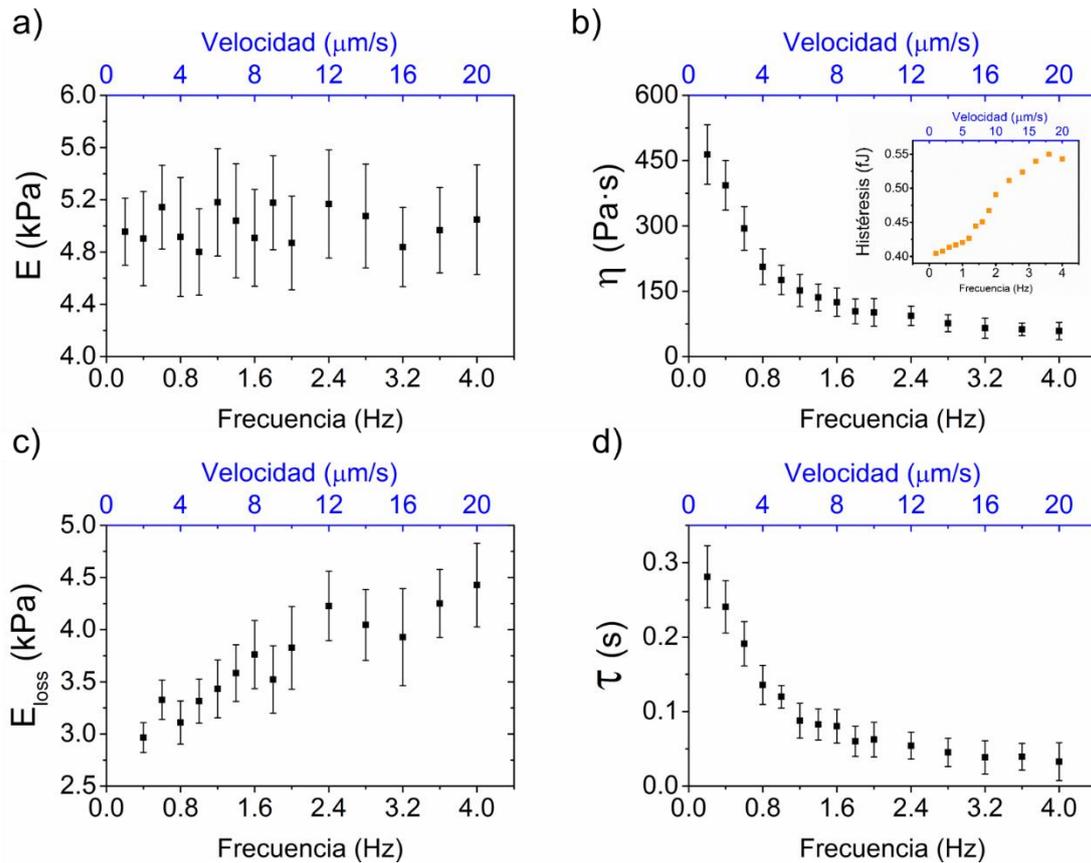


**Figura 3.8.** a) Imagen de microscopía óptica de contraste de fase para una micropalanca rectangular en las cercanías de un fibroblasto MEF. b) Imagen de AFM en modo contacto de un MEF. Se puede observar la existencia de varios elementos pertenecientes a la estructura del citoesqueleto.

Dentro del marco interpretativo que hemos introducido, el hecho de que el módulo de Young se mantenga constante durante esta reducida ventana de frecuencias es un resultado esperable. Al fin y al cabo, estamos modelizando la respuesta del citoesqueleto como elástica. En un sistema exclusivamente elástico no existe una relación entre la frecuencia de la perturbación y la respuesta del material. Sin embargo, la bibliografía evidencia que para sistemas de redes de biopolímeros puede darse el caso de que el valor del módulo de Young aumenta debido a efectos termodinámicos. Este comportamiento puede ser entendido en términos de fluctuaciones longitudinales en la dinámica de un único filamento. A pequeñas escalas temporales (altas frecuencias), menos modos de pandeamiento (resonancia) pueden relajarse. Por tanto, la rigidez que presenta ante una deformación incrementa al aumentar la frecuencia<sup>29</sup>. A la escala de frecuencias en la que hemos trabajado, entre 0 y 4 Hz, es altamente probable que estos efectos termodinámicos puedan ser despreciados. Debido a que el comportamiento de este tipo de fenómenos físicos suele tomar un carácter logarítmico. Y, por tanto, no apreciable a bajas frecuencias.

En segundo lugar, hemos observado un descenso del coeficiente de viscosidad conforme la frecuencia del experimento se iba incrementando. Sabiendo que el tiempo de equilibrio del fluido interno de la célula es del orden de varios segundos<sup>30,31</sup>, y que se está trabajando en tiempos parecidos o inferiores al mismo. La cantidad de material movilizado (líquido moviéndose a través de los poros que forman el citoesqueleto) dependerá de que a frecuencia se realicen los experimentos, siendo mayor conforme más tiempo hayan permanecido en contacto punta y muestra, o menor sea la frecuencia de modulación. Si se está trabajando a mayores frecuencias, se activará una cantidad mayor de material implicando que la energía

disipada durante todo el proceso (perdidas de energía debido al movimiento del líquido) se verá incrementada. Por consiguiente, si estamos en presencia de un fenómeno que involucra una mayor energía de disipación, el valor que obtengamos del coeficiente de viscosidad con nuestras medidas de AFM (el cual esta intrínsecamente relacionado con este tipo de comportamientos físicos) debería ser mayor. Esta argumentación explicaría porque conforme incrementamos la velocidad de nuestra punta, el valor experimental obtenido para el  $\eta$  disminuye considerablemente, ya que no damos tiempo suficiente al sistema para que salga del equilibrio.



**Figura 3.9.** Dependencia en frecuencias de la respuesta nanomecánica de una única célula tipo MEF en su medio de cultivo. a) Módulo de Young ( $E$ ). b) Coeficiente de viscosidad, incluyendo una entrada con la histéresis. c) "Loss modulus". d) Tiempo de relajación. Por completitud se han incluido los valores de la velocidad de la micropalanca correspondiente a cada frecuencia de modulación.

Como punto de vista complementario, también podemos entender este comportamiento comparándolo con el caso puramente elástico. Para el caso elástico todas las comunicaciones o transmisiones entre la zona de contacto y el resto del material se hacen de forma instantánea (como si fuera un único muelle ideal). No existen tiempos de relajación intrínsecos del material. Pero en el caso viscoelástico, aunque el área de contacto y la indentación sean exactamente las mismas, la cantidad de material que activamos será menor cuanto más rápido hagamos nuestra deformación. Esto es debido a que la transmisión no se produce instantáneamente, sino que para que la información llegue de un punto del sistema a otro se requiere de un tiempo. En nuestro caso, tendremos cierta cantidad de líquido intersticial, al cual le llevará un tiempo moverse a través de los poros que conforman la estructura de la célula. Para frecuencias muy altas, si no le damos tiempo suficiente al sistema a llegar su nueva posición de relajación (después de la deformación), nos encontraremos en el caso de que la

punta se está alejando cuando aún no se ha activado el movimiento de la máxima cantidad de material posible.

La histéresis encerrada entre las curvas de aproximación y retirada que podemos observar en la figura 3.3 está relacionada por la cantidad de energía disipada durante la interacción punta-muestra (energía de histéresis). Lo cual a su vez está relacionado con el carácter viscoelástico del material que es objeto de medida. En la entrada de la figura 3.9.b, presentamos los valores de la histéresis obtenidos para este estudio reológico. Pudiéndose observar un incremento de la energía disipada desde valores entorno a los 0.40 *fJ* a 0.2 Hz hasta 0.55 *fJ* a 4 Hz.

La figura 3.9.c muestra que el  $E_{loss}$  tiene un comportamiento creciente con la frecuencia. Para el rango entre 0.2-2 Hz,  $E_{loss}$  incrementa monótonamente desde 3 hasta 3.7 kPa. Para frecuencias mayores,  $E_{loss}$  incrementa de una forma mucho más leve. Las pérdidas de energía durante un ciclo en una medida oscilatoria aumentan con la frecuencia, dando lugar a que incluso para sistemas con viscosidad constante, el parámetro  $E_{loss}$  aumente cuando se incrementa la frecuencia del estímulo aplicado. Este resultado en el  $E_{loss}$  es un argumento a tener en cuenta cuando se comparan los valores de módulo de Young que hemos obtenido con respecto a otros estudios en los cuales la respuesta de la célula se asume como perfectamente elástica<sup>10,32</sup>. Al no considerarse comportamientos viscoelásticos se está englobando todas las respuestas mecánicas en un único parámetro. Comportamiento que nosotros somos capaces de desacoplar en la contribución de distintos parámetros. Y, por tanto, llevando a identificar incrementos en  $E$  como comportamientos que podrían ser propios del “*loss modulus*”.

Por último, el tiempo de relajación de nuestra célula decrece cuasi-exponencialmente desde 0.28s para 0.2 Hz hasta 0.05 s para 4 Hz. Este es un resultado esperado, ya que como se introdujo en la sección teórica, el tiempo de relajación viene determinado por el cociente entre coeficiente de viscosidad y el módulo de Young para cada frecuencia. Este resultado indica que cuenta mayor sea la frecuencia aplicada por nuestras curvas de fuerza-distancia sobre la célula, menor tiempo tardará en recuperarse y volver a la configuración inicial. La explicación intuitiva para este comportamiento puede ser englobada en la previamente realizada para el coeficiente de viscosidad.

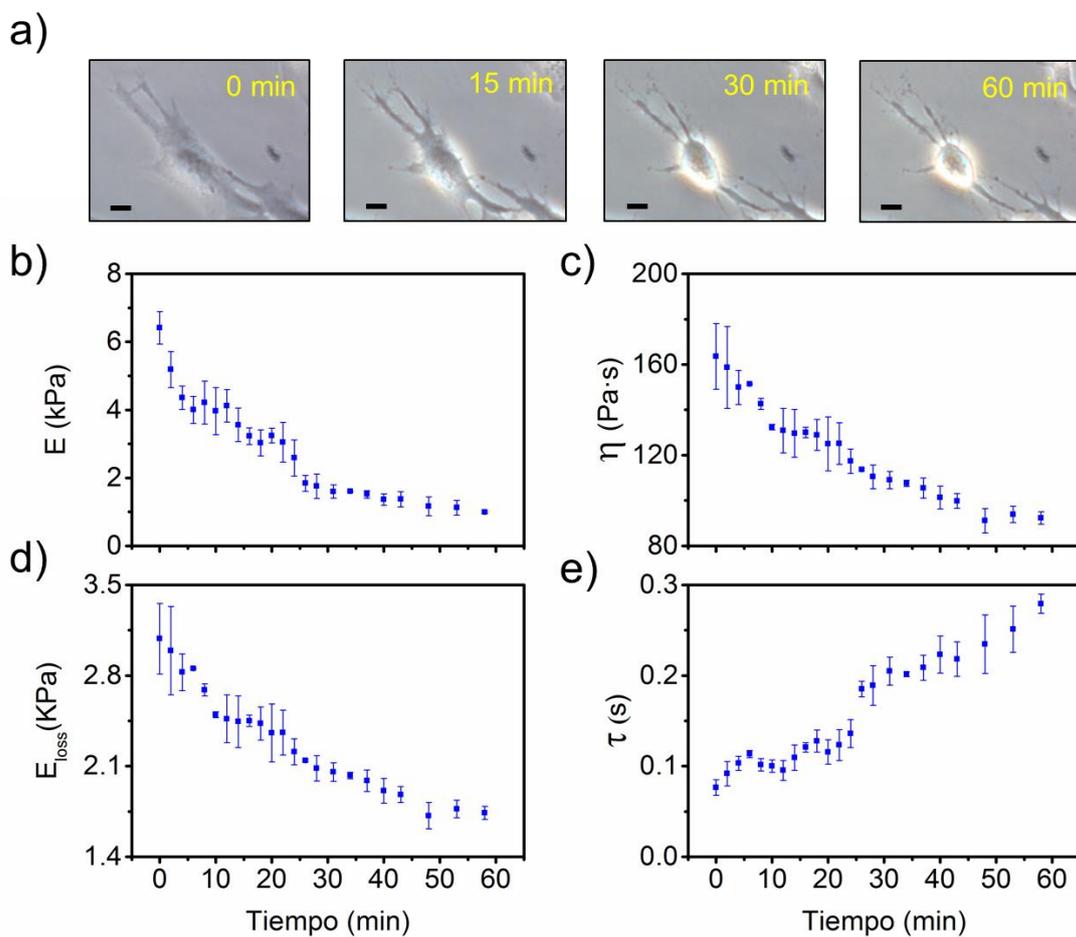
### – 3.3.3. Estudio temporal de la respuesta celular ante la acción de la “*Cytochalasin-D*”.

En este último estudio, expondremos los MEFs a la acción de la Cyt-D. Aplicaremos el método reológico de obtención de propiedades viscoelásticas para poder monitorizar en tiempo real la evolución mecánica de esta célula viva, sujeta a la presencia del compuesto químico ya mencionado. La resolución temporal presentada será de 1 min.

Previamente, diversos estudios han demostrado que la estructura filamentar de actina perteneciente al citoesqueleto tiene un rol importante en la respuesta mecánica de la célula ante una deformación externa<sup>19,33</sup>. Esos estudios se caracterizan por la utilización de, entre otros, un compuesto químico denominado “*cytochalasin-D*” (Cyt-D). La Cyt-D es un potente inhibidor de la polimerización de actina capaz de atravesar la membrana celular (permeable). Dicho compuesto puede llegar a producir la fragmentación de los filamentos de actina e inhibir procesos celulares como la de su propia división<sup>34-36</sup>. En definitiva, podemos decir que la Cyt-D perturba, desorganiza y rompe la red del citoesqueleto basada en actina.

Empezaremos mostrando la evaluación morfológica de la célula en el transcurrir de la actuación de la Cyt-D. Para ello, analizaremos las imágenes ópticas de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido. Es posible observar un claro cambio en la forma de la célula. Inicialmente, (figura 3.10.a tiempo  $t = 0$  s) cuando aún no se ha introducido la Cyt-D, la célula presenta un formato totalmente aplanado y estirado a lo largo del sustrato. Conforme va transcurriendo el tiempo de exposición la célula va cambiando gradualmente su aspecto hacia algo más redondeado, para acabar convirtiéndose en algo semejante a un globo.

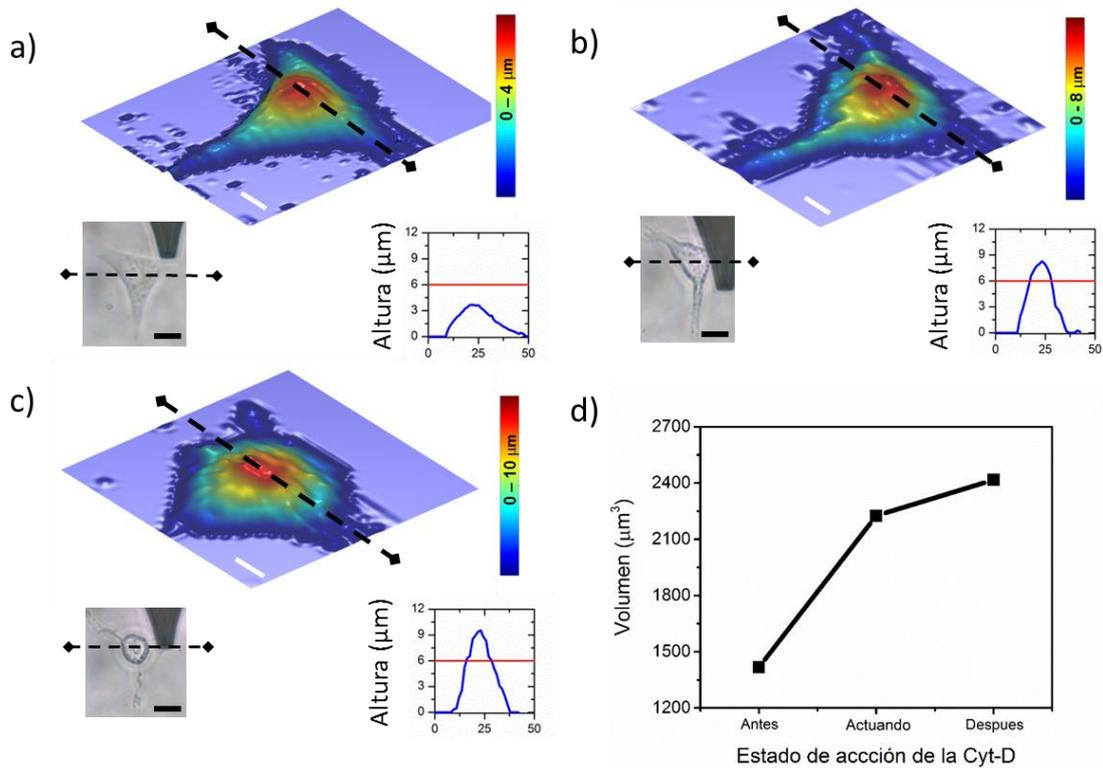
Con ayuda de imágenes topográficas obtenidas con AFM, pudimos observar que el volumen total que presentaba la célula viva se iba incrementando también conforme la Cyt-D se introducía y la afectaba, figura 3.11. Estos resultados son un claro indicador de la perturbación causada por esta droga y de la consiguiente ruptura de gran parte del citoesqueleto, lo cual ha desembocado en la pérdida de una de las funciones principales del citoesqueleto, mantener la forma y estructura de la célula.



**Figura 3.10.** Respuesta nanomecánica resuelta temporalmente de una única célula bajo los efectos de la Cyt-D. a) Secuencia de imágenes (microscopía óptica con contraste de fase) de un MEF expuesto a dicha sustancia. b) Módulo de Young en función del tiempo de exposición. c) Coeficiente de viscosidad. d) “Loss modulus”. e) Tiempo de relajación. Los datos expuestos han sido tomados a una frecuencia de modulación de 1 Hz.

En cuanto a las propiedades viscoelásticas, empezaremos exponiendo los resultados obtenidos a una frecuencia de modulación de 1 Hz en las curvas de fuerza-distancia empleadas. Para el caso del módulo de Young ( $E$ ) (figura 3.10.b) tenemos una evolución decreciente desde

valores alrededor de los 7 kPa hasta llegar a otros cercanos a 1 kPa (después de 60 minutos de exposición). No obstante, es posible diferenciar tres distintos regímenes. Primero, un decaimiento abrupto desde 6.2 kPa hasta 3.6 kPa durante los 5 primeros minutos, etapa caracterizada por una pendiente de  $-10 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Más adelante, entre los 5 y 30 minutos de afección, se produce un cambio de 3.6 a 1.6 kPa con una pendiente de  $-1 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Después de 30 minutos, el decaimiento se vuelve muy leve con un gradiente de  $-0.3 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$  estabilizándose finalmente alrededor de un valor de 1 kPa. Estos resultados están en buena consonancia con trabajos previos sobre otras líneas celulares<sup>33,37-39</sup>. Es de esperar que al modificar o depolimerizar el citoesqueleto, la rigidez o resistencia a la deformación que presente nuestro material disminuya. Y, por tanto, el módulo de elasticidad que medimos experimentalmente sea menor conforme más partes del citoesqueleto (más fibras de actina) se vean afectadas por la Cyt-D.



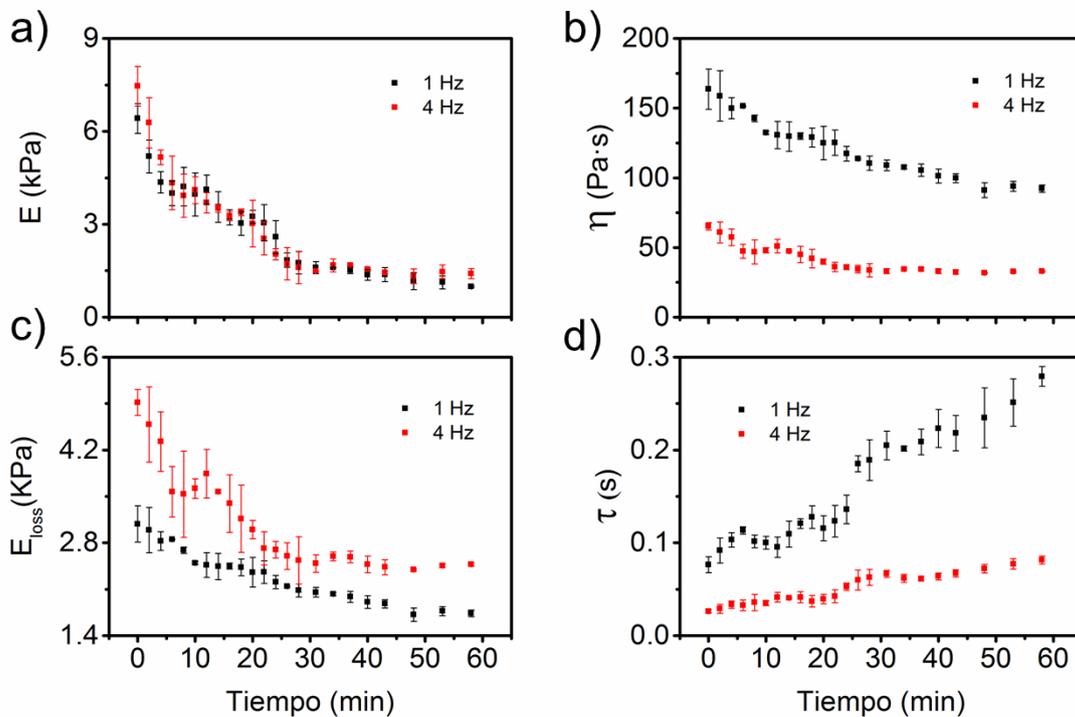
**Figura 3.11.** Evolución del volumen de una célula viva afectada por Cyt-D. Se ha discretizado el proceso en tres etapas: a) Estado inicial; b) Mientras está actuando la Cyt-D; c) Estado final. En las entradas de los paneles a) - c) se incluye la topografía de la célula obtenida por medio del AFM, una imagen óptica de la célula y el perfil de alturas a lo largo de la línea discontinua marcada. En las imágenes de topografía la escala corresponde con  $10 \mu\text{m}$ , y en las ópticas con  $20 \mu\text{m}$ . d) Resultados obtenidos para la evolución del volumen de una célula individual a lo largo de las tres etapas.

El coeficiente de viscosidad ( $\eta$ ) presenta un comportamiento también decreciente, desde valores cercanos a  $150 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  para  $0.2 \text{ Hz}$  llegando a  $90 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  para  $4 \text{ Hz}$  de frecuencia de modulación (figura 3.10.c). Este es un resultado bastante interesante y para explicarlo recurriremos otra vez a la idea de célula como material poroelástico. Si pensamos en la Cyt-D como agente despolimerizador de las fibras de actina, al aplicar este compuesto químico, el número de fibras y su tamaño ira decreciendo paulatinamente conforme el tiempo va transcurriendo. Eso significa que los poros u orificios que forman la estructura interna de la célula están aumentando de tamaño, debido a la disminución de la densidad de fibras (al menos las basadas en actina). Por tanto, al incrementar el tamaño de poro para un mismo

material poroelástico, la facilidad que tenga el líquido o fluido (compuesto principalmente por el citosol) para moverse a través de este sistema modificado se verá incrementada. Finalmente, esta menor resistencia al movimiento del fluido implica un menor coeficiente de viscosidad medido experimentalmente. Explicando el descenso de  $\eta$  conforme el tiempo de exposición a la Cyt-D se iba incrementando.

El “*loss modulus*” decrece desde 3.2 kPa hasta valores cercanos a 1.7 kPa, con un ritmo de  $-0.4 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$  (figura 3.10.d). Comportamiento similar al de la viscosidad, ya que a menor viscosidad del sistema menores pérdidas tendremos durante un ciclo.

El tiempo de relajación ( $\tau$ ) es un reflejo inequívoco de la competición entre los procesos disipativos y conservativos que se llevan a cabo en el interior de la célula (figura 3.10.e). El tratamiento con Cyt-D por un lado disminuye la dureza de la célula y por otro reduce la viscosidad de la misma. No obstante, el proceso de disminución del módulo de Young se produce de una forma más rápida que el de reducción del coeficiente de viscosidad. Esto da lugar a un claro incremento del tiempo de relajación de la célula a medida que el compuesto químico la va afectando. Reflexionando un poco sobre el problema, da pie a introducir una interpretación más intuitiva del mismo. Si la Cyt-D debilita el citoesqueleto y, eventualmente, lo despedaza, implica que el responsable de mantener la forma de la célula y manejar perturbaciones externas se encuentra ahora ausente. Esto conlleva que ante deformaciones externas (como son las curvas de fuerza-distancia ejercidas sobre la célula), sea más difícil y costoso para la célula recuperar la forma inicial y, por tanto, el gasto temporal de este proceso aumente. De ahí que el tiempo de relajación de nuestro material se vea incrementado conforme se debilita gradualmente el citoesqueleto, desde 0.07 s hasta valores alrededor de los 0.28 s.



**Figura 3.12.** Respuesta nanomecánica resulta temporalmente de una única célula bajo los efectos de la Cyt-D. Los experimentos han sido realizados a dos distintas frecuencias de modulación: 1 Hz y 4 Hz, siendo posible comparar las propiedades mecánicas obtenidas para ambas frecuencias. a) Módulo de

*Young en función del tiempo de exposición. b) Coeficiente de viscosidad. c) "Loss modulus". d) Tiempo de relajación.*

Para finalizar, combinaremos el estudio reológico con la acción de la Cyt-D sobre las células. En la figura 3.12 presentamos los resultados obtenidos para la evolución temporal del fibroblasto afectado por Cyt-D para dos distintas frecuencias de modulación representativas (1 y 4 Hz). El módulo de Young decrece para ambas frecuencias. Sin embargo, como se había predicho con anterioridad, no hay diferencia apreciable entre 1 y 4 Hz a lo largo de la evolución temporal. Por otro lado, para el caso del "*loss modulus*" podemos apreciar como ambas curvas siguen el mismo comportamiento, aunque en el experimento a 4 Hz todo está desplazado hacia valores mayores. Por último, tanto el coeficiente de viscosidad ( $\eta$ ) como el tiempo de relajación ( $\tau$ ) presentan un comportamiento semejante para ambas frecuencias siguiendo la misma tendencia. No obstante, los valores obtenidos para menor frecuencia (1 Hz) están desplazados hacia valores más altos en ambas gráficas. Con estos resultados probamos la concordancia entre ambas secciones experimentales de determinación de parámetros nanomecánicos de células vivas. Permittiéndonos afirmar, a luz de estas consideraciones, que las interpretaciones se mantienen congruentes para todo el capítulo.

### 3.4. Conclusiones

En este tercer capítulo se ha desarrollado y presentado un método de estudio de reología nanomecánica para la medida de la respuesta frecuencia-temporal de una célula viva individual ante la aplicación de fuerzas externas.

Tanto el desarrollo teórico como el método experimental expuesto proporcionan un marco completamente general para tratar problemas de carácter viscoelástico. Independiente del modelo mecánico escogido (Kelvin-Voigt, SLS, series de potencias (PL), tipo "*soft glassy*"<sup>40,41</sup>...) o la geometría del indentador que se utilice (esférica, cilíndrica, cónica, piramidal...).

A nivel experimental, se ha implementado un procedimiento capaz de medir con un AFM células vivas en condiciones fisiológicas. Englobando desde el cultivo de las mismas hasta el correcto mantenimiento mientras se realizaban los experimentos.

Centrándose en el modelo Kelvin-Voigt, esta metodología ha permitido obtener una solución analítica para este problema de indentación tridimensional, a la vez que proporcionaba información sobre cuatro parámetros mecánicos distintos de las células vivas: módulo elástico, coeficiente de viscosidad, "*loss modulus*" y tiempo de relajación.

Cada uno de estos parámetros mecánicos presenta un comportamiento distinto en función de la frecuencia. Se muestra que existen cambios considerables en la respuesta reológica de fibroblastos vivos, al menos en el rango de frecuencias estudiado (0.2 – 4 Hz), implicando la necesidad de varios parámetros para describir este tipo de comportamiento. En definitiva, concluyendo que los análisis de la respuesta mecánica de células necesitan estar basados en modelos que sean capaces de tener en cuenta procesos físicos que el módulo de elasticidad por si solo obvia.

Mediante la utilización del modelo poroelástico para la célula, se ha podido dar una interpretación a los parámetros mecánicos obtenidos en función de elementos estructurales

de la célula. Corresponsiéndole al modelo de Young la rigidez del citoesqueleto, y a la viscosidad la dificultad del citosol de moverse a través de dicha red de filamentos proteicos.

La aplicación escogida para probar nuestra metodología se ha basado en el estudio de la evolución de un fibroblasto sujeto a la depolimerización de su citoesqueleto de actina mediante Cyt-D, siendo un ejemplo que evidencia la potencia analítica de nuestra metodología. Gracias a este estudio aportamos información sobre los diversos mecanismos subyacentes que envuelven todo este proceso de depolimerización, debilitación y eventual ruptura del citoesqueleto. Los resultados que proporcionamos ayudan a reforzar la idea de una célula con un alto índice de comportamiento poroelástico.

### 3.5. Referencias

1. Eckes, B. & Krieg, T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin. Exp. Rheumatol.* **22**, (2004).
2. Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A. & Li, W. J. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis* **11**, 1–15 (2015).
3. Responde, D. J., Lee, J. K., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Biomechanics-driven chondrogenesis: from embryo to adult. *FASEB J.* **26**, 3614–3624 (2012).
4. Wirtz, D., Konstantopoulos, K. & Searson, P. P. C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 512–522 (2011).
5. Guck, J. *et al.* Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys. J.* **88**, 3689–3698 (2005).
6. Bufi, N. *et al.* Human primary immune cells exhibit distinct mechanical properties that are modified by inflammation. *Biophys. J.* **108**, 2181–2190 (2015).
7. Lammerding, J. *et al.* Lamin A / C deficiency causes Tema Grupo defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* **113**, 370–378 (2004).
8. Phillip, J. M., Aifuwa, I., Walston, J. & Wirtz, D. The Mechanobiology of Aging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 113–141 (2015).
9. Lautenschlager, F. *et al.* The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15696–15701 (2009).
10. Nawaz, S. *et al.* Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations. *PLoS One* **7**, (2012).
11. García, R., Magerle, R. & Perez, R. Nanoscale compositional mapping with gentle forces. *Nat. Mater.* **6**, 405–411 (2007).
12. Garcia, R. *et al.* Identification of nanoscale dissipation processes by dynamic atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 1–4 (2006).
13. LEE, E. H. STRESS ANALYSIS IN VISCO-ELASTIC BODIES. *Q. Appl. Math.* **13**, 183–190 (1955).
14. RADOK, J. R. M. VISCO-ELASTIC STRESS ANALYSIS. *Q. Appl. Math.* **15**, 198–202 (1957).
15. Lee, E. H. & Radok, J. R. M. The Contact Problem for Viscoelastic Bodies. *J. Appl. Mech.* **27**, 438–444 (1960).
16. Garcia, P. D., Guerrero, C. R. & Garcia, R. Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton. *Nanoscale* 12051–12059 (2017). doi:10.1039/C7NR03419A
17. Maniotis, A. J., Chen, C. S. & Ingber, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 849–854 (1997).
18. Choi, A. P. C. & Zheng, Y. P. Estimation of Young's modulus and Poisson's ratio of soft tissue from indentation using two different-sized indentors: Finite element analysis of the finite deformation effect. *Med. Biol. Eng. Comput.* **43**, 258–264 (2005).
19. Harris, A. R. & Charras, G. T. Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology* **22**, (2011).
20. Nyland, L. R. & Maughan, D. W. Morphology and transverse stiffness of Drosophila myofibrils measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **78**, 1490–1497 (2000).
21. Radmacher, M. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **16**, 47–57 (1997).
22. Domke, J. & Radmacher, M. Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **14**, 3320–3325 (1998).
23. Wilkes, R. P. & Athanasiou, K. a. The Intrinsic Incompressibility of Osteoblast-like Cells. *Tissue Eng.* **2**, 167–81 (1996).
24. Trickey, W. R., Baaijens, F. P. T., Laursen, T. A., Alexopoulos, L. G. & Guilak, F. Determination of

- the Poisson's ratio of the cell: Recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *J. Biomech.* **39**, 78–87 (2006).
25. Martínez-Martin, D. *et al.* Inertial picobalance reveals fast mass fluctuations in mammalian cells. *Nature* **550**, 500–505 (2017).
  26. Efremov, Y. M., Wang, W. H., Hardy, S. D., Geahlen, R. L. & Raman, A. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
  27. Brückner, B. R., Nöding, H. & Janshoff, A. Viscoelastic Properties of Confluent MDCK II Cells Obtained from Force Cycle Experiments. *Biophys. J.* **112**, 724–735 (2017).
  28. Moeendarbary, E. *et al.* The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat. Mater.* **12**, 253–261 (2013).
  29. Broedersz, C. P. C. P. & MacKintosh, F. C. F. C. Modeling semiflexible polymer networks. *Rev. Mod. Phys.* **86**, 47 (2014).
  30. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
  31. Charras, G. T., Yarrow, J. C., Horton, M. A., Mahadevan, L. & Mitchison, T. J. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* **435**, 365–369 (2005).
  32. Li, Q. S., Lee, G. Y. H., Ong, C. N. & Lim, C. T. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 609–613 (2008).
  33. Rotsch, C. & Radmacher, M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an Atomic Force Microscopy study. *78*, 520–535 (2000).
  34. Casella, J. F., Flanagan, M. D. & Lin, S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* **293**, 302–305 (1981).
  35. Schliwa, M. Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks High-voltage Electron Microscopy Cytochalasin D Applied to Intact Cells. *J. Cell Biol.* **92**, 79–91 (1982).
  36. Robinson, D. N. Cell division: Biochemically controlled mechanics. *Curr. Biol.* **11**, 737–740 (2001).
  37. Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G. & Grütter, P. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: Stiffening induced by contractile agonist. *Biophys. J.* **88**, 2994–3007 (2005).
  38. Brückner, B. R. & Janshoff, A. Elastic properties of epithelial cells probed by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 3075–3082 (2015).
  39. Salker, M. S. *et al.* LeftyA decreases Actin Polymerization and Stiffness in Human Endometrial Cancer Cells. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
  40. Kollmannsberger, P. & Fabry, B. Active soft glassy rheology of adherent cells. *Soft Matter* **5**, 1771–1774 (2009).
  41. Kollmannsberger, P. & Fabry, B. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 75–97 (2011).

## Capítulo 4

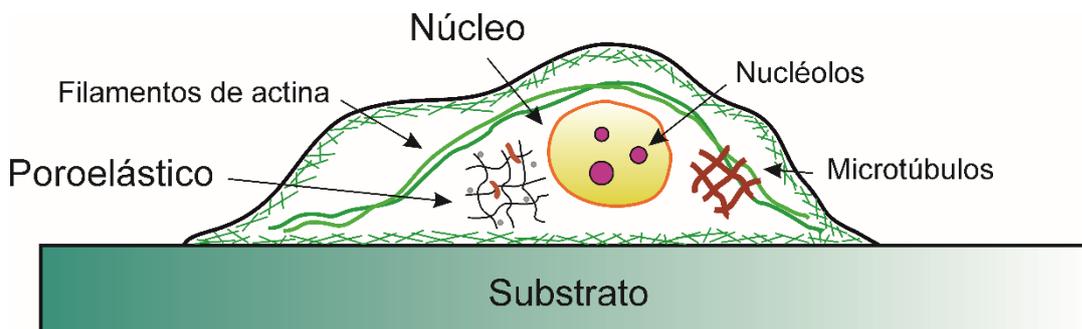
### **Visualización tridimensional de la arquitectura celular. Estudio tomográfico para la detección directa de los nucléolos y el citoesqueleto**

#### 4.0. Introducción

Los sistemas biológicos, desde células hasta tejidos, órganos, y organismos están caracterizados por poseer un alto grado de heterogeneidad<sup>1,2</sup>. Para ejemplificar esta heterogeneidad podemos centrarnos en casos de enfermos de cáncer<sup>3-5</sup>. En este ámbito, no solo se dan casos de pacientes en los cuales coexisten tumores del mismo tipo con variaciones tanto genéticas como fenotípicas (lo denominado heterogeneidad intertumoral), sino que se han dado ocasiones en las que dentro del mismo tumor hay diferencias entre las propias células cancerosas (heterogeneidad intratumoral). Debido a hechos de esta índole, la investigación a nivel de una célula individual ha cobrado una gran importancia en campos como la biomedicina, llegando a revelar novedosos mecanismos reguladores de procesos celulares. En este ámbito de estudio individualizado de células se han llevado a cabo investigaciones en cuestiones como la regulación epigenética<sup>6</sup>, dinámica celular<sup>7</sup>, comportamiento de células madre<sup>8</sup>, análisis del genoma completo<sup>9</sup>, entre muchos otros. Si bajamos al nivel de heterogeneidades dentro de la propia célula nos adentraremos en el estudio de estructuras y comportamientos que se desarrollan por debajo de la microescala, incluso llegando a la nanoescala. Las propiedades mecánicas de las células a esta escala (como la adhesión o la respuesta elástica de la superficie) desempeñan importantes funciones en procesos celulares tales como adhesión focal<sup>10</sup>, morfogénesis<sup>11</sup>, suministro de drogas<sup>12-15</sup>, motilidad<sup>16,17</sup>, metástasis<sup>18</sup> o mecanotransducción<sup>19</sup>. En este escenario el AFM es una técnica

capaz de simultáneamente obtener información topográfica con resolución espacial nanométrica, a la vez que mediante la utilización de la espectroscopía de fuerzas ofrece una sensibilidad de piconewtons para observar actividades de los sistemas biomoleculares involucrados.

Hasta este momento, y a lo largo del relato descrito durante esta tesis doctoral, se han ido exponiendo una serie de conclusiones clave sobre el comportamiento mecánico de una célula biológica. En primer lugar, y como primera aproximación, se trata la célula como un sistema infinito adscrito a un comportamiento puramente elástico y homogéneo. Durante el capítulo 2 se expone que la célula no puede representarse como un objeto infinito, a la vez que deben considerarse ciertas heterogeneidades internas que ella misma posee. En el capítulo 3 se da el salto al mundo viscoelástico, demostrando la ineficacia de los modelos elásticos y justificando la utilización de modelos constitutivos que incluyesen mecanismos disipativos en el comportamiento celular, es decir, viscoelasticidad. Gracias a este planteamiento se ha conseguido extraer información sobre parámetros como el módulo de Young, coeficiente de viscosidad, tiempo de relajación, entre otros. No obstante, el enfoque abordado hasta ese momento trataba la respuesta de la célula de una forma global y única, sin tener en cuenta las contribuciones de cada una de las partes que la componen y forman el cómputo final. La figura 4.1 contiene algunos de los componentes que podrían tener repercusión sobre la respuesta mecánica de una célula medida por AFM.



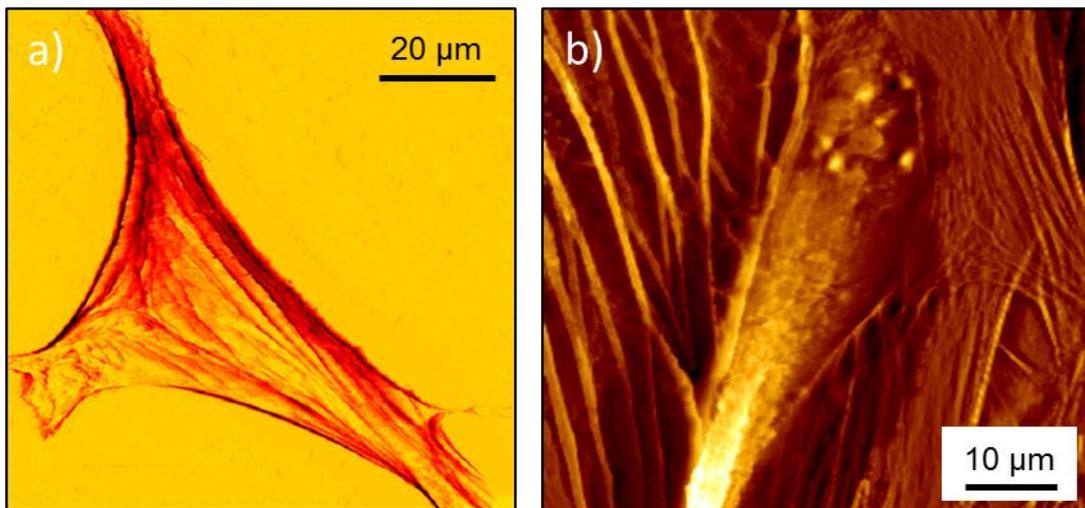
**Figura 4.1.** Esquema de una célula típica cultivada in vitro destacando el sustrato, la corteza de actina, el núcleo, los microfilamentos de actina, los microtúbulos y los nucléolos. En este cuarto capítulo de la tesis se intentará resolver de una forma tridimensional la localización y propiedades mecánicas de elementos internos de la célula eucariota.

En este capítulo 4 daremos un paso hacia delante y obtendremos mapas tridimensionales de los parámetros mecánicos que poseen las células. Utilizando toda la teoría desarrollada en el capítulo anterior, junto con el procedimiento experimental asociado a las curvas de fuerza-distancia, seremos capaces de obtener estos mapas de propiedades mecánicas a través de la aplicación de la técnica denominada “Force Volume” (en la sección de métodos experimentales 4.3 se describirá con detalle la física relacionada con este procedimiento).

Cabe destacar que el trabajo que presentaremos a lo largo de este capítulo ha sido realizado en colaboración con Pablo D. García, responsable de las simulaciones de elementos infinitos y el desarrollo teórico complementario.

## 4.1. Modos de obtención de mapas de propiedades mecánicas en células con un AFM

Las células animales adherentes crecen de forma natural y dispersa sobre sustratos de cultivo celular, permitiendo de esta forma la utilización del AFM para tomar imágenes de ellas sin tener que recurrir a estrategias de inmovilización adicionales. No obstante, existen compuestos químicos como la fibronectina o la polilisina<sup>20</sup> que pueden ayudar a conseguir una mejor adhesión de la célula al sustrato subyacente. Las primeras imágenes de células vivas tomadas con un AFM se realizaron durante los primeros años de la década de los 1990s<sup>21-23</sup>, utilizando el **modo de contacto**. Mediante este modo de adquisición de imágenes se mantiene aplicada una fuerza constante sobre la muestra (*“setpoint”* en fuerzas, sistema de realimentación), mientras tanto la punta barre toda el área donde se encuentra localizada la célula a la vez que la realimentación actúa, permitiéndonos observar la topografía de la misma. En este modo de trabajo del AFM la punta ejerce tanto una fuerza vertical como lateral sobre la célula, llegándose a registrar resoluciones de ~50 nm en células animales<sup>24,25</sup>. Gracias a los periodos de adquisición de datos de esta técnica topográfica ha sido posible observar dinámicas morfológicas de las células<sup>22,26</sup>, el crecimiento de fibrillas amiloideas patológicas<sup>27</sup> o la degradación de membranas lipídicas<sup>28</sup>. A continuación, en la figura 4.2 mostramos algunas de las imágenes de topografía que hemos obtenido en células animales adherentes aplicando el modo de contacto.



**Figura 4.2.** Imágenes topográficas de fibroblastos vivos (MEFs) tomadas con el modo de contacto (canal correspondiente a la señal de error). La punta utilizada fue un MLCT con forma triangular y una constante de fuerza de 0.01-0.02 N/m. El *“setpoint”* en fuerza escogido fue de 2 pN con una frecuencia de 0.8 Hz para el caso a) y 0.1 Hz para b).

La principal alternativa al modo de contacto son los **modos dinámicos u oscilatorios**. Básicamente, en este tipo de modos la micropalanca oscila cerca de la frecuencia de su resonancia mientras se toma una imagen de la muestra, tocándola únicamente al final del movimiento descendente de un ciclo de oscilación. Esto representa una ventaja respecto al modo de contacto, ya que gracias al movimiento oscilatorio se reducen algunas de las fuerzas y fricciones originadas en la interacción punta-muestra. Cuando la micropalanca se encuentra próximo a la muestra, la interacción entre ambos cambia la amplitud de la oscilación y la frecuencia de resonancia de la micropalanca, permitiendo que puedan ser usados como

parámetros de realimentación<sup>29,30</sup>. Si utilizamos la amplitud como parámetro de realimentación es técnicamente más simple y se denomina modulación en amplitud, AM-AFM. En AM-AFM se requiere únicamente de un ciclo para la retroinformación del microscopio. En cambio, si escogemos la frecuencia (sub-modo de frecuencia modulada, FM-AFM) se requerirán al menos tres realimentaciones (configuración más compleja), haciendo que su implementación sea menos asidua.

Actualmente, existen modos dinámicos avanzados, los cuales excitan la micropalanca a varias frecuencias o emplean diferentes señales como parámetros de realimentaciones. El bimodal-AFM es un ejemplo clave de este tipo de microscopía avanzada, excitando simultáneamente dos modos normales de oscilación de la micropalanca y midiendo sus observables (suelen utilizarse el primer y segundo modo)<sup>31</sup>. Mediante esta técnica multifrecuencia se es capaz de caracterizar las propiedades de la muestra con el doble de observables. El bimodal ha sido aplicado en diversos estudios relacionados con anticuerpos IgM<sup>32</sup>, ferritina<sup>33</sup>, membrana purpura<sup>34</sup>, fibras de ratón<sup>35</sup> o proteosomas<sup>36</sup>. Incluso se ha llegado a utilizar en medidas de escaneo de células vivas<sup>37</sup>. Este último trabajo se caracteriza por la utilización de sondas de AFM muy alargadas en las cuales la punta se encuentra inmersa en el líquido de cultivo celular, mientras que la micropalanca oscila en presencia del aire (consiguiendo reducir el ruido y aumentar la  $Q$  de la micropalanca).

Otra opción para la adquisición de información topográfica de células es la microscopía por escaneo de la conductancia iónica (SICM por sus siglas en inglés: “*Scanning Ion Conductance Microscopy*”)<sup>38–42</sup>. Esta técnica se basa en el escaneo de la muestra con una nanopipeta mientras se mide la corriente iónica del líquido que pasa a través de ella. La intensidad de esta corriente iónica será usada para controlar la posición vertical de la nanopipeta con un sistema de realimentación, de forma que se pueda recorrer el contorno de la célula. Las principales ventajas de esta metodología radican en la ausencia de contacto punta-muestra, a la vez que se evitan contaminaciones en la sonda de escaneo. Esta es una situación común en las puntas de AFM que suelen contaminarse con polisacáridos provenientes de la membrana celular.

Hasta este momento hemos mencionado la operatividad del AFM como instrumento capaz de seguir el contorno de la célula y aportarnos información topográfica de la misma. La evolución de los modos dinámicos para la obtención de propiedades mecánicas de células está representada por la técnica desarrollada por Raman et al<sup>43</sup>. Este método, en concreto, está basado en el modo de escaneo dinámico con amplitud modulada (AM-AFM), siendo capaz de modelizar el sistema punta-muestra como un oscilador armónico amortiguado según se encuentre la punta cerca o lejos de la muestra. Se usa el armónico 0 (idea similar a la usada en el modo de contacto) para seguir la topografía de la célula. Al mismo tiempo observando los cambios tanto en la amplitud como en la fase de los demás armónicos (observables) es posible extraer información de las propiedades mecánicas. Finalmente, para obtener propiedades viscoelásticas intrínsecas de las células se recurrirá a una modelización tipo Kelvin-Voigt para la célula y se asumirán amplitudes de oscilación bajas en comparación con el total de la indentación (implicando una interacción permanente con la muestra). Esta técnica de obtención de propiedades mecánicas de células ha valido para estudiar muestras biológicas como fibroblastos<sup>44–46</sup>, eritrocitos<sup>45</sup>, bacterias (*E. Coli*)<sup>45</sup> y virus<sup>47</sup>.

Compitiendo con el método de Raman et al., basado en el AM-AFM, nos encontramos con los **métodos “off-resonance”** (“*Force Volume*”, “*PeakForce*”, “*QI mode*”, “*Pulsed Force Mode*”<sup>48,49</sup>, “*Jumping Mode*”<sup>50</sup>, “*HarmoniX*”<sup>51,52</sup> entre otros). Uno de los más extensivamente usados para visualizar células y sus propiedades es el “*PeakForce™ Tapping*” (PF-QNM, por sus siglas en

inglés: “*PeakForce Quantitative Nanomechanical Properties Mapping*”). En este modo de operar el AFM se induce un movimiento sinusoidal sobre la punta llevando a la micropalanca a oscilar a frecuencias considerablemente menores a la de resonancia, de ahí que se incluya en la categoría “*off-resonance*”. En cada contacto periódico punta-muestra se adquiere una curva de fuerza-distancia, usándose para controlar la fuerza de interacción. La máxima fuerza aplicada (“*peak force*”) de cada una de las curvas de fuerza-distancia es usada para ajustar la posición de la punta y mantener constante la fuerza ejercida (sistema de realimentación en la fuerza pico instantánea). Básicamente, el “*PeakForce*” realiza curvas de fuerza-distancia a altas frecuencias (comparadas con las normalmente usadas en el “*Force Volume*”, *FV*) siguiendo una forma de onda sinusoidal en vez de triangular. Mediante la aplicación del PF-QNM ha sido posible medir las microvilli de la superficie de células vivas<sup>53</sup>, paredes de células vegetales<sup>54,55</sup>, células cancerosas metastáticas<sup>56</sup>, diatomeas<sup>57</sup>, eritrocitos<sup>58</sup>, queratinocitos<sup>59</sup>, la relación entre la mecánica y la adhesión celular<sup>60</sup>, y la variabilidad dinámica de la corteza de actina de fibroblastos<sup>61</sup>. Otro modo de operar el AFM, también usado para la caracterización de células, es el *QI<sup>TM</sup> mode*<sup>62</sup>, muy parecido al “*Force Volume*” clásico. En el *FV* simplemente se realiza una secuencia de curvas de fuerza-distancia sobre una malla de píxeles predefinida que engloba toda el área que ocupa la muestra. Implicando una ausencia total de fuerzas laterales. El *FV* se ha aplicado a muestras tan diversas como fibroblastos<sup>63,64</sup>, células endoteliales del cerebro<sup>65</sup>, patógenos bacterianos<sup>66</sup>, células de feocromocitoma<sup>67</sup>, células musculares<sup>68</sup> y células de levadura<sup>69</sup>. El *QI* es esencialmente un *FV* que incluye ciertas mejoras o variaciones en el movimiento de los piezos y de la micropalanca, tanto a lo largo de las curvas de fuerza-distancia como en el paso de un píxel a otro. Este modo ha sido validado con muestras de células de mamífero<sup>70</sup>, células de levadura<sup>70</sup>, bacterias (*E. Coli*)<sup>70,71</sup>, células de riñón<sup>71</sup>, pared de células vegetales<sup>72</sup> o células endoteliales<sup>73</sup>. El rango de frecuencias de modulación con las que suele trabajar en el *FV* y el *QI* es de 0.1 – 100 Hz, mientras que en el PF-QNM gira entorno a los 0.25 y 5 kHz<sup>74</sup>. En este último se suelen tomar más de una curva de fuerza-distancia por píxel permitiendo tomar ciertas estadísticas. Tanto en el PF como en el *QI*, las propiedades mecánicas obtenidas de la muestra por los softwares comerciales están ceñidas al módulo de Young. La elección del *FV* para nuestros estudios se realizó teniendo en cuenta que nos permite trabajar con curvas de fuerzas-distancia sin modificar y, de esta forma, conocer con exactitud qué tipo de estímulo ejercemos sobre la célula, facilitando la modelización teórica para el posterior análisis de las mismas.

Por último, antes de concluir con los modos “*off-resonance*” (normalmente fundamentados en curvas de fuerza-distancia) cabe mencionar algunas metodologías destacadas. Empezando por el “*ringing mode*” propuesto por M.E. Dokukin e I. Sokolov<sup>75,76</sup>, basado en el análisis de la señal resonante de la micropalanca producida a consecuencia del despegue entre la punta del AFM y la superficie de la muestra. Y finalizando con una técnica desarrollada en el grupo de T. E. Schaffer para la obtención de imágenes de propiedades viscoelásticas denominada “*Force Clamp Force Mapping*”<sup>77,78</sup>. Esta metodología está basada en un *FV* con curvas de fuerza-distancia modificadas. En estas curvas tanto la aproximación como el alejamiento se realizan a velocidad constante. Sin embargo, a diferencia del *FV* estándar, la fuerza se mantiene aplicada sobre la muestra durante un periodo de tiempo determinado a la vez que se registran las variaciones en la indentación (experimento de “*creep*”). La principal desventaja de este procedimiento radica en el tiempo de adquisición de los datos, ya que suma a los tiempos propios del *FV* el periodo de tiempo necesario para las medidas del “*creep*” de la muestra.

La principal diferencia del método que nosotros proponemos con respecto a todos los descritos en esta sección estará relacionada con la capacidad de acceder a información de

estructuras intracelulares. Este avance técnico permite superar una de las limitaciones de la mayoría de las técnicas derivadas del AFM, basada en la imposibilidad de acceder a información más allá de la superficie celular. Esencialmente, trabajaremos con un modo “*off-resonance*”, en concreto el FV, a la vez que lo combinaremos con una forma novedosa de analizar los resultados obtenidos. Esto dará lugar a una metodología capaz por una parte de obtener información mecánica intrínseca de la célula y, por otro lado, de ser sensible y resolver estructuras celulares en profundidad.

## 4.2. Métodos experimentales

### – 4.2.1. Cultivo celular y preparación de muestras

El estudio que se discute en este capítulo se basará en células de la línea NIH 3T3 de fibroblastos (“*NIH 3T3 Cell Line murine*”, Sigma-Aldrich). El procedimiento de cultivo celular se llevó a cabo con la asistencia de una incubadora, la cual mantiene las muestras en una atmósfera del 90% de humedad, 5% de CO<sub>2</sub>, y temperatura de 37°C. Dichas células han sido cultivadas en un medio compuesto principalmente por “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium – DMEM*” (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con un 10% de “*Fetal Bovine Serum – FBS*” (Gibco Life Technologies) y un 1% “*penicilin/streptomycin*” (Gibco Life Technologies, Paisley, UK).

La fijación de los fibroblastos se realizó mediante la exposición de las células vivas a una solución de 4% de paraformaldehído en PBS. El tiempo de inmersión en dicha solución fue de 15 minutos.

Para realizar los experimentos tanto de fluorescencia como de AFM, se extrajeron las células de la incubadora y se cambió el medio de cultivo. El nuevo medio escogido fue “*Leibovitz’s L-15 Medium*” (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con 10% de FBS, el cual permite mantener constante el pH (acidez del medio) sin tener que estar en las condiciones atmosféricas que la incubadora aporta (CO<sub>2</sub> independiente).

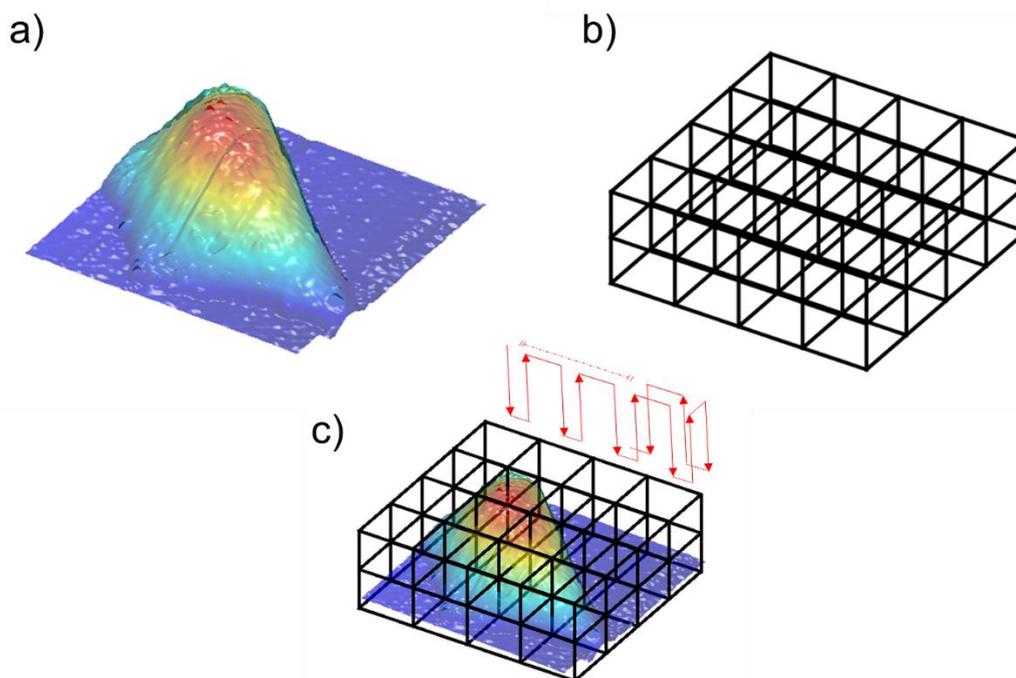
### – 4.2.2. Imagen óptica y de fluorescencia

Las imágenes ópticas tanto de microscopía invertida con contraste de fase como de fluorescencia fueron tomadas en un *AXIO Observer D1* (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Para obtener las imágenes de fluorescencia se utilizó una lámpara de mercurio *HBO 100* (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Los fluoróforos escogidos estaban destinados a la visualización de dos partes diferentes del citoesqueleto: las fibras de actina y los microtúbulos. Para la actina se usó una tinción basada en faloidina: “*Alexa Fluor 488 Phalloidin*” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mientras que para la tubulina se utilizó una tinción de tipo inmonofluorescente, basada en un anticuerpo primario: “*anti- $\alpha$ -tubulin (bovine), mouse IgG1, monoclonal 236-10501*”; y un anticuerpo secundario: “*AlexaFluor™ 594 F(ab’)2 fragment of rabbit anti-mouse IgG (H+L)*” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para más información sobre el protocolo de tinción de las células, consulta los apéndices A.3.1 y A.3.2.

### – 4.2.3. Espectroscopía de fuerzas y “Force Volume”

La integridad de las medidas de AFM fueron llevadas a cabo en un sistema comercial (JPK *NanoWizard 3*, JPK Instruments AG, Berlin, Germany) montado sobre el microscopio invertido (previamente descrito en la sección sobre imagen óptica y fluorescencia). Los estudios sobre células vivas incluyeron, a su vez, un sistema de regulación de temperatura con una precisión de  $0.1^\circ$ , “*BioCell*” (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) capaz de mantener la temperatura en  $37^\circ$ . Además, para contrarrestar las pérdidas de medio debido a la evaporación, el medio (“*Leibovitz’s L-15 Medium*”) es regularmente reemplazado durante las medidas. Las medidas en células fijadas se realizarán en el mismo buffer salino (PBS) en el cual son almacenadas.

La elección de la micropalanca estará altamente relacionada con los efectos hidrodinámicos que aparecen al oscilar inmersos en un medio líquido (“*drag*”). En la siguiente subsección de los métodos experimentales se discutirá este hecho y se propondrá la micropalanca más adecuado para nuestras medidas. Asimismo, la calibración de la micropalanca se realizará mediante el método derivado del ruido térmico (ver sección 1.3 de esta tesis), permitiéndonos obtener información cualitativa de los experimentos de AFM.



**Figura 4.3.** Explicación del funcionamiento del modo “off-resonance” basado en curvas de fuerza-distancia denominado “Force Volume”. a) Topografía de la célula o muestra contenida en el área sobre la que se realizará el FV. b) Discretización del espacio creando voxeles de información. En concreto, cada voxel tendrá información sobre deflexión de la micropalanca (fuerza) e indentación. c) Esquema del funcionamiento del FV sobre el área discretizada.

La técnica experimental escogida para los experimentos de mapeo de células estará basada en el ya comúnmente conocido “Force Volume”. Dicho método consiste en la realización de curvas de fuerza-distancia de forma secuencial por un área designada. Inicialmente, se escogerá una zona del *Petri* de cultivo que abarque la totalidad de una célula (decenas de  $\mu\text{m}^2$ ). Una vez elegida el área, se realizará un mallado de manera que a cada pixel se le

asignará una curva de fuerza-distancia, llegándose a trabajar con resoluciones de hasta 512 x 512 píxeles. Las curvas de fuerza-distancia estarán caracterizadas por una fuerza máxima (“*set point*”) de 4 nN para células fijadas y de 3 nN para células vivas. Se realizaron a velocidad de constante, alcanzando valores de hasta 250  $\mu\text{m/s}$  (50 Hz de modulación en frecuencia).

#### – 4.2.4. Análisis de los datos experimentales

El análisis de los datos experimentales obtenidos se realizó mediante un código escrito en *Python*. Dicho código es capaz de extraer información nanomecánica de la célula para cada una de las curvas de fuerza-distancia, permitiéndonos obtener un mapa tridimensional de las propiedades mecánicas de la misma. El procedimiento para obtener esta información nanomecánica partiendo de las curvas de fuerza-distancia está descrito en el capítulo 3 de esta tesis, donde se incluye la teoría que engloba una indentación sobre un material con comportamientos viscoelásticos. Para este caso en concreto, asumiremos un modelo constitutivo tipo Kelvin-Voigt para la célula, permitiéndonos trabajar con una solución analítica y existiendo la posibilidad de analizar la curva de fuerza-distancia para diferentes tramos de indentación (voxel a voxel). Este análisis a diferentes indentaciones (tomografía) nos permitirá estudiar la evaluación de los parámetros correspondientes a la respuesta mecánica de la célula a medida que el indentador vaya penetrando la muestra. Sin embargo, no solo se realizará el análisis por tramos en las curvas de fuerza-distancia, sino que alternativamente se hará un ajuste numérico a toda la curva, dándonos unos valores de las propiedades mecánicas de la célula independientes de la indentación ejercida (análisis por pixel).

La teoría asumida para el modelo de contacto entre punta y célula poseerá las correspondientes correcciones debidas a los efectos del sustrato sobre el cual yace la célula<sup>79,80</sup>.

Para el análisis de la direccionalidad de la arquitectura del citoesqueleto se utilizó un paquete de softwares perteneciente a *ImageJ* que se denomina *OrientationJ*. No obstante, para el estudio de la densidad del citoesqueleto subyacente a la membrana se utilizó un software propio escrito en *Python* capaz de detectar las fibras, discernir las zonas con agujeros y enumerarlas una a una.

#### – 4.2.5. Efectos de “*drag*” hidrodinámico para distintos tamaños de micropalanca

Partiendo del sistema experimental expuesto en el capítulo 3, mediante el cual se llegaron a medir velocidades de la punta de hasta 20  $\mu\text{m/s}$ , se hacía complicada una realización de mapas de curvas de fuerza-distancia con alta resolución en tiempos inferiores a la hora. El tipo de punta que se usaba era un MLCT-B (micropalanca rectangular) originando un cierto “*drag*” hidrodinámico ya descrito anteriormente (leer subsección: La presencia del “*drag*”, efectos y corrección; de 3.2 Métodos Experimentales). Si superábamos velocidades de 20  $\mu\text{m/s}$ , los efectos el “*drag*” se hacían tan notables que la propia curva se deformaba, imposibilitando su utilización para el análisis de las propiedades mecánicas de la muestra.

Para solventar este contratiempo se decidió recurrir a una estrategia similar a la que se suele emplear en modos de operar el AFM a altas velocidades: HS-AFM (por sus siglas en inglés:

“*High Speed Atomic Force Microscopy*”<sup>81</sup>. Esta solución está basada en la disminución del tamaño de la micropalanca y, en particular, su área. De forma que uno de los parámetros relevantes a la hora de originar o no efectos hidrodinámicos de “*drag*” este controlado y reducido lo máximo posible<sup>82-85</sup>. La micropalanca de una punta tipo MLCT-B tiene unas dimensiones nominales de 210  $\mu\text{m}$  de largo y 20  $\mu\text{m}$  de ancho, una frecuencia de resonancia nominal de 15 kHz (en aire) y una constante de fuerzas nominal de 0.02 N/m. Sustituiremos este tipo de puntas por unas de menor tamaño: BL-AC40TS (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, United Kingdom). Las BL-AC40Ts poseen una micropalanca de nitruro de silicio con forma rectangular, las dimensiones son de 38  $\mu\text{m}$  de largo por 16  $\mu\text{m}$  de ancho, la frecuencia de resonancia del primer modo está en valores alrededor de 110 kHz (en aire), y su constante de fuerzas nominal es de 0.09 N/m.

La implementación de las BL-AC40TS en la nuestra metodología basada en curvas de fuerza-distancia ha permitido pasar de unas velocidades de 20  $\mu\text{m/s}$  a valores de 250-300  $\mu\text{m/s}$ . Gracias a esta mejora hemos conseguido reducir el periodo de adquisición de datos para un mapa tipo *Force Volume* a tiempos cercanos a 20 min para un mallado de 256 x 256 (píxeles). Si quisiésemos aumentar la resolución del mapeado y llegar a 512 x 512 píxeles, el tiempo de adquisición de datos sería superior a la hora.

#### – 4.2.6. Simulaciones por elementos finitos

Sección realizada por Pablo D. García del grupo ForceTool (ICMM, CSIC, IP: Ricardo García).

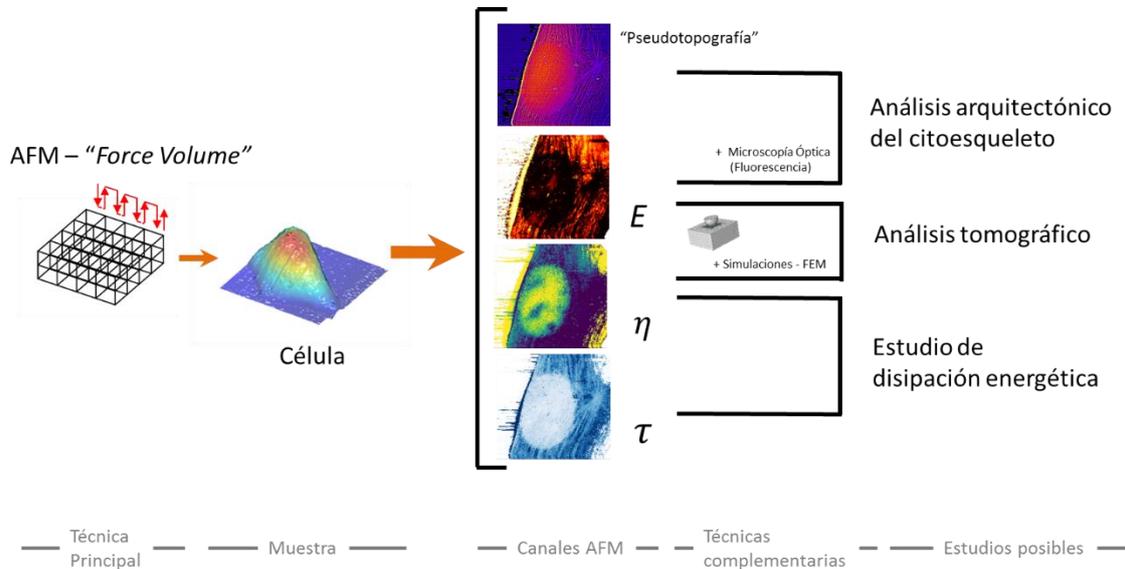
Las simulaciones por el método de elementos finitos se han realizado en la plataforma suministrada por el software COMSOL (COMSOL Multiphysics; COMSOL AB, Stockholm, Sweden). En estas simulaciones, la punta del AFM ha sido modelizada como un material homogéneo e isotrópico con un módulo de Young de 20 GPa. La geometría de dichas puntas es cónica con un ángulo de 70°. Se ha asumido que la superficie de la muestra, que está en contacto físico con la sonda, no sufre desplazamientos laterales. No obstante, dichos desplazamientos ocurren en las regiones de la muestra localizadas por debajo del área de contacto. El movimiento simulado del indentador fue de tipo triangular con una frecuencia de modulación de 2 Hz. Asimismo, el material que será indentado estará caracterizado por su homogeneidad e isotropía, y por una respuesta mecánica de tipo Kelvin-Voigt.

### 4.3. Resultados y discusión

#### – 4.3.1. Metodología para caracterización de las propiedades mecánicas de la célula

El método de obtención de propiedades viscoelásticas de células resuelto tridimensionalmente está basado en el clásico “*Force Volume*”. Experimentalmente, se tomarán curvas de fuerza-distancia siguiendo una señal de tipo triangular, es decir, manteniéndose constante la velocidad de la punta durante todo el ciclo de indentación (acercamiento y alejamiento). Si nos referimos al apartado 4.1 del presente capítulo, nuestra metodología estaría clasificada dentro de los métodos “*off-resonance*” basados en curvas de fuerza-distancia. Una vez obtenidas dichas curvas de fuerza para cada uno de los píxeles que conformarán la imagen de nuestra

célula, se procederá al análisis de los observables y la reconstrucción de los mapas de propiedades mecánicas. En la figura 4.4 está representada esquemáticamente la metodología que vamos a aplicar.



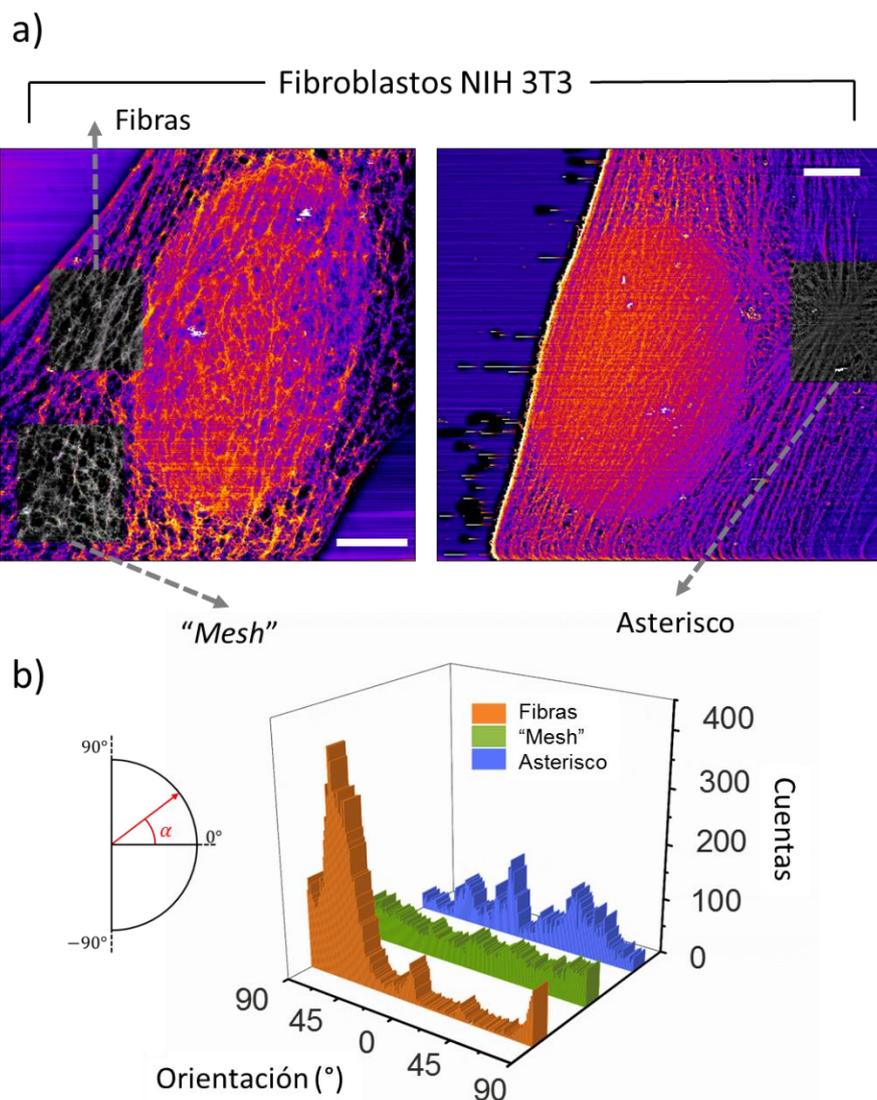
**Figura 4.4.** Esquema de las etapas aplicadas para la caracterización de la célula y de los observables obtenidos a partir de ellas. Se incluyen las distintas técnicas que completan el estudio.

Primero, desarrollaremos un nuevo canal partiendo de la máxima indentación, el cual denominaremos "pseudotopografía", incluyendo información no solo topográfica sino también de la resistencia a la penetración que tiene cada una de las partes que forman la célula. Posteriormente, aplicaremos las teorías viscoelásticas introducidas en el capítulo 3 de esta tesis para el análisis de las curvas de fuerza-distancia. Asumiendo, en primera instancia, un comportamiento de tipo Kelvin-Voigt para nuestras células, seremos capaces de adquirir información sobre parámetros como el módulo de Young, el coeficiente de viscosidad o el tiempo de relajación. La combinación de estos canales de propiedades viscoelásticas con técnicas de inmunofluorescencia nos permitirá observar el citoesqueleto celular con una alta resolución, permitiendo distinguir la contribución a las imágenes de AFM de las distintas fibras que lo componen. Asimismo, un canal específico de información mecánica, como es la viscosidad, nos permitirá acceder a las arquitecturas internas del núcleo. Finalmente, un análisis del modelo de Young tanto por tramos de indentación en la curva de fuerza como por filtros en las escalas de valores (analizando toda la curva de fuerza-distancia como un todo, sin discriminar por profundidades), permitirá aportar ideas a campos relacionados con la tomografía por AFM. Este último estudio tomográfico vendrá acompañado por simulaciones FEM, permitiendo discriminar y esclarecer aspectos fundamentales en la interpretación.

La aplicación de esta metodología se realizará tanto en células vivas como fijadas. Por conveniencia, los datos mostrados en el texto principal corresponderán a células fijadas, ya que, al congelar tanto los procesos internos de la célula como su propio movimiento la resolución de las imágenes obtenidas se verá sustancialmente mejorada. Se evitarán las incertidumbres y los errores experimentales derivados del tiempo transcurrido durante las medidas de AFM. No obstante, en el apéndice A.3.4. se incluyen datos de células vivas complementarios a los que se mostrarán a lo largo de este capítulo. De esta forma, demostramos que todos los resultados obtenidos y las discusiones que realizaremos son extrapolables al conjunto de las células vivas.

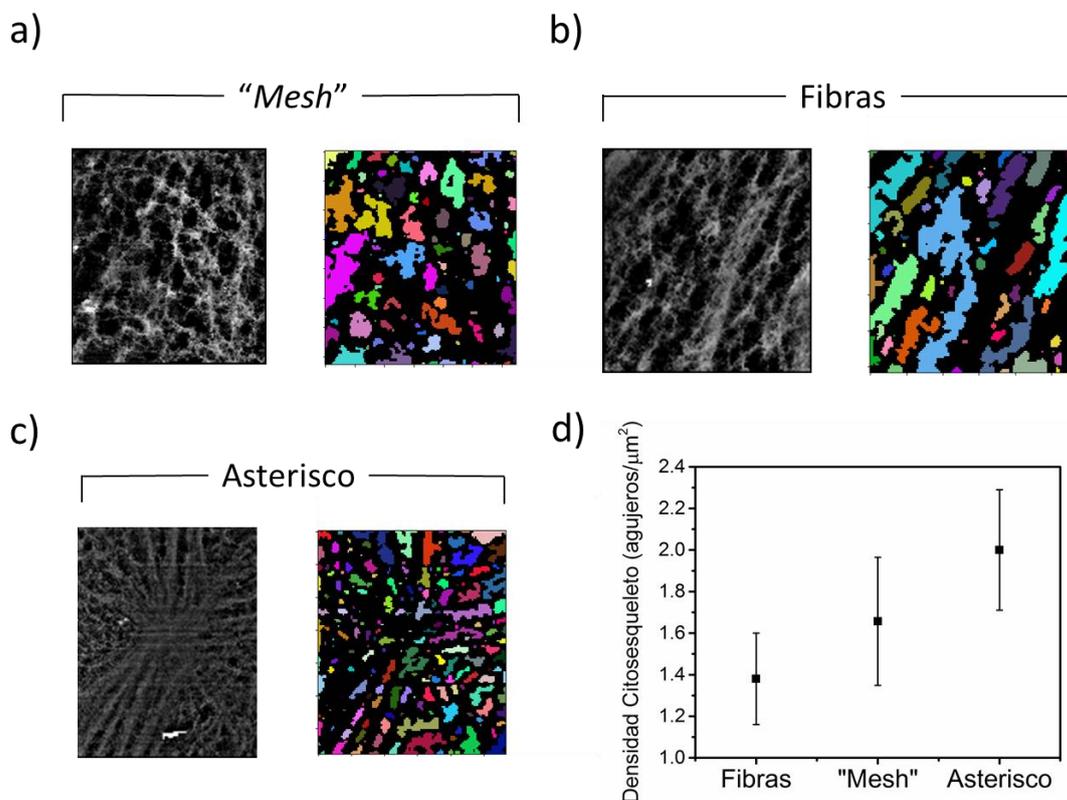
– 4.3.2. “Pseudotopografía” y caracterización del citoesqueleto

La caracterización tanto topográfica como estructural de materiales con alta resolución es una de las grandes cualidades del AFM. Comúnmente para incrementar la resolución se tiende a incrementar el número de píxeles adquiridos para una determinada área, al mismo tiempo que se reduce el tamaño de la punta (radio efectivo de la punta que se encuentra en contacto con la muestra). En este trabajo proponemos un método alternativo que es capaz de extraer propiedades internas de las células a partir de la típica medida topográfica de AFM para un “setpoint” determinado, separando la contribución topográfica y mecánica. Dicho método está basado en un procedimiento de filtrado por transformado de Fourier espacial. Utilizando un filtro pasa alta podremos obtener una nueva imagen o canal que contendrá información tanto mecánica como topográfica de la célula. Este nuevo canal será el que denominemos como “pseudotopografía”. Para más detalles del procedimiento seguido consultar el apéndice A.3.3.



**Figura 4.5.** “Pseudotopografía” obtenida en dos fibroblastos NIH 3T3 y análisis de la direccionalidad de las fibras en distintas regiones de la célula. a ) Las zonas destacadas en escala de grises corresponden con las tres áreas que hemos decidido estudiar. Una correspondiente al “mesh”, otra predominantemente de fibras, y un asterisco. b) Resultados del análisis de direccionalidad en cada una de las tres regiones resaltadas. En el panel izquierdo está explicado el criterio de ángulos. Escalas: 5  $\mu$ m.

En la figura 4.5.a se pueden observar dos ejemplos de células sobre las que se ha obtenido la “pseudotopografía” permitiéndonos visualizar con gran definición la estructura de su citoesqueleto. La visualización de la red de filamentos en células eucariotas proporcionada por nuestra técnica experimental puede ayudar a revelar configuraciones o arquitecturas internas del propio citoesqueleto de la célula. La apariencia visual de la red de filamentos obtenida recuerda a otras ya medidas con anterioridad en trabajos de la bibliografía, basados principalmente en microscopía óptica de super-resolución<sup>86-90</sup>. Inicialmente, por simple inspección visual podemos diferenciar diversas estructuras como zonas con fibras largas, zonas con complejas redes de fibras más cortas, e incluso, arquitecturas más específicas de tipo asterisco. Sobre todas las células analizadas es posible distinguir entre dos casos extremos claramente diferenciados, 1) fibras o haces de fibras colocadas de forma paralela con una alta longitud, típicamente mayor a  $6\ \mu\text{m}$ , que podrían formar parte de arcos de actina (caso que denominaremos como fibras); y 2) entramados altamente densos de filamentos más finos, que denominaremos como “*mesh*”, estos filamentos raramente excederán longitudes mayores de  $1\ \mu\text{m}$ .



**Figura 4.6.** Distintos tipos de arquitecturas internas que podemos revelar en los fibroblastos NIN-3T3, mediante el canal de “pseudotopografía”. El algoritmo de detección de agujeros (áreas íntegramente rodeadas por filamentos) asigna un color diferente para cada uno de ellos que va encontrando. a) “*mesh*”; tamaño:  $8.55\ \mu\text{m} \times 7.62\ \mu\text{m}$ ; b) Fibras; tamaño:  $7.26\ \mu\text{m} \times 6.668\ \mu\text{m}$ . c) Asterisco; tamaño:  $11.03\ \mu\text{m} \times 9.25\ \mu\text{m}$ . d) Densidad del citoesqueleto expresada en agujeros por  $\mu\text{m}^2$ , usando como error la desviación estándar de cuatro imágenes distintas para cada arquitectura.

Una alternativa para discernir distintas estructuras en nuestros mapas de “pseudotopografía” es estudiar las orientaciones de las fibras y su coherencia. Mediante el paquete de softwares *OrientationJ* perteneciente a *ImageJ* se analizó la direccionalidad de las distintas imágenes. En primera instancia se escogieron zonas fácilmente diferenciables por inspección ocular, y sobre ellas se aplicó este software de reconocimiento de direccionalidad (zonas resaltadas en escala

de grises, figura 4.5.a). En cada una de secciones se estudió la orientación de la red formada por las distintas partes del citoesqueleto, obteniéndose los resultados expuestos en la figura 4.5.b. En el caso de la zona escogida para el tipo fibra observamos una clara dirección preferencias en torno a 60-70°, el pico denota una alta coherencia para este tipo de estructura. Nótese que el sistema de referencia para la direccionalidad es arbitrario, siguiendo el criterio ejemplificado en el esquema de la figura 4.5.b. En cambio, para la zona tipo “*mesh*” no hay ninguna dirección preferencial presentando un espectro prácticamente plano que implica una coherencia muy baja. Por último, la estructura con forma de asterisco presenta varias direcciones en las cuales las fibras se alinean, pero sin presentar ninguna que destaque sobre el resto de forma preferencial. Tanto el tamaño como el comportamiento direccional presentado por esta última arquitectura tipo asterisco concuerda con la de las estrellas de actina<sup>91</sup>. Estas son un tipo de estructura de actina caracterizada por un centro de nucleación rodeado por una gran cantidad de haces de microfilamentos de actina.

Para concluir la caracterización de este tipo de estructuras, principalmente pertenecientes a la corteza de actina del citoesqueleto, se decidió estudiar la densidad de la red conformada por toda la variedad de filamentos presentes. La elaboración de este estudio permitió evidenciar el número de filamentos en cada imagen, y como consecuencia de ello, la cantidad de agujeros existentes en el mallado (figura 4.6). En el caso de la estructura tipo fibra obtuvimos una densidad de  $1.4 \pm 0.2$  agujeros/ $\mu\text{m}^2$ , para el “*mesh*” el valor aumentaba en torno a un 20% alcanzando los  $1.7 \pm 0.3$  agujeros/ $\mu\text{m}^2$ . Para la segunda configuración obtenemos un tamaño medio del mallado de cientos de nanómetros, consistente con las dimensiones estimadas de los dominios de confinamiento para las proteínas de la membrana plasmática<sup>61,92</sup>. Finalmente, la arquitectura del asterisco representa un caso excepcional, ya que, al presentar una gran concentración de filamentos todos dirigidos hacia el centro de la estrella, la densidad medida por nuestro análisis da lugar a valores aún mayores que el “*mesh*”:  $2.0 \pm 0.2$  agujeros/ $\mu\text{m}^2$ .

Hasta ahora se ha tratado la información extraída por el AFM para simplemente analizar la geometría estructural de las células, partiendo de la máxima indentación y del punto de contacto de cada una de las curvas de fuerza-distancia que participa en el “*Force Volume*”. A partir de ahora se utilizarán las curvas de fuerza para extraer información de propiedades mecánicas intrínsecas de las células como el módulo de Young o el coeficiente de viscosidad. Para ello se asumirá una configuración de tipo Kelvin-Voigt, al igual que se hizo en el capítulo 3, y se analizará la célula pixel por pixel con la correspondiente teoría de mecánica de contacto. Este proceso permitirá reconstruir mapas tanto de dureza de la célula como de su componente viscosa.

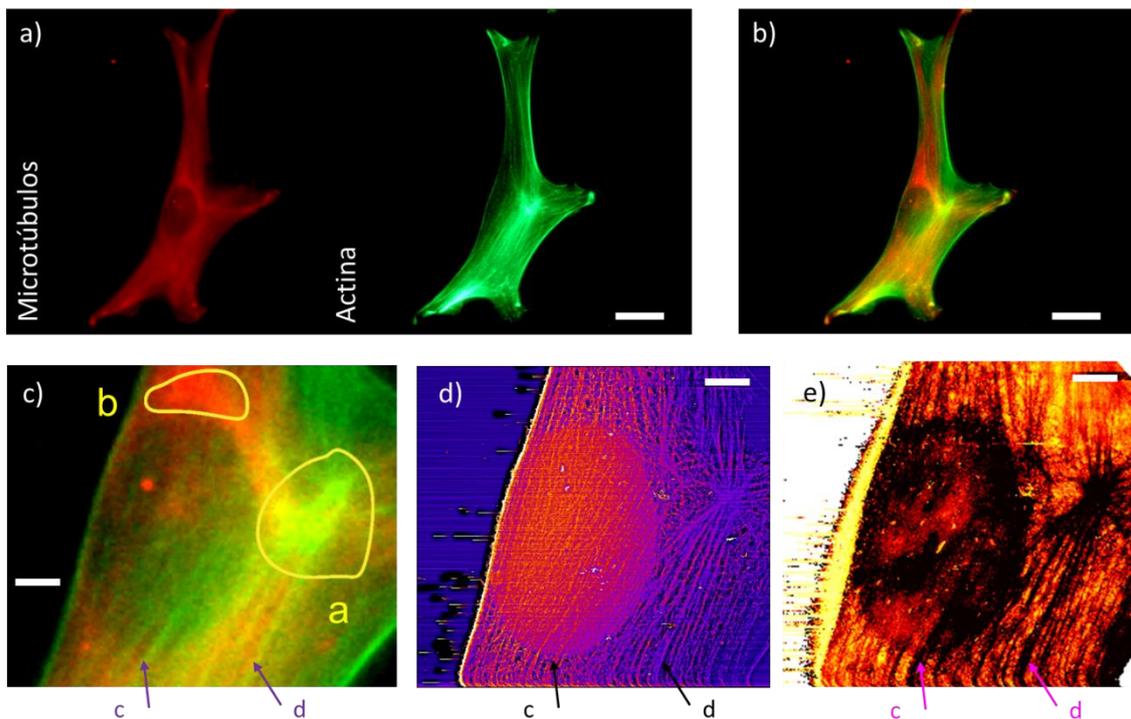
#### – 4.3.3. Correlación de las propiedades mecánicas y topográficas con las imágenes de fluorescencia

El primer paso a seguir para comprobar que somos capaces de verdaderamente resolver el citoesqueleto de la célula consiste en correlacionar los datos obtenidos mediante microscopía de fluorescencia con la “pseudotopografía” y los mapas de módulo de Young obtenidos para la misma célula.

La figura 4.7.a muestra los dos canales de fluorescencia que han sido objeto de estudio en este experimento concreto. Primero, se resaltan los microtúbulos (correspondientes a los filamentos de color rojo) pudiéndose observar cómo se extienden a lo largo del citoplasma, y

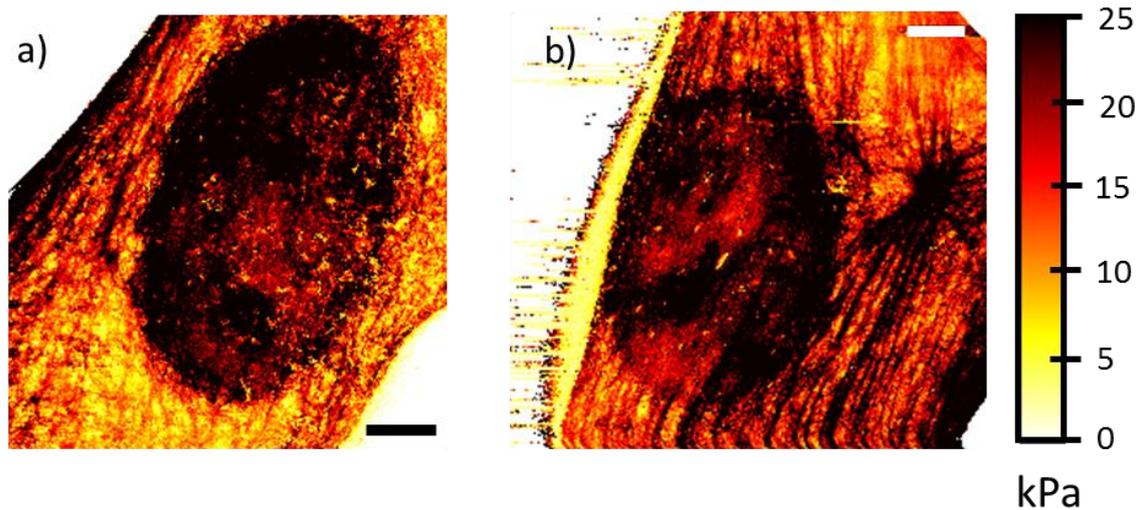
como se distribuyen alrededor del núcleo formando una corona y evidenciando la presencia del mismo. En segundo lugar, se pueden visualizar las fibras de actina. En contraposición a lo observado para el otro tipo de filamento, estas al encontrarse localizadas más cercanas a la membrana plasmática no dan pie a intuir (mediante una simple observación de la disposición espacial que presentan) cuál podría ser la localización del núcleo celular.

La combinación de ambos canales de fluorescencia se encuentra ejemplificada en la figura 4.7.b y 4.7.c, siendo esta segunda un zoom sobre la región en la que se realizó la experimentación con AFM. Más en concreto, en la figura 4.7.c se han escogido dos áreas para mostrar la buena concordancia entre la información proveniente de la fluorescencia y la del AFM. Por un lado, la zona a. corresponde con la morfología de la estrella de actina previamente descrita. Gracias a las imágenes de fluorescencia podemos saber que efectivamente el tipo de filamento del citoesqueleto que conformaban esta estructura eran fibras de actina. Y de esta forma corroborar lo que inicialmente se había observado por medio de los estudios topográficos y de direccionalidad del citoesqueleto (sección 4.3.2.). Por otro lado, la zona b. corresponde con una zona que está mayormente formada por entramados de microtúbulos. Ahora bien, para este caso no es posible observar que tipo de arquitectura están conformando (al menos mediante la imagen producida por imnofluorescencia). Por tanto, no podemos afirmar que la estructura que se observa por los canales de AFM corresponda a microtúbulos o simplemente se esté visualizando el “*actin cortex*”. Serían necesarias medidas complementarias del tipo aportado por la microscopía de super-resolución para poder atribuir a un tipo de filamento u otro la red observada por medio de los canales de AFM en esta región concreta.



**Figura 4.7.** Correlación de las imágenes de imnofluorescencia con distintos canales obtenidos a partir de las medidas de AFM (“pseudotopografía” y módulo de Young para un mismo fibroblasto). a) Imágenes de fluorescencia resaltando con tinciones rojas los microtúbulos, y con verdes las fibras de actina. Escala 20  $\mu\text{m}$ . b) Fusión de ambas canales en una sola imagen. Escala 20  $\mu\text{m}$ . c) Zoom del panel b); escala: 5  $\mu\text{m}$ . d) Mapa de “pseudotopografía”. e) Imagen de módulo de Young. Escala de d) y e): 5  $\mu\text{m}$ . La escala de colores para el mapa de módulo de Young coincide con la de la figura 4.8.

Si analizamos comparativamente los resultados obtenidos en una misma célula para las imágenes de fluorescencia (esencialmente el canal relacionado con la actina) y para las medidas de AFM, en concreto, “pseudotopografía” (figura 4.7.d) y valores de módulo de Young (figura 4.7.e), es posible observar un alto grado de concordancia entre las estructuras expuestas por cada uno de los canales. Observar las flechas marcadas como c. y d., las cuales denotan dos fibras individuales coincidentes en los mapas 4.7.c., 4.7.d. y 4.7.e. Esto lleva a concluir que las técnicas de AFM, tanto de obtención como de tratamiento de datos, desarrolladas durante este capítulo de la tesis representan una fuente fidedigna de información referente al citoesqueleto celular.



**Figura 4.8.** Mapas de módulo de Young para dos fibroblastos NIH 3T3 tomados mediante un “Force Volume” de 512 x 512 pixels. Escala a) y b): 5  $\mu\text{m}$ .

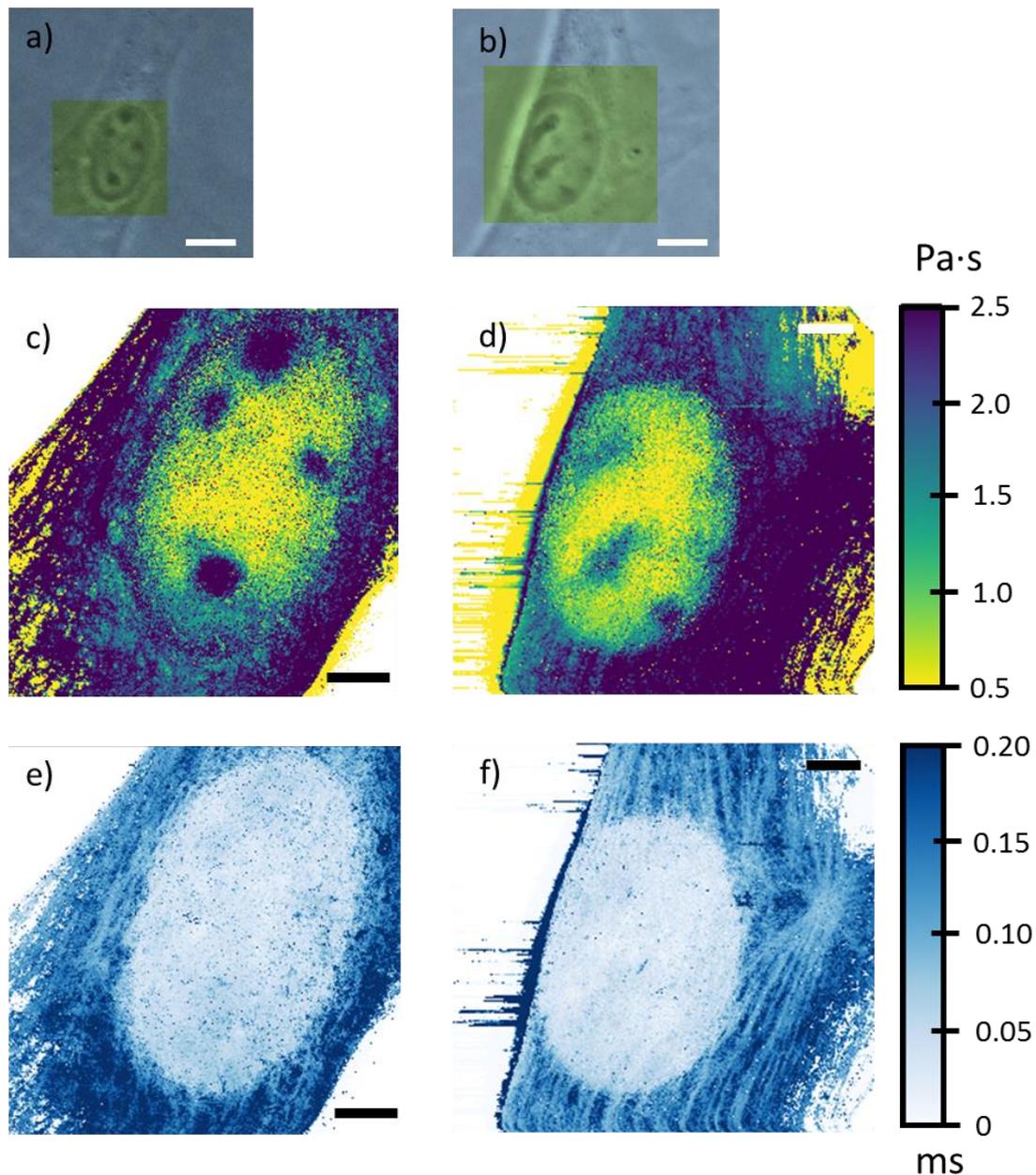
Otra observación a destacar en los mapas de módulo de Young es el claro incremento de la rigidez en la zona nuclear ( $E > 18 \text{ kPa}$ ), para las medidas tomadas en fibroblastos fijados. Pudiéndose incluso distinguir la posición y dimensión del mismo con la información de este canal. En la figura 4.8 se incluyen varios ejemplos de estos resultados experimentales para distintas células. Esta fenomenología podría tener su origen en la contribución de la matriz nuclear sobre la integridad estructural de la célula en esa zona concreta.

#### – 4.3.4. Coeficiente de viscosidad, tiempo de relajación y nucléolos

En el apartado anterior se han tratado exclusivamente resultados relacionados con el módulo de Young y la configuración del citoesqueleto. Reservándole un rol aún más importante a la información mecánica obtenida de nuestras curvas de fuerza-distancia referente a la viscosidad o disipación de energía. Este parámetro viscoso nos permitirá indagar más allá de la superficie celular, dando el salto a la observación de componentes internos de la célula. Como ejemplo de su utilización visualizaremos estructuras supra-macromoleculares localizadas en el interior del núcleo.

La principal observación que se puede hacer relacionada con los mapas del coeficiente de viscosidad es la distinción entre dos zonas dentro de la célula (figura 4.9.c y 4.9.d). Una correspondiente a valores bajos de viscosidad localizada en el núcleo ( $\eta < 0.75 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ), y una

segunda que engloba todo el resto de la célula. Esta clara diferenciación de la zona nuclear viene acompañada de un dato aún más curioso. Dentro de esta área con baja viscosidad existen una serie emplazamientos caracterizados por un aumento de este coeficiente que de forma sorprendente coinciden espacialmente con los nucléolos. Comparando las imágenes ópticas de contraste de fase con los mapas de viscosidad es posible apreciar como cada uno de estos sitios de alta viscosidad interiores al núcleo coinciden exactamente con uno de los nucléolos (ver figura 4.9). Además, los nucléolos son estructuras que se encuentran localizadas dentro de la célula, bien alejadas de lo que considera la corteza celular, de manera que su visualización es un hecho inequívoco de la capacidad de nuestra metodología de AFM de observar estructuras no solo superficiales, sino también otras que se encuentren enterradas profundamente en el conjunto de la célula.



**Figura 4.9.** a) - b) Imágenes ópticas de contraste de fase tomadas en dos fibroblastos. La zona resaltada en verde corresponde con el área sobre la cual se realizó el mapeo de las propiedades mecánicas por AFM. Escala a) y b):  $10\ \mu\text{m}$ . c) - d) Mapas del coeficiente de viscosidad. e) - f) Mapas de tiempo de relajación de las células. Escala c)- f):  $5\ \mu\text{m}$ .

Otro punto a destacar en lo referente a los mapas de viscosidad es su combinación con los datos de densidad del citoesqueleto, previamente obtenidas para distintas regiones de estas células (figura 4.6). Si observamos ambos simultáneamente es posible afirmar que una mayor densidad de número de agujeros (menor tamaño medio por agujero) corresponde con valores mayores en el coeficiente de viscosidad. La zona de la estrella de actina es un claro ejemplo, presentando la mayor densidad y el mayor coeficiente de viscosidad. Este es un fenómeno que casa indirectamente con la idea poroelástica de la célula (recordar que en el capítulo 3 de la presente tesis doctoral se dieron razones y argumentos a favor de una modelización de la célula como un material poroelástico). A mayor densidad de agujeros mayores complicaciones encontrara el fluido interior para moverse a través de las estructuras porosas, implicando un aumento de la viscosidad en esa zona concreta.

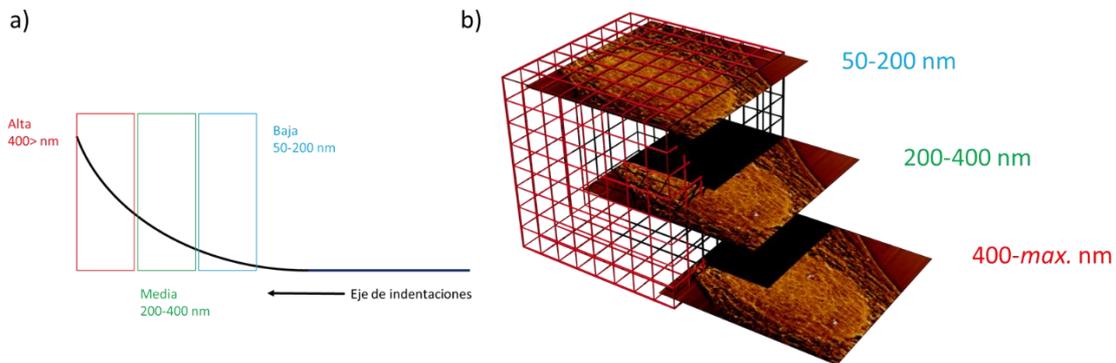
Finalmente, se ha incluido también el canal relacionado con el tiempo de relajación (parámetro que se obtiene mediante la expresión 3.8), ver figura 4.9.e y 4.9.f. Este canal nos aporta información en lo referente a la visualización y definición del citoesqueleto, además de esclarecer alguno de sus propiedades viscoelástica. Pudiéndose observar como los filamentos, en general, muestran tiempos de relajación menores que las áreas circundantes. Por otra parte, el área que corresponde al núcleo, la cual ya podíamos detectar tanto con el módulo de Young como con la viscosidad, también es fácilmente identificable mediante el mapeo con el tiempo de relajación ( $\tau < 0.05$  s). Obteniéndose un valor de dicho tiempo de relajación menor en el núcleo en comparación con el resto de zonas de la célula.

#### – 4.3.5. Estudio del posicionamiento tridimensional de los elementos internos de la célula

En este último apartado experimental se intentará de forma cualitativa posicionar tridimensionalmente distintos elementos que se encuentran ubicados en el interior de las células. Para ello se recurrirá a dos diferentes métodos que trabajarán de forma complementaria con el objetivo de, principalmente, localizar en profundidad distintas fibras del citoesqueleto. Uno de los métodos estará basado en lo denominado como “*stiffness tomography*” (concepto introducido a continuación). Mientras que el otro combinará un análisis de los mapas de módulo de Young (aplicando filtros en la escala de valores de dureza) con simulaciones FEM.

La tomografía de células, determinada mediante la aplicación de curvas de fuerza distancia con un AFM, fue primigeniamente concebida en 2005 por S. Kasas et al<sup>93</sup>, y patentada en 2007<sup>94</sup>. En este trabajo se presentaron los primeros conceptos relacionados con la heterogeneidad estructural de las células en el eje Z (profundidad o eje de indentación) y sus posibles efectos en las curvas de fuerza-distancia. Posteriormente, en 2009 se concretaron más estas ideas dando forma a lo que se conoce como método de “*stiffness tomography*”<sup>95</sup>. Esta metodología está basada en la división de la curva de fuerza-distancia en distintos tramos de indentación, de manera que analizando cada uno de ellos independientemente podemos obtener un módulo de Young aparente diferentes para cada tramo de profundidades (en la figura 4.10 se ejemplifica el proceso de análisis de las curvas de fuerza-distancia en función de la profundidad). Este protocolo de análisis de datos ha dado pie al análisis de gran variedad de especímenes biológicos en contextos diversos, como ha sido descrito en la literatura<sup>96-102</sup>. Estos hechos nos llevaron a decidir probar este tipo de metodología y adaptarla a nuestros mapas de módulo de Young.

En la figura 4.10 se describe el proceso de obtención de información mecánica de la célula mediante la adaptación de la “*stiffness tomography*” a nuestras proyecciones bidimensionales. Básicamente, se decidió dividir la curva de fuerzas en tres tramos de indentación (ver figura 4.10.a), y extrapolarlo a todo el malla del “*Force Volume*”. De esta forma obtendríamos tres mapas diferentes tanto de módulo de Young como del coeficiente de viscosidad, cada uno de ellos representado la respuesta de la célula para una indentación diferente. La figura 4.10.b explica gráficamente el procedimiento previamente descrito.



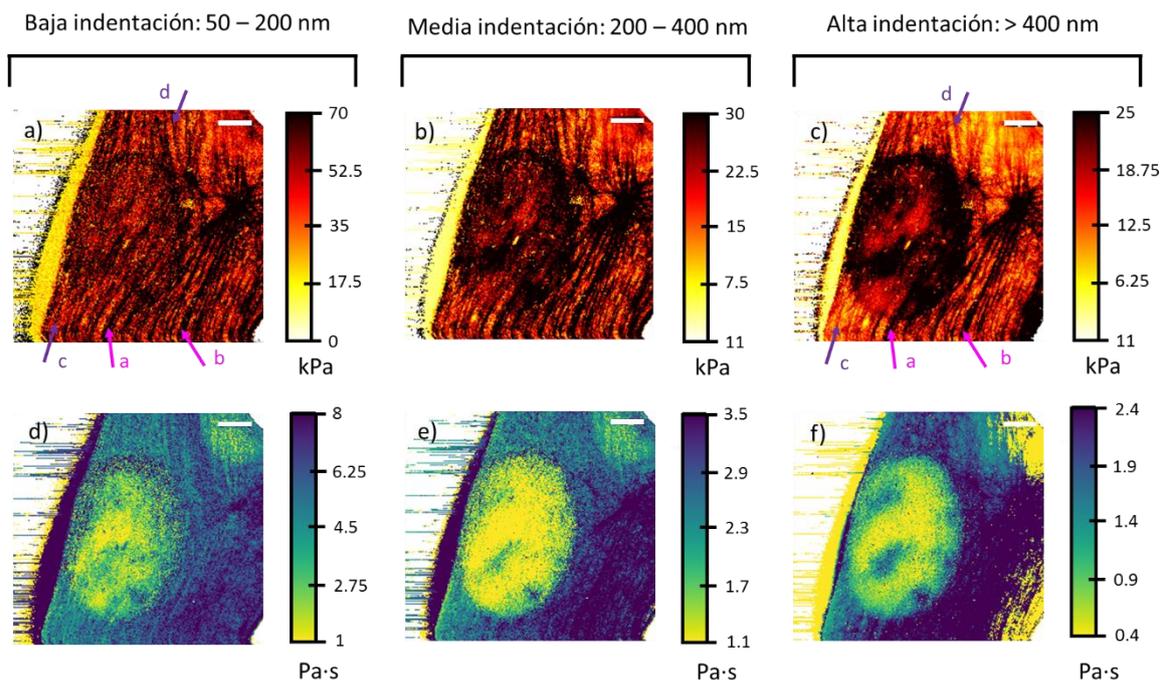
**Figura 4.10.** Estudio tomográfico de una célula por cortes en valores de indentación (adaptación de la “*stiffness tomography*”). a) Esquema de una curva de fuerza-distancia dividida en tres zonas de indentación. En cada zona se resolverá el problema de mecánica de contacto mediante la teoría viscoelástica introducida en el capítulo 3 de esta tesis doctoral. b) Para cada una de esas zonas obtendremos un mapa de módulo de Young distinto.

Los resultados obtenidos para el módulo de Young en estos tres tramos de indentación se encuentran ejemplificados en la figura 4.11.a-c. Lo primero que cabe destacar es la diferencia de escala entre la figura 4.10.a, y las figura 4.10.b y 4.10.c. Implicando un claro incremento del módulo de Young a bajas indentaciones. Toda la argumentación elaborada a continuación es de igual forma extrapolable a los mapas de viscosidad (figura 4.11.d-f), los cuales presentan un comportamiento análogo: mayores viscosidades a bajas indentaciones.

Existen varias explicaciones posibles para este incremento de  $E$  al inicio de la curva de fuerzas. La primera hipótesis estaría relacionada con los errores a la hora de determinar el punto de contacto de la curva de fuerzas. Este comportamiento ya ha sido observado en la literatura científica con anterioridad<sup>103</sup>. Como ya se mencionó en el capítulo 1, para obtener el punto de contacto hemos utilizado el método de ratio de variaciones. Errores en la detección del punto de contacto mediante este método concreto suelen llevar a un corrimiento del mismo hacia mayores indentaciones (el ruido experimental en la línea base de la curva de fuerza aboca a este resultado). Implícitamente, este corrimiento conllevaría una sobreestimación del módulo de Young a bajas indentaciones, ya que se asume una indentación efectiva (y área de contacto) teórica menor que la que de verdad correspondería experimentalmente. Este efecto se irá mitigando conforme se analice la curva a mayores indentaciones, debido a la disminución del error relativo cometido en la estimación de la indentación efectiva. La segunda explicación posible para este fenómeno está relacionada con la corteza celular, región de alta densidad de fibras de actina justo subyacente a la membrana. Al realizar medidas a bajas profundidades la contribución de la corteza celular es mayor que a altas indentaciones. Conforme vamos aumentando la indentación se empezarán a sentir las contribuciones de componentes estructurales que se encuentran ubicados más profundos en el interior de la célula.

Desembocando en la obtención de una respuesta mecánica dada por el promediado de todos estos elementos internos (muchos de ellos teniendo una rigidez inferior a la de la corteza celular), y finalmente obteniendo una disminución del módulo de Young medido por AFM.

Con los datos de que disponemos es difícil discernir cuál de las dos hipótesis es la más plausible. Para poder identificar si la causa es debido a una u otra, o una combinación de ambas, se deberían de realizar unos experimentos de control que incluyesen: una muestra homogénea e isotrópica con un módulo de Young semejante al de las células; y una segunda muestra igual a la anterior sobre la que se creciese una capa de mayor rigidez (modelizando el “actin cortex”). Experimentos de indentación con la misma punta sobre ambas muestras permitirían identificar las contribuciones que tiene cada efecto sobre los valores de  $E$ .



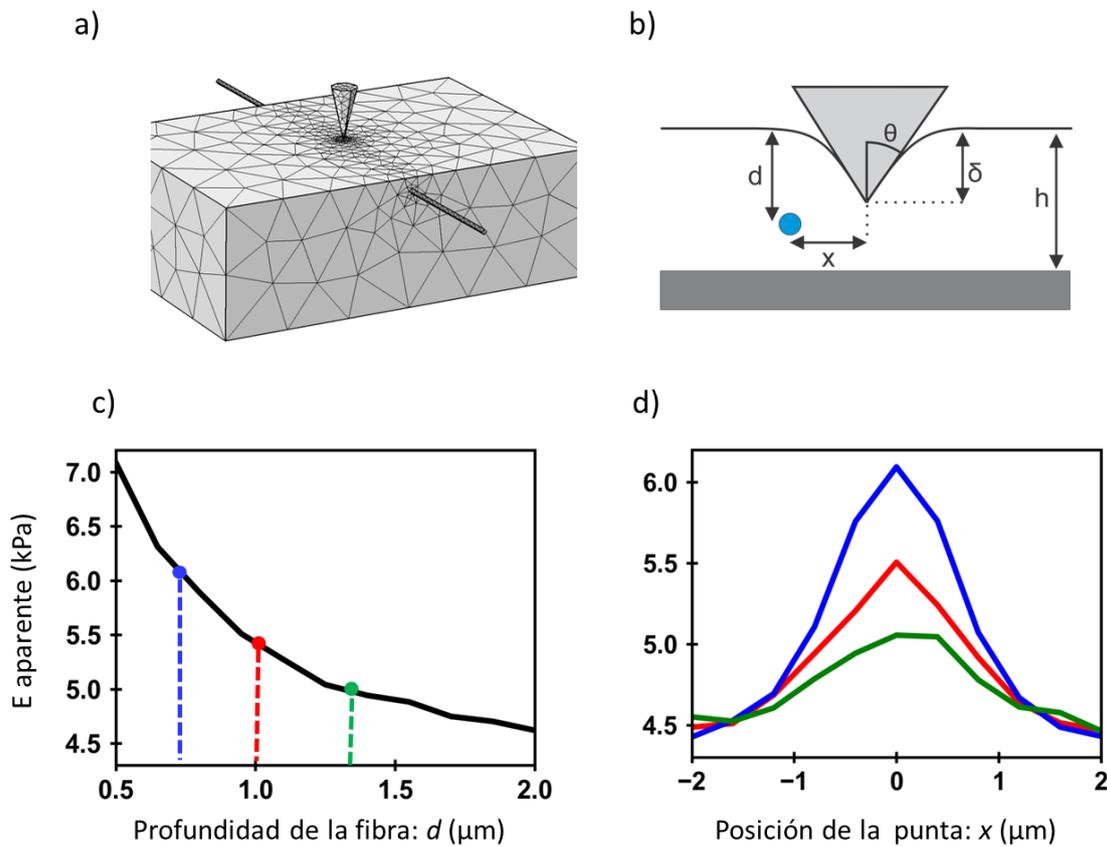
**Figura 4.11.** Resultados obtenidos con el método basado en la adaptación del “stiffness tomography” sobre los mapas de propiedades mecánicas de un fibroblasto NIH 3T3. a)-c) Mapas de módulo de Young para los tres cortes en valores de indentación: 50-200 nm, 200-400 y  $\geq 400$ . d)-f) Mapas del coeficiente de viscosidad para los tres ventanas de indentación: 50-200 nm, 200-400 y  $\geq 400$ . Escala a) -f): 5  $\mu\text{m}$ .

Refiriéndonos a los mapas de viscosidad (figura 4.11.d-f) cabe destacar la nitidez que se adquiere en la resolución de los nucléolos a partir de indentaciones mayores a 200 nm. De igual forma y en primera instancia, cabría pensar que según nos vayamos moviendo a mayores indentaciones fueran apareciendo nuevos filamentos en los mapas de  $E$ , que se encuentran localizados más profundamente. Esta no es la fenomenología que observamos en nuestros mapas tomográficos de módulo de Young. De hecho, si comparamos con detalle las morfologías que se muestran en la figura 4.11.a-c lo que sí es posible observar es como algunas fibras han sufrido una disminución mayor (conforme nos vamos a mayores indentaciones) en sus valores presentados de módulo de Young, ver flechas c. y d., que otras, ver flechas a. y b.

En un análisis de tomografía clásica cabría esperar que las variaciones en el valor del módulo de Young (obtenidos sobre una fibra) entre dos cortes a distintas indentaciones reflejen la profundidad de la fibra. De esta forma, la indentación a la cual obtengamos el máximo de esta

derivada debería ser proporcional a la posición (o profundidad) que tenga la fibra dentro de la propia célula. El problema que encontramos en nuestros cortes de  $E$  radica en que todas las fibras muestran un carácter decreciente conforme se aumenta la indentación, complicando la interpretación desde un punto de vista de la tomografía clásica. Esta dificultad interpretativa, unida a la baja sensibilidad que presentan los cortes por indentaciones cuando los comparamos entre ellos, nos hizo plantear un enfoque alternativo que permitiera determinar de forma más precisa la profundidad a la cual se encontraba cada fibra.

El método alternativo que proponemos está basado en una hipótesis principal en la cual todos los filamentos poseen un módulo de Young muy superior (y constante) al resto de elementos que componen la célula y en el cual se encuentran embebidos. A continuación, vamos a analizar por medio de simulaciones por elementos finitos como esta hipótesis afectaría a los resultados obtenidos de la respuesta mecánica por curvas de fuerza-distancia. En este caso no se realizará ningún tipo de discriminación por indentación a la hora de obtener las propiedades mecánicas de la muestra.

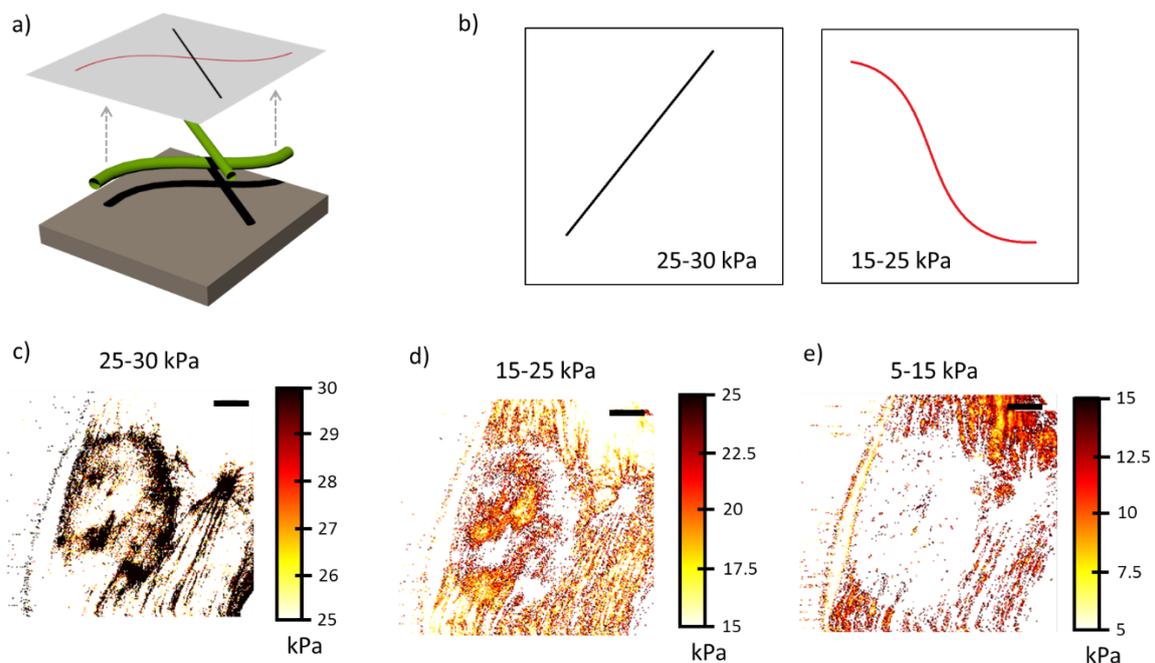


**Figura 4.12.** Resultados de las simulaciones por FEM. a) Ilustración del experimento simulado. Se ha indentado con una punta cónica un material de 4 kPa. Dentro del material se encuentra enterrada una fibra con una rigidez de 1 GPa y 200 nm de diámetro. b) Esquema de la configuración simulada, incluyendo los parámetros relevantes que permitirán evaluar los resultados de la simulación. c) Gráfico del  $E$  aparente medido por una curva de fuerza-distancia simulada en función de la profundidad a la cual se coloca la fibra. d) Representación del  $E$  aparente para tres escaneos laterales realizados con la fibra a distinta profundidad (correspondencia con el panel anterior).

En la figura 4.12.a se muestra una imagen esquemática de la configuración que se siguió durante la simulación FEM. Una punta cónica penetra 500 nm un material con una rigidez de 4 kPa. Dentro de dicho material se encuentra enterrada una fibra con un módulo de Young de 1

GPa. A través de la figura 4.12.b se definen una serie de consideraciones geométricas: la posición de la punta relativa a la fibra ( $x$ ), la profundidad de la fibra ( $d$ ) y la altura de la célula ( $h$ ).

Primero iremos modificando la profundidad a la cual colocamos la fibra ( $d$ ) para ver cómo este parámetro afecta al módulo de Young aparente medido mediante la ejecución de una curva de fuerzas-distancia justo sobre ella. El resultado se encuentra en la figura 4.12.c, mostrando como disminuye el módulo de Young conforme vamos enterrando a más profundidad el filamento. Desde valores cercanos a 6 kPa con la fibra a una profundidad de  $0.7 \mu\text{m}$  hasta 5 kPa para  $1.4 \mu\text{m}$ . Por otro lado, se decidió modificar la posición relativa de la fibra ( $x$ ) de manera que la punta ya no se encontrase localizada justo sobre ella y se moviese hacia los lados de la misma (mientras que se mantenía fija la profundidad). Se puede observar como para  $x = 0$ , la punta está exactamente encima de la fibra, y se obtiene el máximo módulo de Young. De igual forma, si alejamos la fibra de la punta (movimientos a lo largo del eje horizontal) los valores obtenidos irán disminuyendo. Esta segunda simulación basada en un barrido horizontal se repitió para tres distintas profundidades de  $0.7 \mu\text{m}$ ,  $1 \mu\text{m}$  y  $1.4 \mu\text{m}$  (figura 4.12.d), observando como el pico mostrado para mayores profundidades de la fibra va achatándose y disminuyendo la amplitud.



**Figura 4.13.** Estudio de los mapas de módulo de Young para la localización de las fibras en profundidad. a) Esquema ilustrativo de dos fibras localizadas a dos profundidades distintas en el interior celular. b) La fibra negra situada más cerca de la superficie celular, correspondería con un mayor módulo de Young aparente medido por las curvas de fuerza-distancia. La fibra roja, al encontrarse a mayor profundidad, dará lugar a un valor menor de  $E$  aparente. c) - e) Resultados experimentales de un fibroblasto, habiendo dividido la escala de valores del módulo de Young en tres ventanas: 5-15 kPa, 15-25 kPa, y 25-30 kPa. Escala en c) - e):  $5 \mu\text{m}$ .

Resumiendo, los resultados obtenidos por medio de las simulaciones FEM (mostrados en la figura 4.12) han demostrado que las medidas de indentación que hagamos con el AFM sobre la posición de una fibra darán un módulo de Young aparente (correspondiente a la respuesta del material equivalente conformado por la fibra y las estructuras anexas) mayor conforme más cercana este la fibra a la superficie de la célula. Esto fue la semilla para la concepción de un

análisis alternativo de los mapas de módulo de Young, la idea se encuentra esquematizada en la figura 4.13.a-b y se basa en **filtros en la escala de valores de dureza**.

Al realizar los experimentos de “*Force Volume*” y analizar las curvas de fuerza-distancia como un único objeto, estamos proyectando la información tridimensional de la célula sobre un plano bidimensional. Pero si nos fijamos en los valores del módulo de Young proyectado de las fibras, estos dependerán cualitativamente de a que profundidad se encuentren, tal y como se ejemplifica en la figura 4.13.b. Para intentar diferenciar partes del citoesqueleto a distintas profundidades crearemos tres filtros de módulo de Young (5-15 kPa, 15-25 kPa y 25-30 kPa). Cada uno de ellos mostrará una ventana de información que posteriormente se intentará corresponder con la altura a la cual se encuentre la estructura destacada, figura 4.13.c-e.

El filtro de 25-30 kPa resalta con claridad la zona de la estrella de actina, además de las fibras y haces salientes de la misma. Esta arquitectura, como pudimos comprobar mediante microscopía de fluorescencia, está principalmente compuesta por fibras de actina. Por otro lado, el filtro de 15-25 kPa destaca, entre otras zonas, la región inmediatamente superior al núcleo, que como pudimos saber por fluorescencia estaba compuesta en parte por microtúbulos. A su vez, es bien sabido que las fibras de actina suelen estar localizadas en zonas cercanas a la membrana celular, mientras que la posición de los microtúbulos tiende más al interior de la célula (más profundos en nuestra configuración). Estos hechos son un claro argumento a favor del buen funcionamiento de nuestra metodología de detección de la profundidad de las fibras. Hemos obtenido un mayor módulo de Young para las fibras de actina, indicándonos que cualitativamente se encuentran cercanas a la superficie de la célula. Y, por otra parte, hemos observado que zonas en las que se asume una presencia de microtúbulos los valores de módulo de Young son inferiores, dato que denotaría que su localización es cualitativamente más profunda que la que presentan las mencionadas fibras de actina. Por último, con el filtro de 5-15 kPa hemos sido capaces de observar zonas donde predomina la respuesta de estructuras localizadas en el interior celular.

## 4.4. Conclusiones

Experimentalmente, se ha implementado un procedimiento de cultivo celular, imnofluorescencia y fijado adaptado a los requerimientos de un AFM. No solo se han usado los protocolos descritos en el capítulo 3 para las medidas en condiciones fisiológicas, sino que se añadieron protocolos de fijación con formaldehído y tinción de microfilamentos de actina y microtúbulos.

Se ha desarrollado una metodología de obtención de propiedades mecánicas de células resuelta en todos los ejes espaciales. Dicha metodología está basada en el clásico “*Force Volume*”, trabajando con curvas de fuerza-distancia y aplicando un análisis inteligente de las mismas.

Este método tiene la capacidad de resolver la arquitectura del citoesqueleto celular con alta precisión. Mediante la aplicación de transformadas de Fourier espaciales en los datos topográficos de máxima fuerza aplicada se ha podido obtener el canal denominado “pseudotopografía”, permitiendo observar distintas configuraciones que adquiere el citoesqueleto como: fibras, “*mesh*” o tipo asterisco; además de cuantificar algunas de sus características topológicas.

La combinación de la “pseudotopografía” y el mapeado de módulo de Young con las imágenes de fluorescencia permiten identificar contribuciones específicas de distintos tipos de filamentos. En concreto, fuimos capaces de distinguir aportaciones por parte de microfilamentos de actina en las arquitecturas de tipo asterisco, llevándonos a identificar casos concretos de estrellas de actina.

Al asumir un comportamiento viscoelástico por parte de la respuesta celular obtuvimos no solo información topográfica y de dureza, sino que propiedades como el coeficiente de viscosidad y el tiempo de relajación pudieron también ser evaluados. Estructuras internas de la célula son detectadas a través del estudio del coeficiente de viscosidad. En particular, los nucléolos localizados dentro del núcleo destacan por su alta viscosidad en comparación con el resto de la zona nuclear.

El estudio tridimensional de las propiedades mecánicas de la célula no se limitó exclusivamente a la evaluación del comportamiento viscoso de la misma. En primera instancia, se decidió aplicar una adaptación del método de “*stiffness tomography*”<sup>95,101</sup> obteniendo resultados que permitían distinguir de forma cualitativa la posición relativa de algunos elementos internos de la célula.

Complementariamente a la anterior metodología se decidió analizar los mapas de módulo de Young (obtenidos para toda la curva de fuerza-distancia, sin discriminación por indentaciones) aplicando filtros en la escala de valores de dureza. Mediante la aplicación de este método, y la ayuda de las simulaciones FEM, fuimos capaces de posicionar tridimensionalmente de forma semicuantitativa distintas fibras obtenidas en un mismo mapa de módulo de Young.

## 4.5. Referencias

- Pelkmans, L. A New Era in Molecular Biology. *Science (80-. )*. **425**, 10–12 (2013).
- Li, M., Dang, D., Xi, N., Wang, Y. & Liu, L. Nanoscale imaging and force probing of biomolecular systems using atomic force microscopy: From single molecules to living cells. *Nanoscale* **9**, 17643–17666 (2017).
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J. & Siu, L. L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* **501**, 355–364 (2013).
- Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–345 (2013).
- Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
- Bintu, L. *et al.* Dynamics of epigenetic regulation at the single-cell level. *Science (80-. )*. **351**, 720–724 (2016).
- Skylaki, S., Hilsenbeck, O. & Schroeder, T. Challenges in long-term imaging and quantification of single-cell dynamics. *Nat. Biotechnol.* **34**, 1137–1144 (2016).
- Muller-Sieburg, C. E., Sieburg, H. B., Bernitz, J. M. & Cattarossi, G. Stem cell heterogeneity: Implications for aging and regenerative medicine. *Blood* **119**, 3900–3907 (2012).
- Chen, C. *et al.* Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science (80-. )*. **356**, 189–194 (2017).
- Tan, J. L. *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1484–1489 (2003).
- Nelson, C. M. *et al.* Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11594–11599 (2005).
- Palm, K., Luthman, K., Ungell, A. L., Strandlund, G. & Artursson, P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J. Pharm. Sci.* **85**, 32–39 (1996).
- Breukink, E. *et al.* Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science (80-. )*. **286**, 2361–2364 (1999).
- Rotsch, C. & Radmacher, M. Mapping Local Electrostatic Forces with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **13**, 2825–2832 (1997).
- Fantner, G. E., Barbero, R. J., Gray, D. S. & Belcher, A. M. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells

- using high-speed atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 280–285 (2010).
16. Dembo, M. & Wang, Y. L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys. J.* **76**, 2307–2316 (1999).
  17. du Roure, O. *et al.* Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2390–2395 (2005).
  18. Suresh, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Mater.* **55**, 3989–4014 (2007).
  19. Ingber, D. E. Tensegrity: the Architectural Basis of Cellular Mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 575–599 (1997).
  20. Puntheeranurak, T., Wildling, L., Gruber, H. J., Kinne, R. K. H. & Hinterdorfer, P. Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na<sup>+</sup>-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *J. Cell Sci.* **119**, 2960–2967 (2006).
  21. Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M. & Gaub, H. E. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science (80- )*. **257**, 1900 LP-1905 (1992).
  22. Henderson, E., Haydon, P. G. & Sakaguchi, D. S. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science (80- )*. **257**, 1944–1946 (1992).
  23. Schoenenberger, C. A. & Hoh, J. H. Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophys. J.* **67**, 929–936 (1994).
  24. Müller, D. J. & Dufrêne, Y. F. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* **21**, 461–469 (2011).
  25. Dufrêne, Y. F. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 295–307 (2017).
  26. Hoh, J. H. & Schoenenberger, C. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* **107 ( Pt 5)**, 1105–14 (1994).
  27. Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T. & Cooper, G. J. S. Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **285**, 33–39 (1999).
  28. Grandbois, M., Clausen-Schaumann, H. & Gaub, H. Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2. *Biophys. J.* **74**, 2398–2404 (1998).
  29. Hansma, P. K. *et al.* Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* **64**, 1738–1740 (1994).
  30. Albrecht, T. R., Grütter, P., Horne, D. & Rugar, D. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. *J. Appl. Phys.* **69**, 668–673 (1991).
  31. Garcia, R. & Herruzo, E. T. The emergence of multifrequency force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 217–226 (2012).
  32. Martínez, N. F. *et al.* Bimodal atomic force microscopy imaging of isolated antibodies in air and liquids. *Nanotechnology* **19**, (2008).
  33. Dietz, C., Herruzo, E. T., Lozano, J. R. & Garcia, R. Nanomechanical coupling enables detection and imaging of 5 nm superparamagnetic particles in liquid. *Nanotechnology* **22**, (2011).
  34. Amo, C. A., Perrino, A. P., Payam, A. F. & Garcia, R. Mapping Elastic Properties of Heterogeneous Materials in Liquid with Angstrom-Scale Resolution. *ACS Nano* **11**, 8650–8659 (2017).
  35. Lamour, G., Yip, C. K., Li, H. & Gsponer, J. High intrinsic mechanical flexibility of mouse prion nanofibrils revealed by measurements of axial and radial young's moduli. *ACS Nano* **8**, 3851–3861 (2014).
  36. Benaglia, S., Gisbert, V. G., Perrino, A. P., Amo, C. A. & Garcia, R. Fast and high-resolution mapping of elastic properties of biomolecules and polymers with bimodal AFM. *Nat. Protoc.* **13**, (2018).
  37. Guan, D., Charlaix, E., Qi, R. Z. & Tong, P. Noncontact Viscoelastic Imaging of Living Cells Using a Long-Needle Atomic Force Microscope with Dual-Frequency Modulation. *Phys. Rev. Appl.* **8**, 1–10 (2017).
  38. Hansma, P. K., Drake, B., Marti, O., Gould, S. A. & Prater, C. B. The scanning ion-conductance microscope. *Science (80- )*. **243**, 641 LP-643 (1989).
  39. Novak, P. *et al.* Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat. Methods* **6**, 279–281 (2009).
  40. Seifert, J., Rheinlaender, J., Novak, P., Korchev, Y. E. & Schäffer, T. E. Comparison of Atomic Force Microscopy and Scanning Ion Conductance Microscopy for Live Cell Imaging. *Langmuir* **31**, 6807–6813 (2015).
  41. Rheinlaender, J. & Schäffer, T. E. Mapping the mechanical stiffness of live cells with the scanning ion conductance microscope. *Soft Matter* **9**, 3230 (2013).
  42. Rheinlaender, J. & Schäffer, T. E. Lateral Resolution and Image Formation in Scanning Ion Conductance Microscopy. *Anal. Chem.* **87**, 7117–7124 (2015).
  43. Efremov, Y. M., Cartagena-rivera, A. X., Suter, D. M. & Raman, A. Mapping heterogeneity of cellular mechanics by multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat. Protoc.* (2018). doi:10.1038/s41596-018-0031-8
  44. Cartagena-Rivera, A. X., Wang, W. H., Geahlen, R. L. & Raman, A. Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical mapping of live cells using the atomic force microscope. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
  45. Raman, A. *et al.* Mapping nanomechanical

- properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 809–814 (2011).
46. Cartagena, A. & Raman, A. Local viscoelastic properties of live cells investigated using dynamic and quasi-static atomic force microscopy methods. *Biophys. J.* **106**, 1033–1043 (2014).
47. Cartagena, A., Hernando-Pérez, M., Carrascosa, J. L., De Pablo, P. J. & Raman, A. Mapping in vitro local material properties of intact and disrupted virions at high resolution using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nanoscale* **5**, 4729–4736 (2013).
48. Weilandt, E., Hild, S., Marti, O. & Rosa-Zeiser, A. The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Meas. Sci. Technol.* **8**, 1333–1338 (1997).
49. Krottil, H. U. *et al.* Pulsed force mode: a new method for the investigation of surface properties. *Surf. Interface Anal.* **27**, 336–340 (1999).
50. De Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. Jumping mode scanning force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **73**, 3300–3302 (1998).
51. Dokukin, M. E. & Sokolov, I. Quantitative Mapping of the Elastic Modulus of Soft Materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM Modes. *Langmuir* **28**, 16060–16071 (2012).
52. Liparoti, S., Sorrentino, A. & Speranza, V. Micromechanical characterization of complex polypropylene morphologies by HarmoniX AFM. *Int. J. Polym. Sci.* **2017**, (2017).
53. Schillers, H., Medalsy, I., Hu, S., Slade, A. L. & Shaw, J. E. PeakForce Tapping resolves individual microvilli on living cells. *J. Mol. Recognit.* **29**, 95–101 (2016).
54. Zhang, T., Zheng, Y. & Cosgrove, D. J. Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel atomic force microscopy. *Plant J.* **85**, 179–192 (2016).
55. Ren, D., Wang, H., Yu, Z., Wang, H. & Yu, Y. Mechanical imaging of bamboo fiber cell walls and their composites by means of peakforce quantitative nanomechanics (PQNM) technique. *Holzforschung* **69**, 975–984 (2015).
56. Cross, S. E., Jin, Y. S., Rao, J. & Gimzewski, J. K. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 780–783 (2007).
57. Pletikapić, G., Berquand, A., Radić, T. M. & Svetličić, V. Quantitative nanomechanical mapping of marine diatom in seawater using peak force tapping atomic force microscopy. *J. Phycol.* **48**, 174–185 (2012).
58. Picas, L., Rico, F., Deforet, M. & Scheuring, S. Structural and Mechanical Heterogeneity of the Erythrocyte Membrane Reveals Hallmarks of Membrane Stability. *ACS Nano* **7**, 1054–1063 (2013).
59. Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C. & Nicod, L. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. *J. Struct. Biol.* **178**, 1–7 (2012).
60. Rigato, A., Rico, F., Eghiaian, F., Piel, M. & Scheuring, S. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales. *ACS Nano* **9**, 5846–5856 (2015).
61. Eghiaian, F., Rigato, A. & Scheuring, S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys. J.* **108**, 1330–1340 (2015).
62. JPK Instruments. QI™ mode - Quantitative Imaging with the NanoWizard® 3 AFM. *Tech. Note (JPK Instruments)* 1–7 (2011). doi:10.1016/j.memsci.2012.10.059
63. Rotsch, C., Jacobson, K. & Radmacher, M. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 921–926 (1999).
64. Matzke, R., Jacobson, K. & Radmacher, M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat. Cell Biol.* **3**, 607–610 (2001).
65. Végh, A. G. *et al.* Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. *J. Mol. Recognit.* **24**, 422–428 (2011).
66. Francius, G. *et al.* Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano* **2**, 1921–1929 (2008).
67. Puricelli, L., Galluzzi, M., Schulte, C., Podestà, A. & Milani, P. Nanomechanical and topographical imaging of living cells by atomic force microscopy with colloidal probes. *Rev. Sci. Instrum.* **86**, (2015).
68. Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G. & Grütter, P. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: Stiffening induced by contractile agonist. *Biophys. J.* **88**, 2994–3007 (2005).
69. Touhami, A., Nysten, B. & Dufrêne, Y. F. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir* **19**, 4539–4543 (2003).
70. Chopinet, L., Formosa, C., Rols, M. P., Duval, R. E. & Dague, E. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron* **48**, 26–33 (2013).
71. Bhat, S. V. *et al.* Correlative atomic force microscopy quantitative imaging-laser scanning confocal microscopy quantifies the impact of stressors on live cells in real-time. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
72. Casdorff, K., Keplinger, T. & Burgert, I. Nano-mechanical characterization of the wood cell wall by AFM studies: Comparison between AC- and QI™ mode. *Plant Methods* **13**, 1–9 (2017).

73. Kronlage, C., Schäfer-Herte, M., Böning, D., Oberleithner, H. & Fels, J. Feeling for Filaments: Quantification of the Cortical Actin Web in Live Vascular Endothelium. *Biophys. J.* **109**, 687–698 (2015).
74. Smolyakov, G., Formosa-Dague, C., Severac, C., Duval, R. E. & Dague, E. High speed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments. *Micron* **85**, 8–14 (2016).
75. Dokukin, M. E. & Sokolov, I. Nanoscale compositional mapping of cells, tissues, and polymers with ringing mode of atomic force microscopy. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
76. *Nanoscale Imaging - Methods and Protocols.* (Humana Press, 2018). doi:10.1007/978-1-4939-8591-3
77. Hecht, F. M. *et al.* Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale. *Soft Matter* **11**, 4584–4591 (2015).
78. Schierbaum, N., Rheinlaender, J. & Schäffer, T. E. Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contact to adjacent cells. *Acta Biomater.* **55**, 239–248 (2017).
79. Garcia, P. D. & Garcia, R. Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophys. J.* **114**, 2923–2932 (2018).
80. Garcia, P. D. & Garcia, R. Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy. *Nanoscale* **10**, 19799–19809 (2018).
81. Ando, T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophys. Rev.* **10**, 285–292 (2018).
82. Viani, M. B. *et al.* Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 4300–4303 (1999).
83. Alcaraz, J. *et al.* Correction of microrheological measurements of soft samples with atomic force microscopy for the hydrodynamic drag on the cantilever. *Langmuir* **18**, 716–721 (2002).
84. Ando, T. *et al.* A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12468 LP-12472 (2001).
85. Sahin, O., Magonov, S., Su, C., Quate, C. F. & Solgaard, O. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 507–514 (2007).
86. Xu, K., Zhong, G. & Zhuang, X. Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science (80-. )*. **339**, 452 LP-456 (2013).
87. Xu, K., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat. Methods* **9**, 185–188 (2012).
88. Bovellan, M. *et al.* Cellular control of cortical actin nucleation. *Curr. Biol.* **24**, 1628–1635 (2014).
89. Morone, N. *et al.* Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* **174**, 851–862 (2006).
90. Maninová, M. & Vomastek, T. Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts. *FEBS J.* **283**, 3676–3693 (2016).
91. Fritzsche, M. *et al.* Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics. *Nat. Commun.* **8**, 17–19 (2017).
92. Kusumi, A., Suzuki, K. G. N., Kasai, R. S., Ritchie, K. & Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 604–615 (2011).
93. Kasas, S. *et al.* Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motil. Cytoskeleton* **62**, 124–132 (2005).
94. Kasas, S., C. Roduit, F. Lafont, and S. C. Stiffness tomography by atomic force microscopy. (2007).
95. Roduit, C. *et al.* Stiffness tomography by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **97**, 674–677 (2009).
96. Radotić, K. *et al.* Atomic force microscopy stiffness tomography on living arabidopsis thaliana cells reveals the mechanical properties of surface and deep cell-wall layers during growth. *Biophys. J.* **103**, 386–394 (2012).
97. Longo, G. *et al.* Antibiotic-induced modifications of the stiffness of bacterial membranes. *J. Microbiol. Methods* **93**, 80–84 (2013).
98. Kasas, S., Longo, G. & Dietler, G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46**, (2013).
99. Dague, E. *et al.* Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **74**, 162–172 (2014).
100. Tang, G., Galluzzi, M., Zhang, B., Shen, Y.-L. & Stadler, F. J. Biomechanical Heterogeneity of Living Cells: Comparison between Atomic Force Microscopy and Finite Element Simulation. *Langmuir* acs.langmuir.8b02211 (2018). doi:10.1021/acs.langmuir.8b02211
101. Galluzzi, M. *et al.* Atomic force microscopy methodology and AFMech Suite software for nanomechanics on heterogeneous soft materials. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
102. Galluzzi, M., Schulte, C., Milani, P. & Podestà, A. Imidazolium-Based Ionic Liquids Affect Morphology and Rigidity of Living Cells: an Atomic Force Microscopy Study. (2018).

doi:10.26434/chemrxiv.6216383.v1

103. Gavara, N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc. Res. Tech.* **80**, 75–84 (2017).

## Capítulo 5

# **Biomedicina y Biomateriales I: Regeneración neural mediada por espumas de óxido de grafeno reducido en médula espinal de ratas con hemisección cervical crónica**

### 5.0. Introducción

Uno de los grandes retos actuales de la medicina son las enfermedades del sistema nervioso central, y en particular, las lesiones de la médula espinal. El funcionamiento, tanto a nivel celular como tisular del sistema nervioso central, está afectado por las propiedades mecánicas del entorno que les rodea. Esto ha sido probado en diversos trabajos que demuestran hechos como que la dureza del substrato influye en la diferenciación de células madre neurales<sup>1</sup>, que los astrocitos de la médula espinal adaptan su morfología a las propiedades mecánicas del substrato<sup>2</sup>, o que las neuritas de las neuronas del ganglio espinal crecen más en sustratos más rígidos<sup>3</sup>.

Las cicatrices producidas en el sistema nervioso central, constituido por el encéfalo (contenido en el cráneo) y la médula espinal (conectada al encéfalo y protegida por la columna vertebral) están principalmente formadas por células gliales (encargadas de la mielinización, el mantenimiento de la homeostasis, y de funciones auxiliares complementando las neuronas, como es su protección y soporte), células no neuronales como pericitos y células fibromeningeas<sup>4</sup>, componentes de la matriz extracelular y colágeno. La gran singularidad que presentan las cicatrices del sistema nervioso radica en sus propiedades mecánicas.

Usualmente, las cicatrices en otros tipos de tejidos tienden a endurecerlo después del daño producido. En cambio, para zonas del sistema nervioso como el neocórtex o la medula espinal, el tejido reacciona disminuyendo su dureza o ablandándose. Este comportamiento ha sido recientemente demostrado por Moeendarbary et al. en un trabajo basado en medidas de AFM<sup>5</sup>, en el que se hipotetiza que la pobre habilidad regenerativa del sistema nervioso central lesionado pueda estar relacionada con cambios en las propiedades mecánicas en el área cercana a la lesión.

Uno de los grandes referentes en la ciencia de materiales es sin duda alguna el grafeno, motivo del Premio Nobel de Física de 2010 concedido a los investigadores Andre Geim y Konstantin Novoselov (*University of Manchester*), gracias a los innovadores experimentos que realizaron en relación al aislamiento y caracterización de este extraordinario material bidimensional<sup>6</sup>. Park et al. en 2011 dieron las primeras muestras de la posibilidad de combinar materiales basados en grafeno con elementos neurales estimulando la diferenciación de progenitores neurales hacia neuronas<sup>7</sup>. A partir de ese momento han sido diversos los estudios que han probado la utilidad del grafeno como material con capacidad para promover el crecimiento y la diferenciación neural, haciendo más y más real la idea de usar este tipo de aproximaciones para reparación neural<sup>8</sup>. Materiales basados en grafeno han sido utilizados, entre otros estudios, para potenciar la germinación y extensión de neuritas<sup>9</sup>, para estimular señales eléctricas en redes neuronales<sup>10</sup>, para incrementar la actividad neuronal modulando la distribución de iones extracelulares<sup>11</sup>, para reorganizar el funcionamiento de la sinapsis neuronal<sup>12</sup> y para estimular la diferenciación neuronal desde células progenitoras tanto neurales como no neurales<sup>7,8,13</sup>. También, se ha demostrado que nanoláminas de grafeno se comportan como un material permisivo para la neurogénesis cuando se encuentran implantadas en el bulbo olfatorio<sup>14</sup>. En experimentos con estructuras tridimensionales compuestas en parte por rGO (por sus siglas en inglés: “*reduced graphine oxide*”, **óxido de grafeno reducido**) se ha observado una respuesta reparadora positiva al ser implantadas en el tejido nervioso periférico<sup>15</sup>.

Dos de los aspectos más relevantes en relación al uso de biomateriales como implantes es su toxicidad y biodegradabilidad. Aunque para los materiales basados en grafeno aún no hay una respuesta clara en cuanto a la toxicidad<sup>16</sup>, parece que hay un rango de tamaños y concentraciones que pueden resultar en una utilización segura<sup>17</sup>. Por otro lado, en cuanto a la biodegradabilidad diversos estudios están empezando a mostrar signos positivos de degradación de este tipo de materiales basados en carbono<sup>18-20</sup>.

Actualmente, los tratamientos para las **lesiones de la médula espinal** (SCI, por sus siglas en inglés: “*Spinal Cord Injury*”) representan un gran reto, tanto para clínicos como para científicos, debido a la inexistencia de una terapia efectiva a día de hoy. Aproximadamente, un 66 % de este tipo de lesiones en personas se producen en la zona cervical y un 70 % de ellas son incompletas<sup>21</sup>. Trabajos recientes, abarcando distintas disciplinas de la ciencia, están proporcionando resultados esperanzadores en cuanto a la recuperación de funciones después de una SCI<sup>22-25</sup>. Estos trabajos están basados en la utilización de materiales y biomateriales tan dispares como polímeros orgánicos<sup>26,27</sup>, macromoléculas<sup>28</sup> o nanotubos de carbono<sup>29,30</sup>. En concreto, M. C. Serrano et al. han iniciado la exploración de 3D rGO “*scaffolds*” como una plataforma avanzada para la reparación de la médula espinal dañada<sup>31,32</sup>.

En el trabajo que vamos a exponer, a continuación, demostraremos las ventajas regenerativas aportadas por espumas tridimensionales porosas de rGO en la respuesta tisular de ratas con una hemisección crónica de la médula espinal (4 meses). Utilizaremos el AFM como

herramienta de espectroscopía nanomecánica de fuerzas para llevar a cabo el estudio de los cambios que ha podido producir el implante sobre las propiedades mecánicas del tejido de la médula espinal. Se eligió la espuma de rGO por su similitud mecánica con los valores de módulo de elasticidad mostrados por los distintos componentes de los tejidos neurales nativos<sup>33</sup>, y de esta forma, pudiéndose utilizar como matriz o estructura mecánica para la regeneración del tejido. Este trabajo se desarrolló como parte de un proyecto multidisciplinar, complementado por distintos enfoques experimentales en colaboración con: Grupo de Materiales para la Salud (ICMM-CSIC, IP: Dra. María Concepción Serrano) y Laboratorio de Interfaces para Regeneración Neural (Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM, IP: Dra. Elisa López). Junto a las medidas de AFM, se realizaron estudios de comportamiento, imágenes de resonancia magnética, técnicas de histología estándar, estudios de inmunofluorescencia, microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión y barrido.

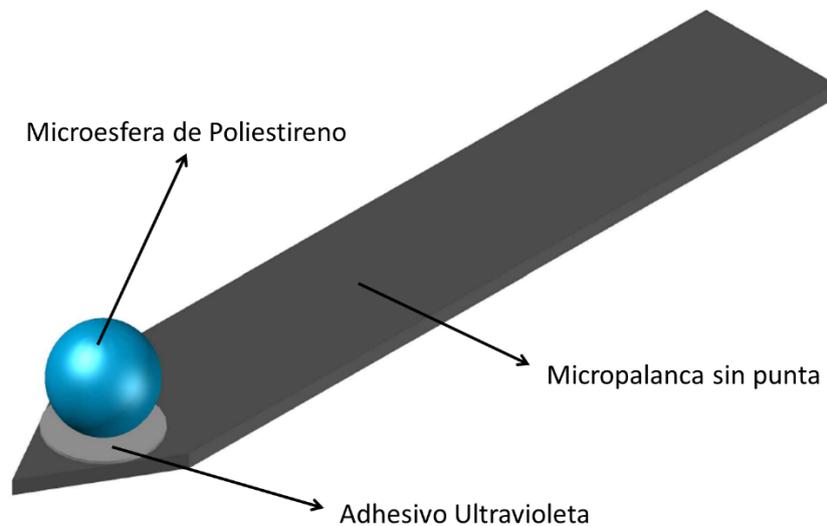
Centrándonos en el estudio mecánico realizado en este proyecto, se deben mencionar los distintos experimentos que se realizaron. Primero de todo, se estudiaron por separado cada uno de los elementos que se ven envueltos en este tipo de implantes: rGO “scaffolds”, tejido de médula espinal de rata sana (distinguiendo entre sustancia blanca y gris) y células progenitoras neurales de embriones de rata (E18, embrión de 18 días). Posteriormente, se analizó el tejido de una médula espinal lesionada de rata (hemisección en C6), siendo posible distinguir distintas zonas del tejido mediante medidas de una propiedad mecánica específica, como es el módulo de Young ( $E$ ).

## 5.2. Métodos experimentales

### – 5.2.1. Fabricación de puntas esféricas de gran diámetro para aplicaciones biológicas con AFM

El principal problema al cual nos enfrentamos cuando queremos medir propiedades mecánicas de un tejido biológico es el alto grado de heterogeneidad que éste posee. Comúnmente, los tejidos biológicos están compuestos por una gran diversidad de elementos. En el caso concreto del tejido de médula espinal se estructura en dos zonas: sustancia blanca (WM, por sus siglas en inglés “White Matter”) y sustancia gris (GM, por sus siglas en inglés: “Grey Matter”). La GM está compuesta principalmente por neuronas, células gliales, el neuropilo (región formada por dendritas y terminales axónicas que se encuentra entre distintos somas neuronales) y vasos sanguíneos. En cambio, la WM está compuesta por un notable menor número de cuerpos celulares (somas) y una mayor densidad de axones mielinizados formando tractos o vías. Este alto grado de diversidad y heterogeneidad conforma un factor crucial a la hora de estudiar las propiedades mecánicas de estos tejidos como un único ente conjunto.

Para solventar este problema, se optó por hacer una media de todas las respuestas mecánicas presentes de forma indirecta. Se decidió fabricar puntas de AFM<sup>34-36</sup>, las cuales se usarían como indentador, con una alta área de contacto. De esta forma, estudiaremos de forma combinada todas las repuestas internas del tejido, sin tener que preocuparnos del rol o aportación de cada uno de los elementos de forma independiente.



**Figura 5.2.** Representación esquemática de la configuración que se pretende fabricar para la realización de medidas de propiedades mecánicas de tejidos biológicos con alta heterogeneidad por técnicas basadas en el microscopio de fuerzas atómicas.

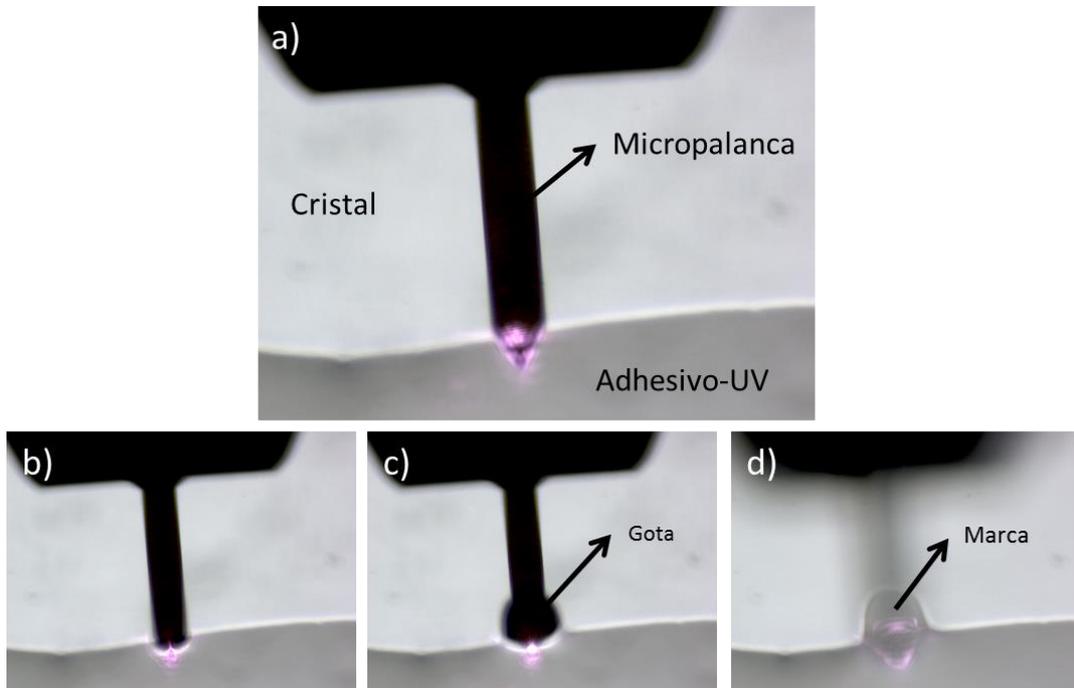
La geometría esférica fue la escogida para amplificar el área de contacto. Decidimos adherir a una micropalanca comercial de AFM (ARROW TL1 Au, NanoWorld Arrow™, constante de fuerzas nominal:  $k = 0.03 \text{ N/m}$ ) una microesfera de poliestireno (PS-R de microParticles GmbH, Germany) de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro, que haría sus veces de punta. Para el pegado de ambas componentes se utilizó un adhesivo de curación por luz ultravioleta (Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, Germany) siguiendo un procedimiento sujeto a la inmersión de los componentes en medio acuoso. Ver figura 5.2 para poder observar una imagen ilustrativa de la configuración buscada para el indentador.

### **Protocolo**

A continuación, se detalla el protocolo seguido para fabricar este tipo de indentadores, paso a paso:

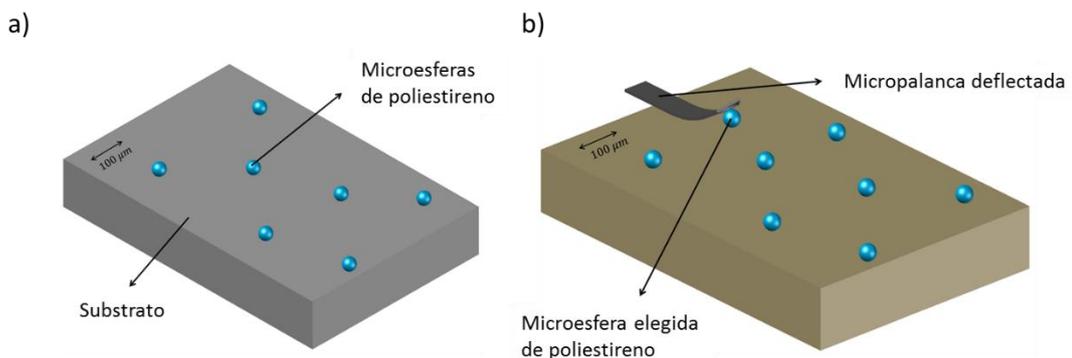
1. **Limpieza del material a utilizar.** Para empezar, procederemos a limpiar unos cubreobjetos de vidrio con agua destilada, isopropanol y etanol. Primero enjuagaremos los cubreobjetos en agua destilada, para posteriormente, sumergirlos durante 5 min en ambos líquidos orgánicos secuencialmente (primero isopropanol y después en etanol).
2. **Preparación del pegamento de curación UV.** Una vez limpios los cubreobjetos, colocaremos una pequeña cantidad de pegamento en forma de línea sobre ellos con la ayuda de una aguja o filamento delgado.
3. **“Mojar la pluma”.** En este paso pondremos una gota de pegamento en la zona final de la micropalanca (área con forma de flecha). Todo el proceso lo realizaremos con ayuda del soporte y los motores de un JPK AFM. Con ayuda del sistema de alineado del JPK, nos moveremos en los ejes X e Y, hasta que posicionemos la micropalanca sobre la línea de pegamento. A continuación, usaremos los motores del eje Z del microscopio para acercarnos paulatinamente a la muestra en pasos de  $10 \mu\text{m}$ . Una vez contactamos con el pegamento, sumergiremos levemente la punta en él durante un breve periodo de tiempo

(alrededor de 1 s). Tras el cual retraeremos la punta. Después de haber retraído la punta quedará una pequeña gota de pegamento en la parte inferior de la micropalanca, tal y como se observa en la figura 5.3.



**Figura 5.3.** Imágenes de microscopía óptica del proceso de creación de la gota de pegamento de curación ultravioleta en el extremo de la micropalanca. a) Configuración inicial del sistema. b) Aproximación de la micropalanca a la zona con pegamento. c) La micropalanca toma contacto y “moja” la punta en el adhesivo. d) Marca dejada en la línea de pegamento después de haber formado la gota de pegamento en el extremo del micropalanca.

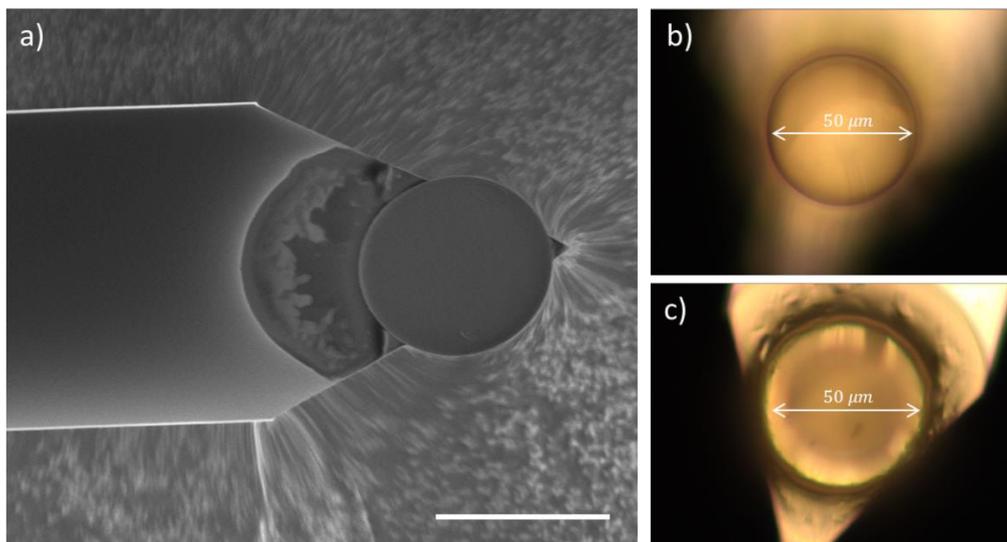
4. **Preparación de la solución de microesferas.** Mezclaremos 1  $\mu\text{L}$  de la solución comercial de microesferas de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro con 2 mL de agua destilada (1:2000). En este entorno, las partículas yacen sobre el substrato sin adherirse al mismo (figura 5.4.a). Una baja concentración de partículas nos permitirá a posteriori capturar una única microesfera sin que haya interferencia de las colindantes.



**Figura 5.4.** Esquema del proceso de alineamiento de la micropalanca en la solución de microesferas decantadas sobre el substrato. a) Microesferas dispersas sobre la base del recipiente contenedor de la solución. b) Micropalanca alineada sobre la esfera escogida. La deflexión de la micropalanca muestra el contacto entre ambas componentes, habiéndose iniciado por tanto el proceso de adhesión de la partícula.

5. **Alineamiento micropalanca -microesfera.** Al igual que se realizó en el paso 3, alinearemos la micropalanca (con la gota de pegamento ya adherida) sobre la microesfera escogida. En este caso, el acercamiento lo haremos con pasos de  $5\ \mu\text{m}$  hasta que alcancemos el contacto entre las partes (figura 5.4.b). Para detectar el contacto usaremos el sistema laser-fotodiodo del AFM. Una vez el contacto está hecho, podemos modificar y corregir pequeños errores en la colocación de la microesfera moviendo la muestra en las direcciones X e Y (proceso asistido por el soporte del JPK. Una vez hayamos alcanzado la posición deseada, pararemos de ejercer presión sobre la microesfera y procederemos a mover la micropalanca hacia arriba. Finalmente, la micropalanca con la microesfera adherida es extraído de la solución.
6. **Curación del adhesivo ultravioleta.** Con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (UVGL-25 con longitud de onda de 254 nm y 365 nm; VWR, Darmstad, Germany) expondremos la micropalanca a una radiación de 254 nm de longitud de onda durante 15-20 minutos, todo a ello a una distancia aproximada de 5 cm entre la lámpara y el pegamento que vamos curar.

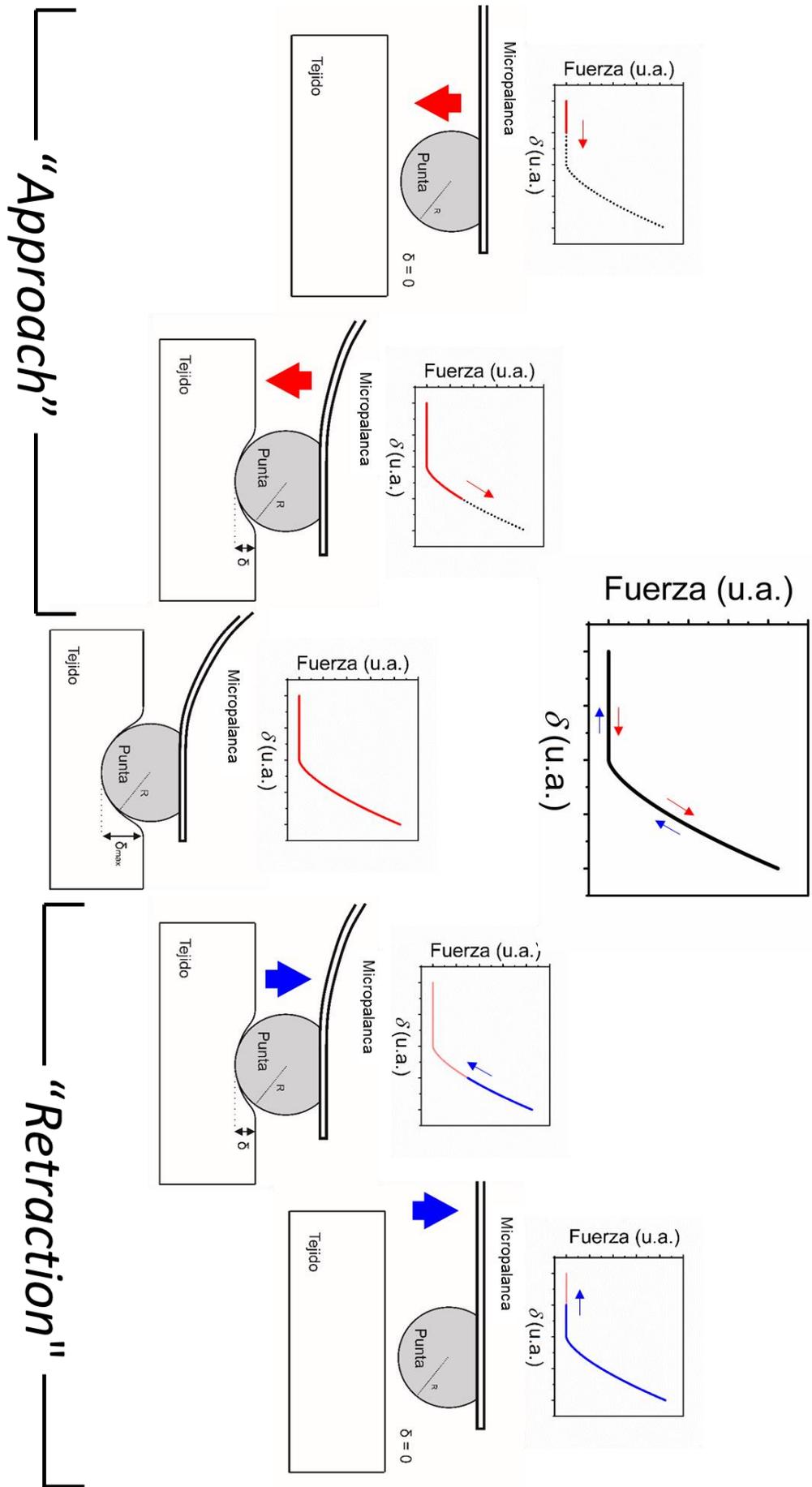
En la figura 5.5 es posible observar algunas imágenes tanto ópticas como de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las puntas de AFM resultantes después de haber seguido todo el procedimiento previamente descrito.



**Figura 5.5.** Imágenes de las puntas obtenidas mediante el protocolo de fabricación de puntas de AFM para la medida de tejidos biológicos. a) Imagen SEM. Escala:  $50\ \mu\text{m}$ . b) y c) Imágenes ópticas a diferentes distancias focales de las mencionadas puntas de AFM.

### – 5.2.2. Microscopía de fuerzas atómicas y espectroscopía de fuerzas.

El procedimiento experimental seguido durante las medidas que se exponen en este capítulo ha estado principalmente basado en las curvas de fuerza-distancia (protocolo ya descrito en el capítulo 1 de esta tesis doctoral).



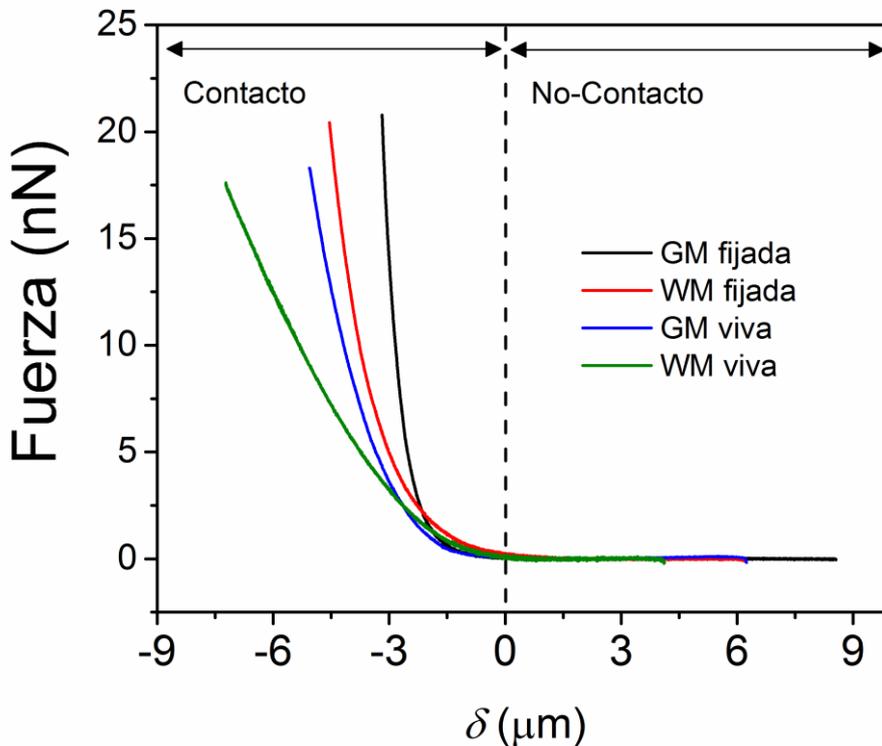
**Figura 5. 6.** Esquema de un experimento típico de curvas de fuerza-distancia. Los colores azules y rojos sirven como indicadores de las dos distintas partes de la curva: rojo para la ida (acercamiento) y azul para la vuelta (alejamiento).

Resumiendo lo ya introducido previamente, la curva de fuerzas tiene dos secciones, aproximación y retracción (proceso expuesto en la figura 5.6). En el acercamiento, la micropalanca se mueve hacia la muestra y la indenta hasta que alcanza una fuerza dada (pasos 1 a 3). En la segunda parte de la curva de fuerzas, la punta se aleja de la muestra (pasos 4 a 5) recorriendo el mismo camino en sentido inverso. La principal diferencia entre una curva de fuerza-distancia realizada sobre células y sobre tejidos radica en dos parámetros experimentales. Primero, la fuerza aplicada deberá ser mayor, ya que al usar puntas esféricas de amplia área de contacto necesitaremos aumentar dicha fuerza para observar penetraciones del orden de varias micras sobre el tejido biológico (al igual que realizábamos en células). Y segundo, la longitud a recorrer por el piezo en el eje Z es mayor, llegando a valores de 10-15  $\mu\text{m}$ . Esto es consecuencia directa de la mayor heterogeneidad que presentan los tejidos respecto a las células y la necesidad de determinar dos de las magnitudes necesarias para el correcto ajuste de los modelos teóricos: el punto de contacto y el “*baseline*”. Al incrementar el movimiento en el eje Z incrementaremos la longitud del “*baseline*” de la curva de fuerza-distancia, proveyéndonos de un mayor rango donde aplicar el software de detección del punto de contacto y permitiéndonos determinarlo de forma más precisa.

Las medidas de AFM que se discutirán a continuación fueron llevadas a cabo mediante la utilización de un instrumento comercial, JPK Nanowizard 3 (JPK Instruments AG, Berlin, Alemania), montado sobre un microscopio invertido del tipo Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Dependiendo del tipo de muestra (célula o tejido), se usó una clase de punta u otra. Para las medidas de los cortes de espina dorsal, hemos utilizado las puntas fabricadas en nuestro grupo específicamente para tejidos biológicos (proceso descrito en el anterior subapartado: 5.2.1), caracterizadas por una micropalanca sin punta con una constante de fuerzas de  $0.07 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , una frecuencia de resonancia de 6 kHz, y una microesfera de poliestireno de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro adherida al extremo. Para las medidas en neuronas (progenitores neurales embrionarios, proporcionado por el *Hospital Nacional de Paraplégicos*, Toledo, España), hemos usado una micropalanca comercial caracterizado por una constante de fuerzas de  $0.08 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , una frecuencia de resonancia de 17 kHz y una punta esférica de 6.62  $\mu\text{m}$  de diámetro (CP-PNPL-SiO-C, sQube, Bickenbach, Alemania). La determinación de la constante de fuerzas de las micropalancas fue realizada previamente a cada experimento. El método de calibración utilizado fue el basado en el ruido térmico (más detalles en el capítulo 1 de esta tesis doctoral), el cual se encuentra implementado en el software de nuestro AFM, JPK Nanowizard 3.

Las curvas de fuerza-distancia fueron obtenidas con el fin de determinar el módulo de Young de los tejidos de la médula espinal, rGO “*scaffolds*” y neuronas. La distancia punta-muestra fue modulada aplicando una señal tipo onda triangular, consecuente con una velocidad constante en la aplicación de las curvas de fuerza-distancia. Para los tejidos, la velocidad de modulación fue de 5  $\mu\text{m}/\text{s}$  (frecuencia de 0.33 Hz) y la máxima fuerza aplicada fue de 20 nN. En la figura 5.7 incluimos algunos ejemplos de las curvas de fuerza-distancia obtenidas aplicando la metodología previamente descrita. Los datos y resultados que mostraremos posteriormente estarán referidos o representarán un valor medio entre tres tejidos distintos de médula espinal. En cada una de estas muestras se han realizado 100 curvas de fuerza-distancia distintas por región o área objeto de estudio. Para los experimentos con neuronas, la velocidad escogida fue también de 5  $\mu\text{m}/\text{s}$  (frecuencia de 1 Hz) y la máxima fuerza aplicada fue de 3 nN. En este segundo caso, hemos evaluado 20 células diferentes realizando 126 curvas de fuerza-distancia en una región rectangular de la zona del soma, o cuerpo de la célula, para cada

neurona. La punta ha recorrido para cada una de ellas áreas de en torno a  $10 \mu\text{m}^2$  en la zona mencionada.



**Figura 5.7.** Curvas de fuerza-distancia en tejido de médula espinal. La punta de AFM es aproximada a la muestra hasta alcanzar una fuerza de 20 nN. Esta figura muestra como la máxima indentación depende de la muestra, reflejando cómo el módulo de Young depende del tipo de tejido estudiado, ya que el sistema micropalanca-punta es exactamente el mismo para todos los casos. Para el tejido de médula espinal fijado, la sustancia gris es penetrada alrededor de  $3 \mu\text{m}$  y la sustancia blanca  $4.5 \mu\text{m}$ . El tejido de médula espinal vivo muestra un comportamiento más blando. La máxima indentación llega a valores de  $5 \mu\text{m}$  (sustancia gris) y  $7.5 \mu\text{m}$  (sustancia blanca).

Para la obtención explícita del módulo de elasticidad o módulo de Young se ajustaron las curvas obtenidas a un modelo puramente elástico de tipo hertziano. En concreto, el ajuste se realizó en la parte repulsiva de la curva de fuerzas sin obviar la corrección o extensión del modelo debido a efectos del sustrato (previamente introducido en el capítulo 2 de esta tesis).

### – 5.2.3. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en la plataforma de OriginPro 2016 (OriginLab) y SPSS v25 (IBM SPSS Statistics). Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. En los gráficos con formato “box plot”, la línea y el cuadrado que se encuentran dentro de la caja representan la mediana y la media de la población, respectivamente. La parte superior e inferior de la caja corresponden con los percentiles 25 y 75 (también conocidos como cuartil Q1 y Q3), respectivamente. Los “bigotes” fuera de la caja

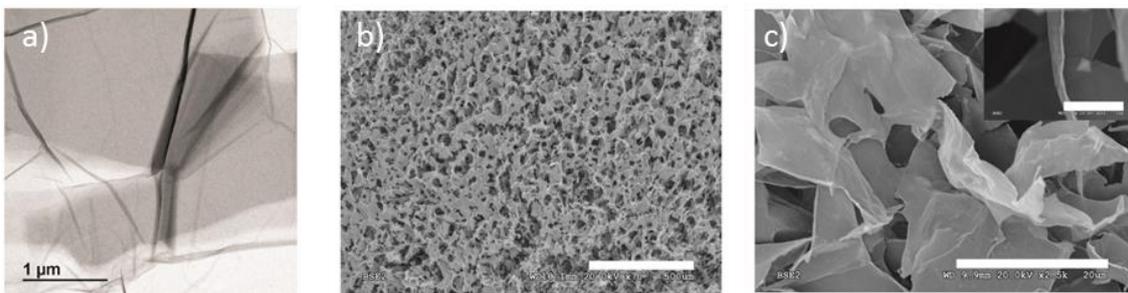
denotan el rango en el cual se encuentran los datos atípicos. Estos valores se extienden entre dos extremos definidos por 1.5 veces el rango intercuartílico (RIC):  $Q1 - 1.5 \text{ RIC}$  y  $Q3 + 1.5 \text{ RIC}$ .

Para probar las diferencias estadísticas significativas entre distintos grupos hemos usado un algoritmo de análisis de la varianza de una vía: “*one-way*” ANOVA; seguido de un tratamiento “*post-hoc*” tipo Games-Howell. La elección del estadístico de Games-Howell se debió al resultado sobre la homogeneidad de las varianzas proporcionado por el test de Levene, siendo en este caso heterogénea<sup>37</sup>. En todos nuestros análisis estadísticos hemos seguido el mismo criterio, considerando estadísticamente significativos valores de  $p < 0.05$ . Las tablas que recogen todas las estadísticas comparativas realizadas en este trabajo pueden ser encontradas en el apéndice A.4.1.

## 5.3. Resultados y discusión

- 5.3.1. Caracterización mecánica de los rGO “*scaffolds*” y su comparación con el tejido de médula espinal y neuronas corticales individuales

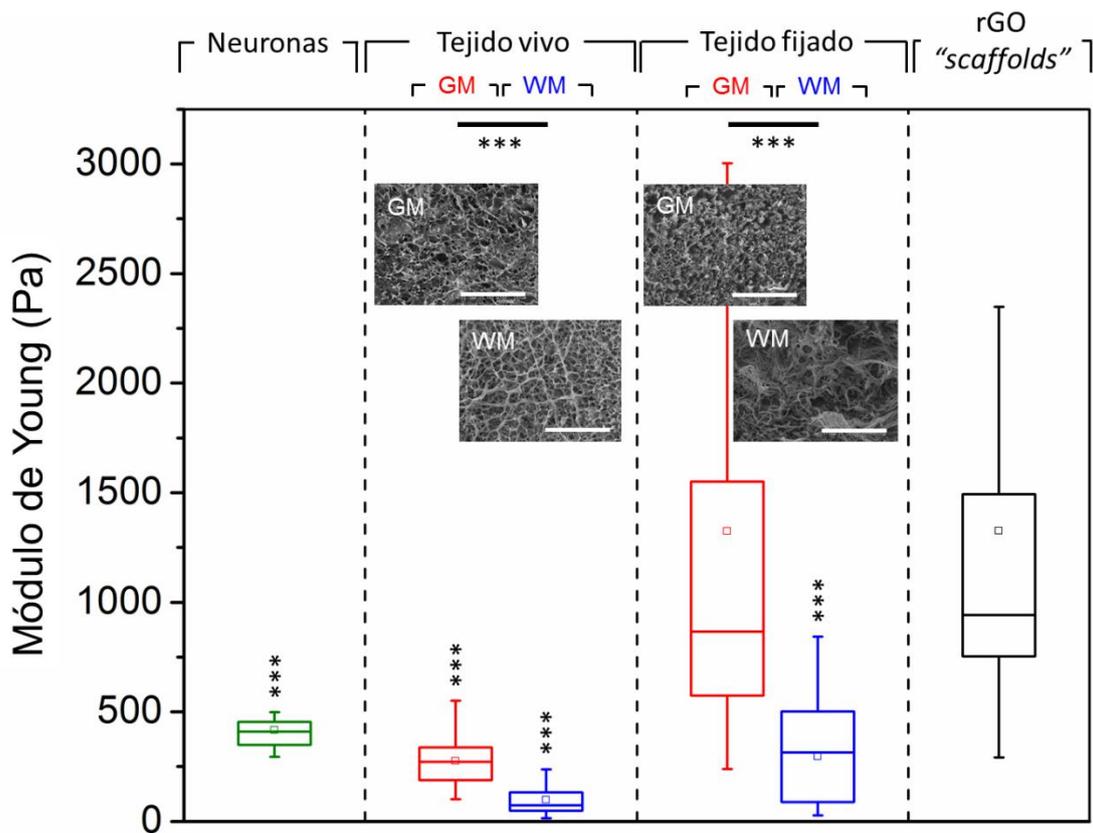
Los implantes basados en rGO que utilizaremos como estructura 3D para favorecer la regeneración del tejido nervioso requieren un proceso de fabricación específico a partir de una solución acuosa de GO (óxido de grafeno, por sus siglas en inglés: “*Graphene Oxide*”), a una concentración comprendida entre 5 y 10 mg·mL<sup>-1</sup>.



**Figura 5.8.** a) Imagen de TEM representativa de láminas de GO. b) y c) Caracterización morfológica por SEM de las espumas 3D de rGO. Escalas: b) 500  $\mu\text{m}$ ; c) 20  $\mu\text{m}$ , y 5  $\mu\text{m}$  para el inserto. Resultados experimentales como parte de la colaboración con el grupo de M. C. Serrano (ICMM, CSIC).

El GO se encuentra formando láminas micrométricas con varias capas apiladas (figura 5.8.a). Mediante un procedimiento de ensamblado por congelación (más detalles en las publicaciones<sup>31,32</sup>), se consigue el ensamblado de láminas de rGO en una estructura tridimensional blanda con porosidad aleatoria. Para más detalles morfológicos sobre estos rGO “*scaffolds*”, observar las imágenes obtenidas por SEM en la figura 5.8.b y 5.8.c. El material resultante está caracterizado por un alto índice de porosidad ( $48.9 \pm 3.5$  % de porosidad y  $31.9 \pm 19.4$   $\mu\text{m}$  de tamaño medio de poro), permitiendo de esta forma la adecuada infiltración de células y proteínas de matriz extracelular una vez implantado. La respuesta mecánica de los rGO “*scaffolds*” fue caracterizada mediante experimentos de indentación llevados a cabo con un AFM, y finalmente obteniendo su módulo de Young ( $E$ ). La rigidez macroscópica de este tipo de material fue confirmada obteniendo valores de  $1326 \pm 1004$  Pa (figura 5.9).

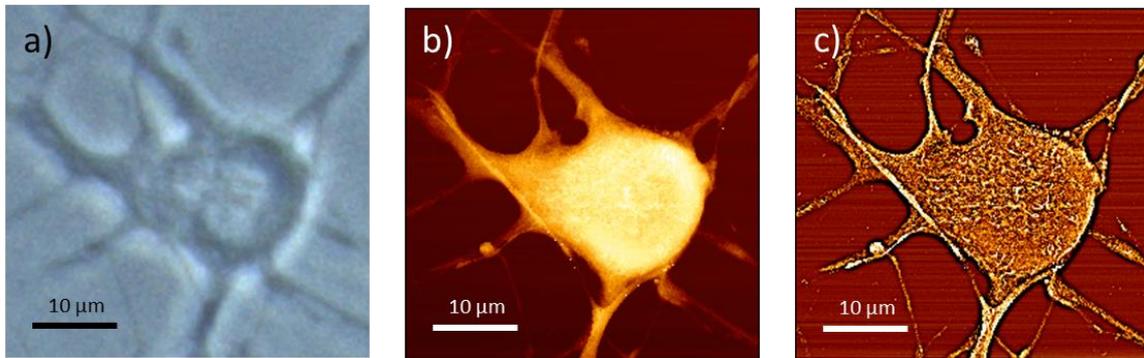
Estas espumas de rGO son significativamente más blandas (valor de módulo de elasticidad) que la mayoría de los implantes basados en biomateriales que a día de hoy se están explorando en la médula espinal lesionada. Algunos ejemplos de implantes en estudio son los hidrogeles de metacrilato porosos ( $E \sim 3 - 12 \text{ kPa}$ )<sup>38</sup>, hidrogeles de metacrilato superporosos con colesterol ( $E \sim 10 - 20 \text{ kPa}$ )<sup>39</sup>, estructuras de metacrilato funcionalizadas con proteínas ( $E \sim 177 - 311 \text{ kPa}$ )<sup>40</sup>, estructuras porosas ordenadas basadas en policaprolactona ( $E \sim 2 - 180 \text{ MPa}$ )<sup>41</sup> y combinaciones de policaprolactona con gomas Gellan ( $E \sim 4 - 62 \text{ MPa}$ )<sup>42</sup>. Aunque la mayoría de estos materiales presentan una respuesta regenerativa favorable, como puede ser el crecimiento de axones en la médula espinal lesionada, no existen datos publicados relacionados con los posibles problemas que podría causar la disparidad mecánica con el tejido neural.



**Figura 5.9.** Caracterización nanomecánica del tejido de médula espinal (GM y WM), células neurales y rGO "scaffolds" mediante medidas de AFM (expresado como módulo de Young). Imágenes de SEM de tejido vivo y fijado tanto para las zonas de GM como de WM. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . Los asteriscos horizontales indican comparaciones entre grupos indicados. Las comparativas que se encuentran expresadas con asterisco en disposición vertical hacen referencia a la significación estadística con respecto a los resultados obtenidos para el rGO "scaffold". La significación estadística está representada por  $p < 0.001$ \*\*\*.

Las propiedades mecánicas del entorno son reguladores esenciales de la respuesta biológica. De esta forma, como ya pudimos ver en capítulos anteriores de esta tesis, diferentes células y tejidos están caracterizados por un rango específico de  $E$ , convirtiendo la elasticidad en un requisito indispensable en ingeniería de tejidos. En la figura 5.10 se puede observar una serie de imágenes morfológicas por AFM de neuronas corticales cultivadas *in vitro* obtenidas con la técnica desarrollada en el capítulo 4 de esta tesis doctoral. Para este tipo de neuronas medimos un valor  $E = 417 \pm 106 \text{ Pa}$  ( $p < 0.001$  respecto al resultado obtenido para el rGO

“scaffold”), ver figura 5.9. Este comportamiento es aproximadamente tres veces más rígido que el del tejido fresco de médula espinal, teniendo en cuenta contribuciones tanto por parte de sustancia blanca ( $97 \pm 69$  Pa;  $p < 0.001$ ) como de sustancia gris ( $275 \pm 99$  Pa;  $p < 0.001$ ). Los resultados obtenidos para médula espinal se encuentran en consonancia con los descritos en la bibliografía. Por ejemplo, Moeendarbary et al. mostraron valores para la médula espinal de 177 y 420 Pa (relativos a sustancia blanca y gris, respectivamente) y para tejido de corteza cerebral de rata de entre 50 y 500 Pa<sup>5</sup>.



**Figura 5.10.** Análisis topográfico de las neuronas cultivadas *in vitro*. a) Imagen óptica de una neurona. b) Imagen topográfica estándar obtenida por AFM, mostrando la morfología de la célula. Set-point fijado en 1 nN. c) Imagen topográfica tratada con un filtro basado en la transformada de Fourier para bajas frecuencias espaciales (“pseudotopografía”).

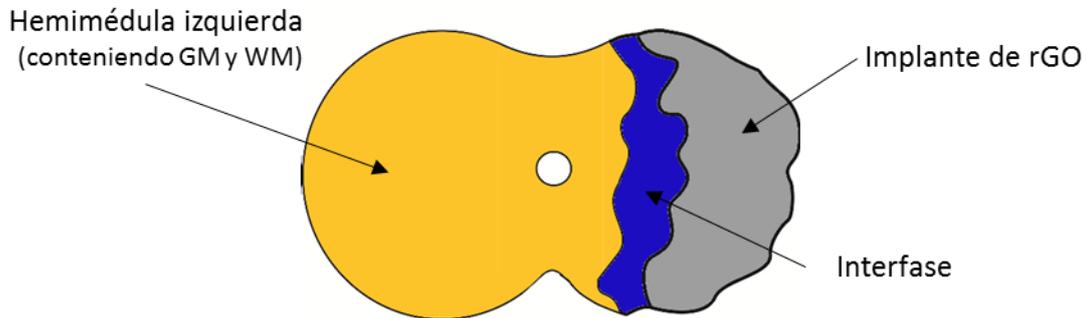
Para una comparativa más acertada de los datos presentados, es importante destacar que el sustrato ejerce un efecto significativo en las propiedades mecánicas de las muestras. Específicamente, las neuronas corticales medidas en estos estudios se han cultivado sobre cubreobjetos de vidrio, un material sustancialmente más duro que el tejido de la médula espinal. Este efecto relacionado con la dureza del sustrato de cultivo ha sido reportado con anterioridad, normalmente implicando consecuencias en la morfología celular y en la estructura del citoesqueleto<sup>43-47</sup>.

Finalmente, se estudiaron las propiedades mecánicas obtenidas del tejido de la médula espinal fijado con formaldehído. Como se espera de tejidos fijados<sup>48,49</sup>, los valores de elasticidad medidos en ambas zonas, blanca y gris, son significativamente mayores que los obtenidos para su equivalente fresco ( $296 \pm 221$  y  $1324 \pm 1202$  Pa, respectivamente;  $p < 0.001$ ). No obstante, cabe destacar que los valores de  $E$  de áreas de sustancia gris en tejidos fijados son muy semejantes a los valores medidos para los rGO “scaffolds” ( $p > 0.999$ ). La naturaleza más blanda de la sustancia blanca (WM), hecho observado a lo largo de todos nuestros experimentos, independientemente si el tejido está fijado o vivo, ha sido relacionada con un contenido más elevado de mielina y otros componentes de tipo lipídico<sup>5</sup>.

### – 5.3.2. Estudio del efecto del implante de rGO “scaffolds” sobre la respuesta mecánica del tejido de la médula espinal lesionada

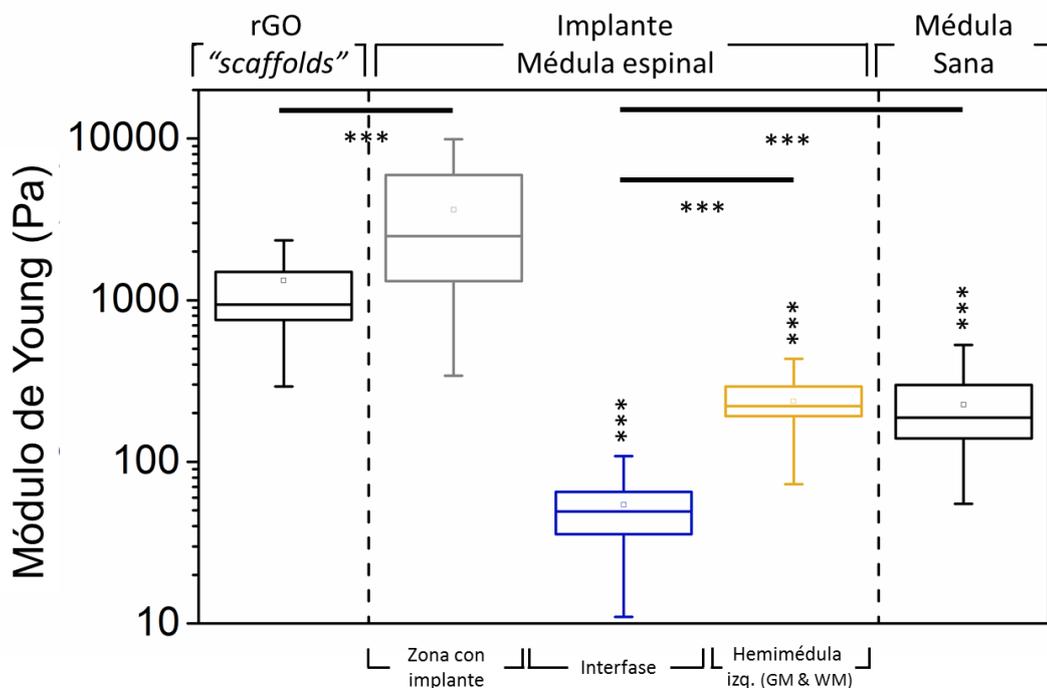
Con la finalidad de promover la regeneración neural en la medula espinal lesionada, se realizaron implantes basados en rGO “scaffolds”. La caracterización mecánica de estos implantes y su repercusión en la hemimédula izquierda fue medida mediante curvas de fuerza-distancia a los 4 meses de implantación. En la figura 5.11 se muestra un esquema del sistema experimental que estudiaremos, pudiéndose observar las diferentes regiones o áreas que se

intentarán diferenciar mediante sus propiedades mecánicas: hemimédula izquierda (zona no dañada o "left hemicord"), interfase e implante de rGO.



**Figura 5.11.** Esquema de las principales regiones objeto de estudio en el sistema compuesto por tejido de médula espinal con un implante basado en rGO.

La figura 5.12 recoge todos los valores de elasticidad medidos en este sistema experimental. Comenzando por la zona denominada como interfase, la cual corresponde a la zona lesionada colindante o más cercana al implante, el tejido muestra un significativo decaimiento del módulo de elasticidad ( $54 \pm 29$  Pa;  $p < 0.001$ ). Esto es un resultado esperado, ya que en trabajos previos se ha demostrado una disminución de la rigidez del tejido neural tras la lesión<sup>5</sup>. No obstante, la zona de la lesión ocupada por el implante muestra un valor de módulo de Young más elevado ( $3624 \pm 2664$  Pa;  $p < 0.001$ ), incluso mayor que el obtenido para los rGO "scaffolds" antes de la implantación ( $1326 \pm 1004$  Pa). La causa más plausible para este fenómeno es la deposición de colágeno y otras proteínas de matriz extracelular, y la infiltración masiva de células dentro de la espuma. Hecho que comentaremos más en detalle en la próxima sección de resultados.



**Figura 5.12.** Caracterización nanomecánica de implantes de rGO en médula espinal a 4 meses:  $p < 0.001$ \*\*\*. Los asteriscos horizontales indican comparaciones entre grupos indicados, los asteriscos verticales se refieren a comparaciones con los rGO "scaffolds".

Otro resultado a destacar es que las modificaciones mecánicas detectadas en la hemimédula derecha y la interfase no se propagan a la hemimédula izquierda, ya que para esta segunda región hemos encontrado valores de  $237 \pm 66$  Pa, muy similares a los obtenidos para la sustancia gris y blanca en tejidos de médula espinal fresca sana ( $225 \pm 109$ ;  $p = 0.366$  en el análisis estadístico comparativo con los datos obtenidos para la médula sana).

### – 5.3.3. Caracterización de la regeneración neural más allá de las propiedades mecánicas

El trabajo de caracterización mecánica que desarrollamos en este capítulo de la tesis corresponde con una parte de un proyecto multidisciplinar que se llevó a cabo en colaboración con los ya mencionados grupos de investigación. Cada uno de estos grupos enfocó el problema desde perspectivas distintas intentando aportar información relevante con respecto a la capacidad regenerativa de estos implantes basados en rGO “*scaffolds*”. A continuación, describiré de manera resumida las distintas técnicas y estudios que se realizaron a la hora de caracterizar tanto el alcance de las lesiones como la posterior capacidad regenerativa de los implantes. Para más detalles consultar la publicación<sup>50</sup>.

Para el análisis químico de los rGO “*scaffolds*” a lo largo de su proceso de fabricación se utilizó la técnica denominada como XPS (espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, por sus siglas en inglés: “*X-ray photoelectron spectroscopy*”). Los estudios de XPS permitieron confirmar un incremento en el grado de reducción de los rGO “*scaffolds*” con respecto a las GO no tratadas térmicamente.

Estudios del comportamiento espontáneo del animal basados en los tests de asimetría y acicalamiento revelaron cambios significativos debidos a la lesión producida o al implante de rGO “*scaffolds*”.

Mediante resonancia magnética nuclear (MRI, por sus siglas en inglés: “*Magnetic Resonance Imaging*”), se estudió el tamaño de las lesiones provocadas y las áreas colindantes afectadas tanto en animales con y sin implantes. Los resultados indicaron, primero, un volumen mayor en las lesiones que incluyen implantes, principalmente debido al implante en sí mismo y sin observarse un incremento en el volumen de la interfase. Sin embargo, las áreas medias dañadas colindantes a la lesión eran significativamente mayores en ratas sin implante de rGO “*scaffold*”. La conclusión que damos a estos resultados es que estos implantes basados en rGO son beneficios para la estabilidad del daño ocasionado por la lesión reduciendo las áreas perilesionales de gliosis.

La tinción tricromática de Masson (MTS, por sus siglas en inglés: “*Masson’s Trichrome Stain*”) junto con imágenes de TEM permitieron observar un aumento en la deposición de colágeno en el caso de las lesiones con implantes de rGO “*scaffolds*”, además de un incremento en el soporte estructural aportado a la zona lesionada. Posteriormente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia con marcadores específicos y microscopía confocal. Los resultados más notables fueron dos. Primero, la formación de microvasos sanguíneos funcionales dentro implante de rGO. Y segundo, un incremento de las conexiones neuronales mediante el crecimiento de axones mielinizados dentro del implante. Estos resultados corroboran la idea planteada en la sección mecánica, que relacionaba el incremento en el módulo de Young con la deposición de colágeno y la infiltración de células en la zona implantada.

Finalmente, se realizaron pruebas tanto de degradación como de toxicidad de la espuma de rGO. Mediante técnicas de TEM, se observaron ciertos indicios de degradación del implante de rGO, los cuales serán evaluados con más detalle en estudios futuros. En cuanto a la toxicidad, se estudiaron y analizaron algunos de los órganos más importantes (riñones, hígado, pulmones y bazo), sin apreciar cambio alguno en su morfología ni signos de toxicidad con respecto a las ratas control. Esta ausencia de toxicidad respalda la idea de la dependencia entre la dosis administrada de materiales basados en grafeno y la toxicidad que se pueda originar en el organismo. En nuestro caso no se llegó al umbral en el cual se ha observado que pueden producir efectos adversos.

## 5.4. Conclusiones

Para la caracterización mecánica de tejidos vivos se han fabricado puntas de AFM especialmente diseñadas para materiales con una alta heterogeneidad y una baja rigidez. Dichas puntas destacan por una constante de fuerzas cercana a los 0.03 N/m y por indentar con esferas que poseen un diámetro de al menos 50  $\mu\text{m}$ .

Materiales para implantes basados en rGO han sido evaluados como material promotor de la regeneración neural de la médula espinal lesionada. Mediante AFM se ha caracterizado de forma independiente cada una de las partes presentes en el marco de la lesión de la médula espinal: rGO “*scaffold*” ( $1326 \pm 1004$  Pa), sustancia gris ( $275 \pm 99$  Pa) y blanca ( $97 \pm 69$  Pa), y neuronas ( $417 \pm 106$  Pa).

Se ha comprobado que, tanto para tejidos de medula espinal fijados como vivos, la sustancia gris presenta un módulo de Young superior al que muestra la sustancia blanca.

Posteriormente se ha estudiado el efecto de un implante de 4 meses sobre la respuesta mecánica del tejido de médula espinal, pudiéndose observar dos principales resultados. En primer lugar, una vez implantado el rGO “*scaffold*”, la zona no lesionada (hemimédula izquierda) preserva sus propiedades mecánicas. Y segundo, se ha podido observar un aumento de la rigidez en la zona de la lesión (valor del módulo de Young más alto medido en este conjunto de experimentos).

Este incremento de la rigidez en la zona lesionada corrobora la también observada deposición de colágeno dentro del implante basado en espumas de rGO. Y, a su vez, se encuentra en consonancia con los experimentos que se realizaron a nivel celular, los cuales mostraron una mediación de este rGO “*scaffold*” en la infiltración masiva de células. En concreto, se ha demostrado la capacidad de estos biomateriales para inducir la formación de micro vasos sanguíneos y el crecimiento de axones mielinizados, indicando una remodelación del sistema microvascular.

En definitiva, como fruto de la colaboración con el grupo dirigido por M. Concepción Serrano se ha demostrado que los rGO “*scaffolds*” porosos y tridimensionales son capaces de promover, sin ningún tipo de funcionalización biológica, una colección de efectos beneficiosos (entre los que se incluye el incremento de la rigidez de la zona lesionada y la invariabilidad de la zona no lesionada) raramente observados en otro tipo de implantes de médula espinal, al menos hasta la fecha.

## 5.5. Referencias

1. Pathak, M. M. *et al.* Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16148–16153 (2014).
2. Moshayedi, P. *et al.* Mechanosensitivity of astrocytes on optimized polyacrylamide gels analyzed by quantitative morphometry. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, (2010).
3. Koch, D., Rosoff, W. J., Jiang, J., Geller, H. M. & Urbach, J. S. Strength in the periphery: Growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophys. J.* **102**, 452–460 (2012).
4. Göritz, C. *et al.* A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue. *Science (80-. )*. **333**, 238 LP-242 (2011).
5. Moeendarbary, E. *et al.* The soft mechanical signature of glial scars in the central nervous system. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
6. Geim, A. & Novoselov, K. The Nobel Prize in Physics 2010. *NobelPrize.org* (2010).
7. Park, S. Y. *et al.* Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv. Mater.* **23**, 263–267 (2011).
8. Marchesan, S., Ballerini, L. & Prato, M. Nanomaterials for stimulating nerve growth. *Science (80-. )*. **356**, 1010 LP-1011 (2017).
9. Li, N. *et al.* The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials* **32**, 9374–9382 (2011).
10. Tang, M. *et al.* Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials* **34**, 6402–6411 (2013).
11. Pampaloni, N. P. *et al.* Single-layer graphene modulates neuronal communication and augments membrane ion currents. *Nat. Nanotechnol.* **13**, 755–764 (2018).
12. Rauti, R. *et al.* Graphene Oxide Nanosheets Reshape Synaptic Function in Cultured Brain Networks. *ACS Nano* **10**, 4459–4471 (2016).
13. Wang, Y. *et al.* Fluorinated graphene for promoting neuro-induction of stem cells. *Adv. Mater.* **24**, 4285–4290 (2012).
14. Defterali, Ç. *et al.* Thermally reduced graphene is a permissive material for neurons and astrocytes and de novo neurogenesis in the adult olfactory bulb in vivo. *Biomaterials* **82**, 84–93 (2016).
15. Qian, Y. *et al.* An integrated multi-layer 3D-fabrication of PDA/RGD coated graphene loaded PCL nanoscaffold for peripheral nerve restoration. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
16. Bianco, A. Graphene: Safe or toxic? the two faces of the medal. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 4986–4997 (2013).
17. Reina, G. *et al.* Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4400–4416 (2017).
18. Li, Y. *et al.* Surface coating-dependent cytotoxicity and degradation of graphene derivatives: Towards the design of non-toxic, degradable nano-graphene. *Small* **10**, 1544–1554 (2014).
19. Kurapati, R. *et al.* Dispersibility-Dependent Biodegradation of Graphene Oxide by Myeloperoxidase. *Small* **11**, 3985–3994 (2015).
20. Kurapati, R. *et al.* Degradation of Single-Layer and Few-Layer Graphene by Neutrophil Myeloperoxidase. *Angew. Chemie Int. Ed.* 11896–11901 (2018). doi:10.1002/anie.201806906
21. National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal cord injury facts and figures at a glance. *Facts Fig. a Glance 2* (2018). doi:10.1179/204577212X13237783484262
22. van den Brand, R. *et al.* Restoring Voluntary Control of Locomotion after Paralyzing Spinal Cord Injury. *Science (80-. )*. **336**, 1182 LP-1185 (2012).
23. Mineev, I. R. *et al.* Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces. *Science (80-. )*. **347**, 159 LP-163 (2015).
24. Führmann, T., Anandakumaran, P. N. & Shoichet, M. S. Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury: How Can Biomaterials Help? *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1–21 (2017).
25. Tobias Führmann & Shoichet, M. S. The role of biomaterials in overcoming barriers to regeneration in the central nervous system The role of biomaterials in overcoming barriers to regeneration in the central nervous system. *Biomed. Mater.* **13**, 13–16 (2018).
26. Slotkin, J. R. *et al.* Biodegradable scaffolds promote tissue remodeling and functional improvement in non-human primates with acute spinal cord injury. *Biomaterials* **123**, 63–76 (2017).
27. Hong, L. T. A. *et al.* An injectable hydrogel enhances tissue repair after spinal cord injury by promoting extracellular matrix remodeling. *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
28. Rao, J.-S. *et al.* NT3-chitosan enables de novo regeneration and functional recovery in monkeys after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E5595–E5604 (2018).
29. Usmani, S. *et al.* 3D meshes of carbon nanotubes guide functional reconnection of segregated spinal explants. *Sci. Adv.* **2**, 1–10 (2016).
30. Fabbro, A. *et al.* Spinal cord explants use carbon nanotube interfaces to enhance neurite outgrowth and to fortify synaptic inputs. *ACS Nano* **6**, 2041–2055 (2012).

31. López-Dolado, E. *et al.* Subacute Tissue Response to 3D Graphene Oxide Scaffolds Implanted in the Injured Rat Spinal Cord. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1861–1868 (2015).
32. López-Dolado, E., González-Mayorga, A., Gutiérrez, M. C. & Serrano, M. C. Immunomodulatory and angiogenic responses induced by graphene oxide scaffolds in chronic spinal hemisectioned rats. *Biomaterials* **99**, 72–81 (2016).
33. Lu, Y.-B. *et al.* Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17759–17764 (2006).
34. Glaubitz, M., Block, S. & Gottschalk, K. Gluing micro-spheres on cantilevers in aqueous solution. *JPK Instruments Appl. Rep.*
35. Attaching microspheres to cantilevers using the NanoWizard<sup>®</sup> Life Science stage and AFM head Microsphere cantilever tips. *JPK Instruments Appl. Rep.*
36. Indrieri, M., Podestà, A., Bongiorno, G., Marchesi, D. & Milani, P. Adhesive-free colloidal probes for nanoscale force measurements: Production and characterization. *Rev. Sci. Instrum.* **82**, (2011).
37. Armstrong, R. A., Slade, S. V. & Eperjesi, F. An introduction to analysis of variance (ANOVA) with special reference to data from clinical experiments in optometry. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **20**, 235–241 (2000).
38. Kubinová, Š. *et al.* SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores for spinal cord injury repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 1298–1309 (2013).
39. Kubinová, A. Š. *et al.* Highly superporous cholesterol-modified poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for spinal cord injury repair. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **99 A**, 618–629 (2011).
40. Tsai, E. C., Dalton, P. D., Shoichet, M. S. & Tator, C. H. Synthetic Hydrogel Guidance Channels Facilitate Regeneration of Adult Rat Brainstem Motor Axons after Complete Spinal Cord Transection. *J. Neurotrauma* **21**, 789–804 (2004).
41. Shahriari, D., Koffler, J. Y., Tuszynski, M. H., Campana, W. M. & Sakamoto, J. S. Hierarchically Ordered Porous and High-Volume Polycaprolactone Microchannel Scaffolds Enhanced Axon Growth in Transected Spinal Cords. *Tissue Eng. Part A* **23**, 415–425 (2017).
42. Silva, N. A. *et al.* Development and Characterization of a Novel Hybrid Tissue Engineering-Based Scaffold for Spinal Cord Injury Repair. *Tissue Eng. Part A* **16**, 45–54 (2010).
43. Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P. C. & Janmey, P. A. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* **93**, 4453–4461 (2007).
44. Levental, I., Georges, P. C. & Janmey, P. A. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **3**, 299–306 (2007).
45. Gupta, M. *et al.* Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
46. Yeung, T. *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24–34 (2005).
47. Rianna, C. & Radmacher, M. Comparison of viscoelastic properties of cancer and normal thyroid cells on different stiffness substrates. *Eur. Biophys. J.* **46**, 309–324 (2017).
48. Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V., Rao, U., Ranganathan, K. & Elizabeth, J. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **16**, 400 (2012).
49. Kiernan, J. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Micros. Today* **12**, 8–12 (2000).
50. Domínguez-Bajo, A. *et al.* Myelinated axons and functional blood vessels populate mechanically compliant rGO foams in chronic cervical hemisectioned rats. *Biomaterials* **192**, 461–474 (2019).

## Capítulo 6

### Biomedicina y Biomateriales II: Principios mecanobiológicos de la lipodistrofia analizados por AFM

#### 6.0. Introducción

La obesidad es una condición médica caracterizada por una hipertrofia generalizada del tejido adiposo y una acumulación excesiva de grasa corporal. Suele presentar un desorden complejo, multifactorial y resistente a la mayor parte de aproximaciones farmacológicas e intervenciones disponibles actualmente. La obesidad es uno de los grandes problemas de las sociedades avanzadas del s. XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aportado datos devastadores: un 13 % de la población mundial en 2016 es considerada obesa según su índice de masa corporal<sup>1</sup>. Estando esta condición médica vinculada al desarrollo de enfermedades crónicas como cáncer, desórdenes musculoesqueléticos, depresión, discapacidad, enfermedades coronarias, esteatosis hepática no alcohólica o diabetes<sup>2-5</sup>.

El **tejido adiposo** sano tiene entre una de sus funciones principales el actuar como reserva energética segura. Una vez hemos ingeridos alimentos, los adipocitos acumulan energía en su interior (en forma de triglicéridos) como respuesta a niveles circulantes de precursores lipídicos o señales hormonales (como insulina). Otra de las funciones del tejido adiposo es la regulación de la ingesta calórica y la regulación térmica del cuerpo. También es capaz de proporcionar energía y precursores para el crecimiento, la función reproductora y el sistema inmune. Por último, cabe destacar sus competencias en materias como protección de órganos (normalmente este tejido se encuentra distribuido entre diferentes órganos),

amortiguamiento frente a fricciones derivadas de la locomoción y su actividad como almohadillas para evitar consecuencias derivadas de golpes externos en las palmas de las manos y los pies<sup>6</sup>.

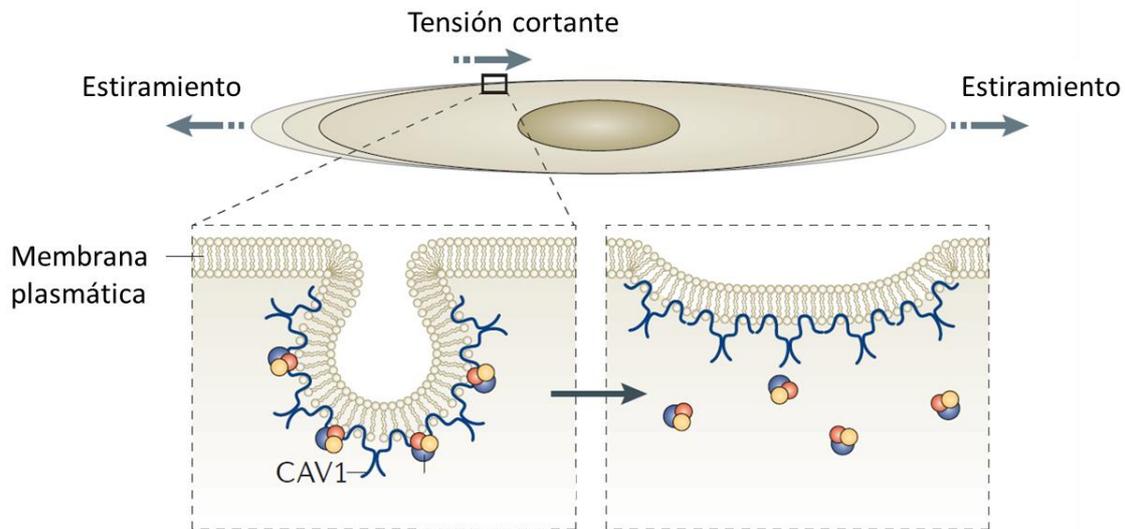
La opinión generalizada de las sociedades modernas equipará un mejor estado de salud con una menor cantidad neta de grasa. Sin embargo, su reducción excesiva o la lipodistrofia (insuficiencia funcional de depósitos grasos) conlleva consecuencias cardiovasculares y metabólicas muy similares, e incluso agravadas, a las presentes en la obesidad. Comúnmente, los pacientes de lipodistrofia presentan un cuadro de alta incidencia de enfermedades coronarias y dislipidemia, además de esteatosis hepática y diabetes de tipo 2<sup>7</sup>. Estas comorbilidades de la lipodistrofia y la obesidad dan lugar a hipotetizar un origen, para ambas enfermedades, vinculado a una insuficiencia física y/o funcional del tejido adiposo: o bien intrínseca (lipodistrofia) o por límite de capacidad (obesidad).

Tanto las células como los tejidos vivos son objeto de continuados estímulos de naturaleza mecánica como fuerzas de estiramiento o compresión, rigidez del substrato sobre el que se adhieren o fuerzas de cortadura superficiales ocasionadas por fluidos en movimiento. Al ser afectados por dichos estímulos, y dependiendo del carácter de los mismos, promoverán respuestas adaptativas específicas. Aquí es donde entra en juego la **mecanobiología**, definida como el estudio sistemático de la interacción de fuerzas mecánicas con células y tejidos biológicos<sup>8</sup>. En lo relativo a nuestro caso en particular, no existe un conocimiento amplio acerca de cómo los adipocitos responden a fuerzas mecánicas, tanto externas como internas, y qué mecanismos permiten una expansión coordinada, cuál es su límite, y como dicha expansión física se integra con el estado funcional del adipocito. Lo que sí sabemos es que el tejido adiposo es uno de los más blandos del organismo, y la expansión de sus adipocitos podría verse dificultada por un entorno con una aumentada rigidez (con relevancia funcional) o una acumulación de matriz extracelular. La mera eliminación de un componente de la matriz extracelular del tejido adiposo es causa suficiente para alcanzar una mayor capacidad de expansión de los adipocitos y una mejora en el perfil metabólico de, al menos, modelos animales con obesidad genética<sup>9</sup>. Por otra parte, incrementos en la rigidez y fibrosis son alteraciones biofísicas típicas de la obesidad, estudios científicos han encontrado relaciones entre el desarrollo de la diabetes tipo 2 con la rigidez del tejido adiposo subcutáneo<sup>10,11</sup>.

A continuación, exploraremos y comentaremos las causas subyacentes a los límites en la deformabilidad del **adipocito**. Los adipocitos son células capaces de aumentar hasta mil veces su volumen, y su labor consiste en incrementar su tamaño para acumular los lípidos excedentes después de cada ingesta. De forma análoga, en periodos de ayuno deben liberar lípidos y reducir su tamaño. Uno de los componentes esenciales de las células animales es la membrana celular (también conocida como membrana plasmática o membrana citoplasmática), compuesta en su mayor parte por proteínas y lípidos. La principal función de la membrana es mantener separados los componentes intracelulares del entorno extracelular que rodea el citoplasma de células vivas. En concreto, la membrana plasmática del adipocito está sujeta a una elevada presión interna debido a los lípidos que acumula, sufriendo importantes cambios de tensión cada vez que la célula se expande o se encoge.

Desde un punto de vista estructural, la membrana plasmática posee ciertas irregularidades y constituye un sistema heterogéneo. Especialmente cabe destacar un tipo especial de balsas lipídicas denominadas **caveolas**, siendo comunes en adipocitos, cardiomiocitos y células endoteliales<sup>12</sup>. Estas caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática de un tamaño de 60-80 nm conteniendo una alta concentración de ciertos lípidos y proteínas (como

la caveolina). Jugando un rol importante en mecanismos como la endocitosis, y en la captura de virus y ciertas bacterias patógenas<sup>13</sup>. Además, es conocido que, ante la aplicación de estreses mecánicos sobre la membrana, estas caveolas pueden aplanarse y usarse como depósito para el estiramiento de la membrana, siendo un ejemplo de mecanoadaptación (ver figura 6.1)<sup>14-16</sup>. Las propiedades de estas invaginaciones pueden indicar, en el caso concreto de los adipocitos, mecanismos de mecanoadaptación relacionados con ciclos de llenado y vaciado de los adipocitos (acción tipo buffer mecánico). La importancia de este tipo de estructuras en el tejido adiposo se ve reflejada en que uno de los fenotipos más aparentes y constantes ligados a la mutación o ausencia de componentes de caveolas es la lipodistrofia (probado tanto en modelos animales como en pacientes humanos)<sup>17</sup>.



**Figura 6.1.** Esquema ilustrativo de la acción de una fuerza de tipo mecánico como tensiones cortantes o estiramientos, provocando un aplanamiento de las caveolas. Adaptada de <sup>13</sup>.

La caveolina es una de las principales proteínas y esencial en la formación de las caveolas. Centrándonos en uno de los miembros de la familia genética de la caveolina, la **Caveolina-1** (CAV1) es la clase expresada con más frecuencia. Aparece en todo tipo de células, con la excepción de los linfocitos (un subtipo celular de los leucocitos) y neuronas. En especial, los fibroblastos y los adipocitos contienen una cantidad considerable de caveolina-1. Una de las características a destacar de esta clase es la presencia de un aminoácido específico: Tirosina 14 (Y14), responsable de muchas de las funciones fundamentales de esta proteína.

En el trabajo presentado en esta sección de la tesis doctoral nos centraremos en el estudio de las funciones de la CAV1. La ausencia de CAV1 en humanos conlleva la ausencia de la prácticamente totalidad de los depósitos adiposos del cuerpo y, en modelos murinos, a una reducción del tamaño de los adipocitos, un descenso en el porcentaje de grasa corporal y resistencia a la obesidad inducida por dieta grasa<sup>17,18</sup>. Sin embargo, actualmente no existen evidencias concretas de que sea debido a una ausencia de mecanotransducción y/o mecanoprotección lo que determina estos fenotipos alterados. El objetivo del trabajo expuesto a continuación consistirá en investigar cual es el papel que juegan la CAV1 y las caveolas en los mecanismos, principalmente mecanobiológicos, relacionados con el almacenamiento de grasa. Estudiaremos como esta proteína afecta al tejido adiposo y sus funciones, además de evaluar como regula la rigidez del mismo. Para ello, se realizarán experimentos con tres genotipos animales distintos. Genotipo WT (Cav1+/+) como control. Un

modelo Cav1<sup>-/-</sup>, caracterizado por la ausencia de CAV1 (KO). Y, un modelo mutante, caracterizado por la mutación de la CAV1, reemplazando la Tirosina 14 (Tyr 14 o Y14) por una fenilamina (KI), y perdiendo principalmente funciones relacionadas con la fosforilación. La investigación llevará no solo a estudiar el tejido adiposo como un elemento uniforme, sino que la respuesta mecánica de los adipocitos (principal componente de este tipo de tejido) será también evaluada mediante técnicas derivadas del AFM. Este proyecto se realizó en colaboración con el Laboratorio de Mecanoadaptación y Biología de Caveolas (CNIC, IP: Dr. Miguel Ángel del Pozo).

## 6.1. Teoría. Deformación de membranas (modelo de tensiones)

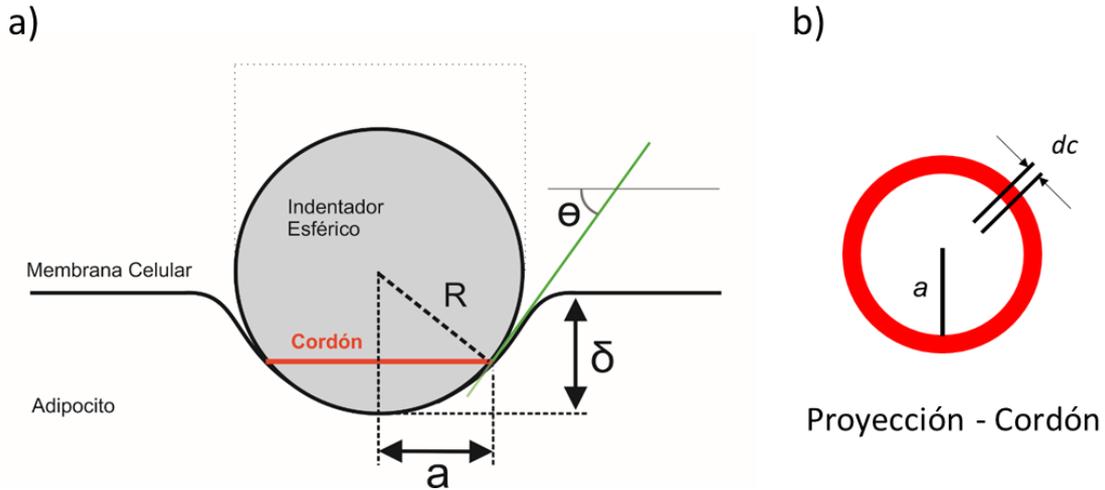
A la hora de extraer las propiedades mecánicas de células biológicas, existen alternativas a los extensamente usados modelos de mecánica de contacto inspirados en la solución y supuestos de Hertz. Las curvas de fuerza-distancia han sido previamente analizadas en base a modelos basados en tensiones de la membrana celular, describiendo a su vez, la elasticidad de células epiteliales<sup>19-23</sup>.

En este tipo de modelo de tensión la célula es tratada como una carcasa pretensada caracterizada por una tensión lateral, la cual actúa como principal fuente de recuperación ante deformaciones ejercidas sobre la misma. La tensión isotrópica constante y homogénea por toda la membrana,  $T$ , está compuesta por un primer término que es la pretensión,  $T_0$  (característica intrínseca del material estudiado), y un segundo término relacionado con el módulo de compresibilidad del área ( $K_A$ ), que posee un comportamiento lineal con la dilatación del área de la bicapa. En la ecuación 5.1 se ejemplifica lo previamente descrito.

$$T = T_0 + K_A \frac{\Delta A}{A_0} \quad (6.1)$$

El módulo de compresibilidad del área es una magnitud que cuantifica la extensibilidad lateral de la membrana (cuanto menor es su valor, más fácil es realizar un estiramiento de la membrana), y normalmente, actúa a altas indentaciones. En la ecuación 6.1,  $\Delta A$  denota cambios en el área de la bicapa, a la vez que los pesa con el valor inicial del área:  $A_0$ . Las bicapas lipídicas pueden soportar un incremento de su área de  $\sim 2 - 3\%$  antes de su ruptura<sup>24</sup>. No obstante, existen mecanismos como las caveolas o protuberancias en la membrana celular que pueden actuar como depósitos, favoreciendo el estiramiento de la misma.

El problema mecánico a resolver se encuentra descrito en la figura 6.2, siendo una aproximación relativa al problema de indentación de una carcasa cerrada con volumen constante.



**Figura 6.2.** Esquema de la configuración experimental conformada por un indentador esférico y una membrana bidimensional. a) Ilustración que define las distintas magnitudes físicas envueltas.  $R$  = radio de la esfera;  $a$  = radio de contacto;  $\delta$  = indentación;  $\theta$  = ángulo entre  $\vec{n}$  y la horizontal. b) Cordón sobre el que se proyecta el problema integral.

En este esquema podemos observar una membrana celular (sistema exclusivamente bidimensional) siendo deformada por un indentador de tipo esférico. Por tanto, la fuerza total ejercida sobre la membrana para deformarla vendrá dada por todas las contribuciones que se den a lo largo del área punta-membrana que se encuentra en contacto:

$$\vec{F} = \iint \boldsymbol{\tau} \cdot \vec{n} \cdot dA \quad (6.2)$$

Donde  $\boldsymbol{\tau}$  es el tensor de tensiones,  $dA$  el elemento de superficie, y  $\vec{n}$  juega un papel crucial siendo el vector unitario en la dirección perpendicular a la superficie en cada elemento de superficie. Gracias a la simetría esférica del problema podremos trabajar exclusivamente con fuerzas netas en la dirección  $Z$  y proyectar el problema bidimensional sobre un cordón cerrado dentro del área de contacto. Dicho cordón deberá poseer tensiones homogéneas a lo largo de todo su recorrido, y englobar dentro de su circunferencia todas las fuerzas externas aplicadas sobre la bicapa lipídica. Este argumento nos permite reducir la ecuación 6.2 a una ecuación integral a lo largo del circuito demarcado por el cordón:

$$F_z = \int^{Cordón} T \cdot \sin(\theta) \cdot dc \quad (6.3)$$

Donde  $T$  es el vector de tensiones definido dentro de la proyección con forma de circunferencia.  $\theta$  es el ángulo entre  $\vec{n}$  y la horizontal (según se describe en la figura 6.2). En trabajos previos, para solucionar este problema se suele asumir como área de contacto la superficie del indentador hasta llegar a la base de la membrana (situación de  $\delta = 0$ ). Sin embargo, en nuestro caso decidimos abordar el problema de una forma más realista. Para ello decidimos combinar la matemática desarrollada con el área de contacto dada por las teorías

tipo Hertz. Para un indentador esférico, asumiendo un cordón circular dado por la teoría Hertziana 6.3 se convierte en:

$$F_z = \int_0^{2\pi a} T \cdot \sin(\theta) \cdot dc = 2\pi a \sin(\theta) \cdot T \quad (6.4)$$

Teniendo en cuenta que el radio de contacto de Hertz es  $a = \sqrt{R \cdot I}$ , y algunas consideraciones geométricas:  $\sin(\theta) = a/R$ , podemos reescribir la fuerza vertical como:  $F_z = 2\pi T I$ . Por sencillez, renombraremos  $F_z \equiv F$ , ya que el problema es reducible a contribuciones de la fuerza a lo largo únicamente del eje vertical. Como ya introdujimos al inicio de esta sección, vamos a utilizar un modelo de tensión para nuestra membrana celular, de manera que la tensión vendría dada por la ecuación 6.1.

$$F = 2\pi T \delta = 2\pi \delta \left[ T_0 + K_A \frac{A_n - A_0}{A_0} \right] \quad (6.5)$$

El único paso que falta por evaluar son los cambios relacionados con el módulo de compresibilidad y la expansión que se ha efectuado en la membrana. Asumiremos que el área en contacto directo con el indentador será la que este afectada por la expansión. Y, por tanto, reemplazaremos el círculo determinado por esta área deformada en favor de un casquete esférico.

$$A_n = A_0 - \pi a^2 + 2\pi R d \quad (6.6)$$

Donde  $d$  es la altura del casquete esférico, relacionado con el resto de magnitudes por:  $\sqrt{R^2 - a^2} = R - d$ . Sustituyendo la ecuación 6.6 en 6.5, y teniendo en cuenta algunas consideraciones geométricas obtendremos la siguiente expresión para la fuerza:

$$F = 2\pi T_0 \delta + \frac{2\pi^2 R^2}{A_0} K_A \left( \delta - \sqrt{\delta^2 - \frac{\delta^3}{R} - \frac{\delta^2}{2R}} \right) \quad (6.7)$$

Aproximando la solución 6.7 por series de Taylor para  $\delta \ll R$ , obtendremos una gran simplificación en la expresión de la fuerza asumiendo bajas indentaciones.

$$F = 2\pi T_0 \delta + \frac{\pi^2}{2 A_0} K_A \delta^3 \quad (6.8)$$

Finalmente, es posible definir tanto una pretensión como un módulo de compresibilidad del área aparentes ( $\widetilde{T}_0$  y  $\widetilde{K}_A$ ), dejando una expresión para la fuerza con dos términos bien diferenciados. Un primer término dependiente de la pretensión siendo lineal con la

indentación y actuando principalmente a bajas indentaciones. Y un segundo término dependiente del módulo de compresibilidad, que tiene unos mayores efectos cuanto mayor sean las indentaciones.

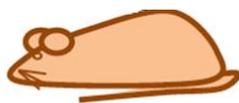
A la hora de escoger las células para la comparativa entre genotipos, se intentarán mantener constante tanto la forma como el tamaño de los adipocitos. Esto nos permitirá trabajar con magnitudes aparentes como  $\widetilde{K}_A$ , sin tener que preocuparnos por el área inicial de la célula  $A_0$  a la hora de comparar entre valores del módulo de compresibilidad del área de la membrana provenientes de distintos adipocitos.

$$F = \widetilde{T}_0 \delta + \widetilde{K}_A \delta^3 \quad (6.9)$$

## 6.2. Métodos experimentales

### – 6.2.1. Modelos de ratón, dietas y seguimiento de la evolución de pesos

Todos los modelos animales utilizados están recogidos en el mismo fondo genético (C57B46). En nuestro caso utilizaremos tres modelos distintos. Los animales C57BL/6 Cav1+/+ se utilizarán como control. El modelo Cav1-/- (Código MGI: Cav1tm1Kur/tm1Kur) que ya se ha sido publicado con anterioridad caracterizado por la ausencia de CAV1<sup>18</sup>. Y el modelo Cav1Y14F/Y14F que ha sido desarrollado en el laboratorio de Mecanoadaptación y Biología de Caveolas, M. Guadamillas, M.A. del Pozo, CNIC, y se mantiene sin publicar. Todos y cada uno de los animales utilizados para la experimentación son machos. Los experimentos con animales han sido aprobados por el Comité Ético del CNIC, el Comité de ética de la Investigación/Subcomité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, y por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid, de acuerdo al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.



Cav1 +/+ o WT



Cav1 -/- o KO



Cav1 Y14F/Y14F o KI

**Figura 6.3.** Esquema de los tres genotipos que estudiaremos. Los colores asignados en estas ilustraciones se mantendrán a lo largo de toda la exposición de los resultados experimentales.

Para la alimentación de los animales se ha recurrido a dos tipos de dietas. Por un lado, se ha utilizado una dieta estándar de animalario (Dieta Normal o ND, por sus siglas en inglés: “Normal Diet”), con referencia *LabDiet 5K67 - JL Rat & Mouse/Auto 6F*. Dieta caracteriza por

contener un 16,028% de contenido calórico procedente de grasa. Por otro lado, se ha establecido un grupo tratado con dieta de alto contenido en grasa (“Dieta Grasa”, o HFD, por sus siglas en inglés: “*High Fat Diet*”), con referencia *Research Diets D12492*, y con un 60% de contenido calórico procedente de grasa. El pesado de los animales para el estudio de su evolución temporal se realizó de forma semanal. Los participantes en este experimento fueron: Mauro Catalá Montoro, Teresa Osteso Ibáñez y María Aboy Pardal.

### – 6.2.2. Obtención de tejidos, procesado histológico, imágenes TEM y cuantificación de fibrosis

Sección experimental realizada por Maria Aboy Pardal del grupo de Mecanoadaptación y Biología de Caveolas (CNIC, IP: Dr. Miguel Ángel del Pozo).

Los animales se sacrifican por inhalación de CO<sub>2</sub>, obteniendo el tejido adiposo epididimal. Una porción del mismo es específicamente reservada para los experimentos de mecanobiología llevados a cabo con AFM. El tejido sobrante se fija durante al menos 48 horas en formalina tamponada al 10%. A continuación, estos órganos fijados se transfieren a etanol 70% y son procesados, incluidos en parafina, cortados y teñidos en la Unidad de Histopatología del CNIC. Para el procesado histológico se realizan tinciones de tricrómico de Masson, con la intención de contrastar los depósitos de colágeno. Los portamuestras se digitalizan con un escáner de muestras histológicas. Y posteriormente, utilizando el software NDP.view, las imágenes de los cortes son exportadas a formato “.tiff” para su análisis cuantitativo.

Una vez obtenidas las imágenes digitales, con ayuda de *ImageJ*, y de forma manual, se eliminan todos los depósitos de colágeno no intersticiales que se sitúen rodeando plexos venosos o formando parte de tejido epididimal que haya podido contaminar la muestra, así como cualquier precipitado o artefacto. Finalmente, para cuantificar el área azul correspondiente al colágeno en las tinciones de tricrómico de grasa usaremos un macro o *plugin* de *ImageJ* basado en obtener las zonas que sean un 120 % más azules que rojas<sup>25</sup>.

Los tejidos utilizados para las medidas de microscopía electrónica (TEM) son tejido visceral epididimal de animales con 45 semanas de vida y sometidos a dieta normal. Una vez extraídos se fijan con 2% formaldehído y 2% glutaraldehído en tampón fosfato 1 M (pH =7.4). El procesado, el contraste y la ultramicrotomía de los tejidos corrió a cargo del laboratorio de Microscopia Electrónica de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

### – 6.2.3. Protocolo de diferenciación para obtención de adipocitos cultivados *in vitro*

Sección experimental realizada por Maria Aboy Pardal del grupo de Mecanoadaptación y Biología de Caveolas (CNIC, IP: Dr. Miguel Ángel del Pozo).

Inicialmente, se extrae el tejido adiposo subcutáneo posterior (inguinal y gluteal), se corta en pequeños fragmentos con un bisturí y se disgrega incubándolo en una solución de colagenasa 2 mg/ml con BSA (Albúmina de suero bovino, BSA por sus siglas en inglés: “*Bovine Serum Albumin*”) 20 mg/ml durante 40 minutos a 37°C, manteniendo una agitación constante. La suspensión resultante se centrifuga, quedando la fracción vásculo-estromal de interés en el

“pellet”. A continuación, se resuspende el “pellet” y se pasa por un “cell strainer” de 100  $\mu\text{m}$  para eliminar fragmentos de tejido. Posteriormente, se lisan los eritrocitos con un tampón ACK durante 2 minutos, se cuentan y las células se ponen en la placa de cultivo a una densidad de 50000 células por  $\text{cm}^2$ .

El medio de cultivo utilizado es DMEM: F12 con suplementos de penicilina/estreptomicina, fungizona y una concentración de 8% FBS. El cultivo se mantiene en una incubadora a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  cambiando el medio cada dos días, realizando un pase antes de alcanzar la confluencia completa (aproximadamente al cuarto día). Una vez se alcance la confluencia completa (día contado como 0), se inicia la diferenciación adipogénica añadiendo los siguientes factores de diferenciación: insulina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dexametasona 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , troglitazona 0,4415  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tras 48 horas (día 2) se cambia el medio y se añade insulina y troglitazona a igual concentración que a día 0. A días 4 y 6 se añade únicamente insulina. Para concluir, los ensayos se realizan a día 8 o 9.

#### – 6.2.4. Espectroscopía de fuerzas por AFM

Todas las medidas de AFM fueron llevadas a cabo mediante la utilización de un instrumento comercial, JPK Nanowizard 3 (JPK Instruments AG, Berlin, Alemania), montado sobre un microscopio invertido del tipo Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Dependiendo del tipo de muestra (célula o tejido), se usaron una clase de micropalanca u otra. Previamente a las medidas de AFM, los tejidos adiposos se extraen del animal sacrificado y se adhieren a la base de una placa con la ayuda de *Histoacryl*® (B. Braun, Melsungen, Alemania). Posteriormente, el tejido adherido se sumerge en PBS (1%), medio en el cual se realizarán finalmente las medidas de repuesta mecánica por AFM. Los tejidos son medidos el mismo día de su extracción.

El tejido adiposo conforma una muestra altamente heterogénea, compuesta por células adiposas, fibroblastos, células inmunes, venas, matriz extracelular, entre otros. Por tanto, para las medidas de este tipo de tejidos se utilizaron las puntas fabricadas en nuestro grupo específicamente para tejidos biológicos (descrito con más detalle 5.2.1. del anterior capítulo), caracterizadas por una micropalanca sin punta con una constante de fuerzas de 0.07  $\text{Nm}^{-1}$ , una frecuencia de resonancia de 6 kHz, y una microesfera de poliestireno de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro adherida al borde. Para las medidas en adipocitos diferenciados y cultivados *in vitro*, se usó una micropalanca comercial caracterizado por una constante de fuerzas de 0.08  $\text{N m}^{-1}$ , una frecuencia de resonancia de 17 kHz y una punta esférica de 6.62  $\mu\text{m}$  de diámetro (CP-PNPL-SiO-C, sQube, Bickenbach, Alemania). La determinación de la constante fuerzas de los cantilevers fue realizada previamente a cada experimento. El método de calibración utilizado fue el basado en el ruido térmico (más detalles sobre la calibración se encuentran en el capítulo 1 de esta tesis doctoral), ya implementado en el software comercial proporcionado para el manejo de un JPK Nanowizard 3.

Las curvas de fuerza-distancia fueron obtenidas con el fin de determinar el módulo de Young de los tejidos adiposos frescos y los adipocitos cultivados en placas *Petri*. La distancia punta-muestra fue modulada aplicando una señal tipo onda triangular, consecuente con una velocidad constante en la aplicación de las curvas de fuerza-distancia. Para los tejidos, la velocidad de modulación fue de 5  $\mu\text{m}/\text{s}$  (frecuencia asociada de 0.33 Hz) y la máxima fuerza aplicada fue de 15 nN. Los datos y resultados que mostraremos durante la exposición de este

trabajo estarán referidos o representarán un valor medio entre todos los tejidos adiposos medidos para cada distinto genotipo. Para cada genotipo contaremos con tejidos de varios ratones distintos. De cada ratón mediremos una porción de su grasa visceral, eligiendo cuatro áreas distintas de cada tejido. Regiones que deberán estar separadas entre sí varios cientos de micras. Por cada área seleccionada se realizarán 100 curvas de fuerza distancia, obteniendo finalmente un muestreo de 400 curvas por tejido y animal. Para los experimentos con adipocitos, la velocidad escogida fue también de 2  $\mu\text{m/s}$  (frecuencia de 0.66 Hz) y la máxima fuerza aplicada fue de 3 nN. En este segundo caso, hemos evaluado células provenientes de 6 ratones distintos por genotipo. Para cada ratón se escogían cuatro células (adipocitos) siguiendo un criterio de selección basado en su forma y tamaño. Para la caracterización individual de cada uno de los adipocitos se realizaron mapas de curvas de fuerza-distancia (*Force Volume*) sobre áreas de aproximadamente 30 x 30  $\mu\text{m}$ , manteniendo un pixelado de 8 x 8 (mínimo de 136 curvas por célula).

Para la obtención explícita del módulo de elasticidad o módulo de Young en tejidos se ajustaron las curvas obtenidas a un modelo puramente elástico de tipo hertziano. Para el caso de los adipocitos se usaron también ajustes de los datos experimentales siguiendo modelos viscoelásticos (capítulo 3 de esta tesis) y modelos de tensiones (descritos en la subsección teórica relacionada con el presente trabajo). En concreto, el ajuste se realizó en la parte repulsiva de la curva de fuerzas sin obviar la corrección o extensión del modelo debido a efectos del sustrato (previamente introducido en el capítulo 2 de la presente tesis).

#### – 6.2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en la plataforma de *Origin* (OriginLab) y *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS Statistics). Los valores son expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. En los gráficos con formato “*box plot*”, la línea y el cuadrado que se encuentran dentro de la caja representan la mediana y la media de la distribución, respectivamente. La parte superior e inferior de la caja corresponden con el percentil 25 y 75 (también conocidos como cuartil Q1 y Q3), respectivamente. Los “bigotes” fuera de la caja denotan el rango en el cual se encuentran los datos atípicos. Estos valores se extienden entre dos extremos definidos por 1.5 veces el rango intercuartílico (RIC):  $Q1 - 1.5 \text{ RIC}$  y  $Q3 + 1.5 \text{ RIC}$ .

Para probar las diferencias estadísticas significativas entre distintos grupos hemos usado un algoritmo de análisis de la varianza: one-way ANOVA, conjuntamente con un tratamiento “*post-hoc*” basado en el método *Games-Howell* o *Scheffé*, dependiendo de la homogeneidad de las varianzas (dictado por el test de *Levene*)<sup>26</sup>. En todos nuestros análisis estadísticos hemos seguido el mismo criterio, considerando estadísticamente significativos valores de  $p < 0.05$ . La tabla que recoge todas las estadísticas comparativas presentes en este trabajo puede ser encontrada en el apéndice A.5.1.

## 6.3. Resultados y discusión

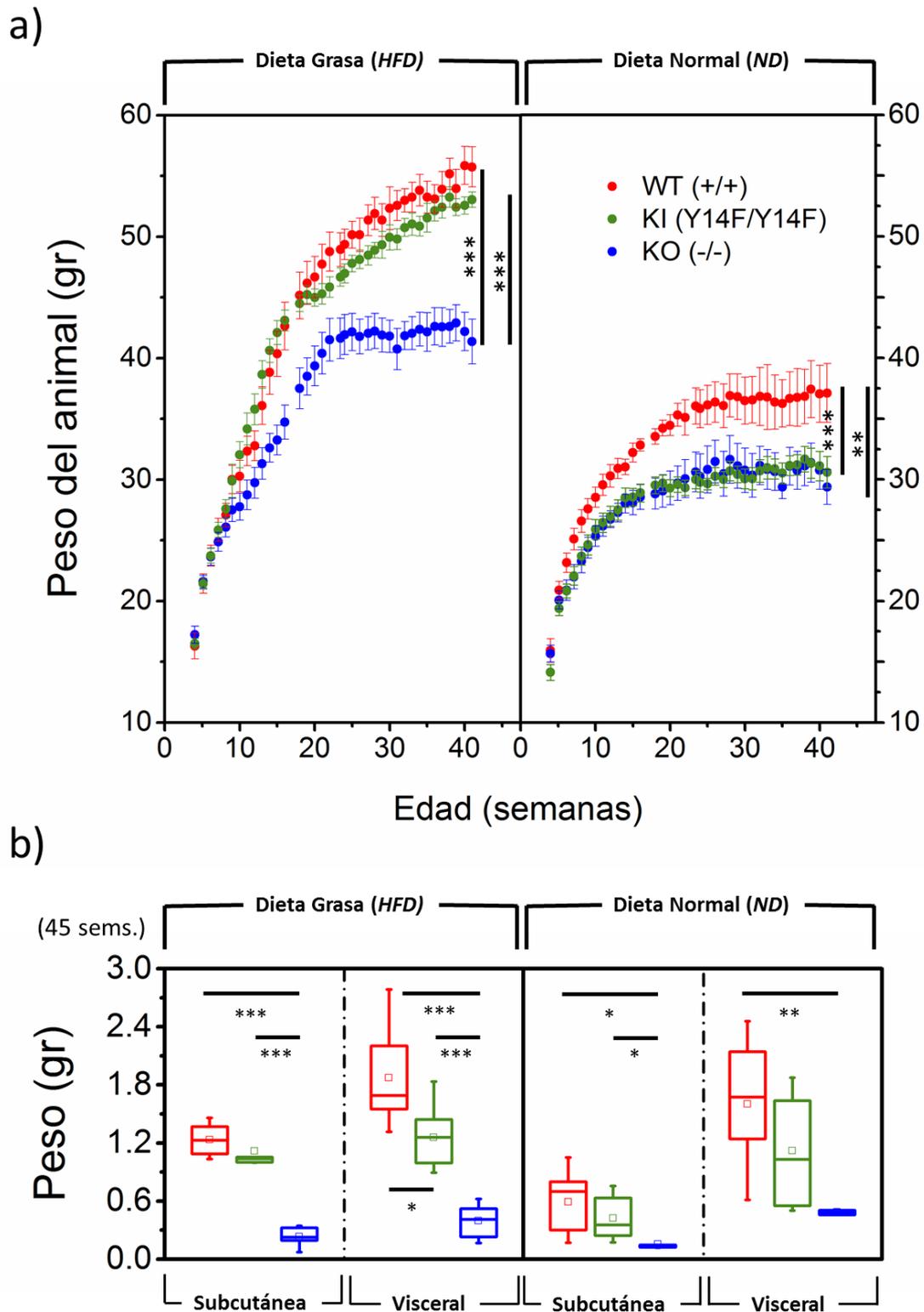
Los resultados que expondremos a lo largo de este trabajo empezarán por un estudio del peso completo de los animales y sus depósitos grasos, provenientes de cada uno de los tres genotipos (WT, KI y KO). Continuaremos con un análisis a nivel mecánico (por medio de un

AFM) de los tejidos adiposos y a nivel histológico para cuantificar el colágeno existente en dichos tejidos. Finalmente, realizaremos un estudio exhaustivo de la mecánica celular del adipocito. En este estudio mecánico de los adipocitos se utilizarán, tanto modelos tradicionales hertzianos como modelos propios de deformación de membrana (aproximación más cercana a la realidad estructural presente en el adipocito), para interpretar las medidas de curvas de fuerza-distancia obtenidas por AFM.

### – 6.3.1. Estudio de masa corporal y pesos de depósitos grasos

La primera parada para estudiar los depósitos grasos y cuál es su cuantía dentro del cómputo global del organismo consiste en estudiar el peso total del cuerpo. En la figura 6.4.a se exponen los datos obtenidos para el pesado de los tres genotipos, siendo sometidos a dos dietas distintas. Primero a una dieta normal (ND), y posteriormente, a una dieta con alto contenido en grasa (HFD). La HFD posee aproximadamente 4 veces más contenido calórico procedente de grasa que la ND. Antes de comentar los resultados cabe mencionar que para los tres genotipos tanto la ingesta de alimento como el gasto energético ha sido equivalente.

En dieta normal, es posible observar una evolución común en los tres genotipos caracterizada por un aumento del peso hasta alrededor de las 20 semanas, punto a partir del cual los incrementos se realizan en menor media, observándose un comportamiento similar a un “plateau”. Estas primeras 20 semanas de aumento de peso corresponden con el periodo de crecimiento y desarrollo de estos animales. Analizando el peso en el punto final (45 semanas de edad), observamos un peso para el WT de  $37.1 \pm 5.0$  gr. Por otra parte, los genotipos KI y KO dan valores de  $29.36 \pm 3.02$  gr ( $p = <0.001$  respecto al peso del WT) y  $30.59 \pm 2.78$  gr ( $p = 0.0063$ ), respectivamente. Mostrando que tanto los animales KI como KO son significativamente más delgados que los WT. Sin embargo, el principal indicador de lipodistrofia no viene determinado por el peso total del animal, sino que es el peso de los depósitos grasos el realmente relevante. Nosotros estudiaremos dos depósitos grasos concretos, el subcutáneo inguinal (ingWAT) y el visceral epididimal (eWAT)<sup>27</sup>, los resultados están recogidos en la figura 6.4.b. El depósito visceral en ND del genotipo WT muestra un peso de  $1.60 \pm 0.62$  gr ( $n = 7$ ). Mientras que, el KI es de  $1.12 \pm 0.52$  gr ( $n = 7$ ;  $p = 0.2305$  respecto al mismo tipo de depósito graso para el genotipo WT) y el KO es de  $0.49 \pm 0.20$  gr ( $n = 5$ ;  $p = 0.006$ ). Por su parte, el depósito subcutáneo aporta un peso de  $0.59 \pm 0.32$  gr ( $n = 7$ ) para el WT, el KI de  $0.42 \pm 0.22$  gr ( $n = 8$ ,  $p = 0.425$ ) y el KO de  $0.15 \pm 0.04$  gr ( $n = 5$ ,  $p = 0.021$ ). Tanto KI como KO presentan una reducción en la expansibilidad de sus depósitos grasos, siendo este efecto más pronunciado para el KO. Una observación curiosa es la falta de concordancia entre los pesos corporales de los ratones KI y KO, presentando un valor muy similar, y los pesos de los depósitos grasos, claramente inferiores en el caso del KO. En el peso corporal contribuyen una gran cantidad de factores, y ya ha sido observado con anterioridad como los ratones del genotipo KO presentan de forma excepcional un mayor desarrollo muscular, pudiendo equilibrar la balanza de pesos totales sin tener que recurrir a unos depósitos grasos similares.



**Figura 6.4.** Estudio de pesos de los animales pertenecientes a los genotipos WT, KI y KO. a) Evolución del peso medio de los animales para cada genotipo en función de las semanas de vida. Se incluyen datos de animales alimentados con dieta normal y dieta grasa. b) Medidas del peso de los depósitos grasos a las 45 semanas (edad en la que se sacrificaron). Se estudiaron grasas provenientes del depósito subcutáneo inguinal y del depósito visceral epididimal. En los gráficos, la significancia estadística está representada por:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*, y  $p < 0.001$  \*\*\*.

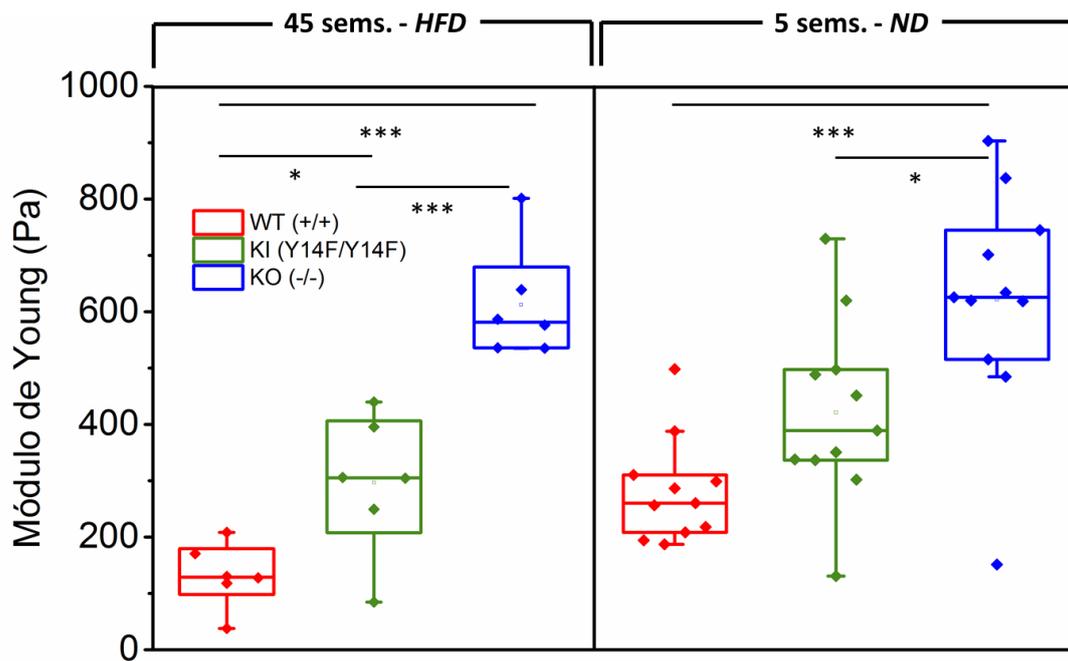
Para ratones sometidos a HFD, los resultados muestran una clara diferencia entre el WT, llegando a un valor medio de peso de  $55.74 \pm 3.51$  gr ( $n = 9$ ) a las 45 semanas de edad, con el KO que presenta un valor de  $41.36 \pm 3.91$  gr ( $n = 10$ ,  $p < 0.001$ ), sustancialmente menor. Mientras tanto, el KI muestra un valor intermedio de  $53.04 \pm 1.32$  gr ( $n = 10$ ,  $p = 0.1903$ ). Por un lado, el depósito visceral muestra un comportamiento muy similar al ya observado en ND. No obstante, una curiosidad aparece en el comportamiento del depósito subcutáneo del genotipo KI,  $1.12 \pm 0.22$  gr ( $n = 6$ ,  $p = 0.4892$ ). Al forzar los mecanismos del almacenamiento de grasa con la aplicación de una dieta grasa, el KO,  $0.23 \pm 0.01$  gr ( $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ) es incapaz de expandir su depósito subcutáneo (deposición con una mayor tendencia a guardar grasa y producir adipocitos nuevos que el visceral), mientras que para el caso del KI sigue funcionando, mostrando incluso unos niveles parecidos al WT,  $1.23 \pm 0.16$  gr ( $n = 6$ ). Este resultado explica por qué a las 45 semanas de edad, los ratones KI, ante dieta grasa, muestran un peso corporal más cercano al WT que al KO.

Como conclusión, los datos de los pesos de los depósitos grasos demuestran una vez más la lipodistrofia y resistencia a la obesidad presente en el genotipo KO. Los animales son incapaces de engordar por problemas en el tejido adiposo. En cuanto al KI, la lipodistrofia que observamos en sus resultados tiene un carácter más leve. El KI presenta un fenotipo intermedio con una limitación clara en la expansión de los depósitos grasos, siendo capaz de responder a la dieta grasa (hecho que el KO no es capaz de simular), a la vez que muestra una reducción muy significativa del depósito visceral, alrededor del 33 %.

### – 6.3.2. Caracterización mecánica de tejidos adiposos de ratones tipo WT, KI y KO

Hasta este momento hemos estudiado la cantidad de grasa y el peso de los animales de los tres genotipos disponibles, obteniendo síntomas de lipodistrofia y resistencia a la obesidad en el genotipo con ausencia de CAV1, y de un carácter más leve en el genotipo mutante. El siguiente paso a investigar está relacionado con el estudio de las propiedades mecánicas de los tejidos adiposos, llevándonos a comprobar si estos genotipos con ausencia o mutación de componentes de las caveolas están caracterizados por una respuesta distinta ante estímulos mecánicos externos. Asimismo, evaluaremos tanto tejidos de ratones sometidos a dieta normal como otros que han sido alimentados mediante dieta grasa. Más en concreto, mediremos las propiedades del depósito graso visceral. La experimentación se realizará mediante curvas de fuerza-distancia a velocidad constante con un AFM, pudiendo obtener información sobre la rigidez o módulo de Young que presentan estos tejidos específicos.

Los resultados de módulo de Young obtenidos mediante indentaciones con AFM están expuestos en la figura 6.5. Empezando por los datos para ratones sometidos a HFD y sacrificados a las 45 semanas de vida, el genotipo de control (WT) muestra en sus tejidos adiposos el menor módulo de Young medido, con un valor de  $132 \pm 57$  Pa ( $n = 6$ ). A su vez el KI posee una rigidez de  $296 \pm 124$  Pa ( $n = 6$ ,  $p = 0.0351$ ), y el KO con  $612 \pm 100$  Pa ( $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ) presenta el mayor módulo de Young de los tres genotipos.



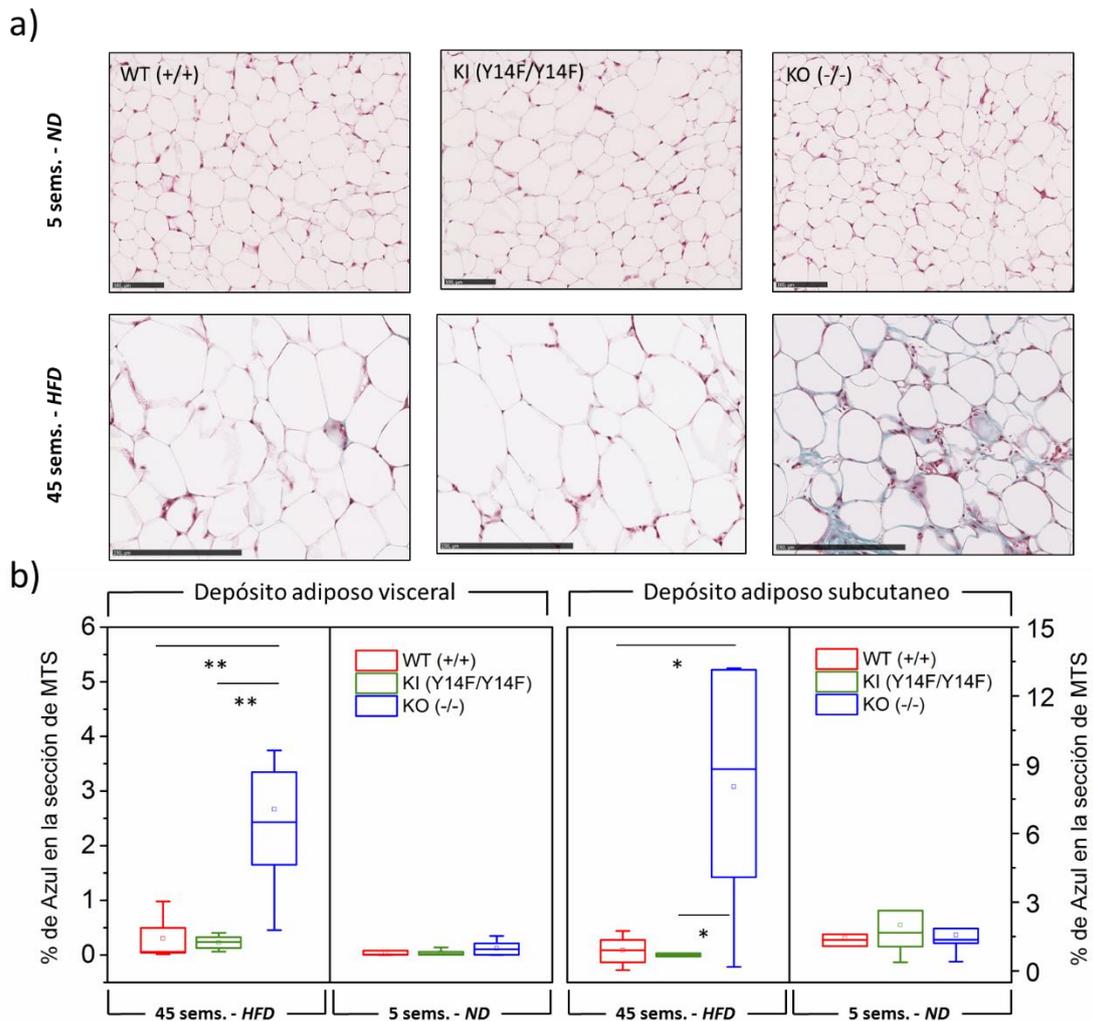
**Figura 6.5.** Caracterización nanomecánica de los tejidos adiposos provenientes de ratones WT, KO y KI. Se estudiaron tejidos provenientes de poblaciones con 45 semanas de edad sometidas a dieta grasa, y poblaciones jóvenes (5 semanas) alimentadas con dieta normal. En los gráficos, la significancia estadística está representada por:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*; y  $p < 0.001$  \*\*\*.

Estos resultados indican una clara diferencia estadística entre los tres genotipos a nivel de respuesta mecánica de los tejidos adiposos. El tejido adiposo está compuesto por una serie de elementos como adipocitos, células inmunes, fibroblastos, venas, matriz extracelular... que de forma individual e indirecta podrían repercutir un incremento del módulo de Young. Una de las principales hipótesis, y causa sabida de aumento de la rigidez de los tejidos grasos, es la fibrosis. La muerte de adipocitos tiene dos consecuencias primordiales, la inflamación debido a la presencia de células inmunes encargadas de fagocitar los adipocitos dañados, y la fibrosis consecuencia de la cicatrización del tejido mediado con colágeno.

Los análisis histológicos, tanto de la grasa visceral como subcutánea, se realizaron mediante la técnica de tinción tricrómica de Masson. Con ayuda de este tipo de tinciones es posible cuantificar los niveles de colágeno presentes en el tejido. En la figura 6.6.a tenemos una serie de imágenes ópticas de estas tinciones sobre tejido adiposo de 5 semanas (estado inicial del animal nada más separarse de la madre) y de 45 semanas (etapa final habiendo sometido al ratón a dieta grasa a partir de la quinta semana de vida). Las áreas con fibrosis son fácilmente identificables en azul. Por otra parte, en color rojo se destacan los núcleos de las diferentes células presentes en el tejido, principalmente adipocitos, fibroblastos y células inmunes. Para las imágenes de ratones de 5 semanas no es posible apreciar visualmente diferencias entre WT, KI y KO. Esta información ha sido corroborada mediante el estudio matemático con *ImageJ* del % de azul presente en las imágenes de MTS. En los casos tanto de los depósitos subcutáneos como viscerales en animales de 5 semanas de vida, los resultados demuestran la inexistencia de diferencias estadísticamente relevantes entre una y otra población. Por tanto, se ha demostrado la inexistencia de fibrosis en estos animales jóvenes.

Sin embargo, es visualmente evidente como entre los tejidos adiposos de 45 semanas (HFD) existen diferencias. El KO presenta zonas con clara fibrosis. Este resultado ha sido validado por

medio de un procesamiento computacional de las imágenes, obteniendo claros incrementos de fibrosis en tejidos adiposos KO tanto visceral como subcutáneo (figura 6.6.b). En ambos casos los porcentajes de fibrosis presentados por el KO son entre 8 y 9 veces mayores que los expuestos por los genotipos WT y KI. En concreto, la diferencia entre KO y WT es claramente significativa con  $p = 0.008$  para el depósito visceral y  $p = 0.042$  para el depósito subcutáneo. Estudiando más detenidamente las imágenes de secciones de MST, es posible exponer un resultado complementario relacionado con la infiltración inmune en los tejidos tipo KO. Si observamos la cantidad de tinción roja, relacionado con núcleos celulares, podemos observar un incremento extraordinario en el caso de KO HFD (45 semanas) que difícilmente puede ser debido exclusivamente a los propios adipocitos, permitiéndonos interpretarlo como una clara presencia de células inmunes en el tejido. Para el caso del KI, la tendencia ascendente parece mantenerse, pero en menor grado que para el tejido del genotipo KO.



**Figura 6.6.** Cuantificación de los niveles de fibrosis para cada uno de los genotipos. a) Imágenes ópticas de histología obtenidas por medio de la tinción tipo MTS de depósitos viscerales epididimales de ratones con 45 semanas de vida (HFD), y ratones de 5 semanas de vida (ND). b) Porcentajes de áreas de colágeno, relacionadas con la fibrosis, provenientes tanto de depósitos adiposos viscerales como subcutáneos. En los gráficos, la significancia estadística está representada por:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*; y  $p < 0.001$  \*\*\*.

A fin de descartar posibles efectos inducidos por la fibrosis sobre la respuesta mecánica, se decidió repetir la misma secuencia experimental que la llevada a cabo para los HFD de 45 semanas. En este segundo caso se evaluaron los tejidos adiposos de ratones de 5 semanas (ND), sabiendo que dichos tejidos no presentaban trazas de colágeno y, por ende, fibrosis en su estructura. La figura 6.5 muestra los resultados obtenidos para estos ratones. El WT muestra un valor del módulo de Young de  $318 \pm 175$  Pa ( $n = 11$ ), el KI es más rígido con  $422 \pm 163$  Pa ( $n = 11$ ,  $p = 0.138$ ) y, finalmente, el KO muestra  $622 \pm 200$  Pa ( $n = 11$ ,  $p < 0.001$ ).

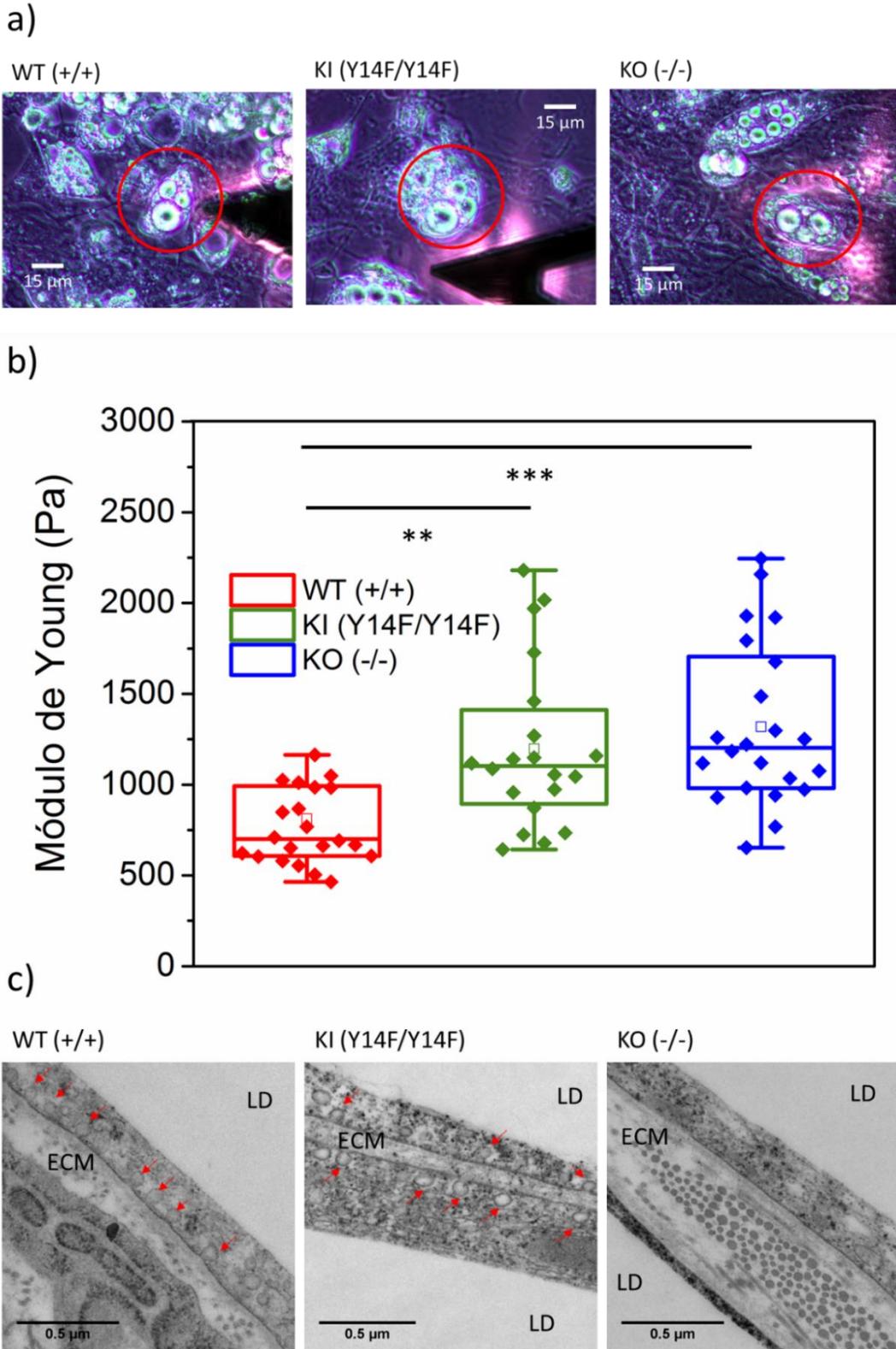
La mayor resistencia a la deformación presentada por el KO, contrasta con el módulo de Young intermedio mostrado por el KI, y los menores valores de rigidez pertenecientes al genotipo WT. Una vez descartada la hipótesis de la fibrosis como causa del endurecimiento mecánico del tejido, los propios adipocitos deben ser los responsables de estos cambios en la resistencia mecánica del tejido adiposo entre genotipos.

### – 6.3.3. Caracterización de adipocitos diferenciados *in vitro* de los tres genotipos (WT, KI y KO)

A partir del tejido adiposo subcutáneo se diferenciaron adipocitos *in vitro*, cultivándose sobre una placa tipo *Petri*. En estas condiciones de cultivo se realizaron medidas de AFM sobre varias células individuales extraídas de diferentes ratones. Los adipocitos se escogieron por inspección visual siguiendo un criterio de tamaños, intentando siempre medir adipocitos provenientes de distinto genotipo con tamaños similares, y una forma análoga (ver figura 6.7.a).

Estos adipocitos cultivados sobre un *Petri* presentan una tendencia en sus valores de módulo de Young análoga a la ya observada en los tejidos adiposos, resultados contenidos en la figura 6.7.b. Para los adipocitos provenientes del genotipo de control (WT) el módulo de elasticidad obtenido es de  $812 \pm 306$  Pa ( $n = 6$ , con medidas procedentes de 22 células). Valores significativamente inferiores a los que muestran tanto el genotipo mutante (KI),  $1197 \pm 452$  Pa ( $n = 6$ , con medidas procedentes de 20 células,  $p = 0.01$ ) como en el que no se expresa la CAV1 (KO),  $1319 \pm 447$  Pa ( $n = 6$ , con 22 células medidas,  $p < 0.001$ ).

El genotipo de control, WT, presenta una gran cantidad de caveolas, como es posible observar en las imágenes TEM de la figura 6.7.c. La presencia de este tipo de invaginaciones, actuando como reservas de membrana y permitiendo una elongación de la misma más fácilmente, es predominante en los WT. A su vez, el KI también posee este tipo de morfologías en su membrana plasmática. No obstante, el KO es el único genotipo que muestra una completa ausencia de estas caveolas. Otra característica a resaltar de las imágenes TEM de los KO, es la abundante aparición de colágeno. En la zona de ECM es posible observar una gran cantidad de puntos grises, correspondientes a fibras de colágeno cortadas de forma transversal. Incluso pueden diferenciarse algunas cortadas en su dirección longitudinal. En cambio, para el WT y el KI, aunque sigue existiendo este tipo de fibras, su número está mucho más reducido. Esta es una prueba más de la presencia de fibrosis en los tejidos adiposos de HFD y de edades avanzadas, observada exclusivamente en el genotipo KO.



**Figura 6.7.** Caracterización mecano-óptica de adipocitos. a) Imágenes ópticas de adipocitos cultivados ex vivo sobre una placa Petri. b) Resultados de la caracterización nanomecánica de los adipocitos por medio de técnicas basadas en el AFM. c) Imágenes de microscopía electrónica (TEM) de tejido visceral epididimal en dieta normal y a las 45 semanas. Las flechas rojas indican la presencia de caveolas. LD es la gota de grasa (LD, por sus siglas en inglés: “Lipid Droplet”). ECM es la matriz extracelular (por sus siglas en inglés: “Extracellular Matrix”). En los gráficos, la significancia estadística está representada por:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*; y  $p < 0.001$  \*\*\*.

Concluyendo la caracterización de los adipocitos, el KO con su ausencia de caveolas presenta una mayor resistencia a la deformación y una reducida capacidad hipertrófica. Mientras el WT, poseyendo unas caveolas perfectamente funcionales y con todos sus componentes sin modificar muestra el menor módulo de Young. Por último, el KI, genotipo mutante en el cual se ha reemplazado uno de los aminoácidos de la CAV1, haciendo perder a las caveolas algunas de sus funciones principales, representa un fenotipo intermedio (igual que en los estudios de los pesos de los depósitos grasos) con un módulo de Young entre el del WT y el KO. Estos resultados obtenidos a nivel celular explican, sin tener que recurrir a argumentos derivados de la fibrosis, por qué los tejidos adiposos para cada uno de los genotipos estudiados muestran una rigidez dispar. Siendo, consecuentemente, mayor para el KO y menor para el WT.

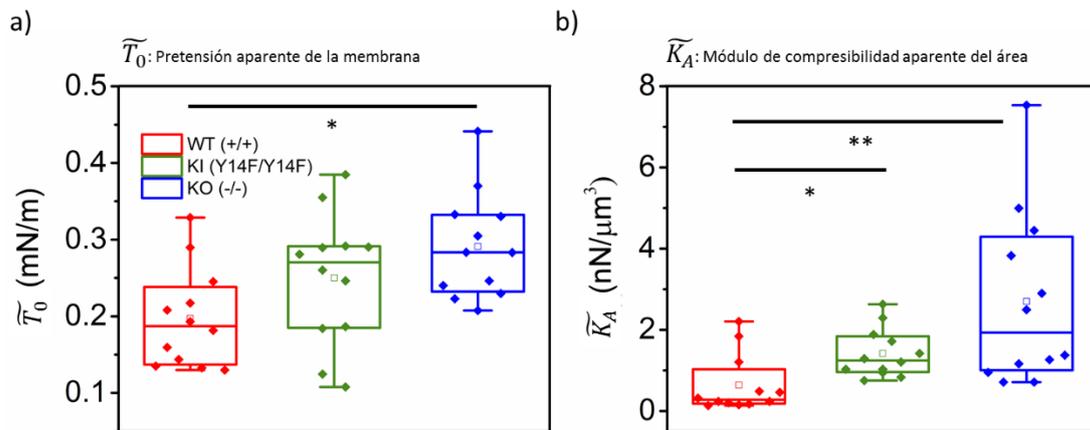
La incrementada rigidez de los adipocitos, y como consecuencia su reducida elasticidad, podrían ocasionar una reducción del punto de rotura de la membrana, lo que supondría adipocitos más frágiles y de reducido tamaño. En nuestro caso hemos evaluado el tamaño medio de los adipocitos. En el caso del WT (adipocitos provenientes de  $n = 30$  distintos ratones) el área de los adipocitos era de  $2382 \pm 912 \mu\text{m}^2$ . Los adipocitos del genotipo KI presentaban  $2131 \pm 1072 \mu\text{m}^2$  ( $n = 36$ ) mientras que los pertenecientes al KO veían reducido su tamaño medio considerablemente  $1488 \pm 809 \mu\text{m}^2$  ( $n = 28$  y  $p = 0.002$ ). Este resultado confirmaría la hipótesis de una reducción del tamaño del adipocito como consecuencia de una baja elasticidad. Hecho que podría finalmente desembocar en fenómenos como muerte celular, infiltración inmune y deposición de fibrosis (efectos ya observados para tejidos adiposos en ratones KO de avanzada edad).

#### – 6.3.4. Análisis alternativo de los adipocitos por medio del modelo de tensiones

Hasta ahora se ha realizado un análisis de las propiedades mecánicas de los adipocitos, asumiendo un modelo elástico (caso más sencillo posible) y ciñéndonos exclusivamente al estudio de la rigidez presente en la respuesta de estos adipocitos ante fuerzas externas. Para profundizar más en el estudio de sus propiedades mecánicas se decidió, en primera instancia, aplicar un modelo poroelástico (basado en una respuesta del material tipo Kelvin-Voigt), mismo modelo que previamente se ha aplicado con éxito sobre fibroblastos. Mediante la aplicación de este modelo constitutivo obtuvimos valores del coeficiente de viscosidad en torno a 8-10 veces inferiores a los de los fibroblastos. La viscosidad obtenida era tan baja que la proporción señal-ruido no permitió usar este parámetro como marcador para distinguir entre un genotipo u otro. Estos valores extraordinariamente bajos de la viscosidad cuadran con la idea inicial de una célula como un material poroelástico. Los adipocitos son células caracterizados por tener un reducido citoesqueleto, la mayor parte de este tipo de células está compuesta por la gota lipídica especializada en el almacenamiento de triglicéridos (principal reserva energética del organismo animal proveyendo energía a los tejidos periféricos) llegando a ocupar la mayor parte del volumen celular<sup>28</sup>. La presencia de esta gran LD y la baja presencia de un citoesqueleto da pie a que la viscosidad de un adipocito dentro un modelo poroelástico tenga un valor muy reducido. La dificultad del líquido interior de la célula para recolocarse y moverse a través de la estructura que conforma el citoesqueleto de un adipocito es considerablemente más baja que para un fibroblasto, como los estudiados en los capítulos 3 y 4 de la presente tesis.

Una vez demostrado que el modelo poroelástico es incapaz de aportar información relevante para la diferenciación de los distintos genotipos, decidimos desarrollar un modelo que tuviera en cuenta directamente la presencia o ausencia de las caveolas en los adipocitos. Para ello modelizamos este tipo de células como una carcasa formada por la membrana celular, en la cual estudiaremos las tensiones laterales ejecutadas al realizar un experimento de curva de fuerza-distancia.

El ajuste a este tipo de modelos evalúa la pretensión de la membrana y el módulo de compresibilidad de la misma. En el apéndice A.5.2. se incluye una comparativa de los ajustes lineales llevados a cabo para tanto el modelo de tensiones como el basado en el módulo de Young. Mediante este método no se fue capaz de determinar la idoneidad de la elección de uno frente a otro.



**Figura 6.8.** Caracterización nanomecánica de adipocitos cultivados *in vitro* por medio de modelos alternativos basados en tensiones laterales de membranas. Ajuste de las curvas de fuerza-distancia a la ecuación 5.9. a) Resultados de pretensión aparente medidas en adipocitos de genotipos WT, KI y KO. b) Resultados de módulo de compresibilidad aparente del área de la membrana celular obtenidos en adipocitos tipo WT, KI y KO. En los gráficos, la significancia estadística está representada por:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*; y  $p < 0.001$  \*\*\*.

Los resultados expuestos en la figura 6.8.a muestran una pretensión ( $\widetilde{T}_0$ ) sin apenas diferencias entre los distintos genotipos. En cambio, la figura 6.8.b correspondiente al módulo de compresibilidad del área aparente de la membrana muestra grandes diferencias entre los genotipos. El WT presenta un valor de  $0.65 \pm 0.46$  nN/μm<sup>3</sup> (n = 12), mientras que el KI muestra valores de  $1.36 \pm 0.51$  nN/μm<sup>3</sup> (n = 12,  $p = 0.022$ ), y el KO de  $2.71 \pm 1.49$  nN/μm<sup>3</sup> (n = 12,  $p = 0.010$ ). El  $\widetilde{K}_A$  denota la dificultad de aumentar el área de la membrana. En los resultados expuestos se demuestra que el genotipo sin caveolas (KO) presenta la mayor resistencia a incrementar el tamaño de la membrana plasmática del adipocito. En contraposición, el genotipo con las caveolas perfectamente funcionales (WT) es el que mayor facilidad tiene para expandir esta bicapa lipídica. Finalmente, como ya se observó en los estudios de rigidez y peso de depósitos grasos, el genotipo con la CAV1 modificada presenta un comportamiento intermedio, ejemplificando como el aminoácido Tyr14 juega un cierto papel en la mecanoadaptabilidad de los adipocitos y, por ende, en la utilización de las caveolas como reservas de membrana capaces de actuar o aplanarse ante situaciones que lo requieran.

## 6.4. Conclusiones

Los efectos derivados de la ausencia y modificación de la caveolina-1 han sido estudiados con objeto de conocer con más profundidad los mecanismos mecanobiológicos inherentes al almacenamiento de grasa y a la lipodistrofia. Se han evaluado adipocitos y tejidos adiposos provenientes de ratones de tres clases genotípicamente distintas: WT (Cav1+/+, control), KO (Cav1-/-, ausencia de caveolina-1 y síntomas de lipodistrofia) y KI (Cav1Y14F/Y14F, expresión modificada de la caveolina-1).

La caracterización mecánica de los tejidos adiposos mediante curvas de fuerza-distancia obtenidas por AFM permitió observar un módulo de Young o resistencia a la deformación significativamente superior en tejidos adiposos del genotipo KO ( $622 \pm 200$  Pa), valores que duplicaban los obtenidos para el genotipo de control WT ( $318 \pm 175$  Pa). A su vez, el KI ( $422 \pm 163$  Pa) presentó un fenotipo intermedio. La contribución de la fibrosis a las medidas de rigidez de los tejidos adiposos fue descartada mediante la elección apropiada de la edad y dieta suministrada a los animales, y demostrando mediante histología (MTS) la presencia o ausencia de altos niveles de colágeno.

Una vez demostrada la inexistente influencia de la fibrosis sobre las diferencias en módulo de Young de los tejidos adiposos para los distintos genotipos, se evaluaron las respuestas mecánicas de adipocitos diferenciados *in vitro*. Los valores de módulo de Young obtenidos para los adipocitos demostraron que efectivamente los propios adipocitos eran la causa de la diferente respuesta de los tejidos adiposos ante estímulos mecánicos. Los adipocitos pertenecientes a los genotipos KI ( $1197 \pm 452$  Pa) y KO ( $1319 \pm 447$  Pa) mostraron un incremento estadísticamente significativo en su rigidez, valores con un aumento del 50% respecto al WT ( $812 \pm 306$  Pa), manteniendo al KI como un fenotipo con una respuesta intermedia.

La principal hipótesis detrás de estas diferencias a nivel celular recae en la presencia de las caveolas en la membrana plasmática de los adipocitos actuando como un buffer mecánico. Mediante imágenes TEM se ha demostrado que el KO está caracterizado por la total ausencia de este tipo de invaginaciones.

Por otro lado, se decidió aplicar una teoría más afín a la morfología del adipocito para la interpretación de las curvas de fuerza-distancia. Llevándonos a evaluar la respuesta mecánica de los adipocitos no simplemente a través de una magnitud relacionada con la dificultad de la deformación del material ( $E$ ), sino que se prefirió modelizar la respuesta de estas células como la de una carcasa sujeta a tensiones laterales (parámetros característicos:  $\widetilde{T}_0$  y  $\widetilde{K}_A$ ).

Aplicando este modelo de tensiones se obtuvo un mayor  $\widetilde{K}_A$  (módulo de compresibilidad aparente del área) para los adipocitos pertenecientes al genotipo KO ( $2.71 \pm 1.49$  nN/ $\mu\text{m}^3$ ) en comparación con los pertenecientes al genotipo WT ( $0.65 \pm 0.46$  nN/ $\mu\text{m}^3$ ), caracterizados por unas caveolas perfectamente funcionales, mostrando indicios de que la actuación de las caveolas y su aplanamiento favorece la expansibilidad de la membrana y su consecuente mecanoadaptación. Por último, se observó que los adipocitos KI ( $1.36 \pm 0.51$  nN/ $\mu\text{m}^3$ ) siguen manteniendo su tendencia manifiesta de fenotipo intermedio, demostrando que el residuo Y14 tiene un rol en el funcionamiento de las caveolas.

## 6.5. Referencias

1. World Health Organization Annual Report. (2017).
2. Lehnert, T., Sonntag, D., Konnopka, A., Riedel-Heller, S. & König, H. H. Economic costs of overweight and obesity. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 105–115 (2013).
3. Wang, J. *et al.* Trends in age of first-ever stroke following increased incidence and life expectancy in a low-income Chinese population. *Stroke* **47**, 929–935 (2016).
4. Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M. & Saha, S. Economic burden of obesity: A systematic literature review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**, 1–18 (2017).
5. Hammond, R. A. & Levine, R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **3**, 285–295 (2010).
6. Goodpaster, B. H. & Sparks, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* **25**, 1027–1036 (2017).
7. Vegiopoulos, A., Rohm, M. & Herzig, S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* **36**, 1999–2017 (2017).
8. Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X. & Chen, C. S. A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology. *Dev. Cell* **21**, 35–47 (2011).
9. Khan, T. *et al.* Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1575–1591 (2009).
10. Abdennour, M. *et al.* Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: Links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 898–907 (2014).
11. Liu, Y. *et al.* Accumulation and Changes in Composition of Collagens in Subcutaneous Adipose Tissue After Bariatric Surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 293–304 (2016).
12. Parton, R. G. *et al.* Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J. Cell Sci.* **120**, 2151–2161 (2007).
13. Parton, R. G. & Del Pozo, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 98–112 (2013).
14. Sinha, B. *et al.* Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* **144**, 402–413 (2011).
15. Kozera, L., White, E. & Calaghan, S. Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive ICl<sub>swell</sub> channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PLoS One* **4**, (2009).
16. Lee, J. & Schmid-Schönbein, G. W. Biomechanics of skeletal muscle capillaries: Hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. *Ann. Biomed. Eng.* **23**, 226–246 (1995).
17. Bruno C, Sotgia F, Gazzo E, et al. Caveolinopathies. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle Univ. Washington, Seattle; 1993-2018
18. Drab, M. *et al.* Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. *Science (80-. )*. **293**, 2449–2452 (2001).
19. Pietuch, A., Brückner, B. R., Fine, T., Mey, I. & Janshoff, A. Elastic properties of cells in the context of confluent cell monolayers: Impact of tension and surface area regulation. *Soft Matter* **9**, 11490–11502 (2013).
20. Karsch, S., Kong, D., Großhans, J. & Janshoff, A. Single-Cell Defects Cause a Long-Range Mechanical Response in a Confluent Epithelial Cell Layer. *Biophys. J.* **113**, 2601–2608 (2017).
21. Hategan, A., Law, R., Kahn, S. & Discher, D. E. Adhesively-tensed cell membranes: Lysis kinetics and atomic force microscopy probing. *Biophys. J.* **85**, 2746–2759 (2003).
22. Sen, S., Subramanian, S. & Discher, D. E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: Theoretical model and experiments. *Biophys. J.* **89**, 3203–3213 (2005).
23. Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. *Theory of Elasticity. Pergamon Press* **7**, (1970).
24. Morris, C. E. & Homann, U. Cell surface area regulation and membrane tension. *J. Membr. Biol.* **179**, 79–102 (2001).
25. Kennedy, D. J. *et al.* Central role for the cardiotoxic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* **47**, 488–495 (2006).
26. Armstrong, R. A., Slade, S. V. & Eperjesi, F. An introduction to analysis of variance (ANOVA) with special reference to data from clinical experiments in optometry. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **20**, 235–241 (2000).
27. de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B. & Nedergaard, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am. J. Physiol. Metab.* **308**, E1085–E1105 (2015).
28. Pol, A., Gross, S. P. & Parton, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.* **204**, 635–646 (2014).

## Conclusiones generales

La concepción de la célula como ente isótropo, homogéneo y elástico que implica la utilización de los denominados modelos de mecánica clásica (Hertz, Sneddon, etc) ha sido estudiada en la bibliografía. No obstante, en la presente tesis doctoral se ha evaluado la respuesta mecánica de este tipo de sistemas teniendo en cuenta comportamientos viscoelásticos. En concreto, se ha desarrollado un método experimental para el estudio de la reología nanomecánica de una célula viva con resolución frecuencia-temporal. Este método contiene la solución al problema tridimensional de indentación de materiales viscoelásticos independientemente del modelo mecánico escogido o la geometría del indentador utilizada.

La aplicación de este método ha permitido evaluar cuatro parámetros mecánicos distintos de una célula viva: módulo elástico, coeficiente de viscosidad, *“loss modulus”* y tiempo de relajación. La combinación de un estudio reológico en el rango de 0.2 – 4 Hz con otro centrado en la depolimerización del citoesqueleto de actina han permitido evidenciar el potencial analítico de esta metodología, aportando pruebas a favor de la descripción de la célula a partir de un modelo poroelástico.

Partiendo de las teorías elaboradas para la obtención de propiedades viscoelásticas a partir de los experimentos de indentación, se ha desarrollado e implementado una metodología de obtención de propiedades mecánicas de células con resolución espacial. La metodología que proponemos es tipo *“off-resonance”*, trabajando con curvas de fuerza-distancia y aplicando una excitación tipo onda triangular sobre la micropalanca.

Los mapas de propiedades mecánicas y topográficas de células (en particular, se utilizaron fibroblastos NIH 3T3) han permitido observar de forma cualitativa heterogeneidades y características de la arquitectura del citoesqueleto celular. Más en detalle, los resultados provenientes de los mapas de módulo de Young y *“pseudotopografía”* han sido contrastados con imágenes provenientes de microscopía de fluorescencia (tinciones en microfilamentos de actina y microtúbulos) permitiendo resolver estructuras características como, por ejemplo, estrellas de actina. Por otra parte, los mapas del coeficiente de viscosidad han mostrado ser más sensible a estructuras internas de la célula, y más en concreto, a los nucléolos.

Se ha realizado un estudio tridimensional de las propiedades mecánicas de este tipo de fibroblastos (NIH 3T3). Mediante la aplicación de filtros en la escala de valores del módulo de

Young unido a la asistencia de simulaciones por elementos finitos, se ha sido capaz de posicionar tridimensionalmente de forma semicuantitativa distintas fibras pertenecientes al citoesqueleto de estos fibroblastos.

Para el estudio de la respuesta mecánica de tejidos biológicos se han diseñado y fabricado puntas de AFM con el propósito de lidiar con el alto grado de heterogeneidad que presentan estos sistemas. En este sentido se adhirieron esferas con diámetros cercanos a 50  $\mu\text{m}$  a micropalancas con una constante de fuerza nominal cercana a 0.03 N/m.

Se han estudiado los efectos de implantes tridimensionales basados en rGO sobre la respuesta mecánica de médula espinal lesionada cuando se encuentran actuando como promotor de la regeneración neural. Se observó cómo estos implantes incrementaban la rigidez de la zona lesionada a la vez que mantenían invariable las propiedades mecánicas de la zona colindante o no lesionada. Estos resultados fueron parte de un proyecto multidisciplinar que acabó demostrando la capacidad de estos biomateriales para inducir la formación de microvasos sanguíneos y el crecimiento de axones mielinizados, indicando una remodelación del sistema microvascular.

Se han medido los efectos derivados de la ausencia y modificación de la caveolina-1 con objeto de conocer con más profundidad los mecanismos mecanobiológicos inherentes al almacenamiento de grasa y la lipodistrofia. Este estudio engloba tanto experimentos a nivel tisular como celular, aportándonos pruebas a favor de la acción de las caveolas como buffer mecánico. Siendo los adipocitos del genotipo con ausencias de caveolas los que presentaban una mayor resistencia a la deformación y una reducida capacidad hipertrófica. De la misma forma, eran los ratones pertenecientes a este genotipo los que presentaban síntomas de resistencia a la obesidad y lipodistrofia.

## Apéndices

### A.1. Información suplementaria al Capítulo 2

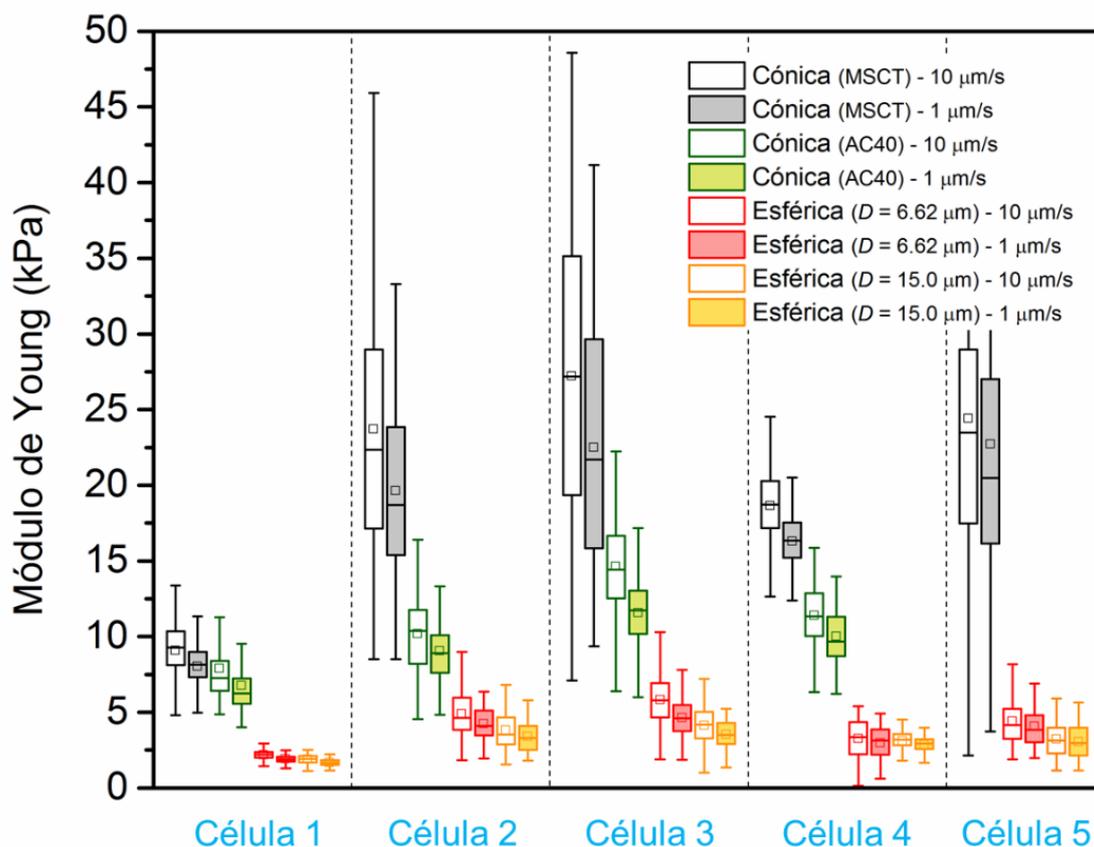
- A.1.1. Experimentos para la detección de los efectos del “*actin cortex*” sobre las medidas del módulo de Young

Este apéndice contiene la información referente a los experimentos que se han realizado tratando de comprobar las diferencias entre los valores de módulo de Young obtenidos tanto con puntas afiladas como romas. En la bibliografía se puede observar como para la misma célula las puntas cónicas o piramidales obtienen un valor de  $E$  mayor que las puntas esféricas<sup>1-9</sup>. A continuación, se expondrá una serie de experimentos y resultados sobre una misma línea celular que tendrán como objetivo estudiar este fenómeno.

En primera instancia, se realizaron experimentos en fibroblastos (“NIH 3T3 Cell Line murine”, Sigma-Aldrich) fijados con formaldehído (solución de formaldehído 4% en PBS, Thermo Fisher Scientific). Al tener que realizar el mismo experimento sobre la misma célula de forma reiterada con distintas geometrías en la punta de AFM, se decidió congelar la evolución temporal de la célula mediante una fijación de su actividad. Esto nos permitió medir el mismo conjunto de células con al menos cuatro diferentes tipos de puntas sin tener que considerar el parámetro temporal como relevante. Posteriormente, se procedió a confirmar este comportamiento también en células vivas, las cuales tienen mucha más relevancia gracias a su aplicabilidad en distintos ámbitos de la comunidad científica, tanto en biología como en medicina.

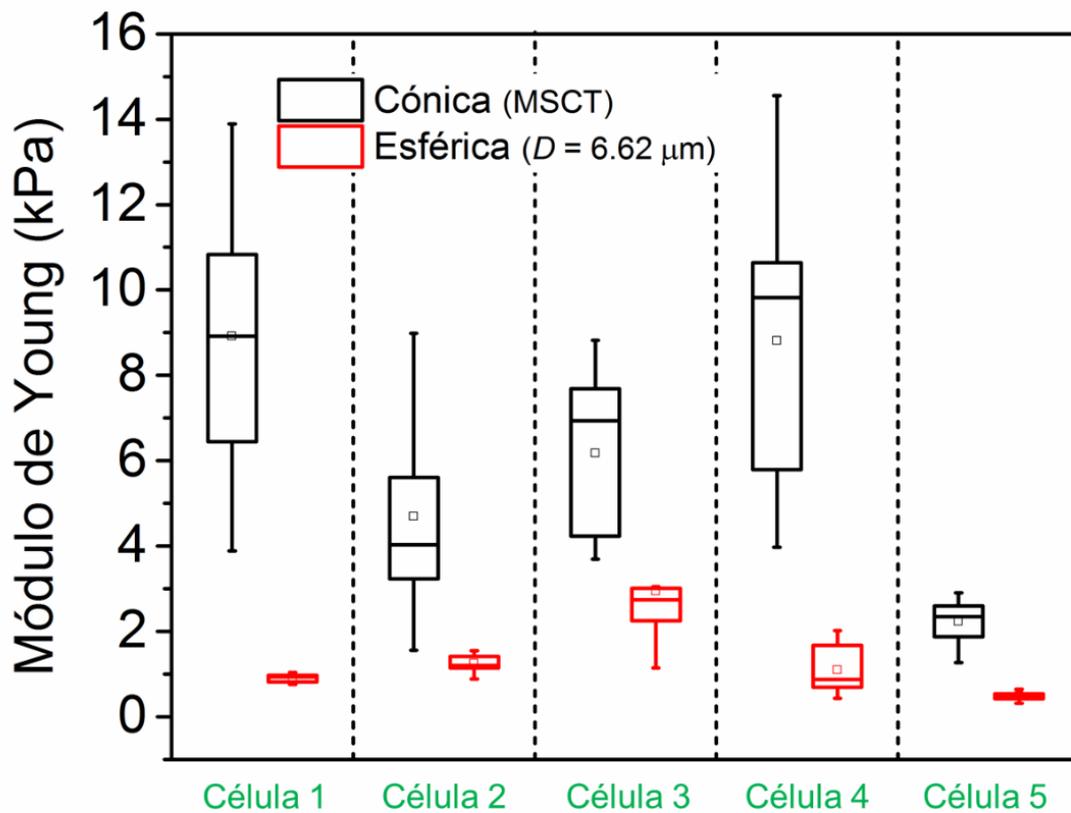
El protocolo experimental que se siguió durante estos experimentos de microscopia de fuerzas se basó en la aplicación de una fuerza máxima de 3 nN para células vivas y 4 nN para células fijadas con formaldehído. Primero se hacía un pre-escaneo de la célula para poder encontrar la zona más alta, normalmente correspondiente con la región localizada sobre el núcleo, de ahí se escogía un área de  $7 \times 7 \mu\text{m}^2$ , y finalmente se realizaban 512 curvas de fuerza-distancia sobre dicha área (la mitad a  $1 \mu\text{m/s}$  y la otra  $10 \mu\text{m/s}$ ). Para el caso de los fibroblastos vivos, el protocolo experimental se redujo considerablemente, realizándose exclusivamente medidas con dos tipos de puntas (una esférica y otra cónica), y únicamente a una velocidad de la punta de  $10 \mu\text{m/s}$ .

Los resultados de cinco distintos fibroblastos NIH 3T3 fijados con formaldehído se exponen en la figura A.1, esto es una parte representativa de todos los que fueron medidos. La obtención del módulo de Young se realizó asumiendo un modelo de mecánica de contacto exclusivamente elástico, como los introducidos en el capítulo 1 de esta tesis. Para puntas esféricas los valores medios de módulo de Young se encuentran en un rango entre 2 y 5 kPa. Por otro lado, para las puntas cónicas los valores medios se encuentran englobados entre 6 y 30 kPa. Esto implica un incremento de 3-6 veces entre los valores de módulo de elasticidad obtenidos para puntas cónicas con respecto a esos mismos valores para puntas esféricas.



**Figura A.1.** Resultados de módulo de Young obtenidos mediante curvas de fuerza-distancia sobre fibroblastos NIH 3T3 fijados con formaldehído. Presentamos los valores obtenidos para cuatro tipos de punta distintas: MSCT, AC40, CP-PNP-SiO-C y CP-PNP-SiO-E, las dos primeras con una geometría cónica mientras que las dos últimas con esférica. A su vez, se muestran resultados para dos velocidades diferentes de la punta (1 μm/s y 10 μm/s) para una indentación con forma triangular (frecuencia de modulación: 0.2 y 2 Hz, respectivamente).

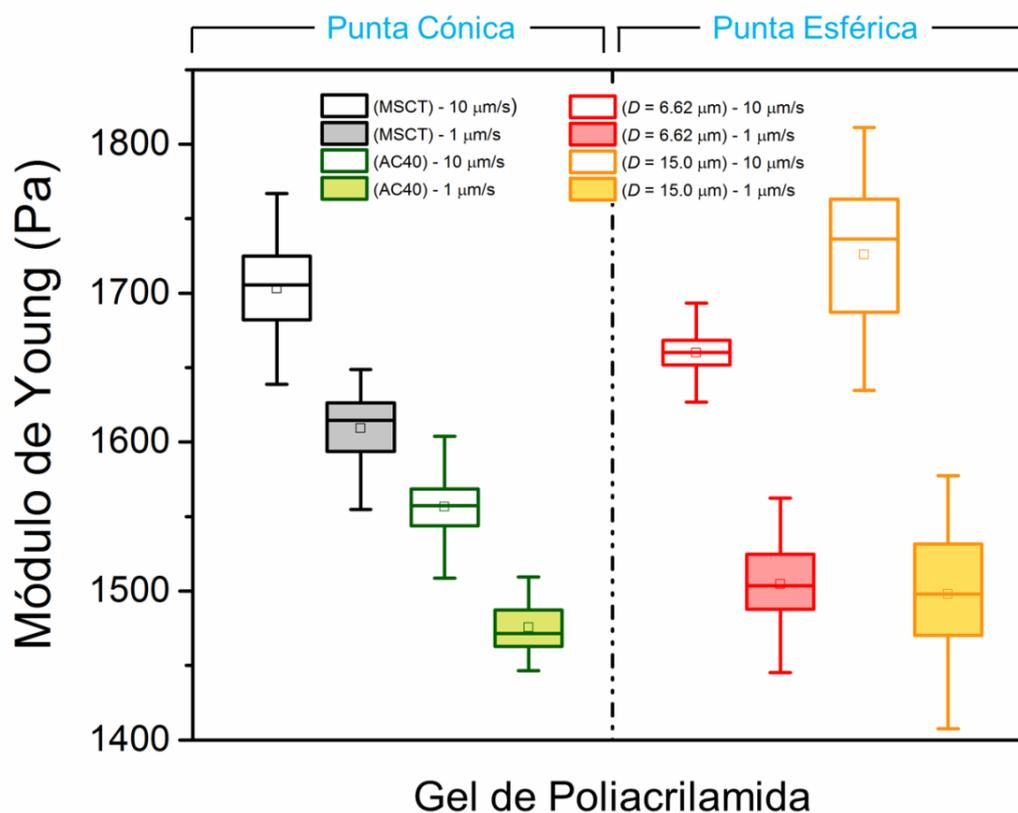
Por otro lado, la figura A.2 muestra los resultados de cinco fibroblastos vivos, exponiéndose solo valores de módulo de Young para dos configuraciones geométricas distintas y para una única velocidad. Esto nos sirve para corroborar que la disminución en los valores de módulo de Young para las medidas con puntas esféricas, no es comportamiento exclusivo de las células fijadas, sino que es extrapolable a las vivas también.



**Figura A.2.** Resultados de módulo de Young obtenidos mediante curvas de fuerza-distancia sobre fibroblastos vivos. Presentamos los valores obtenidos para dos tipos de punta distintas: MSCT (cónica) y CP-PNP-SiO-C (esférica). Los experimentos se realizaron con una indentación a velocidad constante de  $10 \mu\text{m/s}$  ( $2 \text{ Hz}$ ).

En paralelo, se realizaron una serie de experimentos de control. Estos consistieron en la aplicación del mismo protocolo experimental sobre muestras que presentan una conocida morfología espacial homogénea. Para ello, utilizamos geles de poliacrilamida (PA Gel) con un módulo de Young del mismo orden de magnitud que el que presentan estas células vivas. La preparación de las muestras de PA Gel se realizó siguiendo el procedimiento discreto en el Apéndice A.1.2.

En la figura A.3 se pueden observar los valores de módulo de Young obtenidos para el PA Gel con diferentes geometrías de la punta AFM. Si nos remitimos a una única velocidad ( $1 \mu\text{m/s}$ ), las puntas esféricas nos muestran valores de  $1.50 \pm 0.02$  y  $1.50 \pm 0.04$  KPa para diámetros de  $6.63 \mu\text{m}$  y  $10.00 \mu\text{m}$ , respectivamente. Por otro lado, las puntas afiladas muestran valores de  $1.61 \pm 0.02$  y  $1.48 \pm 0.02$  KPa para las puntas MSCT y AC40 (puntas cónicas con un semiángulo de  $18^\circ$ ), respectivamente. Estos resultados implican la inexistencia de una diferencia entre los valores medios obtenidos para ambos tipos de geometría en este tipo de geles. Esta invariancia ha sido comunicada en trabajos anteriores, con materiales como agarosa y distintos tipos de geles<sup>10,11</sup>. El aumento de la velocidad de la punta a la hora de realizar la curva de fuerzas (aumento de la frecuencia de modulación) de  $1 \mu\text{m/s}$  a  $10 \mu\text{m/s}$  ( $0.33 \text{ Hz}$  a  $3.33 \text{ Hz}$ ), conlleva un ligero incremento de  $100\text{-}200 \text{ Pa}$  en los valores obtenidos para el módulo de Young.



**Figura A.3.** Resultados de módulo de Young obtenidos mediante curvas de fuerza-distancia sobre gel de poliacrilamida. Presentamos los valores obtenidos para cuatro tipos de punta distintas: MSCT, AC40, CP-PNP-SiO-C y CP-PNP-SiO-E, las dos primeras con una geometría cónica mientras que las dos últimas con esférica. Además, se muestran los resultados para dos velocidades de indentación:  $1 \mu\text{m/s}$  y  $10 \mu\text{m/s}$  (correspondientes con frecuencias de modulación de 0.2 y 2 Hz, respectivamente; para una indentación con forma triangular).

#### – A.1.2. Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida (PA)

La preparación del gel de PA se lleva a cabo entre un cubreobjetos y un portaobjetos con la intención de crear una capa lo más homogénea posible. El cubreobjetos se quitará al finalizar la polimerización, dejando al polímero yacer sobre el cubreobjetos. Una de las caras del gel de dejará expuesta para poder caracterizar la respuesta mecánica del material a posteriori<sup>12</sup>.

#### Productos requeridos para la fabricación:

- Polvo de acrilamida,  $\geq 99\%$  (ref: A3553; Sigma-Aldrich) y polvo de bis-acrilamida, 99% (ref: 146072; Sigma-Aldrich).
- Tetrametilendiamina (TEMED),  $\sim 99\%$  (ref: T9281; Sigma-Aldrich).
- *N*-[3-(Trimetoxysilyl) propyl]ethylenediamine silane, 97% (ref: 104884; Sigma-Aldrich).
- Persulfato amónico (APS),  $\geq 99\%$  (ref: A3678; Sigma-Aldrich).
- Dimetildiclorosilano,  $\geq 99.5\%$  (ref: 440272; Sigma-Aldrich).
- Solución de Hidróxido de sodio (NaOH), 10 M en  $\text{H}_2\text{O}$  (ref: 72068; Sigma-Aldrich).
- Solución de glutaraldehído en  $\text{H}_2\text{O}$  (50 wt. %) (ref: 340855; Sigma-Aldrich).
- Agua ultra purificada con una resistividad de  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ .
- Tubos cónicos de polipropileno de 50 mL (ref: 339652; ThermoFisher).

**Procedimiento:**Preparaciones previas para los cubreobjetos y los portaobjetos:

- a) Los portaobjetos se tratan con una solución 0.1 M de NaOH durante 3 minutos. Se continua añadiendo una solución de N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine silane durante 3 minutos adicionales. Después se lava con agua ultra purificada (3 repeticiones de 10 minutos de duración), se cubre dicho cubreobjetos con una solución de 0.5 % glutaraldehído durante 30 minutos. Y, para finalizar, se lavan extensivamente con agua ultra purificada y se secan.
- b) Los cubreobjetos usados como parte superior (tapa) se tratan con dimetildiclorosilano para crear una capa hidrofóbica que reduzca la adhesión al gel, facilitando la posterior extracción de esta plancha de vidrio una vez que el gel esté completamente polimerizado.

Preparación y polimerización del gel de poliacrilamida:

- a) Preparación de 40 % (p/v) de acrilamida en agua y 2% (p/v) de bis-acrilamida en agua ultra purificada.
- b) Mezclado de ambas soluciones en un tubo de plástico (*Falcon*). A continuación, se eliminan las burbujas de aire en la mezcla resultante por medio de técnicas de vacío.
- c) Una vez retiradas las burbujas, se añade un 10 % de APS y el TEMED, dejando la solución polimerizar entre los cubreobjetos de cristal previamente tratados. La polimerización suele durar 30 minutos.

Finalmente, el cubreobjetos o tapa se retira, y el resultante cubreobjetos con el gel de PA adherido a su superficie es almacenado en un tubo cónico de polipropileno de 50 mL sumergido en agua ultra purificada.

## A.2. Información suplementaria al Capítulo 3

### – A.2.1. Protocolo de cultivo celular

**Preparación del medio de cultivo:**

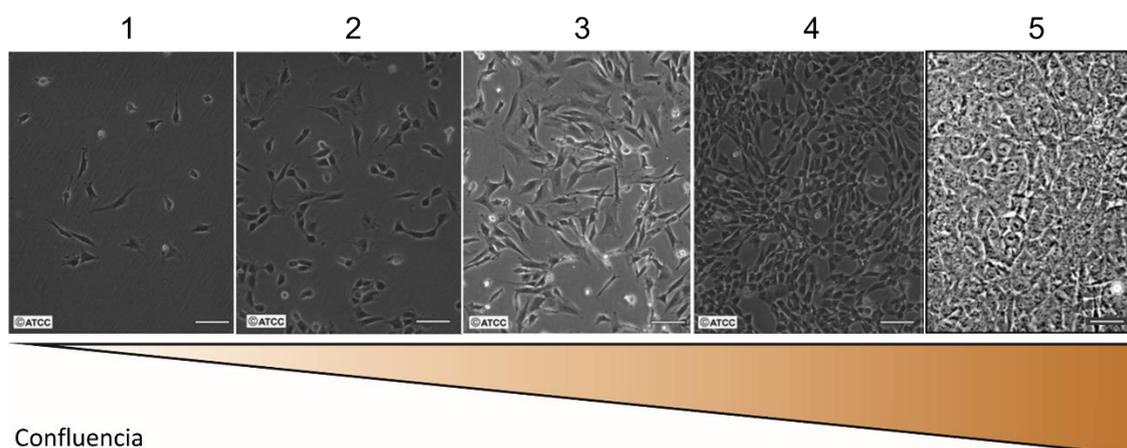
Antes de empezar a cultivar una línea celular, debemos saber cuál es el medio apropiado para nuestras células. El medio usado más frecuentemente en líneas tales como HeLa, MEFs y fibroblastos NIH 3T3 es el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). En nuestro caso en particular, el DMEM utilizado trae tanto glucosa como glutamina añadidas. En caso de no llevar estas moléculas, deben ser añadidas. El medio lleva nutrientes para las células, pero éstas necesitan factores de crecimiento y otras moléculas de señalización aportadas a través del suero. El suero más usado es el FBS (por sus siglas en inglés: "*Fetal Bovine Serum*") con una concentración aproximada del 10 % en el modo de cultivo. Afectando a la velocidad con la cual se dividirán las células. Para ayudar a evitar contaminaciones en nuestro cultivo es conveniente añadir antibióticos (penicilina/estreptomina) y antifúngicos (fungizona) al medio. Poner antibióticos o antifúngicos no garantiza que no vaya a haber contaminaciones, especialmente ante infecciones como las debidas a micoplasmas.

La conservación del DMEM después de su apertura debe realizarse a 4°C. El suero suele almacenarse a -80°C, aunque puede conservarse a -20°C para periodos cortos de tiempo. Los antibióticos se almacenan a -20 °C y una vez descongelados a 4°C. Tanto los medios de cultivo como los suplementos, y las correspondientes alícuotas, deben abrirse solo dentro de la campanada de cultivo celular. Antes de usar la campana, se deberá haber activado el funcionamiento del ventilador hasta alcanzar un flujo estabilizado.

### Seguimiento del cultivo:

Uno de los parámetros más relevantes a monitorizar durante el seguimiento del cultivo celular es la confluencia. La confluencia se suele definir como la superficie de la placa de cultivo que se encuentra ocupada por células. Las células van creciendo a lo largo del tiempo de forma que van aumentando el espacio ocupado en la placa, llegando a un punto en el cual el espacio libre disponible comienza a ser limitante, las células reciben señales de inhibición por contacto y pueden empezar procesos de daño celular, por lo que es conveniente cambiarlas de placa.

La monitorización se realizará por medio de inspección visual mediante un microscopio óptico invertido. En la figura A.1 se incluyen figuras de distintas confluencias para células del tipo MEF.



**Figura A.4.** Imágenes de MEFs en cultivo pertenecientes a la base de datos de la ATCC (American Type Culture Collection<sup>13</sup>). Están ordenadas por confluencia creciente, teniendo en la posición 1 una densidad de células muy baja y en la posición 5 una muy alta confluencia.

Para detalles precisos en el mantenimiento de las líneas celulares se recomienda consultar las indicaciones del proveedor. En todos los casos, se han seguido las instrucciones proporcionadas en las especificaciones técnicas de las líneas celulares utilizadas. Situaciones como las ilustradas en las imágenes 4 y 5 requerirían de la tripsinización y pase del cultivo inmediatos.

En los experimentos con células en cultivo realizados en la presente tesis doctoral se ha intentado mantener un criterio de confluencia constante para todas las muestras del mismo tipo celular (imagen 2), a la vez que se mantenía un criterio de pase a una confluencia semejante (imagen 3).

### Pase de células (tripsinización):

Una vez alcanzada la confluencia adecuada, y dependiendo de la rapidez de crecimiento del cultivo se procederá a realizar un pase. La velocidad con la que crezcan las células dependerá tanto de la línea celular como del medio utilizado.

Materiales utilizados:

- Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (ref: 11965084, gibco™) suplementado con un 10 % de FBS (ref: F0804; Sigma-Aldrich) y penicilina/estreptomicina (ref: 15143-122; gibco™).
- Tampón fosfato salino (PBS), polvo (ref: P3563; Sigma-Aldrich).
- Tripsina, 0.25 % Trypsin-EDTA (ref: 25200-072; gibco™).
- Placas *Petri* con tratamiento para cultivo celular *BioLite* (ref: 130180; ThermoFisher Scientific).
- Pipetas serológicas de 10 mL (ref: 10048-945; eppendorf).

Procedimiento:

1. Preparar la campana de cultivo de forma adecuada, encendiendo el ventilador y obteniendo un flujo adecuado.  
**Nota:** Paso esencial previo a cualquier tratamiento o procedimiento relacionado con cultivos celulares que requiera de condiciones de trabajo estériles.
2. Calentar con ayuda del baño térmico hasta los 37 °C el medio de cultivo (correctamente suplementado), el PBS y la tripsina.  
**Nota:** Antes de introducir cualquier tipo de material dentro de la campana, deberá ser rociado con etanol 70 % en agua y secado con un trozo de papel.
3. Retirar el medio de las placas de cultivo con ayuda de una pipeta y tratarlo como residuo líquido contaminado.
4. Añadir PBS con cuidado, preferiblemente usando las paredes de la placa como zona de choque. El volumen utilizado no es crucial en este paso, el único objetivo que se persigue es la limpieza de la placa de restos del medio antiguo. Finalmente, el PBS es retirado y tratado como residuo. Este paso se repetirá al 2-3 veces, en caso de ser necesario.
5. Anadir la tripsina para levantar las células (“tripsinización”). El volumen introducido tampoco es especialmente relevante, lo único a tener en cuenta es que debe cubrir la superficie en la que se encuentren las células. El tiempo de actuación no debe superar los 5-10 min para evitar daños en la membrana plasmática.  
**Nota:** Este paso debe realizarse a 37 °C.
6. A continuación, trabajando sobre la misma placa se neutralizará la suspensión celular (tripsina) añadiendo al menos el doble de volumen de medio que de tripsina. Si trabajamos con el tamaño estándar de placas *Petri*, 100 mm x 15 mm; solemos utilizar entre 1.5-2 mL de tripsina. Una vez haya actuado, introducimos 10 mL de medio.  
**Nota:** Mezclar bien ambas soluciones, pipeteando repetidamente con suavidad para deshacer posibles grupos de células e intentando no producir burbujas de aire.
7. La dilución para el pase de las células debe ser entre 1:2 y 1:5 (ver indicaciones de la empresa suministradora para detalles concretos según tipo celular). En función de esta dilución, escogeremos la cantidad adecuada de medio con células suspendidas y lo verteremos con cuidado sobre una placa llenada con medio (la cantidad de medio que utilizaremos habrá sido calculado previamente de manera que se llene completamente la placa).  
**Nota:** El contenido final de la nueva placa se mezclará mediante un movimiento en cruz. Este movimiento permitirá que las células puedan dispersarse por toda la placa y no queden concentradas en un único punto de la superficie total. Si no se lleva a cabo

adecuadamente este paso, las células quedarán acumuladas y habrá grandes densidades en áreas muy localizadas.

8. Comprobar con el microscopio óptico a las 2 horas que las células se encuentran adheridas a la placa *Petri*.

## A.3. Información suplementaria al Capítulo 4

### – A.3.1. Protocolo de tinción de células fijadas

El protocolo que describiremos a continuación consiste en una doble tinción centrada en dos componentes del citoesqueleto celular: los microfilamentos de actina y los microtúbulos, para la posterior visualización de los mismos mediante microscopía de fluorescencia. En concreto, el verde será el color asignado a la actina y el rojo a la tubulina.

#### Productos:

- Solución de formaldehído (ref: 28908; ThermoFisher Scientific) 4% en PBS.
- Solución de Triton X-100 (ref: T8787; Sigma-Aldrich) en PBS.
- Solución de BSA (por sus siglas en inglés: *Bovine Serum Albumin*) (ref: A7906; Sigma-Aldrich) 3%, 1% y 0.2 % en PBS.
- Anticuerpo primario: *anti- $\alpha$ -tubulin (bovine), mouse IgG1, monoclonal 236-10501* 200  $\mu$ g/ml (ref: A11126; invitrogen™ - ThermoFisher Scientific) en PBS (suplementado con un 1% BSA).
- Anticuerpo secundario: *AlexaFluor™ 594 F(ab')2 fragment of rabbit anti-mouse IgG (H+L)* (ref: A21205; invitrogen™ - ThermoFisher Scientific), solución comercial 2 mg/mL en PBS.
- AlexaFluor™ 488 Phalloidin (ref: A12379; invitrogen™ - ThermoFisher Scientific) diluado en metanol.

#### Procedimiento:

El protocolo expuesto hará referencia al volumen de una placa *Petri* de 35 mm y una confluencia del cultivo celular tipo imagen 2-3. Este procedimiento ha sido exitosamente probado en líneas celulares como HeLa y fibroblastos comerciales NIH 3T3.

1. Fijación de las células con una solución de paraformaldehído al 4 %. Primero se retira el medio de cultivo y se limpia la muestra con PBS pipeteando repetidamente. Tiempo de exposición: 10-15 minutos. Volumen recomendado: 1 mL.
2. Retirar la solución fijadora y volver a lavar con PBS.
3. Permeabilización de las células mediante una solución de 0.5 % Triton X-100 (v/v) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Extraer la solución permeabilizadora y limpiar con PBS repetidamente (2-3 veces).
5. Incubación con una solución bloqueadora de BSA al 3% (p/v) en PBS. Tiempo: 60 minutos (con la posibilidad de dejarlo actuar durante la noche).
6. Añadir el anticuerpo primario. Primero, necesitaremos preparar una solución madre añadiendo 250  $\mu$ L de PBS con 1% BSA (solución de bloqueo) al producto denominado *anti- $\alpha$ -tubulin (bovine), mouse IgG1, monoclonal 236-10501*, directamente introducido en el vial comercial. Una vez preparada esta primera solución, correspondiente a una

concentración de 200 µg/mL, se diluirá a 1 µg/mL y se incubarán las células fijadas durante 3 horas en la misma.

**Nota:** Para una placa *Petri* de 35 mm se usarán 10 µL de la solución inicial mezclado con 2 mL de 1% BSA en PBS para conseguir la concentración de 1 µg/mL.

7. Añadir el anticuerpo secundario (*AlexaFluor™ 594 F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse IgG (H+L)*) en una concentración de 2 µg/mL en PBS (0.2 % BSA) e incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente.

**Nota:** Para los volúmenes sugeridos a lo largo de todo el protocolo se recomienda 2 µL de la solución comercial de *Alexa Fluor™ 594* en 2 mL de PBS con 0.2 % de BSA.

8. Una vez pasados los 45 minutos se limpiará la muestra repetidas veces con PBS para eliminar el anticuerpo fluorescente que no se haya unido.
9. Añadir el anticuerpo para la actina. Como usamos una tinción basada en faloidina (compuesto orgánico de tipo toxina usada muy a menudo en técnicas de fluorescencia para investigar la distribución de F-actin en las células), simplemente tendremos que añadir 20 µL de la solución comercial de *AlexaFluor™ 488 Phalloidin* mezclado con 1 mL de PBS durante 20 minutos.
10. Finalmente, limpiar pipeteando con PBS. Para su almacenamiento se mantendrán las células fijadas teñidas inmersas en PBS a 4°.
11. La célula esta lista para su visualización por microscopía de fluorescencia (ver antes de 24 horas).

### – A.3.2. Protocolo de tinción de células vivas

El protocolo que describiremos a continuación consiste en una doble tinción centrada en los microfilamentos de actina (color verde) y el núcleo celular (color rojo).

#### **Productos:**

- Medio de cultivo celular (DMEM con los suplementos pertinentes).
- Solución BacMam Actin-GFP (ref: C10582; invitrogen™ - ThermoFisher).
- Solución BacMam Nucleus-RFP (ref: C10603; invitrogen™ - ThermoFisher).
- Solución denominada BacMam Enhancer (ref: B10107; invitrogen™ - ThermoFisher). Según es proporcionada por el fabricante trae dos componentes que han de mezclarse. Verter el componente B (DMSO) dentro del vial del Enhancer kit (componente A).

#### **Procedimiento:**

El protocolo expuesto hará referencia a un volumen relacionado con una placa *petri* de 35 mm y una confluencia del cultivo celular tipo imagen 1-2. Este procedimiento ha sido exitosamente probado en líneas celulares como HeLa y fibroblastos comerciales NIH 3T3.

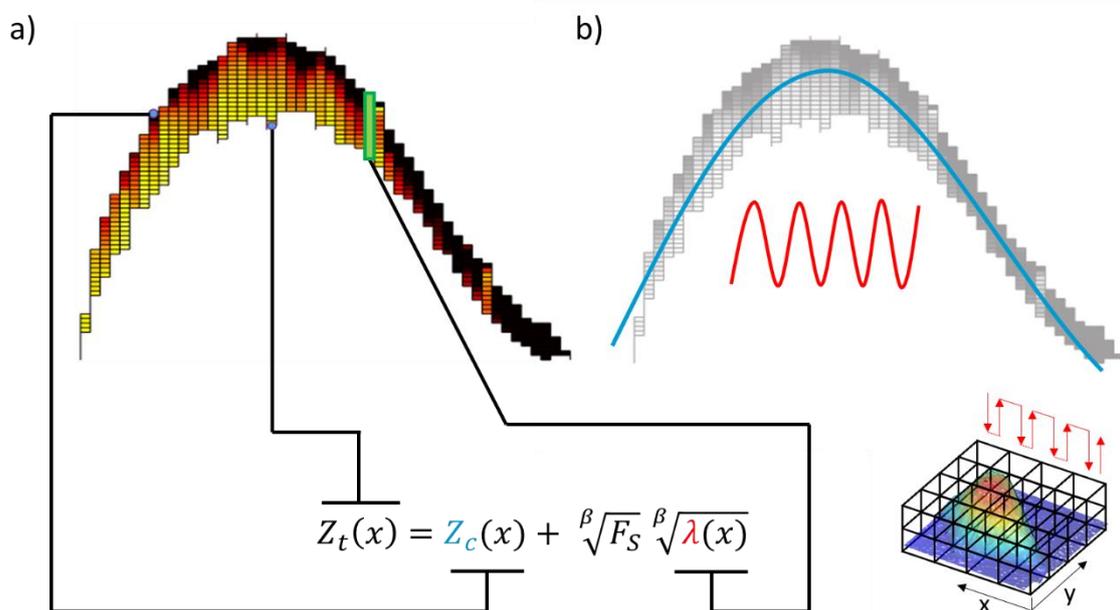
1. Añadir 20 µL de ambas soluciones BacMam al medio de cultivo celular con un volumen inicial de 2 mL. Introducir las células en la incubadora durante 16 horas.
2. Cambiar el medio de cultivo por otro que contendrá el BacMam Enhancer. Para un volumen de medio de 2 mL, añadir 6 µL de dicha solución. Posteriormente, incubar las células a 37 °C durante 60-90 minutos.
3. Retirar el medio y añadir el medio de cultivo estándar. Incubar durante 16 horas y visualizar en microscopio de fluorescencia.

### – A.3.3. Detalles sobre la obtención del canal de “pseudotopografía”

Partiendo de la expresión (1.9) para una indentación tridimensional introducida en el capítulo 1, podemos adaptarla al problema bidimensional que actualmente nos incumbe. Para ello, la reescribiremos en función del punto de contacto  $Z_c$  (equivalente a la topografía real de la célula) y la posición de la punta  $Z$ .

$$F(x, y) = \lambda(x, y) [Z(x, y) - Z_c(x, y)]^\beta \quad (\text{A.3.1})$$

En la ecuación A.3.1 tenemos las variables  $x$  e  $y$  que representan las posiciones espaciales que definen el mallado del “Force Volume”.  $\lambda(x, y)$  es un coeficiente que depende del área de contacto punta-muestra y de la dureza del material justo en el pixel sobre el que estamos trabajando.  $\beta$  es un exponente que está relacionado con la geometría de la punta.



**Figura A.5.** Esquema ilustrativo del proceso de obtención del canal denominado como “pseudotopografía”. a) Se ejemplifica sobre una línea de curvas fuerza-distancia perteneciente al eje  $x$ , a que parte de los datos obtenidos corresponden cada una de las magnitudes envueltas en la ecuación 4.3. b) Ejemplo del sentido que tiene realizar una transformada de Fourier espacial sobre nuestros datos experimentales. Dependiendo si destacamos altas o bajas frecuencias, observaremos una contribución mayor de  $Z_c$  o  $\lambda$ .

Por simplicidad podemos reducir el problema y trabajar línea a línea. Los resultados obtenidos serán fácilmente extrapolables al caso bidimensional. Si imponemos unas condiciones de “setpoint”:  $F(x) = F_S$  ( $F_S$  es la fuerza máxima ejercida, igual para cada uno de los puntos de la línea), y  $Z(x) = Z_t(x)$  ( $Z_t(x)$  es la indentación máxima en la célula, que dependerá de la dureza del material en cada pixel y de la fuerza máxima ejercida  $F_S$ ); la ecuación A.3.1 para este caso particular se transformará en:

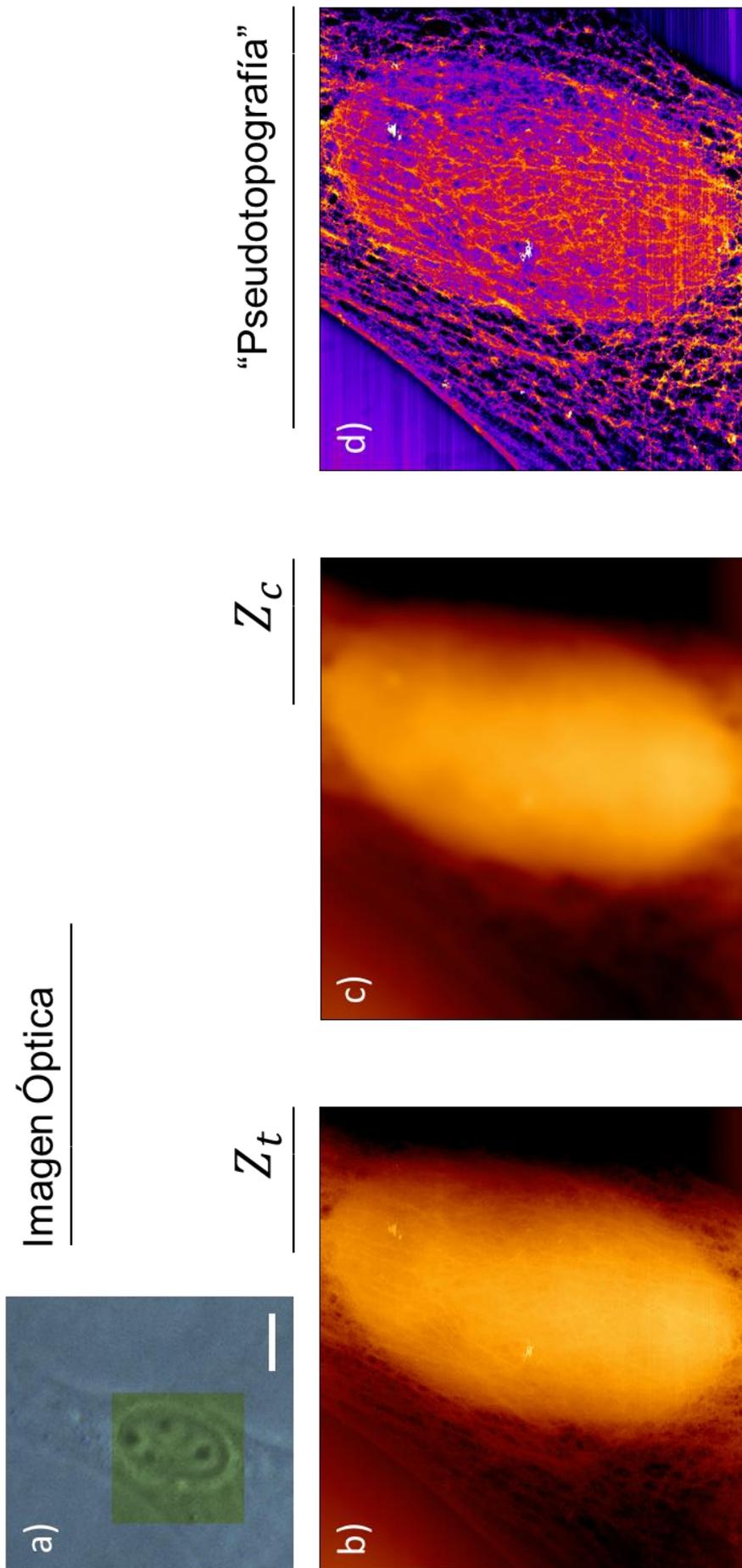
$$F_S = \lambda(x) [Z_t(x) - Z_c(x)]^\beta \quad (\text{A.3.2})$$

El significado de cada uno de los componentes de la ecuación A.3.2 está representado en la figura A.5.a, correspondiendo con un esquema diseñado para una única línea de datos de toda la matriz. Si trabajamos con la topografía dada por el AFM  $Z_t(x)$ , a un “*setpoint*” determinado, podemos observar que reescribiendo A.3.2 tiene dos contribuciones (ecuación A.3.3): una dependiente de la morfología de la célula ( $Z_c$ ) y otra que está relacionada con las propiedades internas de la misma ( $\lambda$ ).

$$Z_t(x) = Z_c(x) + \sqrt[\beta]{F_S} \sqrt[\beta]{\lambda(x)} \quad (\text{A.3.3})$$

Si hacemos la transformada de Fourier de A.3.3, tendremos una clara contribución a bajas frecuencias espaciales principalmente proveniente de  $Z_c$ , mientras que  $\lambda(x)$  tendrá una aportación a frecuencias altas. Ver figura A.5.b con un esquema sobre este razonamiento. Por tanto, si aplicamos un filtro pasa alta podremos obtener una “pseudotopografía” que contendrá información combinada de las propiedades tanto mecánicas como topográficas de la célula. No obstante, si aplicamos un filtro pasa baja obtendremos una imagen muy cercana a la de la topografía real de la célula, que viene dada por cada uno de los puntos de contacto que se determinan para cada curva de fuerza-distancia.

La figura A.6 ejemplifica las diferentes etapas y resultados que se obtienen al aplicar el procedimiento de filtrado por transformada de Fourier que acabamos de describir. Podemos observar como inicialmente partimos de la topografía a un “*setpoint*” de 4 nN y extraemos los dos nuevos canales figura A.6.c y A.6.d. La “pseudotopografía” que hemos desarrollado en esta sección, basada en un filtro pasa alta espacial, nos aporta una gran definición a la hora de evaluar la estructura del citoesqueleto. Gran parte del citoesqueleto resuelto en la figura A.6.d corresponde con la corteza celular, ya que se encuentra justo subyacente a la membrana, y es lo primero que la punta de AFM siente al hacer un experimento de indentación.

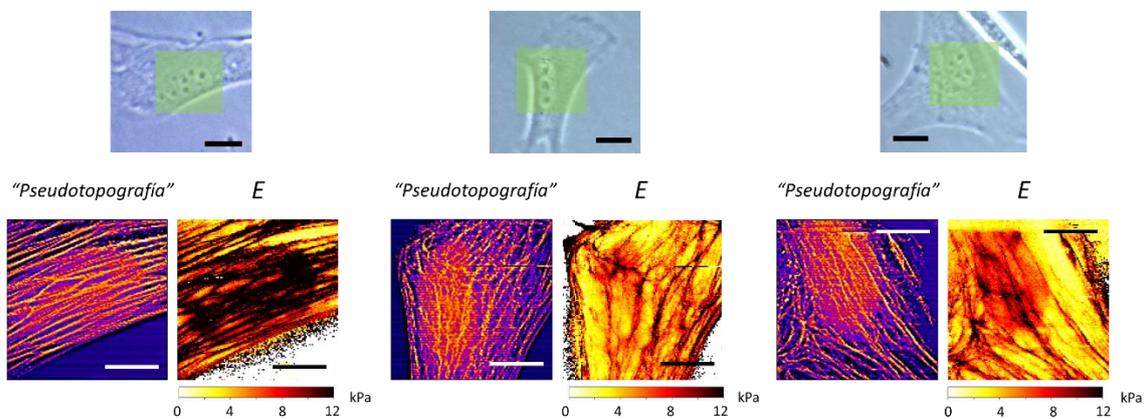


**Figura A.6.** Resultados de la aplicación de los filtros de frecuencia espacial mediante el método basado en la transformada de Fourier. a) Imagen óptica de la célula (fibroblasto NIH 3T3) sobre la cual aplicaremos la metodología de obtención de la “pseudotopografía”, la zona resaltada en verde corresponde con el área sobre la cual se han realizado los experimentos de FV con el AFM. Escala 10  $\mu\text{m}$ . b) Topografía proporcionada por el AFM a un “setpoint” de 4 nN. El área total de escaneo son 30 x 30  $\mu\text{m}^2$ , con un pixelado de 512 x 512, dando una resolución lateral aproximada por pixel de 58 nm. c) La aplicación de un filtro pasa baja da lugar a una imagen muy cercana a la topografía dada por el punto de contacto de las curvas de fuerza-distancia. d) Imagen resultante de la “pseudotopografía” obtenido mediante la aplicación de un filtro pasa alta. Escala (b)-d) 5  $\mu\text{m}$ .

### – A.3.4. Aplicabilidad de la metodología de estudio tridimensional a células vivas

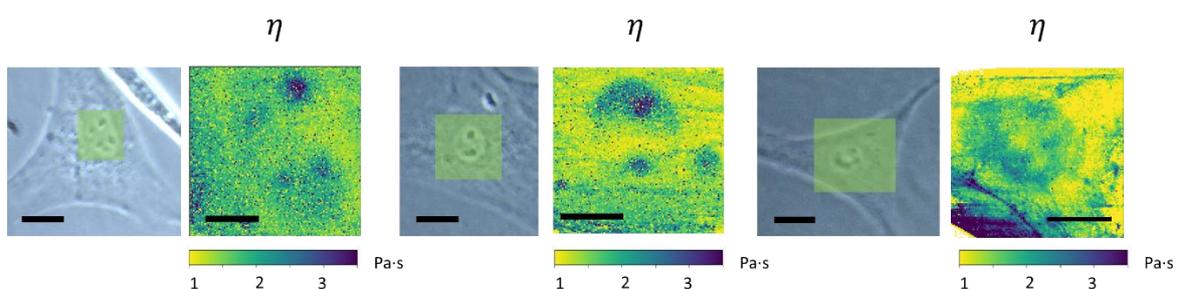
Durante el capítulo 4 de la presente tesis doctoral se han introducido una serie de resultados experimentales basados en el desarrollo de una metodología capaz de extraer información mecánica de células de forma local a escala nanométrica. Los resultados mencionados y las figuras presentadas a lo largo de dicho capítulo han sido obtenidos a partir de células fijadas. En este apéndice demostramos la aplicabilidad de esta técnica para células vivas, permitiéndonos extrapolar los resultados obtenidos y las discusiones realizadas para células fijadas al conjunto de células vivas. Las células utilizadas son fibroblastos NIH 3T3 y las medidas expuestas tanto en la figura A.7 como A.8 pertenecen a esta línea celular.

Obtención de alta resolución en la corteza celular y el citoesqueleto mediante los canales de “pseudotopografía” y módulo de Young.



**Figura A.7.** Propiedades mecánicas obtenidas a partir de tres células vivas distintas. Para cada una de ellas se ha incluido una imagen óptica, sobre la cual se especifica el área de escaneo escogida para realizar las medidas de AFM. Se muestran los canales de “pseudotopografía” y módulo de Young, permitiéndonos observar el citoesqueleto de las células. Las escalas en las imágenes ópticas son de 15  $\mu\text{m}$ . Las barras de escala para los canales derivados del AFM son de 10  $\mu\text{m}$ .

Demostración de la posibilidad de visualizar estructuras internas de las células mediante el canal correspondiente a la viscosidad. Es posible observar los nucléolos mediante técnicas derivadas del AFM también en células vivas, comprobando que las capacidades de adquisición de datos también en profundidad permanecen intactas al ser aplicadas en células vivas.



**Figura A.8.** Mapas de coeficiente de viscosidad obtenidas en tres fibroblastos NIH 3T3 distintos. Para cada una de ellas se ha incluido una imagen óptica, sobre la cual se especifica el área de escaneo escogida para

realizar las medidas de AFM. Las escalas en las imágenes ópticas son de 15  $\mu\text{m}$ . Las barras de escala para los canales derivados del AFM son de 10  $\mu\text{m}$ , exceptuando la célula de la izquierda de la figura, en la cual la escala corresponde a 5  $\mu\text{m}$ .

## A.4. Información suplementaria al Capítulo 5

### – A.4.1. Tablas de los estudios estadísticos desarrollados

En este apéndice se incluyen las tablas que resumen el estudio estadístico realizado en el trabajo de biomedicina que se describe a lo largo del capítulo 5 de la presente tesis doctoral.

	rGO "scaffold"	GM fijada	WM fijada	GM viva	WM viva
<b>GM fijada</b>	1				
<b>WM fijada</b>	<0.001	<0.001			
<b>GM viva</b>	<0.001	<0.001	0.562		
<b>WM viva</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
<b>Neuronas</b>	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001

**Tabla A.1.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) entre los módulos de Young de neuronas, rGO "scaffold" y las diferentes regiones de la médula espinal (sustancia gris y blanca para tanto tejidos vivos como fijados). Al ser las varianzas heterogéneas entre grupos (test de Levene) se optó por un tratamiento post-hoc tipo Games-Howell.

	rGO implantado	rGO "scaffold"	Médula sana	Interfase
<b>rGO "scaffold"</b>	<0.001			
<b>Médula sana</b>	<0.001	<0.001		
<b>Interfase</b>	<0.001	<0.001	<0.001	
<b>Hemimédula Izquierda</b>	<0.001	<0.001	0.366	<0.001

**Tabla A.2.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) entre los módulos de Young del hemimédula izquierda (incluyendo tanto sustancia gris como blanca), interfase, tejido vivo normal (incluyendo también sustancia gris y blanca) y "rGO scaffold" antes y después del implante. Al ser las varianzas heterogéneas entre grupos (test de Levene) se optó por un tratamiento post-hoc tipo Games-Howell.

## A.5. Información suplementaria al Capítulo 6

### – A.5.1. Tablas de los estudios estadísticos desarrollados

En este apéndice se incluirán las tablas que resumen el estudio estadístico llevado a cabo en el trabajo de biomedicina que se describe a lo largo del capítulo 6 de la presente tesis doctoral.

<b>Peso Total HFD (Scheffé)</b>			<b>Peso Total ND (Scheffé)</b>		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.19036		KI	<0.001	
KO	<0.001	<0.001	KO	0.0063	0.8097

**Tabla A.3.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) de los pesos totales de animales pertenecientes a genotipos WT, KI y KO (incluyendo tanto HFD como ND).

<b>Peso Subcutánea HFD (Scheffé)</b>			<b>Peso Visceral HFD (Games-Howell)</b>		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.4892		KI	0.026	
KO	<0.001	<0.001	KO	<0.001	<0.001

<b>Peso Subcutánea ND (Scheffé)</b>			<b>Peso Visceral ND (Games-Howell)</b>		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.507		KI	0.2305	
KO	0.026	0.025	KO	0.006	0.1318

**Tabla A.4.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) de los pesos de los depósitos adiposos tanto a nivel subcutáneo como visceral en animales pertenecientes a genotipos WT, KI y KO (incluyendo tanto HFD como ND).

<b>E Tejido Adiposo HFD (Scheffé)</b>			<b>E Tejido Adiposo ND (Scheffé)</b>		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.19036		KI	<0.001	
KO	<0.001	<0.001	KO	0.0063	0.8097

**Tabla A.5.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) del módulo de Young obtenidos para tejidos adiposos pertenecientes a animales del genotipo WT, KI y KO (incluyendo datos tanto de HFD como de ND).

<b>Fibrosis Subcutánea HFD</b> (Games-Howell)			<b>Fibrosis Visceral HFD</b> (Games-Howell)		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.644		KI	0.833	
KO	0.042	0.038	KO	0.008	0.007

<b>Fibrosis Subcutánea ND</b> (Scheffé)			<b>Fibrosis Visceral ND</b> (Scheffé)		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.6533		KI	0.9809	
KO	0.9774	0.7743	KO	0.1375	0.1898

**Tabla A.6.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) de la fibrosis medida por histología tanto para grasa subcutánea como visceral de animales pertenecientes a genotipos WT, KI y KO (incluyendo tanto HFD como ND).

<b>E Adipocitos</b> (Scheffé)		
	WT	KI
KI	0.0125	
KO	<0.001	0.630

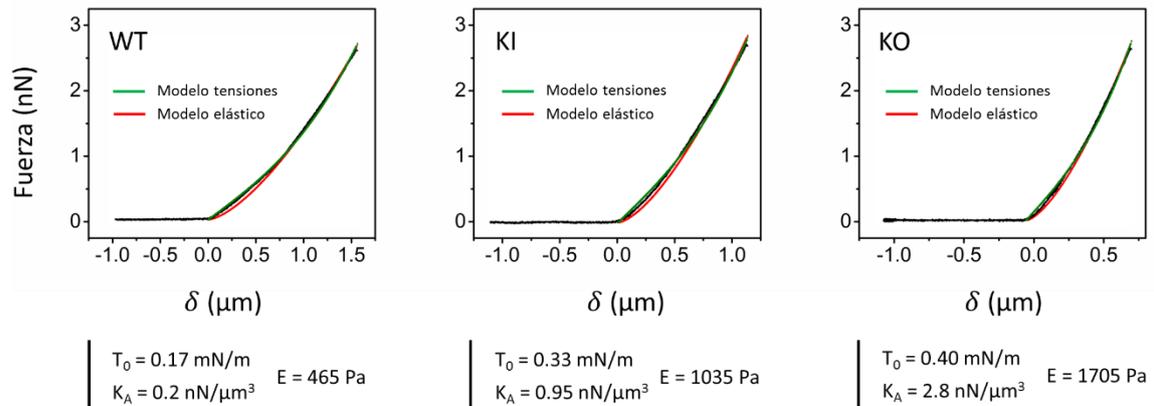
  

<b><math>\bar{T}_0</math> Adipocitos</b> (Scheffé)			<b><math>\bar{K}_A</math> Adipocitos</b> (Games-Howell)		
	WT	KI		WT	KI
KI	0.2227		KI	0.022	
KO	0.0134	0.9311	KO	0.010	0.152

**Tabla A.7.** Comparación estadística (valor de  $p$ ) del módulo de Young obtenidos para adipocitos pertenecientes a animales del genotipo WT, KI y KO. También se ha incluido la comparación estadística para los parámetros derivados del modelo de tensiones: pretensión aparente ( $\bar{T}_0$ ) y módulo de compresibilidad aparente del área de la membrana ( $\bar{K}_A$ ).

## – A.5.2. Comparativa por ajustes lineales entre el modelo elástico de Hertz y el modelo de tensiones

En este apéndice mostraremos unos ejemplos representativos del ajuste por mínimos cuadrados a los dos modelos que se han introducido para describir la respuesta mecánica de los adipocitos.



**Figura A.9.** Curvas de fuerza-distancia representativas que han sido obtenidas por medio de un AFM en adipocitos provenientes de genotipos WT, KI y KO. Los resultados de los ajustes tanto al modelo elástico de Hertz como al modelo de tensiones están incluidos justo debajo de cada curva.

Como es posible apreciar de ambos ajustes, la respuesta mecánica obtenida mediante técnicas de indentación con AFM puede ser ajustada a ambos modelos con cierta seguridad. Sin embargo, esta comparativa no es capaz de relevar cuál de los modelos describe mejor el comportamiento mecánico de los adipocitos. Quizá sea ligeramente más preciso el ajuste al modelo de tensiones, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta que dicho modelo tiene dos grados de libertad en contraposición al único grado de libertad ( $E$ ) que tiene el modelo elástico para realizar el ajuste (se ha asumido un coeficiente de Poisson de 0.5 para las células).

## A.6. Referencias

- Harris, A. R. & Charras, G. T. Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology* **22**, (2011).
- Carl, P. & Schillers, H. Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: Data acquisition and processing. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **457**, 551–559 (2008).
- Rico, F. *et al.* Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **72**, 1–10 (2005).
- Darling, E. M., Topel, M., Zauscher, S., Vail, T. P. & Guilak, F. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. *J. Biomech.* **41**, 454–464 (2008).
- Vargas-Pinto, R., Gong, H., Vahabikashi, A. & Johnson, M. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements. *Biophys. J.* **105**, 300–309 (2013).
- Lekka, M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience* **6**, 65–80 (2016).
- Krause, M., Te Riet, J. & Wolf, K. Probing the compressibility of tumor cell nuclei by combined atomic force-confocal microscopy. *Phys. Biol.* **10**, (2013).
- Targosz-Korecka, M., Malek-Zietek, K. E., Brzezinka, G. D. & Jaglarz, M. Morphological and nanomechanical changes in mechanosensitive endothelial cells induced by colloidal AFM probes. *Scanning* **38**, 654–664 (2016).
- Ng, L. *et al.* Nanomechanical properties of individual chondrocytes and their developing growth factor-stimulated pericellular matrix. *J. Biomech.* **40**, 1011–1023 (2007).

10. Stolz, M. *et al.* Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **86**, 3269–3283 (2004).
11. Engler, A. J., Richert, L., Wong, J. Y., Picart, C. & Discher, D. E. Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf. Sci.* **570**, 142–154 (2004).
12. Schillers, H. *et al.* Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
13. ATCC - American Type Culture Collection. Available at: [http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=es](http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=es).

# Listado de símbolos y acrónimos

## Acrónimos

**AFM:** microscopio de fuerzas atómicas (por sus siglas en inglés: “*Atomic Force Microscope*”)

**BSA:** albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés: “*Bovine Serum Albumin*”)

**PBS:** buffer de fosfato salino (por sus siglas en inglés: “*Phosphate Buffered Saline*”)

**CAV1:** caveolina-1

**CMR:** reología de capas celulares (por sus siglas en inglés: “*Cell Monolayer Rheology*”)

**Cyt-D:** “*cytochalasin-D*”, inhibidor de la polimerización de actina

**DMEM:** medio de cultivo celular: “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*”

**ECM:** matriz extracelular (por sus siglas en inglés: “*Extracellular Matrix*”)

**ES:** sustratos elastoméricos (por sus siglas en inglés “*Elastomeric Substrate*”)

**FBS:** suplemento para el medio de cultivo celular “*Fetal Bovine Serum*”

**FC:** curva de fuerza-distancia (por sus siglas en inglés: por siglas en inglés: “*Force Curve*”)

**FEM:** método de elementos finitos, por sus siglas en inglés: “*Finite Element Method*”)

**FV:** “*Force Volume*”

**GM:** sustancia gris (por sus siglas en inglés: “*Grey Matter*”)

**HFD:** dieta de alto contenido en grasa (por sus siglas en inglés: “*High Fat Diet*”)

**KI:** modelo mutante, un aminoácido de la CAV1 (Y14) ha sido reemplazado

**KO:** genotipo caracterizado por la ausencia de CAV1 (modelo Cav1-/-)

**LD:** gota de grasa (por sus siglas en inglés: “*Lipid Droplet*”)

**MA:** aspiración con micropipetas, (por sus siglas en inglés: “*Micropipette Aspiration*”)

**MC:** citometría por microfluídica (por sus siglas en inglés: “*Microfluidic Cytometry*”)

**MEF:** “*Mouse Embryonic Fibroblasts*”

**MRI:** resonancia magnética nuclear (por sus siglas en inglés: “*Magnetic Resonance Imaging*”)

**MTC:** “*Magnetic Twisting Cytometry*”

**MTS:** tinción tricromática de Masson (por sus siglas en inglés: “*Masson’s Trichrome Stain*”)

**ND:** dieta Normal (por sus siglas en inglés: *“Normal Diet”*)

**OBD:** *“Optical Beam Deflection”*

**OS:** estiramiento óptico (por sus siglas en inglés: *“Optical Stretching”*)

**PALM:** *“photoactivated localization microscopy”*

**PF-QNM:** método *“off-resonance”* para operar un AFM (por sus siglas en inglés: *“PeakForce Quantitative Nanomechanical Properties Mapping”*)

**PID:** controlador proporcional-integral-derivativo

**PPT:** reometría de planos paralelos (por sus siglas en inglés: *“Parallel-Plate rheology”*)

**PTM:** microreología por seguimiento de partículas (por sus siglas en inglés: *“Particle-Tracking Microrheology”*)

**rGO:** óxido de grafeno reducido (por sus siglas en inglés: *“reduced graphene oxide”*)

**SCI:** lesión de la médula espinal (por sus siglas en inglés: *“Spinal Cord Injury”*)

**SEM:** microscopio electrónico de barrido (por sus siglas en inglés: por siglas en inglés: *“Scanning Electron Microscope”*)

**STED:** *“stimulated emission depletion”*

**STORM:** *“stochastic optical reconstruction microscopy”*

**TEM:** microscopio electrónico de transmisión (por sus siglas en inglés: *“Transmission Electron Microscope”*)

**UV:** ultravioleta

**WM:** sustancia blanca (por sus siglas en inglés *“White Matter”*)

**WT:** genotipo de control (modelo Cav1+/+)

**Y14:** Tirosina 14

## Símbolos

**S**: distancia punta-muestra

**Z<sub>0</sub>**: posición de la muestra respecto a un sistema de referencia determinado

**Z**: posición de la base de la micropalanca respecto a un sistema de referencia determinado

**Δz**: deflexión de la micropalanca

**Sd**: sensibilidad del fotodiodo

**k**: constante de fuerzas de la micropalanca

**h<sub>c</sub>**: grosor de la micropalanca

**b<sub>c</sub>**: anchura de la micropalanca

**L**: longitud de la micropalanca

**Γ<sub>i</sub>**: función hidrodinámica dependiente de la forma de la micropalanca

**T**: temperatura absoluta

**k<sub>B</sub>**: constante de Boltzmann

**Q<sub>f</sub>**: factor de calidad

**ω<sub>f</sub>**: frecuencia de resonancia de la micropalanca

**ω<sub>vac</sub>**: frecuencia de resonancia en vacío

**σ**: tensión ("*stress*")

**ε**: deformación ("*strain*")

**E**: módulo de Young o módulo de Elasticidad

**α**: semiángulo del cono o pirámide

**δ**: indentación

**F**: fuerza

**G**: módulo de cizalla o cortadura

**B**: módulo de compresibilidad

**ν**: coeficiente de Poisson

**Q**: respuesta del material a un pulso de deformación ("*relaxance*")

**U**: respuesta del material a un pulso de tensión ("*retardance*")

**K**: función de relajación

**J**: función de "*creep*"

**η**: coeficiente de viscosidad

**E<sub>loss</sub>**: "*loss modulus*"

**b**: factor de rozamiento

**F<sub>a</sub>**: fuerza en la curva de aproximación

**F<sub>r</sub>**: fuerza en la curva de alejamiento

**τ**: tiempo de relajación

**T**: tensión

**K<sub>A</sub>**: módulo de compresibilidad del área

**T<sub>0</sub>**: pretensión

## Lista de publicaciones

- Garcia, P. D., **Guerrero, C. R.**<sup>1</sup> & Garcia, R. Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton. *Nanoscale* 12051–12059 (2017).
- Domínguez-Bajo, A., González-Mayorga, A., **Guerrero, C. R.**, Palomares, F. J., García, R., López-Dolado, E., Serrano, M. C. Myelinated axons and functional blood vessels populate mechanically compliant rGO foams in chronic cervical hemisected rats. *Biomaterials* **192**, 461–474 (2019).

---

<sup>1</sup> Artículo en el cual los dos primeros autores han contribuido de forma equivalente.