



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Escuela de Graduados
Programa de Magister en Ciencias con Mención en Química

INFLUENCIA DE LA RIGIDEZ DE MATRICES DE COLÁGENO

EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA CELULAR



Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Químicas

POR: Joao Aguilar cuenca

Profesores Guías: Dra. Susana Sánchez Donoso

Dr. Bruno Urbano Cantillana

Concepción, Chile 2020

DERECHOS DE AUTOR

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



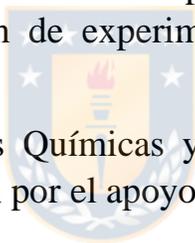
AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Sánchez Donoso y al Dr. Bruno Urbano por permitirme ser parte del Laboratorio de Interacciones Macro Moleculares, su continua disposición y compromiso en la elaboración de la tesis, por sus contribuciones científicas e incentivar el análisis crítico.

A los Dres. Enrico Gratton y Leonel Malacrida por recibirme en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica de la Universidad de California, Irvine y por todo el apoyo desinteresado entregado en la realización de experimentos que fueron fundamentales para este trabajo.

Así mismo le agradezco a todo el personal de laboratorio, en especial a Lorena Leiton y Katherine Valdebenito por su apoyo y buena disposición al momento de realización de experimentos lo cual contribuyó a mi formación científica.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por el apoyo económico entregado durante la realización del Magister.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Colágeno	3
1.1.1. Características estructurales de las fibras de colágeno.....	4
1.1.2. Formación y caracterización de fibras de colágeno in vitro.....	6
1.1.3. Colágeno como matriz y soporte celular (cartílago, hueso).....	7
1.2. Interacción de las células dentro de la matriz	8
1.2.1. Interface entre célula y matriz.....	9
1.3. Polarización Generalizada (PG) de Laurdan	11
1.3.1. Laurdan y medición de fluidez de membrana.....	14
2. HIPÓTESIS	17
3.1. Objetivo general.....	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	18
4.1. MATERIALES	18
4.1.1. Colágeno	18
4.1.2. Medio de cultivo	18
4.1.3. Cultivo línea celular NIH 3T3	18
4.1.4. Reactivos y soluciones.....	19
4.1.4.1. Soluciones para la gelificación de colágeno.....	19
4.1.4.2. Soluciones para la fijación de colágeno	19
4.1.4.3. Marcadores fluorescentes	19

4.2. METODOLOGÍA	20
4.2.1. Implementación de metodología de fabricación de matrices de colágeno con distinta rigidez	20
4.2.1.1. Purificación del colágeno a partir de cola de rata.....	20
4.2.1.2. Formación de matrices de colágeno con rigidez variable	20
4.2.2. Caracterización de las propiedades viscoelásticas y densidad de malla.....	21
4.2.2.1. Caracterización de las propiedades viscoelásticas de las matrices de colágeno.....	21
4.2.2.2. Determinación del diámetro de fibra promedio y la fracción de volumen de las fibras	22
4.3. Crecimiento de cultivo celular en medio de cultivo y en matrices de colágeno con distinta rigidez	23
4.3.1. Crecimiento de cultivo celular en medio de cultivo	23
4.3.2. Crecimiento de cultivo celular en matrices de colágeno	24
4.3.2.1. Crecimiento de cultivo celular sobre matrices de colágeno	24
4.3.2.2. Crecimiento de cultivo celular dentro de matrices de colágeno	25
4.4. Ensayo de viabilidad celular	25
4.5. Medición de fluidez de la membrana celular cultivada en medio de cultivo y en matrices de colágeno con distinta rigidez utilizando microcopia de fluorescencia Laurdan	25
4.5.1. Determinación de la fluidez de la membrana celular	26
4.5.1.1. Cultivo celular sobre colágeno	26
4.5.1.2. Cultivo celular dentro de colágeno	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. Implementación de la metodología de fabricación de matrices de colágeno con rigidez variable	28
5.2. Caracterización de las matrices de colágeno	29
5.2.1. Ensayos reológicos de amplitud de las matrices colágeno.....	29

5.2.2. Determinación del diámetro de fibra promedio.....	37
5.2.3. Determinación de la fracción de volumen de las fibras.....	41
5.3 Determinación de la fluidez de la membrana celular	45
5.3.1. Determinación de la fluidez de membrana celular en células sobre colágeno	46
5.3.2. Determinación de la fluidez de membrana celular en células dentro de colágeno	49
5.3.3. Dominios lipídicos predominantes de la membrana (GP coverage) sobre colágeno.....	51
5.4. Viabilidad celular sobre colágeno.....	54
6. CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes usados de cada compuesto para la formación de matrices de Colágeno de diferente rigidez	21
Tabla 2. Promedios de diámetros de fibras individuales de las matrices de colágeno gelificadas a 1 y 3 días.....	41
Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de las células NIH 3T3 sobre colágeno de concentración variada.....	55



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura jerárquica del colágeno fibrilar	5
Figura 2. Tejidos humanos con distintos módulos elásticos correlacionados con sus funciones (adaptado de Cox & Erler, 2011).....	8
Figura 3. Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana	11
Figura 4. Esquema de la ubicación de Laurdan en la bicapa lipídica en fase ordenada y desordenada).....	12
Figura 5. Esquema del microscopio de dos fotones y espectro de emisión de Laurdan.....	14
Figura 6. Imágenes de PG de Laurdan para medición de fluidez en sistemas artificiales y naturales.	16
Figura 7. Matrices de colágeno gelificadas.....	29
Figura 8. Módulo de almacenamiento en deformación de oscilatoria para las matrices de colágeno del día 1 y 3.....	31
Figura 9. Ensayo de amplitud en deformación oscilatoria de las matrices de colágeno para el Día 1 y Día 3.....	36
Figura 10. Módulo complejo de las distintas concentraciones de colágeno	36
Figura 11. Imágenes SEM de las fibras con distinta concentración de colágeno día 1.....	38
Figura 12. Imágenes SEM de las fibras con distinta concentración de colágeno día 3.....	38
Figura 13. Imágenes SEM para la determinación del diámetro de fibra.	40
Figura 14. Promedio de diámetros de las fibras de colágeno a las distintas concentraciones gelificadas a 1 y 3 días.....	40
Figura 15. Imagen de SHG, tiempo de vida, intensidad y estructura 3D obtenida mediante microscopia.	43
Figura 16. Volumen ocupado por el colágeno dentro de la matriz a las distintas concentraciones y días.....	45

Figura 17. Imágenes de PG de Laurdan de las células NIH 3T3 determinadas mediante microscopia de dos fotones y valores de PG promedio.	46
Figura 18. Mediciones de PG promedio de membranas sobre de colágeno Día 1 y Día 3 a las distintas concentraciones.	49
Figura 19. Mediciones de PG promedio de membranas dentro de colágeno Día 1 y Día 3 a las distintas concentraciones. e.	51
Figura 20. GP coverage de las membranas celulares a distintas concentraciones de colágeno y días.	53
Figura 21. Células NIH 3T3 sobre colágeno de concentración variada marcadas con CytoxOrange y RedNuc 647.....	54



ABREVIATURAS

C	Grado Celsius
BHK-1	Fibroblastos de riñón de hámster bebé
CH1	Canal 1
CH2	Canal 2
cm	Centímetro
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeccos's
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida
G^*	Módulo complejo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GUV's	Liposomas unilamelares gigantes
L	Litros
Laurdan	6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
Pa	Pascal
PBS	Tampón fosfato salino

PG	Polarización generalizada de Laurdan
RVL	Región viscoelástica
SEM	Scanning electron microscopy
SHG	Armónica de segunda generación
T_m	Temperatura de transición
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
μL	Microlitros
μM	Micromolar



RESUMEN

En el presente trabajo se buscó ampliar el conocimiento con respecto al efecto de la rigidez del medio extracelular sobre la fluidez de la membrana celular. Para ello se utilizaron matrices de colágeno de rigidez variable y se midió la fluidez de las membranas celular de la línea celular NIH 3T3 crecidas sobre y dentro de las matrices.

Se fabricaron a partir de colágeno tipo I de cola de rata (5 mg/mL) matrices de colágeno de concentraciones 0,5; 1; 2 y 4 mg/mL y se gelificaron durante 1 y 3 días. Se determinó la rigidez de las matrices mediante reología, la forma y diámetro de sus fibras mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y se obtuvo la fracción de volumen ocupado por las fibras mediante microscopía de segunda armónica (SHG). Se cultivaron fibroblastos NIH 3T3 sobre y dentro de colágeno durante 1 y 3 días. Para la medición de su fluidez de membrana se marcó las células con la sonda fluorescente LAURDAN (6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno) y se determinó su función polarización generalizada (GP) utilizando imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia de dos fotones. Finalmente, para comprobar la biocompatibilidad del colágeno con las células se utilizaron las sondas fluorescentes Sytox Orange y RedNuc para determinar el porcentaje de viabilidad celular.

Los resultados mostraron que a mayor concentración de colágeno aumenta la rigidez de la matriz y disminuye el volumen libre para el crecimiento de las células. Esta rigidez afecta de mayor manera a las membranas de las células que se cultivaron sobre colágeno las cuales mostraron un aumento en su fluidez luego de tres días de cultivo. Por otro lado, las células que se cultivaron dentro de colágeno muestran una fluidez independiente de la concentración de colágeno del medio que las rodea. Y al pasar más tiempo en cultivo hay una disminución en su fluidez, lo cual puede indicar una mayor adherencia a la matriz.

ABSTRACT

In the present work, we sought to expand the knowledge regarding the effect of the extracellular matrix stiffness on the fluidity of the cell membrane. For that purpose, collagen matrices of variable stiffness were used and the fluidity of the cell membranes of the NIH 3T3 cell line grown on top and inside the matrices was measured.

Collagen matrices of concentrations 0.5 / 1/ 2 and 4 mg / mL were made from rat tail type I collagen (5 mg / mL) and gelled for 1 and 3 days. The stiffness of the matrices was determined by rheology, the shape and diameter of its fibers by scanning electron microscopy (SEM) and the volume fraction occupied by the fibers was obtained by second harmonic microscopy (SHG). NIH 3T3 fibroblasts were cultured on and inside collagen for 1 and 3 days. For the measurement of their membrane fluidity, the cells were labeled with LAURDAN fluorescent probe (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene) and the generalized polarization function (GP) was determined using images obtained by two-photon fluorescence microscopy. Finally, to test the biocompatibility of collagen with cells, the Sytox Orange and RedNuc fluorescent probes were used to determine the cell viability.

The results showed that a higher concentration of collagen increases the stiffness of the matrix and decreases the free volume for the growth of cells. This stiffness most affects the membranes of the cells that were grown on top of collagen which showed an increase in their fluidity after three days of culture. On the other hand, the cells that were cultivated inside collagen show a fluidity independent of the collagen concentration of the environment that surrounds them. And by spending more time in cultivation there is a decrease in its fluidity, which may indicate a greater adherence to the matrix.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Colágeno

El colágeno es un polímero biológico estructural presente en los seres vivos y se encuentra principalmente en el espacio extracelular de distintos tejidos conectivos del cuerpo, como lo son: la piel, vasos sanguíneos, tendones, córnea, entre otros. Además, puede unirse con minerales para formar estructuras más densas como los huesos, dientes y cartílagos. El colágeno llega a constituir hasta el 30% en masa de los vertebrados (Sherman, y col. 2015). El colágeno forma la matriz extracelular que rodea a la célula y ejerce distintas fuerzas mecánicas sobre ella, y la respuesta de la célula corresponde a un proceso llamado mecanotransducción. Este proceso consiste en transformar un estímulo mecánico a químico. Éste estímulo genera una respuesta celular que se puede expresar de distintas formas como diferenciación celular, proliferación, apoptosis, entre otras funciones vitales para la célula (Guilak y col., 2009). La célula realiza esta transformación mediante diversos mecanotransductores que se encuentran embebidos en la membrana plasmática (Gasparski & Beningo, 2015) y que se caracteriza por estar organizada en dominios lipídicos-proteicos con diferente grado de empaquetamiento y cuyas propiedades son responsables de la fluidez de la membrana. Los mecanoreceptores requieren que la membrana tenga un arreglo conformacional adecuado para poder llevar a cabo sus funciones (Espinosa y col., 2011). Y este arreglo conformacional de la membrana podría verse afectado por las fuerzas ejercidas por la matriz extracelular. Lo cual genera la pregunta de cómo las propiedades de la matriz extracelular afectan a la fluidez de la membrana celular.

El colágeno está clasificado en dos grupos principales fibrilares y no fibrilares. Siendo el más común el colágeno fibrilar o tipo 1 el cual entrega soporte mecánico a grandes grupo multicelulares (Hulmes, 2008). Éste se forma a partir de cadenas de aminoácidos entrelazados entre sí. La síntesis de colágeno se produce, dentro de la célula, en el retículo endoplásmico rugoso donde se forma el tropocolágeno el cual es una cadena polipeptídica con la secuencia Gly-X-Y y posee una estructura 3D de hélice alfa. Gly corresponde a glicina y X e Y a cualquier otro aminoácido, usualmente lisina (grupo lateral $(CH_2)_4NH_2$) y prolina (grupo lateral C_4H_6NH). La glicina posee un hidrógeno en su grupo lateral y se encuentra hacia el centro de la proteína, mientras que los aminoácidos X e Y se encuentra hacia la superficie. Esta hélice alfa posteriormente sufre una hidroxilación en los aminoácidos de la superficie, seguido de una glicosilación. Una vez ocurridas estas modificaciones, se empiezan a formar enlaces de hidrogeno entre los aminoácidos glicosilados e hidroxilados de tres hélices alfa distintas formando una triple hélice a la cual se le llama procolágeno. Posteriormente el procolágeno es expulsado de la célula al espacio extracelular en donde los grupos laterales de la lisina o hidroxylisina de distintos procolágenos forman grupos aldehídos mediante reacciones enzimáticas. Estos procolágenos experimentan una serie de reacciones que llevan al entrecruzamiento de los procolágenos para formar una fibra, a la cual se le denomina colágeno. Son estos entrecruzamientos intramoleculares lo que le otorga características de rigidez particulares y le permite proveer soporte mecánico a los grupos multicelulares. (Eyre & Wu, 2005) (Sherman y col., 2015)

1.1.1. Características estructurales de las fibras de colágeno

Las fibras de colágeno tienen una estructura jerárquica ilustrada en la figura 1 (Sherman y col., 2015). El diámetro del procolágeno es de 1,6 nm aprox. (Figura 1A) y tiene un largo de 300 nm cuando está empaquetado entre las fibras. Se caracterizan por tener un ensamblaje escalonado con una sobreposición de 36 nm y un *gap* de 31 nm entre moléculas de procolágeno lo cual le proporciona un patrón visible de una periodicidad de 67 nm llamado

bandas d (Figura 1B). Se observa también las capas de fibras de colágeno en un corte transversal de la piel (Figura 1C) y una imagen de microscopía electrónica de transmisión de fibras de colágeno de 100 nm de diámetro donde se observa el periodo d (Figura 1D) (Shoulders & Raines, 2009).

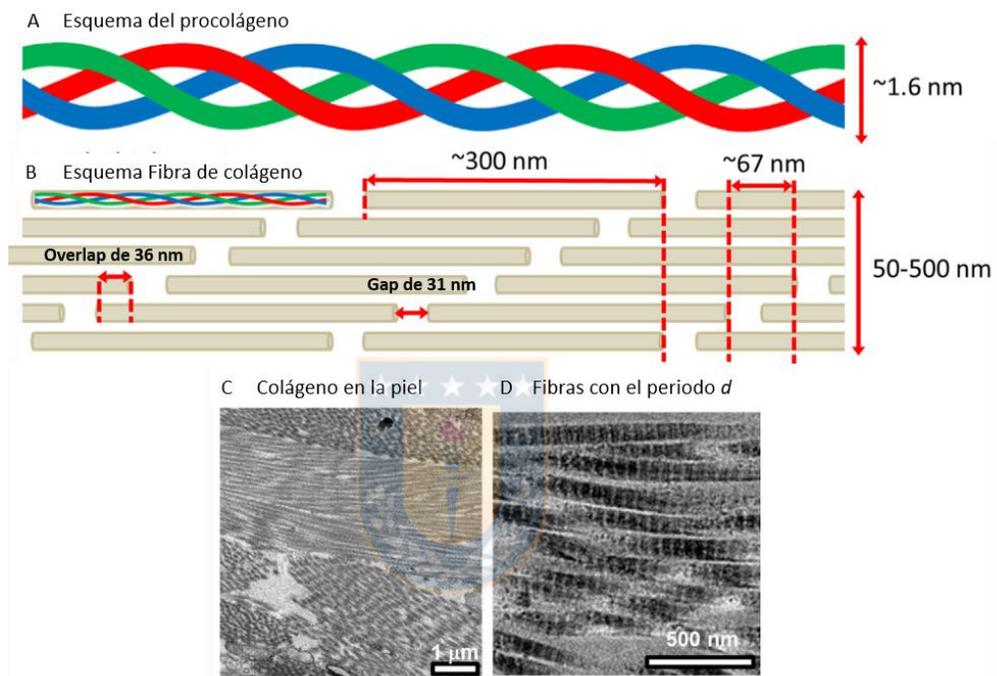


Figura 1. Estructura jerárquica del colágeno fibrilar. (A) Esquema del procolágeno, cada color representa una hélice alfa distinta. (B) Esquema del arreglo de las triples hélices en una fibra de colágeno. (C) Capas de colágeno en un corte transversal de la piel. (D) microscopía electrónica de transmisión de fibras de colágeno de 100 nm de diámetro. Modificado de Sherman y col., 2015.

Este tipo de empaquetamiento le entrega la capacidad de ayudar en el control de la comunicación, unión y movimiento celular y transmite las propiedades biomecánicas específicas del tejido (Orgel y col., 2011). Debido a estas características, el colágeno (principal componente del espacio extracelular) es un polímero muy utilizado en la investigación de aplicaciones médicas

(Kadler, 2004). Por lo que se han desarrollado distintas metodologías para obtenerlo *in vitro* (Kadler, 2017).

1.1.2. Formación y caracterización de fibras de colágeno *in vitro*

Una de las técnicas más usadas para la extracción de colágeno consiste en el tratamiento de tejidos animales (usualmente piel o tendones) con soluciones de ácidos débiles como el ácido acético o tampones salinos neutrales. Esto genera una solución de moléculas de colágeno que cuando son neutralizadas a 30°C se polimeriza y produce fibras estiradas que están organizadas y siguen un periodo d característico (Kadler, 2017). La pureza y la integridad de los polipéptidos y de las moléculas de colágeno, el grado de entrecruzamiento, las propiedades estructurales-mecánicas de las fibras, entre otras propiedades, se establecen en función de la técnica de aislamiento utilizada (Kreger y col., 2010)

Se ha demostrado que al aumentar la concentración de colágeno se obtiene una organización similar de las redes con un aumento de la fracción de volumen de fibras (densidad de fibras) la cual es independiente de la fuente de colágeno usada (Kreger y col., 2010). El aumento en la densidad de fibras se atribuye a un mayor número de entrecruzamientos entre las fibras. Varios reportes muestran que una mayor densidad de fibras conlleva a un aumento en la capacidad de la matriz para poder resistir un mayor grado de deformación y soportar el estrés antes de la ruptura de las cadenas (Buehler, 2008). Esto se debería a que al aplicar un estrés los enlaces hidrógeno se empiezan a romper generando que las cadenas del polímero se desenreden (Buehler, 2006).

El colágeno es considerado como un material viscoelástico, cuyas propiedades mecánicas dependen de las condiciones fisiológicas en las que se encuentra (Buehler, 2006). Mediante la reología es posible estudiar el flujo y deformación de materiales que muestran una combinación de comportamiento elástico y viscoso. Uno de los principales parámetros es el módulo de elasticidad o cizalla que mide la rigidez del material y da cuenta

de la capacidad del material para resistir a la deformación como respuesta a una fuerza aplicada. Las mediciones reológicas permiten establecer para el material analizado relaciones de estrés vs deformación, relajación, oscilación, entre otros (Callister & Wiley, 2006)

1.1.3. Colágeno como matriz y soporte celular (cartílago, hueso)

Las células *in vivo* están organizadas en tejidos y órganos que residen en ambientes mecánicos complejos. A nivel celular el ambiente mecánico consiste de fuerzas endógenas (generadas por las células) y exógenas (aplicadas hacia las células). Las fuerzas exógenas son ejercidas principalmente por la matriz extracelular la cual está compuesta en una 90% por colágeno (Kern y col., 2001).

La matriz extracelular que rodea los tejidos tiene una variada composición. Esta heterogeneidad genera un amplio rango de módulos elásticos (Figura 2) y es así como cada tejido tiene una rigidez específica que le permite realizar su rol fisiológico. Por ejemplo, el hueso es mucho más rígido que los otros tejidos debido a que su función primaria es proveer estructura y proteger nuestros órganos internos, mientras que el cartílago que recubre los extremos de los huesos y articulaciones es menos rígido que el hueso pero más elástico lo cual le permite amortiguar la sobrecarga sufrida por las articulaciones (Handorf et al., 2015).

Los tejidos además están en un constante recambio celular mediante la llegada de células madre que se diferencian en los distintos tipos celulares que pueda requerir en un determinado tejido. Esta diferenciación está regulada por el microambiente físico y químico de la matriz. En el caso de los huesos se ha demostrado que la osteogénesis (generación de tejido óseo) se favorece con la rigidez de la matriz (Khatiwala y col., 2009) mientras que matrices más blandas, como las del cerebro, favorecen la neurogénesis (generación de tejido neuronal) (Engler y col., 2006).

El esfuerzo mecánico que ejerce la matriz sobre la célula puede ser de compresión, de estiramiento o cizalla, y la célula tiene diferentes respuestas dependiendo del tipo de estrés aplicado (Gasparski & Beningo, 2015)

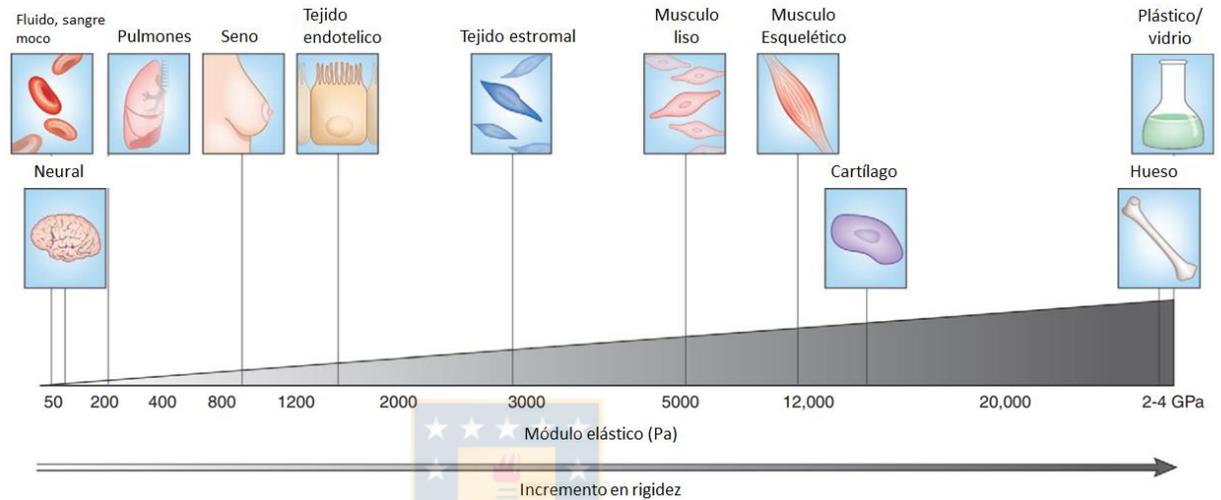


Figura 2. Tejidos humanos con distintos módulos elásticos correlacionados con sus funciones (adaptado de Cox & Erler, 2011).

1.2. Interacción de las células dentro de la matriz

Las células a través de su membrana celular pueden sentir la rigidez de la matriz extracelular. A este proceso se le llama mecanotransducción en el cual las células convierten el estímulo mecánico en estímulo químico para generar una respuesta celular. Una vez generado el estímulo químico se produce una cascada de señalización con distintas reacciones que pueden regular la diferenciación celular, proliferación, apoptosis, migración, mantención de homeostasis entre otras funciones de la célula (Guilak y col., 2009). En la membrana celular existen diversos mecanotransductores como los canales iónicos, glicocalix, efrinas, integrinas, caderinas, entre otras proteínas responsables de la transformación de los estímulos físicos a señales químicas (Gasparski & Beningo 2015). Uno de los principales

mecanotransductores es el citoesqueleto, una red de polímeros proteicos estructurales internos de la célula que proveen soporte interno y organización a las estructuras celulares internas.

Los postulados actuales indican que los mecanotransductores están en contacto con o incorporados dentro de dominios lipídicos-proteicos existentes en la membrana celular (Gasparski & Beningo, 2015). Estos dominios estructurales de la membrana tienen diferente grado de empaquetamiento y se ha reportado que los cambios de sus propiedades (número, empaquetamiento, movilidad etc.) afectan la fluidez global de la membrana. Para poder cumplir con sus funciones los mecanotransductores requieren de una dinámica conformacional energéticamente eficiente que solo es posible en un medio en el cual la membrana se ha adaptado al esfuerzo mecánico (Espinosa y col., 2011).



1.2.1. Interface entre célula y matriz

La membrana celular es una barrera dinámica que delimita a la célula. Esta membrana separa el interior de la célula del espacio extracelular y en ella se organizan reacciones complejas y se regula el flujo de información que llega hacia y sale desde la célula.

La membrana celular está formada por fosfolípidos, proteínas, lípidos y carbohidratos. El modelo estructural más aceptado actualmente es una modificación del mosaico fluido postulado por Singer y Nicolson en 1972 (Figura 3) (Singer & Nicolson, 1972). El modelo original de Singer y Nicolson establece que en las membranas celulares los fosfolípidos forman una bicapa en la cual las regiones polares de las moléculas lipídicas de cada capa están encaradas hacia el exterior interactuando con la fase acuosa de cada lado. Las proteínas están incrustadas en esta bicapa lipídica y se mantienen unidas mediante interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de membrana y los dominios hidrofóbicos de las proteínas. Algunas proteínas sobresalen a un solo lado de la membrana, mientras que otras tienen dominios expuestos a ambos lados. La orientación de las proteínas en la bicapa es

asimétrica, es decir, los dominios proteicos expuestos a un lado de la bicapa son diferentes de los expuestos al otro lado, reflejando una asimetría funcional. Los lípidos individuales y las unidades proteicas de membrana forman un mosaico fluido con un patrón que puede cambiar constantemente. El mosaico de la membrana es fluido debido a que la mayoría de interacción entre sus componentes son no covalentes, dando libertad a las moléculas de lípidos y proteínas para trasladarse lateralmente en el plano de la membrana (Nelson & Cox, 2009).

El rol original de los lípidos asignado por Singer y Nicolson era de soporte solamente. Sin embargo, hoy en día se ha establecido que las membranas son heterogéneas lateralmente a una escala nanométrica y que los lípidos tienen un rol importante en la actividad de las células (Sezgin y col., 2017).

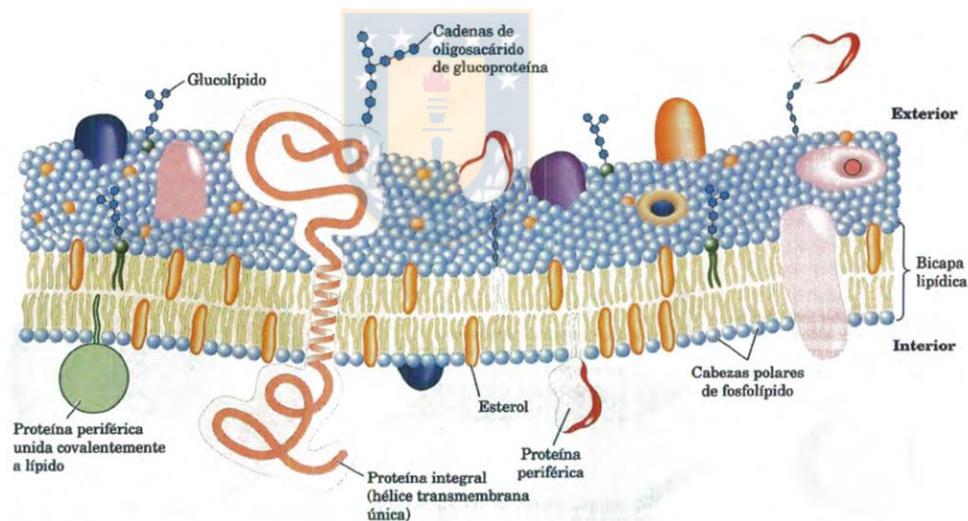


Figura 3. Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana (Nelson & Cox, 2009).

El concepto de heterogeneidad de la membrana celular se entiende por la existencia *in vivo* de áreas en la membrana con diferente grado de empaquetamiento que reciben el nombre de balsas lipídicas (Simons & Ikonen, 1997). Estas balsas son nanodominios heterogéneos altamente dinámicos formados por esfingolípidos y colesterol con un tamaño entre 20

a 100 nm que pueden encontrarse en la capa interna, externa o atravesando la membrana (Pike, 2006)(Lingwood & Simons, 2010). Debido a su alto contenido de colesterol, en estas regiones existe un mayor orden de los fosfolípidos y poseen por lo tanto una menor fluidez (Sezgin y col., 2017). En estas regiones, más empaquetadas se forman interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Carquin y col., 2016) y moléculas mecanoreceptoras (normalmente proteínas) pueden encontrarse en estas plataformas (Gasparski & Beningo, 2015). Estos arreglos dinámicos de lípidos y proteínas en la membrana regulan interacciones moleculares involucradas en las funciones celulares y se ha demostrado que cambios en la fluidez de membrana pueden modificar estas interacciones e incluso afectar la viabilidad de la célula (Tricerri y col., 2001) (Tricerri y col., 2002)(Sánchez y col., 2010).

El arreglo espacial de dominios proteico-lipídicos con diferente fluidez da como resultado la fluidez característica de cada membrana, una propiedad que puede ser evaluada por diferentes técnicas. Una de ellas es la Polarización Generalizada de Laurdan. Laurdan es una sonda fluorescente capaz de detectar la coexistencia de dominios lipídicos de diferente grado de empaquetamiento basado en su sensibilidad para detectar el nivel de hidratación de las membranas (Sanchez y col., 2007)(Sánchez y col., 2010) (Sezgin y col., 2017).

1.3. Polarización Generalizada (PG) de Laurdan

Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno) es una sonda fluorescente ampliamente utilizada en el estudio de membranas tanto en cubeta como en microscopia (Sanchez y col., 2007 (2)). Laurdan posee en estado basal un momento dipolar (producto de una separación de carga) localizado en los anillos de naftaleno de su estructura (Figura 4A). Este dipolo cambia cuando la molécula es excitada y consecuentemente las moléculas de agua alrededor del dipolo se ordenan de manera diferente. La energía utilizada para el reordenamiento de las moléculas de agua alrededor

del dipolo del Laurdan se ve reflejado en el corrimiento del espectro de emisión hacia longitudes de onda más largas (Weber & Farris, 1979). La localización de la sonda en la membrana ubica a los anillos naftalenos a nivel del esqueleto del glicerol (Figura 4A), y es el reordenamiento de las moléculas de agua ubicadas en esta zona de la bicapa las que producen un desplazamiento espectral. El desplazamiento del espectro de emisión cuando la sonda está en una bicapa lipídica depende del contenido de moléculas de agua y se ha relacionado con la organización de los lípidos y la fluidez de membrana (Parasassi y col., 1991).

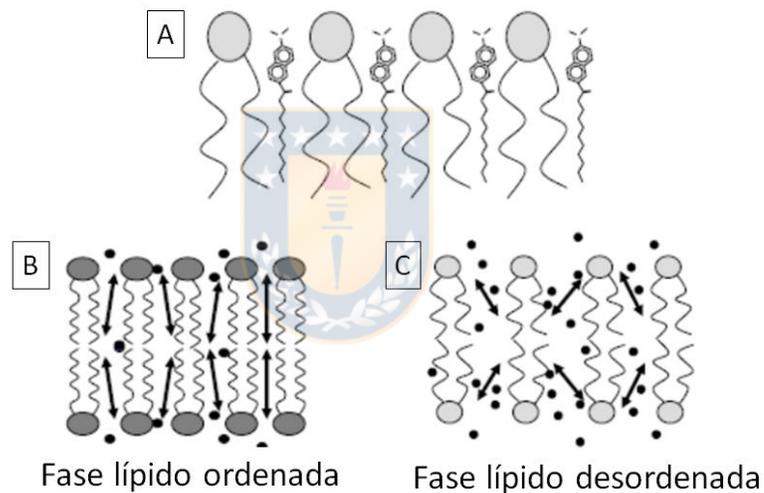


Figura 4. Esquema de la ubicación de Laurdan en la bicapa lipídica en fase ordenada y desordenada. En la parte superior se observa los anillos naftalenos de Laurdan que se encuentran en la membrana a nivel de esqueleto de glicerol en los fosfolípidos. En la parte inferior se observa el reordenamiento de las moléculas de agua (puntos negros) localizadas alrededor del dipolo de Laurdan (flechas) serán las responsables del desplazamiento espectral cuando la fase de los lípidos cambia (Sanchez y col., 2007 (2))

El espectro de emisión de Laurdan localizado dentro de bicapa de fosfolípido está centrado a 440 nm cuando los fosfolípidos están en fase lipídica ordenada (pocas moléculas de agua en la interfase) (figura 4B) y centrado a 490 cuando están en una fase lipídica desordena (mayor cantidad de

moléculas de agua) (Figura 4C). La PG es una forma matemáticamente conveniente y cuantitativa para medir el desplazamiento del espectro de emisión (Sanchez y col., 2007 (2)). La función está dada por:

$$PG = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad \boxed{\text{Ecuación 1}}$$

Donde I_{440} e I_{490} corresponde a la intensidad de emisión a 440 y 490 nm, respectivamente (Parasassi y col., 1991) excitando a 350 nm aproximadamente cuando se mide en cubeta. Así, si Laurdan se solubiliza en una estructura lipídica, el espectro de emisión se moverá de acuerdo al contenido de agua en la bicapa.

Para calcular el valor de PG en un microscopio de fluorescencia es necesario utilizar excitación por dos fotones (para evitar el fotoblanqueo de la sonda) con una longitud de onda de 780 nm y un sistema de detección de dos canales que tendrá los filtros correspondientes para aislar las zonas de 440 y 490 nm (Figura 5). De esta manera se obtienen 2 imágenes que se utilizan para crear una imagen de PG que da cuenta de la fluidez de la membrana (Sanchez y col., 2007 (2))

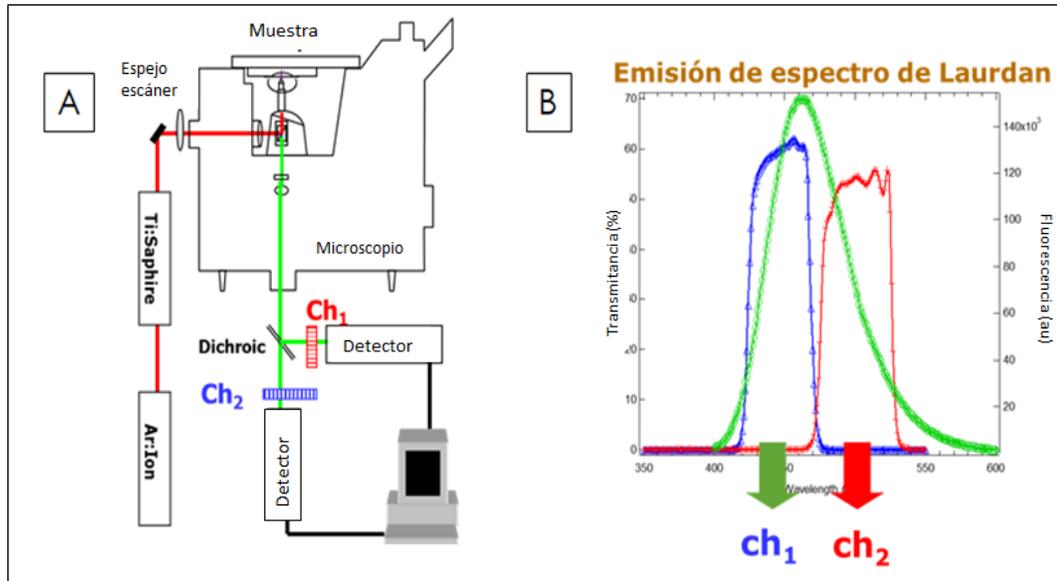


Figura 5. Esquema del microscopio de dos fotones y espectro de emisión de Laurdan. En A se muestra que una vez que el láser llega a la muestra y la traspasa posteriormente es separado por un filtro dicróico el cual divide la señal en dos, los cuales pasan por dos canales distintos (Ch1 y Ch2). Estos poseen filtros que solo dejan pasar un rango de longitudes onda específicas (centrado en 440 nm para Ch1 y 490 nm para Ch2) los que posteriormente pasan al computador para analizar los datos. En B se muestra el espectro de emisión de Laurdan el cual es recopilado por los detectores: 440 nm para Ch1 y en 490 nm para Ch2, en verde se el espectro de emisión de Laurdan y las regiones espectrales detectadas en cada filtro. (Sanchez y col., 2007 (2))

1.3.1. Laurdan y medición de fluidez de membrana

Laurdan y la función de PG en el microscopio ha sido utilizada tanto en bicapas de lípidos puros como en membranas naturales. Bagatolli y Gratton demostraron en modelos de membrana llamados vesículas unilamelares gigantes o GUVs (por sus siglas en inglés) que utilizando Laurdan y las imágenes de PG se puede estudiar la variación en la fluidez de la membrana con resolución espacial. En la Figura 6 se observa GUV's formadas con dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a distintas temperaturas, en la figura 6A se observa a la GUV a 50°C, temperatura superior a su temperatura de transición (T_m) por lo cual la membrana está en una fase fluida. En esta fase Laurdan está en contacto con una mayor cantidad de

moléculas de agua, dando un valor de PG negativo y un color azul en la escala de color utilizada. Cuando la temperatura corresponde a la T_m a $41,5^\circ\text{C}$ (figura 6B) la GUV tiene una mezcla entra zonas más fluidas y zonas más ordenadas por lo que está en contacto con una menor cantidad de moléculas de agua dando valor de PG positivo cercano al 0 y un color amarillo. Bajo su T_m a 25°C (figura 6C) la GUV se encuentra en fase ordenada por lo que está en contacto con un menor número de moléculas de agua que en las fases anteriores dando un valor de PG positivo y un color rojo. (Bagatolli & Gratton, 1999).

Esta técnica también ha sido utilizada en células vivas en cultivo, entre ellas, células HELA y fibroblastos de riñón de hámster bebé (BHK-1) (Sánchez y col., 2010). La Figura 6D muestra que la membrana celular es más rígida (mayor valor de PG, color más anaranjado) que las membranas al interior de la célula (valor de PG más bajo, color más amarillo). Demostrando que a través de las imágenes de PG de Laurdan es posible obtener en forma cuantitativa y visual el estado de la fluidez de la membrana celular.

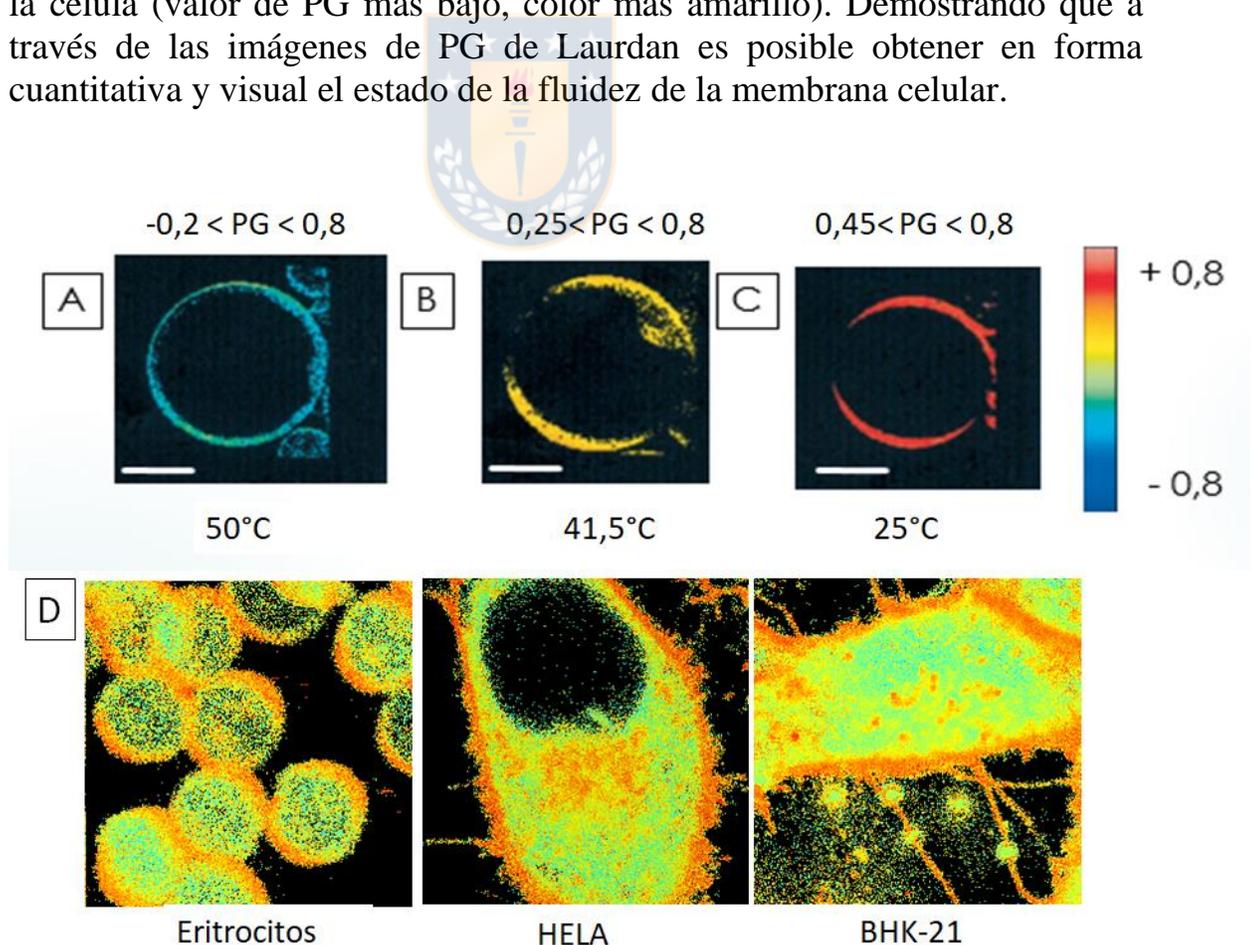


Figura 6. Imágenes de PG de Laurdan para medición de fluidez en sistemas artificiales y naturales. (A) GUV a 50°C con un valor aproximado de PG de -0,2. (B) GUV con un valor aproximado de PG de 0,25. (C) GUV con un valor aproximado de PG de 0,45. Se utilizó una paleta de colores que muestra las imágenes desde valores cercanos a -0,8 azul hasta rojo para valores de PG cercanos a +0,8. Imagen modificada de (Bagatolli & Gratton, 1999). (D) imágenes de PG de Laurdan de tres tipos celulares Figura modificada de (Sánchez y col., 2010)



2. HIPÓTESIS

La rigidez de la matriz de colágeno afecta la fluidez de la membrana celular.

3. OBJETIVOS DE TRABAJO

3.1. *Objetivo general*

- Evaluar la influencia de la rigidez de matrices de colágeno sobre la fluidez de la membrana celular.



3.2. *Objetivos específicos*

- Implementar de metodología de fabricación de matrices de colágeno con distinta rigidez.
- Caracterizar las propiedades viscoelásticas y densidad de malla de matrices de colágeno con distinta rigidez.
- Crear cultivo celular en medio de cultivo y en matrices de colágeno con distinta rigidez.
- Determinar fluidez de la membrana celular en medio de cultivo y en las matrices de colágeno con distinta rigidez utilizando microscopía de fluorescencia PG de Laurdan.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES

4.1.1. Colágeno

- Colágeno I purificado de cola de rata (Gibco, USA)
- Plato de 35 mm con un cubre objetos de 10 mm de diametro (MATTEK, USA)
- Placa multi pocillo con fondo de vidrio óptico (MATTEK,USA)

4.1.2. Medio de cultivo

Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeccos's (DMEM, por sus siglas en inglés) (Termo Fischer, USA), suplementado con 10% de suero de bovino fetal de cultivo, 5 mL de Pen-Strep (una mezcla de antibióticos penicilina y estreptomina para evitar el crecimiento de bacterias) y 2,5 mL de HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico) 1 mol/L el cual es un amortiguador zwitterionico de ácido sulfúrico que ayuda a mantener pH fisiológico a pesar de los cambios de la concentración dióxido de carbono producida por la respiración celular.

4.1.3. Cultivo línea celular NIH 3T3

La línea celular utilizada en este trabajo proviene de fibroblastos embrionarios de ratones a las células NIH 3T3 (ATCC CRL-1658). El termino 3T3 viene de que se cultivaron utilizando el protocolo 3T3, que da el lugar al nombre de la línea, y consiste en la transferencia ("T") cada 3 días (primer "3") de 3×10^5 células (segundo "3"). Esta línea fue obtenida por generosidad de los Dres. Enrico Gratton y Leonel Malacrida de la Universidad de Irvine California, Estados Unidos.

4.1.4. Reactivos y soluciones

4.1.4.1. Soluciones para la gelificación de colágeno

- **Buffer PBS:** 10 mmol/L buffer PBS, 140 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl (Merck. Alemania)
- **NaOH 0,5 mol/L** (Merk, Alemania)
- **Medio de Cultivo DMEM** (Termo Fischer, USA) con 4500 mg/L de glucosa, 1 mmol/L de piruvato de sodio y 1,5 mg/mL de bicarbonato de sodio

4.1.4.2. Soluciones para la fijación de colágeno

- **Paraformaldehído al 2,5%** (Merck, Alemania)
- **Etanol del 10% al 100%** (Termo Fischer, USA)

4.1.4.3. Marcadores fluorescentes

- **Laurdan** (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene) (Termo Fischer, USA)
- **Sytox Orange** (Termo Fischer, USA)
- **NucRed 647** (Termo Fischer, USA)

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Implementación de metodología de fabricación de matrices de colágeno con distinta rigidez

4.2.1.1. Purificación del colágeno a partir de cola de rata

El protocolo de purificación de colágeno de colas de rata que se utilizó es un protocolo modificado del publicado por Conway y col. (Conway y col., 2017). Brevemente, las colas de rata guardadas a -20°C , se descongelaron y mantuvieron en etanol al 70%, posteriormente se extrajeron los tendones. Después se colocaron los tendones en una solución de buffer A (10 mmol/L de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 0,15 mol/L de NaCl, 5 mmol/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se llevó a pH 7,5 con NaOH. Se incubaron durante 24 horas a 4°C con agitación. Se descartó el buffer y se le agregó ácido acético 0,5 mol/L. Se incubó durante 24 horas a 4°C con agitación. Posteriormente se centrifugó y al sobrenadante se le midió el volumen para agregar NaCl hasta obtener una concentración de 0,7 mol/L de NaCl y se dejó en agitación durante 48 horas. Después se centrifugó y al pellet resultante se resuspendió en 18 mmol/L de ácido acético filtrado y se agitó durante 24 horas a 4°C para disolver el pellet.

En este trabajo se purificó el colágeno a partir de cola de rata, sin embargo, los resultados expuestos en adelante se realizaron con colágeno comercial tipo I 5 mg/mL (Gibco, USA).

4.2.1.2. Formación de matrices de colágeno con rigidez variable

Para la formación de las matrices de colágeno de rigidez variable se utilizó el método de gelificación mediante temperatura (Bron y col. 2009) y diferentes concentraciones de colágeno. Para esto en un tubo eppendorf se mezcló colágeno tipo I de concentración 5 mg/mL en ácido acético 20

mmol/L (Gibco, USA) con tampón salino de fosfato (PBS 10x) (para tener un ambiente iónico estable), el protocolo entregado por GIBCO indicaba añadir agua, sin embargo se reemplazó por medio de cultivo DMEM (para aumentar la viabilidad celular (Yoon y col. 2016)) y finalmente se añadió una cantidad variable NaOH 0,5 mol/L para llevar la mezcla a pH neutro. El medio de cultivo DMEM contiene rojo fenol que se utilizó para detectar el pH neutro final. Las cantidades usadas para preparar aproximadamente 1 mL de matriz a diferentes concentraciones de colágeno se muestra en la Tabla 1. Una vez realizada la mezcla se agitó la solución y se incubó en una estufa a 37°C por 1 y 3 días para formar las matrices. Siguiendo esta metodología se gelificó colágeno utilizando concentraciones de 0,5; 1; 2 y 4 mg/mL.

Tabla 1. Volúmenes usados de cada compuesto para la formación de matrices de Colágeno de diferente rigidez

	0,5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
Colágeno tipo I 5 mg/mL	100 µL	200 µL	400 µL	800 µL
PBS 10x	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Medio de Cultivo	800 µL	700 µL	500 µL	100 µL

4.2.2. Caracterización de las propiedades viscoelásticas y densidad de malla

4.2.2.1. Caracterización de las propiedades viscoelásticas de las matrices de colágeno

Las matrices de diferente concentración de colágeno fueron analizadas por reología. Para este análisis se realizaron ensayos oscilatorios de cizalla en un reómetro TA Instrument DHR-3 usando una geometría de plato paralelo de acero inoxidable de 8 mm y un *gap* de 1 mm a una temperatura constante de 37°C. Con esta configuración se realizaron ensayos de amplitud donde se aplica a la muestra un esfuerzo de cizalla oscilatorio dentro de un rango de deformación determinado (0,01-100%) y se registra el esfuerzo necesario en pascal (Pa) para que alcance un cierto grado de deformación.

A partir de este ensayo se obtuvo el módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') y se graficaron versus el porcentaje de deformación de cada una de las matrices de colágeno. Con estos gráficos se estudió el comportamiento viscoelástico del material y a partir de G' y G'' se obtuvo el módulo complejo (G^*) que contiene la contribución de G' y G'' a través de la siguiente expresión:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

Ecuación 2

4.2.2.2. Determinación del diámetro de fibra promedio y la fracción de volumen de las fibras

Determinación del diámetro de fibra promedio: Para la determinación del tamaño de fibra se utilizó imágenes SEM (Scanning Electron Microscopy). Para la preparación de las muestras, las matrices una vez gelificadas en las diferentes condiciones fueron fijadas con formaldehído 2,5% por 1 día y secadas mediante la técnica de deshidratación por alcohol. Esta metodología consiste en añadir glutaraldehído 2,5% a las matrices de colágeno previamente gelificadas, posteriormente se lavó con buffer fosfato y se añadió soluciones de etanol/agua 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100% por 40 minutos cada solución, finalmente se deja evaporar esta última solución de etanol (Baradet y col., 1995).

El análisis de tamaño de fibra se hizo utilizando imágenes de $6,40 \times 4,80 \mu\text{m}$ (1280×960 pixels) que fueron adquiridas en 4 diferentes posiciones del plano XY de las matrices de colágeno. Utilizando el programa ImageJ se midió para cada concentración de colágeno el tamaño de aproximadamente 80 fibras individuales de colágeno y con esto se calculó el diámetro de fibra promedio.

Determinación fracción de volumen de las fibras: Para la determinación de la fracción de volumen de las fibras se fabricaron las matrices de 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 mg/mL de colágeno, se dejaron gelificar por 1 y 3 días a 37°C. Cumplido el tiempo de incubación se fijaron con formaldehído 2,5% por 1 día y luego se lavaron con buffer fosfato. Para esto se utilizó la técnica de microscopía armónica de segunda generación (SHG, por sus siglas en inglés). El principio de esta técnica se basa en que cuando el láser del microscopio llega al colágeno este se refleja de forma dispersa (*scattering*) y es ésta la señal la que se detecta (Chen y col., 2012). A la imagen obtenida mediante SHG se puede medir pixel por pixel su tiempo de vida, que al ser una señal reflejada es igual a cero, y de forma simultánea se puede medir la intensidad de esta señal y esto se representa mediante un gráfico de fasores (Dvornikov y col., 2019).

Utilizando el microscopio no comercial de imágenes de emisión profunda (DIVER, por sus siglas en inglés) (Dvornikov y col., 2019), se tomaron imágenes de intensidad y tiempo de vida de la señal SHG del colágeno tipo I, en 3 dimensiones. Para ellos se escogieron 4 diferentes sectores de la muestra y se obtuvieron 11 imágenes de 30×30 μm en Z (2 μm separación). El análisis del volumen ocupado por el colágeno se realizó de la siguiente manera: Primero, utilizando el programa ImageJ se determinó el porcentaje del volumen total ocupado por la señal de colágeno en cada plano de 30×30×2 μm³. Luego se obtuvo un promedio del volumen ocupado por el colágeno en los 11 volúmenes de cada set 3D. Se tomaron 4 sets 3D y por tanto para cada concentración de colágeno se obtuvo 4 datos de volumen total, se sacó promedio y desviación standard.

4.3. Crecimiento de cultivo celular en medio de cultivo y en matrices de colágeno con distinta rigidez

4.3.1. Crecimiento de cultivo celular en medio de cultivo

El cultivo de las células NIH 3T3 se realizó mediante una metodología descrita previamente (Malacrida y col., 2017). Brevemente, células NIH 3T3 (ATCC CRL-1658), fibroblastos derivados de ratón, se cultivaron en medio

DMEM a 37°C y 5% CO₂. Una vez finalizada la incubación el cultivo se lavó con PBS estéril y se utilizó tripsina para desprender las células del fondo del frasco de cultivos. La actividad de la tripsina se detuvo mediante la adición de suero bovino fetal.

La concentración final de células usadas fue de 100.000 células/mL. Para esto se utilizó metodologías distintas dependiendo del experimento. Para los experimentos sobre colágeno se tomó una alícuota del cultivo madre y se llevó a 1 mL para alcanzar una concentración de células de 100.000 células/mL. Mientras que para los experimentos dentro de colágeno las células usadas se tomaron directamente del cultivo madre.

Esta diferente metodología se debe a que, en los experimentos sobre colágeno, el colágeno se gelifica previamente a la adición del cultivo celular, entonces, si se toma un volumen muy pequeño las células pueden aglomerarse. Mientras que en los experimentos dentro de colágeno el colágeno se gelificó junto con las células por lo cual mediante pipeteo se evita esta aglomeración y se asegura una distribución más uniforme de las células.

4.3.2. Crecimiento de cultivo celular en matrices de colágeno

4.3.2.1. Crecimiento de cultivo celular sobre matrices de colágeno

Una vez preparada la solución de colágeno, 100 µL de ella se pusieron en un plato de 35 mm con vidrio óptico en el fondo y se dejó gelificar durante 40 minutos. Posteriormente, sobre el gel, se añadió 1 mL del cultivo celular NIH 3T3 de concentración 100.000 células/mL. Se dejó en incubación durante 24 y 72 horas a 37°C y 5% CO₂, agregando 1 mL adicional de medio de cultivo cada 24 horas. Media hora antes de cada experimento de microscopia se adicionó al medio Laurdan para alcanzar una concentración final 1 µmol/L. Esta concentración fue determinada usando el coeficiente molar de extinción de 20,000 (mol/L)⁻¹ cm⁻¹ (a 364 nm en metanol). Este proceso se repitió para todas las concentraciones de colágeno

4.3.2.2. Crecimiento de cultivo celular dentro de matrices de colágeno

La solución de colágeno se preparó siguiendo las proporciones especificadas en la tabla 1, posteriormente se añadieron las células y se añadió 300 μL de esta solución en placas multipocillo. Posteriormente se dejó gelificar durante 40 minutos y se le añadió medio de cultivo hasta llenar el pocillo, esto para asegurar la sobrevivencia de las células. Se dejó en incubación durante 24 y 72 horas a 37°C y 5% CO_2 , agregando 1 mL adicional de medio de cultivo con Laurdan 1 $\mu\text{mol/L}$ cada 24 horas. Este proceso se repitió para todas las concentraciones de colágeno.

4.4. Ensayo de viabilidad celular

Para examinar la viabilidad celular a células crecidas sobre las matrices de colágeno se utilizaron dos marcadores fluorescentes: Sytox Orange para marcar los núcleos de las células muertas y el segundo NucRed Live 647 para marcar los núcleos de las células vivas. Se tomaron imágenes grandes de 5×5 secciones, donde cada sección tenía un tamaño de $2124 \times 2124 \mu\text{m}$. Estas imágenes fueron tomadas usando el Microscopio Confocal Zeiss 710 NLO usando un láser de excitación a 547 y 638 nm y filtros de emisión a 500-580 y 660-740 nm para Sytox Orange y NucRed respectivamente. Posteriormente se les aplicó un filtro de color, en donde verde representa a la señal recibida por el SytoxOrange y rojo a la señal recibida por el NucRed. Para contabilizar las células se consideraron las de mayor intensidad, contabilizando las de color verde como células muertas y las de color rojo como vivas.

4.5. Medición de fluidez de la membrana celular cultivada en medio de cultivo y en matrices de colágeno con distinta rigidez utilizando microscopia de fluorescencia Laurdan

4.5.1. Determinación de la fluidez de la membrana celular

4.5.1.1. Cultivo celular sobre colágeno

Para obtener las imágenes para la determinación de fluidez, el plato de cultivo de 35 mm con vidrio óptico se ubicó en la cámara de observación manteniendo la temperatura a 37°C. Las imágenes se obtuvieron en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica de la Universidad de Irvine California, USA. Usando el Microscopio Confocal Zeiss 710 NLO de dos fotones con un láser de excitación a 780 nm y emisión entre los rangos 412-464 para el canal 1 (CH1) y entre 482-534 para el canal 2 (CH2) para a partir de estas calcular la imagen de PG. Esto se repitió para cada concentración de colágeno.

Para la obtención de los valores de PG de Laurdan, se utilizó el programa ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU) usando el Plugin “LSM_Toolbox”. Primero las imágenes se transformaron a formato Tiff 8bit y se separó los canales 1 y 2 (CH1 y CH2 respectivamente). Una vez obtenidas estas imágenes se utilizó un macro de ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU) para la realización de las operaciones requeridas para la obtención de las imágenes de PG. El procedimiento realizado por este macro consiste primero en eliminar el ruido de fondo de las imágenes CH1 y CH2, posteriormente el canal 2 se multiplica por un factor G, que rectifica que los detectores de las dos regiones medidas puedan detectar en forma diferente, en este instrumento el factor G es de 1. Luego se aplicó la fórmula de PG (Ecuación 1) en cada pixel de las de 2 imágenes obtenidas y se obtuvo la imagen de PG

4.5.1.2. Cultivo celular dentro de colágeno

De forma similar al anterior. Para la observación de las células en el microscopio se tomó la placa multi pocillos y se puso directamente en la cámara de observación manteniendo la temperatura a 37°C. Se utilizó un

microscopio confocal Zeiss 710 NLO con excitación de dos fotones con una laser de excitación a 780 nm y emisión entre los rangos 412-464 para el canal 1 (CH1) y entre 482-534 para el canal 2 (CH2) para a partir de estas calcular la imagen de PG. A diferencia del experimento anterior las células estaban inmersas dentro del colágeno, es decir, esta no estaba plana, sino que inclinadas según crecieron en el colágeno. por esta razón, se tomó 20 imágenes aproximadamente en el eje Z. Estas 20 imágenes corresponderían a la célula completa. El análisis de las imágenes se realizó de forma análoga al experimento anterior con la diferencia que se realizó para cada una de las imágenes tomadas en el eje Z.

4.5.1.3. Análisis de cobertura de PG (*Coverage* PG)

El análisis de cobertura (del inglés *coverage*) PG permite analizar los dominios de membrana predominantes y los porcentajes en los que se encuentran. Para la obtención de estos valores a partir del histograma de PG obtenido de las membranas que corresponden a la distribución de pixeles con diferentes valores de PG se le realiza una deconvolución en dos Gaussianas, de esta forma se obtienen dos poblaciones de pixeles que representan los valores de PG. Estas poblaciones de pieles representan la diferente fluidez que está caracterizada por un valor de PG y un porcentaje de ocupación (% *coverage*).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Implementación de la metodología de fabricación de matrices de colágeno con rigidez variable

Se fabricaron matrices de colágeno de concentraciones 0,5/ 1,0 / 2,0 y 4,0 mg/mL. Se consideraron además dos tiempos de gelificación de 1 y 3 días, teniendo en cuenta que estas matrices deben presentar las mismas condiciones que existirán cuando las células sean cultivadas en ellas. En el caso de las células, estas se observarán después de 1 y 3 días de cultivo, para permitir su crecimiento y la interacción con la matriz. El protocolo establecido por la empresa GIBCO indica en uno de los pasos que debe añadirse agua a la solución de colágeno para gelificarlo, sin embargo esto se reemplazó por medio de cultivo DMEM para favorecer que las células dentro de colágeno pudieran vivir (Yoon y col., 2016)(Zhang y col., 2017) (Kurniawan y col., 2012). Para mantener el protocolo consistente, también se reemplazó el agua por medio de cultivo para los experimentos donde las células se crecieron sobre colágeno.

En la figura 7 se observan matrices de 0,5 a 4 mg/mL del día 1 una vez gelificadas. Se observa en todas ellas el color rosado del indicador rojo fenol a pH 7. La solución de colágeno concentrada (5 mg/mL) tiene como solvente ácido acético 20 mmol/L (para mantener al colágeno en solución), así a medida que aumenta la concentración de colágeno, más NaOH es necesario para neutralizarlo. La diferencia de la intensidad de color rosado que se aprecia en la figura se debe a que, dependiendo de la concentración de colágeno, la razón entre solución stock de colágeno y medio de cultivo cambia y a medida que aumenta la concentración de la proteína, menor es la cantidad de medio con rojo fenol en la solución.



Figura 7. Matrices de colágeno gelificadas. De izquierda a derecha las concentraciones son de 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 mg/mL.



5.2. Caracterización de las matrices de colágeno

Las matrices se caracterizaron en sus propiedades viscoelásticas mediante reología, el tamaño de fibra mediante microscopia SEM y el volumen de la matriz mediante microscopia de fluorescencia.

5.2.1. Ensayos reológicos de amplitud de las matrices colágeno

La figura 8 muestra el valor de G' (módulo de almacenamiento) para las cuatro matrices. Se observa que G' aumenta conforme aumenta la concentración de colágeno, esto porque a mayores concentraciones se acelera la fibrogénesis debido a una mayor disponibilidad cadenas de colágeno libre proporcionando mayor rigidez (Zhang y col., 2017). Los valores de G' obtenidos fueron de 100 Pa para 0,5 mg/mL y 1000 Pa para 4 mg/mL los cuales son mayores a lo reportado en trabajos anteriores, en donde se encuentran valores de 1 Pa para 0,5 mg/mL y 100 Pa para 4 mg/mL (Vader y col., 2009) (Kurniawan y col., 2012) (Motte y col., 2013). Sin embargo, la

metodología reportada por estos autores difiere en el tiempo de gelificación usado. Los mencionados reportan tiempos de gelificación de 30 min, 90 min y 2-3 horas, respectivamente. Reportes de la literatura indican que hay un aumento progresivo en el valor del módulo de Young, el cual se relaciona con el módulo de cizalla, conforme aumenta el tiempo de gelificación del colágeno. (Roeder y col., 2002) (Madhavan, y col., 2010). Siguiendo esta lógica, los valores obtenidos en este trabajo son similares a los descrito a mayores tiempos de gelificación (Zhang y col, 2017).

Un ensayo de amplitud es útil para determinar la región lineal viscoelástica (LVR) y que corresponde al rango de deformación (o stress) donde no existe cambio en G' . En las matrices de colágeno preparadas en este trabajo no se utilizó ningún entre cruzador, y por ello la estabilidad estructural de las matrices ocurre por interacciones no covalentes. Se ha propuesto que estas interacciones se rompen bajo estrés, de esta forma liberando parte de la energía aplicada y generando el ablandamiento inicial que se observa a bajas deformaciones (Figura 8). La posterior zona lineal que se observa puede ser atribuida a la orientación y alineación de las fibras (Gralka & Kroy, 2015) (Burla y col., 2020).

Entonces, es posible que, a concentraciones de colágeno bajas, y debido a que hay un menor número de fibras se observa en mayor medida el fenómeno de ablandamiento. En el día 3 (Figura 8B) a concentración de 1 mg/mL se observa a bajas deformaciones de 0,01% aumenta G' y mantiene la dependencia con la deformación. Esto se puede deber a la organización que presentan sus fibras, las cuales poseen una organización más “fibrilar”, mientras que las concentraciones de 0,5/2/4 mg/mL presentan una organización en “malla”. Esto se discutirá en secciones posteriores.

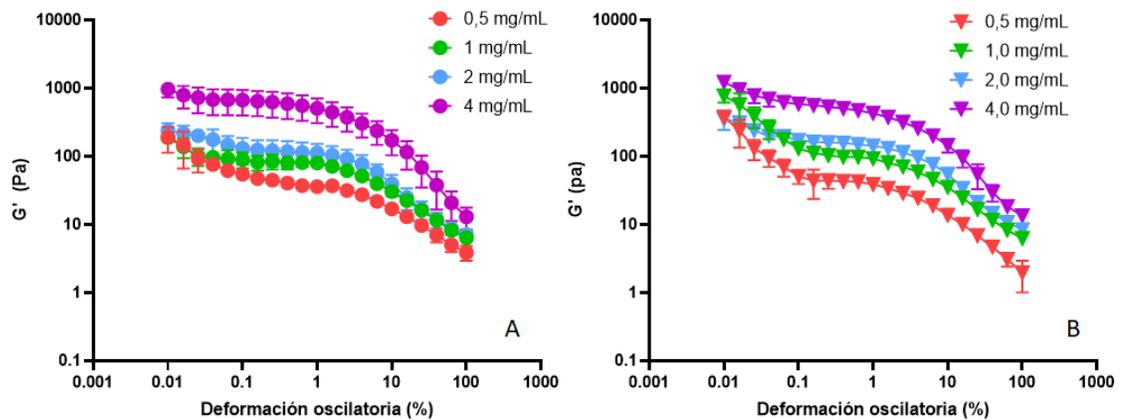


Figura 8. Módulo de almacenamiento versus deformación oscilatoria para las matrices de colágeno del día 1 y 3. Valores de G' para el día 1 (A) y día 3 (B). Concentraciones de 0,5 mg/mL (rojo) 1,0 mg/mL (verde), 2,0 mg/mL (azul) y 4,0 mg/mL (morado).

La figura 9 A-H muestra la comparación del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). Se observa que para los dos tiempos de gelificación (día 1 y día 3) G'' es superior a G' . Esto indica que el material fluye cuando se le aplica estrés, debido a que hay una mayor contribución viscosa que elástica. Esto es contrario a lo reportado, donde G' es siempre mayor que G'' independiente del tiempo de gelificación (Vader y col., 2009) (Kurniawan y col., 2012) (Zhang y col., 2017) incluso hasta deformaciones que no superen el 250% (Kurniawan y col., 2012). Al comparar las metodologías usadas, un parámetro a destacar es el *gap* usado en las mediciones. El *gap* corresponde a la distancia entre los platos donde se encuentra la muestra para la medición. En el presente trabajo se utilizó una geometría de 8 mm con un *gap* de 1000 μm y se utilizó un volumen de 500 μL de colágeno. Los valores de *gap* y volumen de colágeno reportados son variados: Vader y col. reportaron el uso de una geometría con 40 mm de diámetro y un *gap* de 109 μm utilizando un volumen de colágeno de 1,2 mL. Por otro lado, Motte y col. utilizaron una de geometría de 60 mm y un *gap* de 26 μm sin reportar el volumen utilizado. Kurniawan y col. reportaron el uso de una geometría de 40 mm y un *gap* de 500 μm y un volumen de 630 μL de colágeno y finalmente Zhang y col. reportaron una geometría de 40

mm y 1000 μm de *gap*, no reporta volumen utilizado. Además, Arevalo y col. evaluaron el efecto del *gap* en geometría de cizalla en colágeno y observaron que no había una variación significativa del valor de G' entre los rangos de 50 μm a 300 μm (Arevalo y col., 2010). Por lo cual, existe evidencia que *gaps* pequeños no afectan G' de forma significativa. Sin embargo, para *gap* superiores a 500 μm no hay información concluyente

Por lo cual, una posible explicación para el comportamiento observado, es el efecto conocido como “resbalón” (*slip*, en inglés) el cual consiste en que, a menor *gap* utilizado, la viscosidad del material estudiado disminuye. Henson y Mackay propusieron cuatro posibles mecanismos para este efecto, dentro de estos destaca el mecanismo de capa desenredada. Este modelo supone que entre los límites de la geometría utilizada y la matriz hay una capa de espesor finito con una viscosidad inferior al de la viscosidad aparente de la muestra. Esta capa tendría menor viscosidad porque está más desenredada (Henson & Mackay, 1995) (Zhai y col., 2000). En nuestra experiencia, cuando se realizaron los ensayos de amplitud, las muestras presentaban una cantidad de líquido evidente, por lo tanto, es posible en nuestro caso, la “capa desenredada” propuesta por Henson y Mackay sea agua y contribuya a la fluidez de la muestra, resultando en un aumento en el valor de G'' . Además, se observa que esto es más prominente a menores concentraciones (Figura 9 A-B, E-F) que a mayores concentraciones (Figura 9 C-D, G-H) de colágeno. En efecto, mayor concentración hay menor proporción de agua en las matrices. Además, se ha reportado el uso de cubre objetos con poly-L-lisina para fijar a las matrices de colágeno y evitar que estas resbalen (Nam y col., 2016) (Burla y col., 2020)

Es interesante notar que en los gráficos de G' y G'' , existe una deformación donde se intersecan ambos módulos ($G' = G''$). Además, se evidencia que la intersección de los módulos ocurre a menor deformación con el aumento de las concentraciones de colágeno. Desde el punto de vista físico, antes de la intersección ($G' < G''$) existe una mayor contribución viscosa, es decir una mayor tendencia a fluir, mientras que a mayor deformación ($G' > G''$) existe una mayor contribución elástica. Estos resultados son consistentes con lo reportado en relación del fenómeno de rigidización por deformación (*strain-stiffening*) reportado por Zolfahari y col. y también el ablandamiento por

deformación (*strain-softening*). Este fenómeno fue inicialmente reportado por Kurniawan y col. en el 2012 y explica que este efecto viscoelástico se puede deber al deslizamiento de las fibras entre sus entrecruzamientos y se ha demostrado que la adición de entrecruzamientos químicos permanentes en la matriz, reduce este deslizamiento y por ende reduce el ablandamiento por deformación (Kurniawan y col., 2012) (Zolfaghari y col., 2020).

A mayores concentraciones de colágeno hay una mayor cantidad de fibras de colágeno y esto genera un aumento de la contribución elástica de la matriz. Sin embargo, en el día 3 se observa que las concentraciones de 0,5 y 1 mg/mL la deformación a la cual G'' se interseca con G' , aumenta. Mientras que se mantiene constante a concentraciones mayores de colágeno. Para poder dar una explicación a este comportamiento primero hay que entender el comportamiento de la matriz y de las fibras al aplicarles estrés

Se ha propuesto que la causa del comportamiento viscoelástico presente en las fibras de colágeno cuando se aplica un esfuerzo de cizalla es debido a la cizalla interfibrilar producida por el deslizamiento relativo de las fibrillas. Esto permite a la matriz disipar la energía aplicada a través del deslizamiento entre las fibrillas. Este deslizamiento reduce la cantidad de deformación que es transmitida a las fibrillas y, por lo tanto, baja el módulo macroescalar del tejido. (Szczesny & Elliott, 2014).

Ahora bien, como esto afecta a nivel de una sola fibra de colágeno, se ha propuesto que el esfuerzo aplicado genera un reordenamiento molecular entre las fibras de colágeno y las moléculas de agua. Cuando se aplica estrés a la fibra de colágeno las moléculas de colágeno se reordenan de diferentes formas. Primero las cadenas de colágeno se desenredan y se estiran, para luego deslizarse entre sí. Posteriormente las moléculas de agua que rodean al colágeno pueden rotar, trasladarse dentro de la fibra o ser expulsadas de la fibra resultando en una reorganización de la red de agua. Finalmente, este reordenamiento del agua puede crear un estrés opuesto (del inglés *back stress*) en la fibra. Cuando el estrés aplicado se retira el estrés opuesto acumulado causa que el colágeno y las moléculas de agua dentro de la fibra se reordenen. Sin embargo, cuando la magnitud del estrés opuesto es igual al

estrés aplicado la fibra ya no vuelve a su forma original (ya no hace *creep*) y la matriz fluye (Shen, y col., 2011)

Entonces, es posible, que en las concentraciones de colágeno de 2 y 4 mg/mL debido a que hay una menor proporción de agua y un mayor número de fibras la deformación a la que G'' y G' se intersecan se mantiene mientras que a menores concentraciones de colágeno aumenta. Por otro lado, se observa que a deformaciones mayores G'' se vuelve a intersectar con G' en las concentraciones de colágeno de 2 y 4 mg/mL. Esto significa que el material tiende a fluir. Esto se puede deber a que a mayores concentraciones de colágeno las cadenas de polímeros de las matrices tienden a ceder a deformaciones más bajas (del inglés, *yield strain*), mientras concentraciones de colágeno menores se presentan pueden soportar una mayor deformación antes de ceder (Kreger y col., 2010) (Motte & Kaufman, 2013). Esto se podría atribuir a que a menores concentraciones de colágeno hay una mayor cantidad de agua por lo cual tiene una mayor acumulación de estrés opuesto lo que le permite resistir una mayor deformación antes de que la cadena ceda.



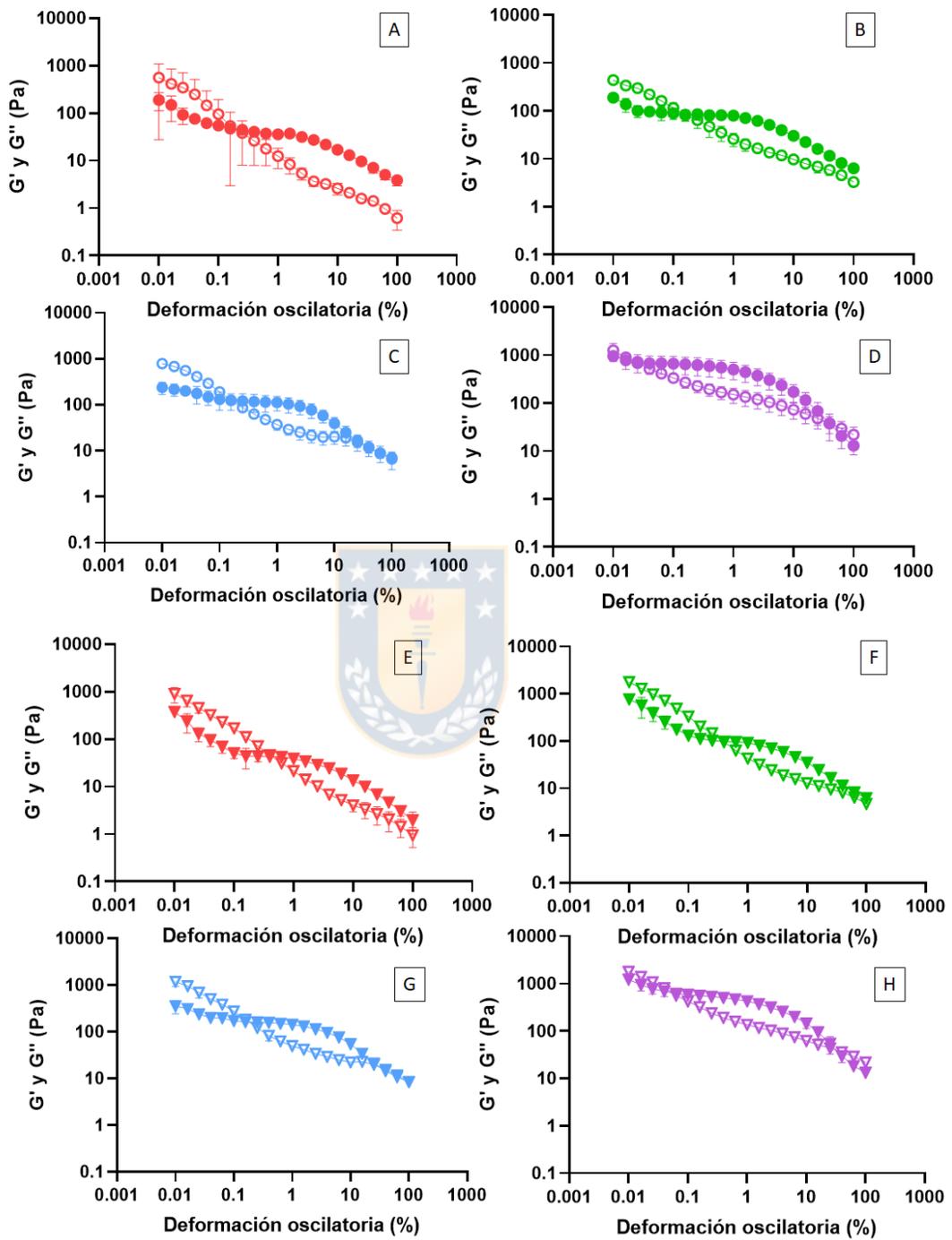


Figura 9. Ensayo de amplitud en deformación oscilatoria de las matrices de colágeno para el Día 1 y Día 3. En la figura se muestra G' (círculos y triángulos cerrados) y G'' (círculos y triángulos abiertos) para el Día 1 (A-D) y el Día 3 (E-H) para concentraciones de colágeno a 0,5 mg/mL (rojo), 1 mg/mL (verde), 2 mg/mL (azul) y 4 mg/mL (morado).

Finalmente, para comparar la rigidez de los diferentes sistemas se estableció como referencia una deformación de 0,25%, debido que a esa deformación ambos días presentan una región viscoelástica consistente, y se determinó el módulo complejo (G^*). En la Figura 10 se observa que a mayor concentración de colágeno el módulo complejo aumenta, es decir la rigidez de la matriz es mayor, lo cual concuerda con lo reportado (Kurniawan y col., 2012) (Vader y col., 2009). Además, cuando se compara los días 1 y 3 también hay un aumento leve de la rigidez, claramente asociado a un mayor tiempo de gelificación. Se realizó un test ANOVA en donde se determinó que la variación de G^* al pasar del día 1 al día 3 no es significativa ($p > 0.05$).

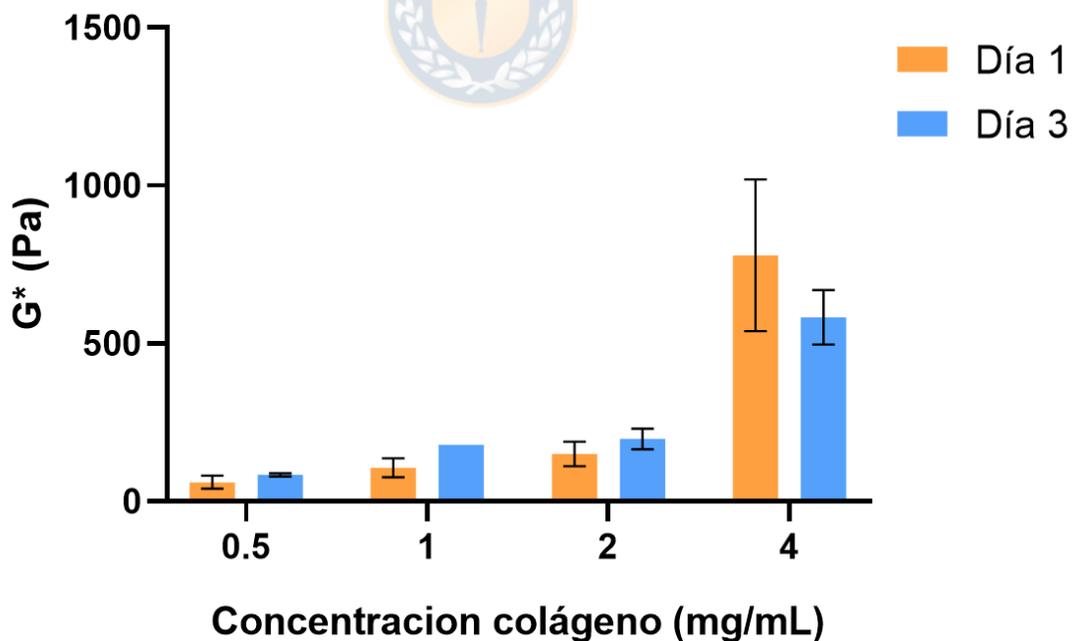


Figura 10. Módulo complejo de las distintas concentraciones de colágeno

5.2.2. Determinación del diámetro de fibra promedio

Para la obtención de las imágenes SEM de las matrices colágeno primero se consideró el método de liofilización como se ha propuesto en otros trabajos (Lohrasbi y col., 2020). Sin embargo, demostraba ser muy agresivo para las fibras y estas se destruían completamente. Por esta razón se optó por utilizar el método de secado mediante alcohol, usado para muestras biológicas (Moran & Coats, 2012) y que mostró mejores resultados (Figura 11 y 12).

En ambos tiempos de gelificación (día 1 y día 3) se observa que al aumentar la concentración aumenta el número de fibras. Esto debido a que hay una mayor cantidad de colágeno por mililitro y por lo tanto al momento de llevar a pH neutro y gelificar 37 °C se forman más fibras que a menores concentraciones (Buehler, 2006). Esta podría ser una de las razones del aumento de G^* (Figura 10).

Destaca en la organización de la matriz de 1 mg/mL (Figura 11B y 12B) que a diferencia de las otras concentraciones, tiene una organización que se asemeja más una “fibra” mientras que las otras concentraciones poseen un organización similar a una “malla” (Figura 11 A, C y D) siendo más notorio al gelificar durante más tiempo (Figura 12 A, C y D).

Este tipo de organización puede explicar el comportamiento de G' visto en las matrices de colágeno de 1 mg/mL (Figura 8B) en la cual se observa un aumento en la G' máximo y una dependencia de la deformación. Se ha reportado que al gelificar el colágeno en una direccionalidad paralela (de fibra), en vez de ortogonal (malla), aumenta su fuerza de tensión, que es el máximo estrés que puede soportar un material antes de romperse (Tanaka y col., 2011). Por otro lado, se han propuesto dos mecanismos de plasticidad; el primero es a nivel de red de las fibras de colágeno que indica que al aplicar un esfuerzo las fibras agrupadas se empiezan a desprender debido a la pérdida de interacciones no covalentes. El segundo mecanismo se refiere al alargamiento de fibras debido a deslizamiento de los aminoácidos (Burla y col., 2020).

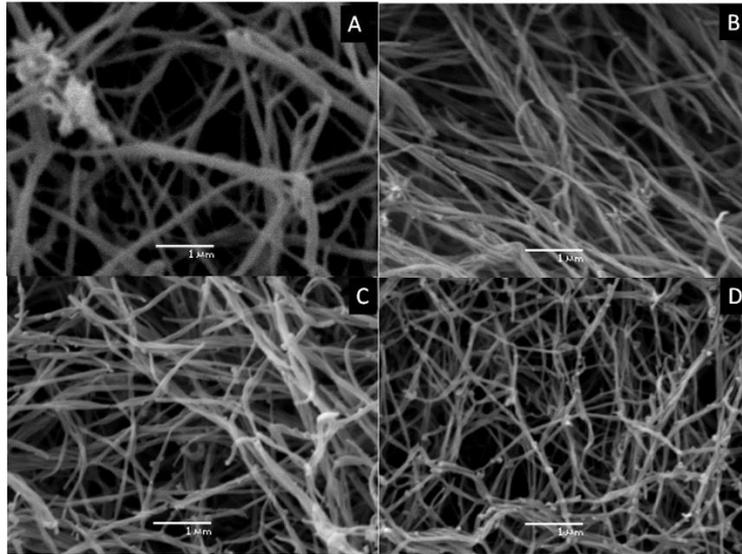


Figura 11. Imágenes SEM de las fibras en matrices de distinta concentración de colágeno día 1. Imágenes SEM de las matrices de colágeno con concentración de 0,5 mg/mL (A), 1,0 mg/mL (B), 2,0 mg/mL (C), 4,0 mg/mL (D) y gelificadas durante 24 horas.

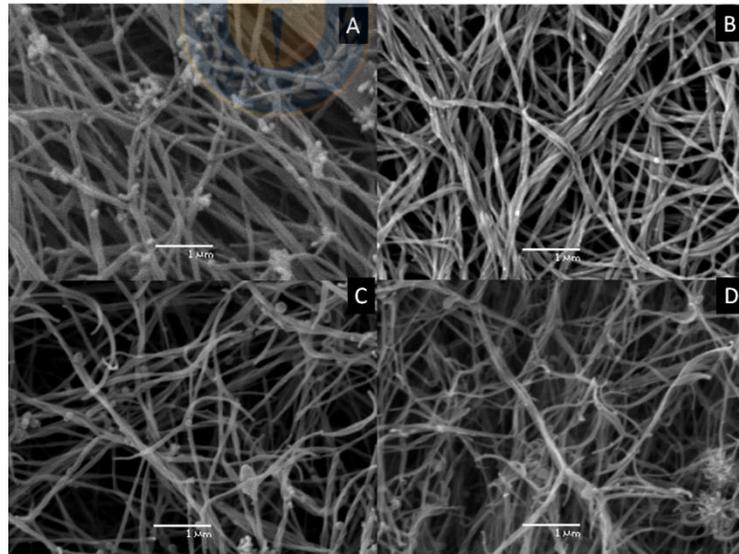


Figura 12. Imágenes SEM de las fibras en matrices de distinta concentración de colágeno día 3. Imágenes SEM de las matrices de colágeno con concentración de 0,5 mg/mL (A), 1,0 mg/mL (B), 2,0 mg/mL (C), 4,0 mg/mL (D) y gelificadas durante 72 horas.

Para determinar el tamaño de fibra promedio se diseñó un protocolo de análisis utilizando imágenes SEM de $6,40 \times 4,80 \mu\text{m}$ (1280×960 pixels). Las imágenes fueron adquiridas en 4 diferentes posiciones del plano XY de cada una de las matrices de colágeno (Figura 13). Utilizando el programa ImageJ se midió para cada concentración de colágeno el tamaño de aproximadamente 80 fibras individuales (Figura 13 A y B) y con esto se calculó el diámetro de fibra promedio

El diámetro promedio de las fibras individuales de las matrices a las distintas concentraciones y días se muestra en la Figura 14 y Tabla 2. Las fibras de la matriz de concentración de $0,5 \text{ mg/mL}$ presentó un mayor diámetro promedio (137 nm) para el día 1 que para el día 3 (108 nm). El análisis ANOVA indica que estos valores tienen una diferencia significativa entre ellos ($p < 0,05$). Esto se puede deber a que, al haber una mayor cantidad de agua, las fibras están más hidratadas el día 1 y al pasar el tiempo a 37°C parte del agua se evapora. Para las otras concentraciones de colágeno el diámetro de fibra se mantiene entre los dos días y entre diferentes concentraciones entre el rango de 78 y 90 nm . Siendo la que tiene menor diámetro las fibras de la matriz de 4 mg/mL del día 3 con un diámetro de $69,90 \text{ nm}$. En la literatura el diámetro de las fibras gelificadas durante 2 horas suelen estar en el rango de los 400 nm (Kreger y col., 2010). Sin embargo para tiempos mayores a 24 horas suelen estar cerca de los 90 nm (Raub y col., 2007) (Zhang y col., 2017). Si bien existe variación en el diámetro de las fibras dependiendo del origen del colágeno (Kreger y col., 2010), nuestros valores se encuentran dentro del rango reportado.

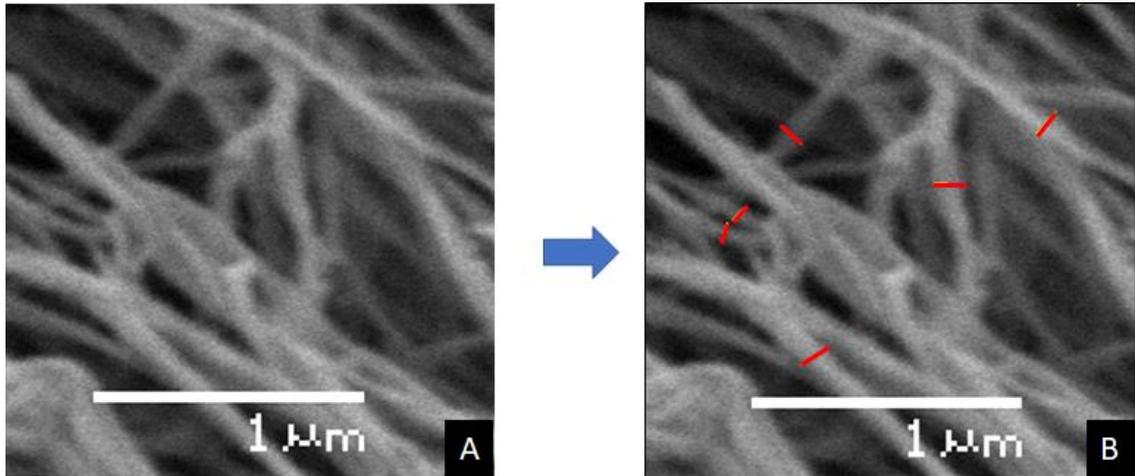


Figura 13. Imágenes SEM para la determinación del diámetro de fibra. A las imágenes obtenidas mediante SEM (A) se les midió el diámetro de fibra con el programa ImageJ, en rojo se observa la línea trazada para medir distancia (B).

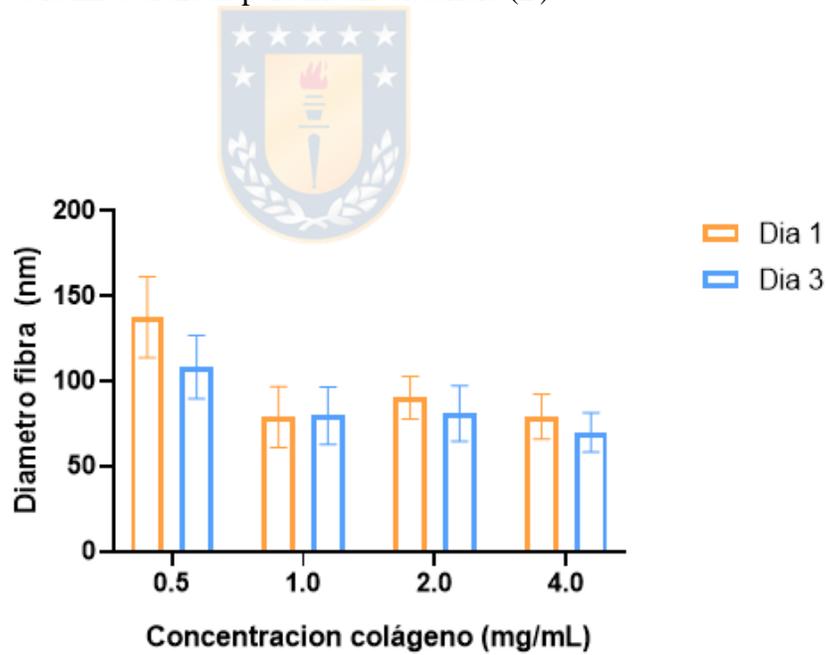


Figura 14. Promedio de diámetros de las fibras de colágeno a las distintas concentraciones gelificadas a 1 y 3 días.

Tabla 2. Promedios de diámetros de fibras individuales de las matrices de colágeno gelificadas a 1 y 3 días.

Concentración de colágeno (mg/mL)	Diámetro de fibra (nm) Dia 1	Diámetro de fibra (nm) Dia 3
0,5	137,52 ± 23,81	108,28 ± 18,62
1	78,81 ± 17,89	79,67 ± 16,98
2	90,21 ± 12,49	80,96 ± 16,21
4	79,05 ± 13,13	69,90 ± 11,59

5.2.3. Determinación de la fracción de volumen de las fibras

Se determinó la fracción del volumen de las fibras como una manera de saber el volumen libre disponible para el crecimiento de las células, que corresponde a la sustracción del volumen ocupado por las fibras del volumen total.

Para la determinación del volumen ocupado por las fibras se tomaron imágenes 3D utilizando la señal de Segunda Harmónica (SHG, por sus siglas en inglés) del colágeno tipo I. Esta técnica no destructiva permite obtener imágenes atravesando el material en el eje Z. Para cada matriz se tomaron 4 sets de imágenes 3D (volumen XYZ de 30×30×2 μm) de intensidad y tiempo de vida de SHG en 3D.

La longitud de onda de la señal de SHG del colágeno es exactamente la mitad de la longitud de onda incidente, vale decir excitando a 800 nm la segunda armónica aparece a 400 nm, una señal bastante separada de señales de emisión como la autofluorescencia (cercana a los 500 nm), y por tanto una señal bastante limpia. Por otro lado, la penetrabilidad de la longitud a 800 nm hace posible examinar el interior de la matriz y determinar el volumen ocupado por las fibras. mediante una reconstrucción 3D a partir de una serie de imágenes tomadas en el eje Z (Raub y col., 2007) (Wolf y col., 2009).

Sin embargo, la dificultad que se encontró con esta metodología fue que dependiendo del tipo y cantidad de fibra formado (tamaño y organización) la intensidad de la señal de SHG era muy variable y el análisis era dependiente de la elección del nivel de intensidad a considerar en el análisis, parámetro dependiente del usuario. El problema se resolvió usando un equipo existente en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica de la Universidad de California Irvine llamado Diver. Este equipo puede medir la intensidad de SHG y simultáneamente medir pixel por pixel el tiempo de vida de la señal SHG, que al ser una señal reflejada es igual a cero (Dvornikov y col., 2019). Dado que el parámetro de tiempo de vida es una propiedad intensiva del material, (independientes de la concentración) midiendo este parámetro, se elimina la subjetividad del análisis de intensidad.

La Figura 15 muestra un ejemplo del diseño de análisis para una matriz de concentración 2 mg/mL. En la imagen de intensidad SHG en un plano XY (figura 15A) es posible observar las fibras de colágeno, las cuales poseen diferentes tamaños e intensidades. Paralelamente se obtuvo la imagen de tiempo de vida de SHG y el valor de tiempo de vida de cada pixel en la imagen se transformó y representó en un gráfico de fasores (figura 15B). Los valores de tiempo de vida en este tipo de representación van desde izquierda a derecha siguiendo el círculo del gráfico polar, desde cero hasta tiempos de vidas más largos (Flecha de figura 15B). En la figura 15B se puede apreciar todos los fasores correspondientes a la figura 15A ubicados en el extremo derecho que corresponde al tiempo de vida cero de la señal de SHG (con la dispersión propia de este tipo de análisis). El programa de análisis permite dibujar un curso circular del color deseado (cursor rojo en Figura 15B) y circunscribir los fasores de interés. Utilizando el mismo color del cursor (rojo), en la imagen de intensidad se destaca los pixeles correspondientes donde se originó cada tiempo de vida (figura 15C). Esta imagen de fasores (figura 15C) fue utilizada para calcular, en cada plano de una imagen 3D, el porcentaje del área total ocupada por el colágeno. La reconstrucción 3D del volumen XYZ ($30 \times 30 \times 2 \mu\text{m}^3$) para una matriz de 2 mg/ml se muestra en la Figura 15D. A partir de estos datos se calculó el porcentaje en volumen ocupado por el colágeno en cada concentración.

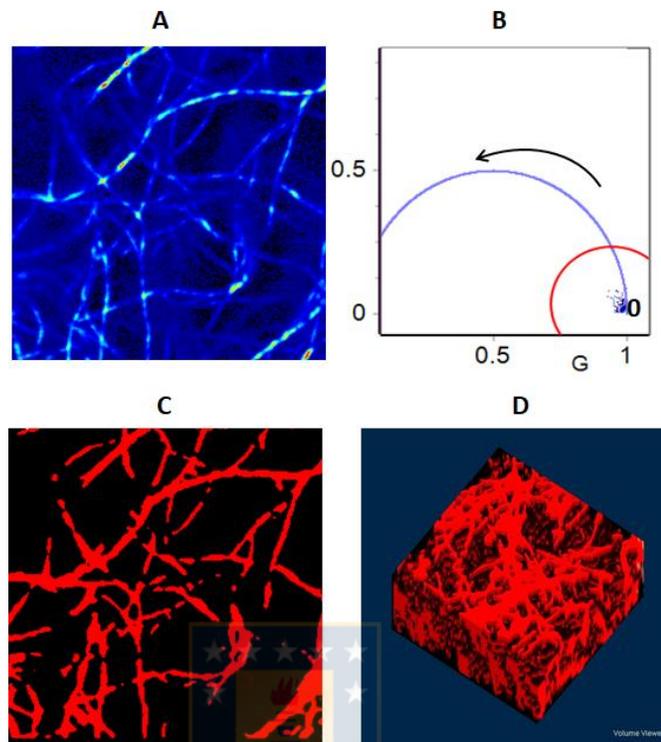


Figura 15. Microscopia de segunda armónica de colágeno para la determinación de fracción de volumen de fibras. A partir de una matriz de colágeno 2mg/mL se obtuvo una imagen de segunda armónica (A), a esta imagen se le midió el tiempo de vida y se lo representó mediante un gráfico de fasores (B). El programa permite colocar un cursor (representado en un círculo rojo de la imagen B) en el gráfico y esto nos muestra la intensidad de la señal para ese sector (C). A partir de esta imagen tomada, en varios planos, se reconstruye una imagen 3D (D).

La figura 16 muestra el porcentaje de volumen ocupado por colágeno en cada matriz a las distintas concentraciones. Se observa en el Día 1 que la concentración de 0,5 mg/mL ocupa una fracción de volumen cercana al 40%, que es mayor que la de 1 mg/mL (35%) y cercana a la de 2 mg/mL (45%). Esto se puede deber al diámetro de fibra de la concentración de 0,5 mg/mL (Table 2) que es casi el doble del diámetro de fibra de 1 mg/mL. Una prueba de esto se puede observar en el Día 3, en donde el diámetro de fibra de la concentración de 0,5 mg/mL disminuye en mayor proporción que las demás concentraciones y así también su volumen ocupado. También en el día 3 se observa el aumento en la fracción de volumen de las concentraciones de 1

mg/mL y 2 mg/mL alcanzando un valor máximo de 70% el cual incluso supera a la concentración de 4 mg/mL (65%). Estos valores son mayores a los reportados previamente, en los cuales a tiempos de gelificación de 2 horas alcanzan una fracción de volumen entre 7% para 0,5 mg/mL y 17% para 4 mg/mL (Kreger, y col., 2010).

Se ha reportado que a mayor fracción de volumen existe una mayor rigidez (Goh y col., 2008) (Kreger y col., 2010) y paralelamente conforme aumenta la concentración de colágeno, disminuye el tamaño de poro (distancia entre fibras) (Kaufman y col., 2005) (Arevalo, y col., 2015)

Lo cual parcialmente representa lo observado en nuestros resultados. En el día 3 la concentración de 4 mg/mL disminuye su fracción de volumen y también su G^* (Figura 10). Sin embargo, en el mismo día 3, la concentración de 2 mg/mL aumenta su volumen ocupado superando a la de 4 mg/mL pero su G^* sigue siendo menor que la de 4 mg/mL. Esto indica que hay factores adicionales además de la fracción de volumen que afectan la rigidez de la matriz. Por ejemplo, la orientación de las fibras al momento de ejercer el esfuerzo, se ha establecido que la orientación de las fibras en dirección de la fuerza éstas tienden a aumentar en rigidez (Zolfaghari y col., 2020) y el alargamiento de las fibras (Münster y col., 2013)

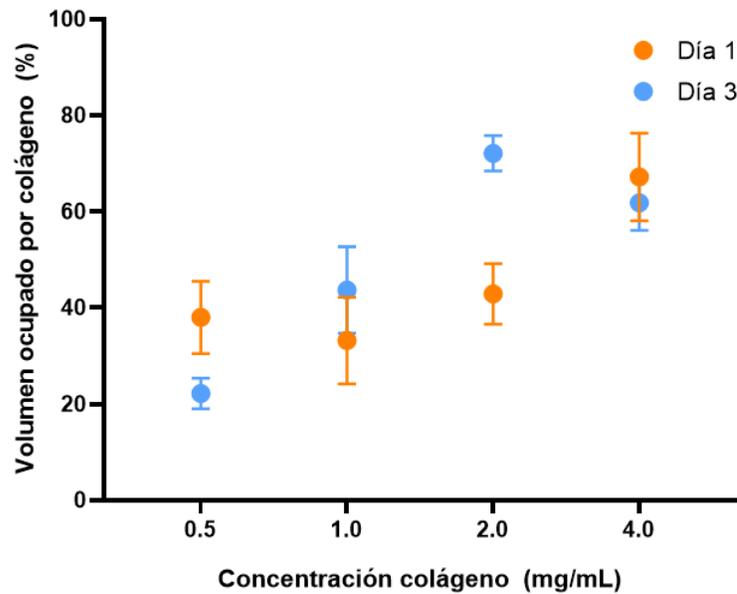


Figura 16. Volumen ocupado por el colágeno dentro de la matriz a las distintas concentraciones y días.

5.3 Determinación de la fluidez de la membrana celular

Se midió la fluidez de las membranas celulares de células NIH 3T3 crecidas sobre y dentro de matrices de colágeno embebidas en medio de cultivo, utilizando la sonda Laurdan y las imágenes de PG. Las medidas fueron realizadas a 37°C y se utilizó como control células crecidas sobre un plato de cultivo

Las imágenes de PG de Laurdan contienen no solo la membrana celular sino todos los organelos internos donde hay presencia de membranas (Figura 17 A). Para aislar los pixeles pertenecientes a la membrana se diseñó el siguiente protocolo de análisis: usando una de las imágenes de intensidad (CH2) se creó una máscara de la célula, luego se consideraron 5 pixeles desde el borde y hacia el interior de la célula y se creó una máscara del borde exterior de la célula. La máscara se usó para cortar las imágenes de PG (Figura 17 A) y obtener aquellos pixeles para medir la fluidez de la membrana (Figura 17B). Para obtener el valor de PG promedio (relacionado con la fluidez) se generó

el histograma de distribución de valores de PG (Figura 17 C) cuyo centro corresponde al valor reportado para cada imagen

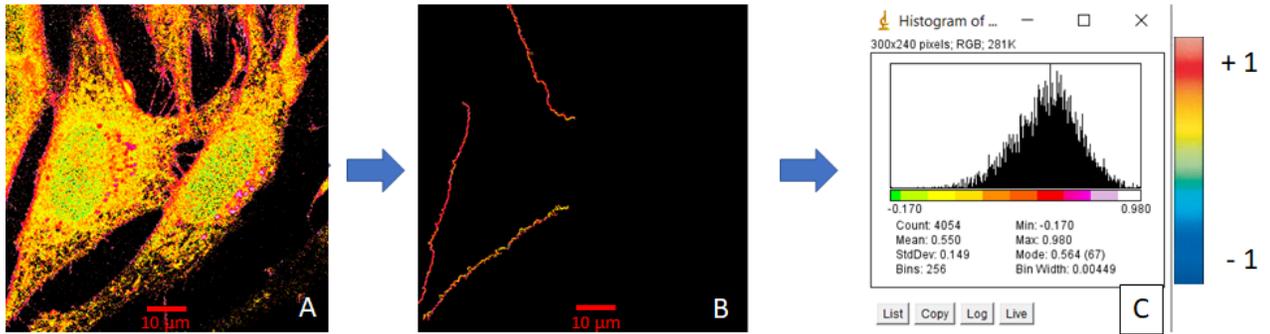


Figura 17. Medición de la fluidez de membrana de células NIH 3T3 mediante PG de Laurdan. Utilizando ImageJ se obtiene la imagen de PG (A). Posteriormente se seleccionan los píxeles de PG correspondientes a la membrana (B) y se obtiene el histograma con el valor promedio de PG (C). Se utilizó una paleta de colores que muestra las imágenes desde valores cercanos a -1 azul hasta rojo para valores de PG cercanos a +1.

5.3.1. Determinación de la fluidez de membrana celular en células sobre colágeno

Las imágenes de PG de Laurdan que fueron utilizadas para calcular la fluidez de las células crecidas sobre colágeno fueron tomadas al centro de la célula. Se midió el valor de PG de Laurdan promedio de las membranas de las células crecidas sobre colágeno por 24 horas (Día 1) y 72 horas (Día 3) (Figura 18). En este tipo de análisis a mayor PG promedio la membrana es más rígida y viceversa.

En el día 1 (naranja), no se observa una tendencia clara en el valor de PG de la membrana celular al aumentar la concentración de colágeno de la matriz sobre la que se encuentran las células. El análisis ANOVA indica que las variaciones de la PG promedio entre las distintas concentraciones de colágeno son significativas entre ellas y en comparación al control ($p < 0,05$).

En el día 3 (azul) sí es posible observar una disminución en el valor de PG promedio de las membranas al aumentar la concentración de colágeno de la matriz. Este resultado significa que la membrana tiende a ser más fluida al aumentar la concentración de colágeno. De igual forma al día 1 las variaciones de PG promedio entre las distintas concentraciones de colágeno son significativas entre ellas y en comparación al control ($p < 0,05$).

Al comparar la fluidez de las membranas en una misma concentración de colágeno, pero a distintos días de gelificación se observa, en general, una tendencia al aumento en la fluidez de la membrana con el tiempo de incubación, el cual es significativo ($p < 0,05$). Cabe destacar que la situación contraria se observa para el control y para las células cultivadas en la matriz de 2 mg/mL. En los cuales disminuye la fluidez al aumentar el tiempo en incubación.

En el control la células crecieron sobre vidrio de borosilicato el cual se ha demostrado ser una superficie que permite la adhesión celular (Zhang y col., 2009) (Hoppe y col., 2011). Un aumento en la adhesión puede ser la causante del aumento en la rigidez que se observa al pasar del día 1 al día 3. Se ha reportado que las integrinas (proteínas de la membrana celular) cuando están adheridas a una superficie disminuyen la fluidez de la membrana y cuando la célula se separa de la superficie, la membrana se vuelve más fluida (Gaus y col., 2006)(Norambuena & Schwartz, 2011). Además a través de estas uniones la célula puede censar la rigidez del ambiente en el que se encuentra (Gasparski & Beningo, 2015)

Los mecanismos de la adhesión celular son complejos, variados y dependientes del ambiente que rodea a las células (Plant y col., 2009). Bajo tensión mecánica, los complejos focales iniciales formados por integrinas resultantes de la interacción célula-colágeno pueden crecer en complejos más grandes, como adherencias focales que pueden contener a lo menos 50 proteínas diferentes que además proporcionan sitios de anclaje para microfilamentos de actina (proteína celular que ayuda en el desplazamiento de la célula) (Geiger & Zamir, 2001). Se ha sugerido que la formación, tamaño, composición y ubicación intracelular de los complejos proteicos responsables de estas adherencias dependen del tiempo y de las fuerzas

mecánicas ejercidas en estos puntos de unión. (Riveline y col., 2001) (Elosegui-Artola y col., 2016)

Se ha reportado una mayor adhesión celular de fibroblastos en ambientes con mayor rigidez (Russel y col., 1997) (Boddupalli & Bratlie, 2018).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que esto no necesariamente es así debido a que las células cultivadas en colágeno a concentraciones de 0,5 y 1 mg/L del día 1 se muestran membranas menos fluidas que las cultivadas en matrices de 2 y 4 mg/mL, lo cual sugeriría una mayor adhesión por parte de las células a las fibras de colágeno. Además, en el día 3 las matrices sufren un aumento en su rigidez (Figura 10) pero, a pesar de esto, se observa que las membranas celulares aumentan su fluidez, indicando una posible menor adhesión celular.

Cabe destacar en el día 3 el comportamiento de las membranas celulares de las células crecidas sobre las matrices de colágeno con concentración de 2 y 4 mg/mL: con respecto al día 1, las membranas sobre la matriz de 2 mg/mL pierden fluidez, mientras que las membranas sobre la matriz de 4 mg/mL se hacen más fluidas. La explicación a este comportamiento podría encontrarse en la caracterización realizada a las fibras de colágeno: En la matriz de 2 mg/mL aumenta el volumen ocupado por el colágeno (Figura 16) y aumenta en rigidez (Figura 10), mientras que ocurre lo contrario en la matriz de 4 mg/mL. En ambas figuras se observa que estas matrices son las que sufren cambios más significativos comparado con las otras concentraciones. Una manera de interpretar estos resultados es que la célula es más susceptible a cambios abruptos en las propiedades de la superficie en la que se encuentra y esto afecta de manera más significativa la fluidez de su membrana que pequeños cambios en el tiempo.

Por otro lado, en la literatura se describen dos posibles causas a la disminución de la fluidez de la membrana celular. La primera es que el cultivo de fibroblastos en mono capas 2D puede resultar estresante para las células y esto lleva a la reducción de esfingomiélin en la membrana celular debido a que la monocapa deja más susceptibles a las membranas a estrés oxidativo (Lupanova y col., 2010). La segunda es que en superficies de baja rigidez (0,5 y 1 mg/mL) las redes de actina pueden ser guiadas y orientadas

por la geometría de la superficie y pueden iniciar migración celular lo cual genera un aumento en la fluidez de la membrana celular (Gasparski & Beningo, 2015).

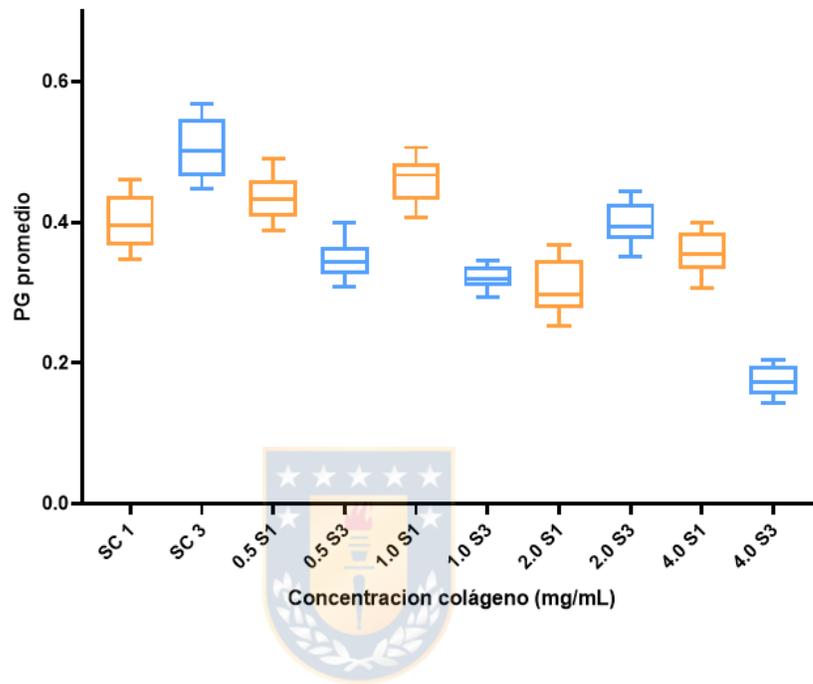


Figura 18. Mediciones de PG promedio de membranas sobre colágeno Día 1 (naranja) y Día 3 (azul) a las distintas concentraciones. SC representa el control, siendo las células crecidas sobre vidrio sin colágeno. S1 y S3 representa al día 1 y día 3 con los colores naranja y azul, respectivamente.

5.3.2. Determinación de la fluidez de membrana celular en células dentro de colágeno

A diferencia de las células crecidas sobre colágeno, las células dentro del colágeno crecen en forma espacial, por lo tanto, se midió un set de imágenes en z para dar cuenta de la fluidez de toda la membrana. Se midió la polarización generalizada (PG) promedio de las membranas en cada nivel z. La figura 19 reporta el promedio ponderado del valor de PG de la membrana para cada corte en z multiplicado por la fracción de área ocupado. Se utilizó

como valor de referencia células crecidas sobre un plato de cultivo. Tanto para el día 1 (Naranja) como para el día 3, no se observan cambios en el valor de GP promedio al aumentar la concentración de colágeno de la matriz. El análisis ANOVA indica que la variación de PG entre las distintas concentraciones de colágeno no es significativa ($p > 0,05$). Las variaciones de PG entre las concentraciones, en general, no son significativas entre ellas y con respecto al control. Excepto al comparar las PG de las membranas de las concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/mL. Las cuales sí son significativas. No se presentan los resultados para 0,5 mg/mL debido a que en uno de los días las células no crecieron.

Cuando se compara las mismas concentraciones a distintos días el análisis ANOVA indica que estos resultados son significativos. Excepto para las membranas que se encontraban dentro del colágeno con concentración 2 mg/mL.

A diferencia de lo observado en las células sobre colágeno, las membranas celulares dentro de colágeno muestran una fluidez similar independiente de la concentración de colágeno de la matriz. Al aumentar el tiempo de incubación las membranas celulares se hacen menos fluidas, indicando un aumento en la adhesión a su entorno (Figura 19). Esto se puede deber a que el colágeno se gelificó junto con las células y las células al estar embebidas en el colágeno son capaces de remodelar su entorno. En particular, los fibroblastos pueden fabricar y organizar el colágeno (Grinnell, 2003) (Baum & Duffy, 2011) (Frahs y col., 2018)

Es importante mencionar que la relación de célula y matriz es una interacción compleja en la que ambos se regulan mutuamente. Estas interacciones están mejor representadas en un ambiente 3D que 2D debido a que las células no están forzadas a adherirse en un plano XY con un fondo rígido, ni a tener una polaridad apical-basal (Duval y col., 2017). En los cultivos 3D las células son capaces de penetrar en la matriz y poder interactuar con las fibras de colágeno, censar patrones mecánicos distintos a los del cultivo 2D y con esto presentar distintos patrones de señalización y respuesta (Rhee & Grinnell, 2007) (Case & Waterman, 2015).

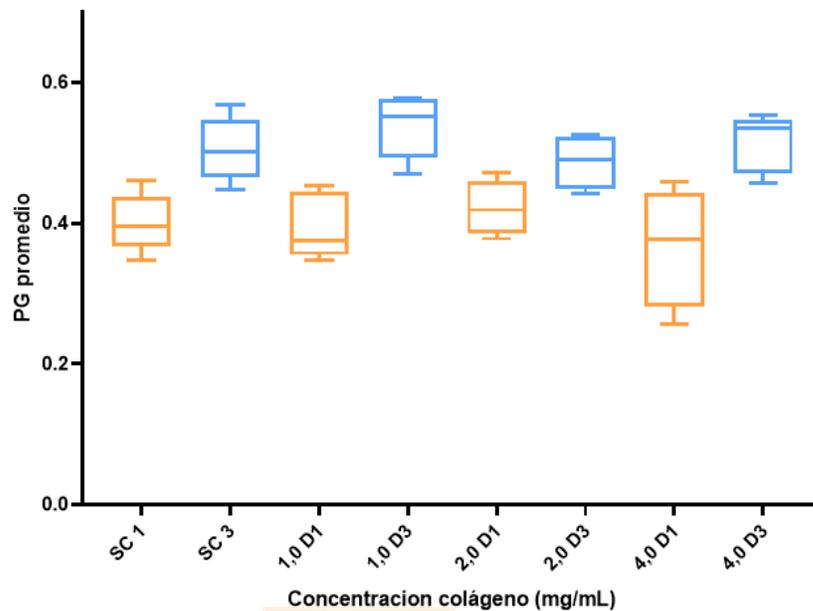


Figura 19. Mediciones de PG promedio de membranas dentro de colágeno Día 1 y Día 3 a las distintas concentraciones. SC representa el control, siendo las células crecidas sobre vidrio sin colágeno. D1 y D3 representa al día 1 y día 3 con los colores naranja y azul, respectivamente.

5.3.3. Dominios lipídicos predominantes de la membrana (GP coverage) sobre colágeno

La fluidez promedio de la membrana puede ser entendida como la existencia de dos tipos de dominios de diferente fluidez que se organizan espacialmente en toda la superficie de la membrana. Una forma de estudiar estos dominios es mediante el análisis de cobertura (del inglés, *Coverage*). En términos generales, este análisis usa el histograma de PG obtenido de las membranas, que corresponde a la distribución de píxeles con diferentes valores de PG y lo deconvoluciona en dos Gaussianas, definiendo así dos poblaciones de dominios con diferente fluidez (una más fluida de GP más bajo y una más rígida con valor de GP más alto) caracterizadas por un valor

promedio de PG y un porcentaje de ocupación (% *coverage*) cada una (Figura 20). Esta metodología ha sido utilizada previamente para análisis de fluidez de membrana celular a células sometidas a estrés de cizalla (Yamamoto & Ando, 2015) Se realizó un gráfico de cobertura para las imágenes de PG de células crecidas sobre colágeno (Figura 20).

En la sección anterior (figura 18) se determinó que para las células crecidas sobre vidrio (control) y sobre colágeno 2 mg/mL la fluidez de sus membranas disminuía (aumenta su GP) al aumentar el tiempo de incubación. El análisis de cobertura (Figura 20) indica que este cambio de fluidez se debe en el caso del control a un cambio en la rigidez promedio de las dos poblaciones de dominios (aumenta el valor de GP promedio de las dos poblaciones) pero el porcentaje de cobertura casi no cambia.

Para las otras concentraciones de colágeno, la fluidez de la membrana aumento con el tiempo de cultivo (Figura 18) y el análisis de cobertura indica que este cambio ocurre porque a nivel microscópico los dos tipos de dominios se hacen más fluidos (GP promedio disminuye) y aumenta el porcentaje de cobertura de ambos.

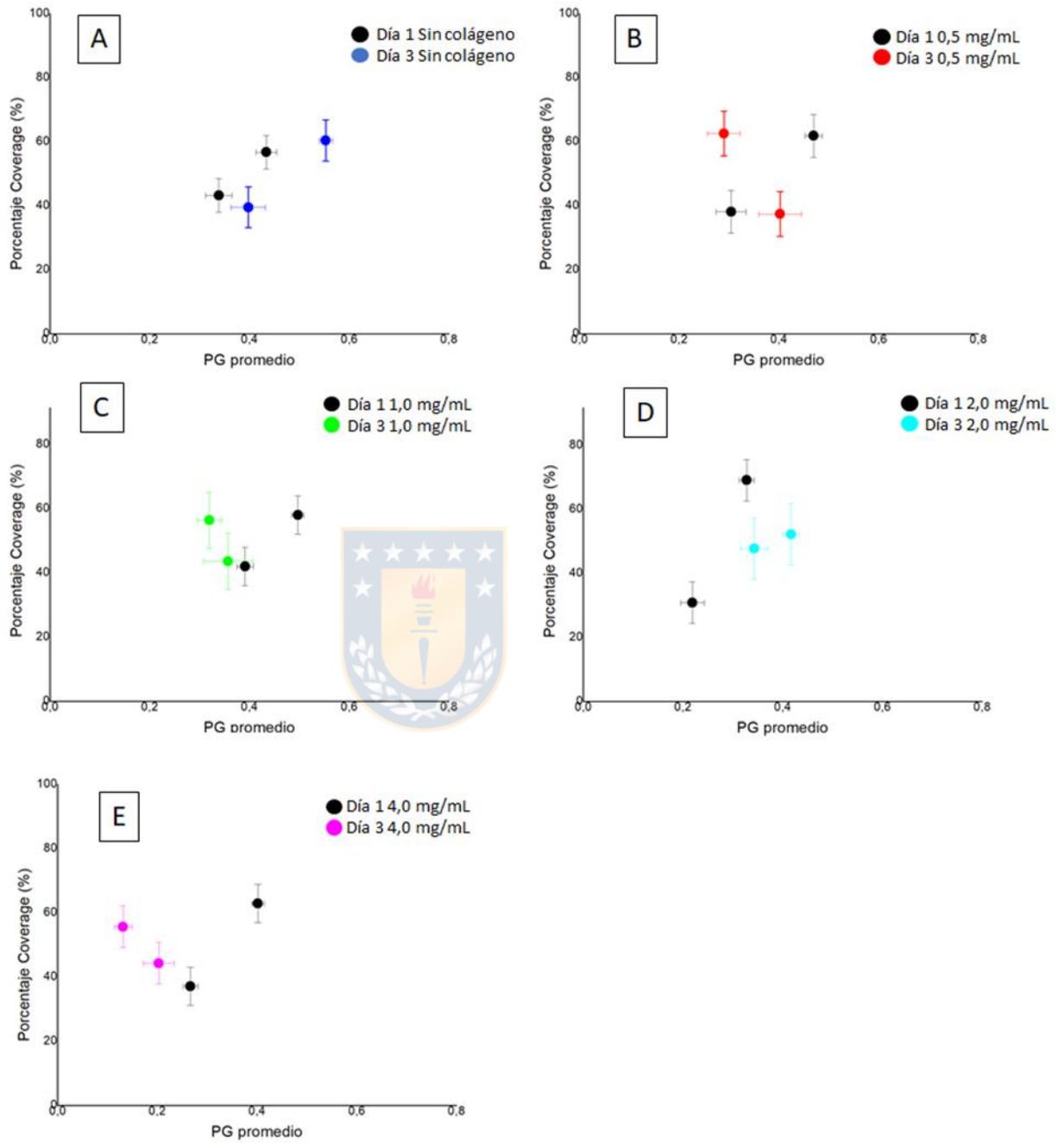


Figura 20. GP coverage de las membranas celulares a distintas concentraciones de colágeno y días.

5.4. Viabilidad celular sobre colágeno

Para comprobar la biocompatibilidad del colágeno con las células y asegurarnos de que estamos midiendo la fluidez de membrana a células vivas y para comprobar la biocompatibilidad de las células con el colágeno, se determinó mediante fluorescencia la viabilidad celular a las células NIH 3T3 sobre colágeno, usando los marcadores CyttoxOrange y RedNuc 647 (Figura 21 y tabla 3). Se observa que el porcentaje de viabilidad está entre el 70% al 85%. En general poseen una viabilidad similar entre concentraciones de colágeno, presentando una mayor viabilidad a menores concentraciones de colágeno. Estos valores concuerdan con los reportados en la literatura (Zhang y col., 2017)

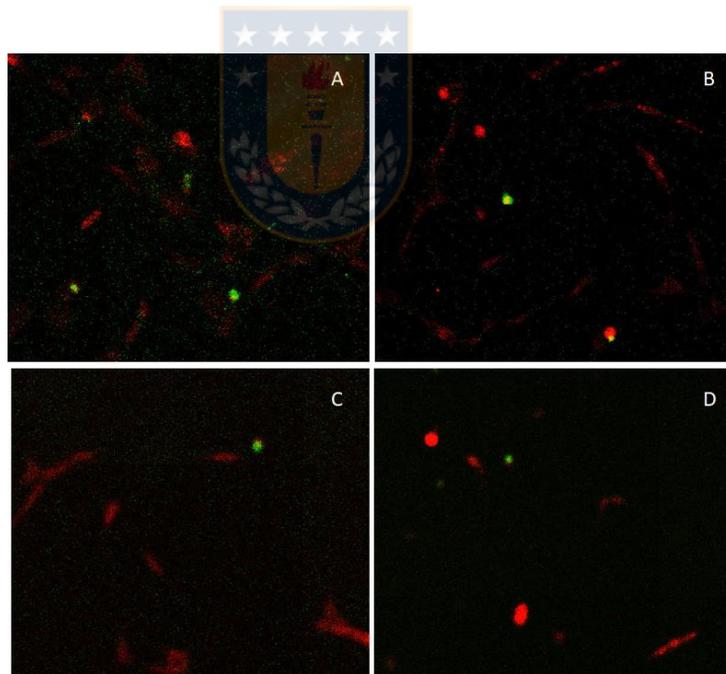


Figura 21. Células NIH 3T3 sobre colágeno de concentración variada marcadas con CyttoxOrange y RedNuc 647.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de las células NIH 3T3 sobre colágeno de concentración variada.

Concentración de colágeno (mg/mL)	Viabilidad (%)
0,5	83,53
1,0	86,97
2,0	80,26
4,0	70,58

En el presente trabajo se buscó el ampliar el conocimiento sobre como la rigidez de las matrices de colágeno afectaban la fluidez de la membrana celular, para esto se fabricaron matrices de colágeno con rigidez variada. Se caracterizó su rigidez mediante reología y se observó que la rigidez de la matriz aumentaba conforme aumentaba la concentración, al realizar ensayos de amplitud las matrices pueden ser propensas a sufrir el efecto resbalón (*slip effect*) y afectar los valores de G'' . También al aumentar la concentración aumentaba el volumen ocupado por colágeno, disminuyendo el espacio libre disponible para las células.

Como se comentó anteriormente, la fluidez de membrana es un indicador del estado general de la célula debido a los mecanorreceptores que se encuentran en ella. Los cuales a través del estrés mecánico del exterior desencadenan una cascada de señalización que puede llevar a distintos tipos de respuesta celular. En este trabajo se pudo apreciar la diferencia de realizar un cultivo 2D de uno 3D. Se observa una mejor adaptación y adhesión por parte de las células al desarrollarse en un ambiente completamente embebido por colágeno, que, a pesar de crecer en ambientes con concentración de colágeno diferente, las células se adaptaron a su medio, pudiendo alcanzar una misma fluidez independiente de la concentración. A diferencia de las células que crecieron sobre colágeno las cuales, en general, muestran un aumento en la fluidez de su membrana celular, la cual es dependiente de las características de la superficie.

6. CONCLUSIONES

- A mayor concentración de colágeno mayor la rigidez de la matriz y esta rigidez aumenta conforme aumenta el tiempo de gelificación
- En los ensayos de amplitud las matrices de colágeno pueden verse afectadas por el efecto resbalón (*slip effect*) y esto puede causar anomalías en los valores del módulo de pérdida.
- En general, a menor concentración de colágeno mayor el diámetro de fibra, en particular para la concentración de 0,5 mg/mL. Las concentraciones de 1,0/2,0/4,0 mg/mL presentan valores de diámetro de fibra similares entre sí
- Las imágenes SEM muestran que al aumentar la concentración de colágeno aumenta la densidad de fibras observada. En particular destaca la concentración de 1 mg/mL que presentó una organización más “fibrilar” en comparación a las otras concentraciones que presentaron una organización en “malla”
- La fracción de volumen de colágeno no sigue una tendencia lineal con respecto a la concentración de colágeno, sin embargo, al comprar con bibliografía se observa un aumento en la fracción de volumen al aumentar el tiempo de gelificación.
- La fluidez de las membranas celulares que crecen sobre las distintas concentraciones de colágeno presentan un aumento de fluidez al aumentar la concentración de colágeno. Esta tendencia se observa mas claramente al día 3 de contacto de las células con la matriz.
- La fluidez de las membranas celulares que crecen dentro de colágeno presentan una fluidez similar independiente de la concentración colágeno y al aumentar el tiempo de cultivo aumenta su rigidez lo cual se podría interpretar como un aumento en su adhesión a la matriz.
- Hay una alta viabilidad celular en las células crecidas sobre colágeno que se encuentra dentro de los rangos reportados.

- Finalmente, la concentración de colágeno afecta en mayor medida a las células que crecen sobre una matriz ya gelificada que a células que crecen dentro de la matriz.



REFERENCIAS

- Arevalo, R. C., Kumar, P., Urbach, J. S., & Blair, D. L. (2015). Stress heterogeneities in sheared type-i collagen networks revealed by boundary stress microscopy. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118021>
- Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (1999). Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, *77*(4), 2090–2101. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77050-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77050-5)
- Baradet, T. C., Haselgrove, J. C., & Weisel, J. W. (1995). Three-dimensional reconstruction of fibrin clot networks from stereoscopic intermediate voltage electron microscope images and analysis of branching. *Biophysical Journal*, *68*(4), 1551–1560. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80327-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80327-9)
- Baum, J., & Duffy, H. S. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *57*(4), 376–379. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182116e39>
- Boddupalli, A., & Bratlie, K. M. (2018). Collagen organization deposited by fibroblasts encapsulated in pH responsive methacrylated alginate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *106*(11), 2934–2943. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36482>
- Bron, J. L., Koenderink, G. H., Everts, V., & Smit, T. H. (2009). Rheological characterization of the nucleus pulposus and dense collagen scaffolds intended for functional replacement. *Journal of Orthopaedic Research*, *27*(5), 620–626. <https://doi.org/10.1002/jor.20789>
- Buehler, M. J. (2006). Atomistic and continuum modeling of mechanical properties of collagen : Elasticity , fracture , and self-assembly. *Journal of Material Research*, *21*, 1947–1961. <https://doi.org/10.1557/JMR.2006.0236>
- Buehler, M. J. (2008). Nanomechanics of collagen fibrils under varying cross-link densities : Atomistic and continuum studies. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *1*, 59–67.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.04.001>

- Burla, F., Dussi, S., Martinez-Torres, C., Tauber, J., van der Gucht, J., & Koenderink, G. H. (2020). Connectivity and plasticity determine collagen network fracture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920062117>
- Callister, W. D., & Wiley, J. (2006). *Materials Science and Engineering. An Introduction*.
- Carquin, M., Auria, L. D., Pollet, H., Bongarzone, E. R., & Tyteca, D. (2016). Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains. *Progress in Lipid Research*, 62, 1–24.
- Case, L. B., & Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology*, 17(8), 955–963. <https://doi.org/10.1038/ncb3191>
- Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., & Campagnola, P. J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*, 7(4), 654–669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009>
- Conway, J. R. W., Vennin, C., Cazet, A. S., Herrmann, D., Kendelle, J., Warren, Timpson, P. (2017). Three-dimensional organotypic matrices from alternative collagen sources as pre-clinical models for cell biology. *Scientific Reports*, 7(May), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17177-5>
- Cox, T. R., & Eler, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 178, 165–178. <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>

- Dvornikov, A., Malacrida, L., & Gratton, E. (2019). The DIVER Microscope for Imaging in Scattering Media. *Methods and Protocols*, 2(2), 53. <https://doi.org/10.3390/mps2020053>
- Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalka, A., Pérez-González, C., Castro, N., Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature Cell Biology*, 18(5), 540–548. <https://doi.org/10.1038/ncb3336>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126, 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Espinosa, G., López-montero, I., Monroy, F., & Langevin, D. (2011). Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018572108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018572108>
- Eyre, D. R., & Wu, J. (2005). Collagen Cross-Links. *Collagen*, (Eyre, D. R., Wu, J. (2005). Collagen Cross-Links. *Collagen*, 207–229. <https://doi.org/10.1007/b103828>), 207–229.
- Frahs, S. M., Oxford, J. T., Neumann, E. E., Brown, R. J., Keller-Peck, C. R., Pu, X., & Lujan, T. J. (2018). Extracellular Matrix Expression and Production in Fibroblast-Collagen Gels: Towards an In Vitro Model for Ligament Wound Healing. *Annals of Biomedical Engineering*, 46(11), 1882–1895. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-2064-0>
- Gasparski, A. N., & Beningo, K. A. (2015). Mechanoreception at the cell membrane: More than the integrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 586, 20–26.
- Gaus, K., Le Lay, S., Balasubramanian, N., & Schwartz, M. A. (2006). Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *Journal of Cell Biology*, 174(5), 725–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603034>
- Geiger, B., & Zamir, E. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 114(20), 3577–3579.
- Goh, K. L., Holmes, D. F., Lu, H. Y., Richardson, S., Kadler, K. E., Purslow,

- P. P., & Wess, T. J. (2008). Ageing changes in the tensile properties of tendons: Influence of collagen fibril volume fraction. *Journal of Biomechanical Engineering*, 130(2), 1–8. <https://doi.org/10.1115/1.2898732>
- Grinnell, F. (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in Cell Biology*, 13(5), 264–269. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00057-6)
- Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Review Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Stem Cell*, 5(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
- Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A., Li, W., Handorf, A. M., Zhou, Y., Li, W. (2015). Tissue Stiffness Dictates Development , Homeostasis , and Disease Progression Tissue Stiffness Dictates Development , Homeostasis , and Disease Progression. *Journal of Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 52, 22-50t. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1019687>
- Hoppe, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757–2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>
- Hulmes, D. J. S. (2008). *Collagen diversity, synthesis and assembly*.
- Kadler, K. (2004). Matrix Loading : Assembly of Extracellular Matrix Collagen Fibrils during Embryogenesis DEVELOPMENTAL BIOLOGY. *Birth Defects Research*, 11(Part C), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20002>
- Kadler, K. E. (2017). Fell Muir Review : Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, 98, 4–16. <https://doi.org/10.1111/iep.12224>
- Kaufman, L. J., Brangwynne, C. P., Kasza, K. E., Filippidi, E., Gordon, V. D., Deisboeck, T. S., & Weitz, D. A. (2005). Glioma expansion in collagen I matrices: Analyzing collagen concentration-dependent growth and motility patterns. *Biophysical Journal*, 89(1), 635–650.

<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061994>

- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., Karsenty, G., Kern, B., Shen, J., Karsenty, G. (2001). Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes *. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7101–7107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006215200>
- Khatiwala, C. B., Kim, P. D., Peyton, S. R., & Putnam, A. J. (2009). ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(5), 886–898. <https://doi.org/10.1359/JBMR.081240>
- Kreger, S. T., Bell, B. J., Bailey, J., Stites, E., Kuske, J., & Waisner, B. (2010). Polymerization and Matrix Physical Properties as Important Design Considerations for Soluble Collagen Formulations. *Biopolymers*, 93(8), 690–707. <https://doi.org/10.1002/bip.21431>
- Kreger, S. T., Bell, B. J., Bailey, J., Stites, E., Kuske, J., Waisner, B., & Voytik-Harbin, S. L. (2010). Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers*, 93(8), 690–707. <https://doi.org/10.1002/bip.21431>
- Kurniawan, N. A., Wong, L. H., & Rajagopalan, R. (2012). Early stiffening and softening of collagen: Interplay of deformation mechanisms in biopolymer networks. *Biomacromolecules*, 13(3), 691–698. <https://doi.org/10.1021/bm2015812>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(January), 46–51.
- Lohrasbi, S., Mirzaei, E., Karimizade, A., Takallu, S., & Rezaei, A. (2020). Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties. *Cellulose*, 27(2), 927–940. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02841-y>
- Lupanova, T., Stefanova, N., Petkova, D., Staneva, G., Jordanova, A., Koumanov, K., Momchilova, A. (2010). Alterations in the content and physiological role of sphingomyelin in plasma membranes of cells cultured in three-dimensional matrix. *Molecular and Cellular*

- Biochemistry*, 340(1–2), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0420-y>
- Madhavan, K., Belchenko, D., Motta, A., & Tan, W. (2010). Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1413–1422. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.028>
- Malacrida, L., Jameson, D. M., & Gratton, E. (2017). A multidimensional phasor approach reveals LAURDAN photophysics in NIH-3T3 cell membranes. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08564-z>
- Moran, P., & Coats, B. (2012). Biological Sample Preparation for SEM Imaging of Porcine Retina. *Microscopy Today*, 20(2), 28–31. <https://doi.org/10.1017/s1551929511001374>
- Motte, S., & Kaufman, L. J. (2013). Strain stiffening in collagen i networks. *Biopolymers*, 99(1), 35–46. <https://doi.org/10.1002/bip.22133>
- Münster, S., Jawerth, L. M., Leslie, B. A., Weitz, J. I., Fabry, B., & Weitz, D. A. (2013). Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12197–12202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222787110>
- Nelson, D., & Cox, M. (2009). *Lehninger - Principios de Bioquímica*.
- Norambuena, A., & Schwartz, M. A. (2011). Effects of integrin-mediated cell adhesion on plasma membrane lipid raft components and signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 22(18), 3456–3464. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0361>
- Orgel, J. P. R. O., Antonio, J. D. S., & Antipova, O. (2011). Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connective Tissue Research*, 52 (April 2010), 2–17. <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.511353>
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60(1), 179–189. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0)

- Pike, L. J. (2006). report Rafts defined : a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47, 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Plant, A. L., Bhadriraju, K., Spurlin, T. A., & Elliott, J. T. (2009). Cell response to matrix mechanics: Focus on collagen. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(5), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.012>
- Raub, C. B., Suresh, V., Krasieva, T., Lyubovitsky, J., Mih, J. D., Putnam, A. J., ... George, S. C. (2007). Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophysical Journal*, 92(6), 2212–2222. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.097998>
- Rhee, S., & Grinnell, F. (2007). Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(13), 1299–1305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.006>
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *Journal of Cell Biology*, 153(6), 1175–1185. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1175>
- Roeder, B. A., Kokini, K., Sturgis, J. E., Robinson, J. P., & Voytik-Harbin, S. L. (2002). Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(2), 214–222. <https://doi.org/10.1115/1.1449904>
- Russel, F. G. M., Bindels, J. M., & Van, C. H. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13661–13665.
- Sánchez, S. a., Tricerri, M. A., Ossato, G., & Gratton, E. (2010). Lipid packing determines protein-membrane interactions: Challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(7), 1399–1408. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.03.019>

- Sanchez, Susana A, Tricerri, M. A., & Gratton, E. (2007). *Interaction of high density lipoprotein particles with membranes containing cholesterol*. 48. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600457-JLR200>
- Sanchez, S. a, Tricerri, M. a, Gunther, G., & Gratton, E. (2007) (2). Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. In *Modern research and educational topics in microscopy: applications in physical/chemical sciences*. Formatex Research Center, Badajoz, Spain
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization : composition , regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Shen, Z. L., Kahn, H., Ballarini, R., & Eppell, S. J. (2011). Viscoelastic properties of isolated collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 100(12), 3008–3015. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.052>
- Sherman, V., Yang, W., & Meyers, M. (2015). The Materials Science of Collagen. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 52, 22–50. <https://doi.org/10.1557/mrs2007.162>
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 929-958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572.
- Singer, S., & Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731.
- Szczesny, S. E., & Elliott, D. M. (2014). Interfibrillar shear stress is the loading mechanism of collagen fibrils in tendon. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2582–2590. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.032>
- Tanaka, Y., Baba, K., Duncan, T. J., Kubota, A., Asahi, T., Quantock, A. J., Nishida, K. (2011). Transparent, tough collagen laminates prepared by oriented flow casting, multi-cyclic vitrification and chemical cross-linking. *Biomaterials*, 32(13), 3358–3366. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.011>

- Tricerri, M. A., Agree, A. K. B., Sanchez, S. A., Bronski, J., & Jonas, A. (2001). *Arrangement of Apolipoprotein A-I in Reconstituted High-Density Lipoprotein Disks: An Alternative Model Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer*. 5065–5074.
- Tricerri, M. A., Sanchez, S. A., Arnulphi, C., Durbin, D. M., Gratton, E., & Jonas, A. (2002). *Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles*. 43, 187–197.
- Vader, D., Kabla, A., Weitz, D., & Mahadevan, L. (2009). Strain-induced alignment in collagen gels. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005902>
- Weber, G., & Farris, F. J. (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry*, 18(14), 3075–3078. <https://doi.org/10.1021/bi00581a025>
- Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L. M., von Andrian, U. H., van Rheenen, J., Friedl, P. (2009). Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(8), 931–941. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.08.005>
- Yamamoto, K., & Ando, J. (2015). Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309 (7), H1178–H1185. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00241.2015>
- Yoon, H., Lee, J. S., Yim, H., Kim, G., & Chun, W. (2016). Development of cell-laden 3D scaffolds for efficient engineered skin substitutes by collagen gelation. *RSC Advances*, 6(26), 21439–21447. <https://doi.org/10.1039/c5ra19532b>
- Zhang, J., Wei, B., He, L., Xu, C., Xie, D., Paik, K. W., & Wang, H. (2017). Systematic modulation of gelation dynamics of snakehead (*Channa argus*) skin collagen by environmental parameters. *Macromolecular Research*, 25(11), 1105–1114. <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5149-y>

- Zhang, X., Fu, H. L., Liu, X., Yao, A. H., Wang, D. P., Huang, W. H., Jiang, X. Q. (2009). In vitro bioactivity and cytocompatibility of porous scaffolds of bioactive borosilicate glasses. *Chinese Science Bulletin*, 54(18), 3181–3186. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0275-3>
- Zolfaghari, N., Moghimi Zand, M., & Mofrad, M. R. K. (2020). Strain-stiffening and strain-softening responses in random viscoelastic fibrous networks: interplay between fiber orientation and viscoelastic softening. *Soft Materials*, 00(00), 1–13. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2019.1697705>

