



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Trabajo de Tesis Doctoral: Aspectos fenomenológicos
del crecimiento y expansión de sistemas celulares.
Efecto de la modificación del medio y el substrato en el
fenotipo celular**

Tesista: Nicolás Eduardo Muzzio

Director: Omar Azzaroni

Codirector: Miguel Ángel Pasquale

Año: 2017

*Dedicado a mi mamá
y a mi papá*

Agradecimientos

Llegando a esta altura de la tesis uno se pone a pensar que cuando haya pasado un mes, una semana, unos días o quizá unas horas luego de la defensa, va a pesar más haber olvidado agradecer a una persona o institución que haberse olvidado una cita bibliográfica, una figura o hasta una frase de la discusión. Y al igual que con las citas o las frases, sea por distracción o por no querer que quede demasiado largo, uno se olvida u omite algunos agradecimientos. Personalmente la sección de agradecimientos es lo que más me gusta de las tesis que he tenido la oportunidad de leer. Es una manera simple de ver que aquellos que se embarcaron en esta aventura del doctorado también son seres humanos y que nadie puede hacer las cosas solo.

Quiero dar gracias al CONICET por la beca que me otorgó para hacer el doctorado. Disponer de un sostenimiento económico (sin olvidar el de mis padres, debo aclarar) me permitió encarar este proyecto con cierta tranquilidad. El dinero no es todo, pero como ayuda!

Gracias a la Comisión Europea que mediante los marcos de trabajo Marie Curie Action “International Research Staff Exchange Scheme” y Marie Skłodowska-Curie “Research and Innovation Staff Exchange” me permitió realizar estancias de trabajo en el exterior. Las experiencias fueron sumamente enriquecedoras a nivel científico y humano.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por ser el lugar que me formó y sigue formando. No el edificio (aunque luego de tantos años uno termina encariñándose hasta con las mesadas de laboratorio), sino las personas: docentes, alumnos, personal administrativo, etc. Gracias a los docentes que compartieron sus conocimientos conmigo. Gracias a la facultad por otorgarme el privilegio y la responsabilidad de compartir mis conocimientos con otros alumnos. Gracias por los compañeros de diversas carreras que he tenido y por los amigos también: Marcos, Agus, Doma.

Tanto el CONICET como la UNLP son organismos que dependen del estado nacional. Quiero agradecer al pueblo argentino por defender y sostener con sus impuestos la educación pública. Difícilmente podría haber estudiado de otra manera.

Gracias al INIFTA por darme un lugar de trabajo y muchos buenos compañeros. Gracias a mis vecinos del segundo piso, sobre todo a Marita por sus cariño y simpatía.

Esta tesis no hubiera sido la misma sin las incontables idas y vueltas a la Facultad de Medicina de la UNLP y sin la posibilidad de usar el laboratorio de cultivo de células de la Cátedra de Patología B. Gracias a Pedro por permitirnos usar las instalaciones. A Solange y Silvia por mantener el orden en el laboratorio y por el asesoramiento en el trabajo experimental. A Inés, Mari y Mariela por encargarse de la limpieza y esterilidad del material. A Zulma y Carlos por cuidar que nunca quede encerrado a la noche.

Gracias a Rodolfo Goya por su generosidad y buena predisposición en todo momento. Gracias a su grupo de investigación por el compañerismo y buena onda.

Gracias a Martín por el factor de crecimiento epidérmico que nos facilitó.

Mi primer tiempo trabajando en el INIFTA lo compartí con personas a las que les guardo

un profundo aprecio. Quiero agradecer a Agustín por su cultura y gran sentido del humor.

Quiero agradecer a María Ana por todo lo que me enseñó, por sus preguntas y por sus consejos. Gracias por el trabajo compartido, por su comprensión y por mostrarme que siempre se pueden aprender cosas nuevas, sin importar cuanto disten de nuestra “formación original”.

El Jefe me enseñó cuan lejos puede llegar una persona que acompaña la pasión con dedicación. Quiero agradecerle por aceptar ser el director de mis becas de iniciación a la investigación, por preocuparse por mí y mis estudios y, sobre todo, por ayudarme a confirmar que ciencia y religión no son tan incompatibles como dicen.

Gracias a Sergio por permitirme trabajar con él y su grupo en España. Por mostrarme muchas cosas, desde como trabajar en equipo hasta las particularidades de los argentinos y las bellezas de nuestro país. El tipo de cosas que uno siempre tiene a la vista pero que no suele notar, después de todo, el zorro tenía razón y lo esencial es invisible a los ojos. Gracias por la cordialidad y cercanía, y por hacerme los momentos difíciles algo más fáciles. Gracias a todas las personas que, estables o de paso por el Soft Matter Nanotechnology Lab y el CIC biomaGUNE, hicieron mis estancias fructíferas y divertidas.

Quiero agradecer a Omar por transmitir sus experiencias y conocimientos, por mostrarme que en este país puede hacerse ciencia de calidad y por compartir su visión del qué, del cómo y del para qué hacer ciencia. Por enseñar cosas que van más allá del sistema científico y que puedo aplicar en muchos ámbitos de mi vida. Trabajar con él es un gran privilegio, tanto por su ingenio, creatividad y experiencia a la hora de hacer ciencia, como por su gran cultura y sentido del humor. Sobre todo quiero agradecerle por todas las oportunidades que me dió, por hacerme parte de un grupo, por la paciencia que me tuvo, por la libertad con que me permitió trabajar (y sin descuidarme, lo que es aún más difícil) y por sus consejos y correcciones. Su manera de corregirme me hizo notar que no sólo es una persona inteligente, sino también sabia y cariñosa.

Gracias al Laboratorio de Materia Blanda por ayudarme a hacer del trabajo una tarea divertida. Gracias por incluirme siempre a pesar de pasar gran parte del tiempo lejos, ya sea en la oficina del segundo piso o en la Facultad de Medicina. Gracias chicos por enseñarme desde como trabajar adecuadamente con el tubo de N₂ hasta como ordenar y mantener adecuadamente el laboratorio. Por mostrarme que trabajar con compañeros es genial, y si es con música, aún mejor.

Quiero agradecer a Miguel porque tuvo que soportar mis momentos de mayor estrés, mala onda y ansiedad. Eso suele ocurrir con mis personas más cercanas, por lo que más allá de ser un castigo, también puede várselfo el lado positivo, no? Gracias por tantos años trabajando juntos, por los alfajores, por las charlas en el tren (o en el colectivo), por la paciencia, por ayudarme tanto en todo. Por ser tan trabajador, versátil, inteligente y por enseñarme la importancia de medir bien. Por ser una persona sumamente humilde y buena, que siempre buscó lo mejor para mí. Gracias por guiarme de cerca a lo largo de esta tesis y trabajar codo a codo conmigo. Soy muy afortunado.

Gracias a Eduardo, Gustavo, Esteban, Íñigo y Ángel porque cada uno en diferentes lugares y momentos de mi vida me hizo sentir en Casa, me enseñó algo sumamente valioso y me ayudó a encontrar el Camino.

Quiero agradecer a Hermano Sol por invitarme a compartir la alegría de ser comunidad y la belleza del servicio.

Gracias a los 4 de siempre por tantos años de amistad y porque *no sé cómo o bajo qué circunstancias ustedes 4 se juntaron*.

Gracias a mis hermanos Lore, Ale y Naza. ¿Qué regalo más grande y hermoso podría pedir un niño que unos hermanos como ustedes?

Gracias a mi mamá, Manuela, por enseñarme lo lindo de los libros, la belleza del pasto que crece, lo divertido del saber. Por contarme el secreto del placer de los dioses, por su paciencia y por insistirme en aquello que terminó siendo lo más importante en mi vida. Gracias por tantas luchas y sacrificios para que pudiera estudiar, por la compañía, por la comprensión, por las oraciones, por ese carácter tan lindo y ese espíritu de niña.

Gracias a mi papá, Eduardo, mi mayor ejemplo de trabajo, sacrificio y amor por los hijos. Por enseñarme que la formación es importante, pero que no supera a andar por la vida con los sentidos bien despiertos. Por ese corazón de oro y por actuar siempre, ya sea acertada o equivocadamente, acorde a sus principios.

Gracias Alina. Gracias por armarte de paciencia, por los mates, la ayuda con LaTeX y las correcciones. Gracias por regalarme un nuevo papá, una nueva mamá y una nueva hermana, a quienes también agradezco. Gracias porque me ayudaste a ordenar mi vida y porque me recordás cada día que las cosas simples son las más hermosas. Gracias por siempre subirme la apuesta, por tu compañía y por mostrarme que *cuando una persona tiene onda con alguien, el tiempo no importa. El tiempo es todo el tiempo.*

Gracias a María, por su fiel compañía.

Y gracias a Dios, por todo.

Índice general

Agradecimientos	5
Índice	9
Lista de figuras	13
Lista de tablas	19
Introducción	21
Marco teórico y antecedentes	23
A.1. Cultivos celulares	23
A.1.1. Definiciones y nociones mínimas para el trabajo con cultivos celulares	25
A.1.2. Ciclo de crecimiento de una línea celular	27
A.2. Fisicoquímica en sistemas biológicos	28
A.2.1. Interacciones de la célula con el substrato	29
A.2.2. Movilidad celular: interacciones con la matriz extracelular y fenómenos de transporte	33
A.2.3. Propagación de interfaces biológicas	37
A.3. Biomateriales	44
A.3.1. Técnica de ensamblado capa por capa	48
Bibliografía	51
Materiales y Métodos	59
B.1. Cultivo celular	59
B.1.1. Líneas celulares utilizadas	59
B.1.2. Medios y condiciones de cultivo	60
B.1.3. Obtención de colonias	60
B.1.4. Observación de las colonias, seguimiento de su crecimiento y propagación	63
B.1.5. Ensayo de proliferación de reducción de metil tiazol tetrazolio	64
B.1.6. Tinciones	64
B.1.7. Cultivo de bacterias	66
B.2. Modificaciones del medio de cultivo y superficies	67
B.2.1. Modificaciones del medio de cultivo: modificación de la reología y agregado de agentes solubles con bioactividad	67
B.2.2. Modificación de superficies: substratos microestructurados y multicapas de polielectrolitos	67
B.2.3. Caracterización de las multicapas de polielectrolitos	73
B.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos	84

B.3.1. Análisis de las características morfológicas de colonias celulares y de las células individuales	84
B.3.2. Análisis de la movilidad celular	85
B.3.3. Análisis cuantitativo de las adhesiones focales	87
Bibliografía	89
1. Fenotipo celular y fenomenología de la propagación de colonias en sistemas multicelulares de distintas geometrías	91
1.1. Introducción	91
1.2. Resultados	92
1.2.1. Cinética de propagación de colonias en 2D	92
1.2.2. Cambios morfológicos en las colonias	93
1.2.3. Evolución de la densidad celular	93
1.2.4. Movilidad de las células individuales	97
1.3. Discusión	105
1.3.1. Estudio de los aspectos cinéticos y morfológicos de las colonias de células HeLa	105
1.3.2. Aspectos dinámicos de las células individuales	112
1.3.3. Rugosado del frente y trayectorias celulares individuales	113
1.4. Conclusiones	114
Bibliografía	117
2. Modificación de la reología del medio de crecimiento	121
2.1. Introducción	121
2.2. Resultados	122
2.2.1. Cambios morfológicos	123
2.2.2. Área celular en distintas regiones de la colonia	127
2.2.3. Cinética de crecimiento de las colonias	127
2.2.4. Análisis de la duplicación celular mediante inmunohistoquímica	135
2.2.5. Movilidad celular en las colonias quasi-lineales	136
2.2.6. Análisis de escalado dinámico	139
2.3. Discusión	143
2.3.1. Influencia de las heterogeneidades espacio-temporales en la propagación de colonias 2D	143
2.3.2. Modelos de Potts celulares que describen los resultados experimentales	144
2.3.3. Dinámica de rugosado de frentes de colonias 2D de células Vero	145
2.4. Conclusiones	146
Bibliografía	149
3. Modificación del medio de crecimiento mediante agentes solubles con bioactividad	151
3.1. Introducción	151
3.2. Resultados	152
3.2.1. Colonias quasi circulares	152
3.2.2. Colonias quasi lineales	161
3.3. Discusión	170
3.3.1. Cinética y morfologías celulares de colonias quasi-radiales en medio que contiene EGF	170
3.3.2. Movilidad celular en las colonias quasi-lineales	173

3.3.3. Escalado dinámico	174
3.4. Conclusiones	175
Bibliografía	177
4. Efecto sobre el fenotipo celular de la modificación del substrato mediante películas de polielectrolitos: empleo de polielectrolitos de origen natural y sintético	181
4.1. Introducción	181
4.2. Resultados	182
4.2.1. Multicapas (Policatión/Polianión) ₇ Policatión	182
4.2.2. Adhesión y morfología celular	185
4.2.3. Proliferación celular	187
4.2.4. Multicapas de Chi/HA	190
4.2.5. “Dibloques” de multicapas de polielectrolitos: caracterización de las películas y adhesión celular	192
4.3. Discusión	199
4.3.1. Multicapas “monobloque” (Policatión/Polianión) ₇ Policatión	199
4.3.2. “Dibloques” de multicapas de polielectrolitos	204
4.4. Conclusiones	205
Bibliografía	207
5. Efecto del recocido de las películas de polielectrolitos en las propiedades fisicoquímicas de las películas y en la adhesión celular: sistema PLL/Alg y PLL/Dex	211
5.1. Introducción	211
5.2. Resultados	212
5.2.1. Fabricación de MPEs y recocido	212
5.2.2. Caracterización de las MPEs	214
5.2.3. Mojabilidad y carga superficial	214
5.2.4. Análisis químico	217
5.2.5. Adsorción de proteínas	219
5.2.6. Adhesión celular	219
5.2.7. Gradiente térmico como estrategia para modular localmente las propiedades de la MPE	225
5.2.8. Tratamiento térmico de multicapas (PLL/Dex) ₇ PLL	226
5.3. Discusión	229
5.3.1. Reestructuración de la MPE durante el tratamiento térmico	229
5.3.2. Adsorción de proteínas	230
5.3.3. Adhesión celular	232
5.4. Conclusiones	233
Bibliografía	235
6. Efecto del recocido de las películas de polielectrolitos en las propiedades fisicoquímicas de las películas y en la adhesión celular: sistema Chi/HA	239
6.1. Introducción	239
6.2. Resultados	240
6.2.1. Ensamblado, recocido y caracterización de las películas de (Chi/HA) ₇ Chi	240
6.2.2. Propiedades antiadhesivas	244
6.3. Discusión	254

6.3.1. Reestructuración de las multicapas de Chi/HA recocidas	254
6.3.2. Propiedades antiadhesivas	256
6.4. Conclusiones	258
Bibliografía	261
7. Propagación de colonias sobre substratos microestructurados	267
7.1. Introducción	267
7.2. Resultados y discusión	268
7.2.1. Características morfológicas	271
7.2.2. Velocidad promedio del frente en función del ángulo de inclinación de la interfase (<i>s</i>)	273
7.3. Conclusiones	275
Bibliografía	277
Conclusiones generales	281
Lista de trabajos publicados o en preparación	285

Índice de figuras

A.1. Duplicaciones línea continua y finita	25
A.2. Esquema de la diferenciación y proliferación de células madre	26
A.3. Curva de crecimiento	28
A.4. Esquema de las escalas espaciales del proceso de adhesión celular	30
A.5. Esquema de las escalas temporales de los procesos celulares	31
A.6. Esquema de la movilidad celular	34
A.7. Esquema de una interfase y los parámetros característicos	38
A.8. Evolución de la rugosidad en función del tiempo y de la rugosidad de saturación en función del tamaño del sistema	39
A.9. Esquema del “colapso” de datos de rugosidad para sistemas con tamaños diferentes	40
A.10. Esquema del efecto de la tensión superficial ν en la morfología de la interfase.	42
A.11. Esquema del crecimiento lateral y del efecto del término no lineal ∇h^2 en la morfología y en la $< h >$ de la interfase.	43
A.12. Técnica de capa por capa: substratos, estructuras, interacciones y bloques de construcción.	49
B.1. Esquema de la obtención de colonias quasi-circulares con bajo (CQRs) y elevado número de células (CQR-Cs)	61
B.2. Esquema de la obtención de colonias con geometría quasi-lineal (CQLs)	62
B.3. Esquema del sistema de seguimiento in situ desarrollado en el laboratorio.	65
B.4. Esquema de la obtención de substratos microestructurados	68
B.5. Esquema de la obtención de frentes lineales con distintos grados de inclinación sobre substratos microestructurados	69
B.6. Estructuras químicas de los policationes utilizados.	70
B.7. Estructuras químicas de los policaniones utilizados.	71
B.8. Esquema del ensamblado de las multicapas de polielectrolitos mediante la técnica de capa por capa	72
B.9. Esquema del sistema desarrollado en el laboratorio para generar gradientes de temperatura.	73
B.10. Microbalanza de cristal de cuerzo con monitoreo de disipación. Cambios de frecuencia y disipación.	74
B.11. Principio de funcionamiento del AFM y modos de trabajo.	76
B.12. Tensiones superficiales y ángulo de contacto.	79
B.13. Partículas, iones y potencial zeta.	80
B.14. Luz polarizada y dicroísmo circular	82
B.15. Esquema de la determinación de las trayectorias celulares.	86
1.1. Crecimiento de una CQR de células HeLa.	93
1.2. Evolución de N y $< R >$ en función del tiempo para CQRs de células HeLa.	94

1.3. Gráfico de $\langle R \rangle$ en función de t para el crecimiento de CQRs de distintos N_0 y R_0	95
1.4. Dominios de la colonia con distintas características morfológicas debido a diversos eventos.	96
1.5. Perfiles de densidad desde el interior de la colonia hacia el borde de CQRs con distintos N y CQLs.	98
1.6. Trayectorias celulares individuales en las CQRs y CQLs.	99
1.7. Densidad celular local y $\langle V_{\text{per}} \rangle$ en función de la distancia al borde de la colonia para regiones de baja y alta densidad de una CQL.	101
1.8. Histogramas de V_{par} y de V_{per} para CQRs de distintos $\langle R_0 \rangle$ y CQLs	102
1.9. Histogramas de direccionalidades celulares individuales y direccionalidades promedio para CQRs con distintos $\langle R_0 \rangle$ y CQLs.	103
1.10. Seguimiento de la formación y ensanchamiento de una protrusión	104
1.11. Gráficos de $\log msd$ vs $\log \Delta t_R$ de las trayectorias de células en CQRs en régimen exponencial y CQLs.	106
1.12. Influencia de las células vecinas en los desplazamientos de una célula del borde de la colonia.	107
1.13. Influencia de las células vecinas en los desplazamientos de una célula del centro de la colonia	108
1.14. Ajuste de los datos de $\langle R \rangle$ en función de t para el crecimiento de CQRs de distintos N_0 y R_0	110
1.15. Ajuste de los perfiles de densidad de una CQL utilizando una variante de la ecuación de Fisher.	111
1.16. Tensiones aplicadas sobre las células y movilidad celular.	113
1.17. Esquema que vincula la movilidad celular de la colonia con su dinámica de rugosado.	115
 2.1. Secuencia de imágenes de CQRs con $N_0 < 100$ células creciendo en medios de cultivo con distinta c_{MC}	124
2.2. CQR-C a $t = 16000$ min en medio gelificado.	125
2.3. Secuencia de imágenes de secciones del frente de una CQL creciendo en medio gelificado.	126
2.4. Comparación de la evolución de dos secciones del frente de CQR-Cs en medio estándar y medio gelificado, 9 horas después de remover la máscara de Teflon.	128
2.5. Comparación de la evolución de dos secciones del frente de CQR-Cs en medio estándar y medio gelificado, 80 horas después de remover la máscara de Teflon.	129
2.6. Histogramas de las áreas de las células ubicadas dentro de las regiones anulares de una CQR-C propagándose en medio gelificado a $t = 19000$ min.	130
2.7. Histogramas de las áreas de las células ubicadas en regiones rectangulares del borde de una CQL propagándose en medio estándar y gelificado a $t = 7200$ min.	131
2.8. Datos cinéticos normalizados para CQRs creciendo en medios de cultivo con $0 \leq c_{\text{MC}} \leq 2.5\%$	132
2.9. S_{3500} , la pendiente $d \langle R/R_0 \rangle / dt$ a $t = 3500$ min en función de la inversa de la viscosidad dinámica (η^{-1}) del medio de cultivo.	133
2.10. Dependencia del radio promedio de la colonia $\langle R \rangle$ y de la región central 3D de CQR-Cs con el tiempo de crecimiento.	134
2.11. $\langle h \rangle$ en función del tiempo de CQLs en medio estándar y medio gelificado.	135

2.12. Imágenes de la región del borde de colonias de células Vero en medio estándar y medio gelificado teñidas para el antígeno Ki-67.	136
2.13. Trayectorias celulares individuales y distribuciones del componente de velocidad perpendicular al frente para CQLs en medio estándar y medio gelificado.	138
2.14. Gráficos doble logarítmicos del msd promedio de células individuales en función de Δt_R	139
2.15. Campos de velocidad de CQLs en medio estándar y medio gelificado.	140
2.16. Gráficos doble logarítmicos de la rugosidad en función de t para CQLs en medio estándar y medio gelificado.	141
2.17. Gráficos doble logarítmicos de las relaciones de escalado de Family-Vicsek de las rugosidades de CQLs en medio estándar y medio gelificado.	142
2.18. Esquema del ruido congelado propio del modelo de QKPZ y de las células “agrandadas”	147
 3.1. Secuencia de imágenes de CQRs con N_0 similar, en medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de EGF.	153
3.2. Imágenes de fluorescencia del citoesqueleto de actina, la proteína vinculina y composición que incluye la tinción del núcleo de las células en medios de cultivo con $c_{EGF} = 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$	155
3.3. Secuencia de imágenes de secciones del frente de una CQL creciendo en medio gelificado.	156
3.4. Gráficos de $\log < R >$ en función de t para CQRs de células HeLa en medios de cultivo suplementados con distintas c_{EGF}	157
3.5. Ajustes de las curvas de $\log < R >$ en función de t para $c_{EGF} = 0, 0,4$ y 10 ng mL^{-1}	159
3.6. Perfiles de densidad de colonias de células HeLa con distinto N_0 creciendo en medios de cultivo con diferentes c_{EGF}	162
3.7. Imágenes de CQLs creciendo en medio de cultivo con distintas c_{EGF}	163
3.8. Alturas promedio $< h >$ en función del tiempo de CQLs creciendo en medios de cultivo con distinta c_{EGF}	164
3.9. Histogramas y promedios de los componentes de velocidad perpendicular y paralela al frente de células ubicadas en el borde de CQLs en medio con $c_{EGF} = 0$ y 2 ng mL^{-1} y distinta densidad celular.	166
3.10. Velocidad perpendicular y paralela al frente de las células del borde de CQLs en medio con $c_{EGF} = 0$ y 2 ng mL^{-1} y distinta densidad celular.	167
3.11. Msd y persistencias promedio de las trayectorias celulares de CQLs en medio con $c_{EGF} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{EGF} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$	168
3.12. Campos de velocidad de CQLs de células HeLa en medio de cultivo con $c_{EGF} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{EGF} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$	169
3.13. Log $w(L,t)$ en función de log L de colonias en medio de cultivo con $c_{EGF} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$	170
3.14. Log $w(L,t)$ en función de log t para diferentes L	171
3.15. Esquema de $\epsilon_{ }$ y de los desplazamientos laterales de las células con y sin EGF.	174
 4.1. QCM del ensamblado de multicapas de PLL con distintos polianiones	183
4.2. QCM del ensamblado de multicapas de PAH con distintos polianiones	184
4.3. Imágenes de AFM de películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ (a) y $(\text{PAH}/\text{PSS})_7\text{PAH}$ (b) secadas en aire.	185
4.4. Adhesión de células A549 sobre MPEs de distintas composiciones	186

4.5. Áreas de adhesión de células A549 sobre MPEs de distintas composiciones	188
4.6. Parámetros morfológicos de la adhesión de células A549 sobre MPEs de distintas composiciones	189
4.7. Proliferación de células A549 sobre MPEs de distintas composiciones	191
4.8. QCM y AFM de multicapas de (Chi/HA) ₇ Chi ensambladas en buffer HEPES	192
4.9. Esquema de la multicapa de polielectrolitos en “dibloque”	193
4.10. QCM y AFM de multicapas de (PLL/PSS) ₆ (PLL/Alg) ₄ PLL	194
4.11. QCM y AFM de multicapas de (PLL/PSS) ₆ (PLL/Dex) ₄ PLL	195
4.12. Adhesión de células A549 sobre MPEs di-bloque	196
4.13. Imágenes de fluorescencia y áreas de células A549 sobre MPEs di-bloque con Alg	197
4.14. Imágenes de fluorescencia y áreas de células A549 sobre MPEs di-bloque con Dex	198
4.15. Imágenes de fluorescencia de la adhesión de células A549 sobre MPEs en “dibloque” con Alg	200
4.16. Áreas de adhesión de células A549 sobre MPEs de PLL/Alg con distinto número de capas	201
4.17. Imágenes y áreas de adhesión de células C2C12 sobre MPEs di-bloque con Alg	202
5.1. QCM del ensamblado de multicapas de PLL/Alg	213
5.2. Adhesión celular sobre películas de PLL/Alg de distinto espesor recocidas en agua, en seco y en dos ciclos	215
5.3. AFM de películas de PLL/Alg	216
5.4. Ángulo de contacto y potencial zeta de películas de PLL/Alg	217
5.5. Análisis de XPS de las películas de (PLL/Alg) ₇ PLL no recocidas y recocidas.	218
5.6. QCM del ensamblado de multicapas de PLL con distintos polianiones	220
5.7. QCM del ensamblado de multicapas de PLL con distintos polianiones	220
5.8. Adhesión de células A549 sobre películas de PLL/Alg	221
5.9. Adhesión de células C2C12 sobre películas de PLL/Alg	222
5.10. Adhesión de células BHK sobre películas de PLL/Alg	223
5.11. Imágenes de fluorescencia de células A549 sobre películas de PLL/Alg.	224
5.12. Imágenes de fluorescencia de células C2C12 sobre películas de PLL/Alg	225
5.13. Gradiente térmico aplicado a películas de PLL/Alg: ángulo de contacto, adhesión celular y adsorción proteica	227
5.14. Adhesión de células A549 sobre películas de PLL/Dex	228
5.15. Esquema de la reestructuración inducida por el recocido de las películas de (PLL/Alg) ₇ PLL	230
6.1. QCM del ensamblado de multicapas de Chi/HA	241
6.2. ΔF en función del número de capas de Chi/HA y dicroísmo circular antes y después del recocido	242
6.3. AFM de películas de Chi/HA	245
6.4. Adsorción de SAB sobre Chi/HA sin recocer y recocido	246
6.5. Adsorción de FN sobre Chi/HA sin recocer y recocido	246
6.6. Dicroísmo circular de FN adsorbida sobre multicapas de Chi/HA no recocidas y recocidas	247
6.7. Adhesión de células A549 sobre películas de Chi/HA no recocidas y recocidas	248
6.8. Adhesión de células BHK sobre películas de Chi/HA no recocidas y recocidas	249
6.9. Adhesión de células C2C12 sobre películas de Chi/HA no recocidas y recocidas	250

6.10. Adhesión de células MC3T3-E1 sobre películas de Chi/HA no recocidas y recocidas	251
6.11. Adhesión de células C2C12 sobre vidrio y una película de Chi/HA no recocida 48 h pos siembra	252
6.12. Adhesión de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> sobre multicapas de Chi/HA no recocidas y recocidas: imágenes de fluorescencia	253
6.13. Adhesión de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> sobre multicapas de Chi/HA no recocidas y recocidas: UFC y DO	255
7.1. Interfases creciendo con ángulo de inclinación constante.	269
7.2. CQL de células A549 propagándose con un ángulo de inclinación constante sobre un substrato con microranuras.	270
7.3. Contornos de colonias propagándose con distintos ángulos de inclinación.	272
7.4. Secuencia de imágenes de una CQL propagándose con una inclinación $s = 0^\circ$	273
7.5. Secuencia de imágenes de una CQL propagándose con una inclinación $s = 70^\circ$	274
7.6. $\langle V_F \rangle$ en función del ángulo de inclinación de la interfase.	274

Listas de Tablas

A.1. Clases universales, ecuación continua que las representa y exponentes críticos que las caracterizan.	43
2.1. Constantes cinéticas de primer orden $\langle k_N \rangle$ y $\langle k_R \rangle$ para CQRs en medios con distintas concentraciones de MC.	134
3.1. Condiciones iniciales y características de la cinética de crecimiento de colonias en medios de cultivos con distintas c_{EGF} . Se incluyen el radio $\langle R_0 \rangle$, el número de células $\langle N_0 \rangle$ y la densidad celular (ρ_0) iniciales de la colonia. Las colonias presentaron una cinética de crecimiento supraexponencial (SE), exponencial(E) y/o con $\langle V_F \rangle$ constante (C).	160
3.2. Parámetros utilizados en la ecuación 3.1 para el ajuste de los datos cinéticos de la propagación de CQRs en medios con distinta c_{EGF}	172
5.1. Composición química superficial de películas de $(PLL/\text{Alg})_7PLL$ no recocidas y recocidas determinada por XPS y expresada como porcentaje atómico relativo (at. %).	219
5.2. Área total de vinculina por célula sobre vidrio y $(PLL/\text{Alg})_7PLL$ no recocidas y recocidas.	226
6.1. Medidas de ángulo de contacto de películas de $(Chi/\text{HA})_7Chi$ y de potencial zeta en buffer HEPES y Acetato de partículas recubiertas con MPE $(Chi/\text{HA})_7Chi$	243
7.1. Aspectos morfológicos de las colonias y las células de CQLs propagándose con distintos ángulos de inclinación. Ancho de las protrusiones medido a $100 \mu\text{m}$ del borde, rugosidad de la interfase y relación de aspecto de las células del borde.	271

Introducción

El estudio de los sistemas supramoleculares de interés biológico requiere de la colaboración interdisciplinaria de diversas ramas del conocimiento. En estos sistemas complejos la organización de los individuos genera procesos cooperativos que resultan impredecibles a través de la simple adición del comportamiento individual. Las células que forman los organismos más complejos pueden crecer en medios quasi-artificiales para el estudio de sus propiedades individuales o de grupo. Estas constituyen *per se* sistemas complejos capaces de sentir y procesar las señales provenientes del medio en el que se desarrollan y desencadenar un conjunto de funcionalidades y comportamiento dependientes de su origen y que define su fenotipo para cada condición particular. Las células constituyen entes inteligentes que responden a perturbaciones proporcionadas por el entorno y dan cuenta de sus características fisicoquímicas y bioquímicas.

Las células en los tejidos pueden percibir un conjunto de señales biofísicas y bioquímicas e integrarlas para cambiar su estado dinámico. En este sentido las células son “materiales inteligentes” y este comportamiento es de gran importancia para el diseño de nuevos materiales con aplicaciones particulares. La adhesión celular es el primer paso en muchos procesos fisiológicos, como la cicatrización de heridas, o patológicos, como las infecciones bacterianas y la propagación tumoral. La adhesión celular juega también un papel preponderante en la ingeniería de tejidos y en el diseño de superficies utilizadas en implantes médicos. Por eso resulta necesario conocer el efecto de cambios locales en las propiedades de los materiales que forman el medio o matriz extracelular (MEC), tales como cambios en la composición, micro-topografía, rigidez, etc., sobre el comportamiento de las células.

La propagación de los sistemas multicelulares conlleva variaciones espacio-temporales de las interacciones entre los individuos y con el entorno durante el desarrollo de fenómenos colectivos. De esta manera queda condicionada la expansión de la población celular y la movilidad de cada célula, determinando la organización y el crecimiento del sistema.

En esta tesis se observarán y describirán procesos que tienen lugar en los cultivos celulares en distintos entornos y que resultan comunes al crecimiento y expansión de sistemas complejos en general, tanto de origen inorgánico como orgánico. Además, se intentará modificar la funcionalidad de las células a través del cambio en las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Se propone avanzar en el conocimiento de la dinámica de sistemas supramoleculares de interés biológico y el papel que juegan en ella su organización y respuesta funcional. Se prevé caracterizar la fenomenología del comportamiento de sistemas multicelulares *in vitro* y como influye el cambio de las propiedades fisicoquímicas del entorno. Se conoce que los procesos celulares dependen de las interacciones recíprocas y dinámicas de las células con el microambiente que las rodea. Este les proporciona estímulos bioquímicos y mecánicos determinados por las células vecinas y el entorno extracelular. El tema resulta de particular interés para la ingeniería de biomateriales enfocada al estudio de regeneración de tejidos y la comprensión de los procesos y transformaciones que ocurren en la propagación de ciertos

tejidos y tumores. En general, estos procesos son el resultado de la coordinación espacio-temporal de la diferenciación, la proliferación y la migración celular, estos tres regulados por un conjunto complejo de señales fisicoquímicas dinámicas que se generan en el ambiente extra-celular.

Esta tesis trata del uso de cultivos celulares para estudiar diversos aspectos del crecimiento y expansión de sistemas celulares y propiedades de materiales biocompatibles. Se comenzará con una breve descripción de algunos de los descubrimientos y desarrollos más importantes vinculados a los cultivos celulares, tanto procariotas como eucariotas, y sus aplicaciones. Continuará con una breve descripción de técnicas de análisis utilizadas en física y química aplicadas a sistemas biológicos. Un gran número de biomateriales se desarrollaron para modular las funcionalidades de las células y son brevemente descriptos al final del marco teórico. A continuación se describirán e interpretarán los resultados obtenidos a partir de cada sistema de estudio.

En el capítulo 1 se estudiará el fenotipo celular y la fenomenología de la propagación de colonias con geometrías quasi-circulares y quasi-lineales. En el capítulo 2 se analizarán los cambios que produce en el fenotipo celular y en el mecanismo de propagación de las colonias la modificación de las propiedades reológicas del medio de cultivo. A continuación, en el capítulo 3, se mostrará como la presencia de agentes solubles con bioactividad en el medio de cultivo afecta las características celulares y la dinámica de crecimiento de las colonias. En todos los casos se vincularán los cambios morfológicos y dinámicos globales de la colonia con las características microscópicas de la misma, como la aparición de heterogeneidades espacio-temporales y los cambios en la movilidad y fenotipo celulares.

En los capítulos 4, 5 y 6 se describirá la interacción de las células con numerosas superficies poliméricas fabricadas utilizando la técnica de ensamblado de capa por capa y cómo las características de las multicapas obtenidas determinan la adhesión celular. En el capítulo 4 se mostrarán las características de la adhesión de células epiteliales sobre multicapas de polielectrolitos de distintas composiciones. Además, se propondrá una estrategia para mejorar las propiedades adhesivas de multicapas de biopolielectrolitos basada en el ensamblado de un bloque formado por polielectrolitos de origen natural sobre un bloque inferior que contiene el polícatón de origen natural pero un polianión sintético. En el capítulo 5 se propondrá otra técnica para mejorar la adhesión celular sobre películas de biopolielectrolitos basada en el recocido térmico de las mismas. Luego, en el capítulo 6, se mostrará que el recocido térmico de multicapas de otra composición disminuye la adhesión celular y bacteriana sobre esta superficie.

En el capítulo 7 se mostrará como la microestructuración del sustrato permite controlar la dirección de los movimientos celulares y permite validar la aplicación de ciertos modelos universales a la dinámica de crecimiento de la interfase de una colonia. Finalmente se presentarán algunas conclusiones generales.

Marco teórico y antecedentes

A lo largo de esta tesis se estudiarán sistemas multicelulares formados por individuos aislados o formando colonias de distintas características. Se considerarán diversas funcionalidades celulares, como la movilidad y proliferación, en relación con las interacciones célula-célula y célula-entorno y la dinámica de propagación de los sistemas multicelulares. El entorno, del cual dependen las funcionalidades celulares, será modificado adecuadamente empleando sustancias solubles con distinta actividad biológica y distintos biomateriales desarrollados en el laboratorio.

En todos los casos, los sistemas de estudio se obtendrán a partir de cultivos de distintos tipos de células. De ahí que esta tesis comenzará con la exposición de temas relacionados al desarrollo histórico, al lenguaje particular y a conceptos involucrados en la práctica del cultivo de células.

A.1. Cultivos celulares

Hoy en día, en la práctica, nos referimos al término cultivo celular como al cultivo de células eucariotas de organismos pluricelulares, generalmente, animales. Eso lo distingue del cultivo de otros tipos de células, como el cultivo de células vegetales, cultivo de hongos o el cultivo de bacterias. Históricamente el cultivo de células animales se desarrolló junto o gracias a otros tipo de cultivos, sobre todo el microbiológico.

El desarrollo de los cultivos celulares ha tenido grandes consecuencias en nuestras vidas hoy día. Poder controlar que determinados tipos de células crezcan en determinadas situaciones y que otras no, es algo necesario tanto en las investigaciones de vanguardia como en la vida cotidiana. Desde el proyecto genoma humano hasta el cocinar unas pizzas para compartir con amigos, desde la fabricación de una vacuna contra el cáncer de pulmón hasta el lavarnos un raspón en la rodilla y ponernos desinfectante, encontramos situaciones donde es necesario controlar de alguna manera el crecimiento celular.

Si bien desde la prehistoria los seres humanos venían controlando el crecimiento de microorganismos para producir o preservar alimentos [A.1], no fue sino hasta el siglo XVII d.C. que, mediante el uso de los primeros microscopios, las células pudieron ser observadas por primera vez por Robert Hooke y Antoni van Leeuwenhoek [A.2]. Robert Koch, fue un pionero de los cultivos en fase sólida, observando la formación de colonias en rodajas de papa hervidas expuestas al aire, agregando gelatina a caldos nutritivos para obtener medios rígidos o utilizando suero de oveja esterilizado por calentamiento y dejado solidificar [A.3]. De hecho, un ayudante de Koch fue el inventor de las cápsulas de Petri [A.4]. Estos cultivos en fase sólida fueron los que le permitieron al grupo de Koch aislar por primera vez el *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis [A.5]. Si bien los primeros materiales usados con fines biológicos o biomateriales existían desde hace ya mucho tiempo (las suturas datan el período Neolítico y los implantes dentales son anteriores al 600 a. C.) [A.6], Koch fue un visionario al aplicar el diseño inteligente del medio y condiciones de cultivo para el estudio

celular. Hoy en día los biomateriales se utilizan no sólo con fines médicos, sino para screening biológicos o estudios de ciencia básica [A.7]. Gran parte de este trabajo de tesis se realizó modificando las condiciones de crecimiento para estudiar distintos aspectos del crecimiento celular o utilizando cultivos para evaluar las propiedades de distintos biomateriales.

El desarrollo de cultivos de células y tejidos eucariotas animales comenzó algo después que el de bacterias y hongos. El primer registro data de 1885, cuando el embriólogo Wilhelm Roux logró mantener la placa neural de un embrión de gallina en una solución salina durante varios días, sentando las primeras bases del cultivo de tejidos [A.8, A.9]. Roux, que se dedicó a estudiar el desarrollo de los vasos sanguíneos a lo largo de su tesis doctoral, estaba convencido de que las leyes de la física controlan el crecimiento de los organismos y que la necesidad de optimización es inherente al desarrollo [A.10]. En 1887 Loe Loeb colocó tejido epitelial de cerdos de Guinea en agar y suero coagulado, lo inoculó en animales adultos y observó las reproducción de las células implantadas [A.8]. Mientras tanto, Arnold demostrataba que los linfocitos de rana pueden sobrevivir y migrar en solución salina. En 1898 Ljunggren fue el primero en reportar experimentos con tejidos humanos, demostrando que la piel puede sobrevivir *in vitro* si es colocada en líquido ascítico [A.9]. En 1910-11 Francis Peyton Rous, transplantando un tumor maligno desde una gallina con sarcoma a otra sana, descubre que algunos tumores sólidos pueden ser transmisibles.

Los injertos de tejidos y fluídios en animales realizados por Roux, Loeb o Rous no son considerados estrictamente cultivo de células o tejidos. Ross Granville Harrison fue el primero en desarrollar una técnica de cultivo reproducible en 1907 y es por eso considerado el padre del cultivo celular. Una revolución en el cultivo de células se dió en la década del 40 con el diseño y desarrollo de los primeros medios de cultivos sintéticos, lo que facilitó e hizo más reproducible, cuantificable y aplicable el cultivo de células [A.11, A.8]. En 1943 Earle establece la primer línea celular animal, unos fibroblastos de ratón adaptados para crecer indefinidamente en el medio de cultivo [A.12]. Ocho años más tarde George Gey, a partir de una biopsia de carcinoma cervical que padecía una granjera afroamericana llamada Henrietta Lacks, estableció la primer línea celular proveniente de un tumor humano, las células HeLa [A.13]. Estas células que poseen ADN de virus papiloma humano, se pusieron a disposición de todo el que las solicitara y se transformaron en el caballo de batalla del campo de los cultivos celulares. Por entonces, amplificar los virus era una tarea extremadamente difícil y Gey pudo utilizar las células HeLa para propagar el virus de la poliomielitis [A.14]. Las células HeLa no sólo se utilizaron para la amplificación del poliovirus, sino que debido a su gran tasa de proliferación, facilitó la producción de enormes cantidades de células para testear los efectos de la vacuna contra la polio que Salk estaba desarrollando [A.15]. Las células se han utilizado en numerosos estudios, como cáncer, fertilización asistida, clonación, efectos de la bomba atómica y fueron enviadas al espacio para estudiar los efectos de la gravedad cero en el ser humano. Para el año 2009 ya habían sido utilizadas en más de 60000 publicaciones científicas [A.16]. Hay algo importante que destacar, ni Henrietta ni su familia fueron consultados respecto al uso de sus células en investigaciones científicas, lo que abre un importante y necesario debate acerca de los límites legales y éticos de la ciencia. Las células HeLa fueron utilizadas en numerosos experimentos a lo largo de esta tesis.

A lo largo de los siglos el control del crecimiento de las células ha sido utilizados de diversas maneras: en la elaboración y conservación de alimentos [A.1], en la industria farmacéutica [A.17, A.18], en la medicina y enfermería [A.19, A.7], en la industria militar [A.20], en el arte [A.21, A.22] y en la investigación en diversas ramas de la ciencia.

El objetivo de este trabajo de tesis es aplicar las herramientas del cultivo celular en el estudio de los fenómenos generales que regulan el crecimiento de las células y la interacción de estas con diversas superficies.

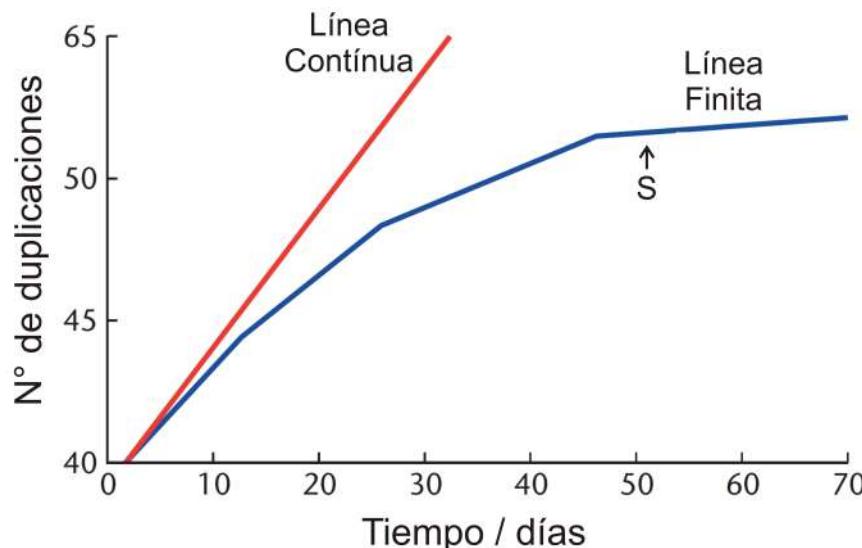


Figura A.1: Esquema que muestra el número de duplicaciones en función del tiempo de una línea celular continua y una finita. Se indica el inicio de la senescencia con *s*.

A.1.1. Definiciones y nociones mínimas para el trabajo con cultivos celulares

De la misma manera que ocurre para otras disciplinas específicas, existe un lenguaje propio en la tecnología de los cultivos celulares .

El término “cultivo celular” se refiere al cultivo de células desagregadas, mientras que “cultivo de órganos” se utiliza para describir tejidos no dispersos. El cultivo inicial tomado directamente de un individuo hace referencia a cultivo primario y cuando se lo transfiere a otros contenedores a través del proceso de subcultivo o pasaje, se convierte en una línea celular. Las líneas celulares se clasifican en líneas continuas, con la capacidad de aumentar la población en forma indefinida, o líneas finitas, formadas por células que pueden realizar solo un número limitado de duplicaciones (Figura A.1) . Este límite está determinado por el número de duplicaciones que las células pueden realizar antes de detenerse debido a la senescencia. Esto último depende de factores intrínsecos que regulan el ciclo celular y está acompañada por el acortamiento de los telómeros y los cromosomas [A.23]. La longitud de los telómeros se mantiene por la telomerasa, que se encuentra sub-regulada en la mayoría de las células normales excepto las germinales. También es mayor en las células madres, permitiendo una expansión mayor y evitando senescencia. Para que una línea celular se transforme en continua se requieren transformaciones que implican la modificación de ciertos genes [A.9].

Históricamente las líneas celulares continuas se obtuvieron a partir del aislamiento y disgregación de tejidos tumorales o embrionarios [A.24]. En el caso de los tumores, las líneas celulares se obtienen a partir de células cancerosas que poseen mutaciones que estabilizan o modifican la expresión de oncogenes. Estos oncogenes son genes reguladores del ciclo celular, responsables de la transformación de una célula normal en una maligna. La incorporación de secuencias de ADN viral también puede resultar en un descontrol del ciclo celular y la evasión de la apoptosis, como en el caso de las infecciones por papilomavirus humano [A.25]. Existen diversas maneras de generar líneas celulares continuas a través del tratamiento de células con radiación, carcinógenos químicos y vectores recombinantes que expresan oncogenes. Finalmente, otra fuente de líneas celulares continuas son las células madre [A.24]. Estas células son capaces de dividirse de forma prácticamente indefinida y de diferenciarse a otros tipos celulares [A.26]. Todos los tejidos del cuerpo humano son fabricados a partir distintos

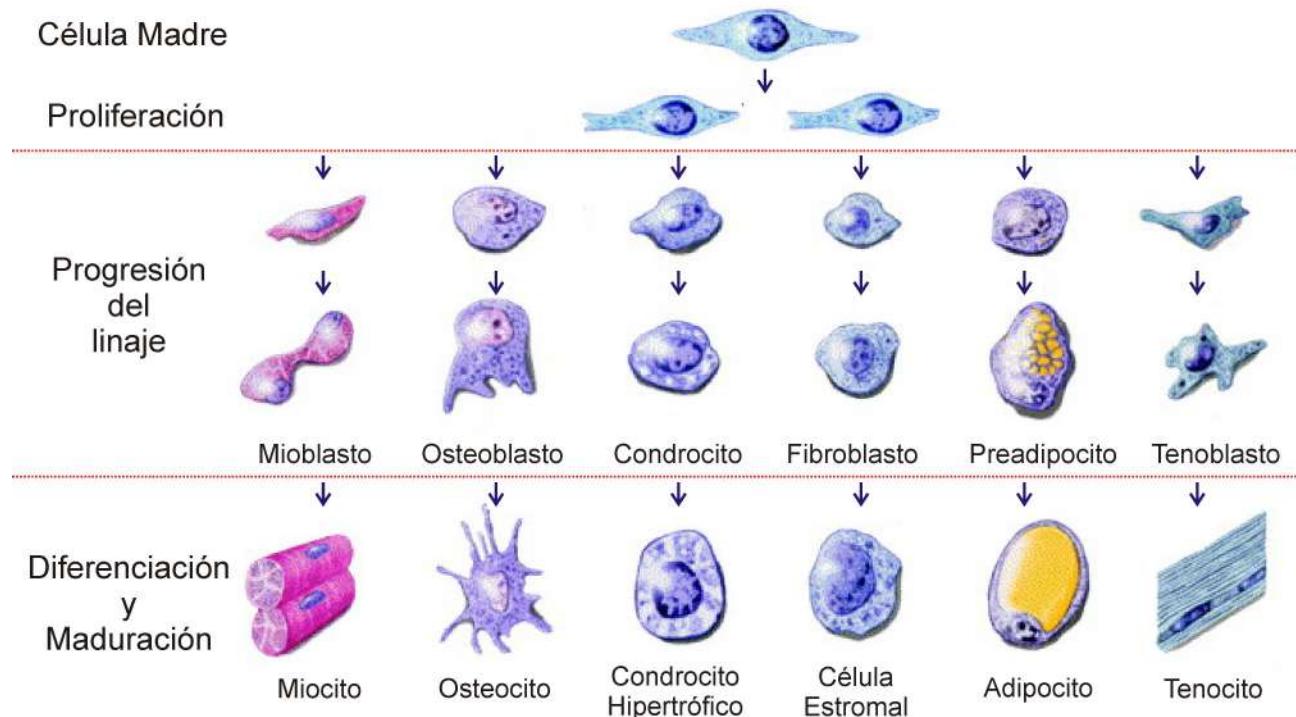


Figura A.2: Esquema que muestra la proliferación y diferenciación de las células madre hacia células de distintos tipos de tejidos.

grados de diferenciación de unas pocas células madre pluripotentes (Figura A.2), lo que las vuelve muy interesantes desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos [A.27, A.28].

Los cultivos de células primarias suelen presentar características muy cercanas a las de sus tejidos de origen [A.24]. Eso suele representar una gran ventaja respecto a los cultivos de líneas celulares, que debido a las transformaciones genéticas necesarias para su obtención o al gran número de pasajes, pueden presentar características, funcionalidades y respuestas a estímulos diferentes [A.29]. Sin embargo, los preparados celulares a partir de animales diferentes también pueden introducir variaciones significativas en los cultivos primarios y sólo un número limitado de tipos celulares pueden subculturarse exitosamente (por ejemplo fibroblastos, queratinocitos, astrocitos, células endoteliales) [A.24]. La elección de uno u otro tipo de célula depende del tipo de experimento que se vaya a realizar.

Hemos visto que una misma célula madre puede diferenciarse en distintos tipos celulares, de morfologías, características bioquímicas y funciones muy distintas. Sin embargo, todos estos tipos celulares presentes en un mismo organismo, salvo ciertas excepciones como los gametos sexuales [A.30] y algunas células del sistema inmune [A.31], poseen la misma información genética. La información genética que posee un organismo (o en nuestro caso, una célula) en particular se denomina genotipo [A.32]. Por otro lado, el fenotipo es la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. De esta manera el genotipo, el ambiente y las interacciones entre estos definen todas las características detectables (estructurales, bioquímicas, conductuales, fisiológicas) de una célula u organismo, es decir, su fenotipo [A.33]. Esto puede modelarse con la ecuación:

$$\text{Fenotipo} = \text{Genotipo} + \text{Ambiente} + \text{Interacción (Genotipo} \cdot \text{Ambiente}) \quad (\text{A.1})$$

Las líneas celulares pueden existir como cultivos adherentes o en suspensión. La mayoría

de las células se adhieren a un substrato como plástico o vidrio y proliferan formando monocapas. Los cultivos en suspensión no se adhieren a un substrato y crecen flotando en el medio.

Para que las células puedan mantenerse en cultivo, se requieren condiciones nutricionales y ambientales apropiadas. Los requerimientos nutritivos vienen provistos por el medio de cultivo con o sin suero agregado. El suero provee elementos adicionales importantes para el crecimiento celular. Las proteínas del suero incluyen hormonas, factores de crecimiento, lípidos, cofactores enzimáticos, proteínas transportadoras, y factores de adhesión a los substratos [A.23]. La concentración de estos componentes dependerá de las características del animal del que proviene el suero. Dentro de las condiciones ambientales, la proporción de oxígeno y dióxido de carbono debe ser controlada. Para las células adherentes las características del substrato son igualmente importantes.

Además del vidrio, donde se cultivaron inicialmente las células, se pueden realizar cultivos en otras superficies cargadas, tales como metales y muchos polímeros. En cualquier caso, es poco probable que las células se adhieran directamente a los substratos sino mas bien ocurre que las células secretan componentes de matriz que se adhieren al substrato y proporcionan ligandos para la interacción. En muchos casos las superficies se tratan con productos de matriz extracelular, como el colágeno IV, la fibronectina o la laminina, para promover la adhesión. Para estudios particulares y determinadas aplicaciones, las células pueden cultivarse en matrices tridimensionales o “andamios” que varían en composición química (colágeno, quitosano, polímeros sintéticos, etc.), estructura (porosidad, distribución y conectividad de poros), propiedades físicas (rigidez, elasticidad, conductividad, permeabilidad al agua) y en la estabilidad.

A.1.2. Ciclo de crecimiento de una línea celular

Cada vez que una línea celular se subcultiva, crecerá hasta alcanzar la densidad que existía antes del pasaje o subcultivo. Este proceso se puede describir por medio de una curva de crecimiento obtenida observando el cultivo en distintos estadios de crecimiento (Figura A.3). Luego de sembrar las células se observa un período de inducción. Este puede durar 12 – 24 hs, y permite que las células se recuperen del proceso de despegado (“tripsinizado”) del substrato en el que se encontraban creciendo previo al pasaje. Además, en este periodo las células secretan sustancias para favorecer la adhesión y expansión del citoplasma.

Luego las células entran en una etapa de proliferación exponencial: la población se duplica cada tiempo celular. Cuando la población de células alcanza a cubrir toda la superficie del substrato, se “empaquetan” y comprimen ocupando más eficientemente el espacio, y la proliferación disminuye y eventualmente salen del ciclo celular. Se observa entonces un “plateau” en la curva de crecimiento. Algunas células pueden diferenciarse en esta etapa de crecimiento, otras simplemente dejan de proliferar. La densidad y concentración celular se incrementan. La primera afecta la forma de las células, perturba las interacciones con el entorno y concomitantemente se ven afectados los procesos de duplicación y diferenciación. El incremento de concentración celular se manifiesta en la disminución de factores de crecimiento y otras sustancias activas, induciendo en algunos caso la muerte celular.

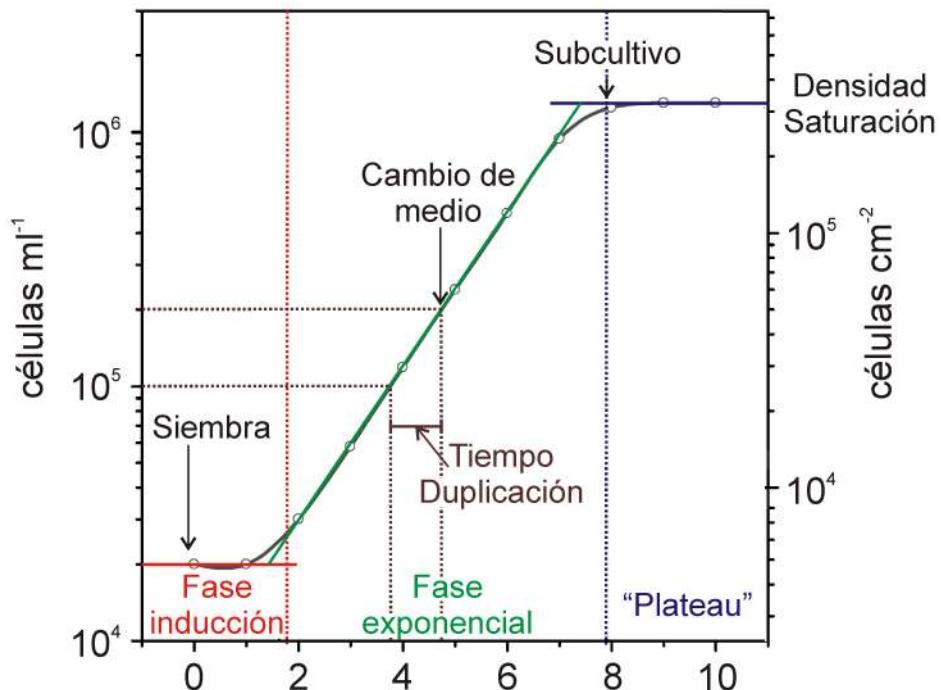


Figura A.3: Esquema de una curva de crecimiento típica. Se grafica el log del número de células por ml o cm^2 en función del número de días de cultivo. Se indican la fase de inducción, de crecimiento exponencial y el “plateau”, así como el momento en que debería realizarse un subcultivo. A partir de esta gráfica puede calcularse el tiempo de duplicación promedio.

A.2. Algunas consideraciones fisicoquímicas en relación a los sistemas biológicos

Erwin Shrödinger sostenía que los eventos espaciotemporales que tienen lugar alrededor de los organismos vivos podían ser descriptos por la física y la química [A.34]. Del mismo modo que Roux, estudiando el ángulo de bifurcación de las arterias y sus diámetros, se convenció de que las leyes de la física determinan el desarrollo de los organismos y que la optimización es inherente al desarrollo [A.10]. La unidad en la bioquímica planteada por Kluyver y Donker indica, de alguna manera, que todos los seres vivos están sometidos a las reglas de la estequiometría, la electroquímica y la termodinámica [A.35]. Parafraseando a Monod se podría decir que cualquier cosa encontrada verdadera para las rocas debería serlo también para los elefantes [A.36]. Por estos motivos se espera que diversos métodos de análisis, leyes, relaciones o ecuaciones pueden ser aplicados para describir tanto el comportamiento de sistemas no vivos y vivos.

Probablemente el ejemplo más simple sea la razón o número áureo. Esta razón está presente en una variedad enorme de situaciones de diferentes escalas, como en el radio de Bohr, el radio covalente y el radio iónico de los átomos, las dimensiones de la doble hélice de ADN, en el ordenamiento de las semillas del girasol, en la concha espiralada de los caracoles, en las proporciones del cuerpo humano, en los torbellinos y en las distancias interplanetarias [A.37]. Desde esta simple relación a la expansión de la termodinámica clásica para cubrir sistemas fuera del equilibrio con comportamientos no lineales, como son los sistemas biológicos, diversos enfoques y modelos matemáticos se aplicaron en la descripción de los principios físicos de los procesos biológicos [A.38]. Por ejemplo, el análisis termodinámico del crecimiento de

tumores ha llevado a proponer terapias anticáncer basadas en modificar la generación de entropía tumoral por fuera de los rangos que necesita el tumor para sobrevivir en un estado estacionario [A.39].

A.2.1. Interacciones de la célula con el substrato

Las interacciones de las células con la matriz extracelular o con otras células están determinadas por las mismas fuerzas presentes en las interacciones de cualquier macromolécula con su entorno [A.40]. De hecho, las sorprendentes propiedades adhesivas de ciertos animales como los geckos que pueden trepar en un vidrio invertido, de las ranas arborícoras que pueden escalar en árboles mojados, de los mejillones que pueden adherirse a superficies sólidas debajo del agua o de numerosos insectos como arañas y sus telas, hormigas y cucarachas, pueden entenderse a través de las mismas fuerzas [A.41]. Es todo una cuestión de escala, y en última instancia son las membranas y receptores celulares los que interactúan a través de fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas y magnéticas, uniones químicas y entrelazamientos mecánicos con el entorno [A.41, A.42]. Sin embargo, a pesar de que las interacciones con el entorno son, en cierto modo, simples, estas desencadenan complejas cascadas de señalización en el interior celular que terminan definiendo tanto la adhesión como el destino celular [A.43]. De hecho, los distintos tipos de células presentes en el cuerpo humano, al tener funciones muy diferentes, responden de manera distinta a los mismos estímulos. Por ejemplo, las células madre tienden a diferenciarse a células adiposas en superficies blandas o poco rígidas y a osteocitos en superficies rígidas [A.44].

La adhesión celular y los distintos procesos que ocurren en una célula tienen diferentes escalas espaciales (Figura A.4) y temporales (Figura A.5). La adhesión celular suele comenzar a nivel molecular, cuando las integrinas se unen a su ligando (por ejemplo, el tripéptido RGD) sobre la superficie celular, pasando de una conformación de reposo (5 nm) a extendida (15-20 nm). Esta unión suele durar en promedio, 10 segundos. Si varias integrinas logran agruparse en la misma zona de la membrana se desencadena un ensamblado molecular, en el que se reclutarán proteínas como Paxilina, Talina o Vinculina y llevarán a madurar la adhesión naciente ($0.25 \mu\text{m}$, en 1 minuto aproximadamente) a complejo focal ($0.5 \mu\text{m}$, en 10 minutos aproximadamente) y este a adhesión focal, que tienen un tamaño $1-5 \mu\text{m}$. Estas adhesiones focales se desensamblan y renuevan cada 20 minutos o pueden evolucionar a adhesiones fibrilares ($>5 \mu\text{m}$) involucradas en la remodelación de la matriz extracelular [A.42].

Las adhesiones focales están asociados con filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto celular, el cual es capaz de sensar y responder frente a estímulos externos. Estas fibras o filamentos de actina tienen tamaños variables, dependiendo del tamaño de la célula, pero en general tienen más de $10 \mu\text{m}$. El citoesqueleto de actina termina definiendo el área de expansión celular, la forma de la célula y es de fundamental importancia en la migración, proliferación y diferenciación celular. Estos 3 últimos procesos están fuertemente regulados por el ambiente o matriz extracelular y son dependientes de una correcta adhesión. Si bien dependen de la línea celular y las condiciones de cultivo, la velocidad de migración suele rondar en las décimas o micrones por minuto, la división es un proceso que demora alrededor de 1 día y la diferenciación 2-3 semanas. Además, para la diferenciación suele ser necesario que múltiples células estén formando agregados o colonias y que las células permanezcan adheridas a la superficie durante todo el tiempo de diferenciación [A.42].

En las células dependientes de anclaje no sólo procesos como la migración, la proliferación o la diferenciación son seguidos sólo después de una correcta adhesión, sino que están programadas para morir mediante anoikis (del griego, “sin hogar”) cuando las interacciones célula-matriz extracelular no son las adecuadas. La anoikis juega un papel fundamental en

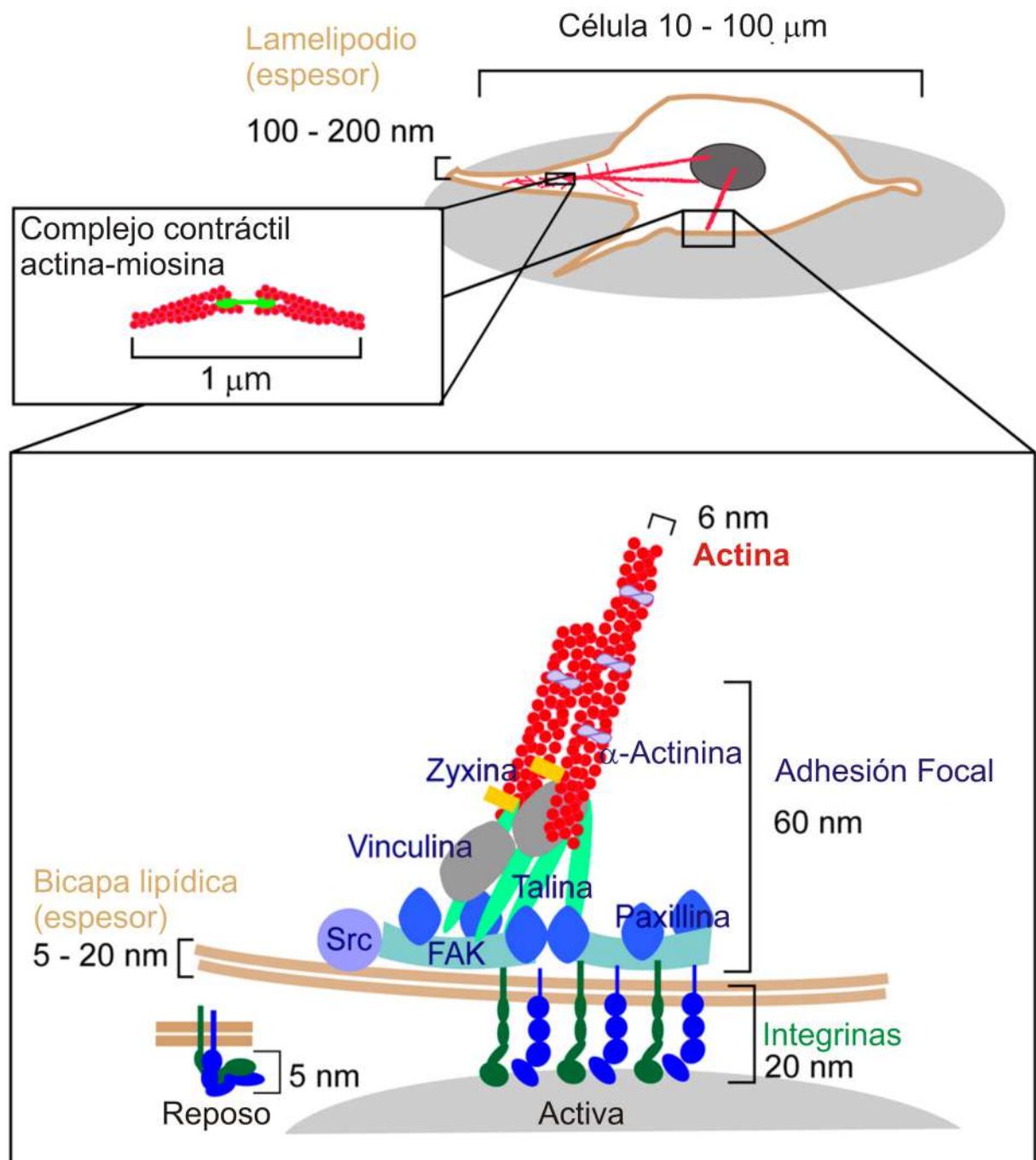


Figura A.4: Esquema que muestra las distintas escalas espaciales del proceso de adhesión celular. Adaptado de [A.42].

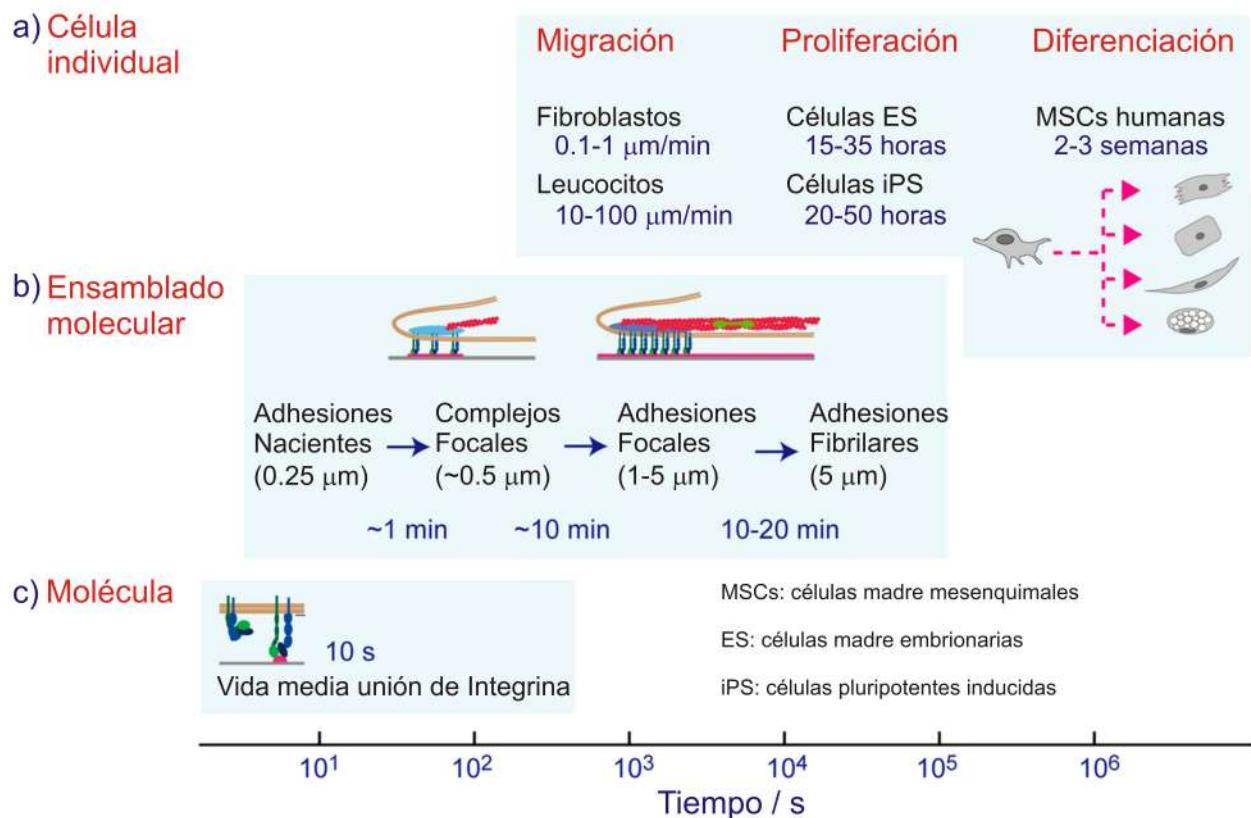


Figura A.5: Esquema que muestra las distintas escalas temporales de los procesos celulares como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación. Adaptado de [A.42].

el mantenimiento de la homeostasis del tejido, y la adquisición de resistencia a este proceso es característica de las células cancerígenas metastásicas [A.45]. Hay numerosas propiedades de la matriz extracelular o de los biomateriales que pueden determinar que las células sean capaces o incapaces de adherirse.

Proteínas adherentes

Dentro de las numerosas proteínas que conforman la compleja matriz extracelular algunas tienen la función de modular la adhesión celular, como son la fibronectina, la vitronectina, el colágeno, la laminina o la fibrina [A.46]. Estas proteínas necesarias para la adhesión ya sea in vivo o in vitro presentan motivos de aminoácidos, como la secuencia RGD (tripéptido de arginina, glicina y ácido aspártico), capaces de unirse a integrinas y otros receptores celulares [A.47]. Además, deben estar ordenadas de tal forma que puedan dirigir la adhesión celular e influyen en la forma que las células sensan las propiedades mecánicas del substrato. A parte de los tipos de proteínas que se adsorben, de la cantidad y la conformación, la fuerza con la que estas se unen al substrato influye en la adhesión celular. Proteínas pobremente adsorbidas determinarán también una pobre adhesión [A.48].

Composición química superficial, polaridad, mojabilidad y potencial zeta

La composición química de una superficie determina la energía superficial, la polaridad, la mojabilidad y el potencial zeta, y de alguna manera podría definir las interacciones entre las células y el material. Sin embargo, las células no se adhieren directamente sobre las superficies. La sangre, los fluidos corporales o las mismas células secretan proteínas de matriz

pro-adhesivas que se adsorben sobre el material y terminan mediando la adhesión celular. En los cultivos in vitro es el suero que se le agrega al medio de cultivo el que aporta estas proteínas [A.49]. Una composición química que favorezca la adsorción de una cantidad y conformación adecuadas de proteínas puede favorecer la adhesión celular. En general, si la superficie es muy hidrofóbica (ángulo de contacto > 100°) tiende a hacer que las proteínas adsorbidas estén desnaturalizadas y en un estado muy rígido. De este modo puede ser que los sitios específicos de interacción con las integrinas (como los oligopéptidos que contienen RGD) estén menos accesibles, evitando la adhesión celular. Por otro lado, superficies muy hidrofílicas tienden a unir a las proteínas adhesivas mediante fuerzas muy débiles, con lo cual pueden desprenderse del substrato impidiendo la adhesión celular. Superficies de hidrofilicidad intermedia (ángulo de contacto entre 80-90°) tienden a promover la adhesión celular ya que favorecen la adhesión de proteínas en su conformación nativa, en cantidades adecuadas y en un modo flexible, de manera que las células pueden reorganizarlas para acceder a sus grupos funcionales de adhesión con sus receptores. Además, tienden a adherir menos proteínas anti-adhesivas como la sero albúmina bovina que suele adsorberse en mayor cantidad en superficies no polares e hidrofóbicas [A.49]. Sin embargo, los resultados suelen variar de material en material y el ángulo de contacto o la energía superficial resultan malos predictores de las respuestas biológicas a los biomateriales [A.50]. Con el potencial zeta o la carga superficial sucede algo similar, como las proteínas de matriz que median la adhesión celular están cargadas negativamente estas se adsorben preferentemente en superficies positivas. Por eso las células tienden a adherirse mejor sobre superficies positivas que sobre superficies negativas [A.49].

Topografía del substrato

Hay una amplia variedad de características topográficas presente en la matriz extracelular de los diferentes tejidos y órganos. Estas características topográficas actúan como restricciones estructurales que alteran la forma de las interacciones célula-matriz extracelular y llevan a la reorganización de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina. De esta manera la topografía afecta la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular [A.42].

La superficie de un material puede presentar distintas rugosidades, dependiendo de la escala en que se diseñan las irregularidades de la superficie. La macro rugosidad está caracterizada por irregularidades de 100 μm o más, mientras que la micro rugosidad presenta irregularidades de entre 1 y 100 μm . La submicro rugosidad se manifiesta en un rango de tamaños que va de los 100 μm a 100 nm, y la nano rugosidad, a escala menores de 100 nm.

La macrorugosidad presenta irregularidades demasiado grandes para ser sensadas por las células, por lo que no afecta la adhesión celular. Los efectos de la microrugosidad suelen ser ambiguos, en determinadas superficies pueden favorecer la adhesión celular y en otras la impiden. La submicrorugosidad también presenta resultados ambiguos, pero en general los efectos positivos/adhesivos prevalecen. La nanorugosidad, que puede asemejarse a la “nano-arquitectura” natural de la matriz extracelular que está organizada en nanofibras, nanocristales y nanopliegues de las moléculas presentes, suele favorecer la adhesión celular [A.49]. Las situaciones pueden ser más complejas, ya que diferentes escalas de rugosidad pueden estar presentes formando estructuras jerárquicas que afectan en forma conjunta la adhesión celular [A.51]. La interacción de las células con el entorno no depende solamente del valor de rugosidad, sino de las diferentes geometrías, de la distribución de las irregularidades o “motivos” y de las proteínas adsorbidas, como la fibronectina, que median el efecto que la nanotopografía ejerce sobre las células [A.52, A.53].

Rigidez del substrato

Los tejidos de un organismo poseen una gran diferencia de rigidez, desde líquidos como la sangre a sólidos como el hueso. El módulo elástico de los diferentes tejidos es variable: 0.1 a 1 Kpa para el cerebro, alrededor de 5 kPa para el tejido adiposo, 8 – 17 kPa para el músculo y 25 - 40 kPa para las fibras de colágeno entrecruzadas o el hueso [A.54]. Por otro lado, las células son capaces de sentir la rigidez del substrato y responder en función de ella [A.55].

En las células adheridas sobre un substrato rígido (>10 kPa), la proporción de integrinas asociadas a proteínas adhesivas y la estabilidad del complejo focal están incrementadas debido a la tensión mecánica, lo que permite la maduración de las adhesiones nacientes a adhesiones focales. La formación de adhesiones focales maduras facilita el desarrollo de las fibras de actina en el citoplasma. Por otro lado, en las células adheridas a substratos poco rígidos o blandos (<10 kPa) los complejos focales son traccionados desde el interior celular y se mueven con las deformaciones del substrato. Las células responden de manera de mantener una deformación del substrato constante, dispersando el citoesqueleto de actina y los complejos adhesivos, de modo de disminuir la tensión en el punto de adhesión [A.42]. Se necesita un balance adecuado entre las fuerzas de tracción de las células y la resistencia del substrato a esas fuerzas para ensamblar adhesiones focales funcionales, para que se desarrolle el citoesqueleto celular y para que la célula pueda extenderse sobre la superficie. Por este motivo los materiales demasiado blandos suelen ser anti-adherentes.

Además de la adhesión, las propiedades mecánicas del substrato regulan numerosos procesos a nivel celular como la motilidad, la síntesis de proteínas de matriz extracelular, la rigidez celular o la proliferación. Los efectos de la rigidez del substrato son fuertemente dependientes de la línea celular, de hecho las células madres mesenquimales humanas muestran un compromiso neurogénico cuando se cultivan sobre substratos blandos, un compromiso miogénico cuando se cultivan sobre un substrato de rigidez intermedia y un compromiso osteogénico cuando se siembran sobre materiales muy rígidos [A.56]. Una vez más, como las adhesiones focales se forman a partir de las interacciones de las integrinas con las proteínas adhesivas, la forma en que estas últimas se adsorben sobre la superficie juega un rol fundamental en la manera en que las células sensan la rigidez del substrato [A.48].

A.2.2. Movilidad celular: interacciones con la matriz extracelular y fenómenos de transporte

La movilidad o migración celular es uno de los procesos que pueden tener lugar luego de la adhesión de las células adherentes. La movilidad celular tiene un rol fundamental en muchos procesos fisiológicos, como la fecundación, el desarrollo embrionario o la sanación de heridas, y patológicos, como el crecimiento de tumores malignos y su metástasis [A.57]. Entender los diferentes aspectos de la movilidad de células aisladas o la migración de las células dentro de una colonia es de suma importancia no sólo para comprender los aspectos dinámicos de estos biosistemas, sino para el desarrollo de terapias que controlen la migración, por ejemplo, favoreciéndola en el caso de la regeneración de tejidos o inhibiéndola en el caso de la propagación del cáncer [A.58, A.59].

La movilidad celular es un proceso complejo que comienza con la extensión de la membrana plasmática hacia un frente o “borde líder”. Estas protrusiones o lamelipodios son guiadas por la polimerización de filamentos de actina del citoesqueleto y estabilizadas a través de las adhesiones focales que sirven como puntos de tracción utilizados por la célula para moverse. Finalmente, la disolución de las adhesiones focales en la parte posterior de la célula y la contracción de la membrana mediados por complejos de actina y miosina resulta en un

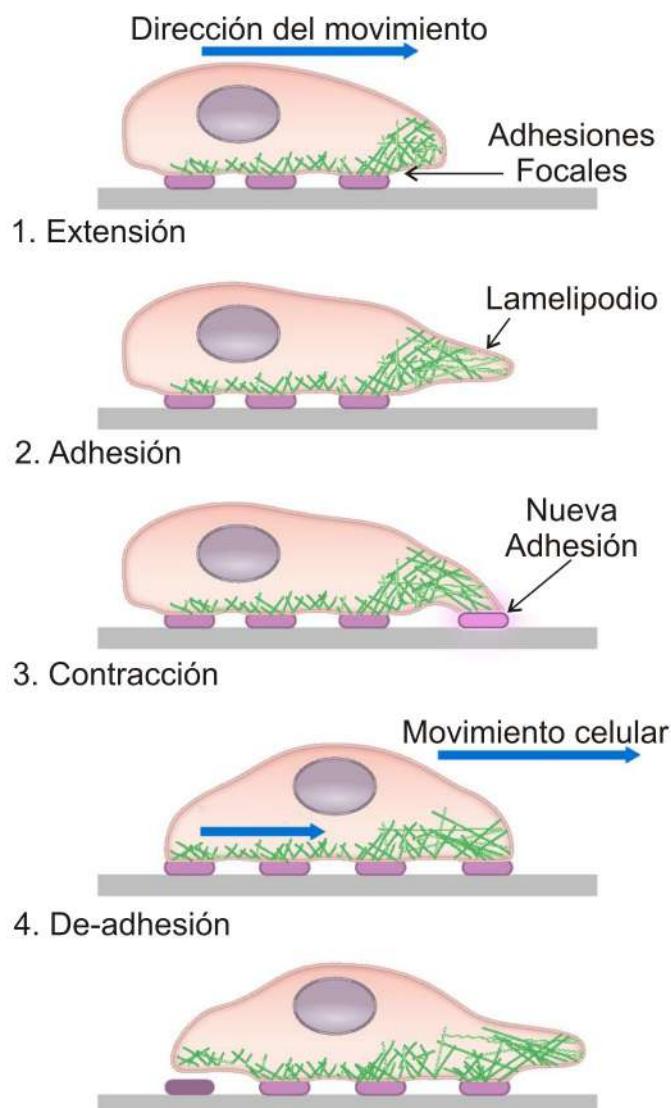


Figura A.6: Esquema que muestra los distintos pasos de la movilidad celular. La célula extiende su membrana plasmática a través de lamelipodios y forma nuevas adhesiones focales. La disolución de las adhesiones focales en la región posterior de la célula y la contracción de la membrana se traduce en un desplazamiento neto.

desplazamiento neto (Figura A.6) [A.60]. La motilidad celular es un proceso que termina dependiendo del balance o relación entre las fuerzas contráctiles, adhesivas y protrusivas [A.61]. Además, existen numerosas moléculas y mecanismos de señalización que controlan la movilidad celular, como receptores adhesivos (integrinas), cadherinas, cateninas, señalización vía tirosin quinasas o Rho GTPasas [A.62], que hacen que la migración no dependa de las células individuales sino de las interacciones de estas con la matriz extracelular (MEC) y con otras células con las que concertan sus movimientos.

El hecho de que en muchas situaciones biológicas las células no se muevan como entidades libres sino coordinando sus movimientos ha despertado el interés de expertos de la materia condensada y la física estadística, ya que la migración colectiva de las células tiene muchas semejanzas con las dinámicas de gases, líquidos o vidrios. Además, el carácter autopropulsado de las células y los complejos modos de interacción entre ellas hacen que sus movimientos colectivos tengan comportamientos más variados y complejos que los de la materia inanimada [A.63]. Es por este motivo que a la migración colectiva puede ser encarada desde un

enfoque multidisciplinario, donde a las herramientas de la biología se le suman aquellas de la física, como la medida de campos de velocidades celulares, el mapeo de las fuerzas que las células ejercen sobre el substrato, la generación de modelos matemáticos o las simulaciones computacionales [A.64].

Influencia del ambiente extracelular en la migración celular

In vivo, la migración celular tiene lugar en una amplia variedad de ambientes extracelulares. Estos ambientes pueden tener distintos grados de confinamiento, pueden variar en las propiedades mecánicas, pueden tener diferentes características bioquímicas o topográficas y presentar gradientes de distintas propiedades biofísicas o factores solubles [A.65]. Para agregar aún más complejidad, la forma en que las células interpretan todos estos estímulos y responden a ellos depende de su estado bioquímico intrínseco, que a su vez varía marcadamente entre las distintas líneas celulares [A.66].

Las células migrando en condiciones fisiológicas se encuentran con una gran variedad de topografías y a menudo confinadas por la MEC o por otras células. Las células pueden migrar en 1D sobre fibras o finas tiras de MEC, lo que reduce la expansión lateral de las protrusiones de la membrana y lleva a la formación de delgadas proyecciones con filamentos paralelos de actina denominadas filopodios. Por otro lado, cuando se mueven en 2D pueden generar prolongaciones planas de membrana llamados lamelipodios. Si las células migran en tubos o túneles tienden a migrar mediante la formación de filopodios como lo hacen en 1D, mientras que la migración entre dos superficies planas es compatible con la generación de lamelipodios. Resulta interesante notar que si la célula está confinada entre dos superficies no es posible que esta se despegue, por lo que se toleran altos niveles de fuerza contráctil incluso si la adhesión al substrato es baja. En estos casos la adhesión y la presencia de proteínas adhesivas pierde importancia [A.65]. Por otro lado, características topográficas como “patterns” de sitios adhesivos, de crestas o de distintas figuras geométricas pueden controlar la morfología o asimetría celular y guiar así la migración de las células [A.67, A.68].

Muchas células pueden sentir la rigidez del substrato por un proceso denominado mecanotransducción. Si una célula tiene más de un punto de anclaje a un substrato rígido, la aplicación de fuerza entre las fibras de estrés puede llevar a una tensión isométrica dentro de la célula (que por lo tanto va a estar estirada y quieta) o si algún punto de adhesión se desprende o mueve resultará en una tensión asimétrica y en el movimiento celular. Si la célula tiene puntos de anclaje a un substrato blando, puede que esta ejerza más fuerza que la que el substrato pueda soportar y lo deforme. Las fuerzas ejercidas por las fibras en las adhesiones mediadas por integrinas pueden conducir a cambios conformacionales en las proteínas dentro de los complejos focales, y así funcionar como una unidad de mecanosensado. Además, las células tienen mecanismos para detectar cambios de rigidez locales, lo que les permite migrar en gradientes de propiedades mecánicas hacia las zonas más rígidas, en un proceso llamado durotaxis [A.65].

A veces, el substrato para el movimiento de las células no es la MEC sino otras células, por lo que las adhesiones célula-célula mediadas por cadherinas cobran singular importancia. Al igual que las integrinas, las cadherinas pueden sentir las propiedades mecánicas del entorno, lo que facilita el movimiento en ambientes celulares. Las adhesiones célula-célula, además, son fundamentales para mantener la cohesión y transmitir las fuerzas en grupos de células migrando colectivamente [A.65].

A parte de las mencionadas, otras propiedades del ambiente extracelular, como la presencia de factores solubles, pueden afectar la movilidad celular. De hecho, luego de una herida, las células secretan una gran variedad de factores de crecimiento que inducen una

rápida proliferación y migración celular [A.69]. Un gradiente de estos factores solubles puede dirigir la movilidad celular por un proceso denominado quimiotaxis [A.70].

La física estadística y los fenómenos de transporte aplicados al estudio de la movilidad celular

El estudio de la movilidad celular puede realizarse tanto sobre células moviéndose independientemente unas de otras o en forma colectiva e incluso en la transición entre ambas situaciones [A.71]. Históricamente se propuso que las células procariotas y eucariotas, en ausencia de gradientes o factores externos que rompan la simetría, se comportan como un caminante aleatorio.

A medida que aumenta la densidad celular, las células están más cerca unas de otras y comienzan a interactuar coordinando sus direcciones y sentidos de movimiento. Esto se ve reflejado en un aumento de la correlación espacio-temporal de las células y un aumento en el comportamiento balístico de los movimientos [A.72]. La conducta cooperativa de las células determina la transición de un sistema desordenado (poco denso) a uno ordenado (denso) [A.71]. La evolución y dinámica de los movimientos celulares en una monocapa confluente encuentra muchas semejanzas con las dinámicas de transición vítreo [A.73].

Si bien hay muchos métodos para estudiar la migración celular, los ensayos con cultivos confluentes y frentes lineales de crecimiento (del estilo de corte y cerrado de herida) o frentes radiales de crecimiento (colonias circulares) son de los más utilizados [A.74]. El cerrado de heridas o la expansión de colonias pueden ser descriptos matemáticamente utilizando ecuaciones de fenómenos de transporte, que se aplican tanto a partículas, especies químicas en una reacción o células. De este modo, el cerrado de una herida o cubrimiento de la superficie libre por parte de células que se desplazan formando un frente lineal puede modelarse, por ejemplo, utilizando la ecuación de Fisher-Kolmogorov, que describe la evolución espacio-temporal de la densidad celular como un sistema de reacción-difusión. Esta ecuación involucra un coeficiente de difusión (relacionado a la velocidad de migración celular) y una tasa de proliferación dependiente de efectos poblacionales para tener en cuenta la disminución de la tasa de proliferación a medida que las células alcanzan la confluencia (inhibición por contacto).

La movilidad celular también depende del tipo de células. Por ejemplo, las células mesenquimales tienden a migrar menos colectivamente, más rápido y de un modo más balístico que las células epiteliales, lo que puede tener grandes implicancias en la invasión tumoral y metástasis [A.75]. Además, ciertos compuestos solubles como el factor trefoil o el factor de crecimiento epidérmico promueven el cerrado en un experimento de corte empleando células epiteliales, pero mientras que el primero lo hace favoreciendo el movimiento colectivo de la monocapa de células con pocos huecos internos, el segundo genera una red de células de forma fibroblástica con numerosos huecos [A.76].

La geometría del substrato o matriz y el número de dimensiones en que pueden desplazarse las células también afecta la movilidad celular. Hemos visto que las células individuales tienen un movimiento aleatorio, pero esto es válido sólo en 2D ya que los mecanismos de migración en las matrices 3D son distintos [A.77]. Esto resalta la importancia de estudiar la movilidad celular en distintas condiciones.

Finalmente, es importante destacar que también pueden utilizarse simulaciones computacionales para estudiar la migración celular y el crecimiento de colonias. En estas simulaciones pueden tenerse en cuenta distintas características de las células y el entorno, como la deformabilidad celular, las interacciones mecánicas entre las células, la polarización celular, la presencia de factores de crecimiento y quimiotaxis, y la presencia de patrones espaciales

u obstáculos en la superficie de los substratos.

A.2.3. Propagación de interfaces biológicas

Para estudiar el crecimiento de las colonias resulta necesario definir qué parámetros van a utilizarse para cuantificar la expansión del sistema. En el caso de los experimentos de corte y cerrado de heridas uno de los parámetros más utilizados es el de porcentaje de cobertura del espacio libre o herida [A.78]. Si bien resulta en cierto modo ventajoso para el estudio de casos en que las células, por su forma y tipo de movimiento, se expanden generando agujeros, está limitado a experimentos en que dos frentes de células deben encontrarse y no es útil si no quieren considerarse las células que por algún motivo se han desprendido de la colonia. Otra alternativa sería tomar como parámetro de crecimiento el número de células en función del tiempo. Esta resulta una medida directa de la capacidad de proliferación de las células, pero como en distintas regiones de la colonia la densidad celular varía, las células tienen distintos tamaños y perdemos noción de la dimensión del sistema [A.79]. Una tercera opción es medir el avance promedio de la interface entre las células que conforman la colonia y el ambiente extracelular, generalmente el medio de cultivo. Es una medida directa del tamaño o crecimiento del sistema y sólo tiene en cuenta las células que están en contacto con la colonia, pero resulta difícil de interpretar cuando existen muchos agujeros [A.79].

El área de cubrimiento en un experimento de corte y cerrado de herida avanza a velocidad constante, del mismo modo que crece la altura promedio ($\langle h \rangle$) de un frente lineal de crecimiento [A.78]. Debido al elevado número de células presentes en el seno de un cultivo que ya alcanzó la confluencia y del pequeño tamaño y forma no definida de las mismas, evaluar la proliferación celular por simple conteo puede resultar difícil. El caso de las colonias circulares y los frentes radiales de crecimiento la situación es algo más compleja. Partiendo de islas con un número pequeño de células, alrededor de 10, se observa que mientras el número de células crece exponencialmente durante todo el intervalo de tiempo que es posible contarlas, el radio promedio de la colonia ($\langle R \rangle$) sufre una transición desde un crecimiento exponencial a uno a velocidad constante [A.79]. El radio al que se presenta esta transición para una línea celular es aproximadamente constante y puede explicarse y modelarse mediante la formación de un anillo efectivo exterior de células cuya duplicación y movimiento aporta a la expansión de la colonia y un núcleo denso en el que, si bien ocurren duplicaciones, no aporta al crecimiento [A.80].

El crecimiento de las colonias celulares depende de numerosos factores que en la mayoría de las situaciones resulta muy difícil, sino imposible, distinguir. Sin embargo, siempre existe un pequeño número de leyes básicas que determina la morfología y la dinámica de crecimiento de las colonias [A.81]. Uno de los procedimientos que se pueden aplicar para interpretar el complejo proceso de propagación de una colonia celular se basa en la aplicación del análisis de escalado dinámico (AED) en la propagación de los frentes de las colonias [A.81, A.82].

Escalado dinámico

Hemos visto que numerosos parámetros pueden utilizarse para describir el crecimiento de una colonia. En los casos en que sea posible definir una interfase entre las membranas plasmáticas de las células que conforman la colonia a estudiar (ya sea un tumor 3D *in vivo* o una colonia 2D en una cápsula de petri) y su entorno, el crecimiento de la interfase puede describirse básicamente con dos parámetros (Figura A.7):

- a. La altura promedio de la superficie de la colonia, $\langle h(t) \rangle$, definida como:

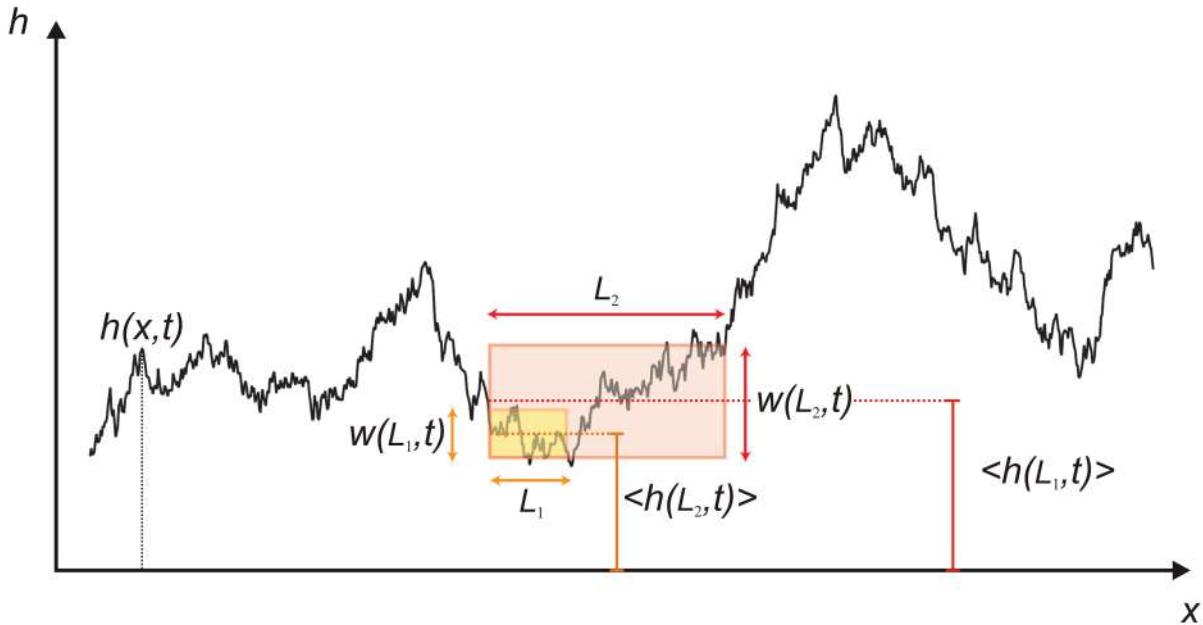


Figura A.7: Gráfico de la altura h en función de x de una interfase. Se muestran los parámetros típicos $\langle h(t) \rangle$ y $w(L,t)$ para distintos valores de l .

$$\langle h(t) \rangle = \frac{1}{L} \sum_x^L h(x, t) \quad (\text{A.2})$$

donde $h(x, t)$ es la altura h de la interfase en la posición x al tiempo t y L es el ancho del sistema.

- b. El ancho de la interfase, $w(L, t)$, que caracteriza la rugosidad de la superficie y se define como la desviación cuadrática media de las alturas:

$$w(L, t) = \left\{ \frac{1}{L} \sum_x^L [h(x, t) - \langle h(t) \rangle]^2 \right\}^{1/2} \quad (\text{A.3})$$

Entonces, para estudiar cuantitativamente el proceso de rugosado se mide la rugosidad en función del tiempo. Por definición, el crecimiento debería comenzar a partir de una línea horizontal por lo que la interfase a tiempo cero es una línea y su rugosidad es cero (sistema liso). El contorno de la colonia se va arrugando a medida que pasa el tiempo.

En general, el comportamiento típico de $w(L, t)$ en función de t presenta una transición a $t = t_{\text{sat}}$ entre los regímenes de crecimiento (Figura A.8 a).

1. Inicialmente la rugosidad crece como una potencia de t ,

$$w(L, t) \propto t^\beta \quad \text{para } t \ll t_{\text{sat}} \quad (\text{A.4})$$

El exponente β , llamado *exponente de crecimiento*, caracteriza la dependencia temporal del proceso de rugosado.

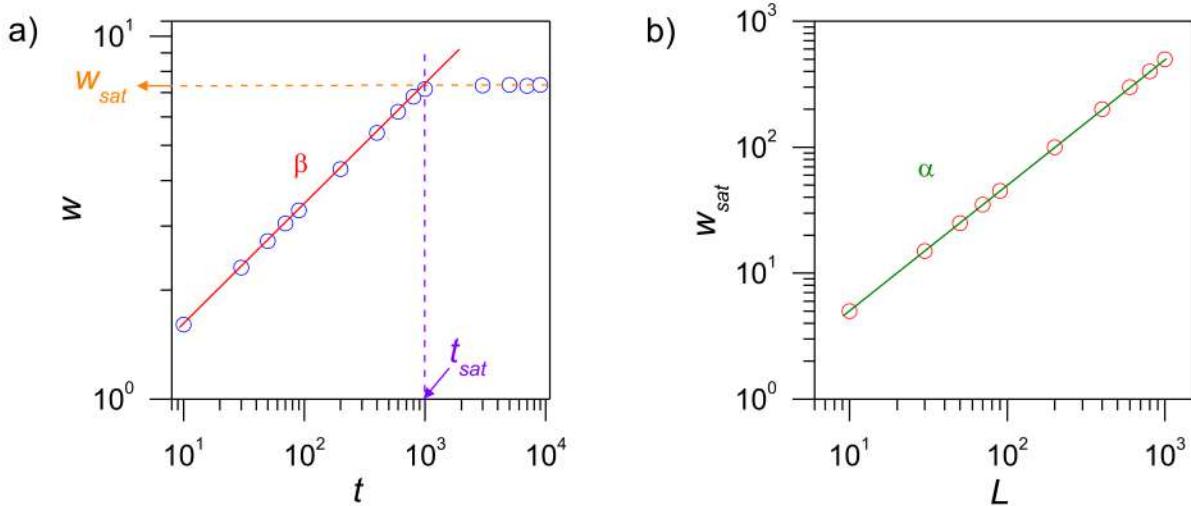


Figura A.8: Evolución de la rugosidad w en función del tiempo (a) y de la rugosidad de saturación w_{sat} en función del tamaño del sistema L (b). En la representación de w en función de t pueden diferenciarse los dos regímenes característicos: crecimiento como ley de potencia de t de donde puede calcularse el exponente β , seguido de la invarianza en el valor de $w = w_{sat}$ a partir de t_{sat} . Con los valores de w_{sat} para sistemas con $\neq L$ se determina α .

2. El crecimiento de la rugosidad como ley de potencia no continúa indefinidamente, sino que es seguido de una saturación (región horizontal de la Figura A.8 a) en que se alcanza una rugosidad de saturación, w_{sat} . A medida que L aumenta, w_{sat} también aumenta y la dependencia también sigue una ley de potencia (Figura A.8 b):

$$w_{sat}(L) \propto t^\alpha \quad \text{para} \quad t \gg t_{sat} \quad (\text{A.5})$$

El *exponente de rugosidad* α es el segundo exponente crítico y caracteriza la rugosidad de la interfase saturada.

3. El tiempo de saturación t_{sat} al que la interfase cambia de régimen depende del tamaño del sistema según la relación:

$$t_{sat} \propto L^z \quad (\text{A.6})$$

donde z es el *exponente dinámico*.

Los exponentes α , β y z no son independientes, sino que están relacionados entre sí. Además presentan propiedades *universales*, esto es, son independientes de los detalles del sistema y se encuentran determinados solamente por aspectos físicos básicos del mismo.

A partir de las relaciones (A.4-A.6) es posible reescalar y “colapsar” las curvas de w en función del t obtenidas para distintos tamaños del sistema L , como las que se muestran en la figura A.9a.

- si se grafica $w(L,t)/w_{sat}$ como función del tiempo, se obtienen curvas que saturan al mismo valor de rugosidad, independientemente de L (Figura A.9b).
- II. si se grafica la rugosidad del sistema como función de t/t_{sat} se logra que las curvas saturan al mismo tiempo característico (Figura A.9c).

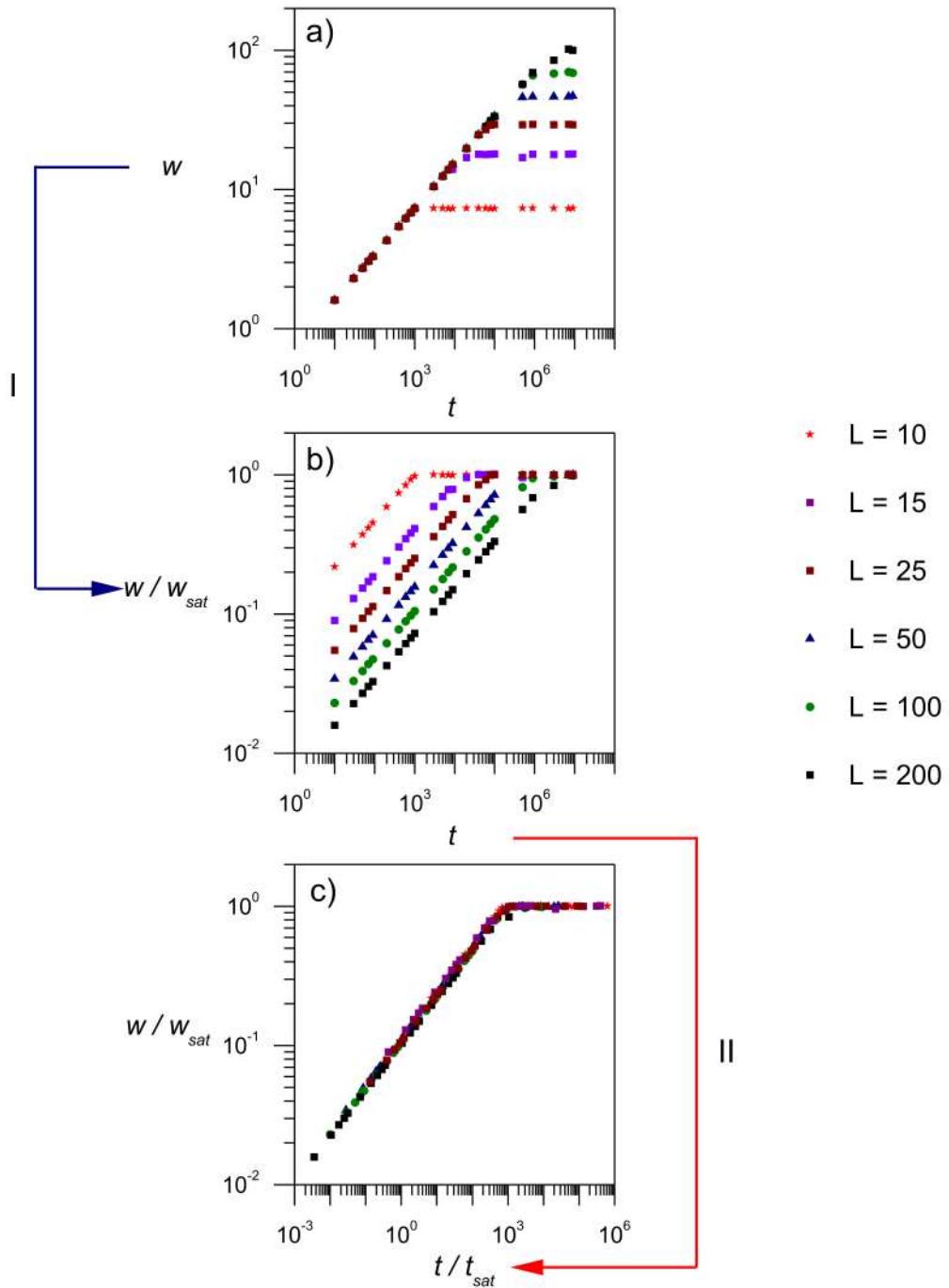


Figura A.9: Esquema del reescalado de datos de rugosidad para sistemas con distintos tamaños. En (a) se muestran curvas de rugosidad w en función del tiempo t para distintos tamaños de sistema. En el paso I se normaliza la rugosidad de las curvas por w_{sat} y las curvas se corren en la dirección vertical hasta el mismo valor de saturación, pero lo hacen a tiempos distintos (b). En el paso II se reescaló el tiempo dividiéndolo por t_{sat} , que corresponde al corrimiento horizontal de las curvas. De acuerdo a la relación (A.6), las curvas ahora saturan al mismo valor de abscisa, t/t_{sat} , “colapsando” todas en una misma curva llamada función de escalado (c).

Estas observaciones sugieren que $w(l,t)/w_{\text{sat}}$ es función de t/t_{sat} sólo si:

$$\frac{w(L,t)}{w_{\text{sat}}(L)} \propto f\left(\frac{t}{t_{\text{sat}}}\right) \quad (\text{A.7})$$

donde $u = t/t_{\text{sat}}$ es el argumento de $f(u)$, la denominada *función de escalado*.

Reemplazando w_{sat} y t_{sat} en la ecuación A.7 por sus expresiones (ecuaciones A.5 y A.6), se obtiene la *relación o hipótesis de escalado dinámico de Family-Vicsek*:

$$w(L,t) \propto L^\alpha f\left(\frac{t}{L^z}\right) \quad (\text{A.8})$$

Dependiendo del argumento u , la función de escalado puede cumplir dos régimenes:

- A. Para valores pequeños de u , la función de escalado aumenta como una ley de potencia:

$$f(u) \propto u^\beta \quad \text{para } u \ll 1 \quad (\text{A.9})$$

- B. Cuando $t \rightarrow \infty$ la rugosidad satura. La saturación se obtiene para $t \gg t_{\text{sat}}$, es decir que el argumento de la función de escalado $u \gg 1$ y

$$f(u) = \text{constante} \quad \text{para } u \gg 1 \quad (\text{A.10})$$

En la figura A.8a podemos observar que si uno se acerca al punto de quiebre $(t_{\text{sat}}, w_{\text{sat}})$ desde la izquierda, se encuentra de acuerdo a la ecuación A.4 que $w(t_{\text{sat}}) \propto t_{\text{sat}}^\beta$. Por otro lado, si uno se acerca al mismo punto desde la derecha, se obtiene a partir de la ecuación A.5 que $w(t_{\text{sat}}) \propto L^\alpha$. De estas relaciones se desprende que $t_{\text{sat}}^\beta \propto L^\alpha$, y de acuerdo a la ecuación A.6:

$$z = \frac{\alpha}{\beta} \quad (\text{A.11})$$

La ecuación A.11, que relaciona los 3 exponentes y se denomina *ley de escalado*, es válida para cualquier proceso que cumpla con la relación de escalado A.8.

Modelos universales de crecimiento

La idea de que sólo existen unos pocos factores o procesos esenciales que determinan los exponentes que caracterizan la dinámica de crecimiento de una interfase da origen al concepto de *modelo o clase universal* [A.81, A.82]. Estas clases universales son descriptas por ecuaciones diferenciales contínuas que describen el crecimiento de h en función de t . La forma más sencilla de desarrollar las ecuaciones diferenciales que representan sistemas cada vez más complejos es ir agregando nuevos términos que respondan a las nuevas variables o procesos en juego. De esta manera pueden obtenerse distintas ecuaciones que describan la variación de la altura de la interfase unidimensional en función del tiempo ($h(x,t)$).

- El sistema más sencillo es aquel en que cada columna x crece de manera aleatoria e independiente del resto. Esto puede representarse con un término $\eta(x,t)$ que refleje las fluctuaciones aleatorias del proceso de crecimiento. Si el proceso es completamente aleatorio, la probabilidad de crecimiento de cada columna es la misma y entonces:

$$\langle \eta(x,t) \rangle = 0 \quad (\text{A.12})$$

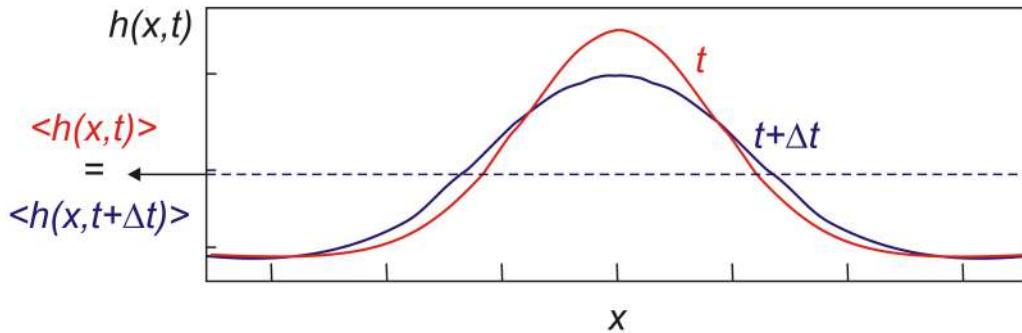


Figura A.10: Esquema del efecto de la tensión superficial ν en la morfología de la interfase. La materia que forma la protrusión es redistribuida sin modificar la altura promedio

Esta clase universal se denomina *deposición aleatoria* (DA) por el modelo que le dió origen, y su ecuación diferencial es:

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \eta(x, t) \quad (\text{A.13})$$

- En la deposición aleatoria la altura de cada columna es independiente de las demás, es decir, no están correlacionadas. Para describir sistemas en que las alturas de las columnas no son independientes (interfases correlacionados) es necesario agregar un término a la ecuación aplicando reglas de simetría. La explicación de este método excede a este trabajo de tesis, pero se encuentran detallada en [A.81, A.82]. La ecuación de *Edwards-Wilkinson* (EW) es lineal y es la ecuación más simple que describe las fluctuaciones de una interfase en equilibrio:

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad (\text{A.14})$$

El término $\eta(x, t)$ incorpora el carácter estocástico del proceso de fluctuación y no está correlacionado. El término $\nu \nabla^2 h$ tiende a suavizar la interfase, por lo que el factor ν se llama habitualmente tensión superficial. Este término produce el suavizado de la interfase redistribuyendo la materia de las irregularidades sin modificar la altura promedio (Figura A.10).

- La primer extensión de la ecuación de EW para incluir términos no lineales fue propuesta por Kardar, Parisi y Zhang (KPZ) [A.83]. El término no lineal de menor orden es ∇h^2 , que agregado a la ecuación de EW da origen a la ecuación de KPZ:

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \frac{\lambda}{2} \nabla h^2 + \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad (\text{A.15})$$

Este término no lineal implica la presencia de crecimiento lateral o en dirección normal “local” a la interfase (Figura A.11). A diferencia del término lineal, que reorganiza la materia manteniendo $\langle h \rangle$ constante, el término no lineal aumenta $\langle h \rangle$ agregando materia a la interfase (en caso de que $\lambda > 0$).

Estas ecuaciones definen 3 clases universales del escalado dinámico: DA, EW y KPZ. Cada una de estas clases tiene asociado un grupo de exponentes críticos en 1 dimensión, que

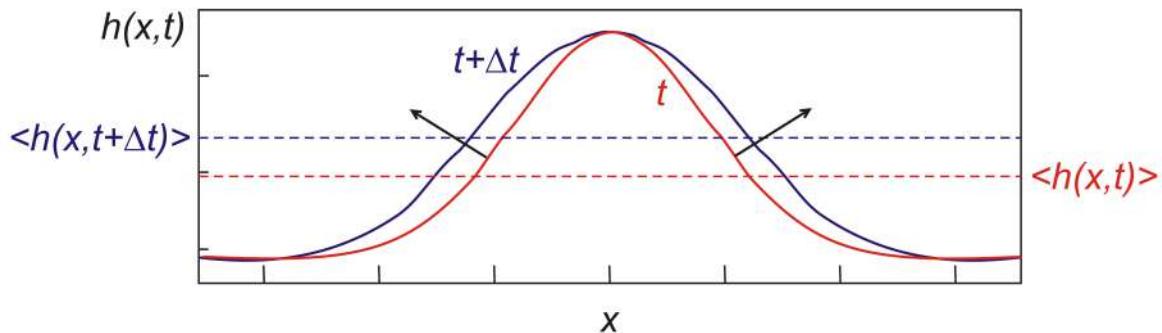


Figura A.11: El crecimiento en dirección normal local a la interfase da origen al término no lineal en la ecuación de KPZ. Se muestra su efecto en la morfología y $\langle h \rangle$ de la interfase.

Nombre	Ecuación	Exponentes críticos
Deposición aleatoria	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \eta(x,t)$	α no definido; $\beta = 1/2$
Edwards-Wilkinson	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \eta(x,t)$	$\alpha = 1/2$; $\beta = 1/4$
Kardar-Parisi-Zhang	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \frac{\lambda}{2} \nabla h^2 + \nu \nabla^2 h + \eta(x,t)$	$\alpha = 1/2$; $\beta = 1/3$

Tabla A.1: Resumen de las clases universales presentadas, la ecuación continua que las representa y los exponentes críticos que las caracterizan.

se encuentran resumidos, junto con las ecuaciones matemáticas que las representan, en la tabla A.1.

A parte de las mencionadas, existen algunas clases universales más que escapan al alcance de esta tesis. Además, existen variantes de estas clases universales. En los casos hasta acá discutidos, las interfaces se propagan en un medio homogéneo y su rugosidad depende en parte del término $\eta(x,t)$, que funciona como un ruido térmico. En estas interfaces la aleatoriedad depende de las características propias del sistema. Sin embargo, en la naturaleza, existen numerosas superficies que se propagan en medios desordenados, como la interfase de un líquido que se propaga en una superficie porosa. En estos casos la velocidad y el rugosado de la interfase son influenciadas por las inhomogeneidades del medio. La resistencia del medio al avance de la interfase varía punto a punto y se denomina ruido congelado porque no cambia con el tiempo pero sí en el espacio. En un medio desordenado, la importancia del ruido congelado es mayor a la del ruido térmico, que está siempre presente. Por este motivo el término $\eta(x,t)$ puede ser reemplazado en la ecuación de KPZ por un término de ruido $\eta(x,h)$, que es ahora función del lugar donde ocurre, dando origen a una variante denominada ecuación de KPZ con ruido congelado (QKPZ):

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \frac{\lambda}{2} \nabla h^2 + \nu \nabla^2 h + \eta(x,h) \quad (\text{A.16})$$

La rugosidad en estos sistemas aumenta con mayor velocidad, por lo que los exponentes α y β tienen valores más altos, en el rango 0.7 - 0.8 [A.81].

Aplicando el escalado dinámico a frentes radiales o lineales de crecimiento de células normales o tumorales creciendo en medios convencionales se encontraron exponentes críticos que coinciden con los de la ecuación de KPZ. Esto indica que más allá de las diferencias bioquímicas de las células y de la geometría de las colonias, hay ciertos procesos o leyes básicas que determinan su dinámica de crecimiento [A.84, A.79]. La dinámica de crecimiento de numerosos y variados sistemas, como la electroconvección de cristales líquidos [A.85], la deposición de partículas esféricas en los bordes de una gota [A.86], la laminación de los

estromatolitos [A.87], la electrodeposición de metales [A.88], el crecimiento de una colonia bacteriana [A.89], entre otros, puede interpretarse mediante la ecuación de KPZ. Por otro lado, el análisis de colonias celulares propagándose en medios con metil celulosa resulta en exponentes que coinciden con los esperados para la ecuación de QKPZ [A.90].

A.3. Algunas consideraciones de los biomateriales

La necesidad de controlar las condiciones del cultivo o crecimiento celular para hacer estudios más específicos o para determinadas aplicaciones en la medicina o la industria llevó a desarrollar nuevas técnicas de cultivo y nuevos materiales.

En la actualidad, una gran cantidad de nuevos materiales y recubrimientos se utilizan con fines médicos, científicos o industriales. En la medicina se utilizan como implantes dentales, cardiovasculares y neuroquirúrgicos, en la reparación de juntas y fracturas óseas, en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, en la entrega selectiva de drogas y hasta en medicina estética [A.91]. También se utilizan nuevos materiales para diagnósticos *in situ* y *ex situ* con el fin de lograr detecciones tempranas y a bajo costo o como recubrimientos de dispositivos para diagnóstico, como sondas endoscópicas [A.7, A.92]. En el estudio de las interacciones célula-matriz resultan interesantes los materiales biocompatibles cuyas propiedades fisicoquímicas y biológicas puedan controlarse. Juegan un papel relevante para indagar acerca de procesos como el cáncer o el desarrollo embrionario o para hacer estudios mecanísticos y cribados a gran escala del efecto terapeútico o tóxico de drogas. La imitación de los sistemas naturales condujo a la generación de nuevos materiales industriales como sensores biomiméticos o nuevos adhesivos sintéticos a partir del estudio y simulación de los mecanismos adhesivos de geckos y mejillones [A.7].

La matriz extracelular es una fuente de inspiración en el desarrollo de nuevos materiales utilizables en cultivo y estudio celular, en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa [A.93]. Esta matriz es un ambiente macromolecular complejo que rodea las células en los tejidos y órganos del cuerpo. La MEC no solo define las propiedades físicas y estructurales de los tejidos, sino que también actúa como reservorio y conducto de numerosos reguladores de la adhesión, proliferación, migración, diferenciación, supervivencia y homeostasis celular [A.94]. La MEC interactúa con las células de una manera dinámica y recíproca: todos los tipos de células (epiteliales, fibroblastos, células del sistema inmune, etc) sintetizan y secretan, siguiendo determinados estímulos, diferentes macromoléculas que formarán o modificarán la matriz, y esta última, a su vez, regula el comportamiento de estas células. Esta matriz es una estructura clave tanto en muchos procesos fisiológicos (desarrollo de los tejidos y homeostasis) como patológicos (osteoporosis, cáncer) [A.95, A.96].

A continuación se describen algunos de los numerosos materiales que se han desarrollado con intención de imitar la MEC de diferentes tejidos y aplicarlos al estudio celular o la ingeniería de tejidos.

Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales blandos compuestos de redes poliméricas hidrofílicas capaces de absorber una gran cantidad de agua y fluidos biológicos sin disolverse. Tanto los hidrogeles naturales (quitosano, ácido hialurónico, alginato) como los sintéticos (polietilenoglicol) son biocompatibles y pueden usarse como matrices ya que imitan muchos aspectos de la MEC como proveer una estructura adecuada para que las células se adhieran y desarrollen sus funciones. Los hidrogeles además pueden cargar y entregar proteínas y factores de crecimiento ante determinados estímulos.

Los hidrogeles, especialmente los naturales, suelen ser demasiado blandos, lo que dificulta la adhesión celular. Por este motivo suelen modificarse por técnicas de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, copolimerización o incorporación de materiales de refuerzo (grafeno, nanopartículas) para mejorar las propiedades mecánicas. Los hidrogeles suelen tener baja conductividad eléctrica, muchas veces necesaria para aplicaciones específicas en ciertas células como las cardíacas o neuronas, lo que constituye una limitación en el uso.

Además de la biocompatibilidad y frecuente biodegradabilidad de los hidrogeles, son capaces de responder a estímulos externos tales como la temperatura, el pH, la presencia de glucosa o enzimas. De este modo es posible controlar el destino celular, lo que permite el uso de hidrogeles para el diseño de materiales inteligentes [A.42].

Materiales autoensamblados

Los materiales autoensamblados son aquellos en que las moléculas se organizan espontáneamente y sin control externo, debido a interacciones de tipo no covalente (puentes de hidrógeno, interacción hidrofóbica, pi-pi, electrostáticas o de Van der Waals), originando agregados ordenados espacial y temporalmente. El autoensamblado es un proceso ubícuo en la naturaleza y muchas estructuras biológicas fundamentales y complejas se forman de esta manera [A.97]. Debido a la naturaleza específica, direccionable, modulable y reversible de las interacciones presentes en los autoensamblados supramoleculares, estos ofrecen grandes ventajas para el diseño de biomateriales con propiedades mecánicas, físicas y biológicas definidas y ajustables [A.98].

■ Matrices autoensambladas peptídicas

Los 20 aminoácidos, pueden generar una variedad enorme de péptidos, que actúan como precursores del autoensamblado de varios tipos de arquitecturas supramoleculares, desde conformaciones en forma de alfa hélice o beta plegada, estructuras tridimensionales, nanotubos, nanofibras y nanovesículas, y finalmente forman matrices fibrosas o hidrogeles.

Las matrices peptídicas, al derivar de aminoácidos naturales, presentan buena biocompatibilidad, una sencilla degradación y presentan grupos funcionales que pueden ser reconocidos por los sistemas biológicos. Además poseen una estructura similar a la de la MEC natural y pueden ser diseñadas y modificadas para tener tamaños de poro adecuados que permitan el intercambio de metabolitos, agua, oxígeno y nutrientes. Incluso pueden variarse las propiedades mecánicas, partiendo del principio que un mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos aumenta la rigidez del material. El hecho de que respondan a estímulos externos como pH, temperatura y fuerza iónica los vuelve un material de interés en la ingeniería de tejidos [A.42].

■ Matrices de polímeros sintéticos autoensamblados

El autoensamblado polimérico sigue un enfoque de abajo hacia arriba para crear nanofibras y generar matrices. En general los bloques de construcción son copolímeros en bloque anfifílicos o péptidos sintéticos similares al colágeno o a la elastina. Estos bloques se autoensamblan formando nanofibras con propiedades mecánicas y estructurales específicas recreando la arquitectura nanofibrosa de la MEC.

Las matrices generadas de esta manera tienen importantes características como una porosidad elevada y homogénea, una relación alta del área superficie al volúmen y buenas propiedades mecánicas. Además se pueden incluir durante el ensamblado dominios

bioactivos y bloques biofuncionales (ligandos de adhesión celular, sitios de unión a factores de crecimiento, dominios con susceptibilidad a degradación por proteasas, etc) para construir plataformas biomiméticas de gran utilidad en la ingeniería de tejidos y la investigación celular [A.42].

- Matrices de autoensamblados de materiales híbridos

Dadas las limitaciones de varios materiales, la utilización de sistemas híbridos puede beneficiarse de la combinación adecuada de las propiedades de cada uno de los componentes. Se combinan péptidos y polisacáridos sintéticos o naturales, ADN y hasta materiales inorgánicos a base de silicio, titanio, carbono o plata con el objetivo de modular la biofuncionalidad, nanoestructura y propiedades mecánicas de los sistemas otorgándoles una gran versatilidad [A.99]. En general estos sistemas híbridos pueden fabricarse a partir de dos enfoques: el **autoensamblado de capa por capa (CpC)** y el autoensamblado supramolecular.

La modificación de superficies mediante la técnica de CpC provee un abordaje simple, flexible y rentable para fabricar ensamblados de multicapas. Esta técnica permite la fabricación de nanoestructuras tridimensionales de espesor, composición, estructura, propiedades y funcionalidades definidas sobre todo tipo de substratos, otorgándole una gran cantidad de aplicaciones. La gran variedad de bloques de construcción y las distintas interacciones que pueden existir entre estos, permite generar una gran cantidad de biointerfases autoensambladas.

El ensamblado supramolecular de materiales híbridos puede seguir diversas rutas: química de sol-gel, como en el caso de las redes metaloorgánicas; hibridización de bloques de construcción de distinto origen; autoensamblado anfílico o de polímeros asociados a polimerizaciones sol-gel [A.42].

Materiales de origen natural

Muchos biomateriales naturales poseen bioactividad intrínseca, tienen la posibilidad de imitar algunas propiedades nativas de la MEC y suelen ser biodegradables y no tóxicos. Se pueden obtener matrices a base de colágeno, hidrogeles naturales, péptidos autoensamblados, a base de fosfato de calcio o matrices extracelulares descelularizadas.

- Matrices a base de colágeno

El colágeno es la familia de proteínas más abundante presente en la MEC de tejidos humanos, donde actúa formando redes altamente organizadas para proveer soporte biomecánico y estructura. Se han identificado más de 27 tipos de colágeno de diferentes funciones y estructuras, como el colágeno tipo I que genera ordenamientos fibrilares de gran rigidez o el colágeno tipo IV que forma redes que suelen ser más flexibles [A.42].

El colágeno tipo I es uno de los más utilizados por su abundancia, biocompatibilidad y bioactividad. Al ser una de las proteínas mayoritarias de la MEC, el colágeno favorece la adhesión celular y puede ser remodelado por las células, lo que favorece la integración de los implantes. Además los materiales a base de colágeno pueden diseñarse para que dirijan el destino celular de varias maneras, por ejemplo, cargándolos con factores de crecimiento. Según la aplicación que se deseé, las matrices de colágeno se sintetizan como láminas, esponjas, pastas inyectables o hidrogeles. El hecho de poder ser remodelado por las células puede resultar una desventaja ya que las matrices utilizadas *in vivo* pueden ser degradadas muy rápidamente por las metaloproteinasas de

matriz secretadas por las células. Esta limitación puede superarse mediante entrecruzado químico, tratamientos fotoquímicos o generando materiales compuestos de colágeno con polietilenglicol o hidroxiapatita.

Varios colágenos comerciales han sido aprobados para su uso clínico en regeneración de tejidos, como rellenos dérmicos y cubierta de úlceras [A.42].

■ Matrices de hidrogeles naturales

Los hidrogeles naturales pueden ser proteínas como el colágeno y la gelatina, también polisacáridos como el quitosano o glicosaminoglicanos y otros derivados de la MEC de tejidos animales.

Los polisacáridos naturales resultan biomateriales interesantes ya que además de tener propiedades biomecánicas y bioquímicas similares a las de algunos componentes de la MEC, presentan grupos reactivos que pueden ser utilizados para estrategias de entrecruzamiento o para conjugación con componentes bioactivos como péptidos que estimulen la adhesión o con factores de crecimiento. Dentro de los polisacáridos naturales más estudiados y utilizados se encuentran el quitosano, el ácido hialurónico, el condroitín sulfato y el heparán sulfato, cada uno con propiedades y aplicaciones diferentes. Por ejemplo el quitosano tiene propiedades antimicrobianas, tiene propiedades osteo-inductivas y puede combinarse con fosfato de calcio para generar matrices con mejores propiedades mecánicas. El ácido hialurónico es condro-inductivo, el condroitín sulfato es antiinflamatorio y el heparán sulfato puede regular la coagulación. Además, los 3 favorecen la angiogénesis) [A.42].

■ Matrices extracelulares descelularizadas

La descelularización implica la aplicación de diversos tratamientos químicos, mecánicos y biológicos con el fin de extraer los componentes celulares de los tejidos produciendo la menor cantidad posible de cambios en la composición y arquitectura de la MEC. Como las MECs de diferentes tejidos tienen propiedades diferentes, los tratamientos o procesos deben estar diseñados para cada tejido en particular. Así se ha logrado descelularizar tejido cardíaco, hepático, pancreático, renal, pulmonar y hasta placenta.

El objetivo de la descelularización es extraer los componentes antigenicos que podrían iniciar una respuesta inmune, intentando preservar las propiedades bioquímicas, biomecánicas y biofísicas de cada tejido en particular. Sin embargo esto no siempre es posible ya que mientras las proteínas estructurales grandes como el colágeno suelen conservarse muy bien, los componentes más solubles como glicosaminoglicanos, fibronectina o laminina se pierden en gran cantidad. La ventaja de las matrices descelularizadas es que los factores de crecimiento, citoquinas y otros mediadores biológicos presentes favorecen la adhesión, migración y regeneración celular. Además son biodegradables [A.42].

Matrices a base de fosfato de calcio

Los andamios o matrices a base de fosfato de calcio pueden ser clasificados en fosfatos de calcio cerámicos o cementos. Estos materiales son diseñados para imitar el componente natural mineral del hueso. El más común de los fosfatos de calcio cerámicos es la hidroxiapatita, que se produce por varios métodos que suelen tener como último paso una sinterización a alta temperatura. Por otro lado, los cementos suelen producirse combinando polvos conteniendo

cantidades equimolares de trifosfato de calcio y bicalcio fosfato con una solución acuosa de cemento para formar una pasta.

Tanto los cementos como los cerámicos son biocompatibles, bioactivos, promueven la adhesión celular y son osteo-inductivos. Propiedades como la rugosidad o carga de estos materiales pueden controlar el comportamiento celular. Además puede controlarse la velocidad de degradación, por lo que otorga un mecanismo para la entrega local y selectiva de drogas o factores de crecimiento. Una de las desventajas de los cerámicos es que se fabrican en bloques o granulos, por lo que puede ser difícil darles forma, mientras que los cementos pueden ser moldeados fácilmente. Por otro lado los cementos pueden desatar respuestas inflamatorias y pueden desintegrarse en contacto con fluidos biológicos [A.42].

Materiales a base de nanotubos de carbono y grafeno

Los nanotubos de carbono (NTCs) y los grafenos, debido a sus importantes propiedades eléctricas y mecánicas y la posibilidad de ser modificados con distintas moléculas mediante uniones covalentes y no covalentes, resultan candidatos interesantes para ser usados como substratos o aditivos en materiales destinados al cultivo celular o la ingeniería de tejidos. Los NTCs son cilindros nanométricos hechos de carbón, que pueden tener uno, dos o múltiples paredes concéntricas. Los grafenos son hojas monoatómicas de carbonos en configuración sp₂ con importantes propiedades mecánicas, alta conductividad térmica y electrónica, y gran estabilidad química. Uno de los principales desafíos que presentan estos materiales es la citotoxicidad y citocompatibilidad, que es un tema de amplio debate.

Debido a la elevada conductividad eléctrica de los NTCs y el grafeno, ambos se han utilizado para estudiar propiedades de las neuronas y aumentar sus respuestas electrofisiológicas. Además, generando híbridos con otros materiales promueven una diferenciación osteogénica de las células madre y se descubrió que pueden aumentar la adhesión y proliferación de osteoblastos y la deposición de fosfato de calcio. La implementación de NTCs y grafeno en otros tejidos o tipos de células como epiteliales, cardíacas o de cartílago también está siendo estudiada [A.42].

Se pueden fabricar matrices para el cultivo y regeneración celular a base de muchos otros tipos de materiales aparte de los descriptos, como los clásicos implantes metálicos [A.100], polímeros conductores, materiales nanofibrosos o magnéticos [A.42].

A.3.1. Técnica de ensamblado capa por capa

La **técnica de ensamblado capa por capa** (CpC) es una metodología simple, efectiva, flexible, relativamente económica y versátil que permite la modificación de superficies y la creación de ensamblados moleculares con estructuras altamente controladas [A.99]. Esta técnica no necesita equipamiento sofisticado, ni una estequeometría precisa, ni reacciones químicas complejas. El ensamblado se basa en la adsorción secuencial de moléculas multivalentes complementarias que mediante distintos tipos de interacciones actúan como bloques de construcción para la fabricación de multicapas. La técnica de CpC puede realizarse prácticamente sobre cualquier superficie por simple inmersión en las soluciones de los bloques de construcción, por rotación en un disco rotatorio o utilizando un atomizador [A.101].

El ensamblado puede realizarse sobre superficies 2D o sobre moldes más complejos como matrices 3D, partículas esféricas, fibras, tubos o incluso sobre virus o células animales (Figura A.12a). Esto permite generar diversas estructuras como simples multicapas 2D, estructuras con gradientes en sus propiedades fisicoquímicas, membranas autónomas, superficies con

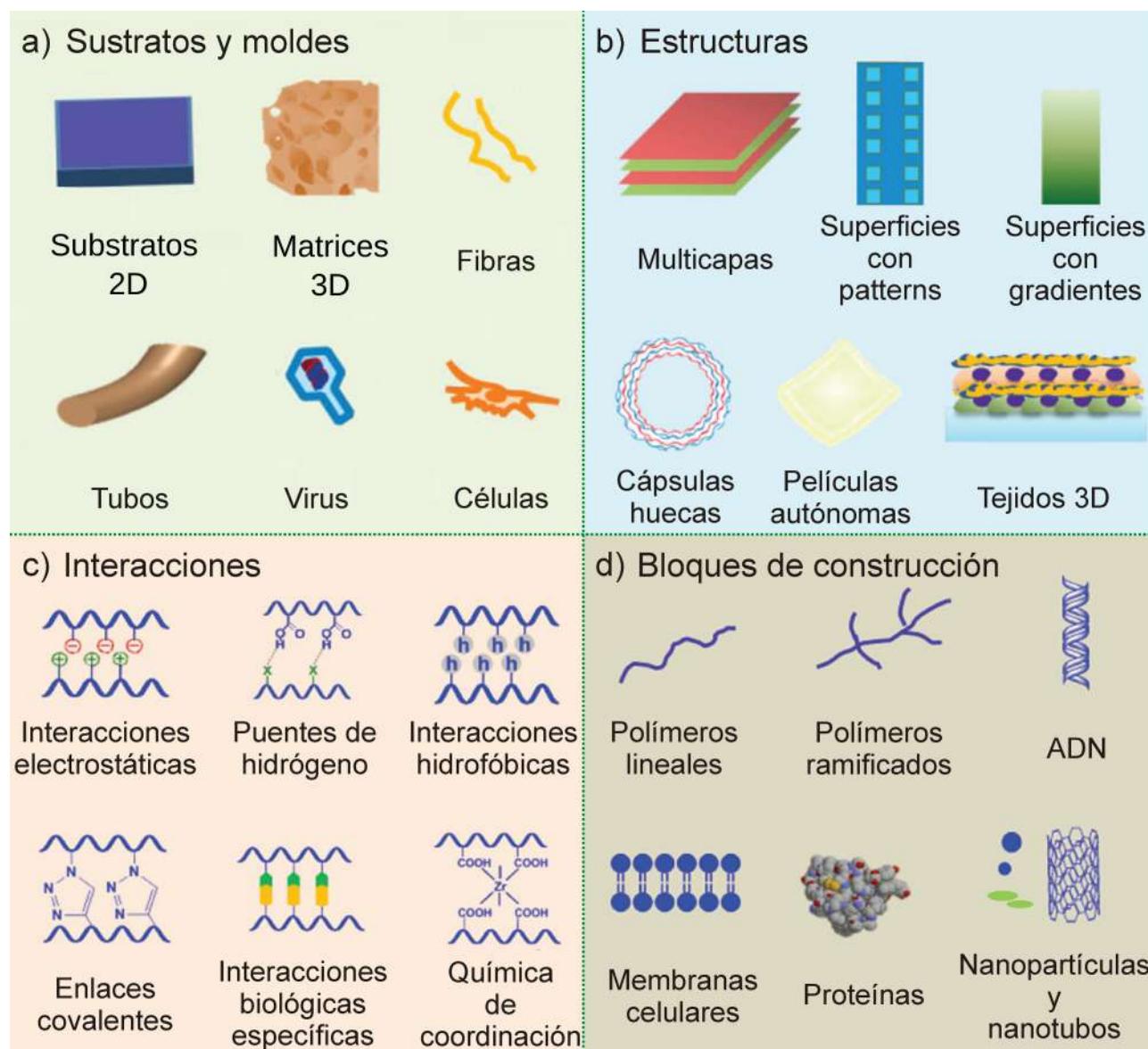


Figura A.12: Esquema que muestra la versatilidad de la técnica de capa por capa, adaptado de [A.99]. a) Substratos para el ensamblado. b) Estructuras que pueden generarse. c) Posibles interacciones intermoleculares entre los bloques de construcción (d).

“patterns”, cápsulas vacías y hasta tejidos 3D (Figura A.12b). Las interacciones electrostáticas entre policationes y polianiones suelen ser las más utilizadas, dando lugar a **multicapas de polielectrolitos** (MPEs). Sin embargo, el ensamblado de multicapas puede depender de otros tipos de interacciones intermoleculares, como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, uniones covalentes o interacciones biológicas específicas (Figura A.12c) [A.102]. Ya que el ensamblado no depende exclusivamente de las interacciones electrostáticas, las multicapas pueden generarse utilizando diversos bloques de construcción. Polímeros lineales o ramificados, moléculas de ADN, nanopartículas, proteínas, antibióticos, membranas celulares o nanotubos de carbono pueden utilizarse para diseñar y fabricar una enorme variedad de estructuras distintas (Figura A.12d) [A.99].

La gran versatilidad de la técnica de CpC se debe a que permite el control preciso en la nano/micro escala de las propiedades de las películas ajustando los parámetros del ensamblado como: naturaleza de los bloques de construcción, su peso molecular y número de

grupos funcionales; tiempo de adsorción y lavado; pH, fuerza iónica y polaridad del medio; temperatura a que se realiza el ensamblado; secado, agitación o hasta la velocidad de inmersión. Las características de la película obtenida también dependen de las propiedades de la superficie sobre la que se ensambla, como la rugosidad o la densidad de carga. Finalmente, las propiedades de las mult capas pueden ajustarse luego del ensamblado, por ejemplo, a través de entrecruzamientos químicos, físicos o iónicos [A.99]. Todas estas características vuelven a la técnica de CpC en general y a las mult capas de polielectrolitos en particular muy atractivas para el diseño y desarrollo de biomateriales con aplicaciones biomédicas.

Bibliografía

- [A.1] B. Ray & A. K. Bhunia. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, New York, 2013. (Citado en páginas 23 y 24.)
- [A.2] H. Gest. “The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society”. *Notes and Records of the Royal Society*, 2004. **58**(2). (Citado en página 23.)
- [A.3] R. Koch. “Methods for the study of pathogenic organisms”. *Mitthdungen uus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 1881. **1**, 1–48. (Citado en página 23.)
- [A.4] R. J. Petri. “Eine kleine Modification des Koch’schen Plattenverfahrens”. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1887. **1**, 279–280. (Citado en página 23.)
- [A.5] E. Cambau & M. Drancourt. “Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882”. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(3), 196–201. (Citado en página 23.)
- [A.6] B. D. Ratner. *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. Academic Press, 2013. (Citado en página 23.)
- [A.7] N. Huebsch & D. J. Mooney. “Inspiration and application in the evolution of biomaterials”. *Nature*, 2009. **462**(7272), 426–432. (Citado en páginas 24 y 44.)
- [A.8] C. O. Rodríguez Hernández, S. E. Torres García, C. Olvera Sandoval, F. Y. Ramírez Castillo, A. Loera Muro, F. J. Avelar Gonzalez & A. L. Guerrero Barrera. “Cell Culture: History, Development and Prospects”. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2015. **3**(1), 252–263. (Citado en página 24.)
- [A.9] S. P. Langdon. *Cancer cell culture : methods and protocols*. Humana Press, 2004. (Citado en páginas 24 y 25.)
- [A.10] H. Kurz, K. Sandau & B. Christ. “On the bifurcation of blood vessels — Wilhelm Roux’s Doctoral Thesis (Jena 1878) — A seminal work for biophysical modelling in developmental biology”. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 1997. **179**(1), 33–36. (Citado en páginas 24 y 28.)
- [A.11] P. R. White. “Cultivation of animal tissues in vitro in nutrients of precisely known constitution.” *Growth*, 1946. **10**(3), 231–89. (Citado en página 24.)
- [A.12] W. R. Earle, E. L. Schilling, T. H. Stark, N. P. Straus, M. F. Brown & E. Shelton. “Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells”. *Journal of the National Cancer Institute*, 1943. **4**(2), 165–212. (Citado en página 24.)

- [A.13] H. W. Jones. “Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: History of the beginning of the HeLa cell line”. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1997. **176**(6), s227–s228. (Citado en página 24.)
- [A.14] W. F. Scherer, J. T. Syverton & G. O. Gey. “Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses”. *Journal of Experimental Medicine*, 1953. **97**(5), 695–710. (Citado en página 24.)
- [A.15] T. Turner. “Development of the polio vaccine: a historical perspective of Tuskegee University’s role in mass production and distribution of HeLa cells.” *Journal of health care for the poor and underserved*, 2012. **23**(4), 5–10. (Citado en página 24.)
- [A.16] R. Skloot. *The immortal life of Henrietta Lacks*. Crown Publishing Group, 2011. (Citado en página 24.)
- [A.17] C. C. Quianzon & I. Cheikh. “History of insulin.” *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 2012. **2**(2). (Citado en página 24.)
- [A.18] D. Ribatti. “From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal”. *Immunology Letters*, 2014. **161**(1), 96–99. (Citado en página 24.)
- [A.19] J. K. Liu. “The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations”. *Annals of Medicine and Surgery*, 2014. **3**(4), 113–116. (Citado en página 24.)
- [A.20] V. Barras & G. Greub. “History of biological warfare and bioterrorism”. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(6), 497–502. (Citado en página 24.)
- [A.21] A. King. “Culture: Art that touches a nerve”. *Nature*, 2011. **470**, 334. (Citado en página 24.)
- [A.22] F. Stracey. “Bio-art: the ethics behind the aesthetics”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. **10**(7), 496–500. (Citado en página 24.)
- [A.23] G. Vunjak-Novakovic & R. I. Freshney. *Culture of cells for tissue engineering*. Wiley-Liss, 2006. (Citado en páginas 25 y 27.)
- [A.24] G. Stacey. *Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2006. (Citado en páginas 25 y 26.)
- [A.25] C. B. J. Woodman, S. I. Collins & L. S. Young. “The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues”. *Nature Reviews Cancer*, 2007. **7**(1), 11–22. (Citado en página 25.)
- [A.26] J. A. Thomson, J. Itzkovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall & J. M. Jones. “Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts”. *Science*, 1998. **282**(5391), 1145–1147. (Citado en página 25.)
- [A.27] M. V. Risbud & M. Sittiger. “Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation.” *Trends in biotechnology*, 2002. **20**(8), 351–6. (Citado en página 26.)

- [A.28] C. Zhao, A. Tan, G. Pastorin & H. K. Ho. “Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering”. *Biotechnology Advances*, 2013. **31**(5), 654–668. (Citado en página 26.)
- [A.29] G. Kaur & J. M. Dufour. “Cell lines: Valuable tools or useless artifacts.” *Spermatogenesis*, 2012. **2**(1), 1–5. (Citado en página 26.)
- [A.30] C. D. Meiklejohn & Y. Tao. “Genetic conflict and sex chromosome evolution”. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010. **25**(4), 215–223. (Citado en página 26.)
- [A.31] H. W. Schroeder & L. Cavacini. “Structure and function of immunoglobulins.” *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010. **125**(2 Suppl 2), S41–52. (Citado en página 26.)
- [A.32] J. Klose. “Genotypes and Phenotypes”. *Electrophoresis*, 1999. **20**, 643–652. (Citado en página 26.)
- [A.33] T. M. Baye, T. Abebe & R. A. Wilke. “Genotype-environment interactions and their translational implications.” *Personalized medicine*, 2011. **8**(1), 59–70. (Citado en página 26.)
- [A.34] E. Schrodinger. *What is life?* Cambridge University Press, 1944. (Citado en página 28.)
- [A.35] A. A. Kluyver & H. J. L. Donker. “Die einheit in der biochemie”. *Chem. Zelle Geweke*, 1926. **13**, 134–190. (Citado en página 28.)
- [A.36] H. C. Friedmann. “From *Butyribacterium* to *E. coli* : An Essay on Unity in Biochemistry”. *Perspectives in Biology and Medicine*, 2004. **47**(1), 47–66. (Citado en página 28.)
- [A.37] M. Akhtaruzzaman & A. A. Shafie. “Geometrical Substantiation of Phi, the Golden Ratio and the Baroque of Nature, Architecture, Design and Engineering”. *International Journal of Arts*, 2011. **1**(1), 1–22. (Citado en página 28.)
- [A.38] R. Glaser. *Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012. (Citado en página 28.)
- [A.39] U. Lucia. “Transport processes and irreversible thermodynamics analysis in tumoral systems”. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2014. **410**, 380–390. (Citado en página 29.)
- [A.40] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova & M. Thompson. “Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface”. *Nature Materials*, 2009. **8**(7), 543–557. (Citado en página 29.)
- [A.41] Z. Gu, S. Li, F. Zhang & S. Wang. “Understanding Surface Adhesion in Nature: A Peeling Model”. *Advanced Science*, 2016. **3**(7), 1500327. (Citado en página 29.)
- [A.42] Q. Wang, editor. *Smart Materials for Tissue Engineering*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016. (Citado en páginas 29, 30, 31, 32, 33, 45, 46, 47, 48 y 224.)

- [A.43] A. Byron & M. C. Frame. “Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts”. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016. **39**, 93–100. (Citado en página 29.)
- [A.44] W. Zhao, X. Li, X. Liu, N. Zhang & X. Wen. “Effects of substrate stiffness on adipogenic and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells”. *Materials Science and Engineering: C*, 2014. **40**, 316–323. (Citado en página 29.)
- [A.45] K. Tan, D. Goldstein, P. Crowe & J. L. Yang. “Uncovering a key to the process of metastasis in human cancers: a review of critical regulators of anoikis”. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2013. **139**(11), 1795–1805. (Citado en página 31.)
- [A.46] A. Byron, J. D. Humphries & M. J. Humphries. “Defining the extracellular matrix using proteomics”. *International Journal of Experimental Pathology*, 2013. **94**(2), 75–92. (Citado en página 31.)
- [A.47] A. J. Zollinger & M. L. Smith. “Fibronectin, the extracellular glue”. *Matrix Biology*, 2017. **60-61**, 27–37. (Citado en página 31.)
- [A.48] C. J. Arias, R. L. Surmaitis & J. B. Schlenoff. “Cell Adhesion and Proliferation on the “Living” Surface of a Polyelectrolyte Multilayer”. *Langmuir*, 2016. **32**(21), 5412–5421. (Citado en páginas 31, 33, 233 y 256.)
- [A.49] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Rumel & V. Svorcik. “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants”. *Biotechnology Advances*, 2011. **29**(6), 739–767. (Citado en páginas 32, 181 y 256.)
- [A.50] M. R. Alexander & P. Williams. “Water contact angle is not a good predictor of biological responses to materials”. *Biointerphases*, 2017. **12**(2), 02C201. (Citado en páginas 32 y 232.)
- [A.51] H. Jeon, C. G. Simon & G. Kim. “A mini-review: Cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014. **102**(7), 1580–1594. (Citado en página 32.)
- [A.52] E. I. Liang, E. J. Mah, A. F. Yee, M. A. Digman, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak & A. Cardona. “Correlation of focal adhesion assembly and disassembly with cell migration on nanotopography”. *Integrative Biology*, 2017. **9**(2), 145–155. (Citado en página 32.)
- [A.53] E. Ngandu Mpoyi, M. Cantini, P. M. Reynolds, N. Gadegaard, M. J. Dalby & M. Salmerón-Sánchez. “Protein Adsorption as a Key Mediator in the Nanotopographical Control of Cell Behavior”. *ACS Nano*, 2016. **10**(7), 6638–6647. (Citado en página 32.)
- [A.54] D. E. Discher, D. J. Mooney & P. W. Zandstra. “Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells”. *Science*, 2009. **324**(5935), 1673–1677. (Citado en página 33.)

- [A.55] D. E. Discher, P. Janmey & Y. L. Wang. “Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate.” *Science*, 2005. **310**(5751), 1139–43. (Citado en página 33.)
- [A.56] R. K. Das & O. F. Zouani. “A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment”. *Biomaterials*, 2014. **35**(20), 5278–5293. (Citado en página 33.)
- [A.57] P. Friedl & D. Gilmour. “Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2009. **10**(7), 445–57. (Citado en páginas 33 y 151.)
- [A.58] C. Xinaris, M. Morigi, V. Benedetti, B. Imberti, A. S. Fabricio, E. Squarcina, A. Benigni, E. Gagliardini & G. Remuzzi. “A Novel Strategy to Enhance Mesenchymal Stem Cell Migration Capacity and Promote Tissue Repair in an Injury Specific Fashion”. *Cell Transplantation*, 2013. **22**(3), 423–436. (Citado en página 33.)
- [A.59] A. Wells, J. Grahovac, S. Wheeler, B. Ma & D. Lauffenburger. “Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis”. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2013. **34**(5), 283–289. (Citado en página 33.)
- [A.60] A. R. Horwitz & J. T. Parsons. “Cell Migration—Movin’ On”. *Science*, 1999. **286**(5442), 1102–1103. (Citado en página 34.)
- [A.61] T. Lämmermann & M. Sixt. “Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration”. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009. **21**(5), 636–644. (Citado en página 34.)
- [A.62] P. Pandya, J. L. Orgaz & V. Sanz-Moreno. “Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you”. *Current Opinion in Cell Biology*, 2017. **48**, 87–96. (Citado en página 34.)
- [A.63] V. Hakim & P. Silberzan. “Collective cell migration: a physics perspective”. *Reports on Progress in Physics*, 2017. **80**(7), 076601. (Citado en página 34.)
- [A.64] L. J. Schumacher, P. M. Kulesa, R. McLennan, R. E. Baker & P. K. Maini. “Multidisciplinary approaches to understanding collective cell migration in developmental biology.” *Open biology*, 2016. **6**(6), 160056. (Citado en página 35.)
- [A.65] G. Charras & E. Sahai. “Physical influences of the extracellular environment on cell migration”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. **15**(12), 813–824. (Citado en página 35.)
- [A.66] P. Friedl & K. Wolf. “Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model”. *The Journal of Cell Biology*, 2010. **188**(1), 11–19. (Citado en página 35.)
- [A.67] H. Jeon, S. Koo, W. M. Reese, P. Loskill, C. P. Grigoropoulos & K. E. Healy. “Directing cell migration and organization via nanocrater-patterned cell-repellent interfaces.” *Nature Materials*, 2015. **14**(9), 918–23. (Citado en página 35.)
- [A.68] Q. Y. Tang, W. X. Qian, Y. H. Xu, S. Gopalakrishnan, J. Q. Wang, Y. W. Lam & S. W. Pang. “Control of cell migration direction by inducing cell shape asymmetry with patterned topography”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015. **103**(7), 2383–2393. (Citado en página 35.)

- [A.69] M. A. Seeger & A. S. Paller. “The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration”. *Advances in Wound Care*, 2015. **4**(4), 213–224. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [A.70] A. Haeger, K. Wolf, M. M. Zegers & P. Friedl. “Collective cell migration: guidance principles and hierarchies”. *Trends in Cell Biology*, 2015. **25**(9), 556–566. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [A.71] B. Szabó, G. J. Szöllösi, B. Gönci, Z. Jurányi, D. Selmeczi & T. Vicsek. “Phase transition in the collective migration of tissue cells: Experiment and model”. *Physical Review E*, 2006. **74**(6), 061908. (Citado en página 36.)
- [A.72] L. Li, B. H. Wang, S. Wang, L. Moalim-Nour, K. Mohib, D. Lohnes & L. Wang. “Individual cell movement, asymmetric colony expansion, rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells.” *Biophysical Journal*, 2010. **98**(11), 2442–51. (Citado en páginas 36 y 85.)
- [A.73] T. E. Angelini, E. Hannezo, X. Trepat, M. Marquez, J. J. Fredberg & D. A. Weitz. “Glass-like dynamics of collective cell migration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(12), 4714–9. (Citado en página 36.)
- [A.74] N. Kramer, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschläger & H. Dolznig. “In vitro cell migration and invasion assays”. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2013. **752**(1), 10–24. (Citado en página 36.)
- [A.75] I. Y. Wong, S. Javaid, E. A. Wong, S. Perk, D. A. Haber, M. Toner & D. Irimia. “Collective and individual migration following the epithelial–mesenchymal transition”. *Nature Materials*, 2014. **13**(11), 1063–1071. (Citado en página 36.)
- [A.76] U. Dürer, R. Hartig, S. Bang, L. Thim & W. Hoffmann. “TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin”. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2007. **20**(5), 329–346. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [A.77] P.-H. Wu, A. Giri, S. X. Sun & D. Wirtz. “Three-dimensional cell migration does not follow a random walk”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(11), 3949–3954. (Citado en página 36.)
- [A.78] F. Ascione, S. Caserta & S. Guido. “The wound healing assay revisited: A transport phenomena approach”. *Chemical Engineering Science*, 2017. **160**, 200–209. (Citado en página 37.)
- [A.79] M. A. C. Huergo, M. A. Pasquale, A. E. Bolzán, A. J. Arvia & P. H. González. “Morphology and dynamic scaling analysis of cell colonies with linear growth fronts”. *Physical Review E*, 2010. **82**(3), 031903. (Citado en páginas 37 y 43.)
- [A.80] M. Radzuweit, M. Block, J. G. Hengstler, E. Schöll & D. Drasdo. “Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions”. *Physical Review E*, 2009. **79**(5), 051907. (Citado en páginas 37, 109, 110, 143, 158, 159, 160, 170, 172, 173 y 176.)
- [A.81] A. L. Barabasi & H. E. Stanley. *Fractal concepts in surface growth*. Cambridge University Press, 1995. (Citado en páginas 37, 41, 42, 43, 113, 122, 146, 173, 174, 267, 268 y 269.)

- [A.82] M. A. C. Huergo. *Estudio de la fenomenología del crecimiento de células transformadas mediante el empleo de técnicas de escalado dinámico y la aplicación de modelos teóricos*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Médicas, 2011. (Citado en páginas 37, 41 y 42.)
- [A.83] M. Kardar, G. Parisi & Y.-C. Zhang. “Dynamic Scaling of Growing Interfaces”. *Physical Review Letters*, 1986. **56**(9), 889–892. (Citado en páginas 42, 113 y 145.)
- [A.84] M. A. C. Huergo, M. A. Pasquale, P. H. González, A. E. Bolzán & A. J. Arvia. “Growth dynamics of cancer cell colonies and their comparison with noncancerous cells”. *Physical Review E*, 2012. **85**(1), 011918. (Citado en páginas 43, 93 y 113.)
- [A.85] K. A. Takeuchi & M. Sano. “Universal Fluctuations of Growing Interfaces: Evidence in Turbulent Liquid Crystals”. *Physical Review Letters*, 2010. **104**(23), 230601. (Citado en páginas 43, 114 y 267.)
- [A.86] K. A. Takeuchi. “An appetizer to modern developments on the Kardar-Parisi-Zhang universality class”. *arXiv[cond-mat.stat-mech]*, 2017. (Citado en página 43.)
- [A.87] R. Cuerno, C. Escudero, J. M. García-Ruiz & M. A. Herrero. “Pattern formation in stromatolites: insights from mathematical modelling”. *Journal of The Royal Society Interface*, 2012. **9**(70), 1051–1062. (Citado en página 44.)
- [A.88] P. L. Schilardi, O. Azzaroni, R. C. Salvarezza & A. J. Arvia. “Validity of the kardar-parisi-zhang equation in the asymptotic limit of metal electrodeposition”. *Physical Review B*, 1999. **59**, 4638–4641. (Citado en página 44.)
- [A.89] J. A. Bonachela, C. D. Nadell, J. B. Xavier & S. A. Levin. “Universality in Bacterial Colonies”. *Journal of Statistical Physics*, 2011. **144**(2), 303–315. (Citado en páginas 44 y 151.)
- [A.90] M. A. Huergo, N. E. Muzzio, M. A. Pasquale, P. H. González, A. E. Bolzán & A. J. Arvia. “Dynamic scaling analysis of two-dimensional cell colony fronts in a gel medium: A biological system approaching a quenched Kardar-Parisi-Zhang universality”. *Physical Review E*, 2014. **90**(2), 022706. (Citado en página 44.)
- [A.91] E. P. Ivanova, K. Bazaka & R. J. Crawford. *New functional biomaterials for medicine and healthcare*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2013. (Citado en página 44.)
- [A.92] G. Pados, A. Makedos & B. Tarlitzis. *Endoscopy*. InTech, 2013. (Citado en páginas 44 y 239.)
- [A.93] B. Harley & H. H. Lu. “Special issue on Gradients in Biomaterials”. *Acta Biomaterialia*, 2017. **56**, 1–2. (Citado en página 44.)
- [A.94] A. D. Theocaris, S. S. Skandalis, C. Gialeli & N. K. Karamanos. “Extracellular matrix structure”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016. **97**, 4–27. (Citado en página 44.)
- [A.95] C. Bonnans, J. Chou & Z. Werb. “Remodelling the extracellular matrix in development and disease”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. **15**(12), 786–801. (Citado en página 44.)

- [A.96] M. W. Pickup, J. K. Mouw & V. M. Weaver. “The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer”. *EMBO reports*, 2014. **15**(12), 1243–1253. (Citado en página 44.)
- [A.97] A. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis & H. S. Azevedo. “Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanobiomaterials”. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013. **5**(6), 582–612. (Citado en página 45.)
- [A.98] M. J. Webber, E. A. Appel, E. W. Meijer & R. Langer. “Supramolecular biomaterials”. *Nature Materials*, 2015. **15**(1), 13–26. (Citado en página 45.)
- [A.99] J. M. Silva, R. L. Reis & J. F. Mano. “Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers”. *Small*, 2016. **12**(32), 4308–4342. (Citado en páginas 46, 48, 49 y 50.)
- [A.100] K. Prasad, O. Bazaka, M. Chua, M. Rochford, L. Fedrick, J. Spoor, R. Symes, M. Tieppo, C. Collins, A. Cao, D. Markwell, K. K. Ostrikov & K. Bazaka. “Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities”. *Materials*, 2017. **10**(8), 884. (Citado en página 48.)
- [A.101] N. Y. Abu-Thabit & A. S. Hamdy. “Stimuli-responsive Polyelectrolyte Multilayers for fabrication of self-healing coatings – A review”. *Surface and Coatings Technology*, 2015. **303**, 406–424. (Citado en página 48.)
- [A.102] J. Borges & J. F. Mano. “Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers.” *Chemical Reviews*, 2014. **114**(18), 8883–8942. (Citado en página 49.)

Materiales y métodos

B.1. Cultivo celular

En este apartado se describirán brevemente las líneas celulares empleadas, los medios y condiciones de cultivo, los métodos utilizados para obtener colonias de distintas geometrías, los ensayos de proliferación celular y las tinciones.

B.1.1. Líneas celulares utilizadas

HeLa

Las células HeLa provienen de un adenocarcinoma de cervix de *homo sapiens*. Son células adherentes de morfología epitelial, relativamente sencillas de cultivar en medios convencionales. Fue la primer línea celular humana establecida y son las más populares [B.1]. Al poseer el ADN del papillomavirus humano entra en la nivel de bioseguridad 2.

A549

Las células A549 provienen de un carcinoma de pulmón humano. Son células epiteliales adherentes. Entran en el nivel de bioseguridad 1.

C2C12

Las células C2C12 provienen de tejido muscular de ratón sano (*Mus musculus*). Son mioblastos adherentes con la capacidad de diferenciarse a miocitos. Entran en la clasificación de bioseguridad 1.

BHK

Las células BHK son fibroblastos adherentes provenientes de riñón de hamster sano (*Mesocricetus auratus*). Entran en la categoría de bioseguridad 1.

Vero

Las células Vero provienen del riñón de un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) sano. Son células adherentes de morfología epitelial. Entran en la clasificación de bioseguridad 1.

MC3T3

Las células MC3T3 provienen de hueso de ratón (*Mus musculus*). Son preosteoblastos adherentes de morfología fibroblástica que tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos. Para los experimentos se utilizó la sublínea MC3T3-E1. Son de nivel de seguridad 1.

B.1.2. Medios y condiciones de cultivo

El trabajo con cultivos celulares implica poder controlar qué células crecen en los experimentos y qué células no. Por este motivo es necesario contar con técnicas de trabajo asépticas, con material (pipetas, “tips”, tubos, frascos, medios de cultivo, etc) estéril y con ciertos elementos que preserven las muestras de la contaminación. La manipulación de las células siempre se hace dentro de una cabina de flujo laminar. Esta cabina emplea motores para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA de modo de proporcionar aire limpio en la zona de trabajo. Las estufas donde se incuban las células, además de generar las condiciones de temperatura y atmósfera adecuadas para el crecimiento, también utilizan estos filtros HEPA para evitar la contaminación de las muestras que contienen. Todo el equipamiento del laboratorio de cultivo celular se limpia y desinfecta periódicamente.

Las células se conservaron en un termo de N₂ líquido a -196 °C en criotubos conteniendo medio de cultivo con 10 % de glicerina o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma 4723301) estéril. Se descongelaron en baño de agua a 37 °C y se colocaron en botellas de 25 cm² (Greiner) con medio de cultivo suplementado. Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB, marca Gibco o, eventualmente, Natocor), 2 g L⁻¹ de bicarbonato y 1 % de antibióticos (Antibiótico-Antimicótico, Gibco), a excepción de las células MC3T3-E1 que se cultivaron en α-Minimum Essential Medium (α-MEM, Gibco) suplementado. Las células se incubaron en estufa de cultivo en condiciones estándar: 37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂ y 97 % de humedad. Con el fin de mantener las condiciones de cultivo constante, la mitad del medio de cultivo de las botellas o cápsulas fue reemplazado por medio de cultivo nuevo cada 2 días.

Cuando los cultivos alcanzaron el 70-80 % de confluencia se repicaron. Este proceso consiste en levantar las células de la monocapa y transferir un 15-20 % de las células a una nueva botella, de manera de tener siempre el cultivo en fase exponencial. Las células se separaron de la superficie utilizando tripsina, una enzima proteolítica capaz de degradar las proteínas que unen a las células con el substrato y entre sí. Para que las proteínas del SFB no interfieran con la digestión enzimática, se retira el medio de cultivo de la botella y las células se lavan 2 veces con buffer PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM), una solución de pH y fuerza iónica fisiológicos. Las células se mantuvieron 10-15 repiques o pasajes luego de ser descongeladas, para evitar las modificaciones genéticas que pudieran afectar los resultados. Luego se descongeló un nuevo vial. La viabilidad celular fue evaluada rutinariamente utilizando el método de exclusión de azul tripán.

B.1.3. Obtención de colonias

La migración celular y la expansión de los frentes de crecimiento de las colonias se estudió en geometrías quasi-circulares y quasi-lineales.

Obtención de colonias circulares

Las colonias con geometría quasi circular (CQR) se obtuvieron sembrando 1000-2000 células en una cápsula de Petri de 30 mm de diámetro (Figura B.1a-c). Se dejó a las células adherir y crecer durante 4-5 días, formando colonias con distintos números de células.

También se obtuvieron colonias con geometría quasi circular, pero con mayor número de células dejando crecer las CQRs hasta que se formó un núcleo 3D de 250-300 μm de radio. Luego, el cúmulo de células se removió cuidadosamente con una micropipeta y se lo transfirió a otra cápsula de petri con medio de cultivo nuevo (Figura B.1d-e). De este modo, a partir

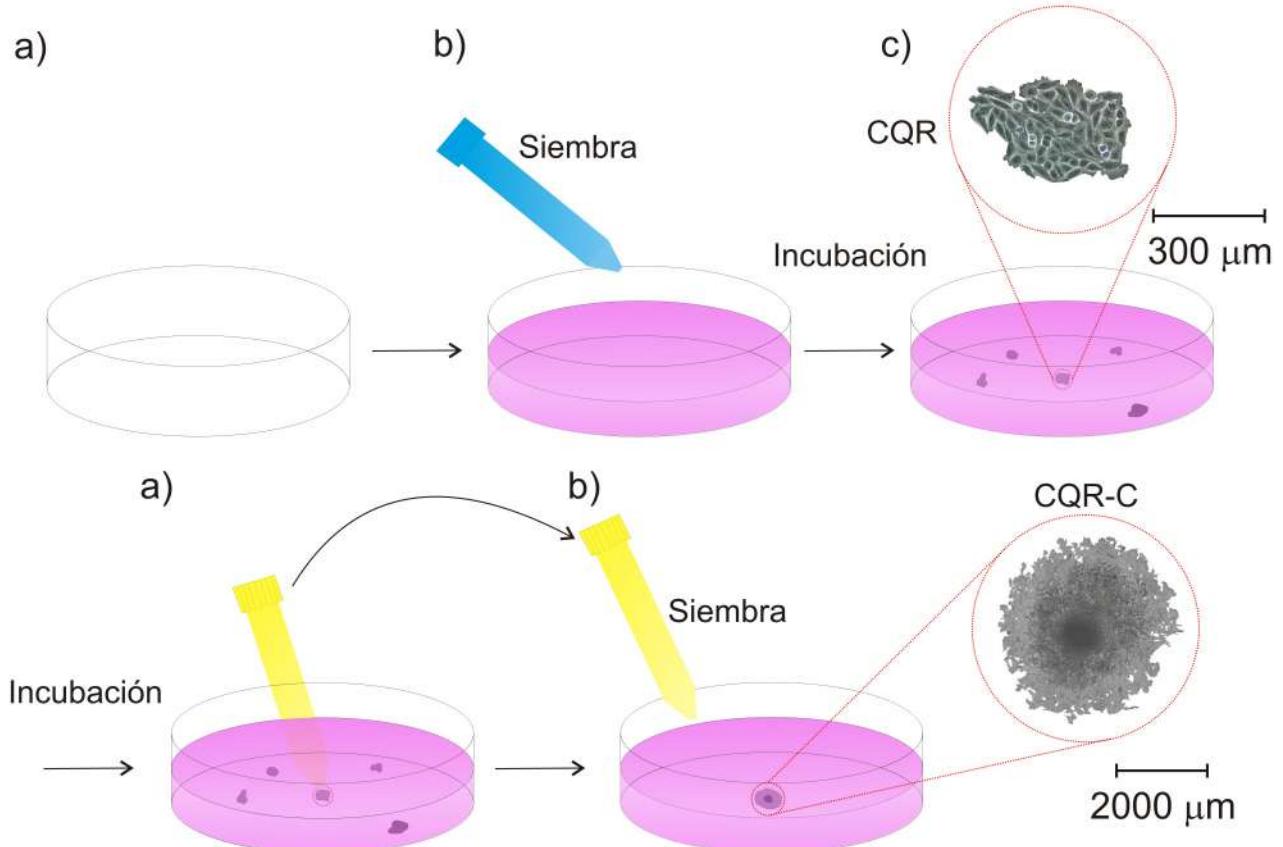


Figura B.1: Esquema de la obtención de colonias quasi-circulares con bajo (CQRs) y elevado número de células (CQR-Cs). Se realiza una siembra diluida en una cápsula de petri (a, b), y se deja incubar 4-5 días hasta la obtención de pequeñas colonias (c). Estas colonias pueden incubarse más tiempo hasta que se forme un núcleo 3D en su interior (d) que puede ser transferido a una nueva cápsula de petri para obtener las CQR-Cs (e). Las regiones aumentadas en (c) y (e) muestran una CQR y CQR-C respectivamente.

de la resiembra de cúmulos se obtuvieron colonias quasi circulares con un elevado número de células (CQR-Cs), $N > 1000$ células.

Obtención de colonias lineales

Para la preparación de colonias con frente lineal de crecimiento (CQL) se realizó una siembra de células en una cápsula de Petri enmascarada con cinta de Teflon® (Figura B.2). El procedimiento de enmascaramiento consistió en colocar en la región central de la cápsula y de forma paralela dos cintas de Teflon de 1,1 cm de ancho y 100 μm de espesor separadas 4-5 mm. Luego del enmascaramiento, la cápsula y las cintas se esterilizaron en UV durante 1 hora y posteriormente se sembraron 120000-150000 células. El Teflon es inerte y no afecta al comportamiento de las células. Constituye una barrera física que impide que las células se adhieran al fondo de la cápsula de Petri, de manera que las cintas así colocadas delimitan una región más o menos rectangular donde las células se pueden adherir y crecer. Una vez alcanzada la confluencia del cultivo en la región libre, se retiró la máscara de Teflon para obtener dos frentes con geometría lineal que avanzan en sentidos opuestos.

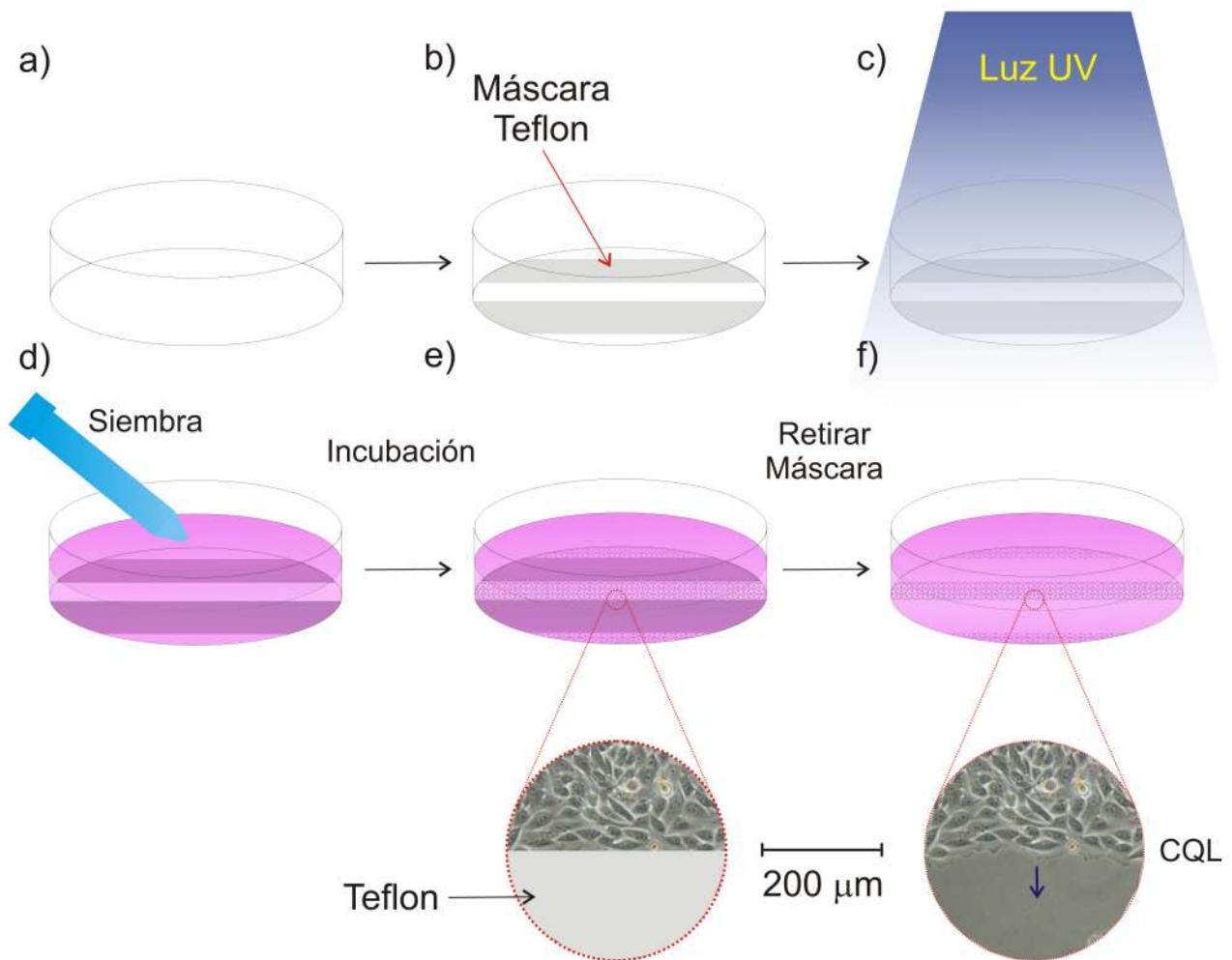


Figura B.2: Esquema de la obtención de colonias con geometría quasi-lineal (CQLs). Sobre la cápsula de petri (a) se colocan dos cintas de Teflon en forma paralela (b). Luego la cápsula y cintas se esterilizan por luz UV (c) y se realiza una siembra concentrada de células (d). A continuación se incuban las células hasta que estén confluentes (e) y se retiran las cintas de Teflon con una pinza estéril (f). Las regiones aumentadas muestran el cultivo confluente antes y después de retirada la cinta el Teflon.

B.1.4. Observación de las colonias, seguimiento de su crecimiento y propagación

Seguimiento ex situ de las colonias

El seguimiento del crecimiento de las colonias se realizó tomando fotografías usando una cámara Nikon DS-Fi acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases Nikon TS100, con un objetivo de 10x ADL de campo plano CFI. La resolución de las imágenes fue de $1 \mu\text{m} = 2,1$ píxeles. Debido a que el campo del objetivo del microscopio es más pequeño que el tamaño de las colonias, se debieron tomar varias fotografías que luego fueron compaginadas para obtener la imagen completa de la colonia. El número de fotos necesarias para obtener una imagen completa de las colonias de frente lineal osciló entre 10 y 50, y para las colonias circulares entre 1 y 30.

Las CQRs comienzan a seguirse a un $t = t_0$, momento en que alcanzan el número de células deseado. Por otro lado, el momento en que se resiembra el cúmulo en el caso de las CQR-Cs o que se retira la máscara de Teflon en el caso de las CQLs constituye t_0 . En estos tipos de colonia el seguimiento comienza 20-24 horas después de t_0 para evitar la influencia del confinamiento. Cada colonia fue seguida en el tiempo hasta que entró en contacto con otra colonia vecina, hecho que ocurría luego de 3 a 15 días, dependiendo del experimento. Se tomaron imágenes en intervalos de 4 – 24 horas durante 2 – 15 días, dependiendo del experimento y de la velocidad de crecimiento de los frentes.

Seguimiento in situ de las colonias

Como se explicó previamente, el seguimiento de las colonias se realizó tomando imágenes en la escala de las horas. El estudio de la movilidad celular, en cambio, requiere tomar imágenes en la escala de los minutos, haciendo poco práctico sacar el cultivo de la estufa con tanta frecuencia e intentar ubicar la misma posición de la cápsula para fotografiar. Para poder estudiar la movilidad celular fue necesario diseñar un sistema de seguimiento in situ, en el que las células puedan crecer en las condiciones de temperatura y atmósfera adecuadas, es decir, 37°C de temperatura, pH 7,4 y condiciones ascépticas, y que a la vez automatice la adquisición de imágenes.

El sistema consiste en una cabina térmica, un sistema de observación y adquisición de imágenes (Figura B.3) y un sistema de gasificación para el control del pH del medio de cultivo.

Cabina térmica y adquisición de imágenes: para lograr un buen control de la temperatura se debe lograr una buena aislación térmica del sistema con el entorno. Con este fin, el microscopio se colocó dentro de una caja de acrílico, un material relativamente sencillo de limpiar (necesario para tener un ambiente ascético), que a su vez fue colocada dentro de una cabina de Polifan® lo suficientemente grande para dejar una cámara de aire entre la caja y la cabina. Sobre el microscopio se colocó una plancha de aluminio que hace de base para una resistencia y que ayuda a distribuir el calor que esta genera a través de un sistema de ventiladores y tabiques para evitar movimientos bruscos de la atmósfera gaseosa. La resistencia es controlada por un termostato electrónico Novus N321 que fue seteado a 37°C y tiene una sensibilidad de 0.1°C . El sensor del termostato, un termistor NTC, fue colocado sobre la platina del microscopio, cerca del lugar donde se ubican las muestras.

Las imágenes son obtenidas a partir de una cámara solidaria al microscopio que está conectada vía un cable USB a una unidad controladora que se conecta a una computadora. Por medio de un programa realizado en el laboratorio se controla el software provisto por Nikon para que realice las tomas de las fotos en los intervalo de tiempo Δt deseados, usualmente

en el rango $5 \leq \Delta t \leq 45$ min. Un temporizador (Digital Twin Timer, SESTOS) se utilizó para controlar la alimentación del microscopio, con el fin de que la lámpara del mismo esté sólo encendida al momento de tomar la imagen. La iluminación constante puede dañar a las células y producir un aumento de la temperatura de la cabina.

Control del pH: La mayor parte de los medios de cultivo de células animales mantienen el pH en valores fisiológicos utilizando un buffer de carbonato/bicarbonato, necesitando una atmósfera de 5 % de dióxido de carbono para funcionar. Las estufas de cultivo convencionales logran esta atmósfera inyectando dióxido de carbono desde un tubo y regulando esta inyección a través de un sensor. En el sistema *in situ* diseñado, el pH fue controlado de tres maneras.

- I. Se empleó medio de cultivo convencional con buffer de bicarbonato. La cápsula con las células se colocó en un recipiente con cierre hermético, que se colocó en la estufa de cultivo durante 3 - 4 horas para saturar su atmósfera en dióxido de carbono antes de cerrarlo. Como el metabolismo de las células no produce ni consume dióxido de carbono en grandes cantidades, un recipiente cerrado de este modo puede mantener la atmósfera de dióxido de carbono varios días.
- II. La segunda alternativa fue usar un medio de cultivo dióxido de carbono independiente, como el RPMI CO₂-Independent Medium (Gibco, Invitrogen Corp.), compatible con la mayoría de las líneas celulares utilizadas.
- III. Inyección de una mezcla gaseosa de dióxido de carbono al 5 % en aire, a través de llaves de entrada con humidificación, esterilización y trampas de salida.

Eventualmente se utilizó el sistema de seguimiento comercial Cell Observer de Zeiss.

B.1.5. Ensayo de proliferación de reducción de metil tiazol tetrazolio

La proliferación celular sobre distintas superficies se cuantificó mediante ensayos de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma M5655). Para esto, las películas se fabricaron sobre cubreobjetos circulares de vidrio de 14 mm de diámetro, se colocaron en una placa de 24 pocillos y esterilizaron con UV durante 1 hora en el flujo laminar. Posteriormente, se sembraron 2.5×10^4 células contenidas en 1 mL de medio de cultivo en cada uno de los pocillos y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ y 97 % de humedad. Luego de 24, 48 y 72 horas de incubación, se agregaron 80 µL de solución de MTT (5 mg mL⁻¹ en PBS 10 mM) a cada pocillo e incubaron durante 3 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo el medio de cultivo se removió completamente y los productos de formazán fueron solubilizados agregando 600 µL de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma 4723301) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Genios pro) y la viabilidad fue expresada como número de células. Cada ensayo se realizó por triplicado y se determinaron la media y el error estándar para cada condición.

B.1.6. Tinciones

Para estudiar la adhesión celular se llevó a cabo la tinción fluorescente de la vinculina, actina y el núcleo, utilizando el “Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit

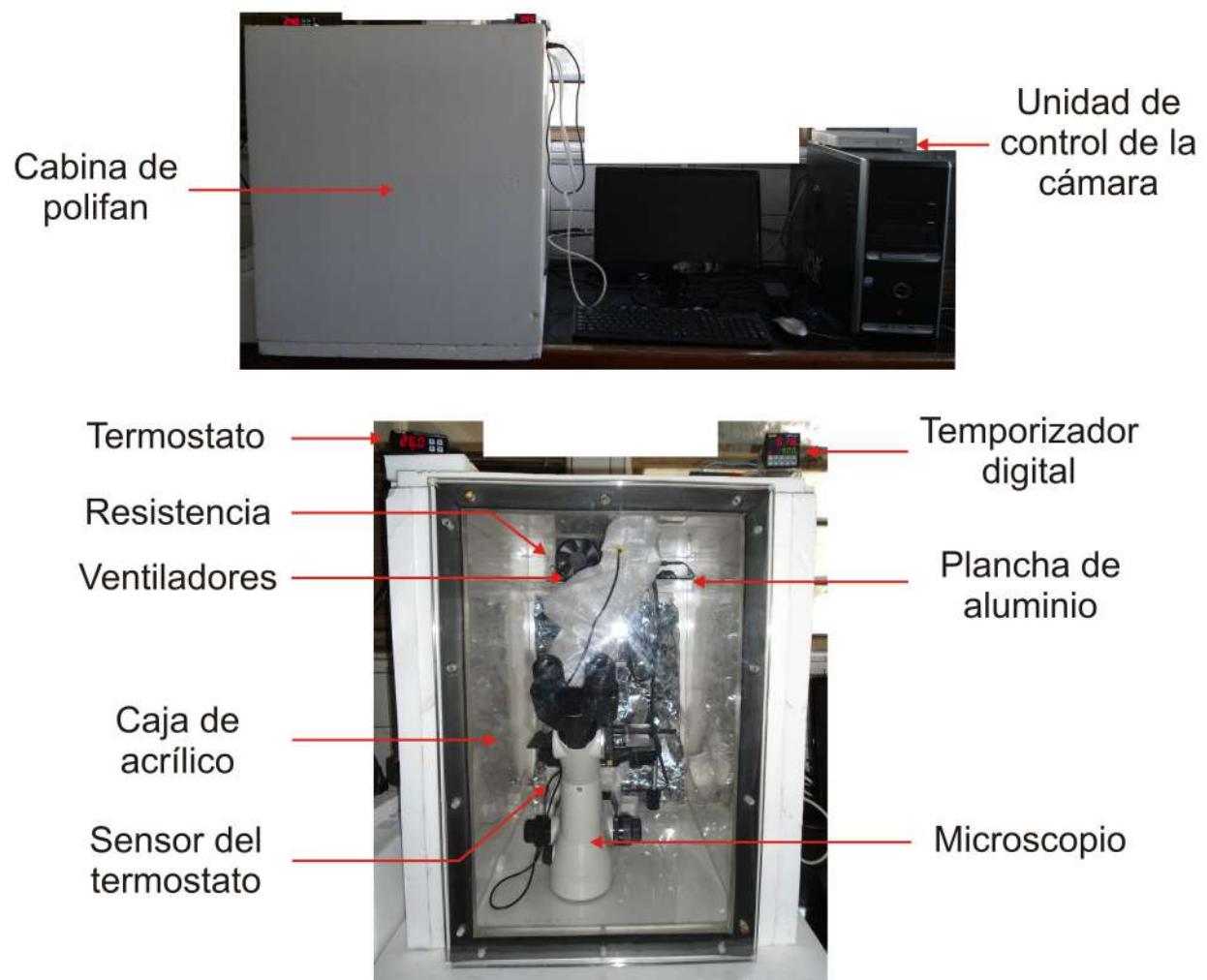


Figura B.3: Esquema del sistema de seguimiento *in situ* desarrollado en el laboratorio.

(FAK100, Millipore)”, solución de montaje anti-blanqueante (Millipore) y anticuerpo IgG-FITC anti-ratón (F0257, Sigma-Aldrich). La tinción se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante en el “Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit user manual”.

Las células cultivadas sobre cubreobjetos se lavaron con una solución al 0.05 % de Tween-20 (P9416, Sigma) en PBS y se fijaron con paraformaldeído al 4 %. Luego se lavaron con PBS y permeabilizaron con una solución al 0.1 % de Triton X-100 (T8787, Sigma) en PBS durante 5 minutos. Después de un nuevo lavado, se aplicó solución de bloqueo, 1% BSA en PBS durante 30 minutos. Luego, se agregó el anticuerpo antivinculina diluido en solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora, seguido de un lavado con PBS. A continuación, el anticuerpo IgG-FITC anti-ratón diluido en PBS se agregó a las muestras e incubó durante 1 hora. Para una doble tinción, la faloidina conjugada con TRITC se incubó simultáneamente con el anticuerpo secundario IgG-FITC anti-ratón. Después del lavado, la contratinción del núcleo se realizó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos. Las muestras lavadas en PBS se montaron en un portaobjetos utilizando solución de montaje anti-blanqueante. Las células así teñidas se observaron utilizando un Microscopio Confocal de Barrido Láser (Carl-Zeiss LSM 10 META) o un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX 50).

La proliferación celular se estudió utilizando el antígeno nuclear de proliferación celular Ki-67 (Dako). La inmunocitoquímica se realizó utilizando el método estándar de estreptavidina-biotina-peroxidasa utilizando el Dako Universal LSAB 2 kit/HRP.

B.1.7. Cultivo de bacterias

Se realizaron ensayos de adhesión bacteriana en algunos materiales utilizando las cepas bacterianas *E. coli*, una enterobacteria Gram negativa, y *S. aureus*, una bacteria Gram positiva. Las bacterias se cultivaron en caldo Luria utilizando un incubador a 37 °C con agitación constante a 200 rpm.

Los ensayos de adhesión consistieron en colocar las superficies a estudiar dentro de cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro y agregar 2 mL de una suspensión de bacterias con 4×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} . Luego de incubar 2 horas a 37 °C sin agitación, las superficies de lavaron suavemente con PBS para remover las bacterias no adheridas y el número de aquellas que quedaron adheridas se evaluó mediante dos procedimientos:

I) Observación directa en un microscopio con aumento de 200X luego de una tinción con DAPI.

II) Removiendo las bacterias adheridas por inmersión de las superficies en tubos conteniendo 3 mL de PBS y sonicando durante 10 minutos. Luego, el número de UFC presente en la suspensión se determinó sembrando 100 μL de diferentes diluciones en placas de Petri con agar Luria y contando las UFC en la concentración adecuada luego de 24 horas de incubación. En otro conjunto de experimentos, la concentración de bacterias fue estimada midiendo la dispersión de luz a 600 nm en un espectrómetro Jasco UV-visible.

Para cada condición se realizaron 3 experimentos independientes, y se determinaron la media y el error estándar.

B.2. Modificaciones del medio de cultivo y superficies

B.2.1. Modificaciones del medio de cultivo: modificación de la reología y agregado de agentes solubles con bioactividad

Modificación de la reología del medio de crecimiento

La reología del medio de crecimiento se modificó agregando distintas concentraciones de metilcelulosa (MC) al medio de cultivo. Para obtener estos medios modificados, ya sea soles o geles, al medio RPMI 2X contenido 20 % de SFB se le agregó solución acuosa 5 % de MC (Sigma Aldrich, peso molecular aproximado 14000, número de catálogo M7027) con una viscosidad dinámica de 250 cP y la cantidad adecuada de agua. El medio sin agregado de MC tiene una viscosidad dinámica de 1 cP, los soles con 0.5 % y 1.0 % de MC tienen viscosidades de 2.0 y 4.6 cP respectivamente y el medio gelificado con 2.5 % de MC tiene una viscosidad de 22.6 cP.

Modificación del medio de crecimiento mediante agentes solubles con bioactividad

Al medio RPMI suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB), 2 g L⁻¹ de bicarbonato y antibióticos se le agregaron distintas cantidades de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, Life Technologies) con el fin de obtener concentraciones en el rango de 0 – 50 ng mL⁻¹.

B.2.2. Modificación de superficies: substratos microestructurados y multicapas de polielectrolitos

Fabricación de substratos microestructurados

Se fabricaron substratos microestructurados de 20 x 20 mm² (máscaras) sobre una oblea de silicio utilizando litografía-UV y grabado iónico reactivo con una combinación de SF₆ y C₄F₈. Cada máscara contiene microranuras con 5 períodos de 20 x 4 mm² (Figura B.4a): g₁ = 88 períodos mm⁻¹ (es decir, períodos de 11,3 micras), g₂ = 100 períodos mm⁻¹ (períodos de 10 micras), g₃ = 150 períodos mm⁻¹ (períodos de 6,6 micras), g₄ = 191 períodos mm⁻¹ (períodos de 5,2 micras) y g₅ = 296 períodos mm⁻¹ (períodos de 3,3 micras) [B.2]. La profundidad de los valles es en todos los casos de 420 nm.

Las máscaras de silicio fueron usadas como moldes para la producción de substratos de poliestireno para el cultivo celular (Figuras B.4b-h y B.5). Se preparó una solución de moldeo disolviendo 2 g de poliestireno de una cápsula de petri (Greiner) en 12 ml de cloroformo y dejando en agitación durante la noche [B.3]. Luego, los moldes de silicio se colocaron en una cápsula de petri de vidrio y se cubrieron con 700 µL de esta solución. Se dejó evaporar el cloroformo durante la noche y al otro día el molde y la réplica se separaron con una pinza luego de enfriarlos en el freezer a -80 °C por unos 45 segundos.

Para promover la adhesión celular, las réplicas de poliestireno se trajeron con ácido sulfúrico durante 15 minutos [B.4]. Posteriormente, se lavaron en solución de PBS, luego con abundante agua bidestilada y finalmente se dejaron secar. Una vez secas, se pegaron a las cápsulas de petri utilizando pequeñas cantidades de la solución de moldeo. Antes de sembrar las células, las cápsulas fueron esterilizadas con luz UV durante 1 hora en la cabina de flujo laminar.

Los frentes lineales con distintos grados de inclinación respecto a la orientación de las microranuras se obtuvieron colocando una cinta de Teflon de la manera indicada en la sección

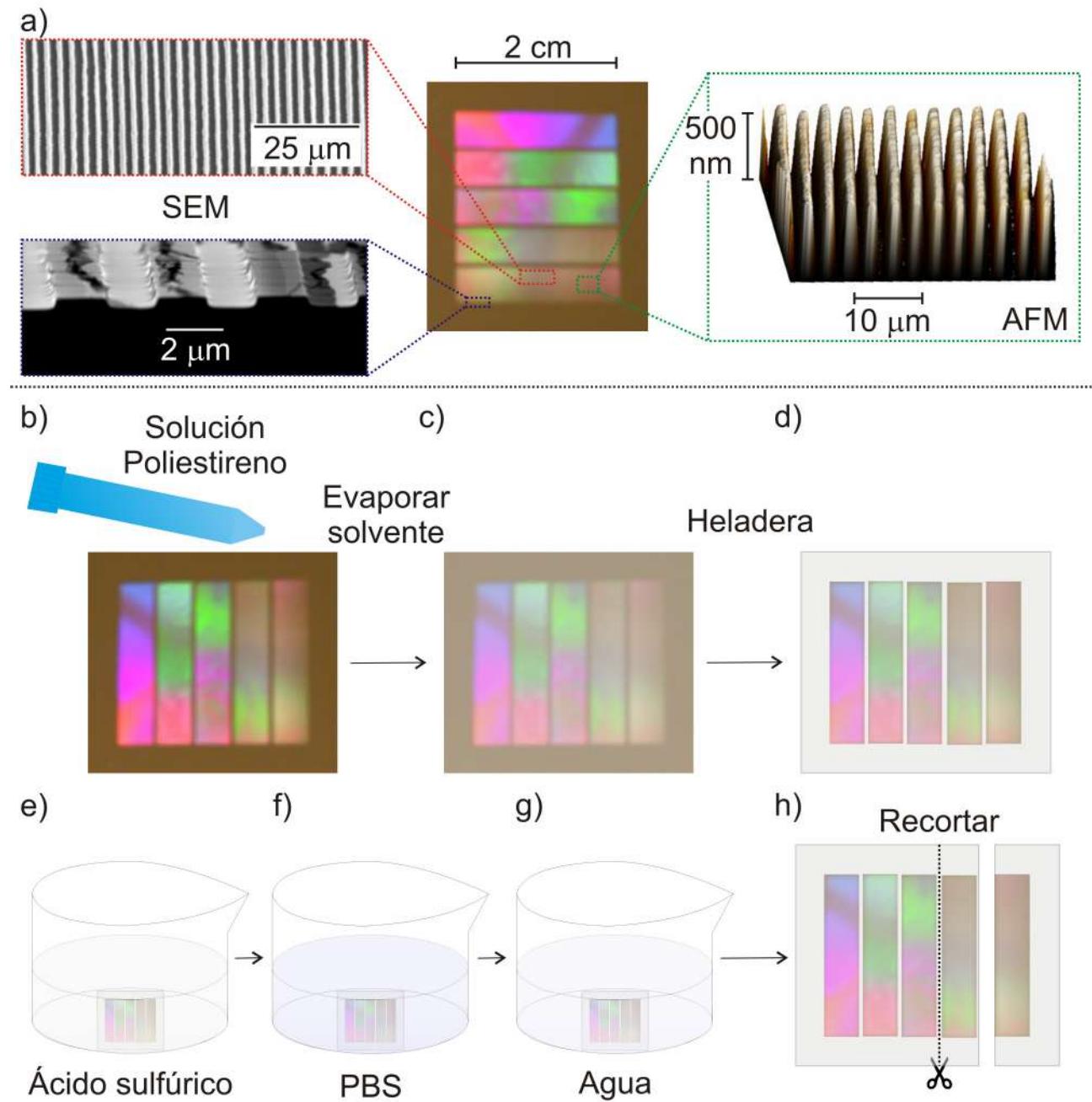


Figura B.4: (a) Caracterización de las microranuras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). (b-h) Esquema de la obtención de réplicas de poliestireno a partir de las máscaras de silicio. La solución de moldeo se coloca sobre las máscaras (b) y se deja evaporar el solvente durante la noche (c). La réplica de poliestireno se separa del molde colocándola en el freezer (d). Posteriormente, la superficie se trata con ácido sulfúrico para favorecer la adhesión celular (e) y lavada 3 veces en solución de PBS (f) y 3 veces en agua (g). Finalmente, las regiones de $20 \times 4 \text{ mm}^2$ con microranuras de distintos períodos se recortan para su colocación en cápsulas de petri (h).

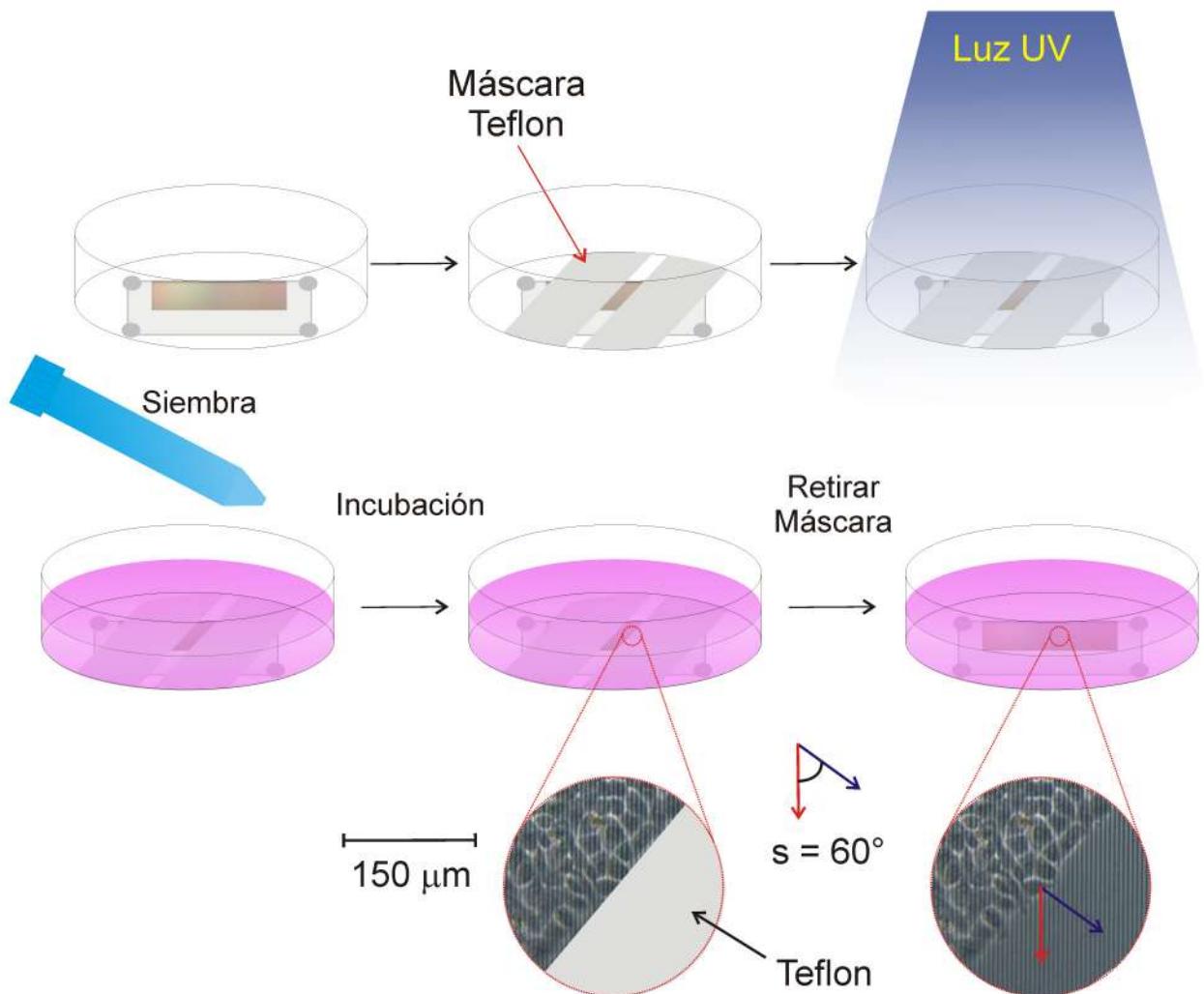


Figura B.5: Esquema de la obtención de frentes lineales con distintos grados de inclinación respecto a las microranuras. La película de poliestireno contenido las microranuras se recorta y se pega al fondo de la cápsula de Petri utilizando solución de moldeo (a). A continuación, se colocan dos cintas de Teflon paralelas de manera de formar el ángulo de inclinación deseado respecto a las microranuras (b). La cápsula de petri, la película de poliestireno con las microranuras y las cintas de Teflon se esterilizan con luz UV (c) y luego se siembran las células (d). Los cultivos se incuban hasta alcanzar confluencia (e) y en ese momento se retira la máscara de Teflon (g). En la figura se incluyen regiones de alta magnificación y se indica el ángulo formado entre una recta normal a la interfase y las microranuras.

Policationes

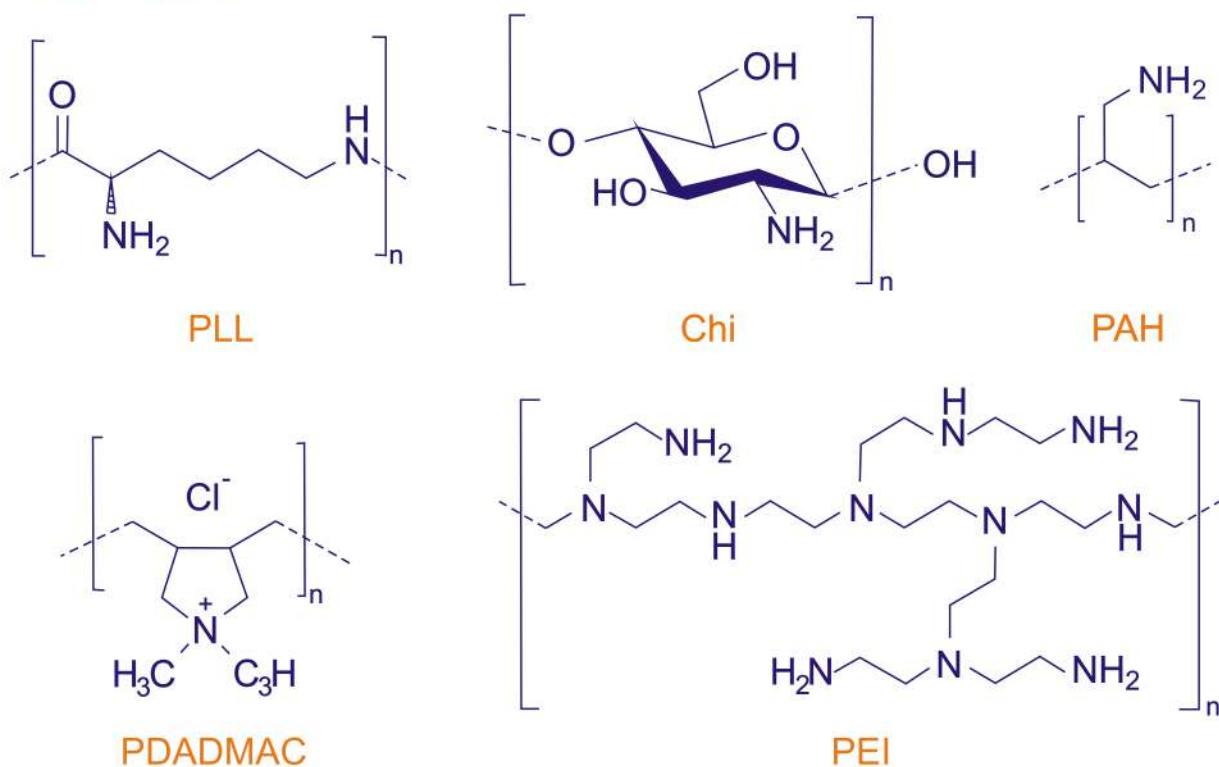


Figura B.6: Estructuras químicas de los policationes utilizados.

B.1.3 con diferentes ángulos respecto a las microranuras.

Ensamblado de multicapas de polielectrolitos

Se utilizaron los siguientes polielectrolitos: poli-L-lisina (PLL; PM \approx 70–150 kDa, P4707), poliestireno sulfonato sódico (PSS; PM promedio \approx 70 kDa, 243051), hidrocloruro de polialilamina (PAH; PM promedio \approx 58 kDa, 283223), polietilenimina ramificada (PEI; PM promedio \approx 25 kDa por LS, PM promedio \approx 10 kDa por GPC, 408727), cloruro de polidialidimethylamonio (PDADMAC; PM promedio \approx 200–350 kDa, 409022), ácido poliacrílico (PAA; PM promedio \approx 100 kDa, 523925), dextrán sulfato sódico de *Leuconostoc spp.* (Dex; PM promedio \approx 9–20 kDa, D6924) comprados de Sigma-Aldrich y alginato sódico (Alg; Cat. No. 17777-0050), quitosano (Chi; PM \approx 100–300 kDa, Cat. No. 349051000), y ácido hialurónico (HA; PM \approx 1500–2200 kDa, Cat. No. 251770010) adquiridos de Acros Organics. Las estructuras químicas de los policationes y polianiones utilizados se muestran en las figuras B.6 y B.7, respectivamente.

Las soluciones de polielectrolito se prepararon con una concentración de 1 mg mL^{-1} en un buffer HEPES 10 mM y NaCl 150 mM, pH = 7.4 (con excepción de la solución de Chi, y ocasionalmente la de HA, que fueron preparadas en un buffer Acetato/Acético 10 mM y NaCl 150 mM, y ajustadas a pH = 5.0) y filtradas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. Se seleccionaron estas condiciones de ensamblado para favorecer la estabilidad de las MPEs en condiciones fisiológicas.

El ensamblado de las multicapas de polielectrolitos (MPEs) se realizó por la técnica de CpC empleando substratos de tamaño adecuado. Para el cultivo celular se utilizaron cubreobjetos de vidrio de $24 \times 24 \text{ mm}^2$. Los substratos se limpian por inmersión en solución

Polianiones

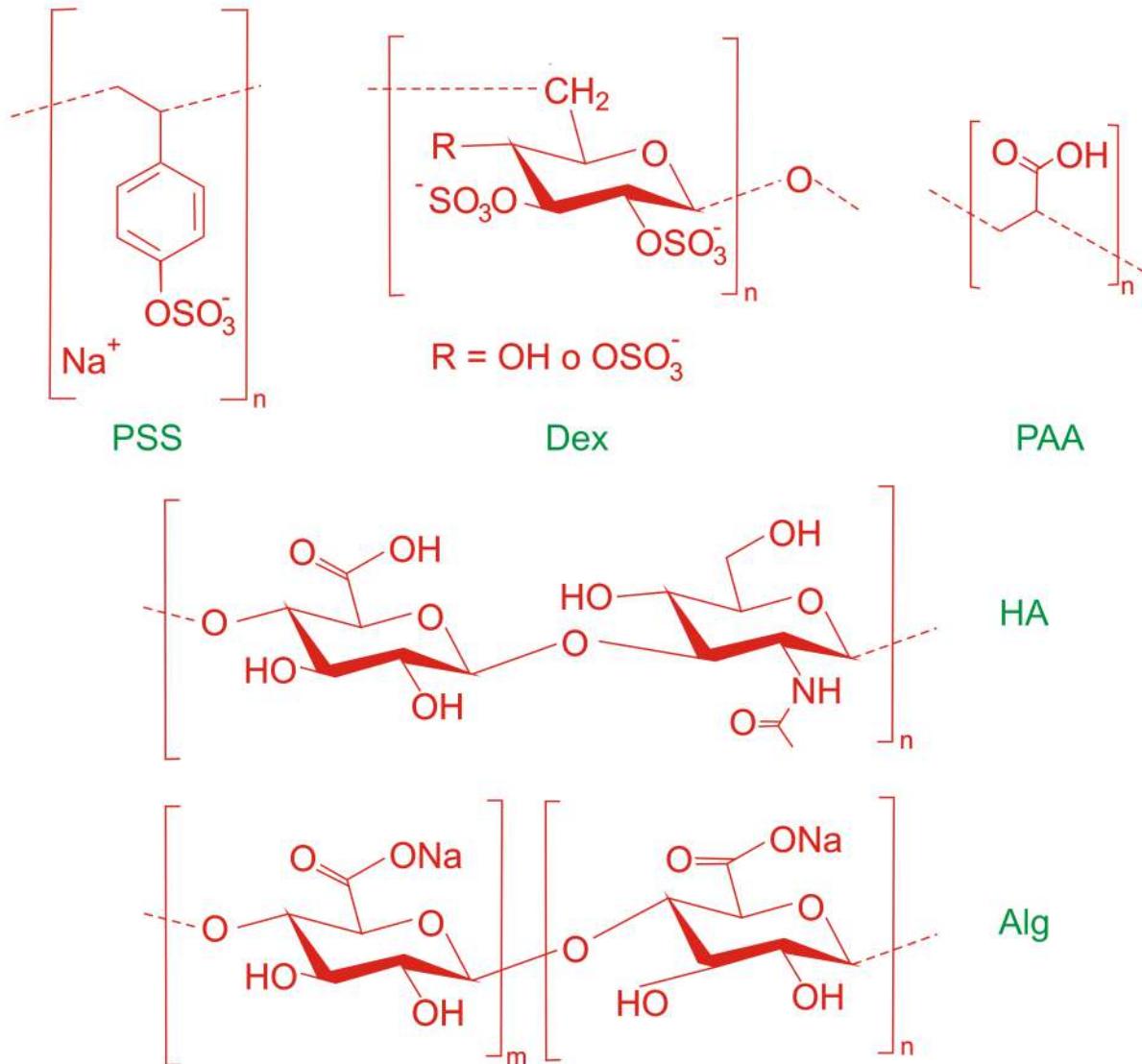


Figura B.7: Estructuras químicas de los polianiones utilizados.

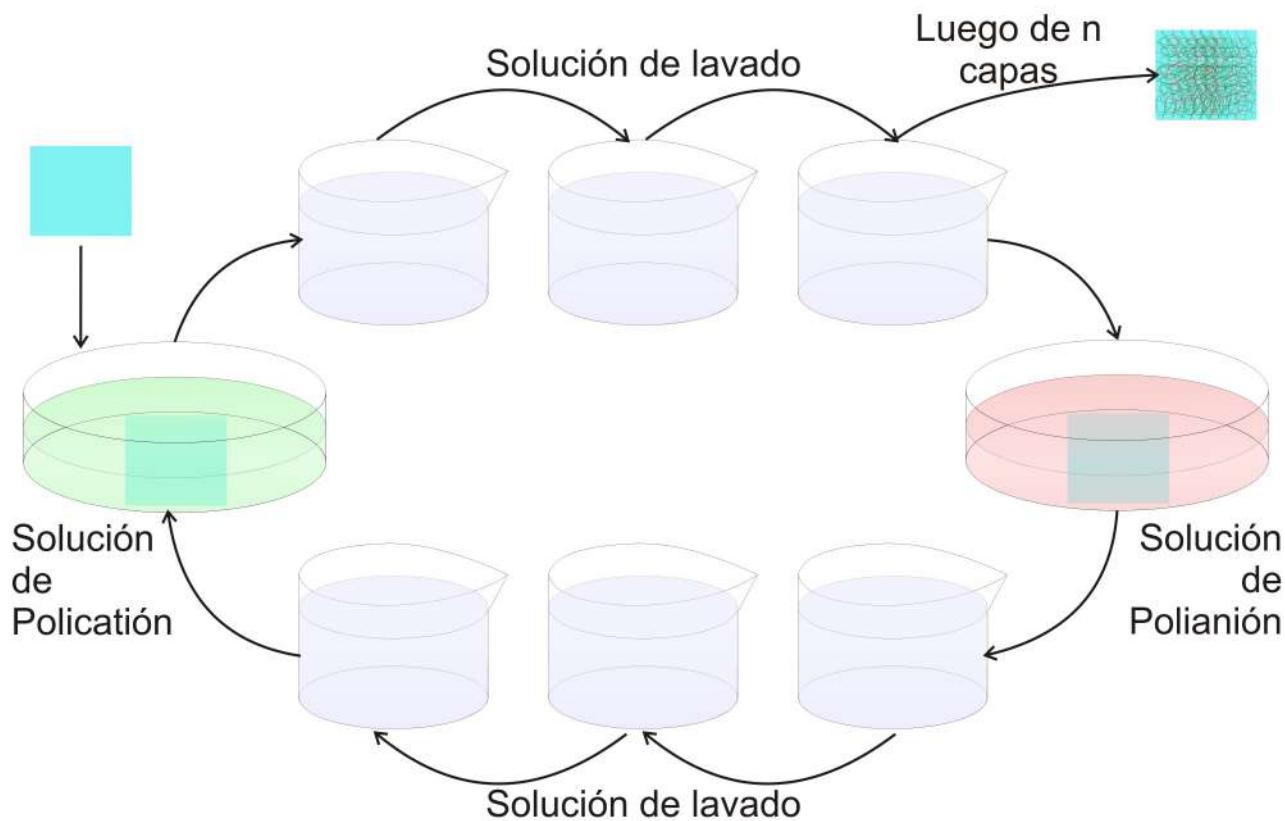


Figura B.8: Esquema del ensamblado de las multicapas de polielectrolitos mediante la técnica de capa por capa. Los vidrios limpios se sumergen en la solución de policación durante 15 min, luego se lavan 3 veces con agua y se sumergen durante 15 minutos en la solución de polianión para depositar la segunda capa. A continuación la superficie se lava nuevamente y se sumerge en la solución del policación. El proceso se repite hasta depositar el número de capas deseadas.

acuosa 10 mM de dodecilsulfato sódico (SDS) durante 3 horas, enjuagados con agua destilada y sumergidos posteriormente en solución acuosa de HCl 0.1 M durante toda la noche y lavados con abundante agua [B.5].

El ensamblado de los policationes y polianiones se realizó por inmersión manual de los substratos en las respectivas soluciones, durante 15 min a 24 °C (Figura B.8). Luego de la deposición de cada capa, las películas se lavaron 3 veces en agua destilada. De este modo se obtuvieron películas de distintos números de capas, correspondiendo la primera y última capa siempre a un policación.

Para los ensayos de adhesión celular, las superficies modificadas se colocaron en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro (Greiner) y se esterilizaron por UV durante 1 hora en la cabina de flujo laminar, un proceso ampliamente utilizado para el que no se ha reportado que produzca cambios en las propiedades de las MPEs [B.6].

Tratamiento térmico o recocido de las MPEs

Las MPEs fabricadas según el procedimiento descripto en la sección anterior (MPEs no recocidas) se colocaron en cápsulas de Petri, esterilizadas por UV durante 1 hora en el flujo laminar y dejadas en una estufa a 37 °C. En aquellos casos en que se indique, el recocido se realizó 55 °C o 80 °C durante 72 horas.

En algunos experimentos, mediante un sistema desarrollado en el laboratorio las MPEs

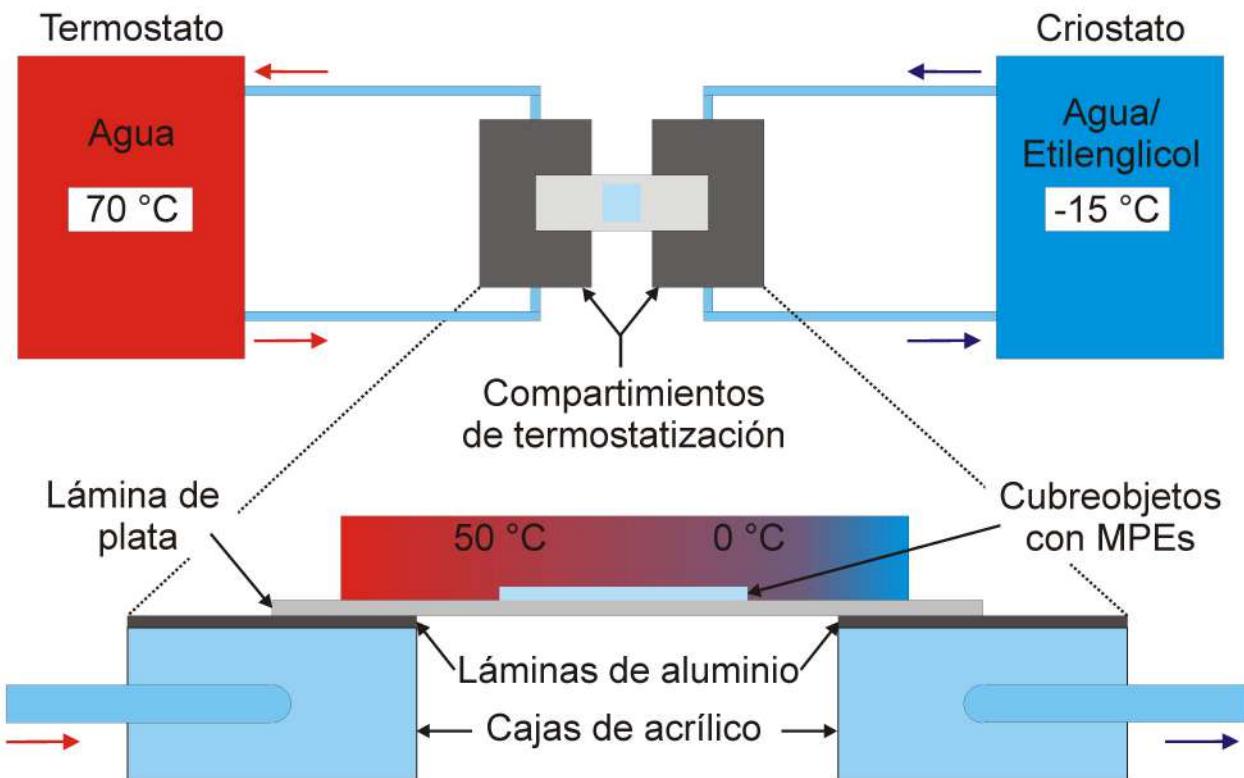


Figura B.9: Esquema del sistema desarrollado en el laboratorio para generar gradientes de temperatura.

se trataron con un gradiente de temperatura luego del ensamblado (Figura B.9). El sistema consiste en dos cajas de acrílico que se conectan mediante mangueras, una a un termostato y otra a un criostato. De este modo se logra que circule agua a alta temperatura (50 - 70 °C) por una de las cajas y una mezcla de agua/etilenglicol a baja temperatura (-15 °C) por la otra. Una de las caras de cada caja es una lámina aluminio, a fin de tener una superficie térmicamente conductora. Sobre ambas superficies de aluminio se coloca una lámina de plata, en la cual se establece el gradiente térmico. De este modo es posible obtener un gradiente aproximadamente lineal que va de 50 a 0 °C, sobre el que se coloca el cubreobjetos con las MPEs.

B.2.3. Caracterización de las multicapas de polielectrolitos

La caracterización de las superficies fabricadas es fundamental para poder interpretar los distintos aspectos fenotípicos de las células en función de las propiedades del material donde estas se siembran.

Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación

La microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D, por sus siglas en inglés) es una técnica altamente sensible capaz de detectar diferencias de masa en la escala de los ng [B.7, B.8]. Su principio de funcionamiento se basa en los cambios que experimenta la frecuencia de resonancia (F_0) del cristal de cuarzo, un material piezoelectrico, al cambiar su masa o la masa depositada sobre su superficie (Figura B.10a-c). El cristal o sensor de cuarzo suele ser circular y se coloca entre dos electrodos metálicos (Figura B.10a). Al aplicar

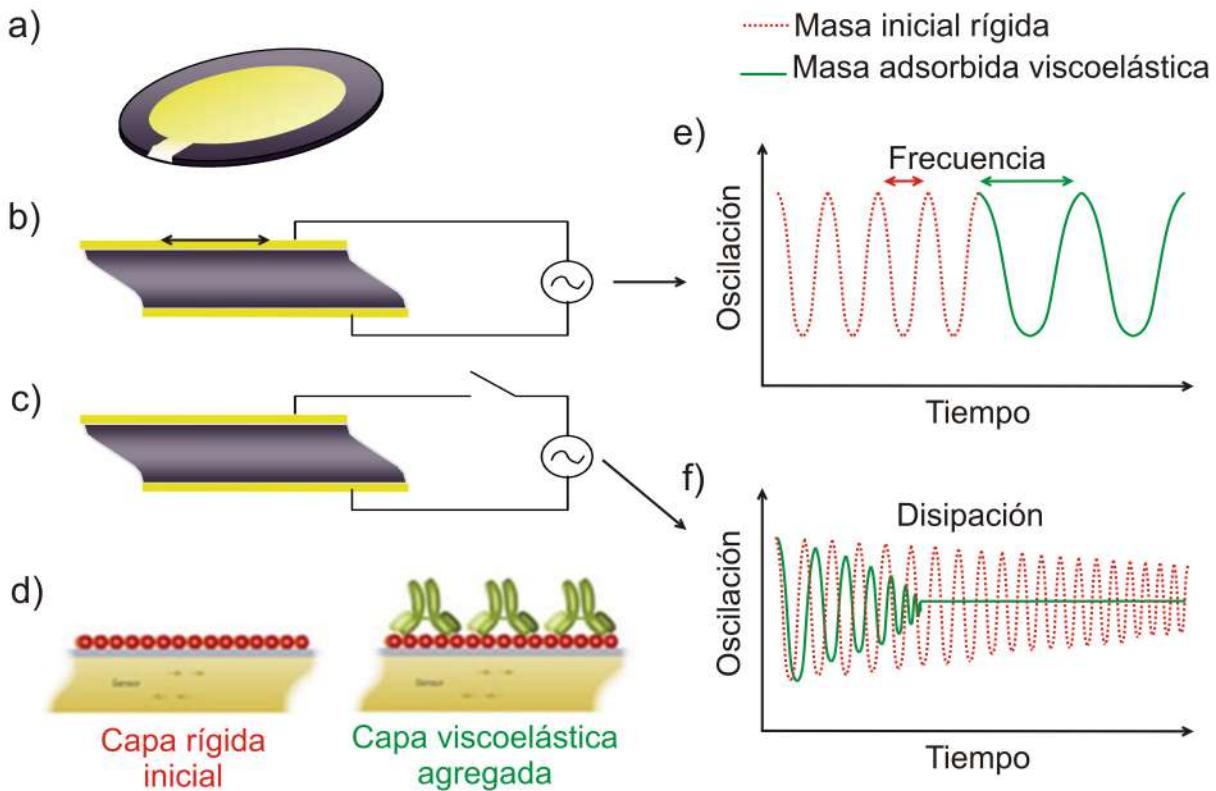


Figura B.10: Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación. a) Sensor típico con electrodos de oro. b) Aplicación de corriente alterna al cristal de cuarzo. c) Cortocircuito de la corriente alterna. d) Esquema de una capa rígida (roja) depositada sobre el cristal y posterior adsorción de una capa viscoelástica (verde). e) y f) oscilaciones del sensor. Mientras se aplica un voltaje alterno (b), la frecuencia de oscilación cambia al depositar más masa (e). Al apagar el voltaje alterno (c), la amplitud de la oscilación disminuye (f). La tasa de disminución o Disipación está relacionada a la elasticidad o viscosidad de las capas adsorbidas.

un campo eléctrico oscilante se induce una onda acústica que se propaga a través del cristal y lo hace oscilar (Figura B.10b). Cuando la frecuencia del voltaje oscilante aplicado es cercana a la F_0 del cristal en particular, se alcanza la condición de resonancia. Esta suele estar en el orden de los MHz y depende del espesor del cuarzo, a menor espesor del cristal mayor es F_0 . La F_0 típica de 5 MHz se corresponde con un espesor de $\sim 330 \mu\text{m}$ [B.8].

La ecuación de Sauerbrey establece una relación lineal entre el cambio de frecuencia (ΔF) y la masa adsorbida (Δm) sobre el cristal:

$$\Delta m = \frac{C}{n} \Delta F \quad (\text{B.1})$$

Donde n es el numero de harmónico y $C \sim -17.7 \text{ Hz ng cm}^{-2}$ para un cristal de 5 MHz. La ecuación de Saurbrey es válida si se cumplen 3 condiciones. Primero, que la masa de material adsorbida sea pequeña en relación a la masa del cristal de cuarzo; segundo, que el material adsorbido sea rígido; tercero, que el material adsorbido se distribuya homogéneamente sobre la superficie del cristal. Muchas veces la película adsorbida no es rígida y es necesario recurrir a modelos más complejos para relacionar cuantitativamente el cambio de frecuencia con la masa depositada.

Las películas “blandas” o viscoelásticas no se acoplan perfectamente con la oscilación del cristal y entonces la ecuación de Sauerbrey estima por defecto la masa de material adsorbida. Una película “blanda” amortigua la oscilación del sensor de cuarzo. Esta amortiguación o disipación (D) de la energía de oscilación del sensor revela las propiedades viscoelásticas de la película [B.8].

D se define como:

$$D = \frac{E_p}{2\pi E_a} \quad (\text{B.2})$$

Donde E_p es la energía perdida o disipada durante un ciclo de oscilación y E_a es la energía almacenada en el oscilador. La energía de disipación se mide registrando las oscilaciones del sensor desde su frecuencia de resonancia hasta el reposo, luego de cortar la corriente alterna (Figura B.10 c y f).

La QCM-D es una técnica muy valiosa para estudiar en tiempo real ensamblados realizados con la técnica de capa por capa e interacciones de macromoléculas con superficies [B.8, B.9].

La deposición de polielectrolitos se estudió mediante QCM-D utilizando un dispositivo QCM-D E4 de Q-Sense. Las MPEs fueron ensambladas sobre sensores de cristal de cuarzo recubiertos con 50 nm de SiO₂ (5 MHz, Q-Sense). Las soluciones de polielectrolitos se hicieron pasar por las cámaras de los sensores con la ayuda de una bomba peristáltica durante 10 – 15 minutos hasta la estabilización de la frecuencia. Luego de cada paso de deposición se realizó un lavado de 10 minutos con buffer HEPES o Acetato/Acético según corresponda. Los experimentos se realizaron a 24 °C. Para estudiar la estabilidad en condiciones fisiológicas de las MPEs de Chi/HA ensambladas a pH = 5.0 se inyectó una solución de buffer HEPES 10 mM y NaCl 150 mM, pH= 7.4 luego del ensamblado.

La QCM-D también se utilizó para estudiar la adsorción de seroalbúmina bovina (BSA; A7906, Sigma) y fibronectina proveniente de plasma humano (FN; F1056, Sigma) sobre las MPEs antes y después del recocido térmico. Para esto se prepararon e inyectaron las soluciones de proteína en buffer HEPES. La solución de BSA tuvo una concentración de 1 mg mL⁻¹ y la de FN 0.05 mg mL⁻¹.

Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es una herramienta usual en el estudio de la materia a micro-nano escala y puede utilizarse en distintas condiciones ambientales en aire, líquidos o incluso vacío [B.10, B.11, B.12]. Un resorte con una constante elástica conocida (k_z) es comprimido por una fuerza de magnitud F . La compresión Δz del resorte es una medida directa de la F ejercida, la que en el régimen de deformación elástica lineal obedece la ley de Hooke:

$$F = k_z \Delta z \quad (\text{B.3})$$

El “resorte” utilizado en el AFM es una micropalanca (o “cantilever”) flexible que posee una rigidez de 0.01 a 50 N m⁻¹ (Figura B.11a) [B.12]. Una punta muy afilada (con una curvatura de unos pocos nanómetros de diámetro) se adjunta a la micropalanca de manera de poder medir la fuerza de interacción entre la punta y la muestra a través de la deflexión de dicha micropalanca. La detección precisa de la deflexión de la micropalanca es clave en un AFM. En general se utilizan métodos de detección ópticos. Con un sistema de deflexión de haz de láser es posible medir flexiones de la micropalanca en el rango de 0.1 Angstrom a unos pocos micrómetros, lo que se corresponde con una sensibilidad en la fuerza de 10⁻¹³

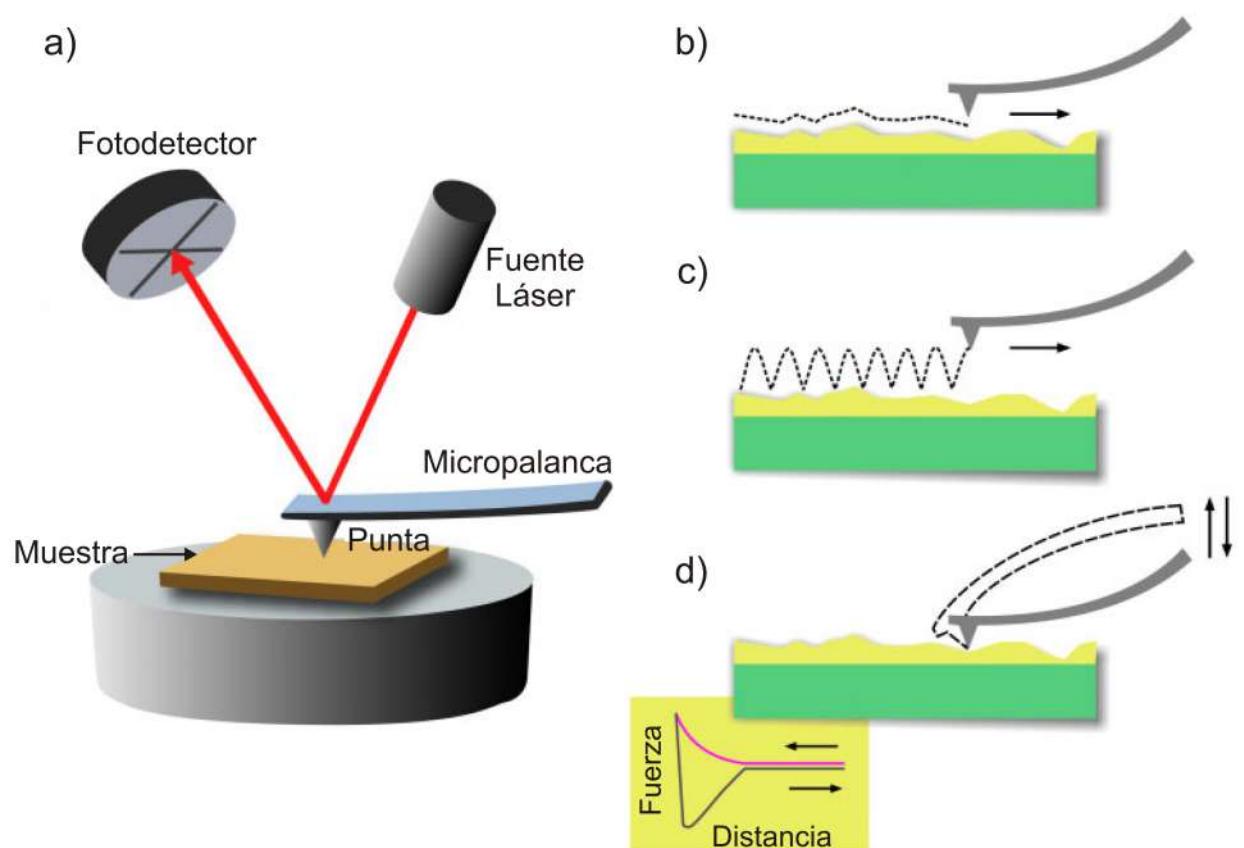


Figura B.11: Esquema del principio de funcionamiento del AFM (a) y de sus modos de trabajo (b-d). Modo contacto (b), modo de contacto intermitente (c), modo de espectroscopía de fuerzas atómicas y curva fuerza-distancia (d). Adaptado de [B.10].

N a 10^{-5} N. El rayo láser reflejado es detectado por un diodo de cuatro cuadrantes para detectar los movimientos de flexión y torsión de la micropalanca. El escáner está conectado a un sistema de retroalimentación y responde con movimientos en los ejes x, y, z.

Por razones de diseño y construcción, en el AFM la muestra es colocada sobre un piezotubo que se desplaza en relación a la punta, que permanece fija. Los movimientos en los ejes x-y corresponden a movimientos a lo largo del área superficial de la muestra. El movimiento en el eje z responde al sistema de retroalimentación según el modo de toma de imágenes que se esté utilizando:

- En el modo contacto la punta de la sonda se encuentra siempre en contacto con la muestra. En este modo la variable de control es la deflexión de la micropalanca (análogo a la compresión o F), que es mantenida constante por medio del circuito de retroalimentación. Este modo permite generar imágenes topográficas de alta resolución de la superficie estudiada, sin embargo el contacto directo con la muestra puede dañarla y llevar a la obtención de imágenes distorsionadas (Figura B.11b) [B.12].
- El modo de contacto intermitente o “tapping mode” es utilizado para proteger la integridad física de la punta y de las muestras, sobre todo aquellas que son blandas como es el caso de las muestras biológicas. En este modo la variable de control es la amplitud y la micropalanca oscila con una frecuencia cercana a la de resonancia a cierta distancia de la muestra manteniendo la amplitud constante. Al igual que en el modo contacto, también genera imágenes topográficas, pero estas suelen ser de menor resolución vertical y mayor resolución lateral (Figura B.11c) [B.11, B.12].
- Además de las imágenes topográficas, el AFM puede utilizarse en un modo de espectroscopía de fuerzas atómicas para medir fuerzas de interacción y propiedades físicas de las muestras. En este modo, la deflexión de la micropalanca (o la fuerza) se registra en función de la distancia vertical de desplazamiento a medida que la punta se acerca y aleja de la muestra. De esta manera se obtienen curvas fuerza-distancia (f-d) que pueden ser analizadas para determinar propiedades mecánicas de la muestra o la interacción de moléculas biológicas (Figura B.11d) [B.10].

La morfología de las MPEs se obtuvo utilizando un Nanowizard II AFM (JPK, Berlín, Alemania). Las películas de MPEs preparadas sobre cubreobjetos de vidrio de 14 mm de diámetro se lavaron con agua nanopura y se dejaron secar al aire. Las imágenes se adquirieron en modo de contacto intermitente (“tapping mode”) con puntas TESP-V2 (Bruker, AFM probes) con una constante de resorte de 40 N m^{-1} y con una frecuencia de resonancia en el rango de 280 – 320 kHz.

Medidas de nanoindentación mediante espectroscopías de fuerzas atómicas

La elasticidad de las películas se determinó a partir de experimentos de nanoindentación realizados con un Nanowizard II AFM (JPK, Berlín, Alemania) en los que se obtuvieron curvas de fuerza-distancia (f-d) en buffer HEPES 10 mM y NaCl 150 mM, pH= 7.4. Las medidas se realizaron con una punta piramidal DNP-S10A (Bruker, AFM probes). La constante del resorte del “cantilever” o micropalanca se calibró con el método del ruido térmico, dando como resultado $\sim 0.540 \text{ N m}^{-1}$. Se adquirieron 400 curvas f-d con un “setpoint” de fuerza de 8 nN sobre un área de muestreo de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ y se analizaron 5 áreas en distintos lugares de cada película. Finalmente, los resultados se analizaron usando el programa JPK SPM Data Processing. El módulo elástico de Young (E) de cada película se evaluó mediante

el ajuste de las curvas f-d al modelo de Hertz asumiendo un radio de Poisson de 0.40. Los análisis estadísticos asociados a los valores de E se realizaron con el programa OriginPro 8.0.

Ángulo de contacto

La mojabilidad es la capacidad de un líquido de extenderse y dejar una traza sobre un sólido [B.13]. Esta depende de las interacciones intermoleculares entre las moléculas superficiales de ambas sustancias. Las mediciones de ángulos de contacto son útiles para la caracterización de las interacciones entre un líquido y una superficie. Estas medidas son confiables si la superficie es suave, homogénea y la gota no penetra en ella.

El ángulo de contacto (θ) depende de la tensión superficial del líquido y de la energía libre superficial del substrato [B.13]. El ángulo de contacto es aquel entre la interfase sólido/líquido y la interfase líquido/vapor (L/V) y cuyo vértice está donde las tres interfasas se encuentran (Figura B.12a). La ecuación de Young describe la dependencia de θ con las fuerzas de adhesión y cohesión:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta \quad (\text{B.4})$$

Donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_{LV} corresponden a las tensiones interfaciales sólido/vapor, sólido/líquido y líquido/vapor, respectivamente. Para el caso en que el líquido sea agua, una superficie con un $\theta > 90^\circ$ se considera hidrofóbica y una con un $\theta < 90^\circ$ se considera hidrofílica (Figura B.12b).

El ángulo de contacto θ puede medirse depositando una gota del líquido (por ejemplo, agua) sobre la superficie y haciendo una captura digital de la imagen utilizando un instrumento llamado goniómetro.

La mojabilidad de las MPEs se determinó en las muestras secadas al aire con un goniómetro DSA 100 (Kruss company) o un Ramé-Hart 200 a temperatura ambiente (20°C). Se utilizó para la determinación el ángulo tangente que se forma en una gota de agua sobre la superficie de la MPE, cuyo vértice es el punto en que se encuentran las 3 fases. Se utilizó un volumen de gota constante de $3 \mu\text{L}$ y una velocidad de goteo de $500 \mu\text{L min}^{-1}$. Se realizaron 5 experimentos independientes para cada muestra y los perfiles de las gotas se registraron y ajustaron utilizando los programas incluídos con los goniómetros (DSA 3 y DROP Image Advanced 2.2v).

Potencial Zeta

En una solución iónica, las partículas en suspensión que tengan una carga neta estarán rodeadas por una capa de iones de carga opuesta unida fuertemente a sus superficies (Figura B.13) [B.14]. Esta capa se denomina capa de Stern. Alrededor se genera una capa difusiva con iones interactuando más débilmente. Estas dos capas conforman la llamada doble capa eléctrica. Cuando una partícula se mueve (debido al movimiento Browniano o a la aplicación de una fuerza), hay una clara distinción entre el grupo de iones de la capa difusiva que se mueve con la partícula y el grupo de iones que permanecen dispersos en el seno de la solución. El potencial eléctrico en este plano de corte se denomina potencial zeta y está relacionado a la carga superficial de la partícula (Figura B.13).

En las medidas de potencial zeta, un campo eléctrico se aplica sobre la muestra y el movimiento de las partículas (movilidad electroforética) se mide mediante velocimetría de laser doppler. Para calcular el potencial zeta (z) se utiliza la ecuación de Henry [B.14]:

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad (\text{B.5})$$

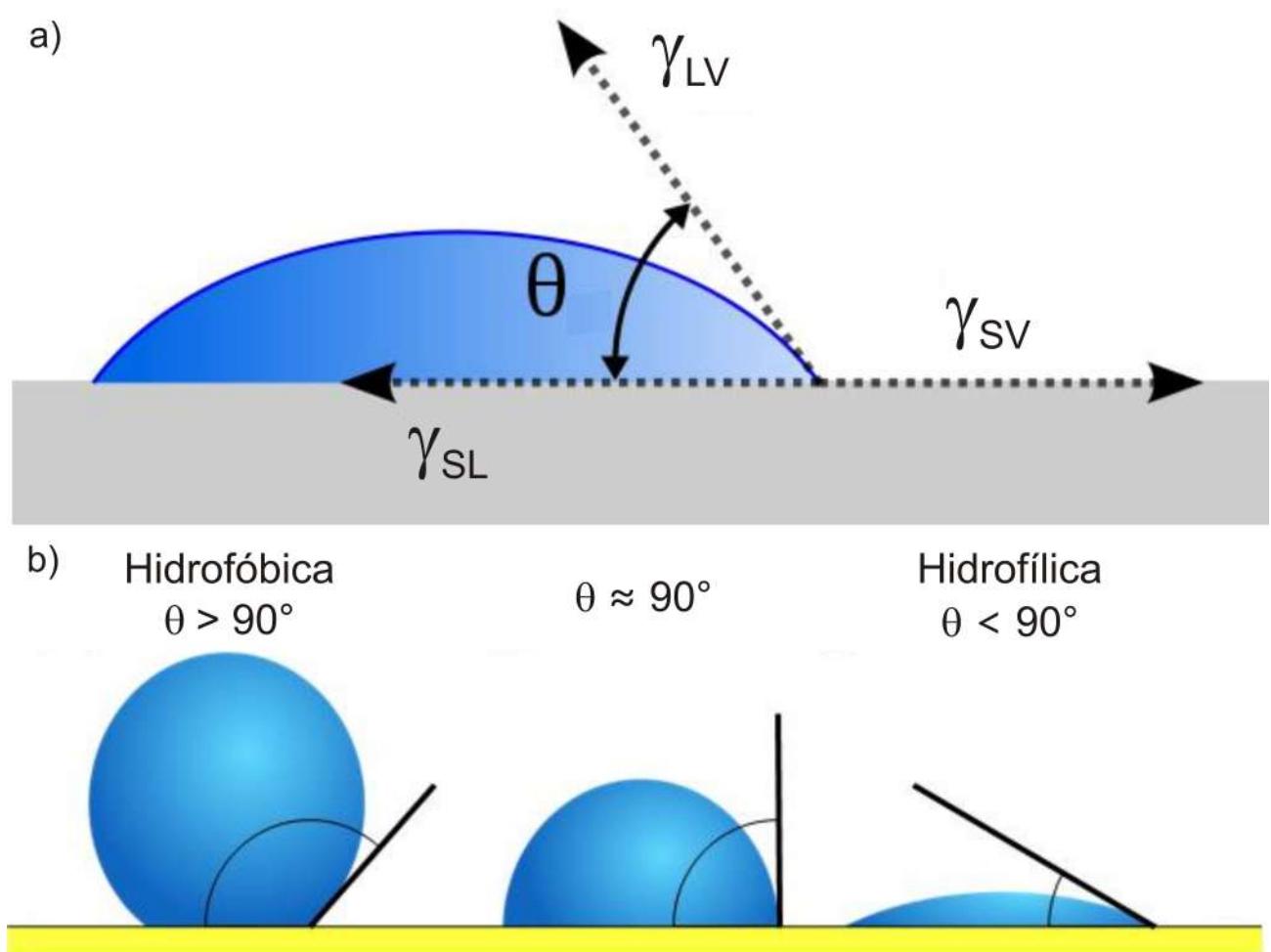


Figura B.12: a) Esquema de la determinación del ángulo de contacto θ . b) Gotas de agua depositadas sobre substratos hidrofóbicos e hidrofílicos y sus respectivos ángulos de contacto.

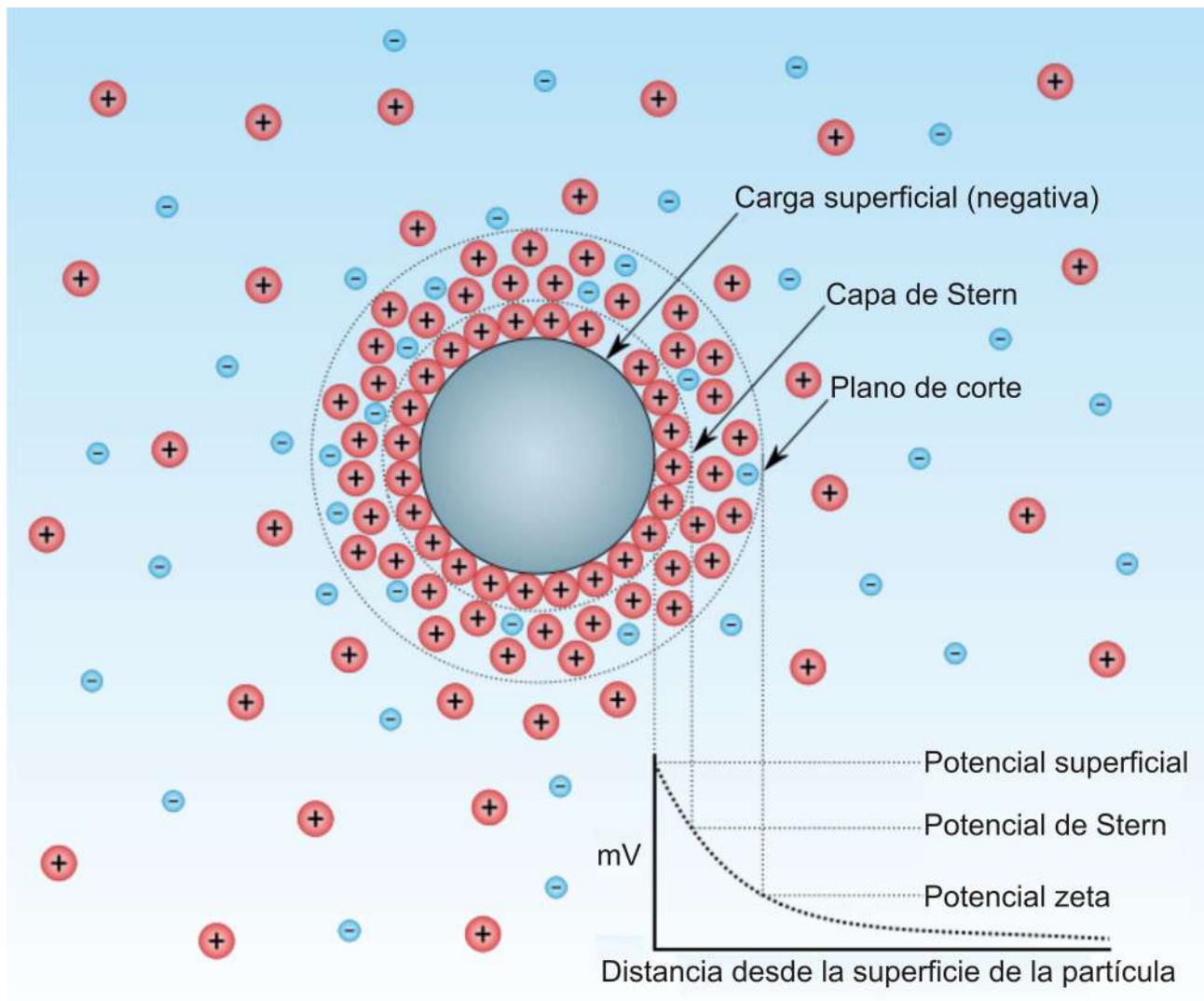


Figura B.13: Esquema de una partícula en suspensión y los iones que la rodean. El potencial varía en función de la distancia a la superficie de la partícula. Adaptado de Wikimedia Commons.

Donde U_e es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, η es la viscosidad dinámica del medio, $f(\kappa a)$ es la función de Henry y κa es una medida del radio de las partículas. Las partículas con potencial zeta entre -10 y +10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que aquellas con potenciales menores a -30 mV o mayores a +30 mV se consideran fuertemente aniónicas o catiónicas, respectivamente.

El potencial zeta de coloides recubiertos de MPEs se determinó utilizando un Malvern Zetasizer. Las medidas fueron realizadas en celdas capilares desechables a 25 °C aplicando un voltaje de 40 V y se usó un modelo de análisis monomodal. Las partículas coloidales de las muestras se diluyeron en buffer HEPES 10 mM y NaCl 150 mM (pH = 7.4) a una concentración final de 0.1 mg mL⁻¹ y se realizaron cinco repeticiones para cada determinación.

Ensamblado de los polielectrolitos sobre coloides: para las medidas de potencial zeta se ensamblaron las MPE sobre partículas de SiO₂ (3 μm de diámetro). Las partículas se resuspendieron en buffer HEPES 10 mM y NaCl 150 mM de pH= 7.4 (o buffer Acetato/Acético 10 mM y NaCl 150 mM a pH=5.0 para el caso del Chi/HA) de manera de alcanzar una concentración de 1 mg mL⁻¹. A continuación se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y las partículas se resuspendieron en solución de policación 1 mg mL⁻¹ e incubaron en ella durante 15 minutos. Seguidamente las partículas se lavaron 3 veces por centrifugación y resuspensión en el buffer correspondiente, y después los coloides se incubaron durante 15 minutos en la solución de polianión 1 mg mL⁻¹. El procedimiento se repitió para la deposición de cada capa hasta llegar a un ensamblado de 15 capas.

Dicroísmo circular

Algunas moléculas poseen asimetría molecular, es decir, sus imágenes especulares no son idénticas. La interacción de estas moléculas, denominadas quirales, con luz polarizada es muy específica y proporciona información estructural tanto de moléculas pequeñas como de macromoléculas [B.15].

El dicroísmo circular es uno de los tipos de medición comúnmente utilizado para determinar el efecto de la luz polarizada en una molécula quiral (Figura B.14) [B.15]. La luz polarizada circularmente gira alrededor de la dirección de propagación. Si el vector forma una hélice dextrógira, es una luz polarizada circularmente a la derecha (Figura B.14c,d). Si el vector forma una hélice levógira, es una luz polarizada circularmente a la izquierda. Las moléculas quirales tienen índices de refracción diferentes para la luz polarizada circularmente a la derecha y para la luz polarizada circularmente a la izquierda. Es decir que los haces de luz viajan a diferentes velocidades y son absorbidos en diferentes grados dependiendo de la dirección en que gira la luz polarizada. Esto significa que los coeficientes de extinción molar para la luz circularmente polarizada dextrógira y levógira son diferentes, $\varepsilon_D \neq \varepsilon_L$. Este efecto se llama DC. La absorbancia diferencial, $\Delta\varepsilon = \varepsilon_D - \varepsilon_L$, entre la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda se mide en función de la longitud de onda λ para obtener el espectro de DC (Figura B.14e).

El DC permite estudiar los cambios conformacionales en la estructura de las macromoléculas. Las proteínas en su conformación nativa tienen espectros de DC característicos y los cambios en la curva del espectro así como los cambios de los mínimos o máximos proveen información acerca de la conformación de la proteína [B.15].

El espectro de dicroísmo circular (DC) de películas secadas al aire se midió utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810. Las MPEs se ensamblaron sobre cubreobjetos de cuarzo de alta calidad (Electron Microscopy Science) y se realizaron medidas antes y después de distintos tiempos de recocido.

También se utilizaron medidas de DC para detectar cambios estructurales de SAB y FN

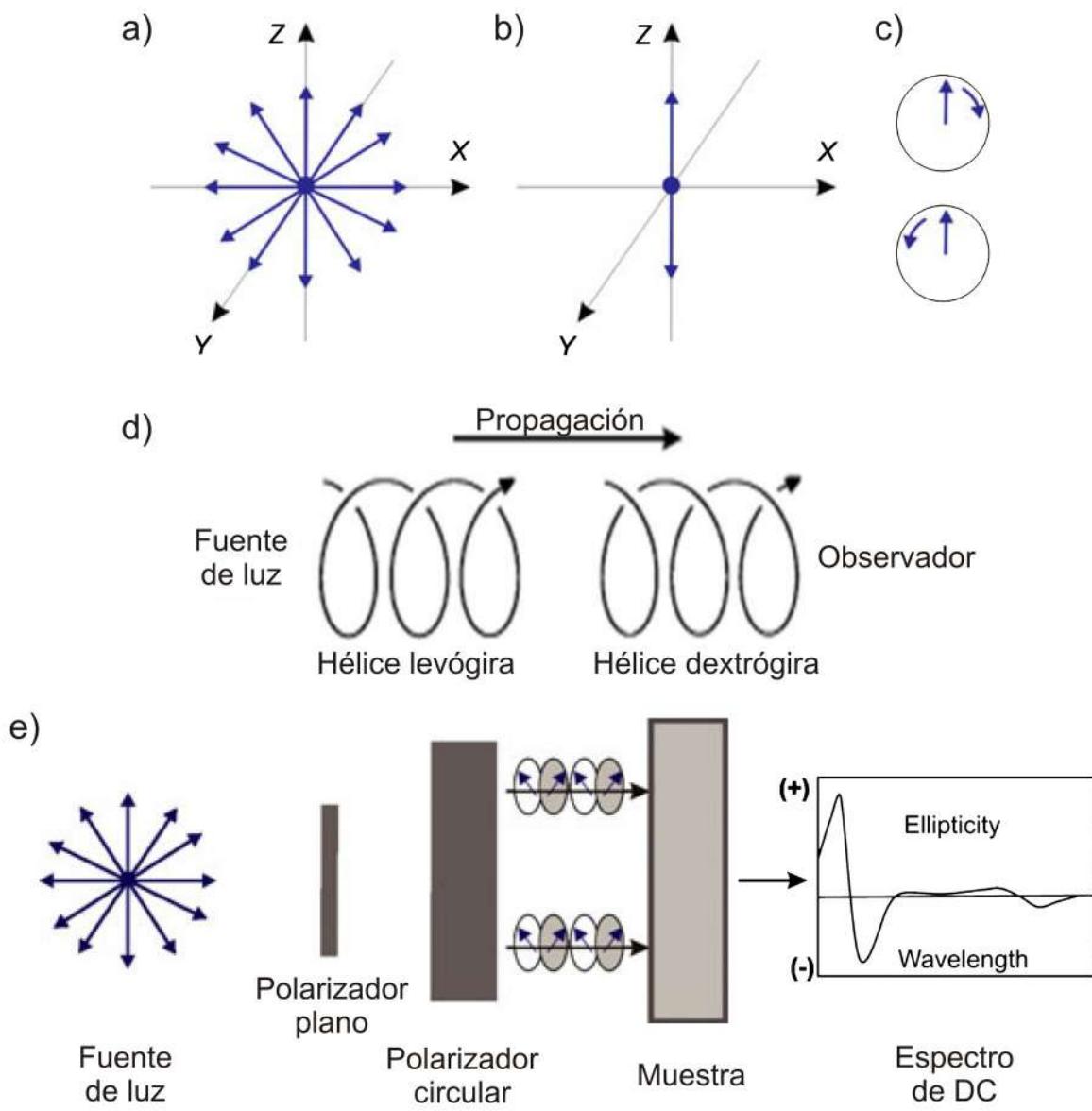


Figura B.14: Esquema de los componentes del campo eléctrico no polarizado (a), luz polarizada linealmente o plana (b). La luz se mueve a lo largo del eje Y. Para la luz polarizada circularmente (c), la dirección de rotación puede dirigirse en sentido de las manecillas del reloj o en dirección contraria. Luz polarizada circularmente, a la izquierda (levógira) y de recha (dextrógira), propagándose en el espacio (d). Esquema de DC en el que se mide la diferencia en absorción (e). Adaptado de [B.15].

adsorbidas sobre las muestras. Las soluciones de proteínas en buffer HEPES se incubaron durante 1 hora sobre películas no recocidas y recocidas. Luego, las muestras fueron lavadas con abundante agua y secadas al aire. Las medidas se realizaron en el rango de 300 a 190 nm y cada espectro se obtuvo por el promedio de 4-16 escaneos. El equipo se calibró con (1R)(-)10 ácido camforsulfónico y todas las medidas se realizaron a 24 °C.

Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

La incidencia de un fotón de energía $h\nu$ sobre los átomos presentes en la superficie de una muestra produce, por efecto fotoeléctrico, la emisión de fotoelectrones con una energía de ligadura (E_B) [B.16, B.17]:

$$E_B = h\nu - E_K - W \quad (\text{B.6})$$

Donde $h\nu$ es la energía de los fotones, E_K la energía cinética del fotoelectrón producido y W la función de trabajo del espectrómetro. La energía de ligadura es un parámetro que identifica al electrón de forma específica, en términos del elemento y del nivel atómico [B.17].

La técnica de XPS permite el análisis cuantitativo y cualitativo de todos los elementos, excepto el hidrógeno, mediante la obtención de espectros de intensidad o cuentas en función de E_B . La posición de los picos da información del elemento. La intensidad o altura de los picos da información de los porcentajes atómicos presentes en la superficie del material.

La E_B de los picos asociados a la emisión de fotoelectrones está muy bien definida y permite diferenciar átomos no equivalentes del mismo elemento. Diferencias en el estado de oxidación, en las moléculas que rodean al elemento o en la posición de la red provocan cambios apreciables (típicamente de entre 1-3 eV) en la E_B llamado corrimientos químico [B.16].

A diferencia de los haces electrónicos, el haz incidente de rayos X no puede focalizarse, por lo que la resolución lateral de la técnica de XPS es mala. En general el área de análisis es de 1 mm².

La técnica de XPS necesita un ambiente de ultra alto vacío para evitar choques inelásticos de los fotoelectrones, para garantizar el correcto funcionamiento del ánodo y los filamentos de rayos X y para evitar la contaminación de la muestra. Por otro lado, la fuente de radiación debe emitir rayos X de manera de cubrir el rango de todos los elementos, con buena resolución e intensidad. La calibración de las energías de ligadura debe realizarse periódicamente con películas de metal libres de contaminantes con posiciones de E_B bien definidas [B.16].

La química superficial de las MPEs con y sin recocido térmico se determinó por XPS empleando un espectrómetro SPECS SAGE HR 100. La fuente de rayos X empleada fue de Mg K α (1253.6 eV) que opera a 12.5 kV y 250 W. La medida se realizó con un ángulo entre radiación emitida y fotoelectrones emitidos fijado en 90° y a una presión de $\approx 10^{-6}$ Pa. Se adquirió el espectro detallado para las regiones del C 1s y el N 1s.

Los espectros se analizaron con el programa CasaXPS 2.3 15dev87. El análisis consistió en eliminación de satélites, sustracción de background o fondo de Shirley, calibración de las energías de enlace a través del pico C-C de la línea C 1s (285 eV) y ajuste de los picos con perfiles de Gauss – Lorentz para determinar los porcentajes atómicos y el estado químico de los elementos presentes en la superficie.

B.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos

B.3.1. Análisis de las características morfológicas de colonias celulares y de las células individuales

Colonias celulares

Las fotografías parciales de las colonias fueron compaginadas para obtener una imagen completa de la colonia utilizando el programa Corel X3. Los perfiles de crecimiento de dichas colonias se trazaron a mano utilizando el mismo software y una tableta digitalizadora Wacom. Se consideró como parte del frente de crecimiento a todas las células que estaban en contacto con la colonia en estudio, ya sea mediante su citoplasma o prolongaciones filopódicas. Los contornos así trazados fueron exportados como imagen de mapa de bits para su procesamiento. Se utilizó un programa desarrollado en el laboratorio en lenguaje Fortran 95. El mismo permite calcular los parámetros asociados con la evolución de los perfiles de las colonias: la distancia de cada punto del contorno a la línea de base (colonias con frente lineal) o al centro de masa (colonias con frente circular), la altura o radio promedio y la rugosidad del perfil de la colonia.

De los perfiles de las CQLs se calcula la distancia instantánea vertical, desde la línea de base hasta el i-ésimo punto del frente al tiempo t ($h_i(t)$) ($i=1, 2, \dots, n$) y la distancia o altura promedio:

$$\langle h \rangle = \sum_i h_i(t)/n \quad (\text{B.7})$$

Similarmente, para las CQRs se calcula el centro de masa (CM), la distancia instantánea ($R_i(t)$) desde el centro de masa al i-ésimo punto del frente y el radio promedio de la colonia:

$$\langle R \rangle = \sum_i R_i(t)/n \quad (\text{B.8})$$

Para ambos tipos de frente se determina la rugosidad como la desviación cuadrática media de las alturas:

$$w(t) = \left\{ \frac{1}{n} \sum_i [h_i(t) - \langle h \rangle]^2 \right\}^{1/2} \quad (\text{B.9})$$

Células individuales

Con el objetivo de estudiar la adhesión celular en distintas condiciones, las células sembradas se fotografiaron a distintos tiempos con un microscopio invertido de contraste de fases Nikon TS100, con un objetivo de 10x ADL de campo plano CFI. La adhesión celular se evaluó determinando el área encerrada por el contorno de las células, determinado manualmente usando una tableta graficadora Wacom y el programa Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics Inc.

Otros parámetros como la relación de aspecto (relación entre el eje mayor y eje menor de una elipse con área equivalente a la de la célula) y la redondez (cociente entre el cuadrado del perímetro de la célula y $4 \times \pi \times$ área celular) también se utilizaron para caracterizar la adhesión. Una relación de aspecto cercana a 1 corresponde a una célula redondeada (por ej, célula en duplicación o despegada de la superficie), valores cercanos a 1.5 son típicos de células epiteliales y valores más altos corresponden a células con una morfología alusada como la observada en los fibroblastos. Por otro lado, una redondez cercana a 1 indica células lisas

quasi circulares, mientras que valores de redondez mayores pueden indicar una morfología ahusada o un citoplasma rugoso con numerosos filopodios.

B.3.2. Análisis de la movilidad celular

Seguimiento de las células y obtención de las trayectorias celulares

Con las fotografías obtenidas en los experimentos de seguimiento *in situ* se armaron secuencias de imágenes utilizando el programa Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics Inc. El software permite seguir manualmente la trayectoria de células seleccionadas y exportar luego las coordenadas ($P_j = p_j(t_i) = x_j(t_i), y_j(t_i)$, $i = 1, 2, \dots, n$; Figura B.15). Por simplicidad y conveniencia se designó a la posición del núcleo celular como la posición de la célula y sólo se siguieron las trayectorias de las células ubicadas en una región del borde de la colonia equivalente a 3 diámetros celulares. Las trayectorias obtenidas de esta manera tienen menos de un 10 % de diferencia con trayectorias obtenidas a partir del centroide celular, calculado a partir del dibujo manual de los contornos celulares. Para el caso de las trayectorias de las células provenientes de CQRs (Figura B.15a) se determinó la posición del CM a t_0 , la distancia entre el CM y cada célula ($r_i(t)$) y el ángulo correspondiente ($\Theta_i(t)$).

Las trayectorias obtenidas se usaron para calcular diversos parámetros de la movilidad celular. La velocidad se calculó como:

$$\langle V_i \rangle = \frac{p_j(t_{i+1}) - p_j(t_i)}{\Delta t} \quad (\text{B.10})$$

También se evaluaron las componentes de velocidad paralelos (V_{par}) y perpendiculares (V_{per}) al frente de la colonia dentro del intervalo $15 \leq \Delta t \leq 45$ min (Figura B.15b). Las mismas trayectorias se obtuvieron para todos los Δt , considerando los errores en la determinación de la posición del núcleo.

El desplazamiento cuadrático medio (msd) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$msd = \langle (x_i(t_0 + \Delta t_R) - x_i(t_0))^2 + (y_i(t_0 + \Delta t_R) - y_i(t_0))^2 \rangle \quad (\text{B.11})$$

donde t_0 es el tiempo inicial del intervalo de registro (Δt_R). Los datos obtenidos para todos los valores de t_0 y todas las trayectorias celulares se promediaron siguiendo referencias bibliográficas [B.18].

La dependencia del msd con Δt_R puede ser expresada con la ley de potencia:

$$msd \propto \Delta t_R^b \quad (\text{B.12})$$

donde el exponente b es 1 para un desplazamiento al azar y 2 para un movimiento balístico [B.19].

Velocimetría por análisis de imágenes de partículas

La movilidad celular también se estudió mediante velocimetría por análisis de imágenes de partículas (PIV) [B.20] usando el software PIVlab 1.35 [B.21] de MATLAB (The MathWorks, Natick, MA). Esta técnica permite obtener a partir de secuencias de imágenes el campo de velocidades de flujos de manera instantánea y con alta resolución espacial. La técnica se basa en el cálculo de la correlación entre ventanas en imágenes sucesivas para deducir desplazamientos locales. Tiene la ventaja de que permite analizar rápidamente todas las partes de la colonia, algo impracticable con los seguimientos manuales.

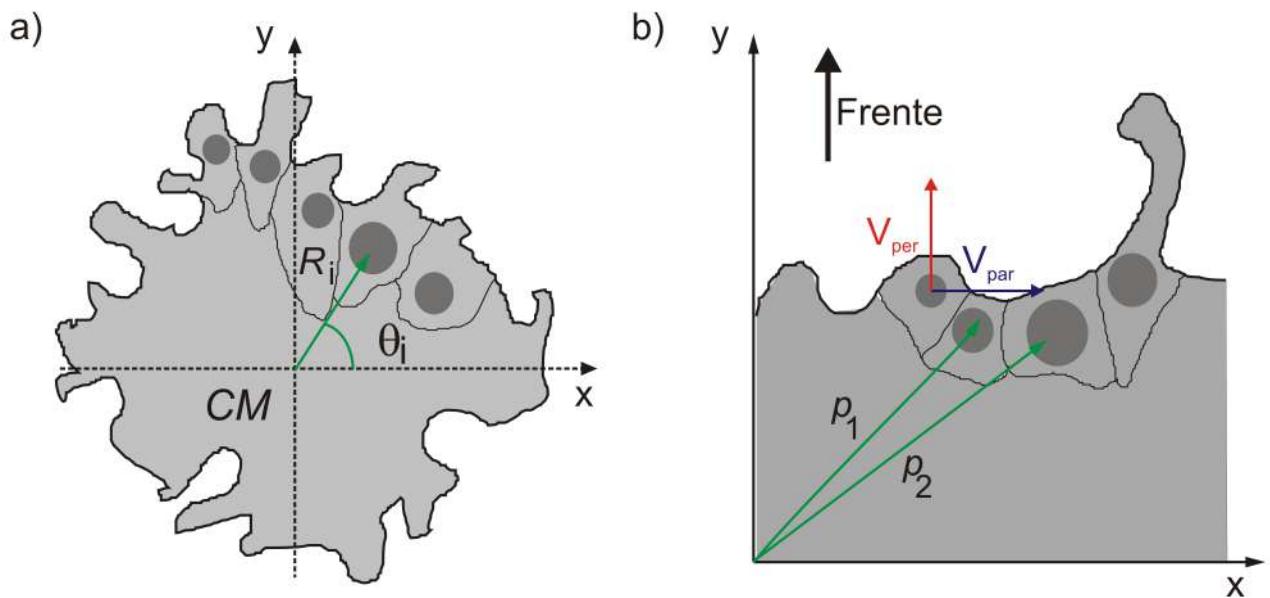


Figura B.15: Determinación de la posición de las células en una CQR (a) y CQL (b). La posición de las células en las CQRs se describió en función de la distancia al CM de la colonia a t_0 y el ángulo que forman con este (a). Los vectores de velocidad de las células pueden descomponerse en el componente perpendicular (V_{per} , vector rojo) y el componente paralelo (V_{par} , vector azul). El componente perpendicular es aquel que forma un ángulo de 90° con respecto al frente de la colonia a t_0 (y un ángulo de 0° con respecto a la dirección de avance del frente). El componente paralelo es aquel que forma un ángulo de 0° con respecto al frente de la colonia a t_0 (y un ángulo de 90° con respecto a la dirección de avance del frente).

Los campos de velocidades se determinaron a partir de secuencias de imágenes tomadas cada $\Delta t = 15$ minutos y analizadas con ventanas de interrogación de 82 x 82 píxeles con 50 % de superposición. Para mejorar la calidad de los resultados obtenidos, las imágenes fueron pre-procesadas mediante ecualización adaptativa del histograma con contraste limitado (CLAHE) [B.21]. Finalmente, los vectores obtenidos fueron validados, promediados y suavizados para su posterior análisis y presentación como mapas vectoriales.

B.3.3. Análisis cuantitativo de las adhesiones focales

El análisis de los contactos focales de las imágenes de inmunofluorescencia de vinculina se realizó siguiendo el procedimiento indicado en [B.22]. Las imágenes de inmunofluorescencia tomadas con aumento de 400X se pasaron a formato de mapa de bits (16 bit de color) y se procesaron usando el programa de dominio público ImageJ (desarrollado por “National Institute of Health”) y los complementos Log3D y CLAHE. El protocolo consistió en:

1. Sustracción de fondo utilizando un “sliding paraboloid” con un radio de 35 píxeles.
2. Aumento del contraste de la imagen utilizando el complemento CLAHE con: tamaño de bloque = 19; intervalos de histograma = 256; pendiente máxima = 3.
3. El fondo se minimizó aún más utilizando el filtro exponencial (EXP).
4. Se aplicó el filtro Log3D con parámetros de referencia: X = 2; Y = 2.
5. El brillo y el contraste se ajustaron automáticamente.
6. Se corrió el comando “threshold” ajustado en forma automática. Este comando convierte una imagen de escala de grises en una imagen binaria, es decir, en blanco y negro.
7. Se ejecutó el comando “analizar partículas” con los parámetros: tamaño = 50-infinito; circularidad = 0.00-0.99.

Los resultados obtenidos se procesaron con planillas de cálculo y el programa OriginLab 8.0.

Bibliografía

- [B.1] E. Callaway. “Most popular human cell in science gets sequenced”. *Nature*, 2013. (Citado en página 59.)
- [B.2] S. Merino, H. Schift, A. Retolaza & T. Haatainen. “The use of automatic demolding in nanoimprint lithography processes”. *Microelectronic Engineering*, 2007. **84**(5-8), 958–962. (Citado en página 67.)
- [B.3] A. S. G. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, F. Lawrie, X. F. Walboomers, H. J. E. Croes, L. A. Ginsel & J. A. Jansen. “Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene”. *Biomaterials*, 1998. **19**(20), 1861–1868. (Citado en página 67.)
- [B.4] A. S. G. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes & F. Lawrie. “Adhesion of cells to polystyrene surfaces”. *Journal of Cell Biology*, 1983. **97**(5 I), 1500–1506. (Citado en página 67.)
- [B.5] A. L. Hillberg, C. A. Holmes & M. Tabrizian. “Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films.” *Biomaterials*, 2009. **30**(27), 4463–70. (Citado en páginas 72, 181, 190, 232 y 256.)
- [B.6] L. Han, Z. Mao, J. Wu, Y. Guo, T. Ren & C. Gao. “Directional cell migration through cell-cell interaction on polyelectrolyte multilayers with swelling gradients”. *Biomaterials*, 2013. **34**(4), 975–984. (Citado en páginas 72, 203 y 211.)
- [B.7] M. A. Zalazar, F. A. Guarneri, M. C. Vol, E. Dvorkin & M. B. Aires. “Análisis y evaluación del comportamiento de sensores piezoelectrinos”. *Mecánica computacional*, 2010. (Citado en página 73.)
- [B.8] M. C. Dixon. “Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions.” *Journal of biomolecular techniques*, 2008. **19**(3), 151–8. (Citado en páginas 73, 74 y 75.)
- [B.9] J. M. Silva, J. R. García, R. L. Reis, A. J. García & J. F. Mano. “Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate”. *Acta Biomaterialia*, 2017. **51**, 279–293. (Citado en página 75.)
- [B.10] S. Liu & Y. Wang. “Application of AFM in microbiology: a review”. *Scanning*, 2010. **32**(2), 61–73. (Citado en páginas 75, 76 y 77.)
- [B.11] N. Jalili & K. Laxminarayana. “A review of atomic force microscopy imaging systems: Application to molecular metrology and biological sciences”. *Mechatronics*, 2004. **14**(8), 907–945. (Citado en páginas 75 y 77.)

- [B.12] E. A. López & S. D. Solares. “El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones”. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 2014. **28**, 14–23. (Citado en páginas 75 y 77.)
- [B.13] R. J. Good. “Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review”. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 1992. **6**(12), 1269–1302. (Citado en página 78.)
- [B.14] J. D. Clogston & A. K. Patri. “Zeta Potential Measurement”. En “Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery”, páginas 63–70. Springer, 2011. (Citado en página 78.)
- [B.15] B. Ranjbar & P. Gill. “Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review”. *Chemical Biology & Drug Design*, 2009. **74**(2), 101–120. (Citado en páginas 81 y 82.)
- [B.16] C. C. Chusuei & D. Goodman. “X-Ray Photoelectron Spectroscopy”. En “Encyclopedia of Physical Science and Technology”, páginas 921–938. Elsevier, 2003. (Citado en página 83.)
- [B.17] J. F. Watts. “X-ray photoelectron spectroscopy”. *Vacuum*, 1994. **45**(6-7), 653–671. (Citado en página 83.)
- [B.18] L. Diambra, L. Cintra, Q. Chen, D. Schubert & L. d. F. Costa. “Cell adhesion protein decreases cell motion: Statistical characterization of locomotion activity”. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2006. **365**(2), 481–490. (Citado en página 85.)
- [B.19] L. Li, B. H. Wang, S. Wang, L. Moalim-Nour, K. Mohib, D. Lohnes & L. Wang. “Individual cell movement, asymmetric colony expansion, rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells.” *Biophysical Journal*, 2010. **98**(11), 2442–51. (Citado en páginas 36 y 85.)
- [B.20] L. Petitjean, M. Reffay, E. Grasland-Mongrain, M. Poujade, B. Ladoux, A. Buguin & P. Silberzan. “Velocity fields in a collectively migrating epithelium.” *Biophysical Journal*, 2010. **98**(9), 1790–800. (Citado en páginas 85 y 161.)
- [B.21] W. Thielicke & E. J. Stamhuis. “PIVlab – Towards User-friendly, Affordable and Accurate Digital Particle Image Velocimetry in MATLAB”. *Journal of Open Research Software*, 2014. **2**(1), p.e30. (Citado en páginas 85 y 87.)
- [B.22] U. Horzum, B. Ozdil & D. Pesen-Okvur. “Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions”. *MethodsX*, 2014. **1**, 56–59. (Citado en página 87.)

Capítulo 1

Fenotipo celular y fenomenología de la propagación de colonias en sistemas multicelulares de distintas geometrías

1.1. Introducción

Los sistemas multicelulares pueden estudiarse en distintas escalas de espacio y tiempo [1.1]. Esto es así porque el crecimiento global de la colonia tiene lugar en la escala de los días y los cientos de μm , la migración celular tiene lugar en la escala de los minutos y unos pocos μm y las interacciones de las células con el substrato pueden estudiarse en la escala de los segundos y los nanómetros. Si bien todos estos procesos pueden analizarse de forma separada, un estudio del sistema en diferentes escalas permitiría describir, modelar y predecir como los cambios en las características microscópicas del sistema (por ejemplo la movilidad celular) afectaran las características macroscópicas del mismo (por ejemplo, la propagación del frente de la colonia).

Este capítulo trata sobre la migración celular en colonias de células HeLa propagándose en 2 dimensiones. La migración celular, que como hemos visto juega un papel importante en muchos procesos fisiopatológicos, también tiene un rol fundamental en la cinética de propagación de las colonias. Las células interactúan con sus vecinas y el entorno, y se mueven cooperativamente generando anisotropías en la propagación del frente de la colonia. Se describen diferentes aspectos dinámicos de frentes de CQRs y CQLs bajo condiciones de entorno constantes. Los mismos individuos que forman la colonia generan heterogeneidades espacio-temporales que afectan a la movilidad celular y modifican el régimen de propagación de las colonias. Las heterogeneidades se presentan como efectos que van más allá de la diversidad genética y tienen origen en las interacciones físicas que estimulan distintas señales bioquímicas que a la vez condicionan a las interacciones que le dan origen.

En este capítulo se describen las trayectorias celulares para CQRs con distintas poblaciones celulares iniciales (N_0) y CQLs. La velocidad de desplazamiento del frente de crecimiento sigue un crecimiento exponencial para CQRs con $N < 1000$ células y un crecimiento a velocidad constante para N mayores. Por otro lado, las CQLs solo presentan el régimen de crecimiento a velocidad constante. A partir de las trayectorias celulares se analiza la movilidad de las células individuales y los efectos de “amontonamiento celular”, esto es, el aumento local de la densidad en distintas escalas espaciales. Las características de la movilidad celular se correlacionan con los régimenes de propagación de las colonias. Estos efectos de “amontonamiento” son más importantes en las CQRs con poblaciones grandes ($N > 1500$ células) y en las CQLs. La cuantificación del desplazamiento cuadrático medio y los

desplazamientos laterales, entre otras características, indican que las movilidad celular presenta contribuciones de desplazamientos aleatorios y movimientos altamente direccionales, dependiendo de la distribución de la densidad celular en la colonia. La contribución relativa de cada uno depende del número de células, de las heterogeneidades locales de la colonia y de la geometría de crecimiento. Resultan entonces trayectorias celulares sesgadas que son compatibles con las predicciones del modelo de crecimiento de interfases propuesto por Kardar-Parisi-Zhang (KPZ), que es de carácter general y se aplica a cualquier interfase, sea de origen biológico o inorgánico. Este modelo de crecimiento que describe el avance del frente de la colonia, al menos en cierto intervalo de tiempo y tamaño, incluye un término no lineal en la variación de altura del frente que puede relacionarse con las características de las trayectorias celulares.

1.2. Resultados

1.2.1. Cinética de propagación de colonias en 2D

Los aspectos dinámicos de la propagación de las colonias comprenden varias escalas espacio-temporales, dependiendo de los procesos observados: la cinética de duplicación celular y su contribución al crecimiento de las colonias; la movilidad de cada célula y el desarrollo de la rugosidad de las colonias.

La constante de duplicación celular promedio se determinó siguiendo la evolución de las CQRs con poblaciones iniciales que cambiaron desde $4 \leq N_0 \leq 100$ a $N \sim 1000$ células en aproximadamente 15 días (Figura 1.1). La cinética de crecimiento de estas colonias expresada en términos del número de células en función del tiempo siguió, durante todo el tiempo en que fue posible contar el número de células, una relación exponencial:

$$\frac{N}{N_0} = e^{<k_N>t} \quad (1.1)$$

donde $<k_N>$, la constante promedio de primer orden, se relaciona con la inversa del tiempo de duplicación promedio $<\tau_D>$:

$$<k> = \frac{\ln 2}{<\tau_D>} \quad (1.2)$$

A partir de los gráficos de log (N/N_0) en función de t (Figura 1.2) resultó que $<k_N> = 4.2 \pm 0.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ y entonces $<\tau_D> = 1660 \pm 280 \text{ min}$. El tiempo de duplicación promedio de células HeLa en un cultivo disperso es de aproximadamente 1440 min [1.2, 1.3].

En términos de $<R>$ las CQRs con $N_0 < 1500$ células presentan un régimen de crecimiento exponencial seguido de uno a velocidad promedio de desplazamiento del frente ($<V_F>$) constante. La fase exponencial tiene lugar desde t_0 hasta el tiempo en que la colonia alcanza un $N \sim 1500$ células, momento en el que puede observarse la transición al régimen de $<V_F>$ constante (Figura 1.1 y 1.3). El tiempo al que ocurre esta transición depende de N_0 y se denomina t_c . El $<R>$ de la colonia cuando ocurre la transición está en el rango 300 - 400 μm .

Por otro lado, es importante notar que tanto las CQRs con poblaciones iniciales grandes ($N_0 > 1500$ células) como las CQLs alcanzan inmediatamente el régimen de velocidad constante con $<V_F> = 0.09 \pm 0.05 \mu\text{m min}^{-1}$, y mantienen este valor al menos dentro de la escala temporal de estos experimentos (Figura 1.1).

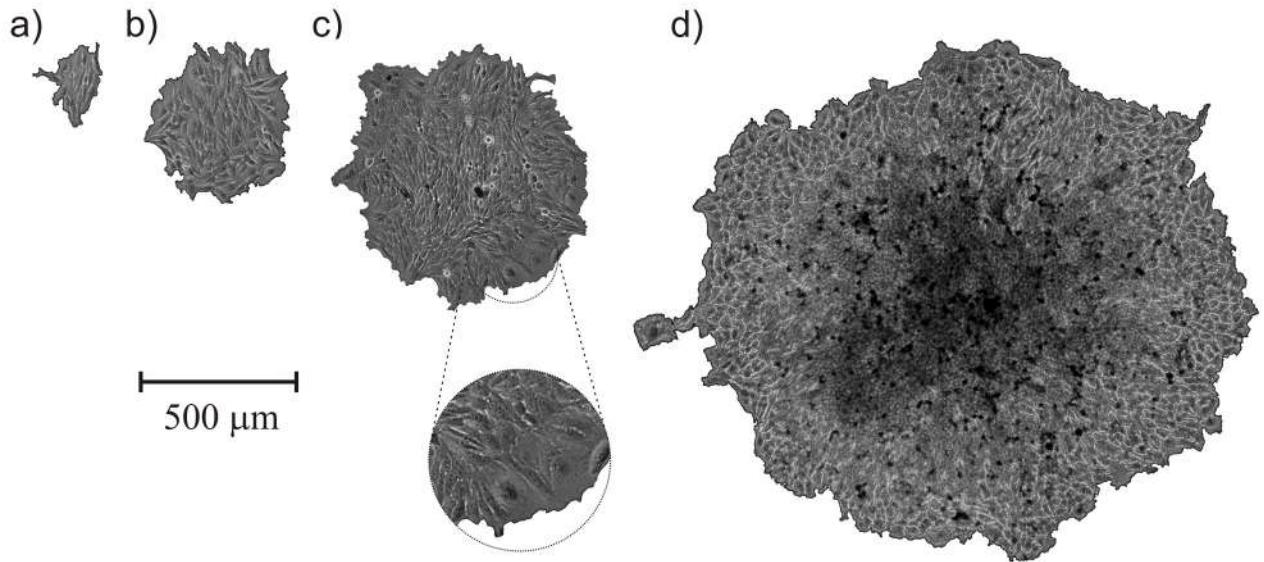


Figura 1.1: Crecimiento de una CQR de células HeLa: a) $t = 0$ min; b) $t = 5612$ min; c) $t = 9220$ min; d) $t = 18130$ min. Se incluye una región aumentada del borde de la colonia c). Pueden observarse dominios de células en 3D (puntos gris oscuro o negros) en la región interior de la colonia d).

1.2.2. Cambios morfológicos en las colonias

Las colonias en crecimiento mostraron una serie de características morfológicas que dependieron de N . Las CQRs ($4 \leq N \leq 500$ células) exhibieron inicialmente frentes bidimensionales irregulares que tendieron progresivamente a formas quasi-circulares. Además, el tamaño medio y forma de las células permaneció prácticamente uniforme y las distancias célula-célula promedio se mantuvieron significativamente más grandes que para N grandes o las CQL.

Por otro lado, para $N > 1500$ células, a medida que se alcanzaba el régimen de $\langle V_F \rangle$ constante ocurrieron cambios en la distribución de tamaños y morfología celulares dando lugar a la aparición de distintas heterogeneidades. De este modo, las distancias célula-célula promedio disminuyeron yendo desde el borde exterior al interior de la colonia y se formaron dominios de pequeñas células ordenadas. Numerosos eventos que ocurrieron en la escala de las células, como la proliferación o muerte celular, o la formación de grandes células multi-nucleadas por fusión o duplicación del material genético sin citocinesis (Figura 1.4), llevaron a la aparición de estas heterogeneidades. Además, en la escala de la colonia, se observaron dominios de células alargadas que cambiaban su distribución espacial en la colonia, la formación de grupos celulares con características morfológicas definidas y con direccionalidades preferenciales; otros grupos de células se desprendieron de la colonia temporal o definitivamente, y en las regiones más internas de la colonia se observó la aparición de dominios 3D (Figura 1.1d). Todos estos eventos se pueden relacionar con los cambios en las características de la movilidad celular y en la transición cinética observada en la propagación de las colonias [1.4, 1.5].

1.2.3. Evolución de la densidad celular

Los cambios morfológicos descriptos indujeron la formación de dominios con distintas densidades celulares. El número de células por unidad de área ρ dependió tanto de N como

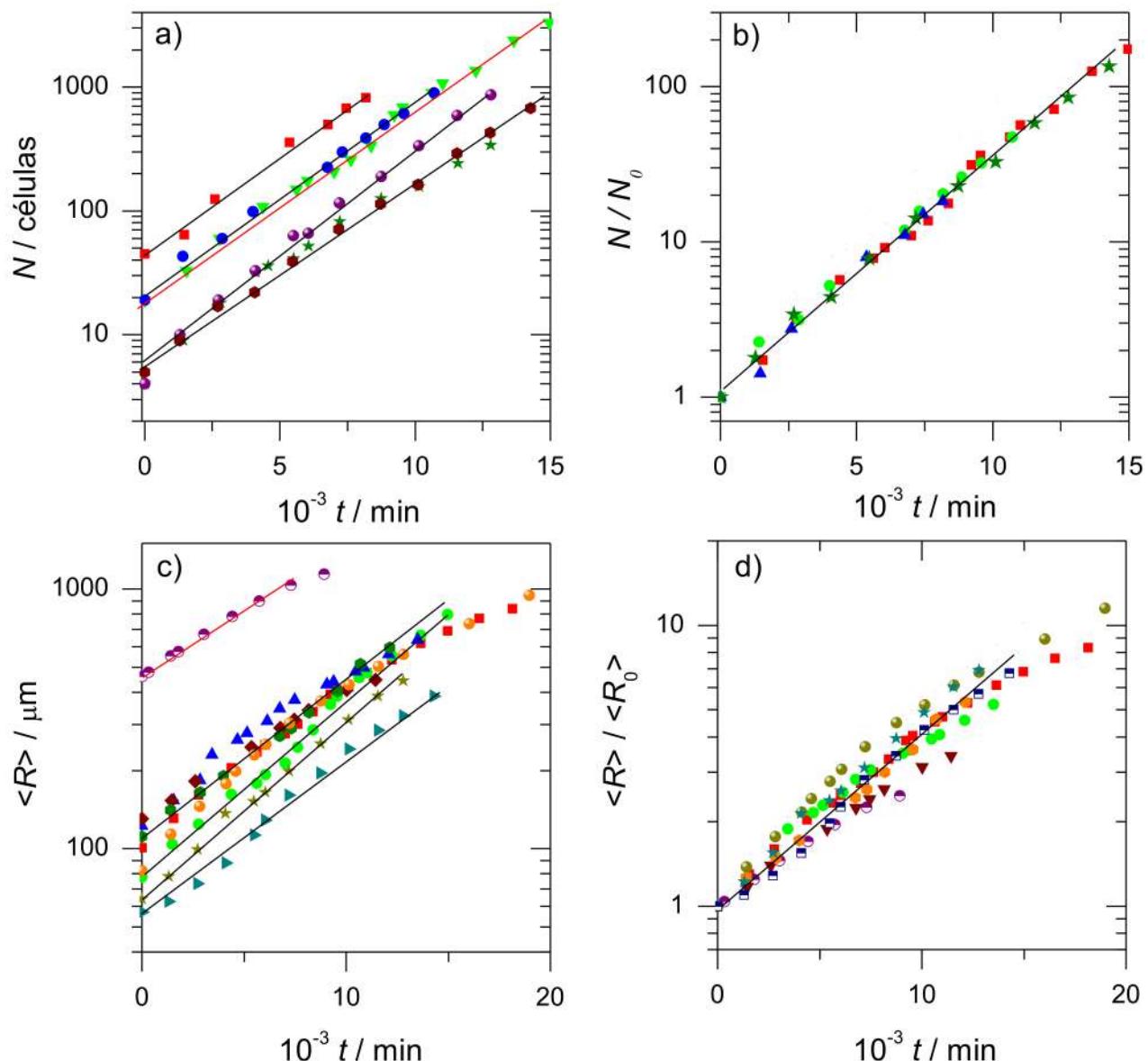


Figura 1.2: Evolución de N y $\langle R \rangle$ en función del tiempo para CQRs de células HeLa. $\log N$ y $\log \langle R \rangle$ en función del tiempo, a) y b) respectivamente. $\log N/N_0$ y $\log \langle R \rangle / \langle R_0 \rangle$ en función del tiempo, c) y d) respectivamente. N_0 y R_0 corresponden al número de células y el radio promedio de la colonia a $t = 0$ min.

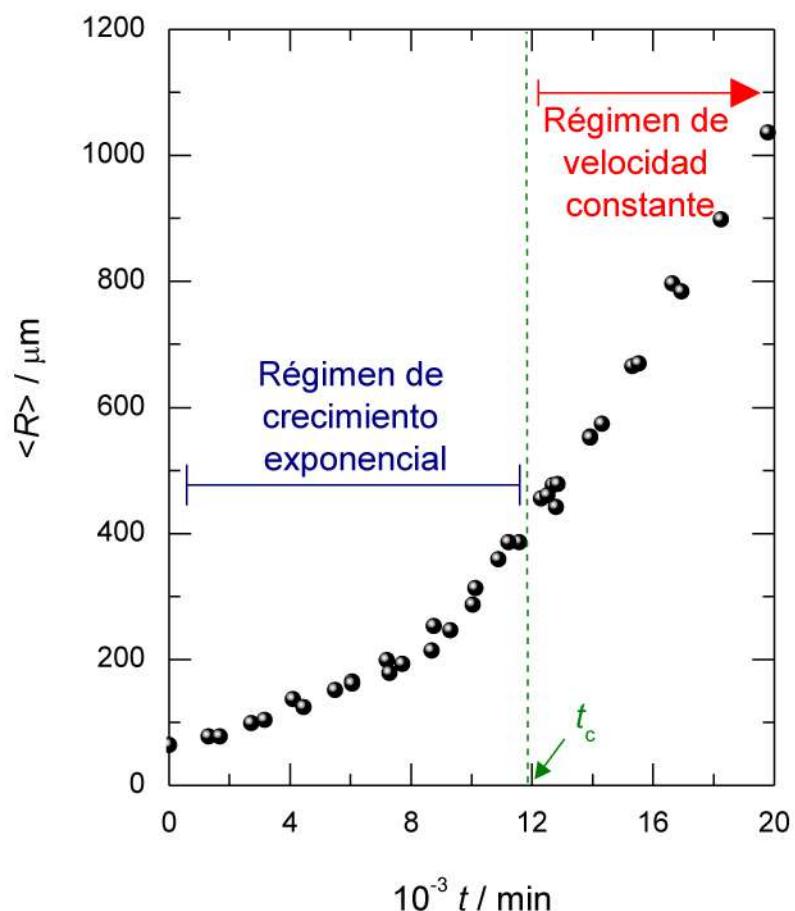


Figura 1.3: Gráfico de $\langle R \rangle$ en función de t para el crecimiento de CQRs de distintos N_0 y R_0 . Pueden observarse los dos regímenes cinéticos de propagación de las colonias y t_c .

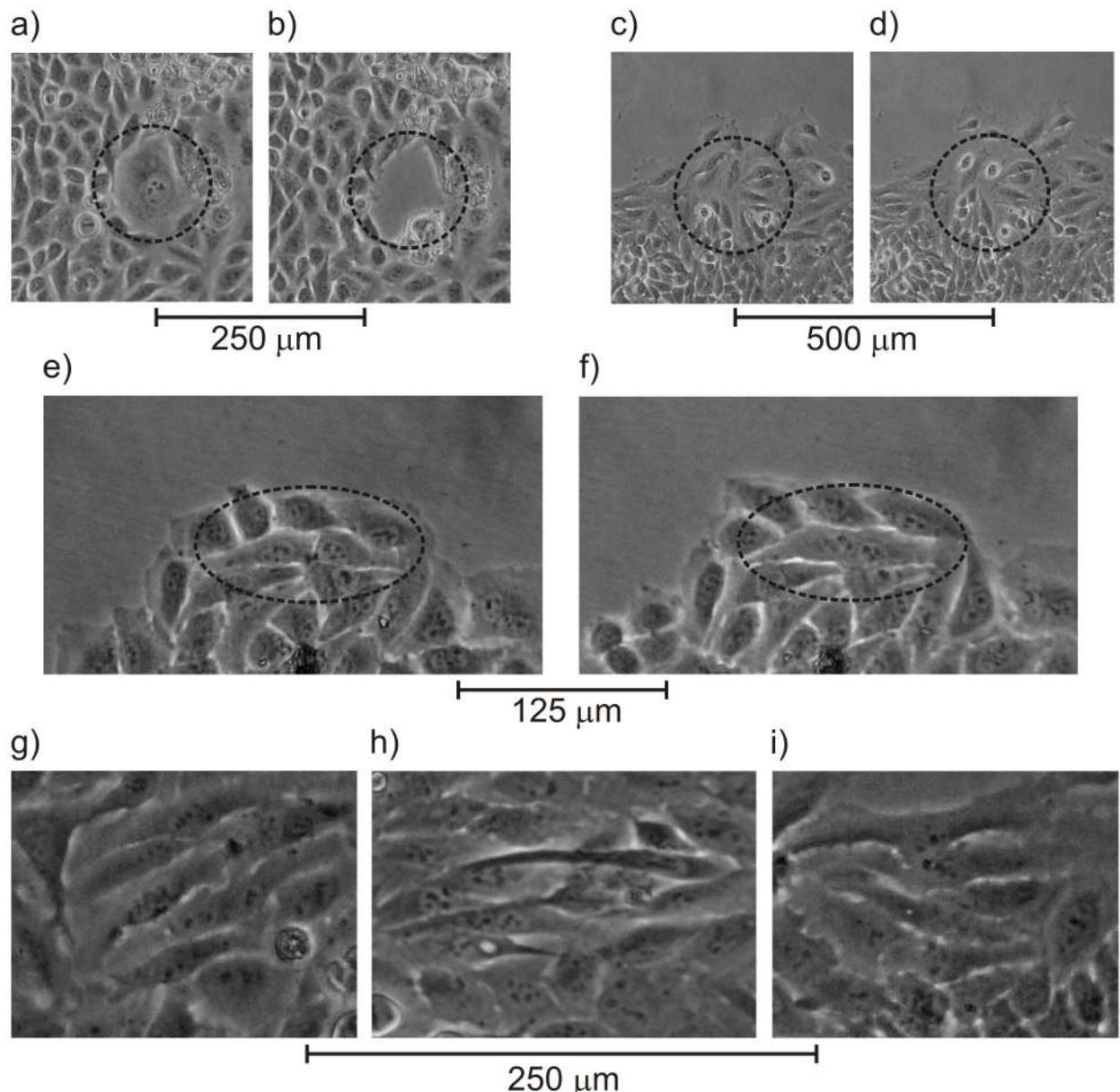


Figura 1.4: Dominios de la colonia con distintas características morfológicas debido a diversos eventos: a) y b) la muerte celular da lugar a la generación de espacios vacíos; c) y d) duplicaciones celulares; e) y f) fusión celular; g), h) e i) dominios de células alargadas que presentan estructuras ordenadas.

de la geometría de crecimiento de la colonia. Para CQRs con $N_0 < 100$ células, ρ aumentó yendo desde el borde de la colonia hacia el centro y este gradiente se hizo más pequeño al disminuir $< R >$ o t (Figura 1.5a). Por otra parte, para colonias con $N > 1500$ células (Figura 1.5b-c) el gradiente dentro de los $200 - 500 \mu\text{m}$ medidos desde el borde de la colonia hacia adentro permaneció constante en el tiempo.

Para las CQLs a t bajos, los perfiles de densidad celular obtenidos a partir de una sección de $2000 \mu\text{m}$ del frente (Figura 1.5d) fluctuaron alrededor de un valor constante, y tendieron a tener un gradiente similar a aquel obtenido para CQRs con $N > 1500$ células. Desde el inicio de estos experimentos, alrededor de 24 horas después de que se removió la máscara de Teflon, se obtuvo un perfil prácticamente estacionario de densidad celular.

Las restricciones impuestas por la geometría de crecimiento a t cortos se hicieron evidentes al analizar los perfiles de densidad (Figura 1.5d). Los gradientes de densidad medidos entre el borde de los frentes y $350 \mu\text{m}$ hacia adentro de estos arrojaron valores de $(9 \pm 1) \times 10^{-6}$ células μm^{-2} para las CQRs con $500 \leq N \leq 1500$ células, un valor mayor que los $(2 \pm 1) \times 10^{-6}$ células μm^{-2} para las colonias con $N > 1500$ células y los $(4 \pm 1) \times 10^{-6}$ células μm^{-2} para las CQLs. En las colonias con poblaciones celulares grandes ($N > 1500$ células), la menor densidad celular en el borde (y por tanto mayor tamaño celular) de las CQRs respecto a las CQLs pone de manifiesto la influencia de la geometría y de la disponibilidad de espacio libre para la propagación de las colonias en las morfologías celulares.

1.2.4. Movilidad de las células individuales

Trayectorias y datos de velocidad

Las trayectorias de las células se obtuvieron por seguimiento manual (como se indica en Materiales y Métodos) en secuencias de imágenes tomadas cada 30 min y permitieron estudiar las características de los movimientos celulares en las CQRs con diferentes valores de N_0 y en las CQLs (Figura 1.6). En las CQRs con poblaciones celulares bajas fue posible obtener la trayectoria de todas las células que la conformaban. En cambio, en las CQRs con grandes poblaciones o en las CQLs, sólo pudo seguirse un grupo representativo de células, sobre todo en el interior de las colonias donde la elevada densidad celular dificultaba el seguimiento. En estos casos se obtuvieron todas las trayectorias de las células cuyos núcleos estaban como máximo a 3 diámetros celulares del borde de la colonia.

En las CQRs con poblaciones celulares grandes, las células ubicadas en la capa más exterior de la colonia tuvieron trayectorias más largas y direccionaladas que aquellas células en colonias con valores bajos de N (Figura 1.6a). A su vez, en el borde de las CQLs, tanto las células “madres” como las células “hijas” resultantes de 85 eventos de duplicación mostraron trayectorias tortuosas similares con un desplazamiento neto perpendicular al frente de crecimiento (Figura 1.6 b, c y d). Muchas de las trayectorias mostraron movimientos laterales significativos, persistieron en su dirección de movimiento durante 300 min y recorrieron $150 \mu\text{m}$ en ese intervalo de tiempo.

Debido a la imposibilidad de obtener en forma feaciente, de acuerdo a nuestras condiciones experimentales, las trayectorias de todas las células en colonias con poblaciones grandes, resulta de interés conocer en qué regiones de la colonia la movilidad juega un rol más importante. Por este motivo se determinó la velocidad celular individual promedio de las células ubicadas en dos regiones rectangulares de una CQL (Figura 1.7a-b): la región I ($290 \times 450 \mu\text{m}^{-2}$) de alta ρ y la región II ($290 \times 600 \mu\text{m}^{-2}$) de baja ρ . Las trayectorias analizadas se obtuvieron en un intervalo de 12 h en el que el gradiente de densidad celular permaneció prácticamente constante. Cada región fue dividida en áreas contiguas más pequeñas de 290

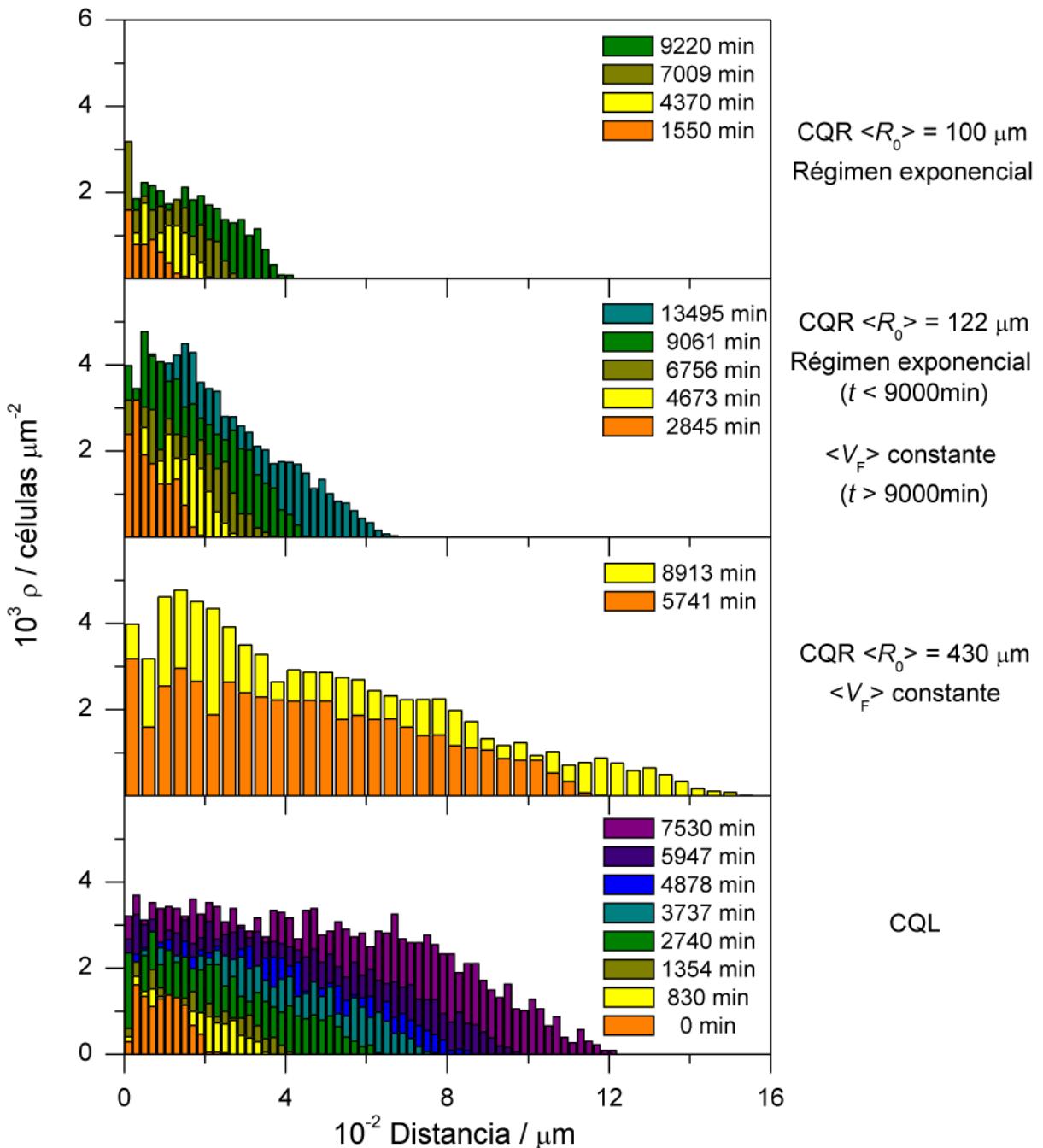


Figura 1.5: Perfiles de densidad desde el interior de la colonia hacia el borde de CQRs con distintos N y CQLs.

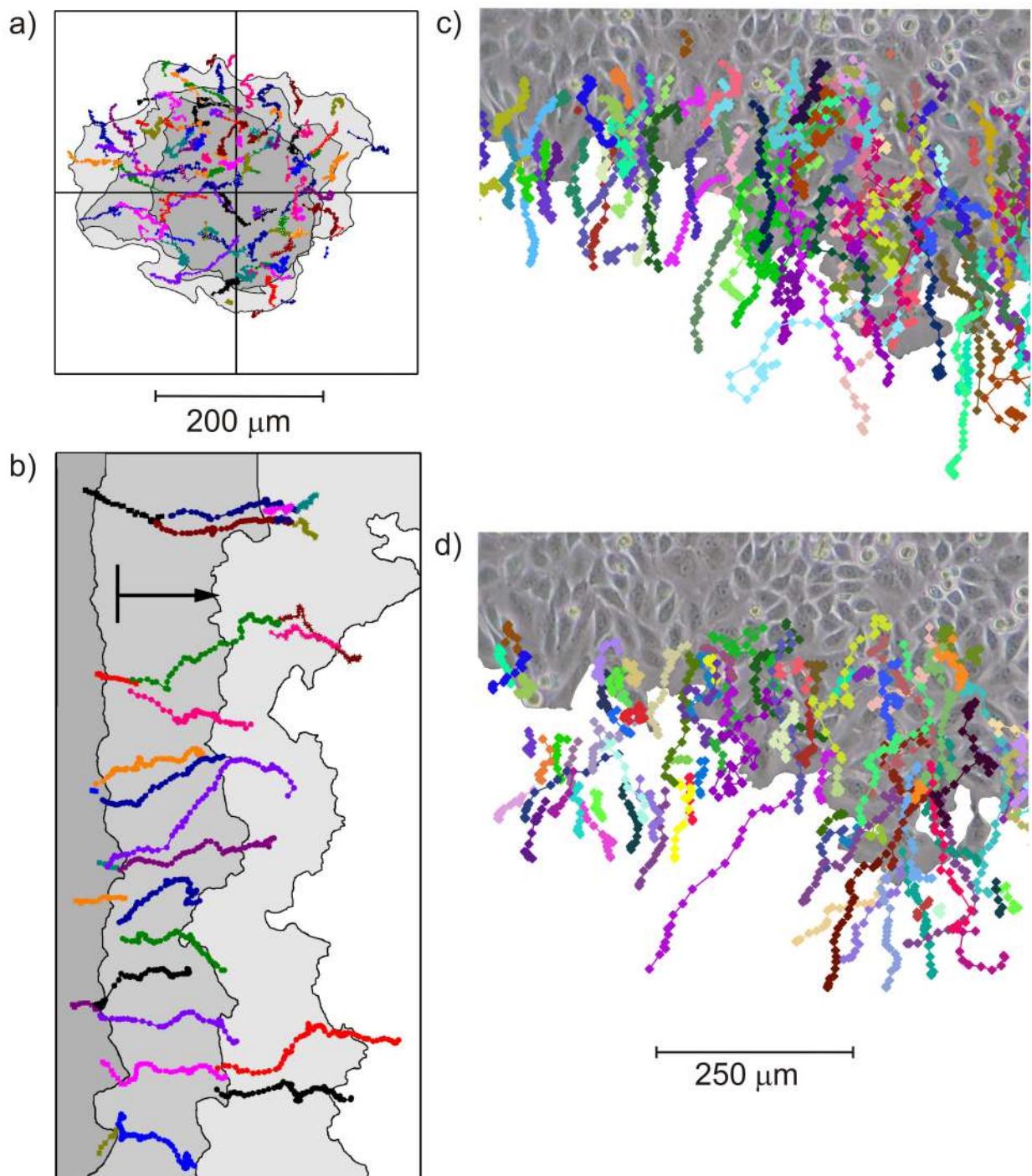


Figura 1.6: Trayectorias celulares individuales de CQRs a) y CQLs b) identificadas con diferentes colores. Se incluyen las trayectorias de las células “hijas”. La secuencia de imágenes utilizadas para obtener las trayectorias tiene un $\Delta t = 30$ min y una duración de 62 horas a) o 66 horas b). Los frentes de las colonias a intervalos de 18 horas están identificados con escala de grises. Imágenes iniciales de frentes de CQLs y las trayectorias de las células seleccionadas para su seguimiento c) y células “hijas” d) seguidas durante 27 horas.

$\times 75 \mu\text{m}^{-2}$ para evaluar las velocidades instantáneas perpendiculares promedio $\langle V_{\text{per}} \rangle$ y ρ local.

El valor de $\langle V_{\text{per}} \rangle$ en función de la distancia desde el borde de la colonia hacia el centro de las regiones I (Figura 1.7c) y II (Figura 1.7d) mostró que las velocidades celulares tienden a disminuir yendo desde el borde hacia el interior de la colonia, mientras que la ρ tiende a aumentar. A distancias de 225-300 μm del borde de la colonia, dependiendo de la densidad celular, los movimientos celulares se vuelven aleatorios y cortos, aportando poco al avance del frente. Eso permite enfocar, en el caso de colonias con poblaciones grandes, el análisis de la movilidad a la región del borde.

A partir de las trayectorias celulares evaluadas con un $\Delta t = 30$ min para CQRs con distintos $\langle R_0 \rangle$ y CQLs se construyeron los histogramas de velocidades instantáneas paralelas (V_{par}) y perpendiculares (V_{per}) (Figura 1.6). Las células analizadas estaban ubicadas inicialmente por dentro de una región comprendida entre el borde de la colonia y 250 μm hacia adentro, por lo que para las colonias pequeñas se analizaron todas las células y para las más grandes sólo las de la región del borde. En todos los casos, el máximo de los histogramas de V_{par} y la media de los datos presentan, a pesar de las fluctuaciones, valores cercanos a 0. Por otro lado, los máximos de los histogramas de V_{per} y los valores promedios aumentan, yendo desde CQR con $\langle R_0 \rangle$ bajos y régimen exponencial hacia $\langle R_0 \rangle$ grandes y régimen de desplazamiento del frente a $\langle V_F \rangle$ constante y CQLs, tendiendo a alcanzar un $\langle V_{\text{per}} \rangle$ constante. La dispersión de los datos de $\langle V_{\text{par}} \rangle$ y de $\langle V_{\text{per}} \rangle$ aumenta yendo desde las CQRs con régimen de crecimiento cinético exponencial a las CQRs que se propagan a $\langle V_F \rangle$ constante. Es de notar además, que la dispersión de las velocidades celulares de esta última es mayor que la observada en células de las CQLs.

La evolución de la trayectoria que recorre cada célula para $\Delta t = 30$ min depende de su direccionalidad (D/T) definida como el cociente entre la distancia entre la posición inicial y final de la célula (D) y la trayectoria total (T). En estos casos Δt es lo suficientemente grande como para despreciar la influencia de las fluctuaciones de las membranas celulares en las trayectorias. Los valores de direccionalidad pueden tomar valores en el rango $0 \leq D/T \leq 1$, siendo 0 el valor de direccionalidad esperado para una caminata aleatoria (movimiento caótico) y 1 para una trayectoria balística (movimiento direccional).

Los histogramas de direccionalidad (Figura 1.9a-d) dependieron tanto del régimen de crecimiento como de la geometría de la colonia. Los valores promedio (Figura 1.9e) de direccionalidad se desplazaron hacia valores más positivos a medida que aumentó el tamaño de la colonia, obteniendo valores máximos en las CQLs. La direccionalidad promedio fue de 0.35 para colonias con régimen exponencial de crecimiento y de 0.65 para frentes lineales. El aumento de la direccionalidad promedio de las trayectorias celulares al pasar de CQR con $\langle R_0 \rangle = 108 \mu\text{m}$ a $\langle R_0 \rangle = 200 \mu\text{m}$ fue de 45 %, mientras que de $\langle R_0 \rangle = 200 \mu\text{m}$ a $\langle R_0 \rangle = 590 \mu\text{m}$ fue del 15 % y de esta última QRC a QLC fue sólo de 10 %. Estos resultados indican que las trayectorias se vuelven más direccionales o balísticas yendo de d) a a).

El análisis de las trayectorias celulares individuales en la región del borde de CQRs y CQLs es útil además para interpretar las características dinámicas en regiones pequeñas del frente o para analizar las contribuciones de los movimientos colectivos en el desarrollo de protrusiones, lo que es de fundamental interés para entender cómo es el crecimiento de la interfase. Para esto, se siguieron las trayectorias celulares del borde de una CQR con N grande durante 30 h (Figura 1.10).

Durante las primeras 11 h muchas trayectorias celulares tuvieron grandes desplazamientos perpendiculares que contribuyeron a aumentar la altura de la protrusión (Figura 1.10a-c y g), mientras que en las 19 h restantes el ancho de la protrusión aumentó (Figura 1.10d-f).

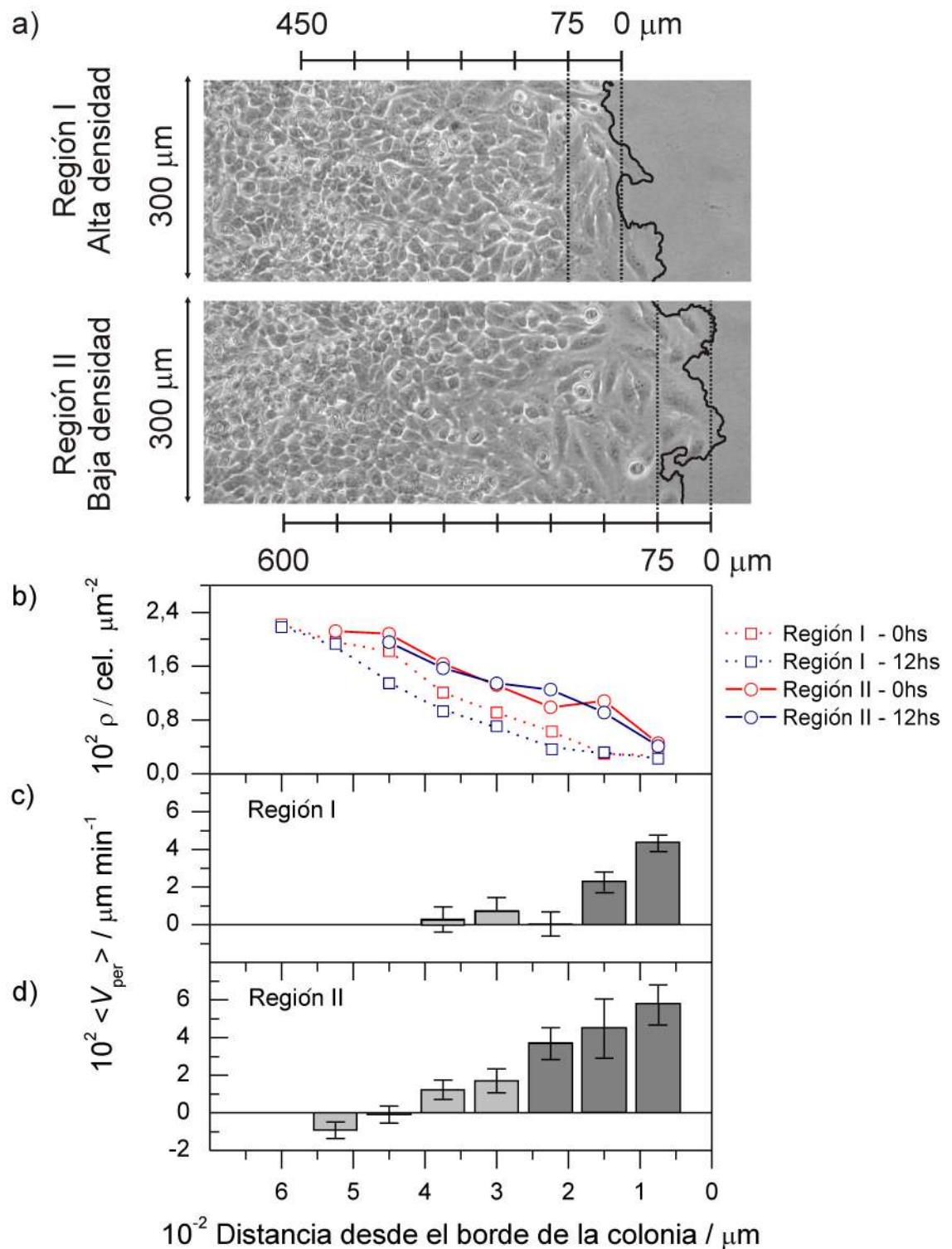


Figura 1.7: a) Regiones I (alta densidad celular) y II (baja densidad celular) de una CQL. Se muestran las áreas de $290 \times 75 \mu\text{m}^2$ en que se dividieron. b) Densidad celular local en función de la distancia al borde de la colonia para las áreas delimitadas en a) a $t = 0$ y $t = 12$ horas. c) y d) Valores de $<V_{\text{per}}>$ de las células ubicadas en las áreas de las regiones I y II en función de la distancia al borde de la colonia. Se incluyen los errores estandar. El ANOVA ($p = 0.05$) fue utilizado para probar las diferencias en $<V_{\text{per}}>$ resultantes de las áreas de las regiones I y II.

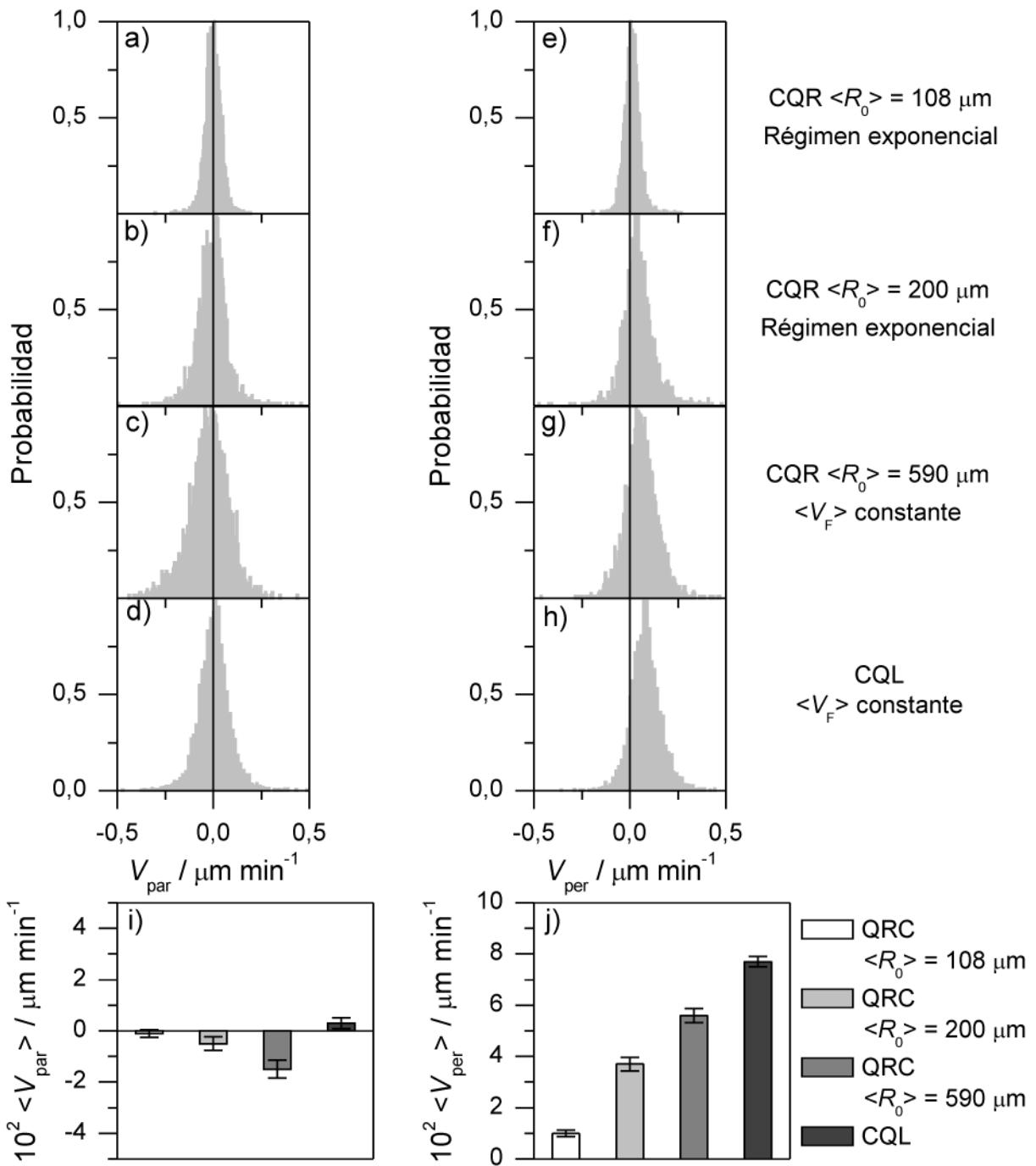


Figura 1.8: Histogramas de V_{par} a)-d) y de V_{per} e)-h) para CQRs de distintos $\langle R_0 \rangle$ y CQLs. Cada histograma contiene más de 2500 datos provenientes de 3 experimentos distintos. Se incluyen los valores promedio y sus respectivos errores estandar de V_{par} i) y de V_{per} j) de los histogramas mostrados en a)-h). El ANOVA mostró diferencias significativas ($p = 0.05$) entre todos los valores de $\langle V_{\text{per}} \rangle$ mientras que no se encontraron diferencias para los valores de $\langle V_{\text{par}} \rangle$.

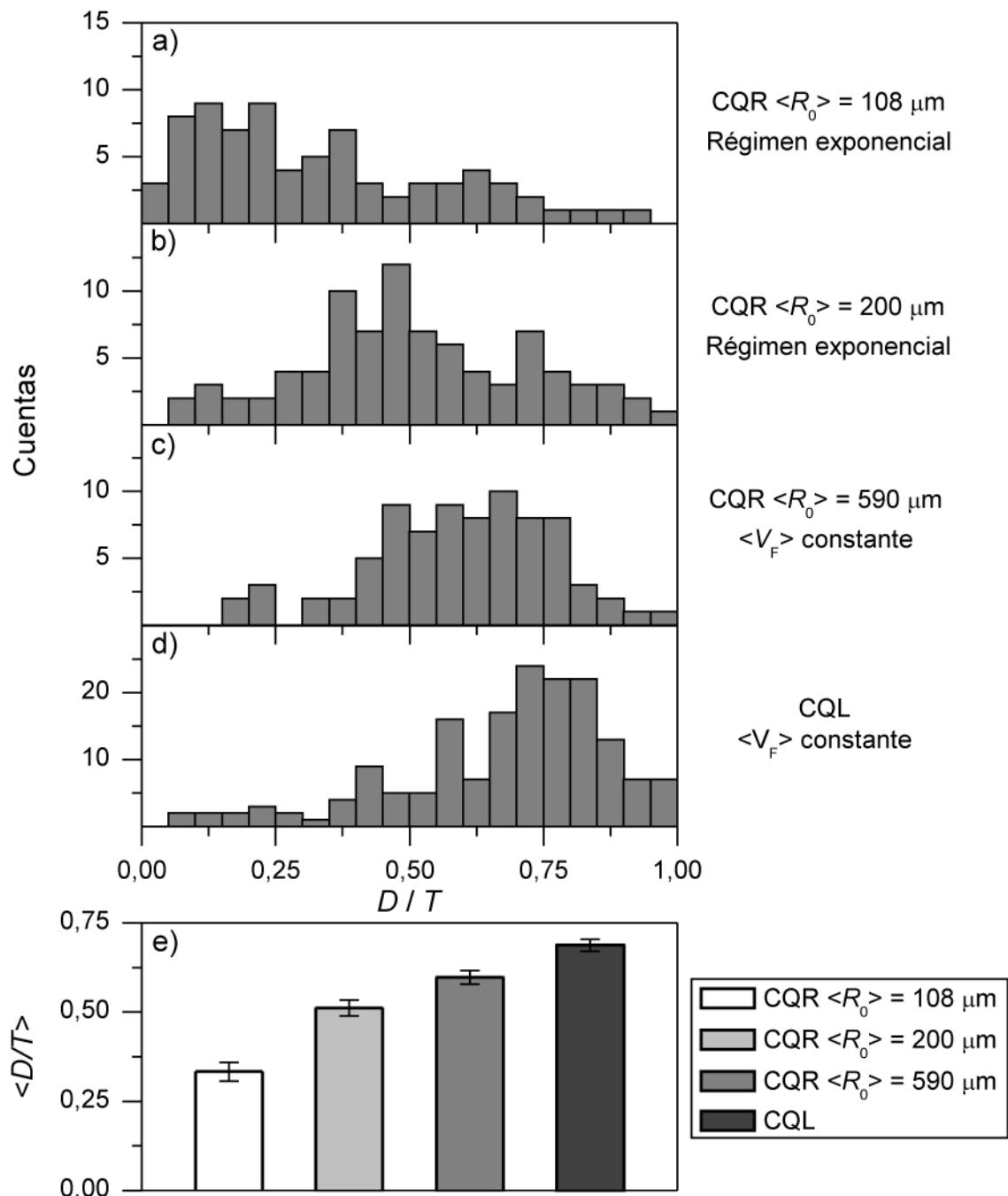


Figura 1.9: a)-d) Histogramas de las direccionalidades celulares individuales (D/T) para CQRs con distintos $\langle R_0 \rangle$ y CQLs. e) Los valores de direccionalidad promedio y sus respectivos errores estándar están indicados a la derecha de la figura. El ANOVA mostró diferencias significativas ($p = 0.05$) entre todas las medias.

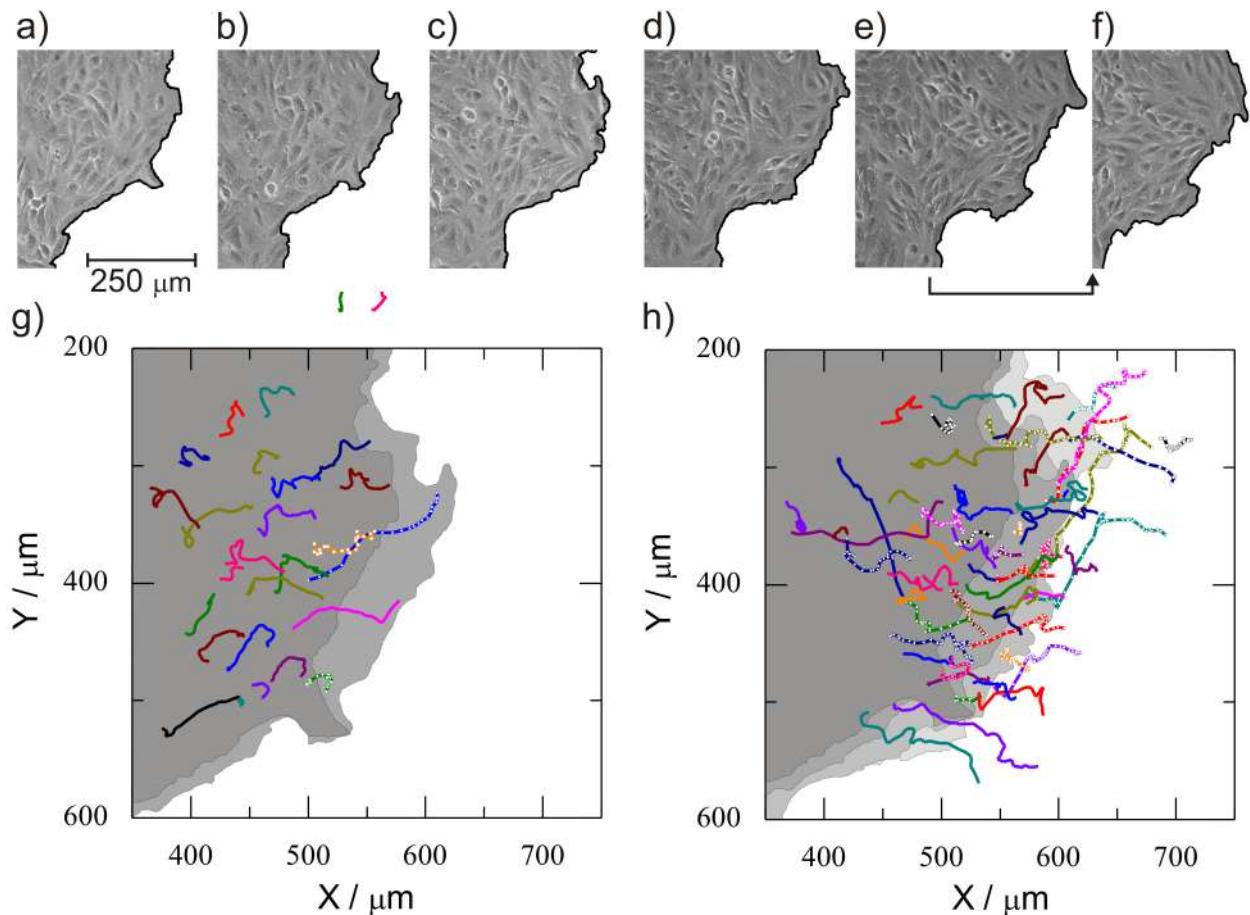


Figura 1.10: a)-f) Secuencia de imágenes tomadas con intervalos de 360 min de una región del frente de una CQR ($N > 1500$ células, $< R_0 > = 590 \mu\text{m}$). Se observa la formación de una protrusión y su posterior ensanchamiento. g)-h) Trayectorias celulares de la región mostrada en a)-f) analizadas a intervalos de 30 min. g) Formación de la protrusión: las trayectorias celulares seguidas durante 11 horas se corresponden a las imágenes a)-c). h) Ensanchamiento de la protrusión: las trayectorias celulares seguidas durante 19 horas se corresponden a las imágenes d)-f). La escala de grises en g) y h) indica el borde de la colonia a $t = 0$, 360 y 1080 minutos, respectivamente. Las células presentan desplazamientos laterales netos durante el ensanchamiento.

f) a expensas de células preexistentes o nuevas con trayectorias sumamente sesgadas con importantes contribuciones laterales (Figura 1.10h). Algunas pocas células tuvieron poca persistencia y se desplazaron en dirección opuesta a la del avance del frente.

Desplazamientos cuadráticos medios

Los msd calculados se representan en gráficos doble logarítmicos en función del Δt_R , tanto para CQRs (msd_{CQR}) propagándose bajo régimen de crecimiento exponencial como para CQLs (msd_{CQL}) (Figura 1.11). Los resultados muestran que los msd_{CQL} son un orden de magnitud mayores que los msd_{CQR} . Varias de las curvas de las células individuales poseen regiones rectas con valores de pendiente comprendidos entre 1 y 2. Algunas curvas tienen regiones con valores negativos de pendiente, un hecho que es consistente con los distintos eventos celulares y cambios morfológicos que tienen lugar en la colonia y que fueron descriptos previamente (Figura 1.4). Cabe aclarar que a valores mayores de Δt_R los errores en los valores

de msd son mayores debido a que el tamaño de la muestra disminuye. Aún así, la descripción realizada de los valores de msd muestra la influencia de las heterogeneidades de la colonia en la movilidad de cada célula.

Las curvas promedio de los msd (curvas rojas en Figura 1.11) pueden describirse mediante relaciones lineales con pendientes comprendidas entre 1 y 2 en determinado rango de Δt_R . Para las CQRs bajo régimen de crecimiento exponencial la pendiente promedio tuvo un valor de 1.4 ± 0.1 para $120 \leq \Delta t_R \leq 750$ min, mientras que para las CQLs fue de 1.7 ± 0.1 para $90 \leq \Delta t_R \leq 700$ min (Figura 1.11). Estos rangos de Δt_R dependen tanto de $\langle R_0 \rangle$ como de la geometría de la colonia. Las curvas de msd promedio tanto para CQRs como para CQLs tienden a dos rectas asintóticas, una con pendiente igual a 1 a Δt_R muy bajos y otra con pendiente igual a 2 a Δt_R altos. Para $\Delta t_R < 400$ min las CQRs presentan numerosas células cuyos msd presentan relaciones lineales con pendientes cercanas a 1 en la representación de $\log msd$ vs $\log \Delta t_R$, mientras que para las CQLs presentan pendientes más cercanas a 2.

Influencia de las células vecinas

La relación entre la velocidad instantánea de cada célula y la densidad celular local (Figura 1.7) permite inferir que la movilidad celular está influenciada por las células vecinas, más allá del régimen de crecimiento. Esta dependencia puede ser analizada utilizando una sencilla estrategia. Se consideró un dominio circular de $130 \mu\text{m}$ de diámetro alrededor de una célula central de referencia que está rodeada por un número determinado de células vecinas. La célula de referencia se localizó en la zona del borde de la colonia (caso I, Figura 1.12) o en una región 2D del interior de la colonia (caso II, Figura 1.13). Se obtuvieron las coordenadas del núcleo de las células vecinas mientras este permaneciera dentro del círculo. Para ambos casos la dirección del movimiento de la célula de referencia fue desde dominios con mayor densidad celular hacia dominios con menor densidad celular.

Para el caso I, la célula de referencia posee la mayoría de sus vecinos en la zona superior derecha de la región circular (Figura 1.12a) y la célula se mueve hacia la zona inferior izquierda (Figura 1.12b-c). A medida que el frente de la colonia crece, la célula de referencia comienza a variar su dirección de movimiento levemente hacia la derecha ya que en esa zona disminuye el número de vecinos (Figura 1.12f).

Para el caso II, la densidad de las células vecinas es significativamente superior respecto a la del caso I (Figura 1.13). Al principio, la posición de la célula de referencia fluctúa alrededor de su posición inicial (Figura 1.13a). Posteriormente la densidad de las células vecinas aumenta en la región inferior izquierda del dominio circular, por lo que la célula se mueve hacia arriba a la derecha (Figura 1.13b-c). Despues su dirección cambia hacia la izquierda debido a un aumento del número de vecinos en la región superior derecha. Hay intervalos de 150 minutos donde la célula de referencia no sufre desplazamientos significativos, aunque está sujeta a deformaciones de su citoplasma (Figura 1.13d y f). Esta situación es improbable para el caso I ya que existe un claro gradiente en la densidad celular durante el intervalo de tiempo considerado.

1.3. Discusión

1.3.1. Estudio de los aspectos cinéticos y morfológicos de las colonias de células HeLa

La dependencia con N de la transición cinética de un régimen de propagación exponencial a uno con $\langle V_F \rangle$ constante (Figuras 1.2 y 1.3) se conoce para distintas líneas

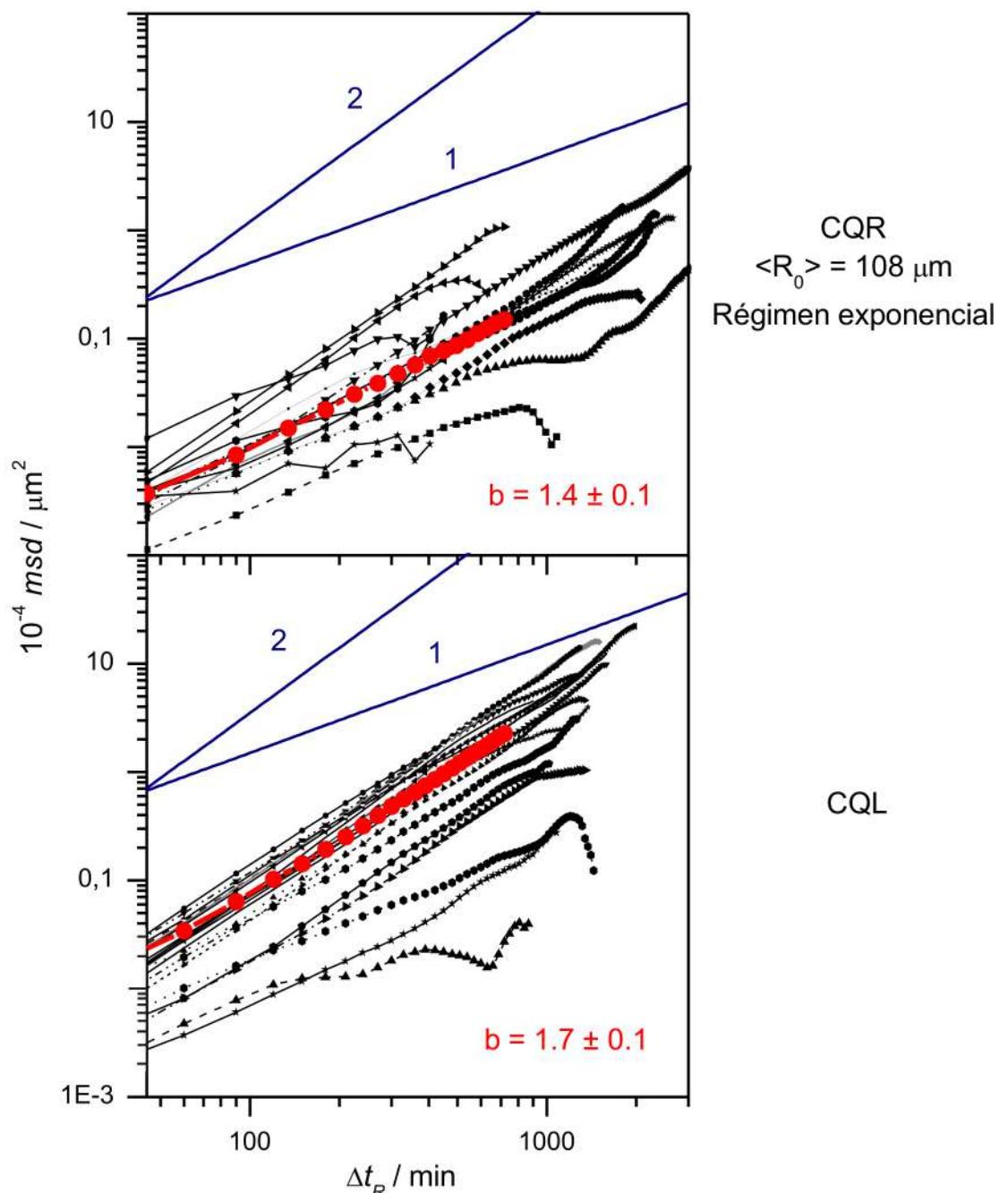


Figura 1.11: Gráficos de $\log \text{msd}$ vs $\log \Delta t_R$ de las trayectorias de células en CQRs en régimen exponencial y CQLs. Se incluye en rojo la curva de msd promedio junto con su error estandar en el intervalo de 30-1800 minutos y el valor de su pendiente, b . Las líneas con las pendientes límites de 1 y 2 se incluyen como guía.

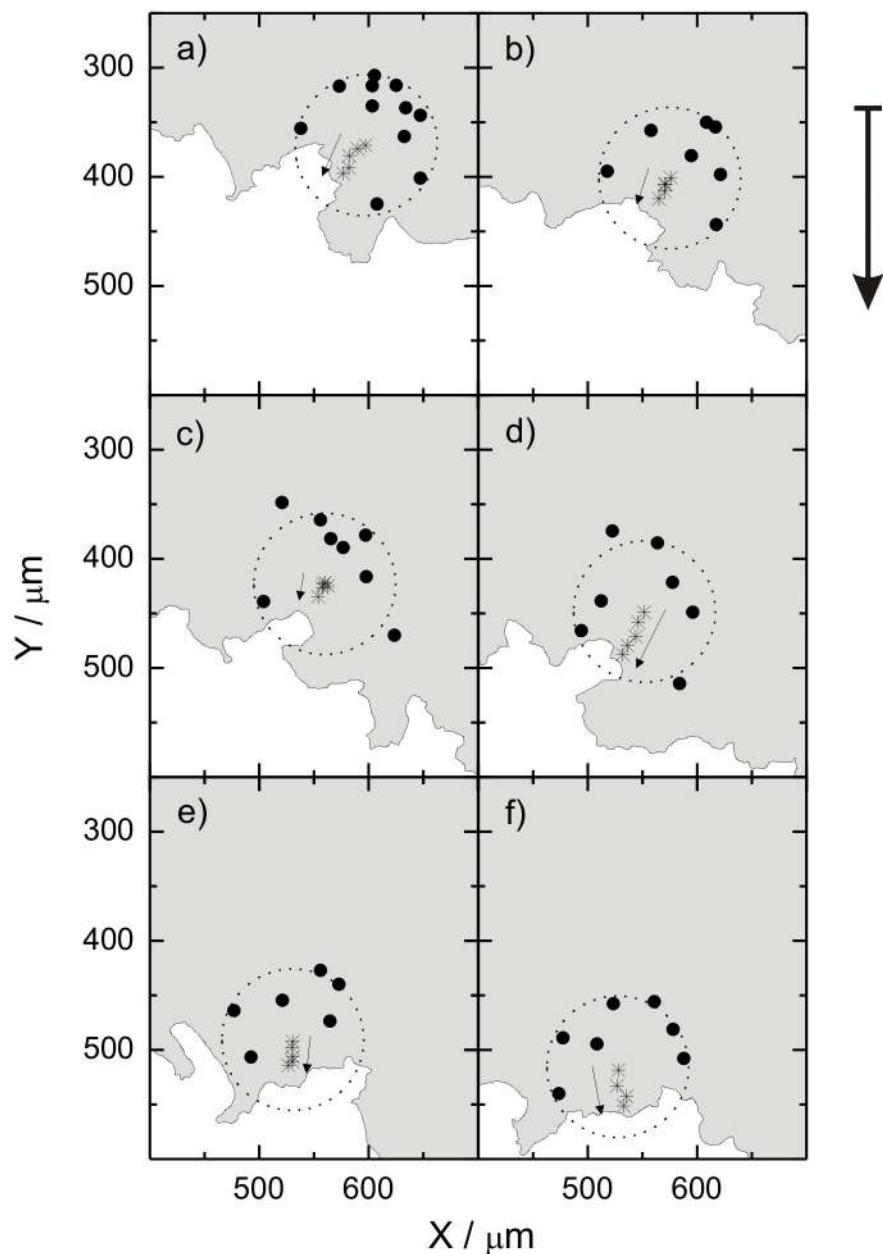


Figura 1.12: Desplazamientos de una célula de referencia (estrellas) del borde de la colonia localizada en el centro de una región circular de $130 \mu\text{m}$ de diámetro (línea de puntos) y las células vecinas dentro de ella (puntos negros). Las flechas en cada figura indican la dirección del movimiento del núcleo de la célula de referencia. La trayectoria de cada cuadro se evalúa considerando $\Delta t = 30 \text{ min}$ durante 150 minutos y las coordenadas de las células vecinas corresponden a $\Delta t = 150 \text{ min}$. El movimiento de la célula de referencia está influenciado por las células vecinas. La flecha exterior indica la dirección principal del crecimiento del frente. La región en gris corresponde a la colonia y la región en blanco al espacio libre.

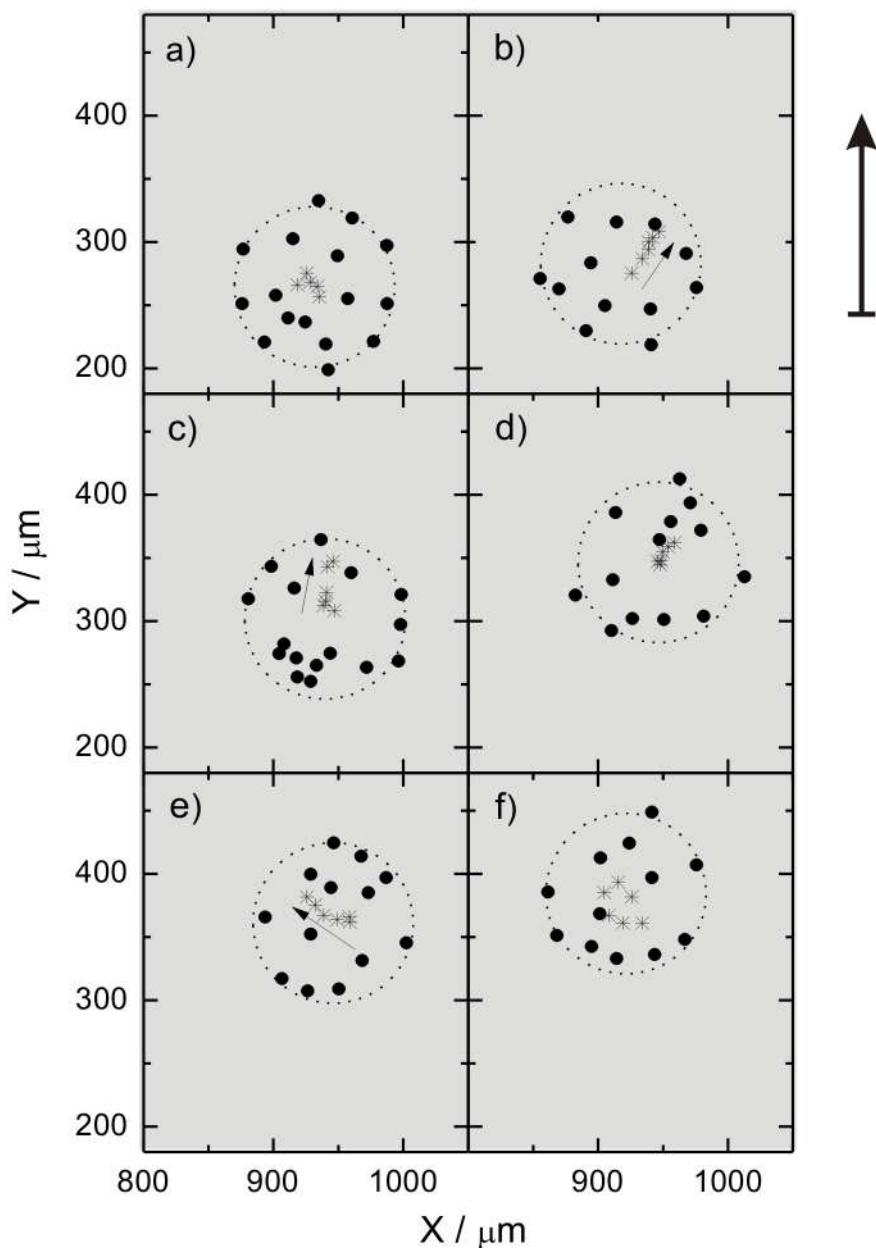


Figura 1.13: Desplazamientos de una célula de referencia (estrellas) del interior de la colonia localizada en el centro de una región circular de $130 \mu\text{m}$ de diámetro (línea de puntos) y las células vecinas dentro de ella (puntos negros). Las flechas en cada figura indican la dirección del movimiento del núcleo de la célula de referencia. La trayectoria de cada cuadro se evalúa considerando $\Delta t = 30 \text{ min}$ durante 150 minutos y las coordenadas de las células vecinas corresponden a $\Delta t = 150 \text{ min}$. El movimiento de la célula de referencia está influenciado por las células vecinas. La flecha exterior indica la dirección principal del crecimiento del frente.

celulares [1.6–1.10] y fue interpretada a través de diferentes mecanismos de expansión bidimensional de la colonia [1.6, 1.11–1.14]. Los resultados presentados en este capítulo, permiten relacionar los patrones morfológicos de las colonias con los distintos regímenes de crecimiento de las colonias. Los patrones morfológicos están relacionados a las heterogeneidades espacio-temporales desarrolladas, como la formación de dominios 3D en el seno de la colonia y los cambios en la forma, tamaño y densidades celulares (Figuras 1.1, 1.4 y 1.5). La proliferación celular contribuye a incrementar la fase 3D pero tiene poca influencia en la expansión en 2D. Todos estos cambios dependen de N y en gran medida son responsables de la transición cinética ya mencionada. Las CQRs y las CQLs, ambas creciendo a $\langle V_F \rangle$ constante, presentan una región anular efectiva bidimensional en el exterior de la colonia con un gradiente de densidad celular constante, donde la movilidad de las células y las duplicaciones se combinan para garantizar la propagación de la colonia (Figura 1.5c-d).

Por otro lado, las CQRs presentan un incremento simultáneo de la masa (N) y el área de la colonia, mientras que las CQLs presentan un incremento de masa manteniendo el ancho del frente constante. El efecto de la geometría en la cinética de crecimiento queda de manifiesto en los gradientes de densidades celulares, que para las CQRs (Figura 1.5c) resultan menores que para las CQLs (Figura 1.5d). La similitud de los valores de $\langle V_F \rangle$ obtenidos para ambas geometrías son consistentes con la mayor área promedio de las células (menor densidad) presentes en la región del borde de las CQRs con respecto a la de las células en el borde de las CQLs (Figura 1.5).

Se utilizó el modelo propuesto en la referencia [1.15] para interpretar los datos de expansión de CQRs (Figura 1.14). La representación matemática del modelo de [1.15] describe la evolución del $\langle R \rangle$ desde $t = 0$ con $N(0) = N_0$ células y $R(0) < \Delta L_{eff}$ con una función definida por partes:

$$\langle R \rangle(t) = \begin{cases} \sqrt{N_0} e^{\frac{t}{2\langle \tau \rangle}} & \text{para } t \leq t_c \\ \sqrt{K_2} \Delta L_{eff} [1 + W(\frac{N_0^2}{K_2^2 \Delta L_{eff}^4} e^{1+\frac{2t}{\langle \tau \rangle}})] & \text{para } t > t_c \end{cases} \quad (1.3)$$

Donde:

- $W(z)$ es la función de Lambert,
- $K_2 = \pi/a^2$ siendo a un parámetro relacionado al tamaño celular,
- ΔL_{eff} es el ancho de la región anular efectiva del borde de la colonia. En este modelo una célula se duplica sólo si encuentra un espacio vacío a una distancia $\langle \Delta L_{eff} \rangle$.
- $\langle \tau \rangle$ se vincula con el tiempo medio de duplicación celular $\langle \tau \rangle = \langle \tau_D \rangle / \ln(2)$ y t_c se define según la ecuación:

$$t_c = \langle \tau \rangle \ln \frac{K_2 \Delta L_{eff}}{N_0} \quad (1.4)$$

El modelo además propone una corta fase inicial de crecimiento por difusión, seguido por la fase de crecimiento exponencial y luego por la fase a velocidad de crecimiento constante. Esta fase inicial, relacionada exclusivamente a la migración celular, no suele observarse experimentalmente.

El ajuste de los datos obtenidos para sistemas con $N < 1000$ células a partir de los valores experimentales $\langle a \rangle = 25 \mu\text{m}$ y $\langle \tau \rangle = 2400 \text{ min}$, arrojó un $\Delta L_{eff} = 210 \mu\text{m}$.

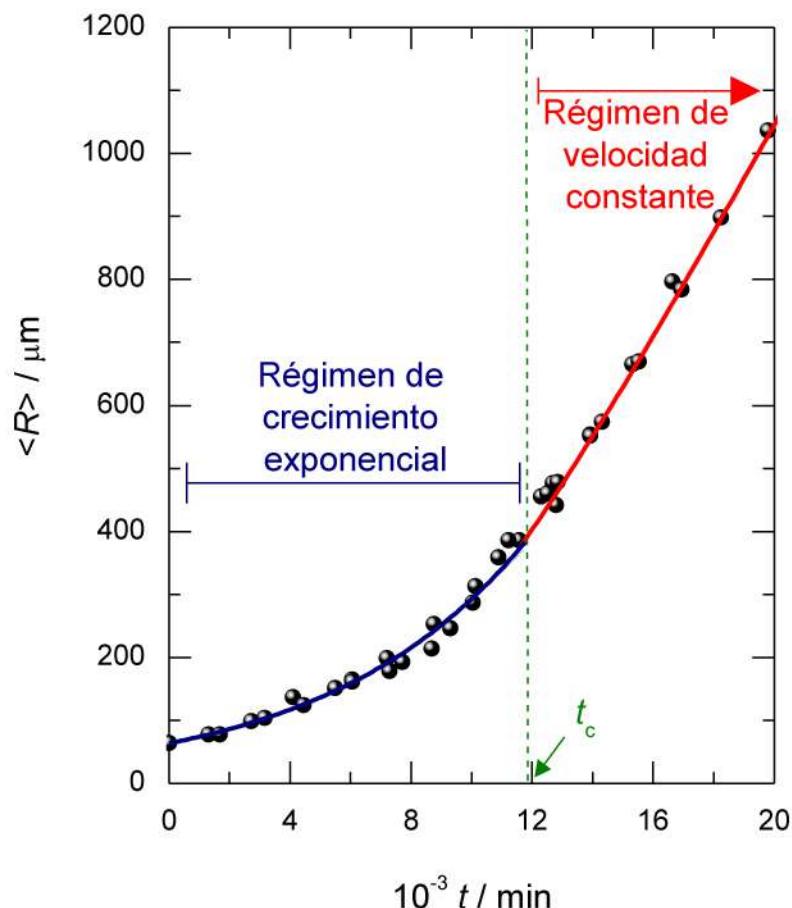


Figura 1.14: Gráfico de $\langle R \rangle$ en función de t para el crecimiento de CQRs de distintos N_0 y R_0 . Pueden observarse los dos regímenes cinéticos y t_c . La curva azul ($t < t_c$) y roja ($t > t_c$) corresponden al ajuste realizado con la ecuación (10) dada en la referencia [1.15] como se describe en el texto. La transición de régimen exponencial a $\langle V_F \rangle$ constante ocurre alrededor de las 1500 células en el intervalo de $11000 < t < 13000$ min.

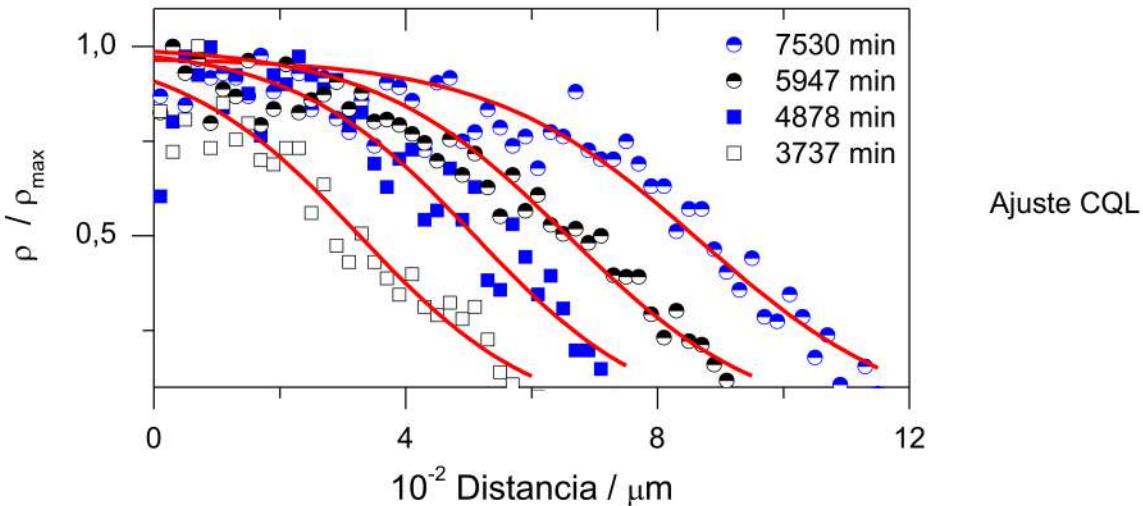


Figura 1.15: Ajuste de los perfiles de densidad obtenidos para una CQL utilizando la ecuación (42) de la referencia [1.18].

Las colonias celulares, como otros sistemas que pueden ser caracterizadas en diferentes escalas espacio-temporales, son sistemas multiescala [1.16]. Estos sistemas pueden interpretarse a través de modelos multiescala que tengan la eficiencia de los modelos macroscópicos y la precisión de los modelos microscópicos [1.17]. De esta manera es posible, por ejemplo, modelar el crecimiento de la interfase de una colonia a través eventos que ocurren en escalas más pequeñas de espacio y tiempo, como la duplicación y muerte celular, o considerando las interacciones microscópicas entre las células [1.1].

Los datos de la CQL mostrados en la figura 1.5 fueron ajustados utilizando el modelo multiescala propuesto la ecuación (42) de la referencia [1.18] que describe la evolución espacio-temporal de la densidad y es una variante de la ecuación de Fisher (Figura 1.15). El modelo propuesto además de incluir los clásicos parámetros de proliferación y difusión (entendida como migración celular), considera también el efecto de la inhibición por contacto y se expresa matemáticamente:

$$\rho(x, t) = \frac{1}{1 + C \exp([\sqrt{\langle k_0 \rangle / D_0} x - \langle k_0 \rangle t] / 2)} \quad (1.5)$$

Donde:

- $\langle k_0 \rangle$ es el índice mitótico de una célula aislada,
- D_0 es la constante de difusión de una célula aislada,
- C es un parámetro de ajuste.

De los ajustes de las curvas de densidad de la CQL (Figura 1.15) resultó que $\langle k_0 \rangle = 4 \pm 1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, similar a la constante cinética calculada a partir de la Figura 1.2 y $D_0 = 9 \pm 2 \mu\text{m}^2 \text{ min}^{-1}$. El valor obtenido es del mismo orden que el obtenido para fibroblastos 3T3 durante el desarrollo de una monocapa confluente ($D_0 = 3 \mu\text{m}^2 \text{ min}^{-1}$) y en un ensayo de corte y cerrado de herida ($D_0 = 5.5 \mu\text{m}^2 \text{ min}^{-1}$), siendo este último valor más grande debido a que el arreglo experimental genera una asimetría en la migración celular. También se encuentra en literatura un valor similar ($D_0 = 11.4 \mu\text{m}^2 \text{ min}^{-1}$) para células de glioma

aisladas migrando en la dirección en que disminuye el gradiente de concentración de un agente quimiorepelente [1.19].

Debido a la gran cooncordancia entre los resultados obtenidos a partir de modelos teóricos y los valores experimentales es que ciertos modelo resultan útiles para describir, predecir e interpretar la evolución de las heterogeneidades espacio-temporales en la colonia. Sin embargo, cabe aclarar que la influencia de las heterogeneidades en la dinámica de crecimiento de las colonias es compleja y aún hoy resulta bastante incierta.

1.3.2. Aspectos dinámicos de las células individuales

Para las CQRs con $N < 1000$ células el valor de $\langle V_{\text{per}} \rangle$, la velocidad promedio y la direccionalidad aumentan con N (Figuras 1.8 y 1.9), aproximándose al comportamiento de las CQLs. La velocidad individual de las células de las CQRs con $N > 1500$ células y CQLs disminuye al ir desde el borde de la colonia hacia el centro. El valor de $\langle V_{\text{per}} \rangle$ disminuye a menos de la mitad a $225 - 300 \mu\text{m}$ del borde de la colonia, un valor comparable al ΔL_{eff} obtenido con el ajuste de la figura 1.14. Además, la velocidad de las células individuales en la región del borde de una colonia muestra una dependencia inversa con la distancia célula-célula promedio (Figura 1.7), un comportamiento conocido para la velocidad de desplazamiento de frentes de fases condensadas, más allá de su naturaleza inorgánica [1.20] o biológica [1.21]. Este conjunto de observaciones es consistente con los efectos de “amontonamiento celular” locales [1.22, 1.23] que se manifiestan más fuertemente para N grandes. De esta manera, a medida que el radio de la colonia y los dominios de heterogeneidades espacio-temporales aumentan, el “amontonamiento celular” local tiene una contribución más marcada sobre las trayectorias celulares, particularmente en la región del borde (Figuras 1.12 y 1.13). Estos efectos poblacionales resultan en un fenómeno complejo en el que la organización de la colonia y la forma y fluctuaciones de orientación de cada grupo de células juegan un rol fundamental.

La dependencia del msd con Δt_R (Figura 1.11) resultó consistente con la contribución al movimiento colectivo que tienen los efectos cooperativos dependientes del número de células. De este modo, a N o Δt_R bajos dominan las características aleatorias ($b = 1$), mientras que a Δt_R largos para QRC con N grande o QLC, prevalecen los desplazamientos balísticos ($b = 2$).

En una serie de trabajos se presentaron resultados obtenidos a partir de la microscopía de fuerzas de tracción aplicada a colonias con N grandes que forman una monocapa confluyente [1.24, 1.25]. Se obtiene un mapa de fuerzas que se interpreta en término de las leyes de Newton. A partir del balance en dos dimensiones de las fuerzas de tracción célula-substrato y de aplicar las leyes de Newton es posible obtener la distribución de líneas de tensión a lo largo de toda la capa de células [1.24, 1.25]. Las tensiones se relacionan a la acumulación de fuerzas de tracción aplicadas en la parte inferior de las células, lo que resulta en severas fluctuaciones de estrés mecánico dentro de la capa de células que oscilan en su extensión. Estas fluctuaciones exhiben una ancha distribución no Gaussiana y se vuelven más fuertes, lentas y cooperativas a medida que la densidad celular aumenta. La migración celular colectiva parece regirse por un simple principio fisiológico: las células vecinas combinan fuerzas para transmitir una apreciable tensión normal sobre las uniones célula-célula (flechas verdes en la Figura 1.16) y se mueven de tal manera de disminuir la fuerza de corte intercelular (tensiones paralelas a las uniones célula-célula, flecha azul en la Figura 1.16). También se sugirió que las células líderes juegan un rol esencial en el direccionamiento local de las células ya que las principales fuerzas que generan son parte de un “juego de la soga” global que involucra células lejanas a los extremos.

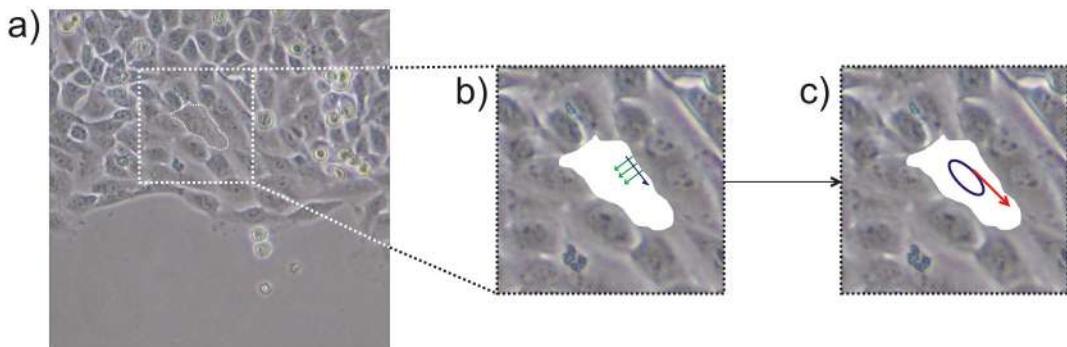


Figura 1.16: a) Interpretación de las microscopías de tracción para una célula en una colonia con N grande [1.24, 1.25]. b) Las células vecinas transmiten tensiones normales sobre las uniones célula-célula (flechas verdes) y tensiones paralelas a estas uniones (flecha azul). Las células se mueven de tal manera de disminuir estas tensiones paralelas. c) El balance de las tensiones paralelas puede representarse con un elipse, que define la dirección y velocidad de las células (flecha roja).

Tanto la migración de células epiteliales normales como la de líneas tumorales antes de la transición epitelio-mesenquimal puede explicarse siguiendo el simple principio fisiológico anteriormente descripto, que es cualitativamente consistente con las características de las trayectorias descriptas a lo largo de este capítulo. De este modo, las diferencias entre las movilidades celulares individuales (Figuras 1.8 y 1.9) así como en los perfiles de densidad (Figura 1.5) observados con el incremento de N de 100 a 1000 células en CQRs podría estar asociado a cambios en el balance de fuerzas.

1.3.3. Rugosado del frente y trayectorias celulares individuales

Las fluctuaciones en la rugosidad de frentes bidimensionales de CQRs con $N > 1500$ células y CQLs se estudian aplicando la teoría de escalado dinámico y el análisis de Fourier [1.4, 1.25–1.27]. Siguiendo estas estrategias se encontró que la dinámica de rugosado de frentes bidimensionales tienen un conjunto de exponentes de rugosidad $\alpha = 0.50 \pm 0.05$, $\beta = 0.32 \pm 0.04$ y $z = 1.5 \pm 0.2$ dentro de los rangos experimentales $0 < t < 10^4$ minutos y $10^2 < L < 10^3 \mu\text{m}$, independientemente de la geometría de crecimiento [1.4]. Este conjunto de exponentes concuerda con los predichos para la clase universal de KPZ [1.28, 1.29].

La ecuación estándar de KPZ describe la propagación de un frente en una dimensión a través de la altura h en cada columna x y tiempo t , e involucra tres términos:

$$\frac{\delta h(x, t)}{\delta t} = \underbrace{\nu \nabla^2 t}_a + \underbrace{\frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2}_b + \underbrace{\eta(x, t)}_c \quad (1.6)$$

Siendo:

- (a) Un término Laplaciano lineal de relajación superficial, que tiende a producir un suavizado de la superficie. Representa cualquier proceso difusivo con difusividad constante o algún proceso que involucra la tensión superficial, que tiende a disminuir la curvatura y altura de las protrusiones. Este término estaría asociado con la parte o contribución aleatoria de la movilidad celular.

- (b) Un término no lineal con coeficiente λ que contribuye al crecimiento lateral o ensanchamiento de las protrusiones (si $\lambda > 0$) o a un angostamiento de las mismas (si $\lambda < 0$). Tiene en cuenta la contribución sesgada de las trayectorias celulares direccionaladas por la búsqueda de espacio libre en la región del borde. Los desplazamientos sesgados de las células determinan la formación y ensanchamiento de las protrusiones como se observa en la figura 1.10. Este proceso debería estar asociado al componente balístico de la movilidad celular.
- (c) Un término estocástico de ruido gaussiano principalmente relacionado a la proliferación celular en la monocapa 2D.

Se propusieron versiones mejoradas de las ecuaciones de KPZ para 1D y 2D [1.30, 1.31], incluyendo una formulación de la ecuación de KPZ para la expansión de colonias celulares bidimensionales en una superficie con estructura teselada o tipo mosaico [1.32]. El análisis de la estructura interna del sistema en propagación así como distintas escalas de teselado permitieron inferir la universalidad del proceso y resultan una alternativa al análisis de la rugosidad mediante el escalado dinámico [1.33–1.35]. Recientemente, a través de estudios de electroconvección de cristales líquidos en fase nemática se obtuvieron dependencias generales de propiedades estadísticas generales tales como las funciones de distribución, las correlaciones espaciales y temporales o la persistencia espacial con la geometría global de la interface [1.36, 1.37]. Estos resultados invitan a analizar la movilidad celular y las heterogeneidades espacio-temporales aparte de los exponentes de rugosidad para estudiar el avance del frente y a relacionarlas, al menos cualitativamente, con la universalidad a la que pertenecen.

En nuestros experimentos, la influencia de la direccionalidad de las trayectorias celulares en el comportamiento tipo KPZ dependió del radio de curvatura promedio de la interfase de la colonia, que se relaciona con N . Además, el cociente $V_{\text{per}}/V_{\text{par}}$ se vió influenciado por la relación de aspecto de las células o de los grupos de células. Una influencia de este tipo se encontró a través de modelos multiescala [1.38]. Para $\langle R \rangle$ o N grandes hay una tendencia de las CQRs a aproximarse a CQLs. Ambas geometrías presentan fluctuaciones en la interface que se corresponden con un $\lambda > 0$ que afecta el término no lineal de la ecuación de KPZ. Esto puede explicarse a través del sesgo en las trayectorias celulares. En la figura 1.17 se intenta relacionar las conclusiones obtenidas a partir de la microscopía de fuerzas de tracción [1.24, 1.25] con las trayectorias celulares y el modelo de crecimiento de interfaces propuesto. En a) se muestran las elipses de estrés y vectores de velocidad de una monocapa de células de endotelio pulmonar de rata, adaptado de la referencia [1.25]. Las trayectorias y morfologías de las células de la protrusión de la figura 1.10 (b) pueden interpretarse en función de las fuerzas de corte intercelular (c). Los trayectorias balísticas de las células aproximadamente normales a la interfase están de acuerdo con el principio de disminución de las fuerzas de corte intercelulares y con el modelo de KPZ propuesto para el crecimiento de la interfase (d).

1.4. Conclusiones

La expansión 2D de colonias de células HeLa presenta dos regímenes de crecimientos dependientes del número de células ($y \langle R \rangle$), uno exponencial para CQRs con $N < 1000$ células y uno a $\langle V_F \rangle$ constante para CQLs y CQRs con $N > 1500$ células. Esta transición cinética se relaciona con el desarrollo de heterogeneidades espacio-temporales en la colonia que incluyen procesos de “amontonamiento celular”. A $\langle V_F \rangle$ constante, la colonia presenta

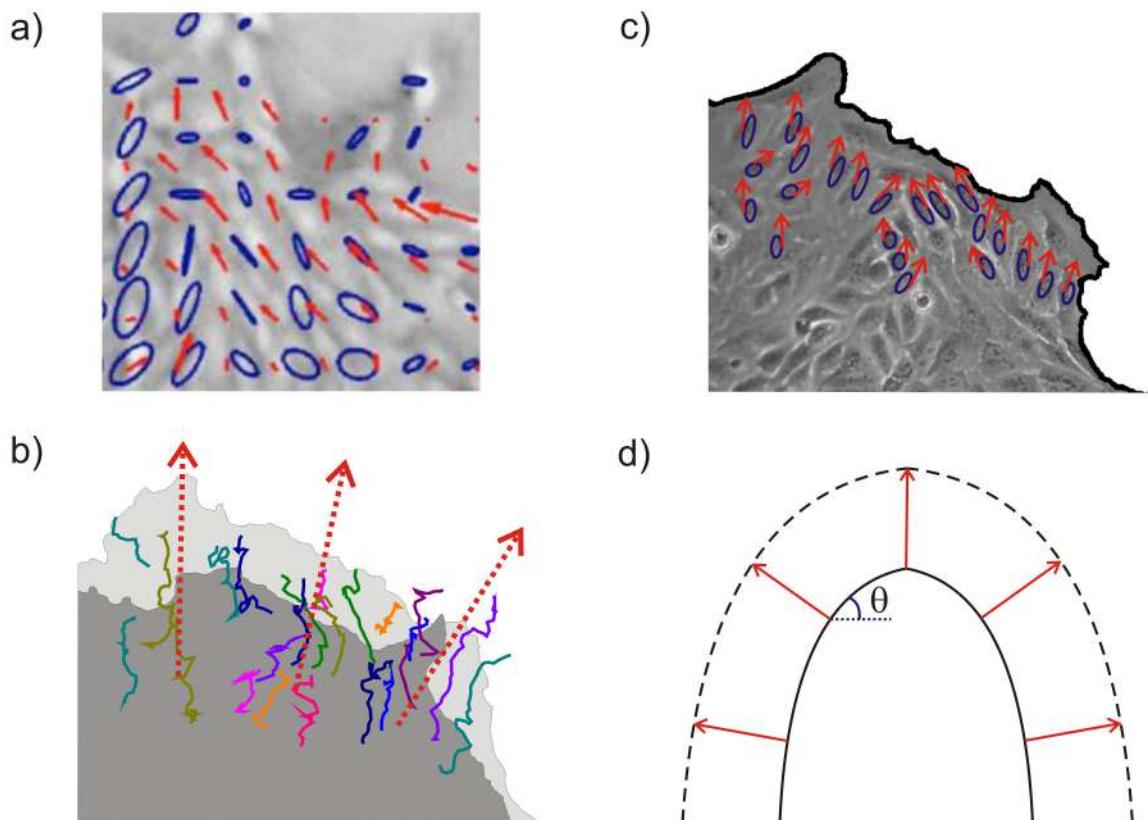


Figura 1.17: a) Elipses de estrés y vectores de velocidad de una monocapa de células de endotelio pulmonar de rata, adaptado de referencia [1.25]. b) Ensanchamiento de una protrusión y trayectorias celulares mostradas en la figura 1.10. c) Esquema de las elipses de estrés y los vectores de velocidad dibujados teniendo en cuenta la morfología de las células de la protrusión y las trayectorias obtenidas. d) Crecimiento normal a la interfase característico del término no lineal de la ecuación de KPZ. Notar la similitud entre b) y d)

dos regiones bien diferenciadas: un borde efectivo 2D con un espesor promedio constante y una región interior con formación de una fase 3D. La proliferación celular y la migración dentro de la región efectiva 2D contribuye al desplazamiento del frente de la colonia. En esta región la movilidad celular individual es alta debido a los efectos cooperativos y a la existencia de un gradiente de densidad celular. Por otro lado, en la región del seno de la colonia, tanto la proliferación como la movilidad celular están ampliamente inhibidos por el “amontonamiento celular”.

La $\langle V_F \rangle$ fue prácticamente la misma para CQRs y CQLs a pesar de la diferencia en el confinamiento y la disponibilidad de espacio libre entre las dos geometrías. Este hecho puede explicarse debido a que el tamaño celular promedio es mayor para las células en la región del borde de las CQRs que de las CQLs, compensando el mayor espacio libre generado por la propagación de las primeras.

Los datos de movilidad celular sugieren que las células se mueven con contribuciones aleatorias y balísticas. La relación del componente balístico con respecto al aleatorio, el componente perpendicular de la velocidad celular con respecto al frente y la direccionalidad de las trayectorias se hacen más grandes al aumentar N . Todos estos factores tienen un efecto importante en la evolución de la rugosidad y las protrusiones del frente. Los datos de movilidad celular obtenidos son consistentes con un $\lambda > 0$, es decir, con un ensanchamiento de las protrusiones y con el cumplimiento de la ecuación de KPZ.

Bibliografía

- [1.1] M. Meier-Schellersheim, I. D. C. Fraser & F. Klauschen. “Multiscale modeling for biologists.” *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2009. **1**(1), 4–14. (Citado en páginas 91 y 111.)
- [1.2] E. W. Gerner & M. J. Schneider. “Induced thermal resistance in HeLa cells”. *Nature*, 1975. **256**(5517), 500–502. (Citado en página 92.)
- [1.3] F.-M. Boisvert, Y. Ahmad, M. Gierliński, F. Charrière, D. Lamont, M. Scott, G. Barton & A. I. Lamond. “A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells”. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012. **11**(3), M111.011429. (Citado en página 92.)
- [1.4] M. A. C. Huergo, M. A. Pasquale, P. H. González, A. E. Bolzán & A. J. Arvia. “Growth dynamics of cancer cell colonies and their comparison with noncancerous cells”. *Physical Review E*, 2012. **85**(1), 011918. (Citado en páginas 43, 93 y 113.)
- [1.5] A. F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N. J. Westwood, J. R. Sellers & T. J. Mitchison. “Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor”. *Science*, 2003. **299**(5613), 1743–1747. (Citado en página 93.)
- [1.6] J. P. Freyer & R. M. Sutherland. “A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth”. *Journal of Cellular Physiology*, 1985. **124**(3), 516–524. (Citado en página 109.)
- [1.7] W. Mueller-Klieser, J. P. Freyer & R. M. Sutherland. “Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids”. *British Journal of Cancer*, 1986. **53**(3), 345–353. (Citado en página 109.)
- [1.8] A. Brú, S. Albertos, J. Luis Subiza, J. L. García-Asenjo & I. Brú. “The Universal Dynamics of Tumor Growth”. *Biophysical Journal*, 2003. **85**(5), 2948–2961. (Citado en página 109.)
- [1.9] J. Galle, M. Hoffmann & G. Aust. “From single cells to tissue architecture—a bottom-up approach to modelling the spatio-temporal organisation of complex multi-cellular systems”. *Journal of Mathematical Biology*, 2009. **58**(1-2), 261–283. (Citado en página 109.)
- [1.10] J. Galle, D. Sittig, I. Hanisch, M. Wobus, E. Wandel, M. Loeffler & G. Aust. “Individual Cell-Based Models of Tumor-Environment Interactions: Multiple Effects of CD97 on Tumor Invasion”. *The American Journal of Pathology*, 2006. **169**(5), 1802–1811. (Citado en página 109.)

- [1.11] D. Drasdo & S. Höhme. “A single-cell-based model of tumor growth *<in vitro>* : monolayers and spheroids”. *Physical Biology*, 2005. **2**(3), 133–147. (Citado en página 109.)
- [1.12] S. A. Menchón & C. A. Condat. “Cancer growth: Predictions of a realistic model”. *Physical Review E*, 2008. **78**(2), 022901. (Citado en página 109.)
- [1.13] J. Galle, M. Loeffler & D. Drasdo. “Modeling the Effect of Deregulated Proliferation and Apoptosis on the Growth Dynamics of Epithelial Cell Populations In Vitro”. *Biophysical Journal*, 2005. **88**(1), 62–75. (Citado en página 109.)
- [1.14] D. Drasdo, S. Hoehme & M. Block. “On the Role of Physics in the Growth and Pattern Formation of Multi-Cellular Systems: What can we Learn from Individual-Cell Based Models?” *Journal of Statistical Physics*, 2007. **128**(1-2), 287–345. (Citado en página 109.)
- [1.15] M. Radszuweit, M. Block, J. G. Hengstler, E. Schöll & D. Drasdo. “Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions”. *Physical Review E*, 2009. **79**(5), 051907. (Citado en páginas 37, 109, 110, 143, 158, 159, 160, 170, 172, 173 y 176.)
- [1.16] S. Karabasov, D. Nerukh, A. Hoekstra, B. Chopard & P. V. Coveney. “Multiscale modelling: approaches and challenges.” *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 2014. **372**(2021), 20130390. (Citado en página 111.)
- [1.17] W. E. *Principles of multiscale modeling*. Cambridge University Press, 2011. (Citado en página 111.)
- [1.18] A. Q. Cai, K. A. Landman & B. D. Hughes. “Multi-scale modeling of a wound-healing cell migration assay”. *Journal of Theoretical Biology*, 2007. **245**(3), 576–594. (Citado en página 111.)
- [1.19] M. Aubert, M. Badoual & B. Grammaticos. “A model for short- and long-range interactions of migrating tumour cell.” *Acta Biotheoretica*, 2008. **56**(4), 297–314. (Citado en página 112.)
- [1.20] D. P. Barkey. “Structure and Pattern Formation in Electrodeposition”. En “Advances in Electrochemical Science and Engineering, Volume 7”, páginas 151–191. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, FRG, 2002. (Citado en página 112.)
- [1.21] T. E. Angelini, E. Hannezo, X. Trepat, J. J. Fredberg & D. A. Weitz. “Cell Migration Driven by Cooperative Substrate Deformation Patterns”. *Physical Review Letters*, 2010. **104**(16), 168104. (Citado en página 112.)
- [1.22] J. D. Murray. *Mathematical biology : an introduction*. Springer-Verlag, 2002. (Citado en página 112.)
- [1.23] M. Aubert, M. Badoual, C. Christov & B. Grammaticos. “A model for glioma cell migration on collagen and astrocytes.” *Interface*, 2008. **5**(18), 75–83. (Citado en página 112.)

- [1.24] X. Trepat, M. R. Wasserman, T. E. Angelini, E. Millet, D. A. Weitz, J. P. Butler & J. J. Fredberg. “Physical forces during collective cell migration”. *Nature Physics*, 2009. **5**(6), 426–430. (Citado en páginas 112, 113 y 114.)
- [1.25] D. T. Tambe, C. Corey Hardin, T. E. Angelini, K. Rajendran, C. Y. Park, X. Serra-Picamal, E. H. Zhou, M. H. Zaman, J. P. Butler, D. A. Weitz, J. J. Fredberg & X. Trepat. “Collective cell guidance by cooperative intercellular forces”. *Nature Materials*, 2011. **10**(6), 469–475. (Citado en páginas 112, 113, 114 y 115.)
- [1.26] J. M. López, M. A. Rodríguez & R. Cuerno. “Power spectrum scaling in anomalous kinetic roughening of surfaces”. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 1997. **246**(3-4), 329–347. (Citado en página 113.)
- [1.27] J. J. Ramasco, J. M. López & M. A. Rodríguez. “Generic Dynamic Scaling in Kinetic Roughening”. *Physical Review Letters*, 2000. **84**(10), 2199–2202. (Citado en página 113.)
- [1.28] A. L. Barabasi & H. E. Stanley. *Fractal concepts in surface growth*. Cambridge University Press, 1995. (Citado en páginas 37, 41, 42, 43, 113, 122, 146, 173, 174, 267, 268 y 269.)
- [1.29] M. Kardar, G. Parisi & Y.-C. Zhang. “Dynamic Scaling of Growing Interfaces”. *Physical Review Letters*, 1986. **56**(9), 889–892. (Citado en páginas 42, 113 y 145.)
- [1.30] H. S. Wio, C. Escudero, J. A. Revelli, R. R. Deza & M. S. de la Lama. “Recent developments on the Kardar–Parisi–Zhang surface-growth equation”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010. **369**(1935), 396–411. (Citado en página 114.)
- [1.31] H. S. Wio, J. A. Revelli, R. R. Deza, C. Escudero & M. S. de la Lama. “KPZ equation: Galilean-invariance violation, consistency, and fluctuation-dissipation issues in real-space discretization”. *Europhysics Letters*, 2010. **89**(4), 40008. (Citado en página 114.)
- [1.32] M. Block, E. Schöll & D. Drasdo. “Classifying the Expansion Kinetics and Critical Surface Dynamics of Growing Cell Populations”. *Physical Review Letters*, 2007. **99**(24), 248101. (Citado en páginas 114 y 172.)
- [1.33] T. Sasamoto & H. Spohn. “One-Dimensional Kardar-Parisi-Zhang Equation: An Exact Solution and its Universality”. *Physical Review Letters*, 2010. **104**(23), 230602. (Citado en página 114.)
- [1.34] P. Calabrese & P. Le Doussal. “Exact Solution for the Kardar-Parisi-Zhang Equation with Flat Initial Conditions”. *Physical Review Letters*, 2011. **106**(25), 250603. (Citado en página 114.)
- [1.35] K. Khanin, S. Nechaev, G. Oshanin, A. Sobolevski & O. Vasilyev. “Ballistic deposition patterns beneath a growing Kardar-Parisi-Zhang interface”. *Physical Review E*, 2010. **82**(6), 061107. (Citado en página 114.)
- [1.36] K. A. Takeuchi & M. Sano. “Universal Fluctuations of Growing Interfaces: Evidence in Turbulent Liquid Crystals”. *Physical Review Letters*, 2010. **104**(23), 230601. (Citado en páginas 43, 114 y 267.)

- [1.37] K. A. Takeuchi, M. Sano, T. Sasamoto & H. Spohn. “Growing interfaces uncover universal fluctuations behind scale invariance”. *Scientific Reports*, 2011. **1**(1), 34. (Citado en página 114.)
- [1.38] M. J. Simpson, R. E. Baker & S. W. McCue. “Models of collective cell spreading with variable cell aspect ratio: A motivation for degenerate diffusion models”. *Physical Review E*, 2011. **83**(2), 021901. (Citado en página 114.)

Capítulo 2

Modificación de la reología del medio de crecimiento

2.1. Introducción

Las células en un organismo no se encuentran aisladas sino interactuando con otras células vecinas y con el entorno, formado por la matriz extracelular. Estas interacciones son capaces de modular tanto el fenotipo celular individual como su comportamiento cooperativo y generan nuevas propiedades que no puede explicarse a partir de las características de las células individuales. Por este motivo, para entender y describir los sistemas complejos es necesario conocer las propiedades e interacciones entre los elementos que los constituyen.

Una estrategia para analizar la dinámica de propagación de las colonias teniendo en cuenta las propiedades e interacciones entre las células y su entorno es modelarlas a partir de modelos de Potts celular (CPM). En estos modelos se simula el crecimiento de células y colonias utilizando mallas cartesianas bidimensionales cuyas celdas son ocupadas por dos tipos de objetos: células y matriz extracelular. La simulación es estocástica y procede mediante el método de Monte Carlo repitiendo una operación básica en la que se selecciona aleatoriamente una posición de la malla y el objeto contenido en esa celda intenta copiar su tipo en una posición vecina. La probabilidad de aceptación de este proceso de copia depende de las energías asociadas con distintos parámetros como la adhesión, las restricciones de volúmen, la movilidad celular, etc [2.1].

De esta manera, teniendo en cuenta distintos aspectos de la biología celular y de su interacción con el entorno, es posible realizar simulaciones y obtener información de la dinámica de las células individuales o en grupos en distintas regiones de la colonia [2.2–2.5]. Por ejemplo, una versión de CPM generalizada permitió obtener una fuerte correlación entre la direccionalidad de la movilidad celular y la topografía de la matriz extracelular e indicó que la migración celular en ambientes fibrilares requiere la deformación del núcleo o la proteólisis de la matriz [2.6]. En otro trabajo se utilizó un CPM para describir la aparición espontánea de corrientes de células orientadas en una monocapa de queratinocitos humanos [2.7]. Al modificar la relevancia de las uniones mecánicas entre las células este modelo permitió explicar los resultados experimentales que indicaban que las corrientes de células se hacen más estrechas al disminuir las adhesiones célula-célula. Otros modelos y simulaciones incluyen el efecto de la migración celular, la compresión y la inhibición por contacto para describir la evolución de la distribución de tamaños celulares y el crecimiento global de la colonia [2.8]. Estos ejemplos ponen de manifiesto que los datos experimentales de la dinámica de las colonias, desde células individuales a grupos de células, resultan de interés para interpretar la influencia de las heterogeneidades espacio-temporales en el mecanismo de crecimiento de la

colonia, mecanismos que pueden verse afectados por las características estructurales estáticas y dinámicas del medio [2.9].

En el capítulo anterior se describió la formación de heterogeneidades durante la propagación de colonias celulares y cómo estas afectan a la movilidad celular y a la dinámica global de propagación de la colonia en medio de crecimiento estándar. Resulta ahora de interés perturbar las condiciones del medio sin modificar directamente las características intrínsecas de las células. Se intentará modificar el entorno celular mediante el agregado de un componente que no afecte directamente la actividad biológica y solo modifique las características físicas del medio.

Por otro lado, es adecuado mencionar como antecedente que la dinámica global de sistemas biológicos en medios que presentan modificaciones en las propiedades fisicoquímicas se analizó a partir de colonias bacterianas, tales como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* en medio con agar [2.10]. En este caso, el análisis del escalado dinámico permite obtener el exponente de rugosado $\alpha = 0.78 \pm 0.07$, que excede el valor pedido por la ecuación estándar de KPZ. Recientemente, se indicó que la dinámica de crecimiento de bacterias resulta más compleja en medios modificados con sustancias espesantes y en presencia de obstáculos físicos, dependiendo de la concentración de nutrientes [2.11]. A diferencia de las bacterias, en el caso de las colonias de células eucariotas, la influencia de las propiedades fisicoquímicas del medio en la propagación de las colonias no se estudió tan extensamente y resulta de importancia para el modelado de procesos biológicos complejos como el crecimiento tumoral [2.7].

En este capítulo se estudiará la expansión de colonias 2D de células Vero, los tamaños, morfologías y migración celulares en medio de cultivo sin (medio estándar) y con agregados de metilcelulosa (MC). Se prestará particular atención al medio gelificado. De la misma manera que se hizo en el capítulo anterior, se intentará relacionar las propiedades a nivel celular con las asociadas a la colonia. Se utilizan colonias con distintas poblaciones celulares iniciales y geometrías creciendo en medios de cultivo con distintas concentraciones de MC (c_{MC}). La MC es un polímero hidrofilico no tóxico para las células que produce soluciones con propiedades reológicas controladas y modifican la viscosidad del medio de cultivo sin cambiar las características adhesivas de las células con el substrato [2.12]. Se suele usar en cultivos celulares, por ejemplo, para estudiar procesos de replicación viral [2.13, 2.14].

2.2. Resultados

Para conocer la influencia de la metilcelulosa en la propagación de colonias de células Vero de distintos tamaños, número de células y geometrías, se estudiaron 3 tipos de colonias (CQRs, CQR-Cs y CQLs). Las colonias CQRs y CQR-Cs aportaron información complementaria de los procesos globales que ocurren en las CQLs. Se utilizaron CQRs (baja población y frentes quasi-circulares) para estudiar a tiempos cortos la dinámica y cinética de crecimiento de colonias con pocas células en diferentes medios de cultivo. Las CQR-Cs (población grande y frentes quasi-circulares) se usaron para estudiar aspectos morfológicos y dinámicos de colonias con elevado número de células en medios gelificados. En ambos tipos de colonias se originaron heterogeneidades espaciales (dependieron de la región de la colonia que se estudió) y temporales (dependieron del tiempo de crecimiento en que se analicen los cambios) como la aparición de regiones de distinta densidad y células grandes en el borde del frente que afectaron el crecimiento de la colonia. Finalmente, las CQLs (población grande y frentes quasi-lineales) se utilizaron para estudiar la movilidad celular y obtener más información de la influencia de las heterogeneidades espacio-temporales de la colonia en la morfología y movilidad de las células y en la dinámica global de crecimiento de la colonia. La comparación

de los datos obtenidos para las CQR-C y CQL permite tener una idea de la influencia de la geometría de crecimiento en la expansión de la colonia.

2.2.1. Cambios morfológicos

CQR (baja población y frentes quasi-circulares)

Las imágenes de las CQRs con $N_0 < 100$ células creciendo en medios de cultivo con distintas c_{MC} muestran que las colonias tienen inicialmente bordes irregulares y que con el paso del tiempo tienden a tener morfologías quasi-circulares (Figura 2.1). En el intervalo de tiempo $0 \leq t \leq 9000$ min también se observa la disminución de la distancia promedio célula-célula en la región interior de la colonia, generando dominios celulares más compactos. Por otro lado, en la región del borde de la colonia se observa el efecto inverso: aparecen células con tamaños mayores al de la célula promedio. A medida que se incrementa la concentración de metilcelulosa estos cambios se hacen más marcados. El efecto más notable es el de las colonias en medio gelificado, en las que aparecen células varias veces más grandes que las células regulares tanto en el borde como en el interior de la colonia.

CQR-C (población grande y frentes quasi-circulares)

Las CQR-C, particularmente en medio gelificado, presentan una rápida aparición de células “agrandadas” en el borde. Estas células “agrandadas” producen una disminución notable de la densidad celular en el borde de la colonia y el aumento de heterogeneidades espacio-temporales debido a la aparición de dominios locales con densidades diferentes. A $t = 16500$ min (Figura 2.2) la región del borde bidimensional (no presenta crecimiento 3D) de la colonia consiste en células de tamaño normal, células “agrandadas” y pequeños huecos o zonas vacías no ocupadas por células. Las células “agrandadas” forman una especie de barrera en el borde de la colonia que perturba el desplazamiento de las células más pequeñas ubicadas alrededor. La región central de estas colonias se presenta como un dominio 3D aproximadamente circular rodeada de una zona intermedia de transición con dominios 2D y 3D. Esta última fase es compacta, con células de tamaños regulares o menores y está limitada por la región del borde de baja densidad. En este estadio de crecimiento ($t = 16500$ min) el frente de la colonia se vuelve significativamente rugoso debido a la formación de huecos y protrusiones.

CQL (población grande y frentes quasi-lineales)

La morfología de la región del borde de las CQLs, que se propagan en medio gelificado permanece sin cambios hasta aproximadamente 5000 min de retirada la máscara de Teflon. Luego se puede observar la aparición de células “agrandadas” y dominios de células pequeñas y orientadas (Figura 2.3). Como sucede en las CQR-C, las células “agrandadas” están localizadas principalmente en el borde de la colonia, y su tamaño aumenta con la edad de la colonia. El diámetro promedio de las células cambia de $45 \mu\text{m}$ a $t = 2400$ min a $250 \mu\text{m}$ a $t = 19260$ min, un valor 4 veces superior al de las células más grandes encontradas en el medio de cultivo con $c_{MC} = 0\%$.

La comparación de las secuencias de imágenes obtenidas mediante el seguimiento *in situ* de las CQLs en medio estándar con $c_{MC} = 0\%$ y medio gelificado permiten tener una idea de la influencia de la dinámica individual de las células en las características de la rugosidad de estas colonias. Para observar los cambios producidos en las colonias tanto a tiempos relativamente cortos, luego de la adaptación de las células al nuevo medio de cultivo, como

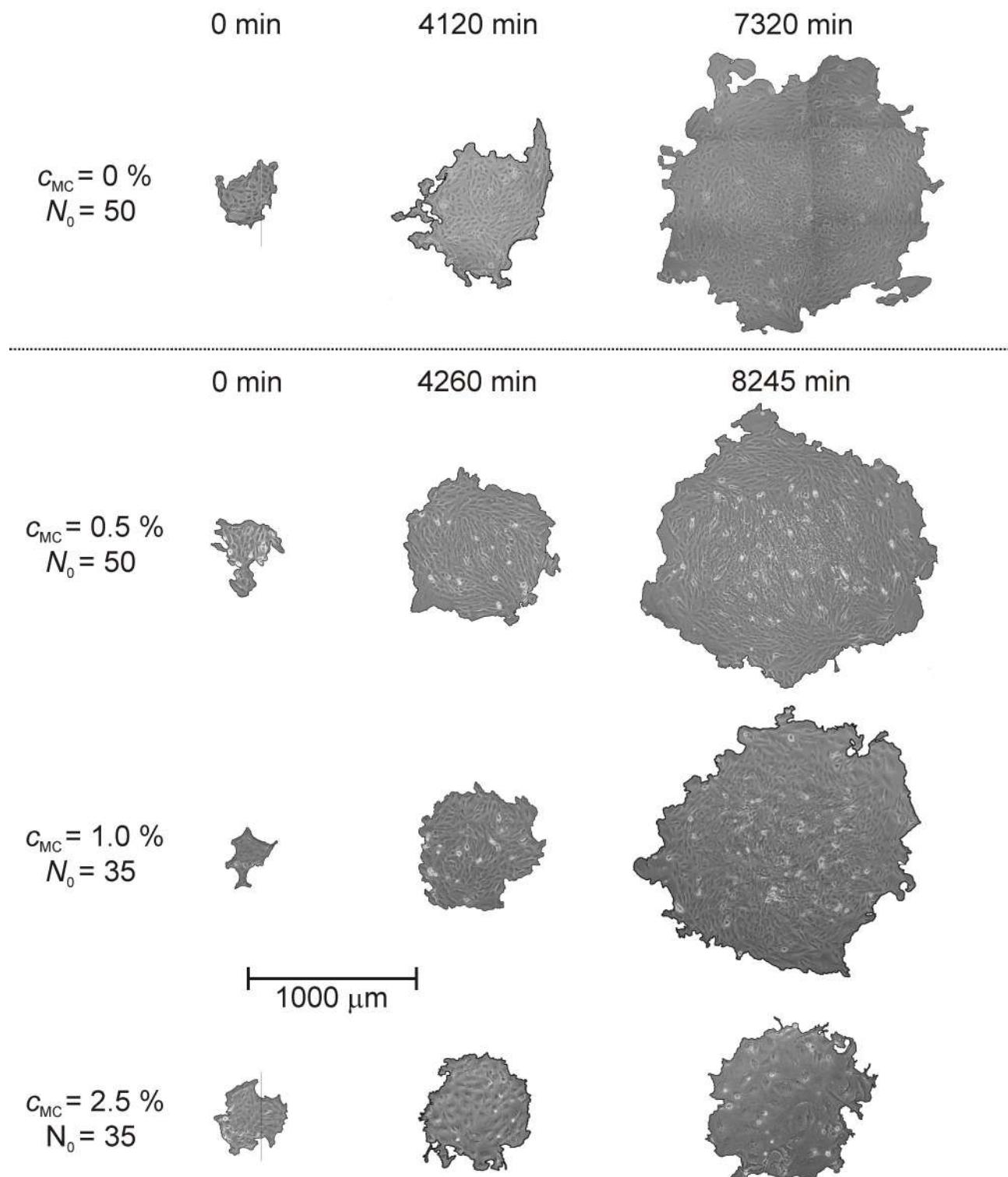


Figura 2.1: Secuencia de imágenes de CQRs con $N_0 < 100$ células creciendo en medios de cultivo con distinta c_{MC} . Para $c_{MC} = 2.5\%$ se puede ver la aparición de células con tamaños varias veces más grandes que el de las células regulares.

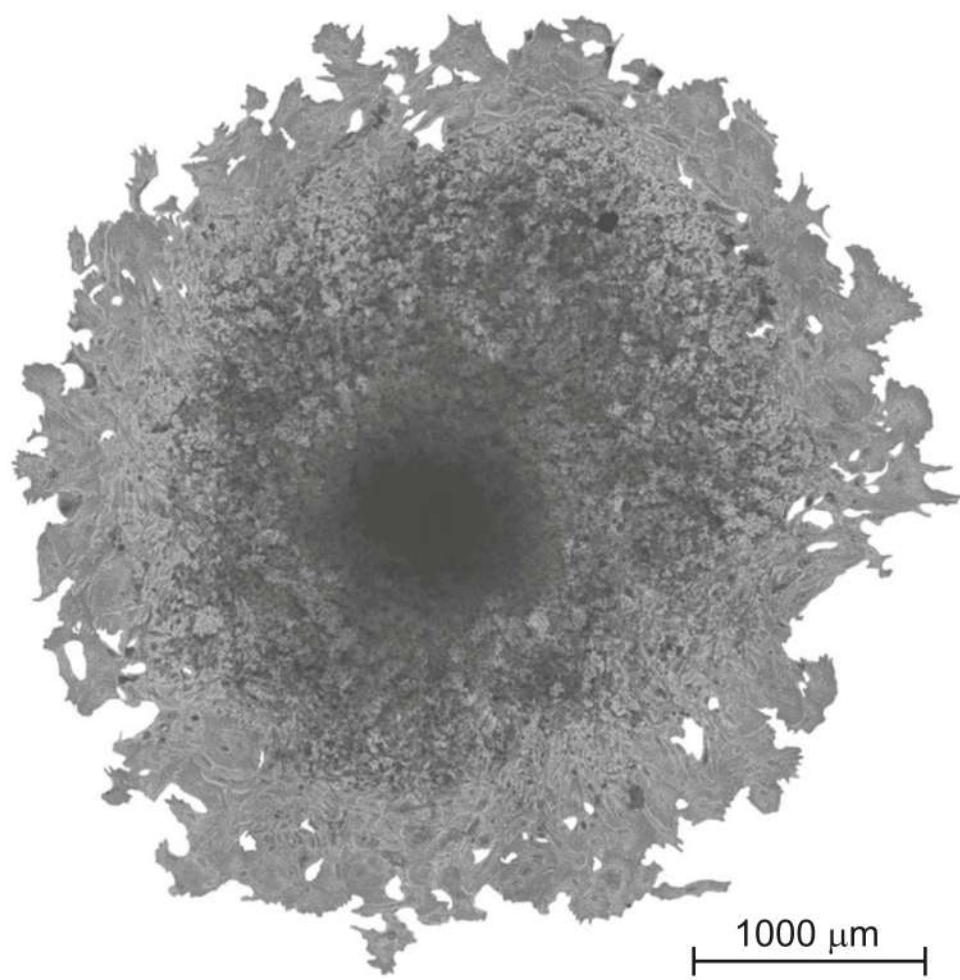


Figura 2.2: *CQR-C a $t = 16000 \text{ min}$ en medio gelificado ($\text{c}_{\text{MC}} = 2.5 \%$). Pueden observarse 3 regiones prácticamente concéntricas: una región exterior 2D con cierto número de agujeros, un núcleo 3D y una región intermedia en la que coexisten dominios 2D y 3D.*

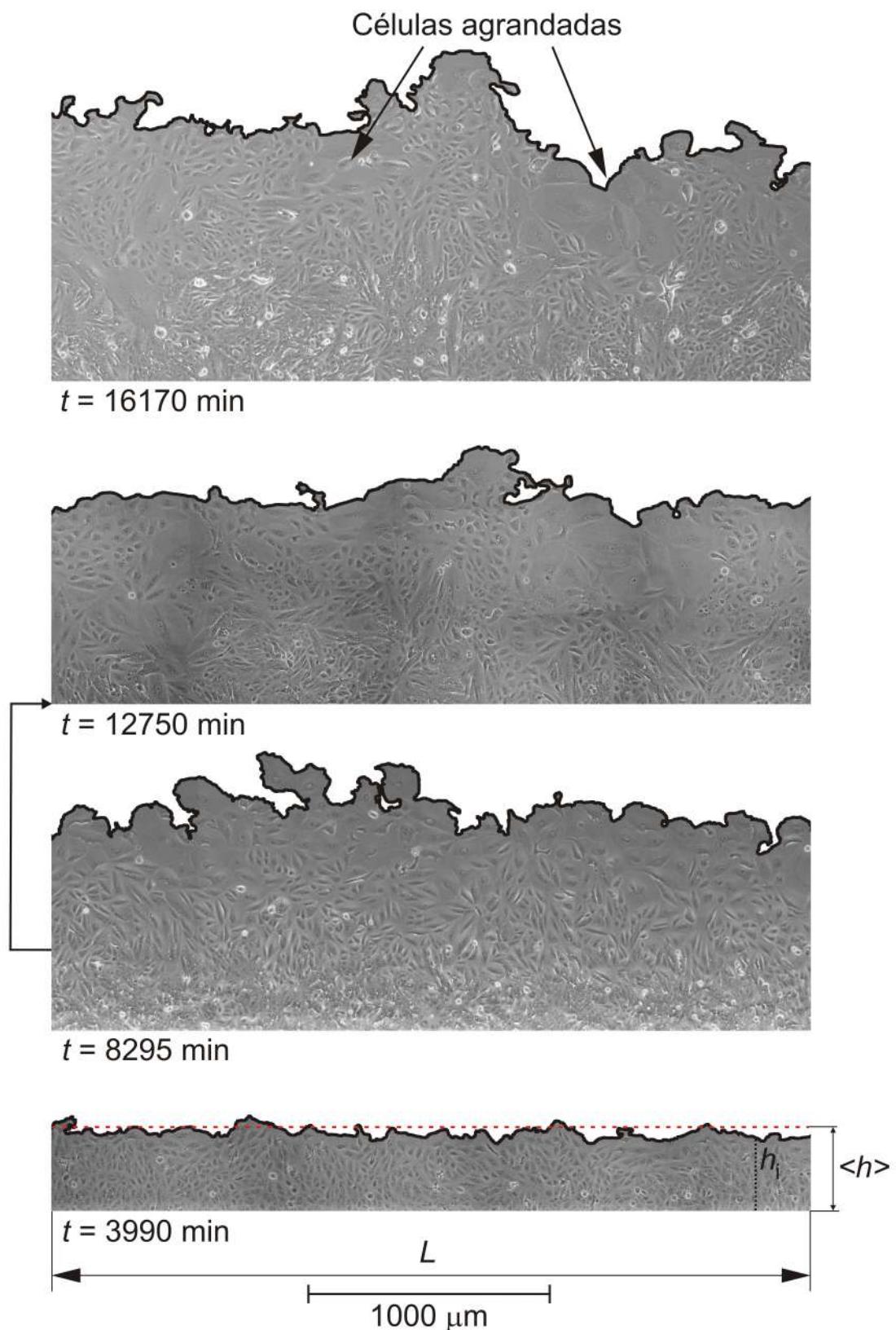


Figura 2.3: Secuencia de imágenes de secciones del frente de una CQL creciendo en medio gelificado. La línea de base de la imagen a $t = 8295 \text{ min}$ se corrió hacia arriba en las imágenes a $t = 12750 \text{ min}$ y $t = 16170 \text{ min}$. Las flechas indican dominios de células agrandadas en el borde de la colonia.

a tiempos largos, el seguimiento *in situ* se comenzó a distintos tiempos luego de retirar la máscara de Teflon y reemplazar el medio de cultivo por medio nuevo con $c_{MC} = 0\%$ o $c_{MC} = 2.5\%$.

A tiempos cortos, las imágenes de las colonias creciendo en medio estándar muestran pequeños cambios en el tamaño y forma de las células, mientras que en las imágenes de las colonias en medio gelificado pueden observarse dominios con células orientadas en la dirección de crecimiento del frente y un aumento local de la rugosidad del borde (Figura 2.4). A estadios de crecimiento avanzados, las imágenes muestran que las células “agrandadas” presentes en las colonias en medio gelificado, aumentan de tamaño y son rodeadas parcialmente por células de tamaño normal a medida que pasa el tiempo (Figura 2.5). Por otro lado, las colonias que crecen en medio estándar presentan menos células grandes y de un tamaño menor que aquellas en el medio gelificado.

2.2.2. Área celular en distintas regiones de la colonia

Se determinó el área celular promedio en diferentes regiones de las CQR-Cs y CQLs. Para las CQR-Cs los histogramas obtenidos en dos coronas circulares de $200 \mu\text{m}$ de espesor muestran que al área celular disminuye yendo desde el borde de la colonia hacia el centro (Figura 2.6a). Para la región anular exterior, el área celular promedio es superior a $17000 \mu\text{m}^2$, mientras que para la región anular interior el área promedio es de $3300 \mu\text{m}^2$ (Figura 2.6b).

Los histogramas de áreas celulares de las CQLs se determinaron seleccionando regiones del borde rectangulares de $2000 \mu\text{m}$ de largo y $600 \mu\text{m}$ de ancho, paralelas al frente, y dividiéndolas en 3 subregiones de $200 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 2.7a). Los resultados muestran que en la subregión exterior de las colonias en medio estándar prevalecen las células con un área inferior a $400 \mu\text{m}^2$ y que yendo hacia la subregión que está a $400 - 600 \mu\text{m}$ del borde, las células tienen áreas 3 veces más pequeñas, en promedio por debajo de $120 \mu\text{m}^2$ (Figura 2.7b). Por otro lado, en el medio gelificado, la contribución de las células grandes es significativa. En este caso, el histograma correspondiente a la subregión más externa muestra dos máximos, uno alrededor de $100 \mu\text{m}^2$ y otro alrededor de $550 \mu\text{m}^2$, que corresponden a células regulares y “agrandadas” respectivamente. Yendo hacia el interior de la colonia, la contribución de las células grandes disminuye, pero es siempre mayor que en las colonias que crecen en medio estándar.

2.2.3. Cinética de crecimiento de las colonias

La población celular de CQRs con $N_0 < 100$ células en medios de cultivo conteniendo $0 \leq c_{MC} \leq 1.0\%$ presentan una cinética de crecimiento de primer orden en el rango $0 < t < 9000$ min (Figura 2.8a). Además, puede observarse que a medida que aumenta c_{MC} , disminuye el rango de tiempo en que se cumple la cinética exponencial. Desafortunadamente, el estudio del crecimiento del número de células a tiempos mayores no resulta posible ya que para $t > 11000$ min, el conteo de las células individuales es incierto debido al gran aumento de la población celular y a la generación de dominios 3D. La constante de velocidad $\langle k_N \rangle$, que está relacionada con el tiempo de duplicación celular promedio, disminuye paulatinamente con el incremento de c_{MC} . En el medio gelificado ($c_{MC} = 2.5\%$) prácticamente no se observa un aumento en el número de células y por lo tanto $\langle k_N \rangle \sim 0$.

Por otro lado, la cinética de expansión de las colonias radiales expresada en términos del radio promedio $\langle R \rangle$ también sigue un comportamiento exponencial hasta aproximadamente 9000 min (Figura 2.8b). En el caso del medio gelificado la colonia prácticamente crece

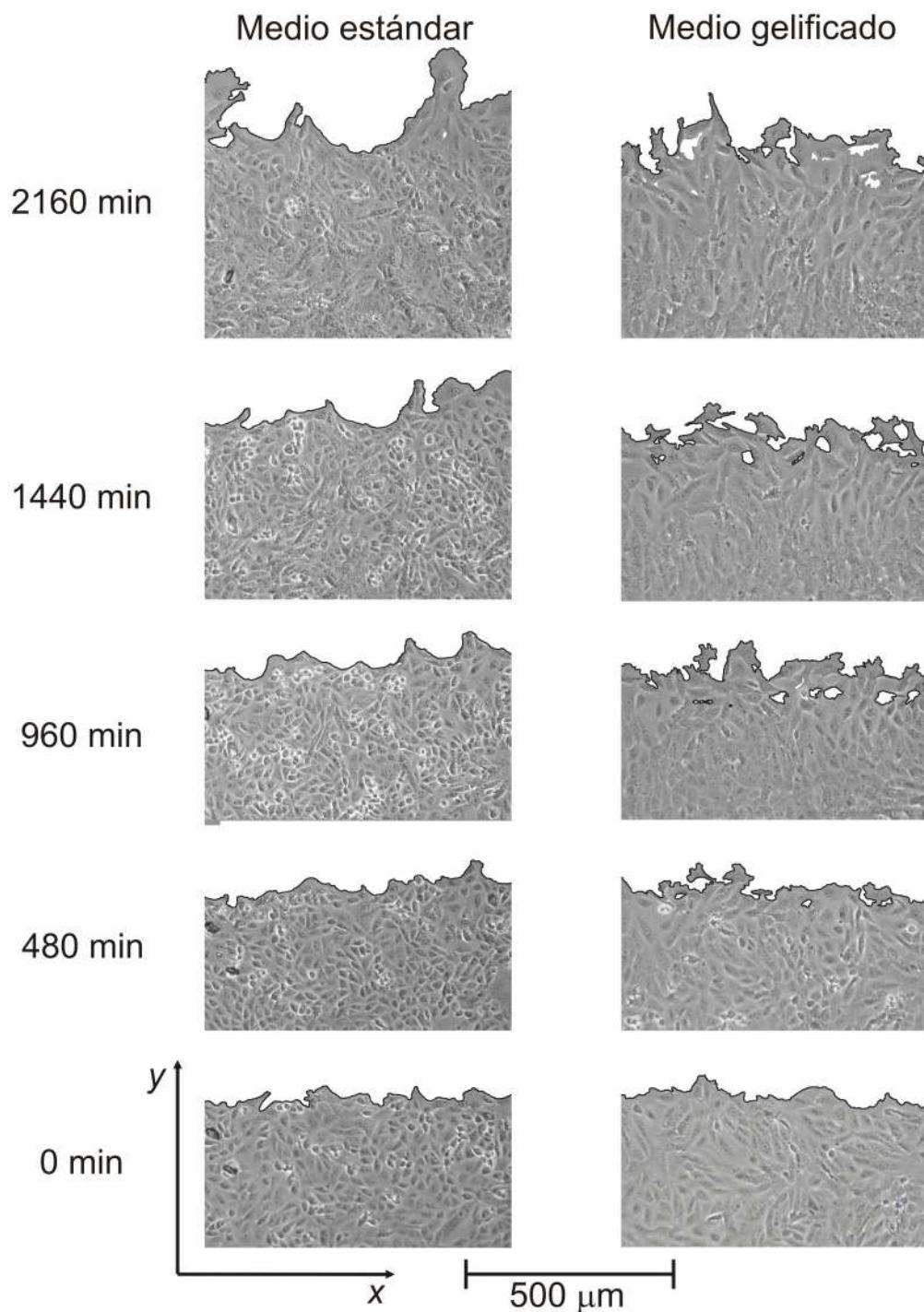


Figura 2.4: Comparación de la evolución de dos secciones del frente de CQR-Cs en medio estándar ($c_{MC} = 0\%$) y medio gelificado ($c_{MC} = 2.5\%$). El seguimiento *in situ* comenzó 9 horas después de remover la máscara de Teflon y agregar medio con $c_{MC} = 0\%$ o $c_{MC} = 2.5\%$, tiempo suficiente para que las células se adapten al nuevo medio de cultivo.

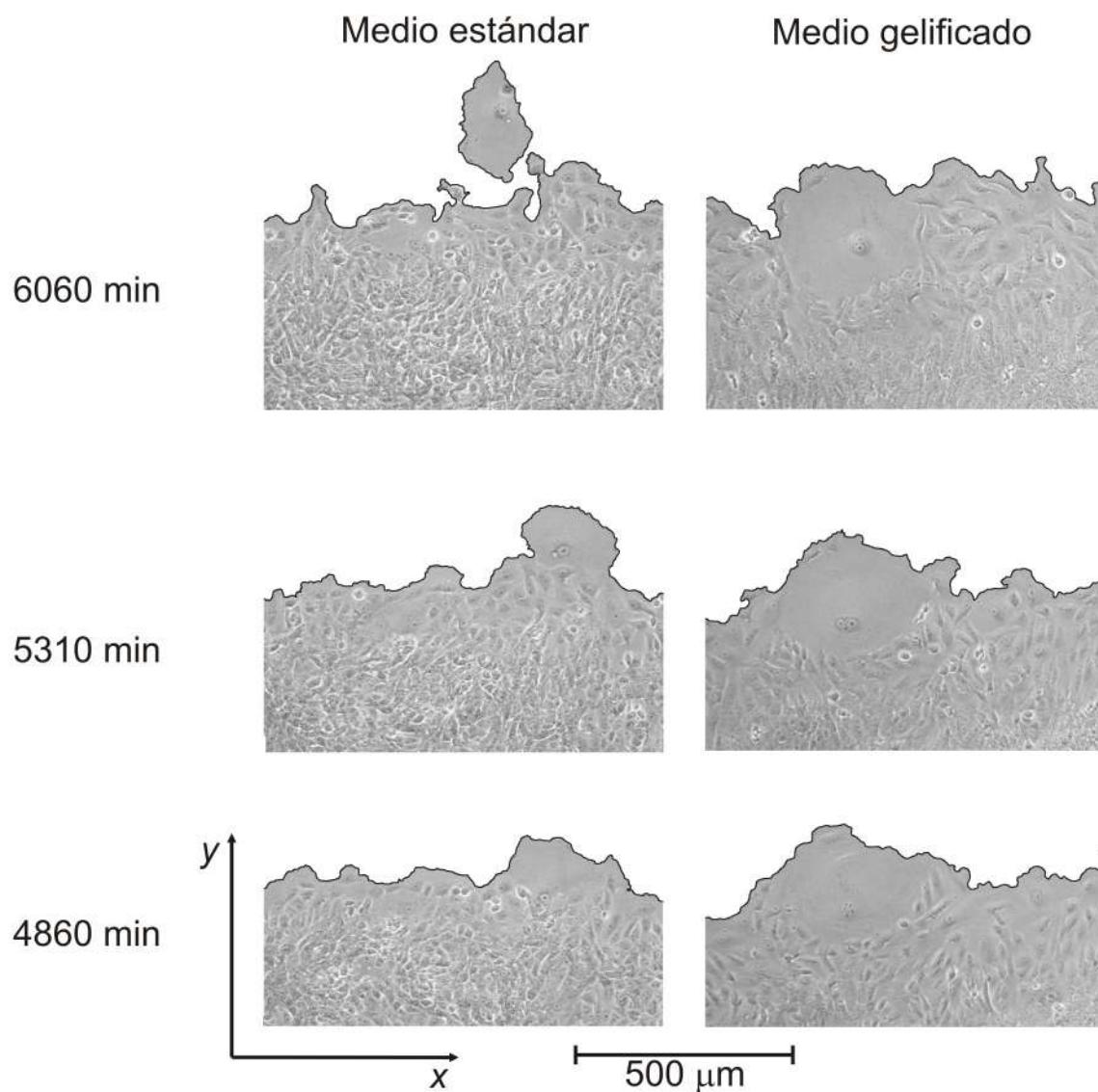


Figura 2.5: Comparación de la evolución de dos secciones del frente de CQR-C en medio estándar ($c_{\text{MC}} = 0\%$) y medio gelificado ($c_{\text{MC}} = 2.5\%$). El seguimiento *in situ* comenzó 80 horas después de remover la máscara de Teflon.

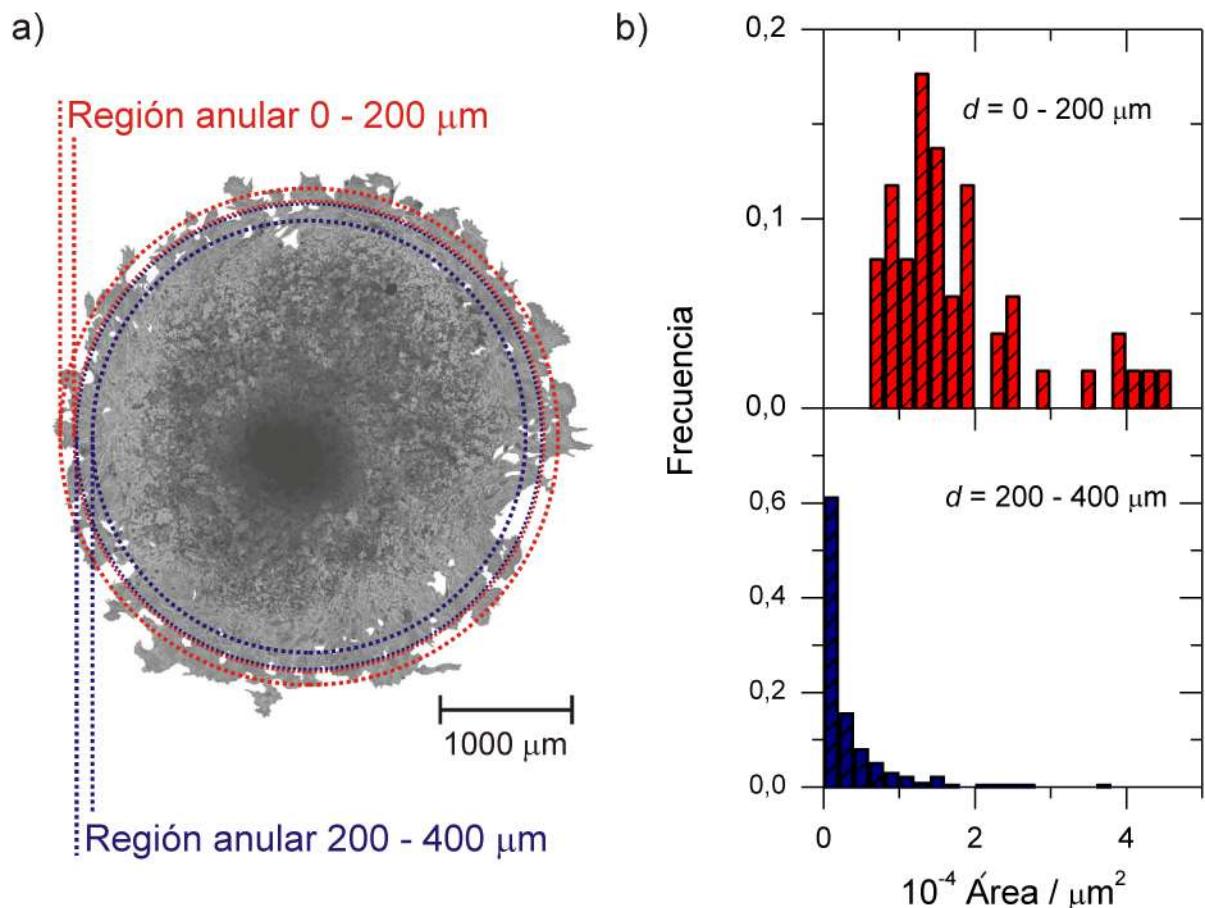


Figura 2.6: a) Esquema de las regiones anulares utilizadas para determinar el área celular en una CQR-C propagándose en medio gelificado. La región anular exterior (roja) se extiende entre 0 - 200 μm desde el borde de la colonia y la interior (azul) entre 200 - 400 μm . b) Histogramas de las áreas de las células ubicadas dentro de las regiones anulares descriptas en (a) de una CQR-C propagándose en medio gelificado a $t = 19000$ min.

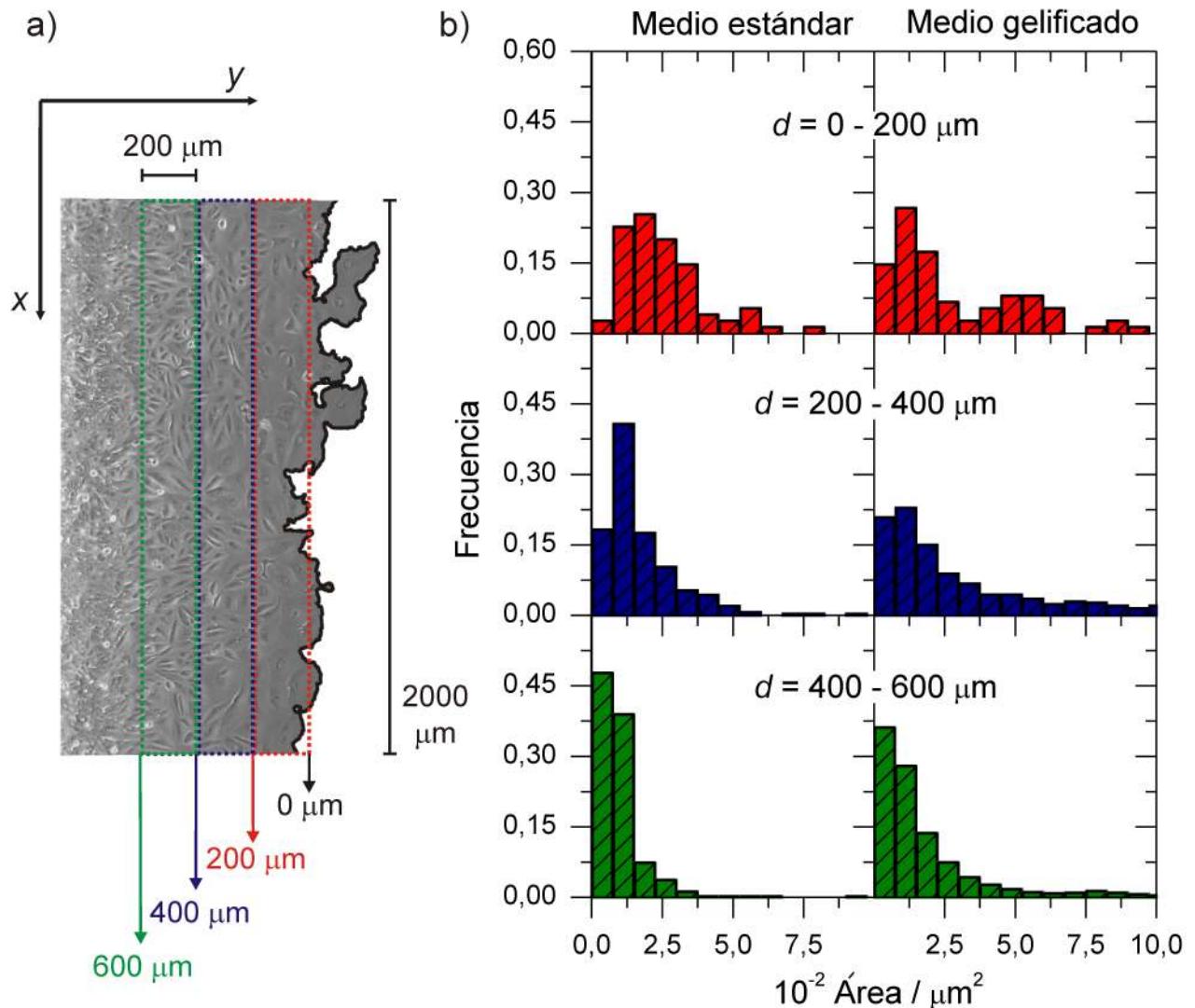


Figura 2.7: a) Esquema de las regiones rectangulares de $2000 \times 200 \mu\text{m}^2$ utilizadas para determinar el área celular en una CQL creciendo en medio estándar o gelificado. La región más exterior comprende una franja que se extiende desde el borde hasta 200 μm hacia el interior de la colonia, la región intermedia desde 200 a 400 μm del borde y la más interior está entre 400 – 600 μm . b) Histogramas de las áreas de las células ubicadas en las regiones rectangulares del borde de una CQL propagándose en medio estándar y gelificado a $t = 7200$ min.

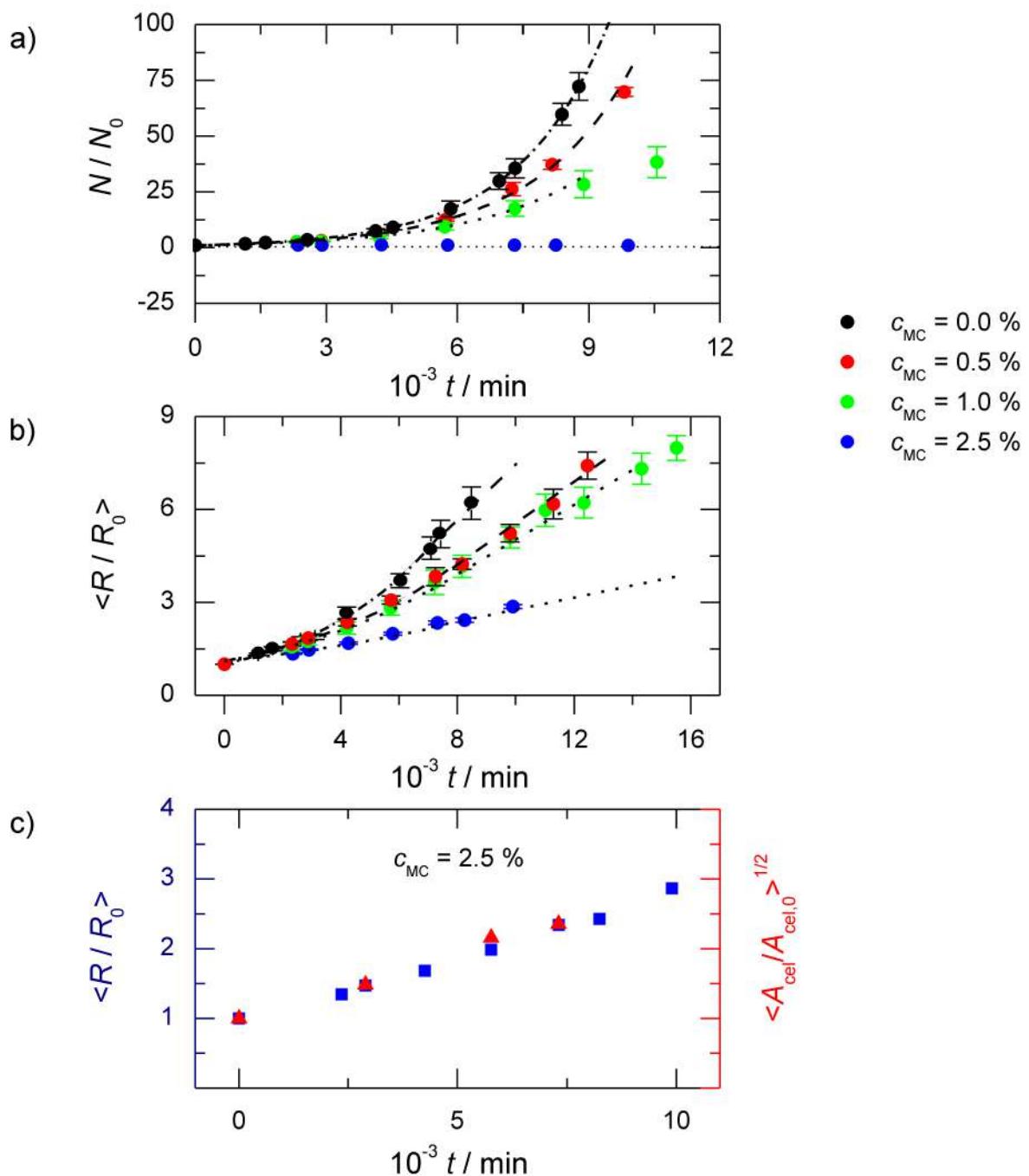


Figura 2.8: Datos cinéticos normalizados para CQRs creciendo en medios de cultivo con $0 \leq c_{\text{MC}} \leq 2.5\%$. a) Población celular promedio normalizada. b) Radio promedio normalizado. c) Radio promedio normalizado y raíz cuadrada del área celular promedio normalizada. N_0 , R_0 , $A_{\text{cel},0}$, corresponden a la población promedio inicial, radio promedio inicial y área celular promedio inicial, respectivamente.

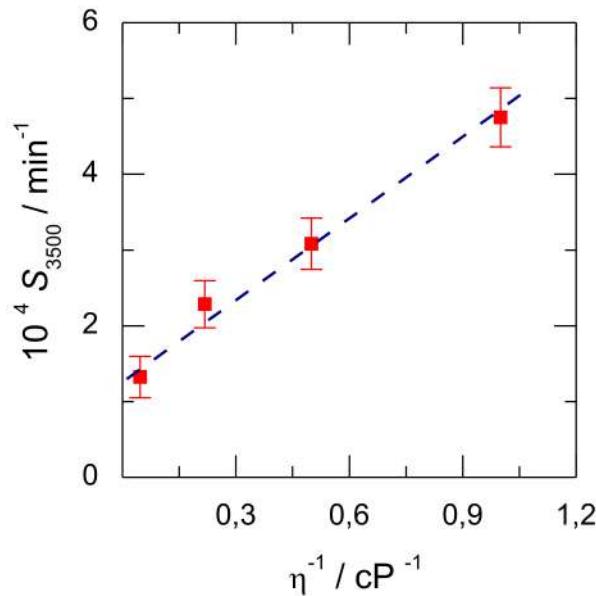


Figura 2.9: S_{3500} , la pendiente de la curva $\langle R/R_0 \rangle / dt$ a $t = 3500$ min tomada de la figura 2.8, en función de la inversa de la viscosidad dinámica (η^{-1}) del medio de cultivo.

a $\langle V_F \rangle$ constante y sólo se apartan de la linealidad los datos a tiempos cortos. Asimismo, la constante de primer orden $\langle k_R \rangle$ disminuye ligeramente con c_{MC} , aunque en este caso no se observa un descenso abrupto en el medio gelificado como ocurría con $\langle k_N \rangle$.

El radio promedio de una colonia quasi-circular 2D puede aumentar debido al incremento del número o al aumento de tamaño de las células. Si las células se consideran aproximadamente circulares, el radio promedio de la colonia está relacionado al número y al radio promedio de las células. Además, el radio de las células será directamente proporcional a la raíz cuadrada del área celular. En el rango $3000 < t < 10000$ min, el radio promedio de la colonia normalizado ($\langle R/R_0 \rangle$) y la raíz cuadrada del área celular promedio normalizada ($\langle A_{cel}/A_{cel,0} \rangle^{1/2}$) de las colonias creciendo en medio gelificado caen en la misma curva (Figura 2.8c). Este hecho indica que el crecimiento del frente de la colonia está gobernado principalmente por el aumento del área (y radio) celular promedio.

La relación $\langle k_N \rangle / \langle k_R \rangle$ para las colonias que se propagan en medios conteniendo $c_{MC} = 0.5\%$ y $c_{MC} = 1.0\%$ (medios de cultivo formando soles de metil celulosa) es algo mayor a la resultante para el medio con $c_{MC} = 0\%$, pero decrece abruptamente para el medio gelificado (Tabla 2.1). El hecho de que en los medios soles la tasa de duplicación no disminuya tanto como la expansión radial de la colonia parece consistente con cierto efecto de “frenado” al desplazamiento de las células que ejerce la metil celulosa, efecto que se vuelve mayor a medida que se incrementa c_{MC} . Para analizar mejor esto, se graficó la pendiente de la curva $\langle R/R_0 \rangle$ en función del tiempo a $t = 3500$ min (S_{3500} , corresponde a la velocidad de crecimiento radial instantánea en ese tiempo) en función de la inversa de la viscosidad dinámica de los medios de cultivo (η^{-1}), obteniéndose una relación lineal (Figura 2.9). Es importante notar que a $t = 3500$ min, las colonias crecen con un régimen exponencial, las células tienen un tamaño aproximadamente constante y la influencia de las células “agrandadas” es pequeña. Bajo estas circunstancias, la disminución de $\langle k_R \rangle$ con c_{MC} está determinada principalmente por la estructura y propiedades hidrodinámicas del medio de cultivo.

En otra serie de experimentos, se estudió la propagación de CQR-C, primero en medio

c_{MC}	$10^4 < k_N >$	$10^4 < k_R >$	$< k_N > / < k_R >$
0	4.9 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2
0.5	4.4 ± 0.3	1.60 ± 0.05	2.8 ± 0.2
1.0	3.9 ± 0.3	1.50 ± 0.05	2.6 ± 0.3
2.5	~ 0	0.95 ± 0.05	0

Tabla 2.1: Constantes cinéticas de primer orden $< k_N >$ y $< k_R >$ para CQRs en medios con distintas concentraciones de MC.

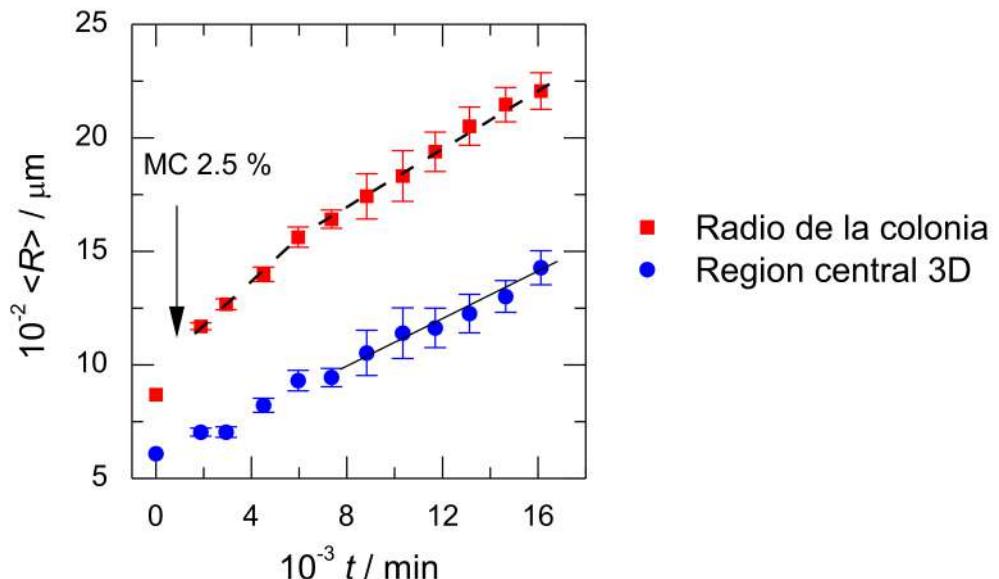


Figura 2.10: Dependencia del radio promedio de la colonia $< R >$ y de la región central 3D de CQR-Cs con el tiempo de crecimiento. La flecha indica el momento en que se cambió el medio estandar por medio gelificado.

estándar durante 1000 min, y luego se cambió a medio gelificado y se siguió el crecimiento durante más de 20000 min. En el medio gelificado, los gráficos de $< R >$ en función de t muestran 2 líneas rectas, la primera a $t < 6000$ min con una pendiente de $0.090 \pm 0.005 \mu\text{m min}^{-1}$ y la segunda a partir de $t = 6000$ min con una pendiente de $0.064 \pm 0.005 \mu\text{m min}^{-1}$ (Figura 2.10). Este cambio se asocia con la formación de una barrera de células “agrandadas” en el borde de la colonia que frena el crecimiento del frente. El efecto de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del medio combinado con el que genera la barrera de células “agrandadas”, resulta en un efecto cooperativo que retrasa o frena la propagación del sistema. La velocidad de crecimiento del frente en medio gelificado para $t > 6000$ min resulta 3 veces menor que los $0.20 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$ encontrados para las CQR-C en medio estándar. Además, la expansión radial del núcleo 3D en función del tiempo también sigue una relación lineal. La velocidad de crecimiento es de $0.055 \pm 0.005 \mu\text{m min}^{-1}$ para $t > 6000$ min, un valor similar al del borde de la colonia. La coincidencia de estos valores de velocidad sumados a la baja tasa de duplicación celular en el medio gelificado sugieren que la expansión de la colonia podría involucrar también el desplazamiento de las células desde la región interior hacia la región del borde de la colonia, generando una corona efectiva 2D de espesor constante que crece influenciada por estos efectos cooperativos de “frenado”.

Las CQLs crecen con velocidad constante tanto en el medio estándar como en el gelificado, con valores de $< V_F > = 0.220 \pm 0.003 \mu\text{m min}^{-1}$ y $< V_F > = 0.126 \pm 0.003 \mu\text{m min}^{-1}$

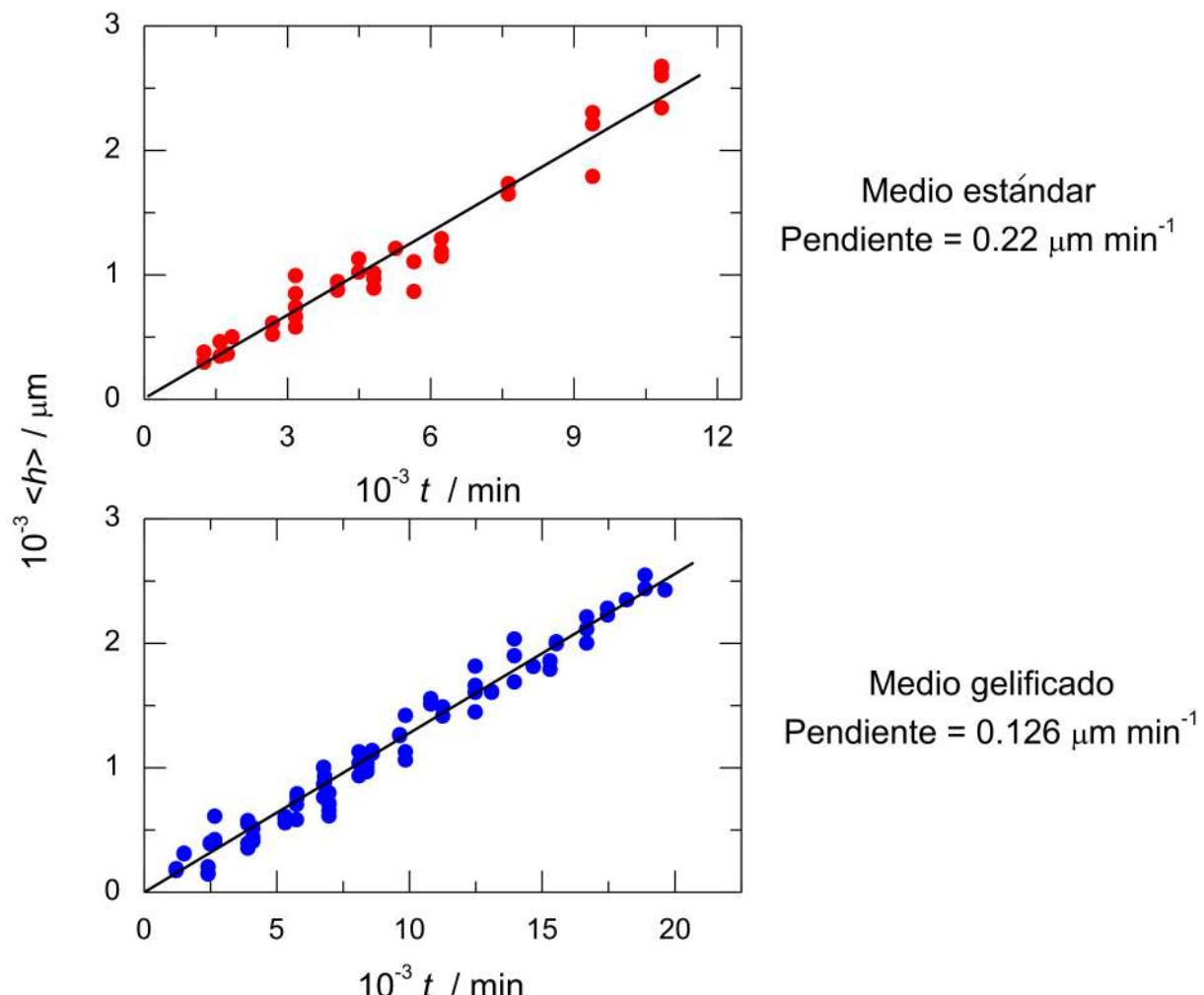


Figura 2.11: $\langle h \rangle$ en función del tiempo de CQLs en medio estándar y medio gelificado.

respectivamente (Figura 2.11). La $\langle V_F \rangle$ de las CQLs en medio estándar es similar a la de las CQR-Cs, cuyo valor es $0.20 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$. Sin embargo, cuando ambos tipos de colonias se propagan en medio gelificado, la velocidad de la colonia con geometría lineal resulta casi el doble de la de la colonia con geometría circular ($0.126 \pm 0.003 \mu\text{m min}^{-1}$ contra $0.064 \pm 0.005 \mu\text{m min}^{-1}$ para $t > 6000 \text{ min}$). Esta diferencia puede deberse al mayor número y al mayor tamaño de células “agrandadas” en las CQR-Cs respecto a las de las CQLs, lo que generaría un mayor efecto “frenado” en el avance del frente (Figura 2.6 y 2.7).

2.2.4. Análisis de la duplicación celular mediante inmunohistoquímica

La duplicación celular juega un papel importante en los cambios espacio-temporales que acompañan el crecimiento 2D de las colonias tanto en medio estándar como en medio gelificado, como puede observarse en las tinciones de Ki-67 de los cultivos. Ki-67 es una proteína estrechamente asociada con la proliferación celular y está presente durante todos las fases activas del ciclo celular (G_1 , S , G_2 y mitosis) y ausente en las células en reposo o quiescentes (G_0) [2.15].

Prácticamente todas las células de las colonias creciendo en medio estándar presentan, si bien en diferentes niveles, expresión de Ki-67 (Figura 2.12). Este resultado era de esperar ya

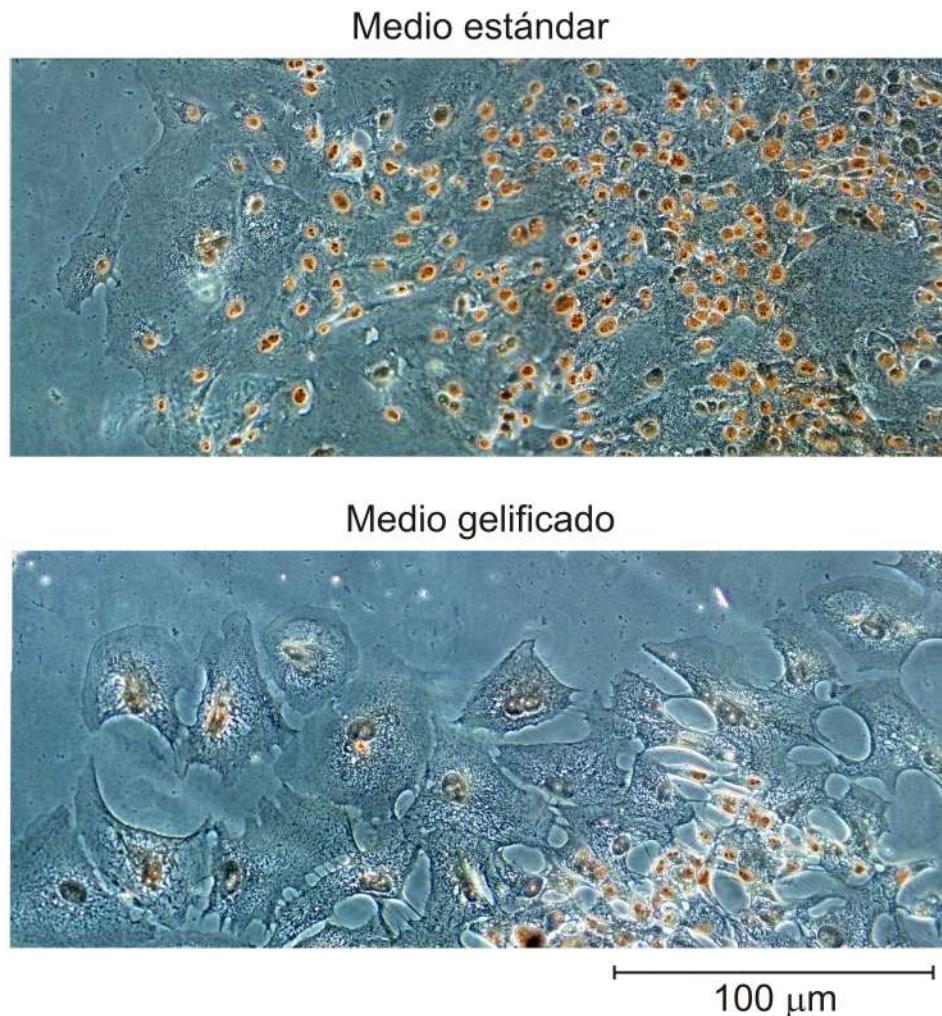


Figura 2.12: Imágenes de la región del borde de colonias de células Vero en medio estándar y medio gelificado teñidas para el antígeno Ki-67.

que células de una línea celular continua como las Vero pueden duplicarse indefinidamente en las condiciones adecuadas de cultivo. Sin embargo, las colonias con medio gelificado sólo presentan pequeños grupos de células teñidas (es decir, activas para la duplicación) y las células “agrandadas” parecen inactivas para la duplicación celular. Esta inhibición de la duplicación celular es consistente con la disminución de $\langle k_N \rangle$ a medida que c_{MC} aumenta.

2.2.5. Movilidad celular en las colonias quasi-lineales

Las CQLs presentan la configuración más adecuada para evaluar los componentes de velocidad paralelos y perpendiculares al frente. Por este motivo se obtuvieron las trayectorias de las células individuales de las secuencias de seguimiento *in situ* de CQLs tanto en medio estándar como en medio gelificado.

Las trayectorias de las células de las colonias en medio estándar tienden a ser bastante caóticas en las regiones más alejadas del frente y son bien direccionales en la región del borde (Figura 2.13a). La distribución de los componentes de velocidad perpendiculares al frente muestra un pico ancho corrido hacia valores positivos, con velocidades con valores levemente negativos y cercanas a 0 para las células del interior de la colonia, y velocidades que alcanzan los $0.4 \mu\text{m min}^{-1}$ para las células en la región del borde (Figura 2.13b). Además,

puede apreciarse que en el borde las células describen trayectorias coordinadas, reflejando movimientos en cierto grado colectivos. Estas diferencias están en parte relacionadas con las distintas densidades en distintas regiones de la colonia.

Las células de las colonias que se propagan en medio gelificado presentan en los primeros estadios trayectorias más cortas (Figura 2.13c) y una distribución de componentes de velocidad perpendicular más estrecha. El máximo de la distribución está desplazado hacia la derecha, aunque menos que para el caso del medio estándar (Figura 2.13d). Además las trayectorias parecen ser más independientes unas de otras, por lo que el movimiento colectivo de las células en medio gelificado es menor. A tiempos largos comienzan a aparecer las células “agrandadas” en las CQLs que se propagan en medio gelificado. Estas células tienen una trayectoria corta y se desplazan lentamente, actuando de barrera para las células que se encuentran detrás de estas, impidiendo que avancen libremente en la dirección del frente (Figura 2.13e). Las células de tamaño regular que se encuentran alrededor de la célula “agrandada” tienden a rodearla, generando trayectorias sesgadas en la dirección paralela al frente. Los histogramas de velocidad perpendicular al frente muestran dos máximos, uno en valores algo menores a 0 producto de las células detrás de la célula grande que no pueden avanzar y otro a valores positivos que se origina en las células de tamaño regular que la rodean (Figura 2.13f). Por lo tanto, la presencia de células “agrandadas” en la región del borde de la colonia produce componentes atípicos de las trayectorias individuales de las células de tamaño regular.

El hecho de que la movilidad individual de las células en el medio gelificado sea menor que en el medio estándar confirma la influencia de las características reológicas del medio tanto en la movilidad celular como en el crecimiento del frente, al menos a tiempos cortos. Los gráficos doble logarítmicos de msd en función de Δt_R muestran una relación lineal para ambos medios, aunque el valor del msd para cada intervalo de tiempo siempre es superior en el medio estándar que en el medio gelificado (Figura 2.14). Esto indica que la movilidad celular individual también es mayor en el medio estándar que en el gelificado, de acuerdo con lo que se había observado en los histogramas de componentes de velocidad perpendicular al frente. El valor de la pendiente de la relación lineal entre el $\log msd$ y $\log \Delta t_R$ calculado a intervalos de tiempo pequeños es de 1.46 ± 0.04 para el medio gelificado y 1.65 ± 0.04 para el medio estándar. Estas pendientes con valores entre 1 (correspondiente al movimiento aleatorio) y 2 (correspondiente a un movimiento balístico) indican que el movimiento de las células de las colonias en medio estándar es más direccional y balístico que aquellas en medio gelificado.

La velocimetría por análisis de imágenes de partículas (PIV) permitió obtener los campos de velocidad de las colonias creciendo en medio estándar y medio gelificado. Los campos obtenidos se dividieron en dos regiones de aproximadamente $600 \mu\text{m}$ de largo, una en el borde de la colonia y otra en una región interior (Figura 2.15a). Los vectores de velocidad de la región interior de la colonia que se propaga en medio estándar son cortos y no muestran una dirección preferencial, mientras que en el borde los vectores son más largos y orientados en dirección perpendicular al frente. Lo contrario ocurre con los vectores de velocidad de colonias en medio gelificado a $t = 4800$ min, ya que se observa una mayor orientación en la región interior que en la del borde (Figura 2.15a). En medio gelificado a $t = 540$ min el comportamiento es intermedio a los dos descriptos anteriormente, con algunos grupos de células orientadas tanto en el borde como en el interior de la colonia.

La presencia de MC en el medio disminuye notablemente el movimiento colectivo de las células en el borde. Los histogramas de ángulo de los vectores permiten cuantificar el comportamiento observado en los campos de velocidad (Figura 2.15b). Valores cercanos a 90° indican vectores en la dirección y sentido del avance de frente, mientras que valores

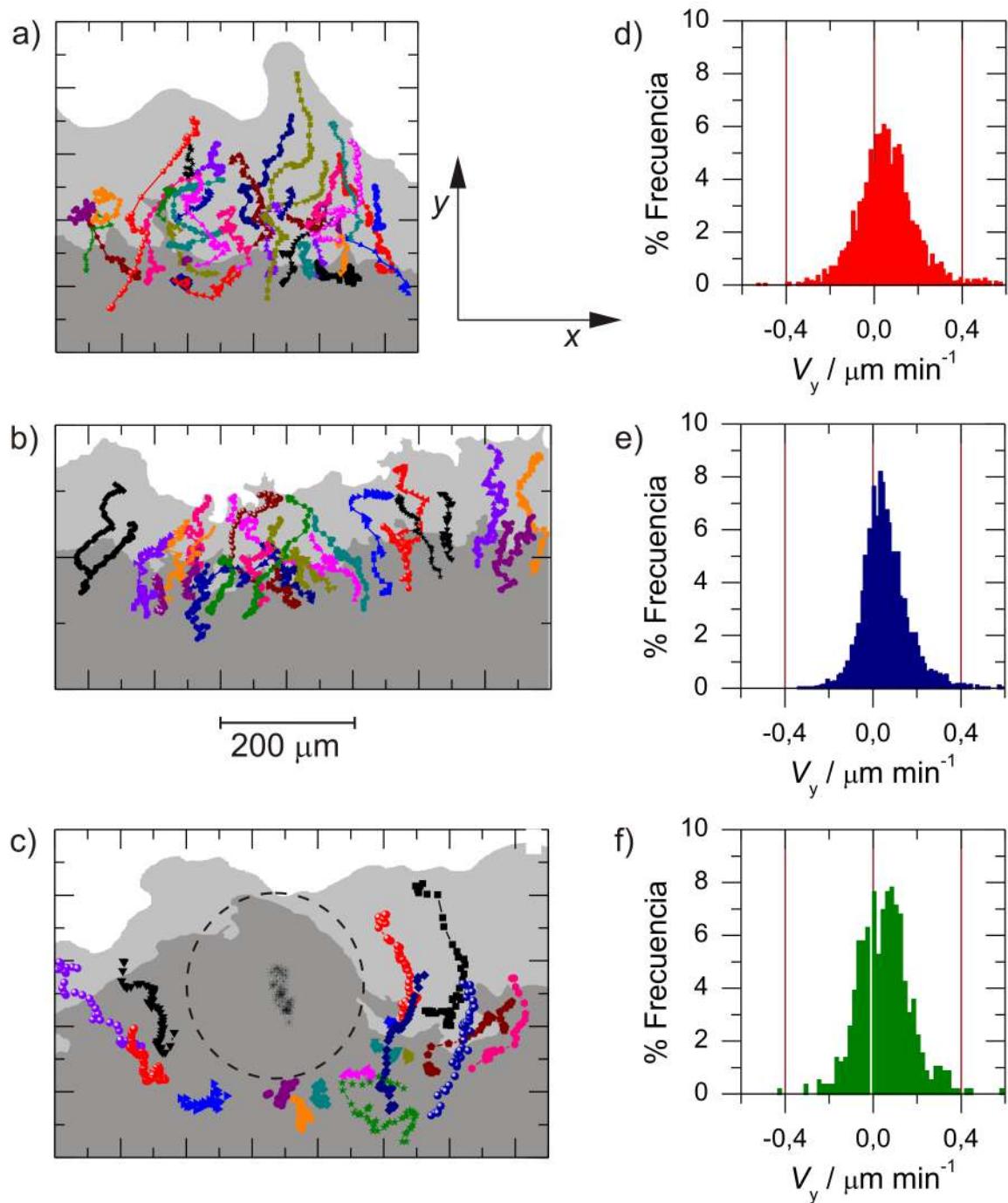


Figura 2.13: Trayectorias celulares individuales y distribuciones del componente de velocidad perpendicular (componente y) al frente para CQLs en: (a, b) medio estándar y (c, d, e, f) medio gelificado. El seguimiento comenzó a $t = 1050$ min (a, b), 540 min (c, d) y 4800 min (e, f) y el $\Delta t = 30$ min.

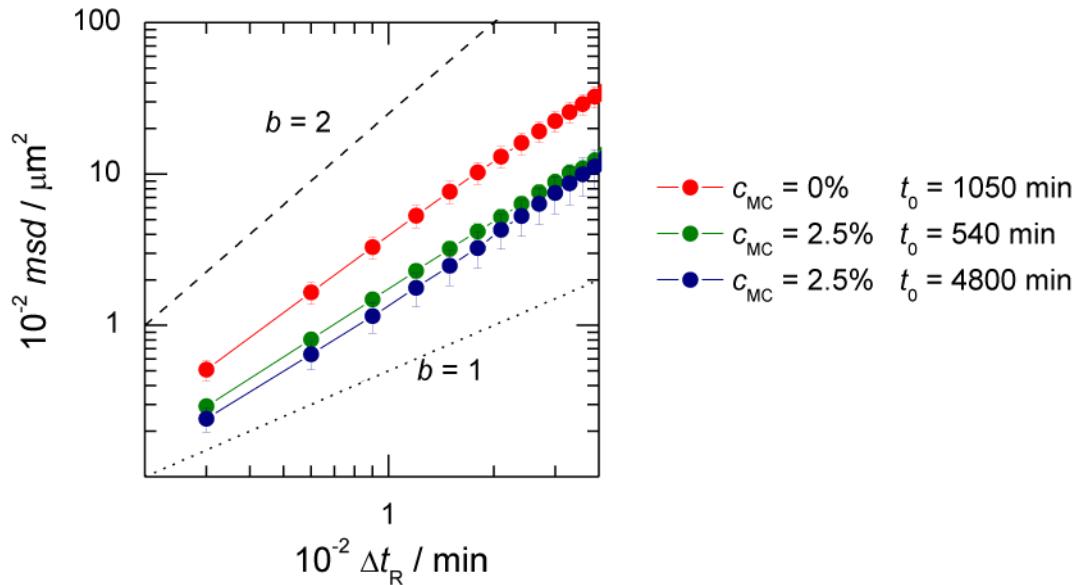


Figura 2.14: Gráficos doble logarítmicos del msd promedio de células individuales en función de Δt_R . Se utilizaron las trayectorias de células presentes en el borde de CQL. Las líneas con pendiente 1, correspondiente a un movimiento aleatorio, y 2, correspondiente a un movimiento balístico, sirven de guía.

cercanos a 270° indican vectores en la dirección perpendicular al frente pero en sentido contrario. Los vectores paralelos al frente están representados por ángulos cercanos a 0° (y 360°) cuando apuntan en un sentido y por ángulos próximos a 180° cuando apuntan en el otro.

La distribución de ángulos de los vectores en la región interior de colonias en medio estándar muestra una distribución que se extiende entre 0° y 360° , indicando que las células se mueven en todas las direcciones, aunque hay cierta preferencia en los ángulos entre 0° y 180° . Por otro lado, en la región del borde se observa un marcado pico alrededor de 90° , por lo que prácticamente todas las células se mueven en dirección del avance del frente. Los vectores de la región interna de las colonias en medio gelificado aumentan de tamaño y se orientan en la dirección del crecimiento del frente a medida que el t aumenta de 540 a 4800 min. Esto se observa con un incremento en la frecuencia de los ángulos en el intervalo $0 - 150^\circ$, que es coherente con los grupos de células orientadas que se van generando en la región interna de la CQL observados en la figura 2.5. El proceso inverso ocurre con los vectores de la región del borde de las colonias en medio gelificado. A medida que transcurre el tiempo, los vectores de velocidad se vuelven más pequeños y pierden su orientación, lo que se ve reflejado en el achatamiento del pico a 90° y la aparición de vectores con ángulos fuera del rango $45 - 135^\circ$. Esto es coincidente con el efecto retardante constituido por el aporte de la reología del medio y la presencia de células “agrandadas” que se comportan como obstáculos al desplazamiento de las células regulares.

2.2.6. Análisis de escalado dinámico

Se graficaron los datos de rugosidad de colonias creciendo en medio estándar y gelificado (Figuras 2.3, 2.4 y 2.5) en función de L (Figura 2.16) y de t (Figura 2.17).

A partir de los datos de w en función de L se calculó el valor del exponente α , que resultó ser de 0.50 para las CQLs en medio estándar y de 0.63 para las CQLs en medio gelificado

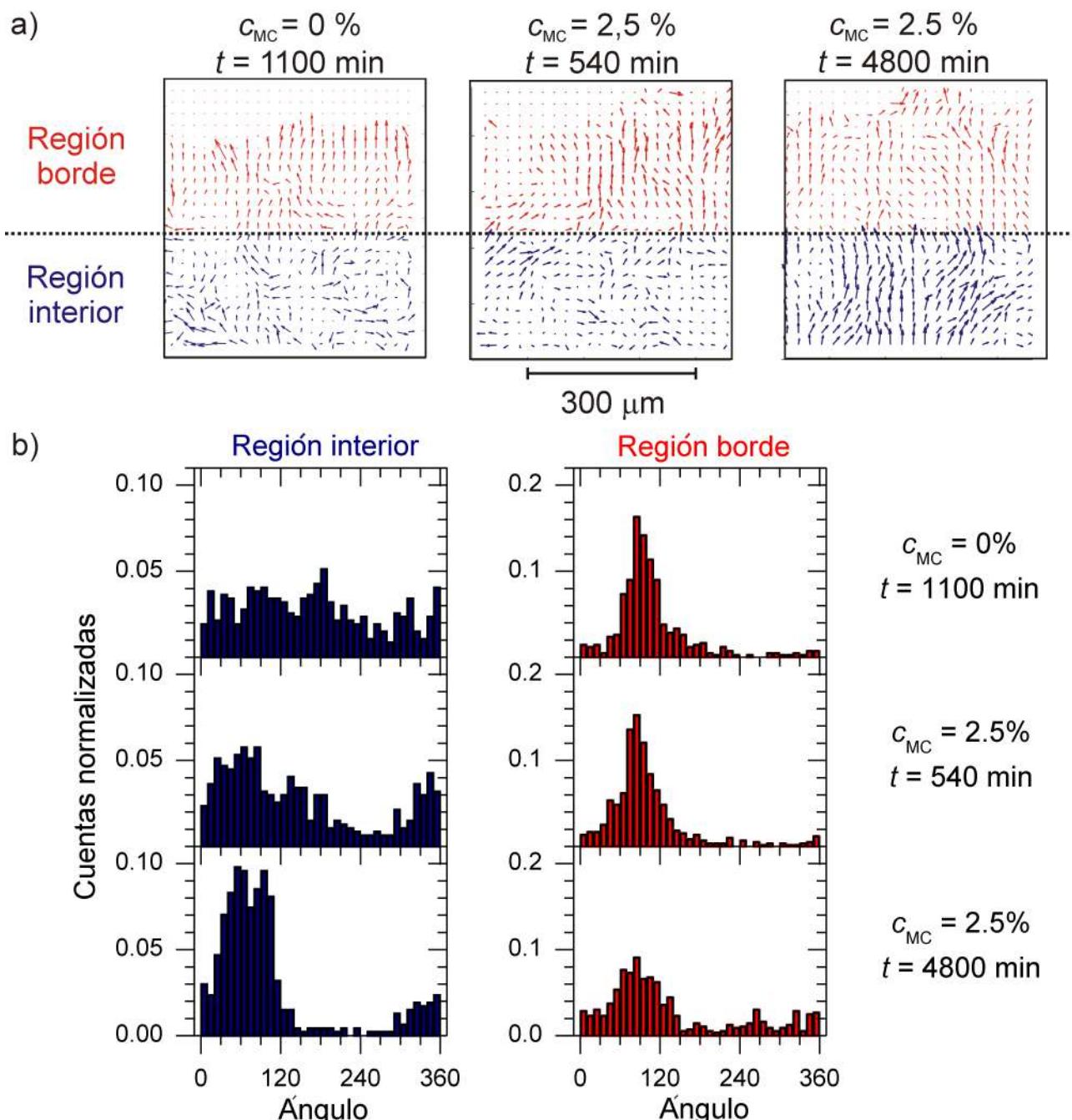


Figura 2.15: a) Campos de velocidad de CQLs en medio estándar a $t = 1100\text{ min}$ y medio gelificado a $t = 540\text{ min}$ y $t = 4800\text{ min}$ luego de remover la máscara de Teflon. b) Histogramas de ángulos de los vectores de velocidad en distintas regiones de CQLs en medio estándar y gelificado. Puede observarse como aumenta la proporción de vectores con ángulos entre 0 y 150° en la región interior de las colonias al ir de medio estándar a medio gelificado $t = 540\text{ min}$ y $t = 4800\text{ min}$. El fenómeno inverso se observa en los vectores de la región inversa.

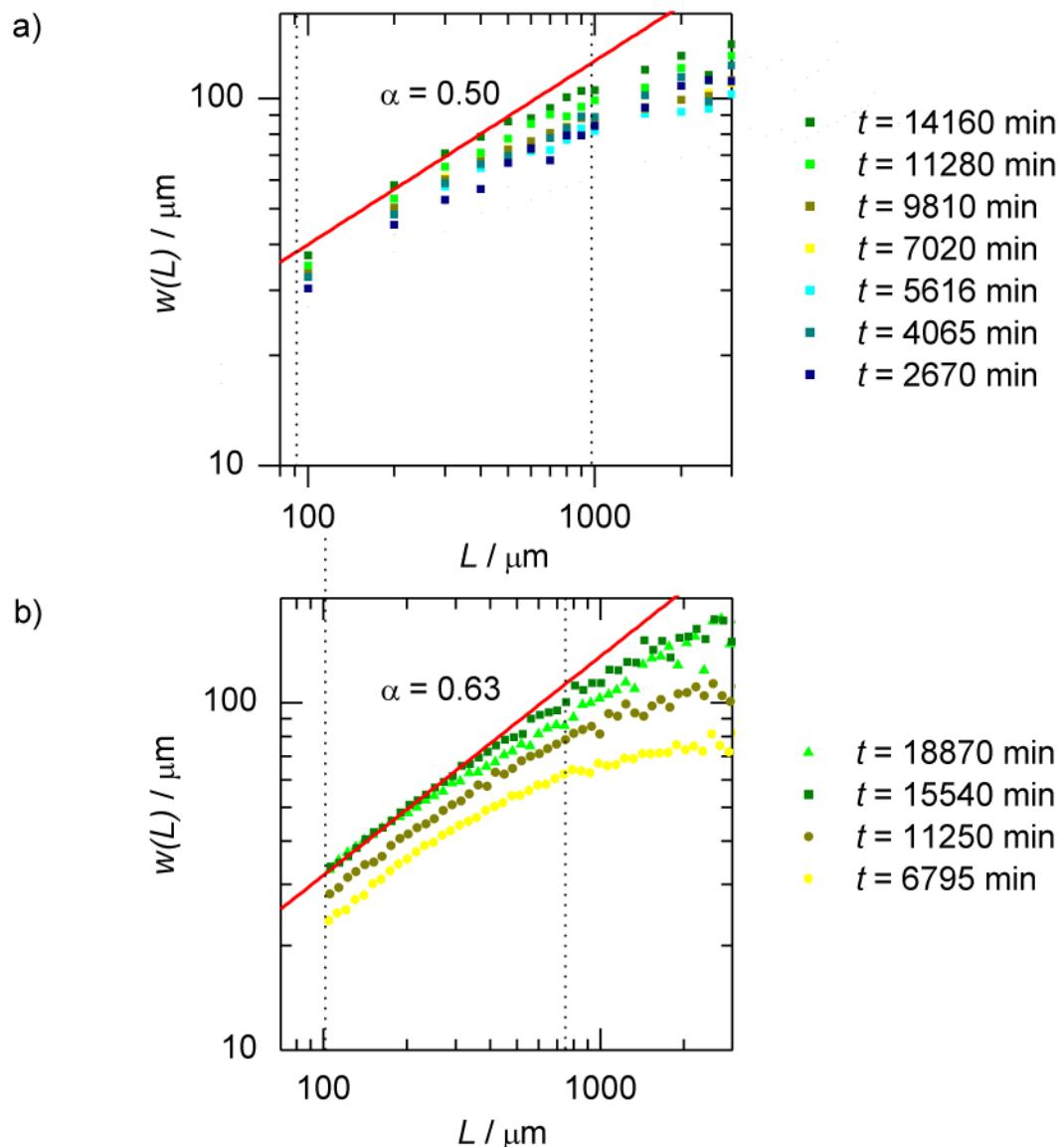


Figura 2.16: Gráficos doble logarítmicos de w en función de t para CQLs en medio estándar (a) y medio gelificado (b).

(Figura 2.16).

Los datos de w en función de t de las distintas curvas se colapsaron utilizando las relaciones de escalado de Family-Vicsek (Figura 2.17). Las curvas de las colonias en medio estándar colapsaron con valores de $\alpha = 0.50$ y $z = 1.5$ y las de las colonias con medio gelificado con $\alpha = 0.63$ y $z = 0.81$. Las pendientes de las curvas permitieron obtener los exponentes de crecimiento, con valores de $\beta = 0.33$ y $\beta = 0.75$ para el medio estándar y gelificado, respectivamente.

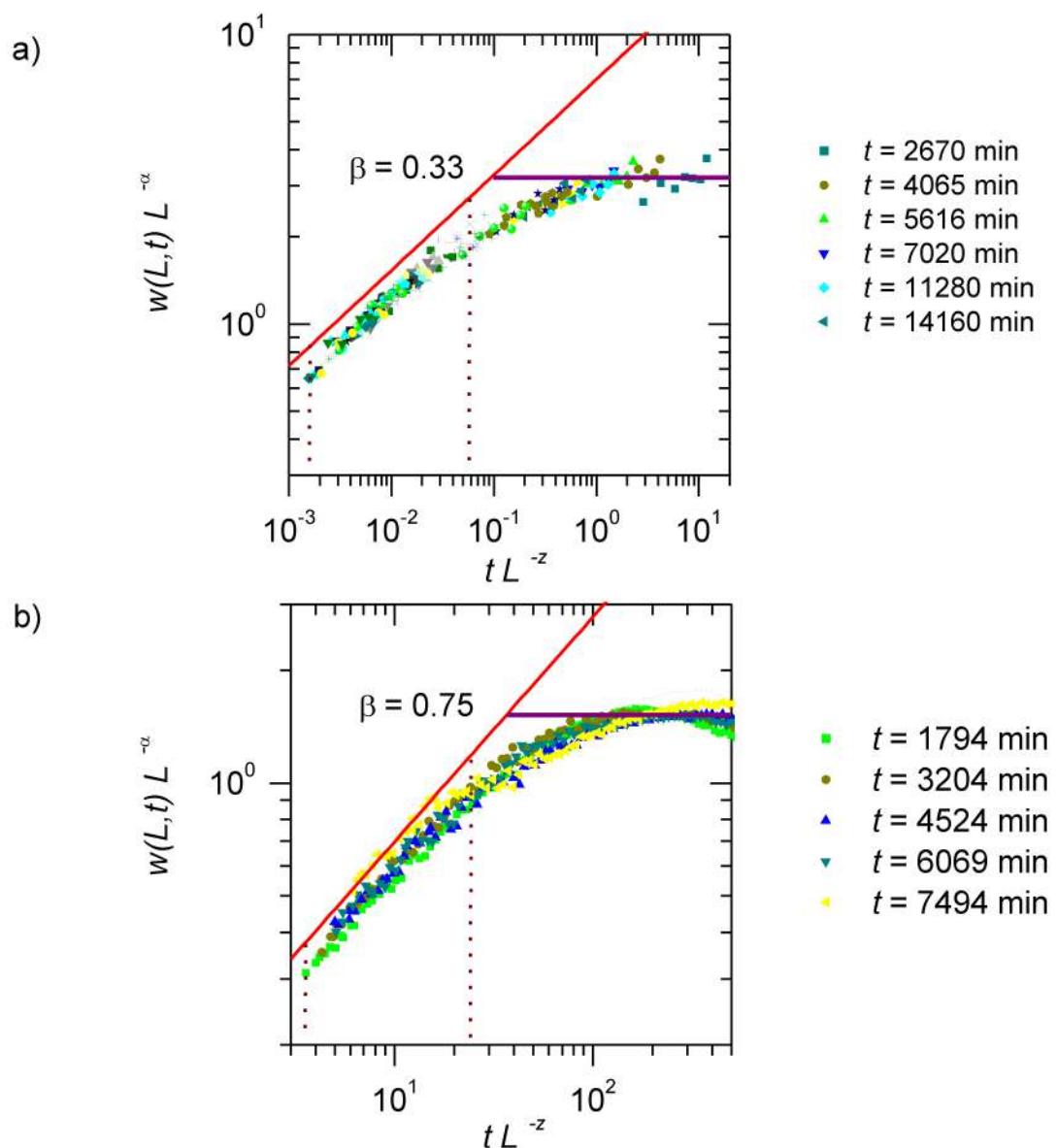


Figura 2.17: Gráficos doble logarítmicos de las relaciones de escalado de Family-Vicsek de las rugosidades de CQLs en medio estándar (a) y medio gelificado (b).

2.3. Discusión

2.3.1. Influencia de las heterogeneidades espacio-temporales en la propagación de colonias 2D

La evolución morfológica de las colonias de células Vero en medios con distintas concentraciones de metil celulosa muestran heterogeneidades espacio-temporales manifestadas a nivel celular y a nivel de la colonia. El tamaño, la morfología y la orientación de las células dependen tanto de la concentración de MC como de la posición en la colonia y del tiempo de crecimiento.

Colonias quasi circulares (CQRs)

Las CQRs en medio estándar en general inician su propagación a partir de un conjunto de células con características homogéneas y permanecen prácticamente constantes en términos del tamaño promedio de las células y la densidad celular local, cuando N es bajo (Figura 2.1). A medida que el número de células y la concentración de metil celulosa aumentan, las heterogeneidades empiezan a jugar un papel más importante en la cinética de crecimiento. Esto se pone de manifiesto por la transición de una cinética de crecimiento exponencial a una de crecimiento a $< V_F >$ constante con el aumento del número de células. Esta transición ocurre a tiempos más cortos al aumentar c_{MC} . Tanto k_N como k_R disminuyen a medida que se incrementa la concentración de metil celulosa (Tabla 2.1). Esto indica que las propiedades reológicas del medio de cultivo ejercen un efecto de “frenado” en la propagación de las colonias producido como consecuencia de la disminución de la tasa de duplicación y de la movilidad celular. En el medio gelificado $k_N \ll k_R$ y el crecimiento del tamaño de la colonia se debe principalmente al aumento del tamaño de las células.

A medida que c_{MC} aumenta, la transición cinética de crecimiento exponencial a $< V_F >$ constante ocurre a tiempos más cortos y comienzan a aparecer células grandes en el borde de la colonia al final de la fase exponencial. Luego de la transición, la colonia posee una región central de alta densidad celular con crecimiento 3D rodeada de una región anular 2D con células de tamaño regular y células “agrandadas”. Las células de tamaño regular de la región anular exterior son las que contribuyen mayoritariamente a la expansión de la colonia mediante sus desplazamientos y, aunque un tanto reducidas, duplicaciones (Figuras 2.1, 2.8, 2.10 y 2.11).

La expansión de las colonias en medio estándar está de acuerdo con varios modelos propuestos para describir el crecimiento de agregados celulares *in vitro* [2.16]. En estos modelos, las células sufren inhibición por contacto cuando la densidad local alcanza ciertos valores críticos. Esta inhibición de la duplicación celular ocurre cuando las células dejan de moverse y sus áreas disminuyen debido a las restricciones mecánicas locales [2.17].

La presencia de metil celulosa en el medio de cultivo ejerce un efecto retardante o de “frenado” en la propagación de las colonias. Dependiendo de la edad de la colonia, pueden distinguirse dos tipos de efectos de “frenado”. Un efecto tipo I que aparece a tiempos cortos y se relaciona con la estructura compleja del medio de cultivo y un efecto tipo II que aparece a tiempos largos vinculado a las células “agrandadas”.

Las características fisicoquímicas de los medios de cultivo que contienen MC son responsables del efecto tipo I. La MC posee un grado intermedio de sustitución de sus grupos OH por grupos metoxi y en solución acuosa genera una estructura tipo caja rodeando estos grupos hidrofóbicos, que aumenta yendo desde el sol al gel [2.12, 2.18, 2.19]. Esta estructura aumentaría el coeficiente de fricción relacionado a los desplazamientos y deformaciones de

las células. Esto es consistente con la relación lineal entre la velocidad de avance del frente y la inversa de la viscosidad dinámica (Figura 2.9). El efecto tipo II se observa principalmente en las CQR-Cs y CQLs y se discutirá a continuación.

Colonias quasi circulares con elevado número de células (CQR-Cs)

En las CQR-Cs en medio gelificado, las células “agrandadas” forman una especie de barrera que perturba la movilidad de las células de tamaño regular hacia el frente de la colonia (Figuras 2.2 y 2.6). Estas células “agrandadas” resultan prácticamente inmóviles y son inactivas para la duplicación celular (Figuras 2.12 y 2.13). Desde un punto de vista físico, se comportan como obstáculos quasi-fijos que fuerzan a las células de tamaño regular a realizar trayectorias más largas y sesgadas para rodearlas y avanzar hacia el frente (Figuras 2.13, 2.14 y 2.15). El efecto de “frenado” tipo II está relacionado a la aparición de estas células “agrandadas” que en promedio frenan progresivamente el avance del frente (Figuras 2.2 y 2.6). Los valores de $< V_F >$ tanto del borde 2D de la colonia como de la región central e intermedia 2D/3D resultan muy similares (Figura 2.10). Teniendo en cuenta esto y la baja tasa de duplicación en las colonias en medio gelificado, es probable que las células de los dominios 3D desciendan a la región 2D, interactúen con el substrato y participen en la expansión de la colonia.

Colonias quasi lineales (CQLs)

En las CQLs, las células “agrandadas” en la región del borde se comportan de un modo similar a las descriptas para las CQR-Cs, aunque en el caso del frente quasi-lineal la capa de células grandes es bastante discontinua, actuando como obstáculos con pequeños espacios libres entre ellos. A tiempos largos, los histogramas de áreas celulares de las CQLs que se propagan en medio gelificado presentan dos máximos (Figura 2.7). Estos máximos indican la existencia de dos poblaciones celulares, una de tamaños regulares y otras “agrandadas” con áreas 5 veces más grandes que las normales.

Las trayectorias celulares y los campos de velocidades muestran que las células grandes presentes en el borde de la colonia producen un importante sesgo en la movilidad de las células de tamaño regular en la dirección paralela al frente (Figuras 2.13 y 2.15). A medida que las células de tamaño normal se mueven hacia el frente de la colonia, tienden a adquirir formas elongadas debido a restricciones locales de espacio (Figuras 2.3, 2.4 y 2.5). Los datos de movilidad confirman que las fuerzas de fricción generadas en el medio gelificado, así como la presencia de células “agrandadas”, influencian en gran medida la magnitud y orientación local de los vectores de velocidades celulares. La deformación del medio de cultivo gelificado en dirección del desplazamiento del frente induce la orientación colectiva de las células en la región interior de la colonia, algo contrario a lo observado en el medio estándar donde las células del interior no tienen direcciones preferenciales (Figuras 2.4, 2.5 y 2.15).

2.3.2. Modelos de Potts celulares que describen los resultados experimentales

Los CPM consideran que las interacciones biofísicas y moleculares individuales entre las células contribuyen a la energía libre de todo el sistema. Entonces, la evaluación de la energía libre del sistema a distintos tiempos permite determinar la probabilidad de que ocurra un proceso global. Ciertos CPM generalizados tienen en cuenta diversos factores, tales como el ciclo de duplicación celular, la inhibición por contacto, las interacciones célula-célula y

célula-medio de cultivo, las propiedades del medio de cultivo, los cambios de energía libre asociados con la forma y tamaño celular y hasta la energía asociada a la movilidad celular [2.8]. Diversos autores utilizaron simulaciones basadas en CPMs para estudiar los efectos individuales y combinados de la compresión, la inhibición por contacto y la movilidad en los tamaños celulares y el crecimiento de las colonias. Encontraron que cuando la compresión celular se mantuvo constante, se observó que las células que se movían rápidamente tenían morfologías ahusadas y que el frente de la colonia crecía rápidamente. También se observó que a mayor cantidad de espacio disponible, mayor era el tamaño celular. Por otro lado, cuando la compresión celular era baja y la movilidad restringida, como en el caso de las células presentes en el borde de la colonia con baja densidad celular en medio gelificado, se obtuvo una distribución bimodal de tamaños celulares. Este marco teórico es cualitativamente consistente con los datos experimentales presentados (Figuras 2.7, 2.8 y 2.13). En el medio gelificado, la presencia de los efectos de “frenado” dificulta la movilidad celular, las macromoléculas de MC disminuyen las interacciones célula-célula y el histograma de tamaños celulares muestra dos máximos.

Las trayectorias celulares son cualitativamente consistentes con las predicciones de los modelos de Potts publicados recientemente [2.7]. Estos modelos describen corrientes de movimientos colectivos en monocapas epiteliales [2.20], y permiten concluir que la adhesión intercelular modula el grado en que grupos de células se mueven colectivamente en una monocapa. La disrupción de los complejos de adhesión entre las células disminuye el ancho de las corrientes de células moviéndose colectivamente. Esta explicación podría aplicarse al desorden de los movimientos celulares y al incremento en la rugosidad del frente de la colonia en el medio gelificado, incluso en ausencia de células grandes (Figuras 2.4, 2.13 y 2.15). La estructura de la MC interactúa con las membranas celulares disminuyendo las interacciones célula-célula en el borde de la colonia [2.21], que resultan menores que en las regiones más interiores de la colonia.

El análisis realizado, aunque cualitativo, revela que las heterogeneidades espacio-temporales afectan los procesos que ocurren tanto a nivel celular como de la colonia y sugieren la posibilidad de unir las características de la movilidad celular individual con la dinámica de expansión 2D de la colonia como un todo. En esta línea, se desarrollaron diversos modelos multiescala que permiten obtener ecuaciones de transporte continuas y no-lineales a partir de propiedades microscópicas que ocurren a nivel celular, derivadas del formalismo de CPM [2.4, 2.5].

2.3.3. Dinámica de rugosidad de frentes de colonias 2D de células Vero

La evolución de la rugosidad de las CQLs en medio estándar y gelificado se estudió mediante análisis de escalado dinámico (AED, Figura 2.17). El AED indica que el crecimiento en medio estándar, dentro del rango de tiempo $1400 < t < 10000$ min y para longitudes de frente en el rango $150 < L < 20000 \mu\text{m}$, arroja un conjunto de exponentes $\alpha = 0.50 \pm 0.05$ y $\beta = 0.33 \pm 0.04$. Estos exponentes son consistentes con las predicciones del modelo estandar de KPZ, $\alpha = 0.50 \pm 0.05$, $\beta = 0.33$ y $z = 1.5$ [2.22]. Por otro lado, para las colonias creciendo en medio gelificado dentro de los rangos $5000 < t < 10000$ min y $200 < L < 20000 \mu\text{m}$, se encuentra un conjunto de exponentes $\alpha = 0.63 \pm 0.04$, $\beta = 0.78 \pm 0.05$ y $z = 0.80 \pm 0.05$. Este conjunto de exponentes resulta similar al esperado para el modelo de KPZ con ruido congelado (quenched-KPZ, QKPZ), es decir, $\alpha = 0.63$ y $\beta = 0.90$ [2.22, 2.23], que describe el crecimiento de una fase condensada en un medio desordenado, según la ecuación:

$$\frac{\delta h(x, t)}{\delta t} = \underbrace{\nu \nabla^2 t}_a + \underbrace{\frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2}_b + \underbrace{F}_c + \underbrace{\eta(x, h)}_d \quad (2.1)$$

Donde:

- (a) Estaría asociado con la parte o contribución aleatoria de la movilidad celular.
- (b) Estaría asociado al componente balístico de la movilidad celular.
- (c) F es la fuerza impulsora, que en este caso se relaciona principalmente con la proliferación, la movilidad celular y el aumento de tamaño de las células.
- (d) Representa un ruido congelado que a diferencia del ruido térmico, $\eta(x, t)$, su posición y fuerza de frenado es independiente del tiempo. Esta distribución aleatoria de ruido congelado o sitios de “frenado” es responsable del aumento local de la rugosidad del frente y de la dinámica de crecimiento de la colonia en general (Figura 2.18a) [2.10, 2.23, 2.24].

El efecto de “frenado” tipo I está asociado a una disminución en la colectividad de los movimientos celulares y a la inhibición gradual de la proliferación celular con el incremento de c_{MC} . Esto contribuye a una disminución de F y también cooperaría con el efecto tipo II en el término de ruido.

El efecto de “frenado” tipo II aparece una vez que se forman las células “agrandadas” en el borde de la colonia. Estas células tienden a formar grupos que se comportan como obstáculos de baja movilidad (o ruido congelado) e influyen en las trayectorias de las células de tamaño regular (Figura 2.18b). Las células de las colonias en medio gelificado tienen trayectorias con una contribución aleatoria mayor que las de las células creciendo en medio estándar (Figura 2.14). Los campos de velocidad y los histogramas de ángulos de los vectores de velocidad en la región del borde (Figura 2.15) muestran que el flujo de células en dirección del borde de la colonia disminuye con el tiempo. Este efecto está de acuerdo con la transición de un modelo de KPZ en el medio estándar a un modelo QKPZ en el medio gelificado.

2.4. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se describió la influencia de los cambios morfológicos a nivel celular y a nivel de la colonia en la dinámica de expansión de colonias quasi-circulares y quasi-lineales 2D de células Vero en medios con distintas concentraciones de MC.

La cinética de expansión de colonias quasi-circulares con bajo número de células en medios de cultivo con concentraciones de MC en el rango $0 \leq c_{MC} \leq 1\%$, sigue una cinética de crecimiento de primer orden tanto para N como para $\langle R \rangle$. A tiempos cortos, la expansión de la colonia está principalmente gobernada por la proliferación celular. A su vez, la proliferación celular disminuye gradualmente a medida que c_{MC} aumenta. A tiempos largos en el medio gelificado, la proliferación celular disminuye prácticamente a 0 y el aumento del tamaño de las células en la región del borde es lo que determina la propagación del frente.

A medida que la población celular crece, se alcanza un régimen de crecimiento a $\langle V_F \rangle$ constante. Los desplazamientos celulares, el aumento de tamaño y la duplicación celular contribuyen a la fuerza impulsora del avance del frente. En el medio gelificado, esta fuerza impulsora se ve en parte contrarrestada por efectos de “frenado” tipo I y tipo II, y sus contribuciones dependen de N , c_{MC} y t . El efecto de frenado tipo I se manifiesta a todo t

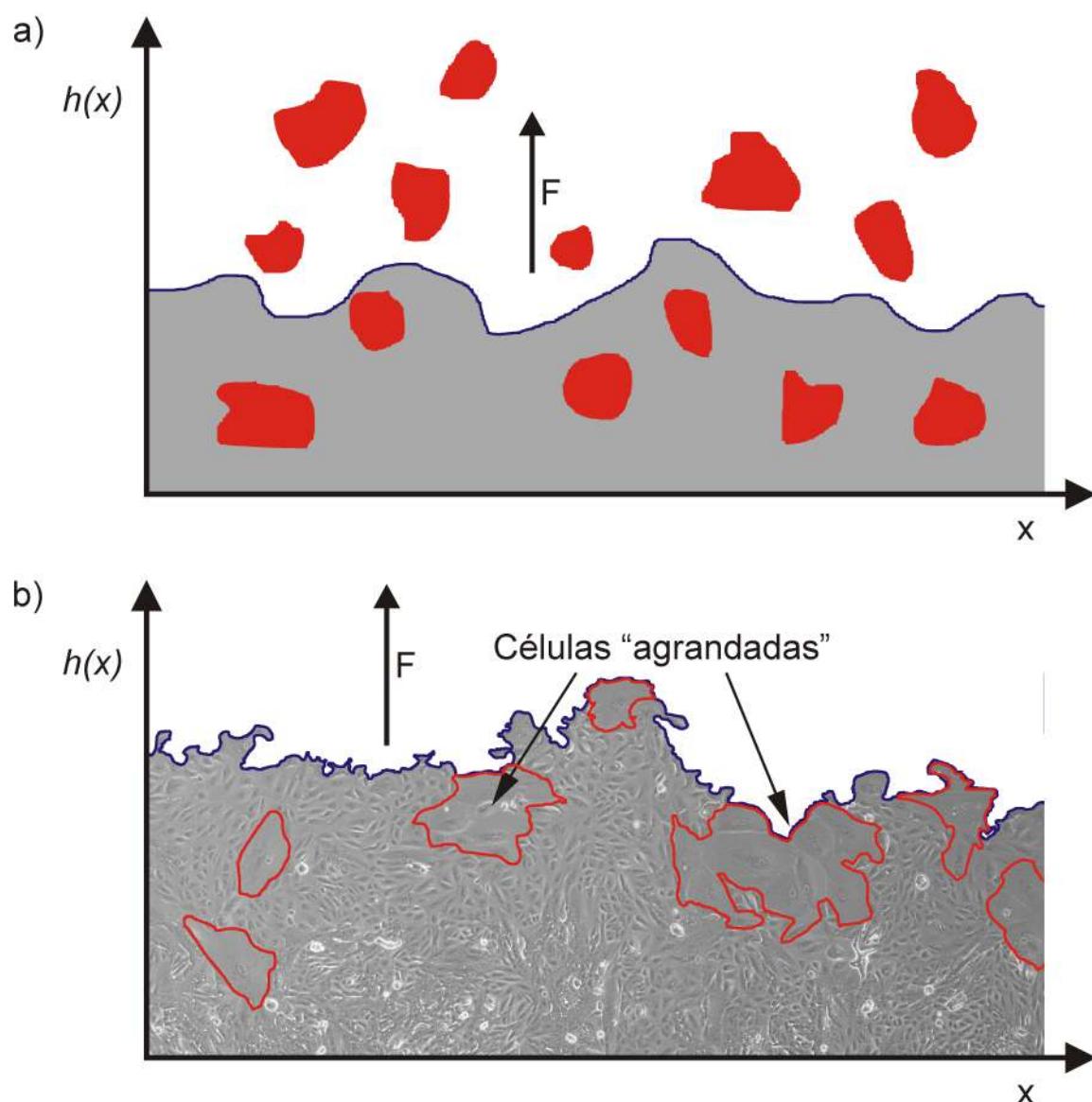


Figura 2.18: a) Esquema de una interfase (gris) creciendo con una fuerza impulsora F en presencia de un ruido congelado (rojo). Adaptado de [2.25]. b) CQL creciendo en medio gelificado. Las células “agrandadas” (rojo) actúan como un ruido congelado frenando el crecimiento.

y está relacionado a la estructura del medio de cultivo, que inhibe la proliferación celular y disminuye la velocidad de las células. En cambio, el efecto de frenado tipo II aparece a tiempos largos cuando las células grandes y lentas generan una barrera quasi-compacta (CQR-C) o discontinua (CQL) en el borde de la colonia. Este efecto tipo II tiene singular importancia en las colonias que se propagan en medio gelificado.

La distribución local de tamaños celulares y los datos de movilidad son cualitativamente consistentes con algunas de las predicciones de los modelos extendidos de Potts celulares, particularmente cuando consideran señales mecánicas para la movilidad celular, la influencia de las morfologías celulares en las distribuciones de densidades celulares y los efectos de las adhesiones célula-célula.

Las características de la movilidad celular cambian cuando se pasa del medio estándar al medio gelificado. También cambia el conjunto de exponentes críticos (α, β, z) que caracterizan la dinámica de fluctuaciones de la rugosidad del frente de las colonias. El conjunto de exponentes pasa de ser compatible con el modelo estándar de KPZ en medio estándar a ser mejor descripto mediante el modelo QKPZ en el medio gelificado. Esta transición en la dinámica de rugosidad de KPZ a QKPZ está relacionada al término de ruido generado principalmente por el efecto de frenado tipo II. Este efecto se manifiesta principalmente en los cambios en las características de movilidad celular, vinculando de cierta manera los cambios ocurridos en la escala microscópica (movilidad celular) con aquellos que ocurren en la escala macroscópica (crecimiento y fluctuaciones del frente). Estos resultados, al igual que aquellos reportados por otros empleando simulaciones basadas en el formalismo de CPMs, alientan a buscar la relación entre las características microscópicas y globales de la colonia para entender mejor el comportamiento de los sistemas complejos.

Bibliografía

- [2.1] S. A. Eming, P. Martin & M. Tomic-Canic. “Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation”. *Science Translational Medicine*, 2014. **6**(265), 265sr6–265sr6. (Citado en página 121.)
- [2.2] D. Dan, C. Mueller, K. Chen & J. A. Glazier. “Solving the advection-diffusion equations in biological contexts using the cellular Potts model”. *Physical Review E*, 2005. **72**(4), 041909. (Citado en página 121.)
- [2.3] J. A. Glazier & F. Graner. “Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells.” *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics*, 1993. **47**(3), 2128–2154. (Citado en página 121.)
- [2.4] P. M. Lushnikov, N. Chen & M. Alber. “Macroscopic dynamics of biological cells interacting via chemotaxis and direct contact”. *Physical Review E*, 2008. **78**(6), 061904. (Citado en páginas 121 y 145.)
- [2.5] S. Turner, J. A. Sherratt, K. J. Painter & N. J. Savill. “From a discrete to a continuous model of biological cell movement”. *Physical Review E*, 2004. **69**(2), 021910. (Citado en páginas 121 y 145.)
- [2.6] M. Scianna, L. Preziosi & K. Wolf. “A Cellular Potts Model simulating cell migration on and in matrix environments.” *Mathematical Biosciences and Engineering*, 2013. **10**(1), 235–61. (Citado en página 121.)
- [2.7] A. Czirók, K. Varga, E. Méhes & A. Szabó. “Collective cell streams in epithelial monolayers depend on cell adhesion.” *New Journal of Physics*, 2013. **15**, 075006. (Citado en páginas 121, 122 y 145.)
- [2.8] J. F. Li & J. Lowengrub. “The effects of cell compressibility, motility and contact inhibition on the growth of tumor cell clusters using the Cellular Potts Model”. *Journal of Theoretical Biology*, 2014. **343**, 79–91. (Citado en páginas 121 y 145.)
- [2.9] K. K. Treloar, M. J. Simpson, P. Haridas, K. J. Manton, D. I. Leavesley, D. L. S. McElwain & R. E. Baker. “Multiple types of data are required to identify the mechanisms influencing the spatial expansion of melanoma cell colonies.” *BMC Systems Biology*, 2013. **7**, 137. (Citado en páginas 122, 152 y 173.)
- [2.10] A. L. Barabasi & H. E. Stanley. *Fractal concepts in surface growth*. Cambridge University Press, 1995. (Citado en páginas 37, 41, 42, 43, 113, 122, 146, 173, 174, 267, 268 y 269.)
- [2.11] A. Brú, J. M. Pastor, I. Fernaud, I. Brú, S. Melle & C. Berenguer. “Super-Rough Dynamics on Tumor Growth”. *Physical Review Letters*, 1998. **81**(18), 4008–4011. (Citado en página 122.)

- [2.12] K. Kobayashi, C. Huang & T. P. Lodge. “Thermoreversible Gelation of Aqueous Methylcellulose Solutions”. *Macromolecules*, 1999. **32**(21), 7070–7077. (Citado en páginas 122 y 143.)
- [2.13] R. Risser & R. Pollack. “A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells”. *Virology*, 1974. **59**(2), 477–489. (Citado en página 122.)
- [2.14] T. Ito, Y. Ishikawa, S. Okano, T. Hattori, R. Fujii, T. Shinozawa & A. Shibuya. “Cloning of Human Neuroblastoma Cells in Methylcellulose Culture”. *Cancer Research*, 1987. **47**(15), 4146–4149. (Citado en página 122.)
- [2.15] T. Scholzen & J. Gerdes. “The Ki-67 protein: From the known and the unknown”. *Journal of Cellular Physiology*, 2000. **182**(3), 311–322. (Citado en página 135.)
- [2.16] M. Radszuweit, M. Block, J. G. Hengstler, E. Schöll & D. Drasdo. “Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions”. *Physical Review E*, 2009. **79**(5), 051907. (Citado en páginas 37, 109, 110, 143, 158, 159, 160, 170, 172, 173 y 176.)
- [2.17] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson & B. I. Shraiman. “Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(3), 739–44. (Citado en página 143.)
- [2.18] N. Sarkar. “Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions”. *Carbohydrate Polymers*, 1995. **26**(3), 195–203. (Citado en página 143.)
- [2.19] L. Li, P. M. Thangamathesvaran, C. Y. Yue, K. C. Tam, X. Hu & Y. C. Lam. “Gel Network Structure of Methylcellulose in Water”. *Langmuir*, 2001. **17**(26), 8062–8068. (Citado en página 143.)
- [2.20] A. Szabó, R. Unnep, E. Méhes, W. O. Twal, W. S. Argraves, Y. Cao & a. Czirók. “Collective cell motion in endothelial monolayers.” *Physical Biology*, 2010. **7**(4), 046007. (Citado en página 145.)
- [2.21] E. L. Medzon & D. J. Merchant. “Interaction of the LM cell surface with methylcellulose and vaccinia virus - Mode of action and implications for large scale vaccine production”. *In Vitro*, 1971. **7**(1), 46–58. (Citado en página 145.)
- [2.22] M. Kardar, G. Parisi & Y.-C. Zhang. “Dynamic Scaling of Growing Interfaces”. *Physical Review Letters*, 1986. **56**(9), 889–892. (Citado en páginas 42, 113 y 145.)
- [2.23] G. Parisi. “On Surface Growth in Random Media”. *Europhysics Letters*, 1992. **17**(8), 673–678. (Citado en páginas 145 y 146.)
- [2.24] K. Sneppen. “Self-organized pinning and interface growth in a random medium”. *Physical Review Letters*, 1992. **69**(24), 3539–3542. (Citado en página 146.)
- [2.25] F. Reis. “Depinning transitions in interface growth models”. *Brazilian Journal of Physics*, 2003. **33**, 501–513. (Citado en página 147.)

Capítulo 3

Modificación del medio de crecimiento mediante agentes solubles con bioactividad

3.1. Introducción

La estimulación del crecimiento y la movilidad celular juega un rol importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos como la morfogénesis, el sanado de heridas o la propagación de tumores [3.1–3.4]. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula un gran número de tipos de células que están involucrados en estos procesos biológicos [3.5–3.8]. El EGF se une a un receptor tirosín quinasa de la membrana plasmática [3.9] y promueve la proliferación y migración celular. Sin embargo, los mecanismos que desencadena el EGF dependen del tipo de célula ya que las respuestas son diferentes en células normales y tumorales [3.10]. A partir de ensayos de corte y cerrado de herida de células de epitelio intestinal se mostró que el EGF induce una movilidad celular que genera numerosos agujeros en la región repoblada, en comparación con otras biomoléculas que también estimulan la migración celular [3.11]. De hecho, inmediatamente después de una herida se secreta un grupo de factores de crecimiento y conocer la influencia de cada uno en la movilidad celular es importante para interpretar los mecanismos involucrados en el proceso de regeneración [3.12].

Por otro lado, la movilidad de las células individuales se ve afectado tanto por EGF soluble [3.13, 3.14] o inmovilizado sobre la superficie [3.15], aumentando el desplazamiento colectivo de la monocapa. Existen moléculas de quimioatractantes que son capaces de guiar la movilidad celular, uniéndose a receptores de membrana que activan señales intracelulares. Si bien los mecanismos de movilidad celular inducidos por quimioatractantes en células individuales se conocen en profundidad, los desplazamientos de grupos de células, que son más frecuentes que los individuales [3.16, 3.17], no son del todo comprendidos [3.18]. Además, es importante tener en cuenta que las comunicaciones célula-célula aumentan la sensibilidad de los sistemas celulares a los gradientes de quimioatractantes [3.18].

Se conoce que los desplazamientos colectivos ocurren mediante ráfagas intermitentes en ciertas regiones de la monocapa de células, similares a los observados en el flujo de líquidos en sistemas porosos [3.19]. Este comportamiento es independiente del tipo de célula y de la naturaleza del substrato. Existen otros tipos de comportamientos universales que ocurren tanto en sistemas vivos como inanimados [3.20–3.22]. Las partes constituyentes de los sistemas vivos interactúan de una manera cooperativa y determinan el comportamiento global del sistema.

Existen numerosos estudios donde se describen las rutas bioquímicas del EGF y su re-

ceptor [3.23, 3.24], sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos de esta biomolécula en la dinámica global de colonias de diferentes geometrías y poblaciones celulares [3.25]. En este capítulo se estudia la propagación del frente y la evolución de la rugosidad de colonias de distintas geometrías que permanecen confluentes en medios con distintas concentraciones de EGF (c_{EGF}). Los resultados muestran que en ciertos intervalos de c_{EGF} , la dinámica de crecimiento del frente depende del número de células y la densidad celular iniciales. Además, la presencia de EGF induce numerosos cambios en el fenotipo de las células, alterando sus características morfológicas y de movilidad, el tamaño y cantidad de contactos focales. Todos estos cambios a nivel celular se traducen en cambios en todo el sistema que conforma la colonia. En ciertas c_{EGF} los desplazamientos celulares se vuelven más balísticos y persistentes, y aumenta la magnitud de los desplazamientos netos laterales o paralelos al frente. Estos cambios producidos por la presencia de EGF influencian la dinámica de rugosado del frente, que si bien cumple con las predicciones de la ecuación estándar de KPZ como las colonias en medio sin EGF, lo hace en otra escala de L y t . Mientras que en ausencia de EGF se cumple en los rangos $0 < t < 10^4$ min y $10^2 < L < 10^3 \mu\text{m}$, en presencia de 2 ng mL^{-1} de EGF lo hace en los rangos $0 < t < 4500$ min y $350 < L < 1800 \mu\text{m}$ y en presencia de 10 ng mL^{-1} de EGF lo hace en los rangos $0 < t < 3200$ min y similares valores de L . Además, la rugosidad en ausencia de EGF satura en el rango de $200 < L < 400 \mu\text{m}$ y para L mayores aumenta sin saturación hasta al menos 6000 min. Por otro lado, en presencia de 2 o 10 ng mL^{-1} de EGF la rugosidad aumenta sin saturación para $L < 900 \mu\text{m}$ y para valores mayores de L se alcanza la saturación a $t < 3000$ min.

3.2. Resultados

3.2.1. Colonias quasi circulares

Morfología

Se estudió el efecto de la presencia de EGF en las CQRs, suplementando el medio de cultivo con $0, 0.08, 0.4, 2$ y 10 ng mL^{-1} EGF y siguiendo las colonias por microscopía óptica, desde los primeros estadios de crecimiento hasta 10000 min (Figura 3.1). Las CQRs con $N_0 < 100$ células y densidad celular $< 0.0007 \text{ células } \mu\text{m}^2$ que se propagan en medio de cultivo con $c_{EGF} \geq 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ se disgregaron perdiendo confluencia, por lo que no puede aplicarse la definición de contorno que se dió en Materiales y Métodos y se tendrán en cuenta otros procesos. La tendencia a disgregarse es mayor a medida que aumenta c_{EGF} . Este hecho impide que pueda estudiarse la cinética de crecimiento de estas colonias mediante el radio promedio, ya que la interfase medio-colonia se vuelve muy rugosa y difícil de definir, además, se apartan considerablemente de la morfología circular. Por este motivo, para estudiar la cinética de crecimiento de colonias en medios suplementados con $c_{EGF} \geq 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ son necesarias colonias con mayor número de células y más compactas.

Respecto a las características morfológicas de las células individuales, en presencia de $c_{EGF} > 2 \text{ ng mL}^{-1}$ las áreas celulares fueron menores que en ausencia de EGF. Del mismo modo, los contactos célula-célula disminuyeron con el tiempo y un mayor número de células presentó filopodios de gran longitud. La tinción de la proteína vinculina aportó información acerca de los contactos focales entre las células vecinas y entre las células y el substrato (Figura 3.2). El número de contactos focales aumentó y su tamaño disminuyó a medida que la c_{EGF} se incrementó de 0 a 2 ng mL^{-1} . La distribución de contactos focales también dependió de c_{EGF} . En las células en medio sin EGF la distribución de contactos focales fue homogénea en la región citoplasmática alrededor del núcleo. En contraste, en presencia de

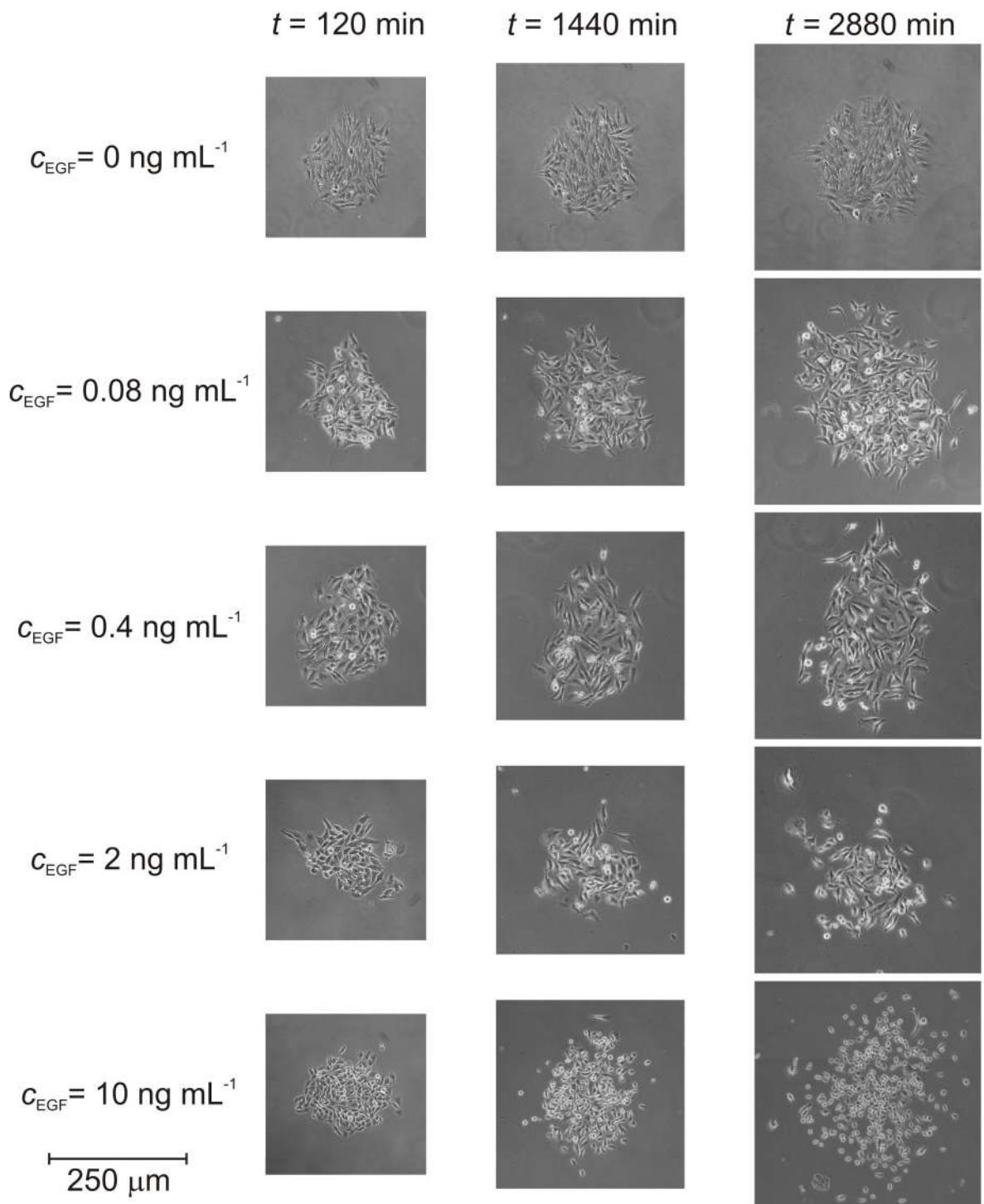


Figura 3.1: Secuencia de imágenes de CQRs con N_0 similar, en medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de EGF. Las c_{EGF} y el t al que fueron tomadas las imágenes se muestran en la figura.

EGF un gran número de células presentó una distribución asimétrica de contactos focales, coincidente con una expansión asimétrica del citoplasma celular y del citoesqueleto de actina (Figura 3.2).

En la figura 3.3 se muestran secuencias de imágenes de colonias de células HeLa típicas con N_0 y densidades celulares adecuados para estudiar su dinámica de crecimiento en medios suplementados con distintas concentraciones de EGF. En los primeros estadios de crecimiento, para las colonias en ausencia de EGF (Figuras 3.1 y 3.3a), el área celular promedio permaneció prácticamente constante, pero la densidad celular aumentó en el interior de la colonia y disminuyó en la región del borde. Luego, en estadios más avanzados, pudo distinguirse la aparición de una incipiente fase 3D en el interior de la colonia.

Por otro lado, en las colonias que se propagan en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ se observó una disminución de la densidad celular en toda la colonia hasta aproximadamente 2000 minutos luego del agregado del medio suplementado con EGF. Luego, la densidad celular aumentó, aunque permaneció bastante uniforme en toda la extensión de la colonia. En la figura 3.3c se muestra una colonia con $N_0 \sim 1300$ células y densidad celular cercana a $0.00272 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$ que se propaga en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$. Esta colonia presenta inicialmente una ligera disminución de la densidad celular en las regiones del borde y luego un gran aumento en la densidad en la región interior y la formación de una fase 3D homogéneamente distribuida de células quasi-redondeadas de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro. Es importante destacar que la evolución de la morfología celular y la dinámica de formación de la fase 3D difieren considerablemente de las observadas en ausencia de EGF o a c_{EGF} relativamente bajas. En ausencia de EGF la fase 3D está conformada por densos agregados celulares, mientras que en presencia de EGF la fase 3D está constituida por un gran número de células redondeadas y disgregadas.

Cinética de propagación de las colonias

Las CQRs de células HeLa con valores de N_0 adecuados para obtener colonias confluentes durante todo el tiempo de seguimiento permitieron comparar la cinética de crecimiento de colonias en medios de cultivo suplementados con distintas c_{EGF} . Por este motivo, se siguieron colonias con $< R_0 >$ en el rango $200\text{-}600 \mu\text{m}$ y $N_0 > 75$ células. La representación de $\log < R >$ versus el t (Figura 3.4) permite apreciar mejor los cambios en la cinética de crecimiento. Las colonias en medio sin agregado de EGF se siguieron durante aproximadamente 10 días. El crecimiento de $< R >$ de la colonia en función de t (Figura 3.4) siguió una cinética quasi-exponencial desde t_0 hasta t_c , pero para $t > t_c$ y $< R > > < R_c >$, alcanzó una velocidad de propagación constante. Esto último puede observarse como una desviación de la relación lineal entre el $\log < R >$ en función de t . De la relación exponencial de los datos se obtuvo una constante de velocidad promedio $< k_R > = 4.2 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

El comportamiento del radio de la colonia es más complicado en presencia de EGF. En general, la velocidad de crecimiento del radio promedio de la colonia aumenta con c_{EGF} , pero exhibe comportamientos que dependen de N_0 y de la densidad celular. Las CQRs en medio con $c_{\text{EGF}} = 0.08 \text{ ng mL}^{-1}$ muestran una dependencia de $< R >$ versus t similar a la observada en colonias en medio sin EGF. La cinética de crecimiento de estas colonias también presentó un régimen exponencial de la velocidad de avance del frente seguido de uno a velocidad constante. Para densidades iniciales relativamente bajas, como 0.0011 y $0.00071 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$, durante los primeros estadios de crecimiento ($t < 3500 \text{ min}$) se observó un incremento de la velocidad de avance del frente ($< V_F >$) más rápido que el esperado de la relación exponencial de $< R >$ en función de t . Las colonias más grandes y compactas no presentaron esta cinética de crecimiento supraexponencial. Además, a valores mayores de N_0 o de densidad celular de

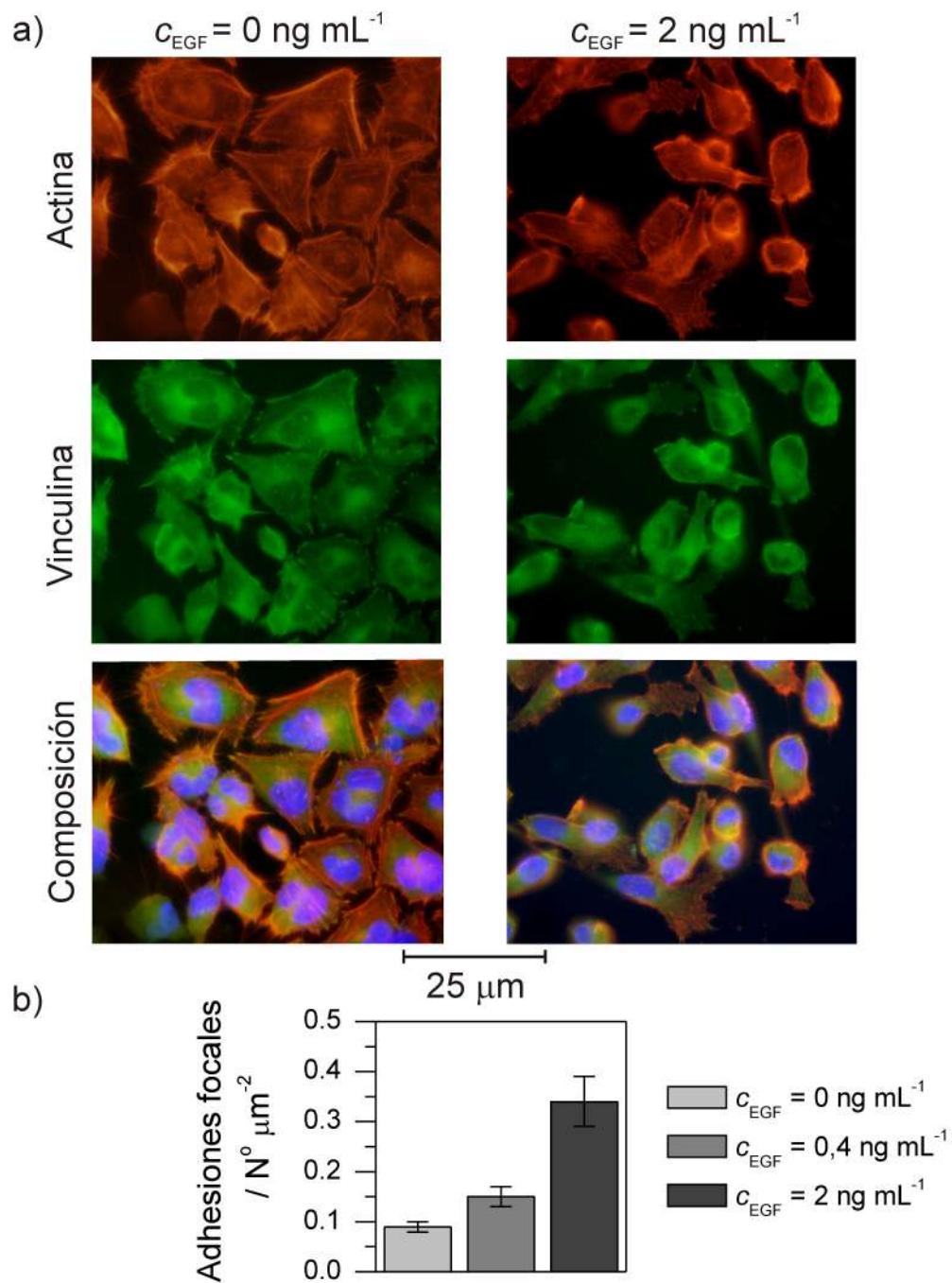


Figura 3.2: a) Imágenes de fluorescencia del citoesqueleto de actina, la proteína vinculina y la composición con la tinción del núcleo de las células en medios de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$. b) Densidad de contactos focales en células sembradas en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0, 0.4$ y $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

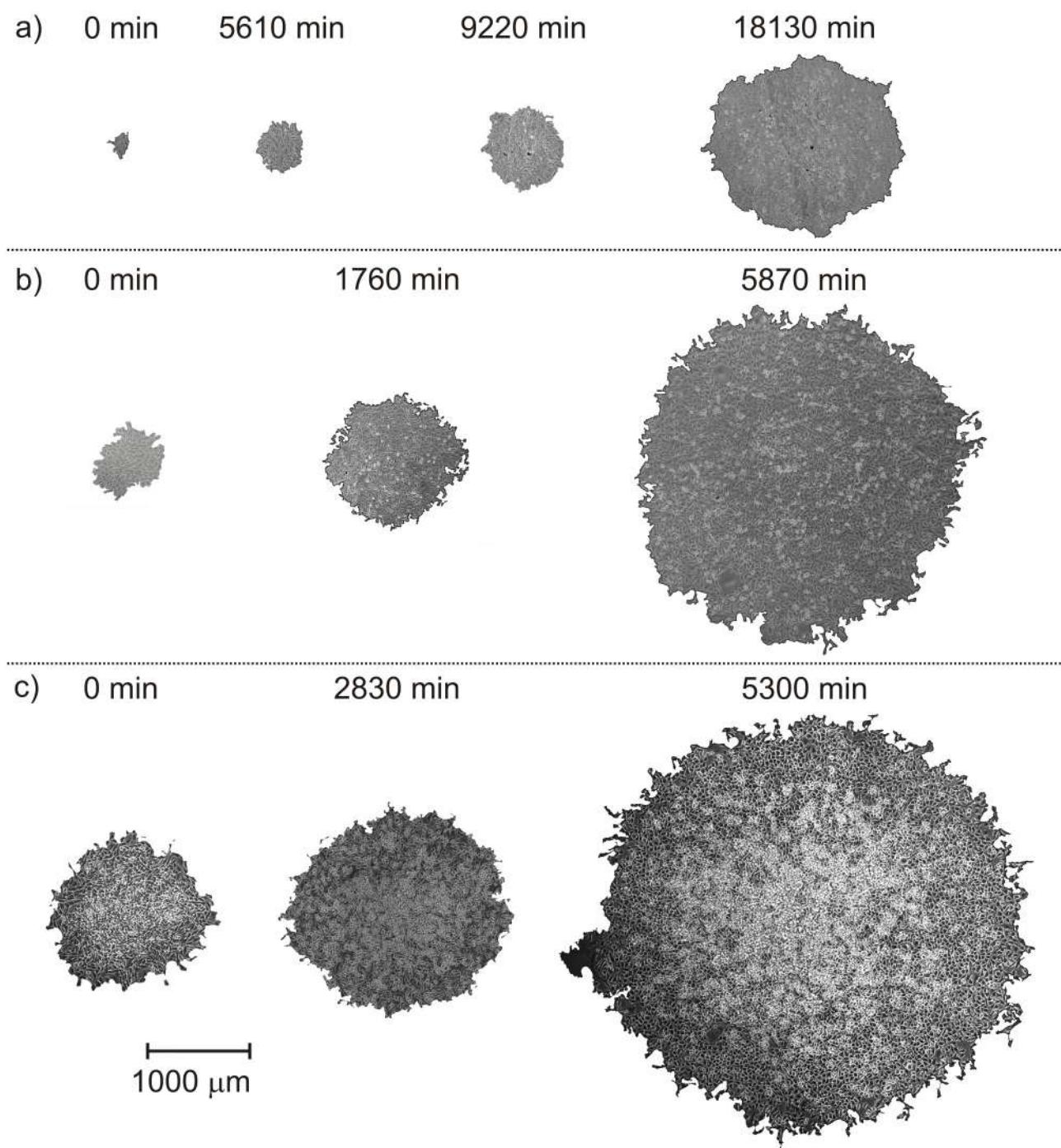


Figura 3.3: Evolución del crecimiento de CQRs en medios de cultivo suplementados con c_{EGF} : a) 0; b) 0.4; y c) 10 ng mL^{-1} .

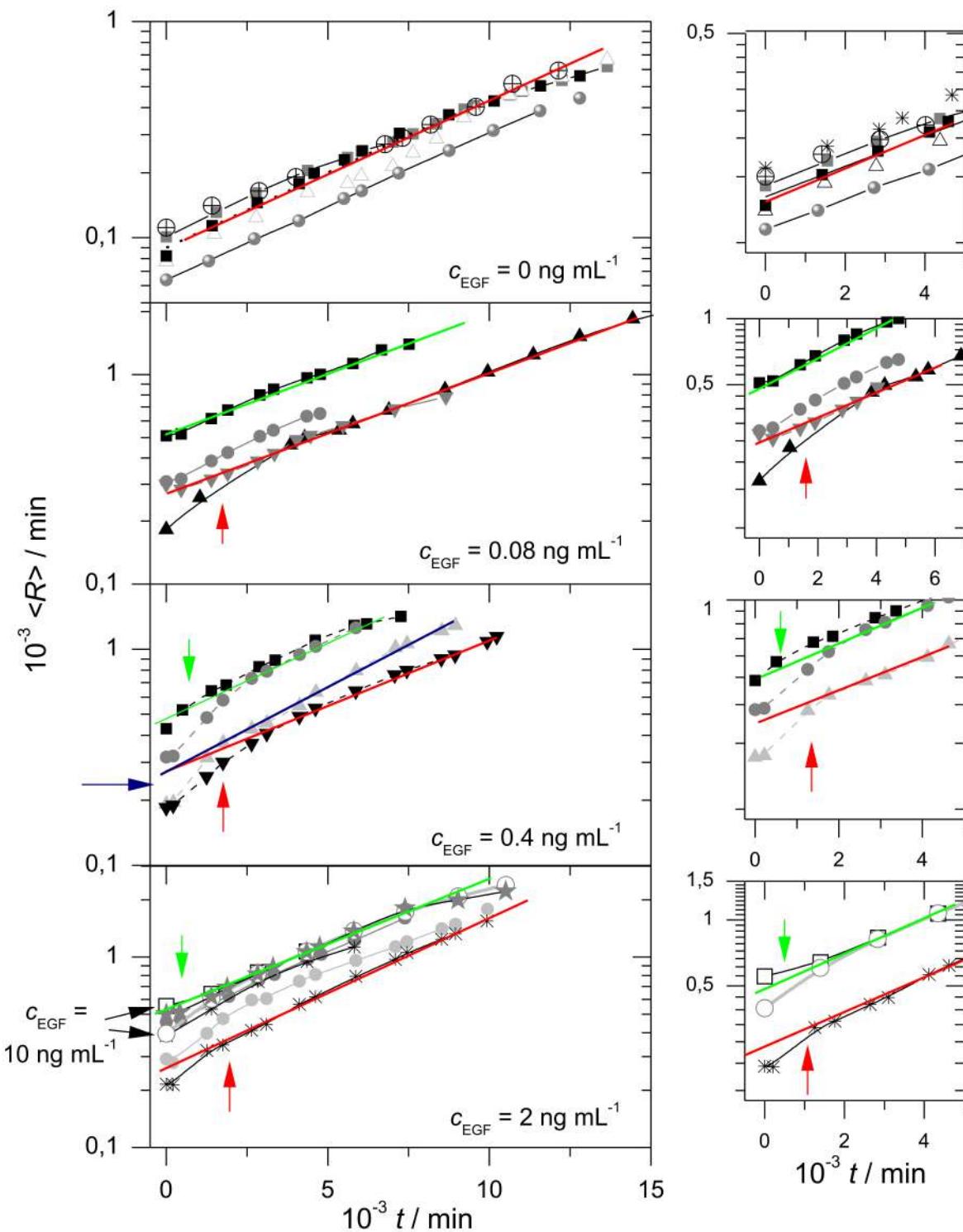


Figura 3.4: Gráficos de $\log \langle R \rangle$ en función de t para CQRs de células HeLa en medios de cultivo suplementados con distintas c_{EGF} . Se muestran ampliadas las curvas a tiempos de crecimiento cortos para facilitar la observación del comportamiento exponencial o supraexponencial.

la colonia, menor es t_c . Las colonias con $N_0 \sim 1700$ células presentaron sólo la cinética a $\langle V_F \rangle$ constante, independientemente del tiempo de crecimiento.

Las colonias en medio de cultivo con $c_{EGF} = 0.4$ y 2 ng mL^{-1} y valores similares de N_0 y densidad celular presentaron una relación supraexponencial de $\langle R \rangle$ en función de t en el intervalo de tiempo $0 < t < 2000$ min. Este comportamiento también se observó para las CQRs en $c_{EGF} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$ y $t < 2500$ min. Luego de este breve período de tiempo, se alcanza el régimen de crecimiento exponencial. A diferencia de las CQRs con $c_{EGF} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ donde la cinética de propagación se mantenía exponencial para $\langle R \rangle < 300 - 400 \mu\text{m}$, para $0.4 < c_{EGF} < 10.0 \text{ ng mL}^{-1}$ la transición cinética del régimen exponencial al de $\langle V_F \rangle$ constante ocurre a $\langle R \rangle$ superiores a $1000 \mu\text{m}$.

Para visualizar mejor el apartamiento del crecimiento exponencial en los estadios iniciales del crecimiento, en la figura 3.5 se graficaron curvas típicas de $\log \langle R \rangle$ en función de t para CQRs en medio de cultivo con $c_{EGF} = 0, 0.4$ y 10 ng mL^{-1} y se incluyeron imágenes típicas de la evolución de una CQR en medio de cultivo con $c_{EGF} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$. La colonia en medio sin EGF muestra inicialmente una relación lineal entre $\log \langle R \rangle$ y el tiempo de crecimiento, asociado con el régimen cinético exponencial. Luego, al alcanzar valores de $\langle R \rangle$ cercanos a $300 \mu\text{m}$ se aparta de la relación lineal, lo que está relacionado con la transición al régimen cinético de $\langle V_F \rangle$ constante. En contraste, en presencia de EGF tanto $c_{EGF} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ como $c_{EGF} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$, puede observarse un comportamiento supraexponencial en los primeros estadios de crecimiento, seguido del ya mencionado régimen exponencial. Este apartamiento del régimen exponencial a tiempos cortos puede relacionarse con la disminución de la densidad celular en las colonias para t entre 0 y 20 horas (Figura 3.5). Además, puede observarse que a mayor c_{EGF} mayor es el valor de $\langle R \rangle$ necesario para alcanzar el régimen cinético $\langle V_F \rangle$ constante. En la figura 3.5 se incluye, además, la representación de la ecuación propuesta por Drasdo *et. al.* [3.26] modificada para describir la contribución de la migración celular en los estadios iniciales y a tiempos más largos la transición de régimen cinético exponencial a $\langle V_F \rangle$ constante. Este tema se trata luego en mayor profundidad.

En resumen, la cinética de crecimiento de las colonias depende del valor de c_{EGF} , del radio inicial y de la evolución de la densidad celular en la colonia. El desarrollo de heterogeneidades espacio-temporales acompaña el crecimiento de la colonia. En la tabla 3.1 se muestran $\langle R_0 \rangle$, $\langle N_0 \rangle$, la densidad celular inicial y el tipo de cinética de crecimiento que tienen las colonias creciendo en medios de cultivo con distintas c_{EGF} . Valores altos de N_0 y densidades iniciales favorecen la transición cinética del régimen exponencial a $\langle V_F \rangle$ constante. Además, el t_c al que ocurre la transición aumenta con c_{EGF} . La presencia de EGF modifica la cinética global de crecimiento mediante el incremento de la tasa de duplicación celular y la dispersión de las células, y su influencia depende de la población y densidad celular iniciales. Se puede inferir que la dispersión se relaciona con un aumento en la movilidad celular y cambios en las interacciones célula-célula y célula-substrato. Estos cambios en el fenotipo celular inducidos por el EGF se reflejan en la cinética de crecimiento de las CQRs, que exhiben un régimen supraexponencial a tiempos cortos, un aumento general en la velocidad de crecimiento y un aumento del t_c .

La evolución de los perfiles de densidad celular de CQRs en medio de crecimiento con $c_{EGF} = 0.4$ y 2 ng mL^{-1} (Figura 3.6) depende de N_0 y de la densidad celular inicial, lo que es consistente con las características cinéticas descriptas. Las colonias con bajo N_0 (152 células) y alta densidad celular ($0.00131 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) mostraron un descenso abrupto de la densidad celular seguido de un incremento sostenido hasta alcanzar a $t \sim 5000$ min valores similares o superiores a los observados a t_0 . Esta disminución de la densidad celular observada en los perfiles de la figura 3.6, se relaciona con el comportamiento supraexponencial de $\langle R \rangle$ en

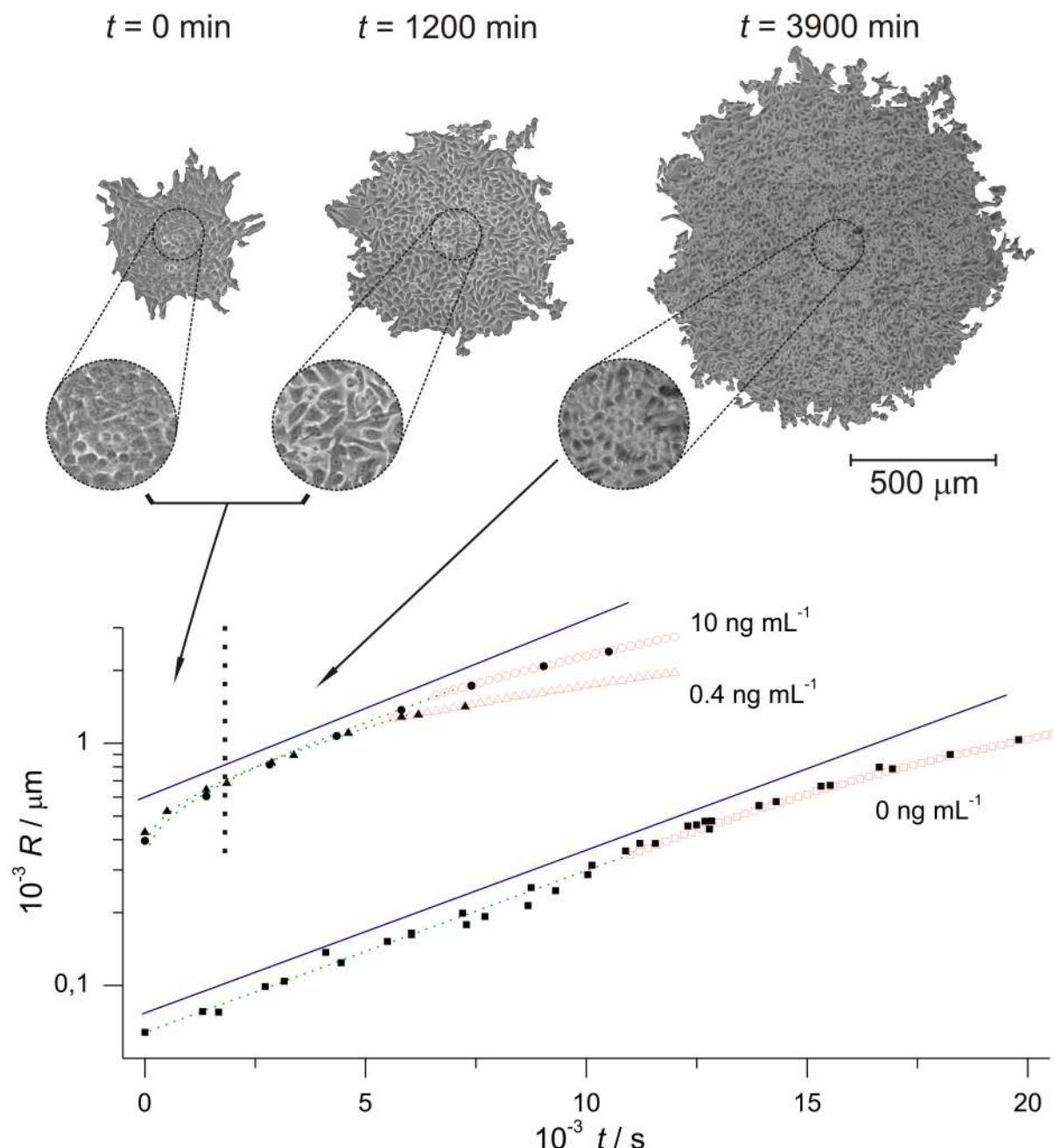


Figura 3.5: Gráficos de $\log < R >$ en función de t para $c_{\text{EGF}} = 0, 0.4$ y 10 ng mL^{-1} . Los trazos discontinuos en verde y rojo corresponden a la adaptación de las ecuaciones propuestas por Drasdo et. al. [3.26] (los detalles se incluyen en el texto). Se incluyen las imágenes relacionadas a los regímenes cinéticos distintivos de la evolución de una colonia en medio con $c_{\text{EGF}} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$. En las imágenes aumentadas pueden apreciarse los cambios en la morfología y densidad celular.

c_{EGF}	$R_0 / \text{m}\mu$	N_0	$\rho / \text{células } \mu \text{ m}^{-2}$	Cinética de crecimiento
0.08	135	63	0.00110	SE, E
0.08	182	74	0.00071	SE, E
0.08	299	360	0.00128	E, C
0.08	308	523	0.00175	E, C
0.08	510	1637	0.0200	C
0.4	184	202	0.00190	SE, E
0.4	192	152	0.00131	SE, E
0.4	317	249	0.00079	SE, E
0.4	322	495	0.00152	SE, E
0.4	429	430	0.00074	SE, E, C
2	162	84	0.00101	E, C
2	215	374	0.00257	SE, E
2	273	97	0.00041	E
2	291	261	0.00081	SE, E
2	387	1234	0.00262	C
2	457	934	0.00142	E
2	552	852	0.00089	E
2	399	515	0.00103	E, C
10	396	1338	0.00272	SE, E, C
10	502	1425	0.00180	E, C

Tabla 3.1: Condiciones iniciales y características de la cinética de crecimiento de colonias en medios de cultivos con distintas c_{EGF} . Se incluyen el radio $\langle R_0 \rangle$, el número de células $\langle N_0 \rangle$ y la densidad celular (ρ_0) iniciales de la colonia. Las colonias presentaron una cinética de crecimiento supraexponencial (SE), exponencial(E) y/o con $\langle V_F \rangle$ constante (C).

función de t en los estadios iniciales de crecimiento y también puede apreciarse en la secuencia de imágenes de la figura 3.5. Por el contrario, para las colonias con alto N_0 (430 células) y baja densidad inicial ($0.00074 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) y medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$, no se observa un descenso abrupto de la densidad celular en los estadios iniciales de crecimiento. Paralelamente, la curva de $\log \langle R \rangle$ en función de t solo muestra un régimen de crecimiento exponencial seguido de la transición a uno de $\langle V_F \rangle$ constante. Esta transición se asocia con el establecimiento de un gradiente de densidad celular más o menos constante a $t \sim 2871\text{-}3371 \text{ min}$. La influencia de N_0 y la densidad celular inicial también puede observarse en las colonias que se propagan en medio con 2 ng mL^{-1} de EGF. La colonia con menor N_0 (261 células) y relativamente baja densidad celular inicial ($0.00081 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) presenta una disminución marcada de los perfiles de densidad, que se traduce en un claro comportamiento supraexponencial en la curva de $\langle R \rangle$ vs t . Por otro lado, la colonia con N_0 más grande (374 células) y gran densidad celular inicial ($0.00257 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) muestra un descenso de la densidad celular que se ve reflejado en un leve apartamiento del régimen exponencial a tiempos cortos. Para todas las CQRs cuyo gradiente de densidad varía con el tiempo, se encontró una cinética de crecimiento exponencial, independientemente de c_{EGF} . Sin embargo, a mayor c_{EGF} menor es la densidad celular en la región del borde. Por otro lado, las colonias con una cinética a $\langle V_F \rangle$ constante presentaron un gradiente de densidad que permanece constante en el tiempo, de acuerdo con lo propuesto en [3.26]. Es importante resaltar que sólo pueden evaluarse los perfiles de densidad de las colonias en las que es posible contar de

manera confiable el número de células. Desafortunadamente, la aparición de dominios 3D en las colonias con N_0 muy grande y a $t >> t_0$ vuelve el conteo de células difícil e incierto.

3.2.2. Colonias quasi lineales

Las CQLs tienen un elevado número de células y un tamaño constante de frente, lo que implica que la colonia se propaga en un espacio libre constante. Los experimentos realizados con estas colonias permiten analizar los parámetros de movilidad celular mediante el seguimiento manual de las células y la velocimetría por análisis de imágenes de partículas [3.27]. Estos datos permitieron analizar con más detalle la influencia de las heterogeneidades espacio-temporales tanto en la morfología celular a nivel local como en la dinámica de propagación del frente de la colonia.

Morfología

En la figura 3.7 se muestra la influencia de la c_{EGF} en la evolución morfológica de las CQLs. El efecto en las morfologías celulares en la región del borde es comparable en cierto modo al descripto para las CQRs.

En ausencia de EGF, las imágenes de la colonia tomadas 1440 min después de retirar la máscara de Teflon muestran una disminución gradual de la densidad celular yendo desde la región interior de la colonia hacia el borde. En el borde, muchas células presentaron un citoplasma extendido y una orientación coincidente con la dirección de propagación del frente. También se encontraron grupos de células en el interior de la colonia orientadas hacia el frente de la misma. A tiempos más largos, $t = 3600$ min, aumentó la densidad celular en la región interior de la colonia donde también pudo observarse la formación de agregados 3D, mientras que las células del borde incrementaron su tamaño promedio.

Las colonias en medio con $c_{\text{EGF}} = 2$ y 10 ng mL^{-1} presentaron, al igual que las colonias en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$, una mayor densidad celular en las regiones interiores que en el borde (Figura 3.7). Pero en presencia de EGF disminuyó el tamaño celular promedio y el número y tamaño de dominios con células orientadas. Además, muchas células en regiones internas de la colonia presentan largos filopodios que conectan unas células con otras a largas distancias. Estos comportamientos distintivos se vuelven más marcados a $t = 3600$ min. En este caso aparece un gran número de células redondeadas, que están en duplicación o interactuando pobremente con el substrato y formando pequeños aglomerados. Por otra parte, la presencia de EGF genera una región 2D de baja densidad en el borde de la colonia mas extensa y provoca que algunas células individuales o en pequeños grupos se separen del borde de la colonia, generando un frente menos confluyente.

Cinética de propagación de las colonias

La velocidad de desplazamiento promedio de los frentes de las CQLs se mantiene constante independientemente de c_{EGF} , aunque su magnitud aumenta de $\langle V_F \rangle = 0.11 \mu\text{m min}^{-1}$ para $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{\text{EGF}} = 0.08 \text{ ng mL}^{-1}$ a $\langle V_F \rangle = 0.18 \mu\text{m min}^{-1}$ para $c_{\text{EGF}} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$, y a $\langle V_F \rangle \sim 0.26 \mu\text{m min}^{-1}$ para $c_{\text{EGF}} = 2, 10$ o 50 ng mL^{-1} (Figura 3.8). Para las c_{EGF} más altas, el frente de la colonia se vuelve muy rugoso y presenta muchas células desprendidas del borde, lo que dificulta trazar el borde de la colonia.

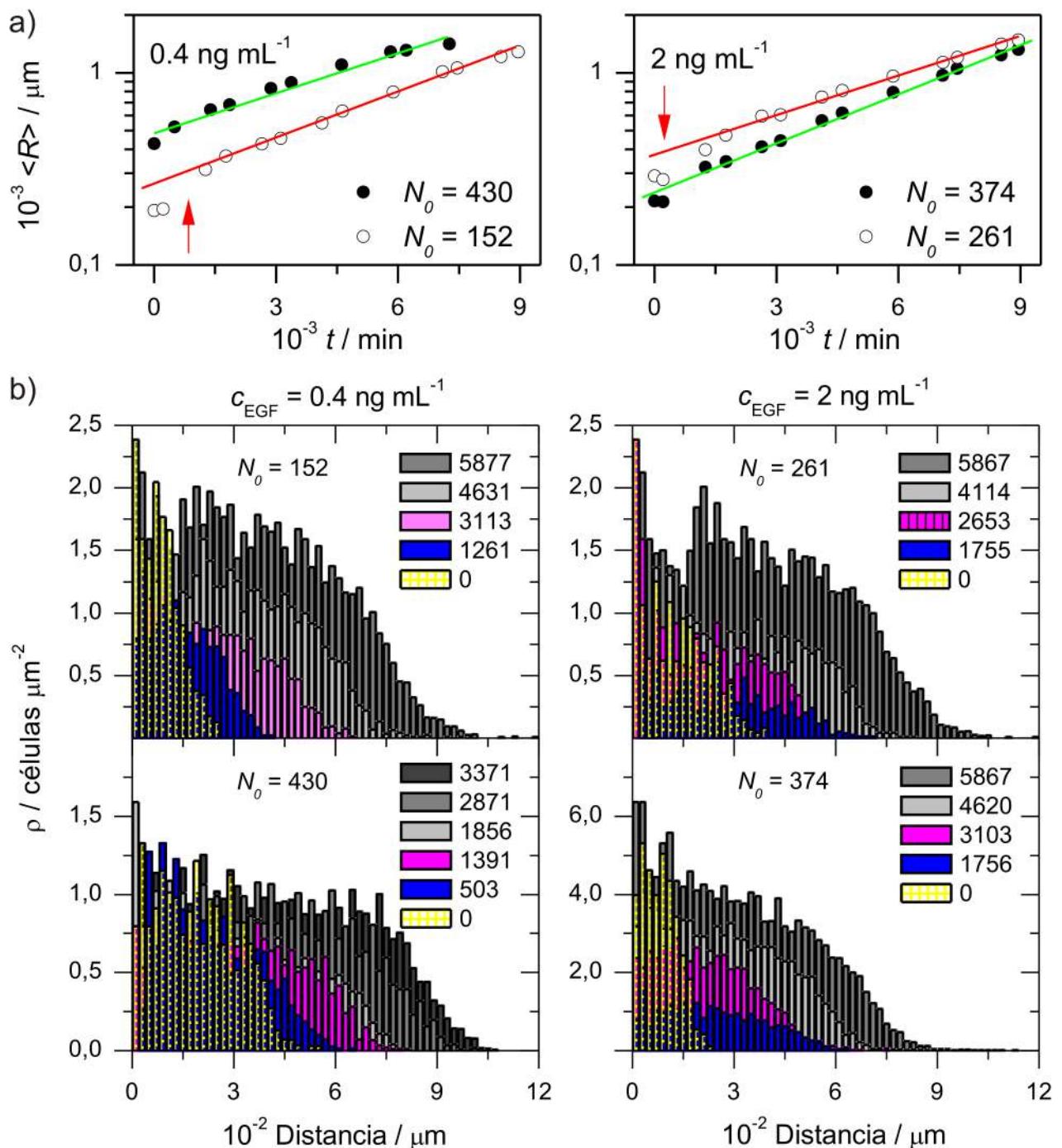


Figura 3.6: a) Gráficos de $\log < R >$ en función de t para colonias de células HeLa con distinto N_0 creciendo en medios de cultivo con diferentes c_{EGF} . b) Perfiles de densidad de las colonias analizadas en (a).

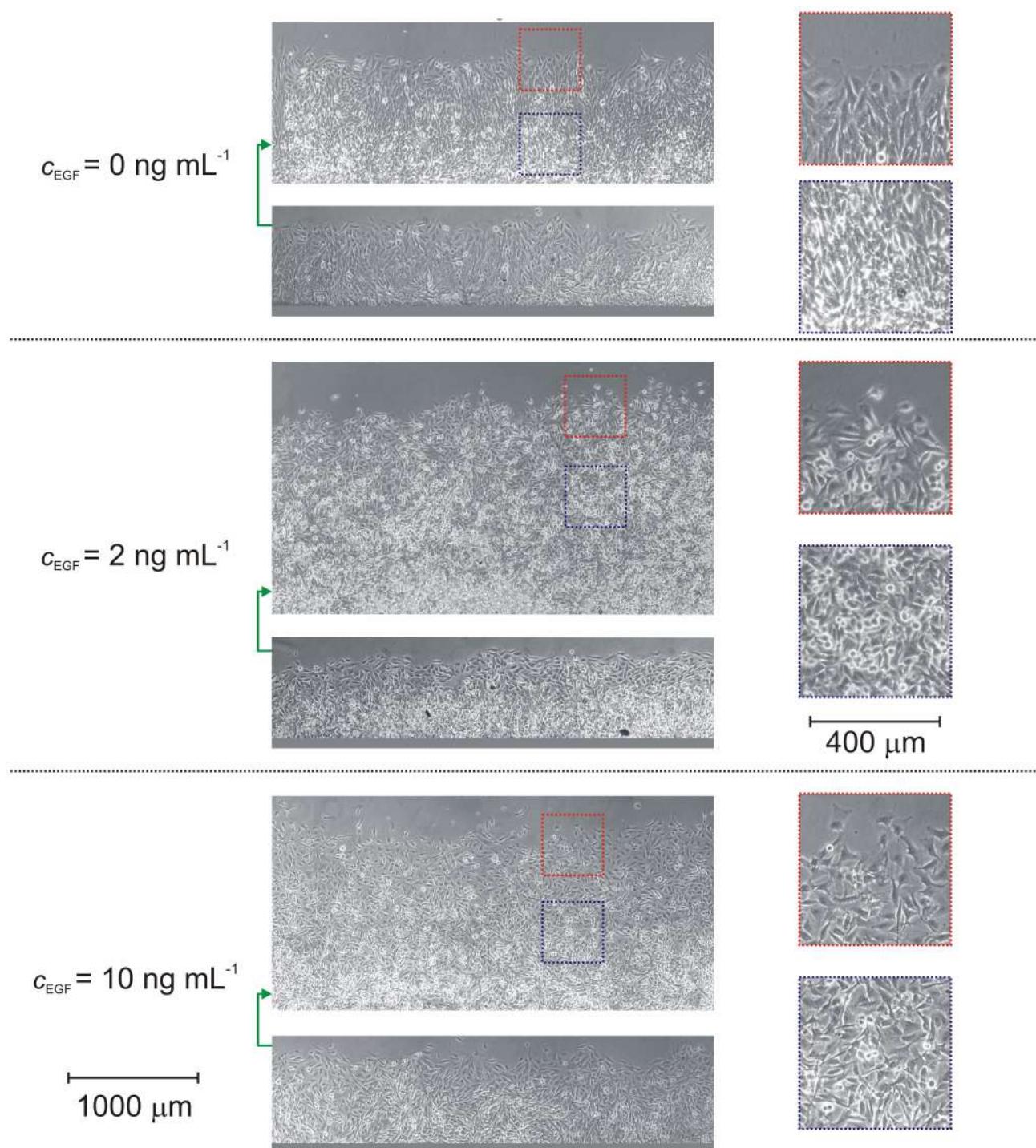


Figura 3.7: Imágenes de CQLs creciendo en medio de cultivo con distintas c_{EGF} tomadas a $t = 1440 \text{ min}$ y $t = 3600 \text{ min}$ luego de t_0 . Las flechas indican la altura promedio del frente de la colonia a $t = 1440 \text{ min}$. Se muestran regiones aumentadas del borde (rojo) y seno (azul) de las colonias.

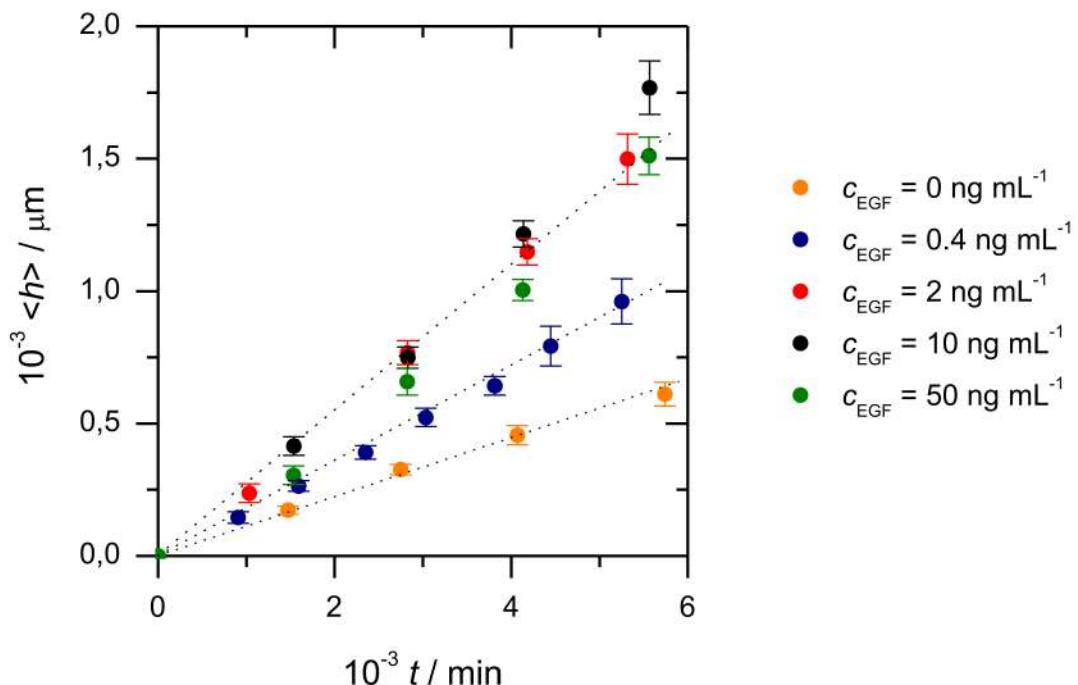


Figura 3.8: Alturas promedio $\langle h \rangle$ en función del tiempo de CQLs creciendo en medios de cultivo con distinta c_{EGF} . Se incluyen los errores estándar en las barras de error.

Movilidad celular

Se obtuvieron las trayectorias de células individuales en CQLs que se propagan en medios de cultivo suplementados o no con EGF. Estas colonias tienen una geometría adecuada para evaluar los componentes de velocidad paralelos y perpendiculares al frente. Las células seleccionadas para su seguimiento estaban ubicadas en las primeras tres filas de células desde el borde de la colonia.

En medio con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ las células ubicadas en las regiones interiores de la colonia presentan desplazamientos aleatorios, trayectorias cortas y poco efectivas, mientras que las ubicadas en el borde tienen trayectorias más largas y direccionales. La movilidad celular está fuertemente relacionada con las heterogeneidades espacio-temporales de la colonia. Así, mientras que la movilidad de las células es escasa en el interior denso de la colonia, en la región del borde, donde el gradiente de densidad celular es grande, se favorece la movilidad.

Se analizaron las trayectorias celulares de colonias en medio con $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$ y distintas densidades celulares iniciales en la región del borde, una de densidad intermedia-alta, $0.0012 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$ y otra de densidad baja, $0.00067 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$. Los histogramas de los componentes de velocidad V_{per} y V_{par} se muestran en la figura 3.9a y los valores promedio ($\langle V \rangle$) y las desviaciones estandar (S) para distintas c_{EGF} en la figura 3.9b. Las células de las colonias con densidades iniciales cercanas a $0.0012 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$ presentan, en ausencia de EGF, un valor de $\langle V_{\text{per}} \rangle = 0.077 \mu\text{m min}^{-1}$ que se incrementa a $0.21 \mu\text{m min}^{-1}$ en medio con $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$. Para esta c_{EGF} , la disminución de la densidad a valores cercanos a la mitad ($0.00067 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) produce un aumento de $\langle V_{\text{per}} \rangle$ a valores de $0.26 \mu\text{m min}^{-1}$. Por otro lado, los valores de $\langle V_{\text{par}} \rangle$ fueron cercanos a 0 independientemente de las condiciones experimentales. Las desviaciones estandar tanto de V_{per} como de V_{par} de las trayectorias obtenidas en medio con EGF fueron aproximadamente el doble de las obtenidas para el medio con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$, independientemente de la densidad celular de la región

del borde.

Si bien del análisis de las células del borde de la colonia el valor de $\langle V_{\text{par}} \rangle$ resultó muy cercano a 0, varias trayectorias celulares presentan desplazamientos laterales netos considerables. Para observar esta diferencia se vuelve entonces necesario promediar sobre las trayectorias en lugar de sobre los tiempos. En la figura 3.10 se muestran las velocidades paralelas o perpendiculares promedio de las trayectorias de las células en el borde de la colonia ($\langle V_{\text{par}}^{\text{tr}} \rangle$ y $\langle V_{\text{per}}^{\text{tr}} \rangle$). Para determinarlos se calculan las distancias paralelas o perpendiculares recorridas por las células a lo largo de sus trayectorias, se dividen las distancias por el tiempo de seguimiento de las trayectorias y finalmente se promedian los resultados obtenidos. En medio sin EGF se obtuvo: $\langle V_{\text{par}}^{\text{tr}} \rangle = 0.027 \pm 0.002 \mu\text{m min}^{-1}$ y $\langle V_{\text{per}}^{\text{tr}} \rangle = 0.084 \pm 0.003 \mu\text{m min}^{-1}$. En medio con 2 ng mL⁻¹ de EGF se obtuvo: $\langle V_{\text{par}}^{\text{tr}} \rangle = 0.079 \pm 0.004 \mu\text{m min}^{-1}$ y $\langle V_{\text{per}}^{\text{tr}} \rangle = 0.201 \pm 0.006 \mu\text{m min}^{-1}$ en la colonia con $\rho = 0.0012 \mu\text{m}^{-2}$. Para la colonia con $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$ y $\rho = 0.00067 \mu\text{m}^{-2}$ se obtuvo: $\langle V_{\text{par}}^{\text{tr}} \rangle = 0.089 \pm 0.006 \mu\text{m min}^{-1}$ y $\langle V_{\text{per}}^{\text{tr}} \rangle = 0.254 \pm 0.008 \mu\text{m min}^{-1}$. En presencia de EGF, $\langle V_{\text{par}}^{\text{tr}} \rangle$ y $\langle V_{\text{per}}^{\text{tr}} \rangle$ resultaron superiores a los obtenidos en ausencia de EGF.

Las representaciones de $\log \langle msd \rangle$ en función de $\log \Delta t_R$ de las trayectorias celulares presentan una relación lineal independientemente de la presencia o no de EGF y de la densidad celular en el borde de la colonia (Figura 3.11a). Las pendientes de estas curvas fueron de 1.74 ± 0.04 y de 1.81 ± 0.01 para la colonia en medio con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. A pesar de tener la misma pendiente, los valores de msd de la colonia en medio con EGF de menor densidad ($0.00067 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$) son mayores que aquellos de la colonia con mayor densidad ($0.0012 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$), lo que es consistente con la mayor velocidad de las células en la colonia menos densa.

En la figura 3.11b se graficó la probabilidad de que una célula del borde cambie en más de 45° la dirección de su trayectoria en un determinado intervalo de tiempo, denominado tiempo de persistencia. La probabilidad de que en 30 min las células del borde de las colonias en medio sin EGF cambien la dirección de su trayectoria es de 0.63. Esta probabilidad es de 0.45 y 0.35 para las células de las colonias que se propagan en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$ y con densidades celulares de $0.0012 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$ y $0.00067 \text{ células } \mu\text{m}^{-2}$, respectivamente. La probabilidad desciende más rápidamente a medida que se aumenta el tiempo de persistencia en las colonias que se propagan en medio de cultivo sin agregado de EGF en comparación con las medidas en medio de cultivo con EGF. De hecho, en ausencia de EGF la probabilidad de persistencias de 60 min o mayores es siempre menor que en presencia de EGF. Entonces, las persistencias más largas se encontraron en las colonias de menor densidad celular creciendo en presencia de EGF. El gráfico de la persistencia en función de la distancia de desplazamiento celular en ese intervalo de tiempo (Figura 3.11c) muestra que para cualquier valor de persistencia, las células en presencia de EGF recorren una distancia mayor que aquellas en ausencia de EGF. Además puede observarse que las trayectorias más persistentes son las que recorren distancias mayores.

La velocimetría por análisis de imágenes de partículas permite analizar los campos de velocidades tanto en las regiones del borde de la colonia como en las más interiores. Los campos de velocidad muestran que la velocidad celular promedio aumenta en presencia de EGF (Figura 3.12). En el mapa de colores las zonas con baja movilidad están en escala de azules y las zonas con alta movilidad en escala de rojos. Puede observarse que en presencia de EGF la región del borde con alta movilidad celular es superior a $400 \mu\text{m}$, un valor al menos dos veces más grande que los $200 \mu\text{m}$ observados en ausencia de EGF.

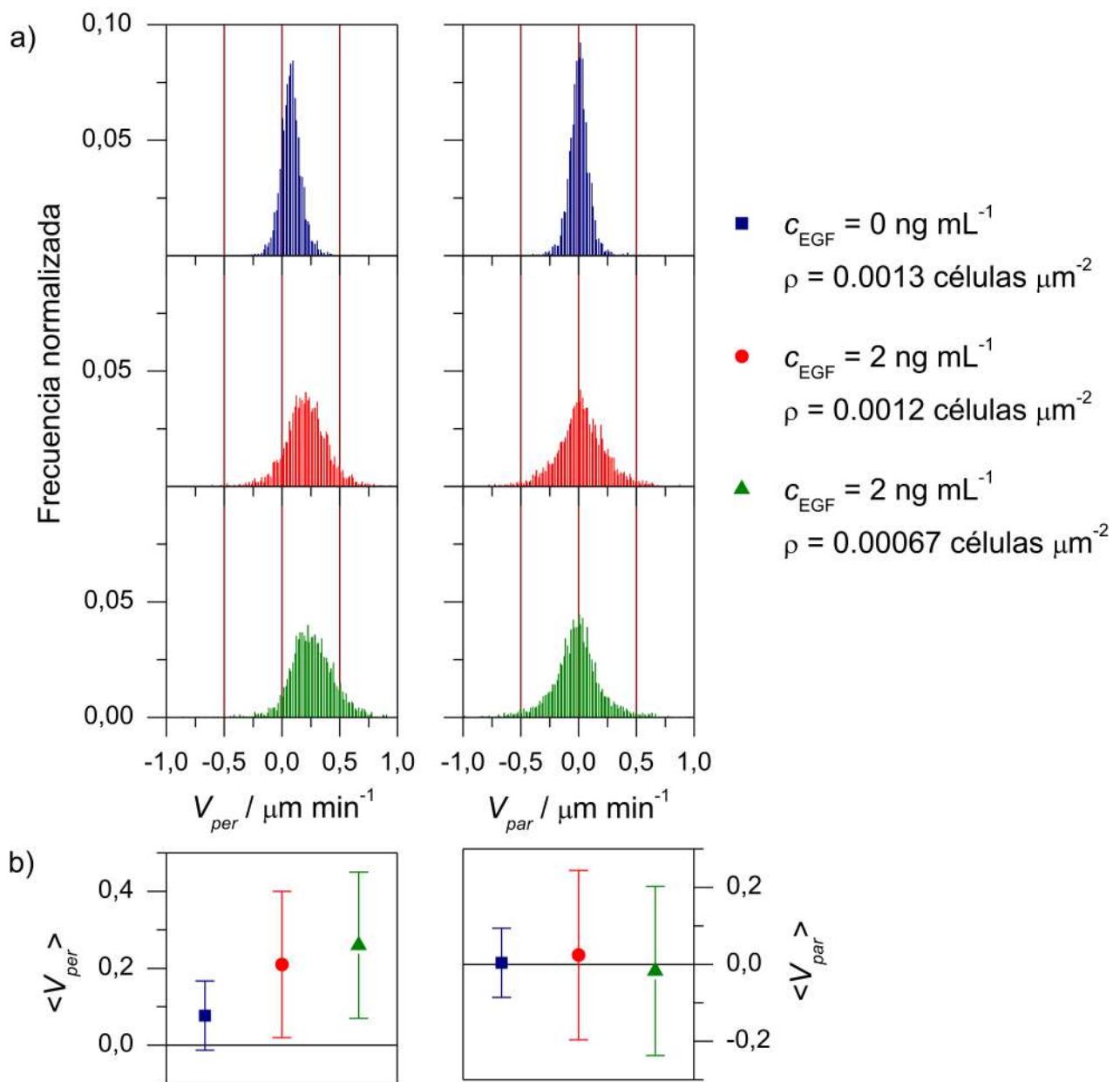


Figura 3.9: a) Histogramas de los componentes de velocidad perpendicular y paralela al frente obtenidos de las trayectorias de células ubicadas en el borde de CQLs en medio con $c_{EGF} = 0$ y 2 ng mL^{-1} y distinta densidad celular. b) Valores promedio ($\langle V \rangle$) y desviaciones estándar (S) de los componentes de velocidad perpendicular y paralela al frente.

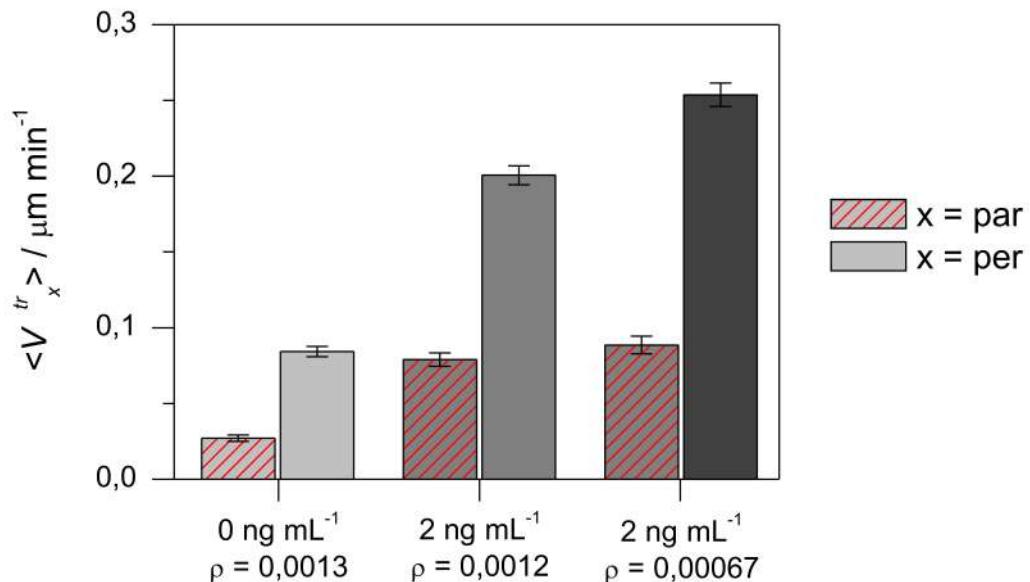


Figura 3.10: Velocidad perpendicular y paralela al frente de las células del borde de CQLs en medio con $c_{\text{EGF}} = 0$ y 2 ng mL^{-1} y distinta densidad celular.

Análisis del rugosado del frente de crecimiento

El crecimiento de CQLs de células HeLa en medio sin agregado EGF cumple, al menos para ciertos rangos de t y L , con la dinámica de crecimiento prevista por la ecuación de KPZ. La ecuación de KPZ también describe la dinámica de crecimiento de las colonias en presencia de EGF, aunque en intervalos de t y L distintos a los encontrados para las colonias en medio sin agregado de EGF. El valor del exponente $\alpha = 0.50 \pm 0.05$ obtenido de los gráficos doble logarítmicos de $w(L,t)$ en función de L en el rango de $400 < L < 1400 \mu\text{m}$ (Figura 3.13) y $\beta = 0.34$ obtenido de los gráficos doble logarítmicos de $w(L,t)$ en función de t (Figura 3.14), coinciden con los previstos por el modelo estándar de KPZ.

En medio de cultivo sin agregado de EGF, el frente de las colonias presenta una saturación de la rugosidad en el rango $200 \leq L \leq 400 \mu\text{m}$ y $t < 2800 \text{ min}$. Para $L > 300 \mu\text{m}$ se observa una relación lineal en el gráfico log-log con una pendiente β cercana a 0.34 (Figura 3.14) y no pudo observarse saturación en los 6000 min en que se siguió la propagación de la colonia. La presencia de EGF en el medio de cultivo aumenta la rugosidad del borde de la colonia, tanto en la escala de la colonia como en la escala celular. La rugosidad del frente de las colonias en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 2$ y 10 ng mL^{-1} crece en forma continua hasta $L < 900 \mu\text{m}$, y se alcanza la saturación a valores mayores. La rugosidad de las colonias con $L > 900 \mu\text{m}$ en medio de cultivo con 2 ng mL^{-1} alcanzan la saturación a $t \sim 2800 \text{ min}$ y aquellas en medio de cultivo con 10 ng mL^{-1} a $t \sim 2300 \text{ min}$. Para $c_{\text{EGF}} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$ en el medio de cultivo a $t = 3600 \text{ min}$ se observa un aumento abrupto de prácticamente todos los valores de rugosidad (recuadro en la Figura 3.14).

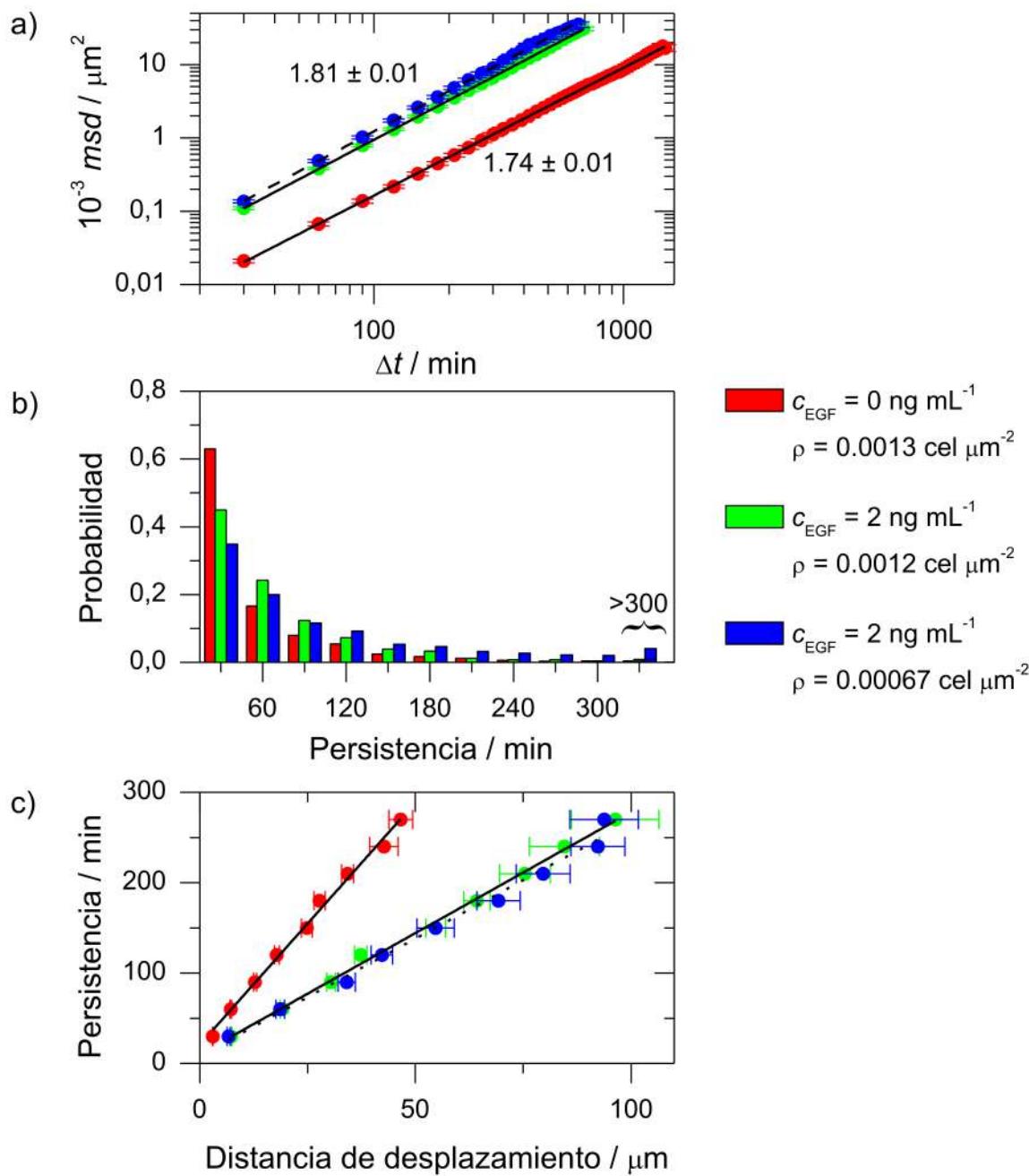


Figura 3.11: *Msd y persistencias promedio de las trayectorias celulares de CQLs en medio con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$.* a) Gráficos doble logarítmicos de msd en función de Δt_R . b) Histogramas de persistencia. Se incluye la probabilidad de observar movimientos con persistencia superiores a 300 min. c) Gráfico de persistencia en función de la distancia recorrida por la célula durante ese intervalo de tiempo.

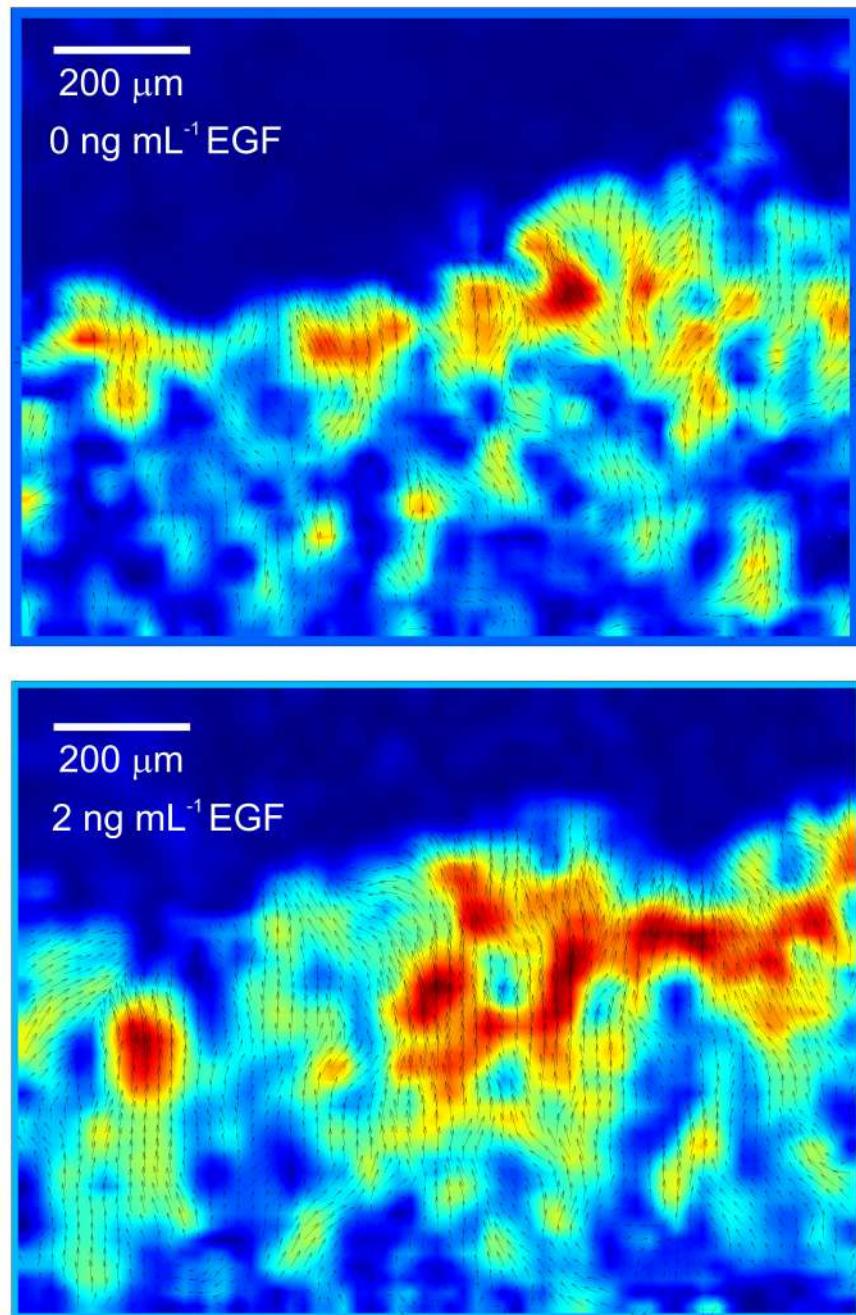


Figura 3.12: Campos de velocidad de CQLs de células HeLa en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0 \text{ ng mL}^{-1}$ y $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$. La regiones de baja velocidad están en tonos de azul, mientras que las de alta velocidad están en tonos de rojo.

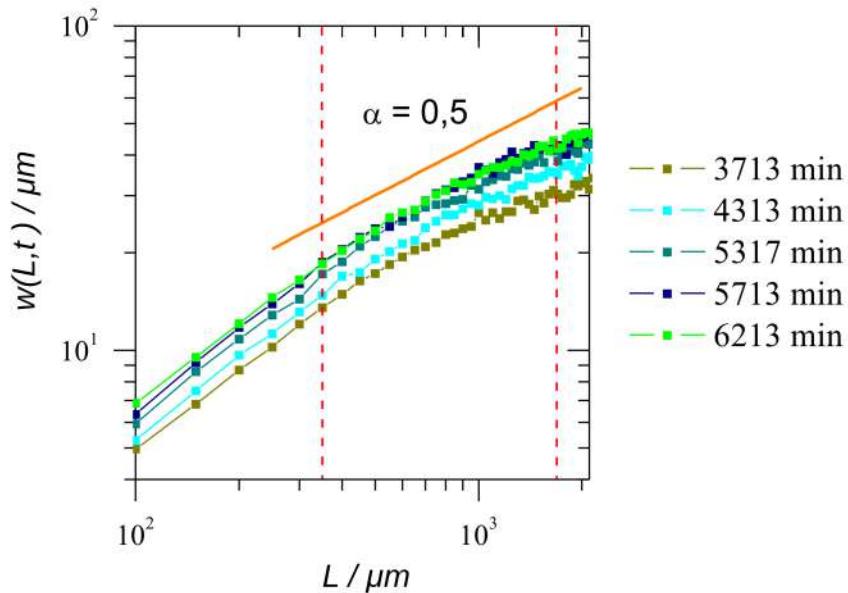


Figura 3.13: $\log w(L,t)$ en función de $\log L$ de colonias en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 2 \text{ ng mL}^{-1}$.

3.3. Discusión

3.3.1. Cinética y morfologías celulares de colonias quasi-radiales en medio que contiene EGF

Las células HeLa son sensibles a la presencia de EGF que activa diferentes vías de señalización luego de unirse a sus receptores celulares [3.23]. Las características de las células individuales así como las de toda la colonia dependen de c_{EGF} (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3). En presencia de EGF, las células tienen una morfología más ahusada y largos filopodios. Además, disminuye el tamaño de los contactos focales, aunque su número por célula aumenta (Figura 3.2). Este hecho está de acuerdo con una cinética de adhesión/desadhesión del substrato más rápida [3.28, 3.29]. Los cambios en la organización del citoesqueleto y las características de los contactos focales se relacionan con los cambios observados en la movilidad celular [3.30].

Las CQRs exhiben una cinética de propagación y una evolución morfológica que depende de c_{EGF} , de N_0 y de la densidad celular. En general, para N_0 y densidades celulares grandes, prevalece una relación lineal entre el $\langle R \rangle$ y el tiempo (Figura 3.4). Por otro lado, las colonias con N_0 y densidades celulares iniciales bajas, que se propagan en medio con EGF presentan en los estadios de crecimiento iniciales, un crecimiento del $\langle R \rangle$ más rápido que lo esperado para un comportamiento exponencial (Figuras 3.4 y 3.5), que denominamos supraexponencial. Este comportamiento supraexponencial se origina por la dispersión de las células en las colonias por efecto del EGF, que se ve reflejado en una gran disminución de la densidad celular (Figura 3.5 y 3.6). A esta rápida expansión de la colonia en estadios iniciales le sigue una cinética de crecimiento exponencial y posteriormente una transición a un régimen cinético de $\langle V_F \rangle$ constante a t_c , N_c y $\langle R_c \rangle$.

Los modelos de crecimiento propuestos consideran que la expansión radial de la colonia ocurre en tres etapas: (i) un régimen de difusión en el que $\langle R \rangle$ es proporcional a $t^{1/2}$, (ii) un régimen exponencial y (iii) un régimen donde $\langle R \rangle$ crece a $\langle V_F \rangle$ constante [3.26]. En los experimentos realizados con colonias confluentes en medios de cultivo sin EGF la primer etapa no pudo ser detectada y sólo se observa el régimen exponencial de crecimiento

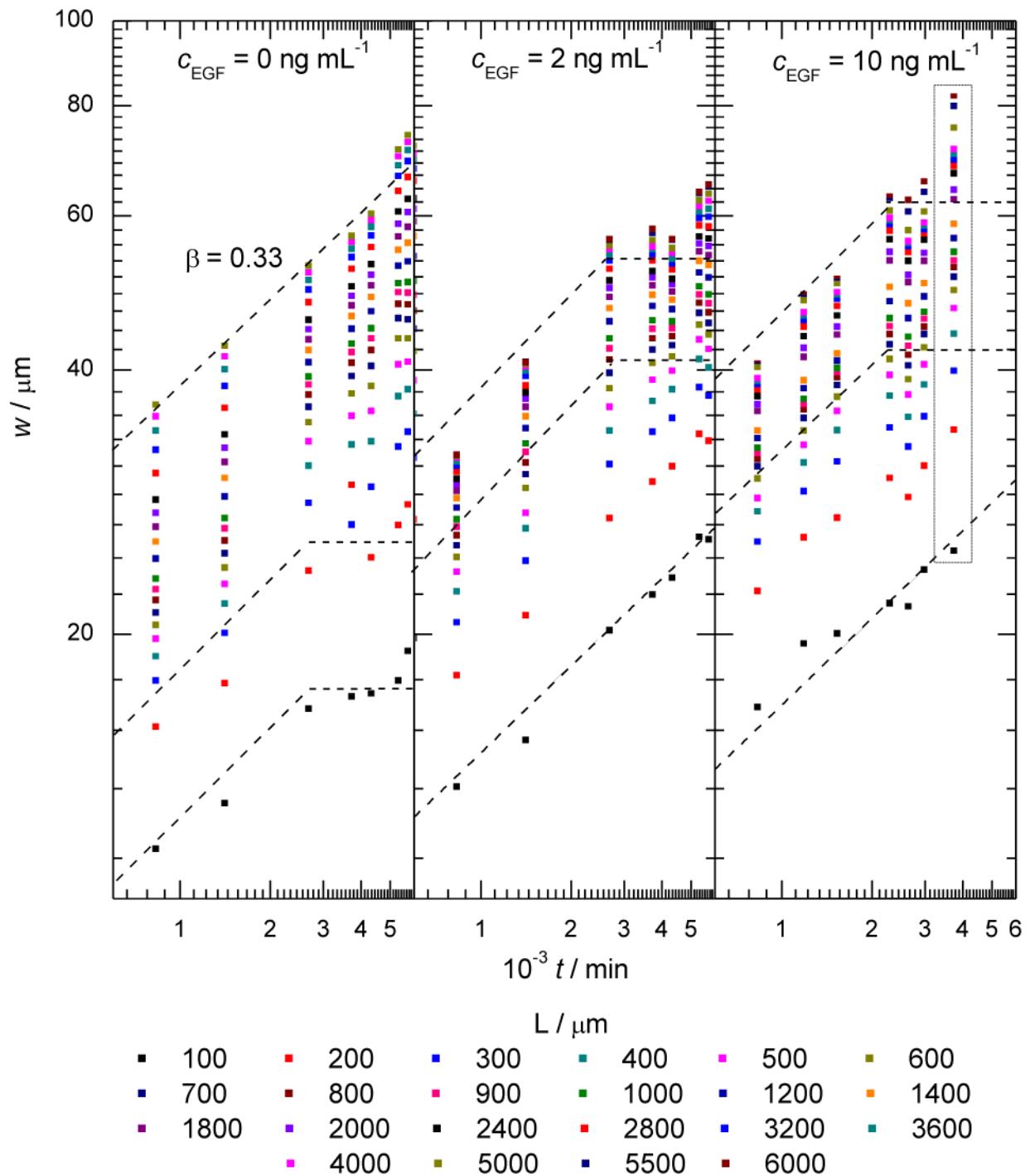


Figura 3.14: $\log w(L,t)$ en función de $\log t$ para diferentes L . Los datos resultan del promedio de 5 CQLs propagándose en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} = 0, 2$ y 10 ng mL^{-1} . Se incluyen los errores estandar. En el recuadro se observa el aumento abrupto de la rugosidad.

seguido del que ocurre a $\langle V_F \rangle$ constante [3.31, 3.32]. Este comportamiento se expresa matemáticamente por la ecuación (3) del capítulo 1. En esta, el crecimiento de la colonia se describe como una región anular de espesor efectivo $\Delta L_{eff} = R(t) - R_2(t)$ y un núcleo central de radio $R_2(t)$ asociado con el retardo del crecimiento. Entonces, a $t = 0$, $N = N_0$ y $R_0 < \Delta L_{eff}$, se obtiene una transición cinética desde un régimen de crecimiento exponencial a uno de $\langle V_F \rangle$ constante que coincide con los resultados experimentales.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la presencia de EGF en el medio de cultivo promueve, dentro de ciertos rangos de c_{EGF} y dependiendo de N_0 y de la densidad celular inicial de la colonia, un rápido crecimiento del radio de la colonia en los primeros estadios de crecimiento. Este comportamiento puede describirse por un término $t^{1/2}$ que se utilizó para modificar la ecuación propuesta en [3.26] para tener en cuenta la movilidad celular y la disminución de la densidad de la colonia a tiempos cortos. La ecuación modificada resulta:

$$\langle R \rangle(t) = \begin{cases} A(\langle \tau \rangle + \Theta)t^{\frac{1}{2}} + \sqrt{N_0}e^{\frac{t}{2\langle \tau \rangle}} & \text{para } t \leq t_c \\ \sqrt{K_2}\Delta L_{eff}[1 + W(\frac{N_0^2}{K_2^2\Delta L_{eff}^4}e^{1+\frac{2t}{\langle \tau \rangle}})] & \text{para } t > t_c \end{cases} \quad (3.1)$$

Donde $W(x)$ es la función de Lambert, $K_2 = \pi/a^2$ con a un parámetro relacionado al tamaño celular, Θ es la difusividad celular y t_c es el tiempo al que ocurre la transición desde una cinética de crecimiento exponencial a una de $\langle V_F \rangle$ constante. Esta última se alcanza cuando $\langle R \rangle > \Delta L_{eff}$. Los datos experimentales pueden graficarse de acuerdo a la ecuación 3.1 teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento, es decir, a y $\langle \tau \rangle$ que son el radio y el tiempo de duplicación promedio de las células, N_0 y utilizando solo dos parámetros de ajuste, $B = A(\langle \tau \rangle + \Theta)$ y ΔL_{eff} . En la tabla 3.2 se muestran los parámetros utilizados para graficar las curvas en la figura 3.5, que resultaron coherentes con los datos experimentales de $\langle R \rangle$ en función de t . Sin embargo, es importante tener en cuenta que a pesar de la buena concordancia de la ecuación propuesta con los datos experimentales, la fenomenología del crecimiento de las colonias excede las suposiciones del modelo.

Parámetros de la colonia					Parámetros de ajuste	
c_{EGF}	N_0	$\rho / \text{células } \mu \text{ m}^{-2}$	$\langle \tau \rangle / \text{min}$	$a / \mu \text{ m}$	B	$\Delta L_{eff} / \mu \text{ m}$
0	16	0.00124	3250	10	0	200
0.4	430	0.00074	3200	20.8	0.08	240
10	1338	0.0072	2800	10.8	0.10	440

Tabla 3.2: Parámetros utilizados en la ecuación 3.1 para el ajuste de los datos cinéticos de la propagación de CQRs en medios con distinta c_{EGF} .

Los datos cinéticos de CQRs confluentes indican que a c_{EGF} constante, un N_0 relativamente bajo favorece la cinética supraexponencial a estadios tempranos del crecimiento. Es necesaria una densidad celular mínima para poder observar este régimen supraexponencial. Por otro lado, para valores de N_0 suficientemente grandes, a mayor c_{EGF} mayor es ΔL_{eff} . Por lo tanto, la transición de un régimen exponencial a uno de $\langle V_F \rangle$ constante ocurre a tiempos mayores.

Las CQLs presentaron un crecimiento a velocidad constante independientemente de c_{EGF} , alcanzando un valor límite de $\langle V_F \rangle = 0.26 \pm 0.05 \mu\text{m min}^{-1}$ para $c_{EGF} > 2 \text{ ng mL}^{-1}$. Este valor de $\langle V_F \rangle$ es casi 3 veces más grande que el encontrado en medio sin agregado de EGF. La región de crecimiento efectivo ΔL_{eff} se forma casi inmediatamente en las CQLs, por lo que no es posible distinguir una transición en la cinética de crecimiento. Para $c_{EGF} > 10 \text{ ng mL}^{-1}$

mL^{-1} el desprendimiento de las células del borde que se relaciona con la disminución de las adhesiones célula-célula y a la generación de nuevas colonias en la zona libre de la cápsula, que eventualmente colisionarán con el frente lineal, altera el contorno de la colonia y dificulta su seguimiento a tiempos largos. Las características de la movilidad celular, discutidas en la próxima sección, contribuyen a entender los cambios morfológicos y cinéticos descriptos.

3.3.2. Movilidad celular en las colonias quasi-lineales

La determinación de las posiciones de las células individuales ubicadas en una región comprendida entre el borde y 3 diámetros celulares hacia el interior de las CQLs permitió evaluar las trayectorias celulares y sus características. Los datos de movilidad celular pueden proveer información importante para caracterizar y entender la dinámica de crecimiento de un sistema biológico complejo como es una colonia multicelular [3.25]. Las características de la movilidad celular pueden relacionarse con la dinámica de crecimiento global de las colonias a través de ecuaciones de transporte que tengan o no el tamaño celular como variable [3.2, 3.33]. Entonces, también es posible vincular ecuaciones de transporte que poseen contribuciones no lineales con ecuaciones generales y complejas que describen el crecimiento de interfases como aquellas propuestas a partir del análisis de escalado dinámico [3.34].

En presencia de 2 ng mL^{-1} de EGF, los desplazamientos celulares son más balísticos y persistentes que en ausencia de EGF (Figura 3.11), como se observó para la migración de células epiteliales mamarias [3.35]. La celeridad celular también aumenta en medios con EGF, siendo mayor en las colonias menos densas respecto a las más densas. Los componentes paralelos de velocidad celular también son más importantes en presencia de EGF, los histogramas de V_{par} presentan una dispersión respecto al máximo cercana al doble de la observada en ausencia de EGF (Figura 3.9) y los desplazamientos netos paralelos al frente son 3 veces más grandes que en ausencia de EGF (Figura 3.10).

El modelo propuesto en [3.26] no tiene en cuenta la migración celular directamente, ya que sólo considera el tiempo de duplicación y el tamaño celular. Dentro de este modelo, una célula se divide y aporta al crecimiento de la colonia si hay un espacio libre a una distancia igual o menor a ΔL_{eff} . Esto está de acuerdo con el hecho de que no sólo las células que están en la interfase de la colonia con espacio libre por delante contribuyen a la expansión de la colonia. Sin embargo, durante el proceso de duplicación no siempre ocurre que las células generan una célula hija que recorre una distancia ΔL_{eff} para ocupar un espacio en la zona libre del frente, sino que suelen adherirse en una zona cercana a la duplicación. La célula no aportará significativamente a la expansión de la colonia si no puede expandir su citoplasma, es decir, si está en una zona de alta densidad. Por otro lado, si está en una zona de la colonia con menor densidad, donde generalmente se establece un gradiente de densidad, esta puede expandir su citoplasma de manera de contribuir a la propagación de la colonia. Esta región está vinculada a la movilidad de las células y se asocia al tamaño del ΔL_{eff} . Las células tienden a moverse en dirección de disminuir el gradiente de densidad generando espacios libres donde pueden ubicarse y expandirse nuevas células. Por este motivo las células más rápidas pueden generar un ΔL_{eff} más grande, situación observada en los medios con EGF.

Los campos de velocidad de las colonias en medio de cultivo con $c_{\text{EGF}} 2 \text{ ng mL}^{-1}$, muestran una región del borde con vectores al menos la mitad de largos que el máximo, que se extiende hacia el interior de la colonia una distancia algo superior al doble de la observada en ausencia de EGF. Esto se corresponde con los valores de ΔL_{eff} obtenidos a partir del ajuste de las curvas con la ecuación 3.1, 440 μm en medio con $c_{\text{EGF}} 10 \text{ ng mL}^{-1}$ contra 200 μm en medio sin EGF.

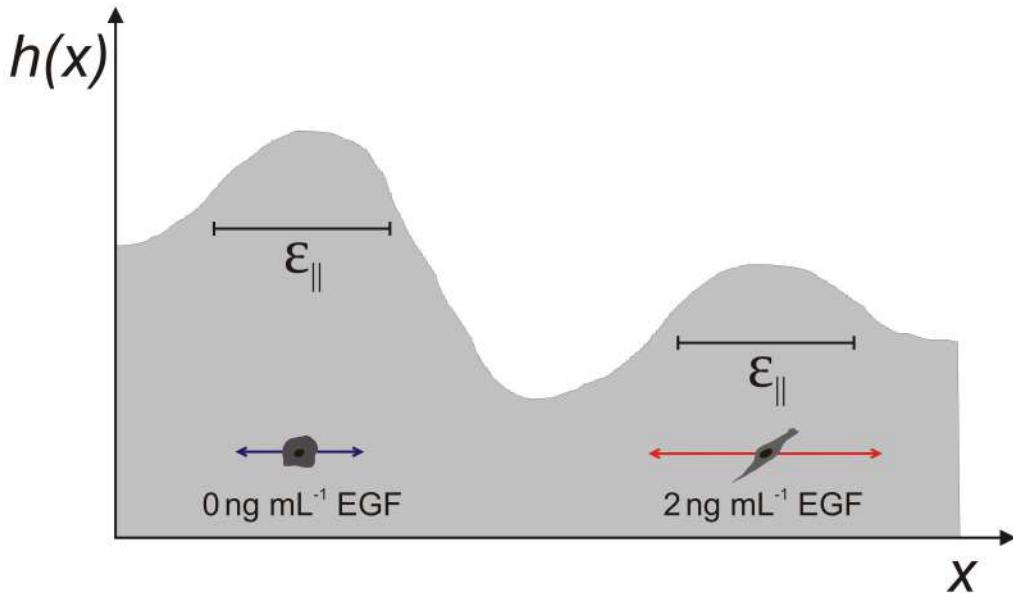


Figura 3.15: Esquema de $\epsilon_{||}$ y de los desplazamientos laterales de las células en c_{EGF} 0 y 2 ng mL^{-1} relacionados con la “comunicación lateral de la información”.

3.3.3. Escalado dinámico

La saturación de la rugosidad de una superficie se produce debido a la existencia de correlaciones en el sistema [3.34]. La altura, la rugosidad o el largo de la interfase miden las propiedades verticales del sistema, pero no reflejan las correlaciones entre las distintas posiciones laterales en la superficie [3.36]. La existencia de estas correlaciones laterales implica que los diferentes sitios de la superficie no son completamente independientes, sino que dependen de la altura de los sitios laterales o vecinos. Entonces, si bien el crecimiento de la interfase es un proceso local, la “información” acerca de la altura de los sitios vecinos se propaga globalmente. La distancia típica en la que las alturas están correlacionadas, es decir, que “saben” el valor de la altura de columnas vecinas, se llama distancia de correlación y se denomina $\epsilon_{||}$ (Figura 3.15). Al comienzo del crecimiento los sitios no están correlacionados y $\epsilon_{||}$ crece a medida que pasa el tiempo según la relación:

$$\epsilon_{||} \sim t^{\frac{1}{z}} \quad \text{para} \quad t \ll t_x \quad (3.2)$$

Para un sistema finito, $\epsilon_{||}$ no puede crecer indefinidamente ya que está limitado por el tamaño del sistema, L . Cuando $\epsilon_{||}$ alcanza el tamaño del sistema, toda la interfase está correlacionada y la rugosidad satura. En esta situación se tiene:

$$\epsilon_{||} \sim L \quad \text{para} \quad t \gg t_x \quad (3.3)$$

A L bajos, la rugosidad de las colonias en medio sin EGF satura a $t = 2800$ min, tiempo al que $\epsilon_{||}$ alcanzaría valores cercanos a L . Al aumentar el tamaño de la interfase analizado (L), el sistema nunca satura para los tiempos en que la colonia fue seguida, por lo que $\epsilon_{||} < L$. Por otro lado, en medio contenido EGF la rugosidad de los frentes de crecimiento satura aún a L grandes, a pesar de que a L pequeños no ocurre. La saturación anómala de la rugosidad de los frentes de colonias creciendo en medio con EGF puede atribuirse a los cambios morfológicos en región del borde de la colonia (Figura 3.3 y 3.7), la cinética de crecimiento y las características de la movilidad de las células (Figuras 3.11, 3.9, 3.10 y

3.12), que se discuten a continuación.

En presencia de EGF, las colonias exhiben un borde efectivo más grande donde las células pueden duplicarse y moverse en dirección del avance del frente. Además, las células tienen desplazamientos laterales netos 3 veces más grandes que en ausencia de EGF. Los cambios fenotípicos de las células en medios con EGF, como los largos filopodios y la morfología más ahuesada, podrían explicar la falta de saturación a L bajos. El hecho de que las colonias celulares no sean objetos autosimilares donde los componentes microscópicos tienen tamaño despreciable en relación al tamaño del frente, determina que el escalado dinámico sólo puede aplicarse a ciertos de rangos de L y t . Un objeto es autosimilar si está formado por partes que son similares al todo. En ese aspecto el frente de las colonias de células epiteliales en ausencia de EGF está formado por regiones con picos que son representativos del todo, que a su vez están formados por grupos de células cuyas membranas también tienen deformaciones y protuberancias. Si bien no es un sistema perfectamente autosimilar, el escalado puede aplicarse a $L > 200 \mu\text{m}$, una distancia correspondiente a unas pocas células. La pérdida del fenotipo epitelial en presencia de EGF, con un cambio en la morfología celular que pasa a ser más ahuesada, la aparición de largos filopodios, la disminución de la cohesión celular y la aparición de espacios vacíos contribuye a que en rangos pequeños de L la morfología y rugosidad del frente sea muy distinta que a escalas mayores. Por este motivo en presencia de EGF el escalado es válido sólo a valores relativamente grandes de L , observándose saturación de la rugosidad del frente de crecimiento.

Para $c_{\text{EGF}} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$ se observan aumentos abruptos de w a $t = 3600 \text{ min}$. Esto se explica teniendo en cuenta que a altas concentraciones de EGF las células tienen una mayor tendencia a desprenderse del borde de la colonia, adherirse en zonas vacías de la cápsula y generar pequeñas colonias que, eventualmente, colisionarán con el frente de crecimiento. Este fenómeno a tiempos largos producirá un aumento de la velocidad del crecimiento del frente y de la rugosidad, aun cuando esta haya saturado. Pero, ¿por qué la rugosidad de las colonias satura en presencia de EGF a valores relativamente altos de L , en los que no se había observado la saturación en colonias en medios sin EGF? Probablemente se deba a que a pesar de la pérdida de cohesividad celular, el sistema se encuentra más “comunicado” por medio de largos filopodios y desplazamientos celulares laterales más grandes en medio con EGF. De esta la manera la “información” de la altura de las columnas se transmite más rápidamente y aumenta la correlación.

3.4. Conclusiones

El EGF afecta las interacciones célula-célula y célula-substrato promoviendo una mayor motilidad celular y la dispersión de las colonias. Por este motivo, para tener colonias confluentes a lo largo del tiempo es necesario partir de colonias con valores grandes de N_0 . Además, la presencia de EGF produce grandes cambios morfológicos a nivel celular y de la colonia. Las células tienen una morfología más ahuesada, con largos filopodios y son capaces de desprenderse del frente de la colonia, generando una región más grande que presenta gradiente de densidad. La presencia de EGF incrementa la contribución de los componentes de velocidad paralelos al frente, aumentando la persistencia y características balísticas de las trayectorias celulares. A medida que c_{EGF} crece, las células de capas más internas tienen velocidades netas hacia el frente mayores, pueden alcanzar el borde de la colonia y contribuir a su expansión.

Los gráficos de $\langle R \rangle$ en función de t de las CQRs que se propagan en medio con EGF también muestran una transición de régimen exponencial a uno a $\langle V_F \rangle$ constante.

Pero las propiedades mitogénicas del EGF y su influencia en la movilidad celular afectan la cinética, resultando en $\langle V_F \rangle$ mayores. Además, para las colonias quasi circulares con N_0 y densidad celular apropiados, la presencia de EGF induce un crecimiento supraexponencial en los estadios iniciales de crecimiento. La cinética de crecimiento de las colonias en medios con EGF puede describirse utilizando el modelo matemático propuesto en [3.26] con el agregado de un término $t^{1/2}$ para incluir el comportamiento supraexponencial observado a tiempos cortos. Este modelo, además, predice el incremento del ΔL_{eff} y de t_c .

La evolución de la rugosidad de los frentes de las colonias en medio con EGF satisface la dinámica propuesta en el modelo estandar de KPZ, pero sólo resulta aplicable en rangos de L y t distintos a los observados en ausencia de EGF. Además la saturación de la rugosidad para L altos ocurre más rápido que en ausencia de EGF, debido posiblemente a un mayor incremento en la distancia de correlación de las alturas en función del tiempo producido por los grandes filopodios y desplazamientos celulares laterales.

Estos resultados resultan de gran interés tanto para el desarrollo de modelos confiables que describan sistemas complejos como para mejorar las estrategias y protocolos aplicados en el campo de sanación de heridas y la investigación del cáncer.

Bibliografía

- [3.1] A. Wells, editor. *Cell Motility in Cancer Invasion and Metastasis*. Springer-Verlag, Berlin, 2006. (Citado en página 151.)
- [3.2] C. L. Simpson, D. M. Patel & K. J. Green. “Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011. **12**(9), 565–580. (Citado en páginas 151 y 173.)
- [3.3] B. Behm, P. Babilas, M. Landthaler & S. Schreml. “Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing”. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012. **26**(7), 812–820. (Citado en página 151.)
- [3.4] B. M. Borena, A. Martens, S. Y. Broeckx, E. Meyer, K. Chiers, L. Duchateau & J. H. Spaas. “Regenerative Skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments”. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015. **36**(1), 1–23. (Citado en página 151.)
- [3.5] B. P. Ceresa & J. L. Peterson. “Cell and Molecular Biology of Epidermal Growth Factor Receptor”. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2014. **313**, 145–178. (Citado en página 151.)
- [3.6] T. Mitsudomi & Y. Yatabe. “Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer”. *FEBS Journal*, 2010. **277**(2), 301–308. (Citado en página 151.)
- [3.7] G. Maheshwari, A. Wells, L. G. Griffith & D. A. Lauffenburger. “Biophysical Integration of Effects of Epidermal Growth Factor and Fibronectin on Fibroblast Migration”. *Biophysical Journal*, 1999. **76**(5), 2814–2823. (Citado en página 151.)
- [3.8] R. C. Kurten, P. Chowdhury, R. C. Sanders, L. M. Pittman, L. W. Sessions, T. C. Chambers, C. S. Lyle, B. J. Schnackenberg & S. M. Jones. “Coordinating epidermal growth factor-induced motility promotes efficient wound closure.” *American journal of physiology. Cell physiology*, 2005. **288**(1), C109–21. (Citado en página 151.)
- [3.9] J. A. Berkers, P. M. van Bergen en Henegouwen & J. Boonstra. “Three classes of epidermal growth factor receptors on HeLa cells.” *The Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(2), 922–927. (Citado en página 151.)
- [3.10] F. Capuani, A. Conte, E. Argenzio, L. Marchetti, C. Priami, S. Polo, P. P. Di Fiore, S. Sigismund & A. Ciliberto. “Quantitative analysis reveals how EGFR activation and downregulation are coupled in normal but not in cancer cells”. *Nature Communications*, 2015. **6**, 7999. (Citado en página 151.)

- [3.11] U. Dürer, R. Hartig, S. Bang, L. Thim & W. Hoffmann. “TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin”. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2007. **20**(5), 329–346. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [3.12] M. A. Seeger & A. S. Paller. “The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration”. *Advances in Wound Care*, 2015. **4**(4), 213–224. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [3.13] M. F. Ware, A. Wells & D. A. Lauffenburger. “Epidermal growth factor alters fibroblast migration speed and directional persistence reciprocally and in a matrix-dependent manner”. *Journal of Cell Science*, 1998. **111**(16), 2423–2432. (Citado en página 151.)
- [3.14] D. T. Geum, B. J. Kim, A. E. Chang, M. S. Hall & M. Wu. “Epidermal growth factor promotes a mesenchymal over an amoeboid motility of MDA-MB-231 cells embedded within a 3D collagen matrix”. *European Physical Journal Plus*, 2016. **131**(1), 1–10. (Citado en página 151.)
- [3.15] E. L. Wickert, S. Pomerenke, I. Mitchell, K. S. Masters & P. K. Kreeger. “Hierarchy of cellular decisions in collective behavior: Implications for wound healing”. *Scientific Reports*, 2016. **6**, 20139. (Citado en página 151.)
- [3.16] P. Friedl & D. Gilmour. “Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2009. **10**(7), 445–57. (Citado en páginas 33 y 151.)
- [3.17] A. Haeger, K. Wolf, M. M. Zegers & P. Friedl. “Collective cell migration: guidance principles and hierarchies”. *Trends in Cell Biology*, 2015. **25**(9), 556–566. (Citado en páginas 36 y 151.)
- [3.18] W.-J. Rappel. “Cell–cell communication during collective migration”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. **113**(6), 1471–1473. (Citado en página 151.)
- [3.19] O. Chepizhko, C. Giampietro, E. Mastrapasqua, M. Nourazar, M. Ascagni, M. Sugni, U. Fascio, L. Leggio, C. Malinverno, G. Scita, S. Santucci, M. J. Alava, S. Zapperi & C. A. M. La Porta. “Bursts of activity in collective cell migration”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. **113**(41), 11408–11413. (Citado en página 151.)
- [3.20] J. Galeano, J. Buceta, K. Juarez, B. Pumariño, J. de la Torre & J. M. Iriondo. “Dynamical scaling analysis of plant callus growth”. *Europhysics Letters*, 2003. **63**(1), 83–89. (Citado en página 151.)
- [3.21] J. A. Bonachela, C. D. Nadell, J. B. Xavier & S. A. Levin. “Universality in Bacterial Colonies”. *Journal of Statistical Physics*, 2011. **144**(2), 303–315. (Citado en páginas 44 y 151.)
- [3.22] K. A. Takeuchi. “Experimental approaches to universal out-of-equilibrium scaling laws: turbulent liquid crystal and other developments”. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2014. **2014**(1), P01006. (Citado en página 151.)
- [3.23] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi & H. Kitano. “A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling”. *Molecular Systems Biology*, 2005. **1**(1), E1–E17. (Citado en páginas 152 y 170.)

- [3.24] M. Scaltriti & J. Baselga. “The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy”. *Clinical Cancer Research*, 2006. **12**(18), 5268–5272. (Citado en página 152.)
- [3.25] K. K. Treloar, M. J. Simpson, P. Haridas, K. J. Manton, D. I. Leavesley, D. L. S. McElwain & R. E. Baker. “Multiple types of data are required to identify the mechanisms influencing the spatial expansion of melanoma cell colonies.” *BMC Systems Biology*, 2013. **7**, 137. (Citado en páginas 122, 152 y 173.)
- [3.26] M. Radszuweit, M. Block, J. G. Hengstler, E. Schöll & D. Drasdo. “Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions”. *Physical Review E*, 2009. **79**(5), 051907. (Citado en páginas 37, 109, 110, 143, 158, 159, 160, 170, 172, 173 y 176.)
- [3.27] L. Petitjean, M. Reffay, E. Grasland-Mongrain, M. Poujade, B. Ladoux, A. Buguin & P. Silberzan. “Velocity fields in a collectively migrating epithelium.” *Biophysical Journal*, 2010. **98**(9), 1790–800. (Citado en páginas 85 y 161.)
- [3.28] H. Xie, M. A. Pallero, K. Gupta, P. Chang, M. F. Ware, W. Witke, D. J. Kwiatkowski, D. A. Lauffenburger, J. E. Murphy-Ullrich & A. Wells. “EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway.” *Journal of Cell Science*, 1998. **111**, 615–624. (Citado en página 170.)
- [3.29] P. J. Rijken, W. J. Hage, P. M. van Bergen en Henegouwen, a. J. Verkleij & J. Boonstra. “Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells.” *Journal of Cell Science*, 1991. **100**(3), 491–499. (Citado en página 170.)
- [3.30] Y. Hou, S. Hedberg & I. C. Schneider. “Differences in adhesion and protrusion properties correlate with differences in migration speed under EGF stimulation.” *BMC Biophysics*, 2012. **5**, 8. (Citado en página 170.)
- [3.31] M. Block, E. Schöll & D. Drasdo. “Classifying the Expansion Kinetics and Critical Surface Dynamics of Growing Cell Populations”. *Physical Review Letters*, 2007. **99**(24), 248101. (Citado en páginas 114 y 172.)
- [3.32] D. Drasdo. “Coarse graining in simulated cell populations”. *Advances in Complex Systems*, 2005. **08**, 319–363. (Citado en página 172.)
- [3.33] C. Deroulers, M. Aubert, M. Badoual & B. Grammaticos. “Modeling tumor cell migration: From microscopic to macroscopic models”. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2009. **79**(3), 031917. (Citado en página 173.)
- [3.34] A. L. Barabasi & H. E. Stanley. *Fractal concepts in surface growth*. Cambridge University Press, 1995. (Citado en páginas 37, 41, 42, 43, 113, 122, 146, 173, 174, 267, 268 y 269.)
- [3.35] G. Maheshwari, H. S. Wiley & D. A. Lauffenburger. “Autocrine epidermal growth factor signaling stimulates directionally persistent mammary epithelial cell migration.” *The Journal of Cell Biology*, 2001. **155**(7), 1123–8. (Citado en página 173.)
- [3.36] M. Pelliccione & T. M. Lu. *Evolution of thin film morphology : modeling and simulations*. Springer, New York, 2008. (Citado en página 174.)

Capítulo 4

Efecto sobre el fenotipo celular de la modificación del substrato mediante películas de polielectrolitos: empleo de polielectrolitos de origen natural y sintético

4.1. Introducción

Diversas estrategias utilizadas para modular las funciones celulares se basan en la modificación de las propiedades físicas y químicas del substrato que interactúa con las células, como la composición, la energía superficial, la mojabilidad, la carga, la rugosidad, la rigidez o la presencia de patrones [4.1]. En estas estrategias pueden utilizarse diferentes materiales poliméricos de origen natural, como multicapas de polielectrolitos fabricadas mediante la técnica de capa por capa, substratos poliméricos recubiertos con proteínas [4.2] o hidrogeles biocompatibles [4.3].

Los polielectrolitos de origen natural, como la poli-L-lisina, el ácido hialurónico, el alginate o el chitosano resultan muy atractivos para la modificación de superficies para aplicaciones biológicas, entre ellas, la ingeniería de tejidos [4.4, 4.5]. Ensamblados en multicapas de polielectrolitos (MPEs), estos polielectrolitos forman películas biocompatibles sobre las que factores de crecimiento, proteínas y otras biomoléculas pueden depositarse o unirse covalentemente para controlar las funciones celulares como la adhesión, la migración o la proliferación [4.6]. La desventaja que suelen presentar las MPEs fabricadas con polielectrolitos de origen natural es que sus propiedades mecánicas no promueven una buena adhesión celular. Por este motivo se emplean diversas estrategias como el entrecruzamiento de los polielectrolitos con agentes químicos [4.7] o el agregado de nanopartículas [4.8] para mejorar las propiedades mecánicas de las películas y favorecer la adhesión celular.

El uso de los MPEs para muchas aplicaciones biomédicas se encuentra descripto en un gran número de trabajos científicos [4.5, 4.9]. Sin embargo, no suele prestarse demasiada atención al impacto de la composición de las multicapas en la adhesión y proliferación celular. La composición química de las MPEs está directamente relacionada con sus propiedades mecánicas, que son fundamentales para controlar la adhesión celular. Las propiedades de las películas son también una combinación de las propiedades de los polianiones y de los polianiones que forman las multicapas. Los MPEs con la misma capa externa pero diferentes

polielectrolitos en las capas inferiores pueden tener propiedades diferentes y, consecuentemente, pueden interactuar de manera diferente con las células.

Por otro lado, resulta interesante saber cuán profundo dentro de las multicapas pueden sensar las células. Las MPEs pueden ensamblarse usando polielectrolitos rígidos de origen sintético en las primeras capas y polielectrolitos blandos de origen natural en las últimas capas, en contraste con la estrategia adoptada en trabajos anteriores [4.10–4.13]. De esta manera las capas superiores en contacto con las células serán biocompatibles, mientras que la presencia de polielectrolitos rígidos en las capas inferiores aportarán las propiedades mecánicas necesarias para una buena adhesión celular.

A lo largo de este capítulo se estudiarán las cuestiones mencionadas anteriormente variando la composición química de las MPEs, combinando polielectrolitos sintéticos con polielectrolitos naturales y fabricando MPEs con dos bloques diferentes, uno superior con polielectrolitos naturales biocompatibles y uno inferior con un polielectrolito sintético.

4.2. Resultados

4.2.1. Multicapas (Policación/Polianión)₇Policación

Se fabricaron MPEs utilizando distintas combinaciones de policationes y polianiones. Los policationes utilizados fueron: Chi, PLL, PEI, PAH y PDADMAC. Para cada policación, se fabricaron películas con los siguientes polianiones: HA, Alg, Dex, PAA, PSS. Las multicapas tuvieron 15 capas de polielectrolitos, correspondiendo la primera y la última siempre al policación, (Policación/Polianión)₇Policación.

El ensamblado de las MPEs se siguió mediante microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D). Son ejemplos típicos de MPEs de origen natural las que contienen PLL (Figura 4.1) y sintético las que contienen PAH (Figura 4.2). En todos los casos, se observa que la masa depositada aumenta con el número de bicapas, aunque es de notar que el tipo de crecimiento varía para cada policación dependiendo del polianión con el que se ensambla. El crecimiento de la película puede ser: (I) supralineal, como es el caso del PAH/HA; (II) lineal, es ejemplo de este comportamiento el PAH/PSS; (III) crecimiento mixto, con una transición de supralineal a lineal, como se observa para el sistema PLL/HA.

La microscopía de fuerzas atómicas se utilizó para comprobar el grado de cubrimiento del substrato con las diferentes MPEs, ya que a excepción de algunos ensamblados que depositan tanto material que es posible ver una película opalescente sobre el cubreobjeto (como los que tienen a PEI como policación) la mayoría son completamente transparentes. En la Figura 4.3 se muestran imágenes de AFM de películas de PLL/Alg y PSS/PAH como ejemplos típicos de multicapas ensambladas con polielectrolitos naturales o sintéticos. Las imágenes tomadas luego de secar las películas, permiten inferir una cobertura completa de la superficie del substrato de vidrio, aunque la topografía de las superficies es diferente para cada película, lo que refleja las características propias de los distintos polielectrolitos ensamblados y la naturaleza de las interacciones. La película de (PLL/Alg)₇PLL presenta una superficie heterogénea cubierta por estructuras fibrilares de distintos tamaños, de 0.5 a 6 μm de largo y de 60 a 120 nm de altura. El (PAH/PSS)₇PAH, por otro lado, presenta una superficie mucho más uniforme cubierta por estructuras globulares de 0.1-0.3 μm y 90-120 nm de altura.

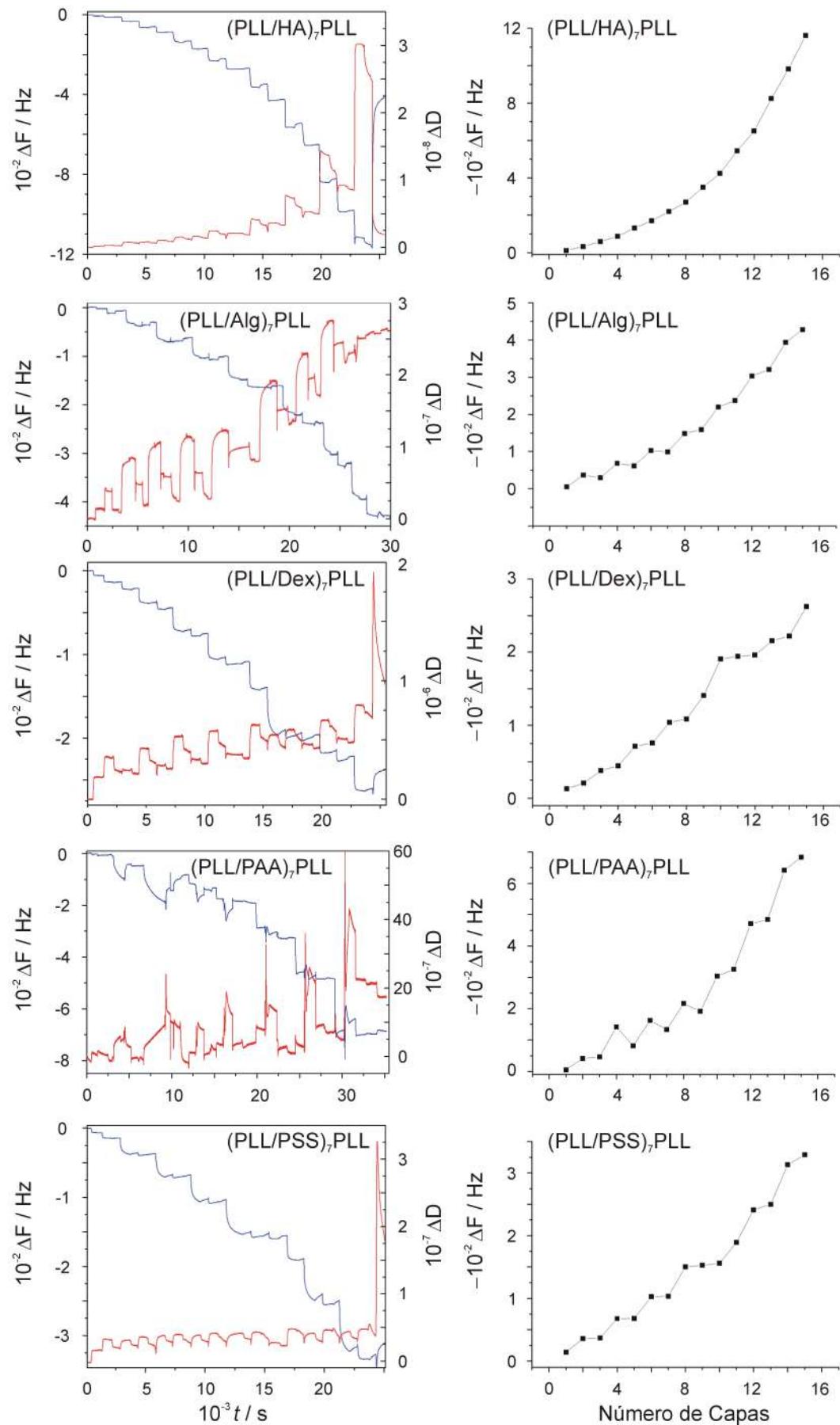


Figura 4.1: ΔF (curva azul) y ΔD (curva roja) del 3.^o armónico en función del tiempo para el ensamblado de películas de PLL con distintos polianiones (izquierda). Para cada sistema se incluyen los valores absolutos de ΔF en función del número de capas (derecha).

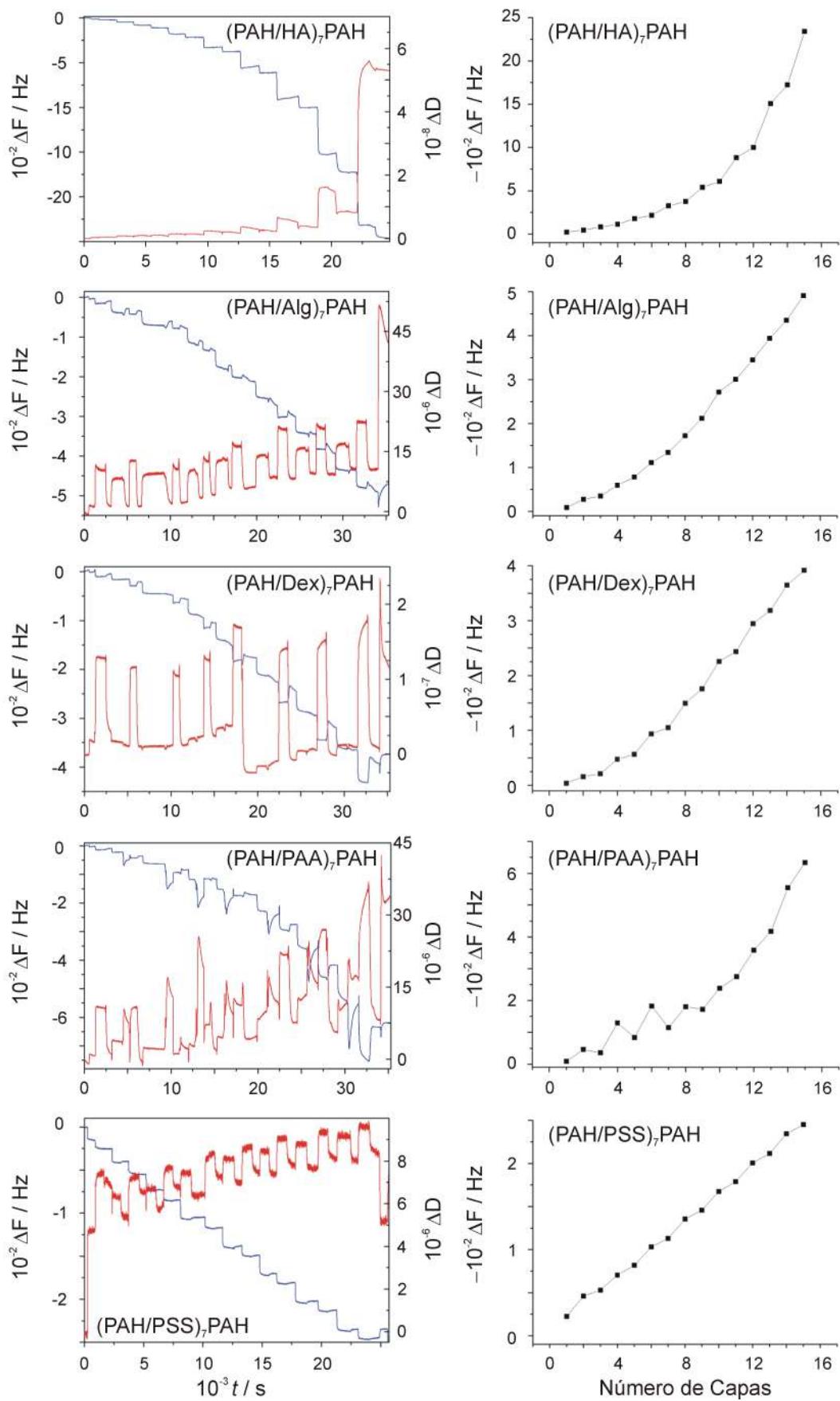


Figura 4.2: ΔF (curva azul) y ΔD (curva roja) del 3.^o armónico en función del tiempo para el ensamblado de películas de PAH con distintos polianiones (izquierdo). Para cada sistema se incluyen los valores absolutos de ΔF en función del número de capas (derecha).

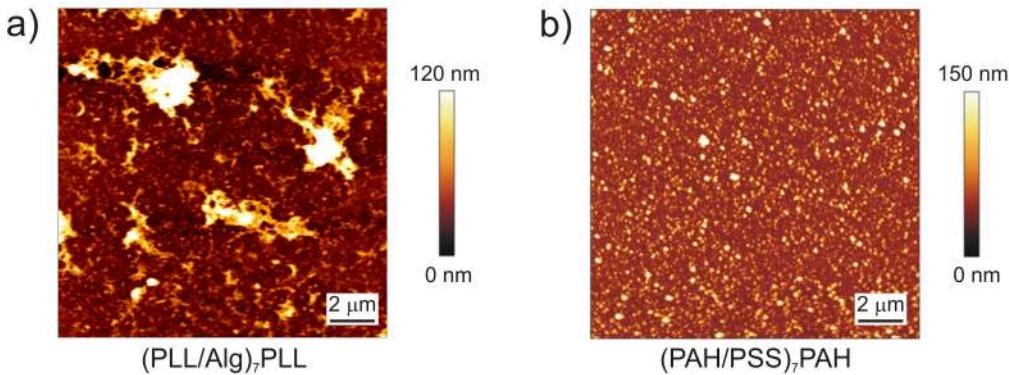


Figura 4.3: Imágenes de AFM de películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ (a) y $(PAH/PSS)_7PAH$ (b) secadas en aire.

4.2.2. Adhesión y morfología celular

La adhesión celular en superficies de distinta composición se estudió empleando MPEs ensambladas combinando distintos policationes y polianiones y utilizando células A549. Como superficie control se utilizaron cubreobjetos de vidrio, donde las células presentan una buena adhesión. Las áreas de adhesión fueron normalizadas respecto al área celular promedio obtenida sobre vidrio, $870 \mu\text{m}^2$.

En la Figura 4.4 se pueden observar imágenes representativas de células A549, 48 horas post siembra sobre vidrio y todas las combinaciones de polielectrolitos estudiadas. Las células adheridas sobre vidrio están extendidas, presentan las características morfológicas típicas asociadas con su linaje epitelial, están intimamente unidas y presentan una fuerte tendencia a formar grupos de células o colonias. Se puede observar que la adhesión sobre las distintas combinaciones de MPEs es en general más pobre que en vidrio. Las células tienen áreas más pequeñas, variando la morfología desde células bien redondeadas a células estiradas con forma de huso, y presentan poca tendencia a formar colonias o grupos.

Una análisis más cuantitativo de la adhesión celular se realizó a través de las áreas celulares promedio normalizadas (Figura 4.5) y parámetros morfológicos como la redondez y relación de aspecto (Figura 4.6).

Las áreas celulares normalizadas dependen de la composición de las películas y salvo casos particulares, siempre se obtuvieron áreas de adhesión promedio inferiores a las obtenidas sobre vidrio. Cambiando la naturaleza del polianión para cada policación se obtuvieron MPEs con distintas propiedades adhesivas. Para las multicapas fabricadas con PLL como policación, el área promedio normalizada fue de 0.4 utilizando Alg, HA o Dex como polianiones y de 0.7 utilizando PAA. El caso de las películas de $(Chi/HA)_7Chi$, que presentan áreas mayores a las obtenidas para el vidrio, será analizado más adelante. Las combinaciones de Chi con Alg, Dex y PAA presentan áreas normalizadas promedio en el rango 0.35 - 0.75, siendo por tanto menores que en vidrio. De modo similar, las películas ensambladas con PEI y HA, Alg, Dex y PAA presentan valores promedio de áreas celulares menores a las obtenidas en vidrio, siendo el área normalizada alrededor de 0.75 para los últimos tres polianiones y de 0.4 para HA. Para el caso de las MPEs fabricadas con PAH como policación, las áreas normalizadas promedio con los diversos polianiones también fueron menores que las observadas sobre vidrio. En este caso, los valores fueron menores a 0.4 cuando el polianión utilizado fue HA o PAA y en el intervalo de 0.4 - 0.7 para Alg o Dex. Por otro lado, la expansión de las células sobre la superficie de las películas se vió favorecida sobre las MPEs fabricadas con PSS y todos los policationes estudiados excepto PDADMAC. Para el caso de

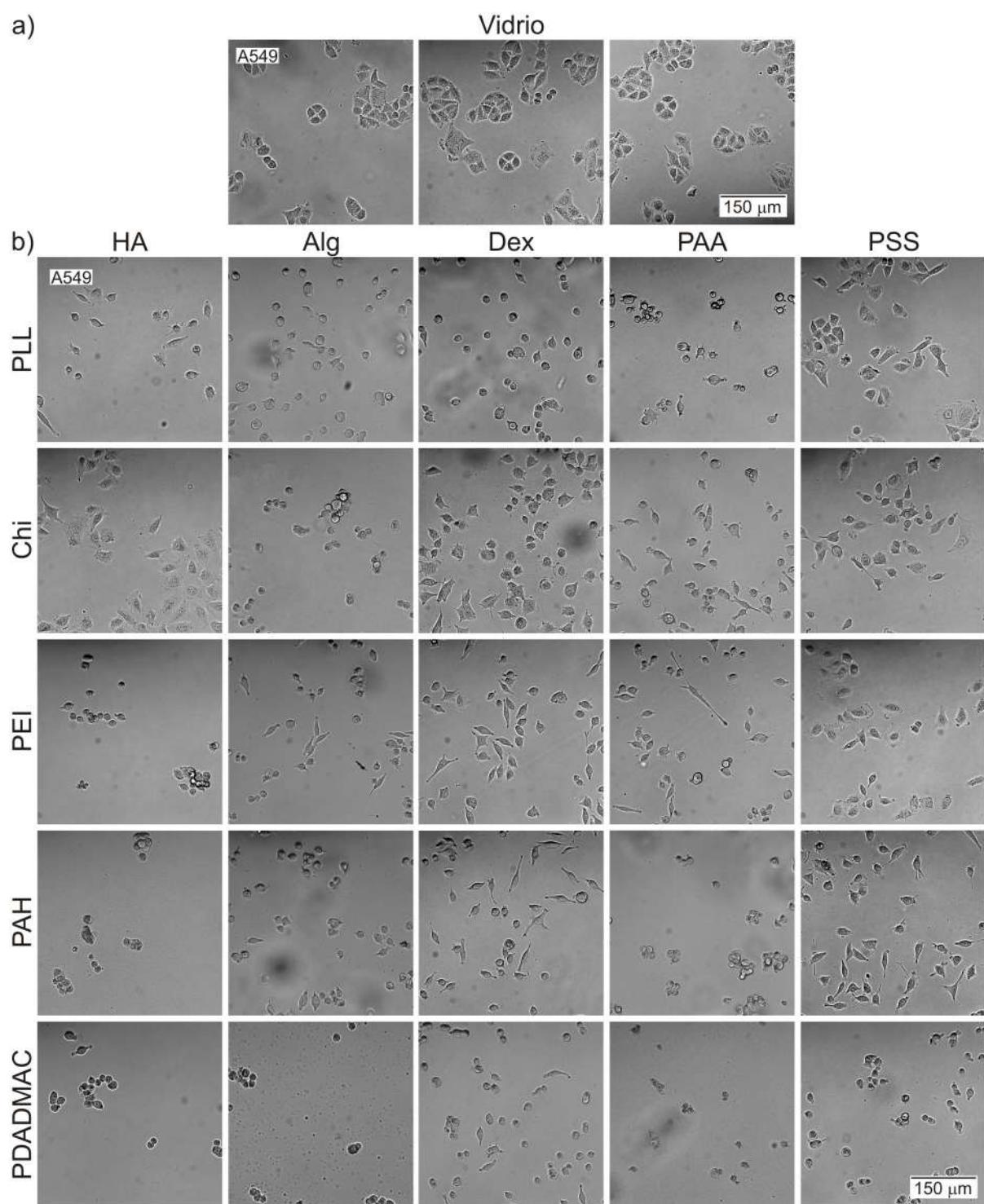


Figura 4.4: Imágenes de contraste de fase de células A549 48 horas después de la siembra sobre vidrio a) y MPEs de distinta composición b). En las filas se indican los policationes y en las columnas los polianiones. Todas las películas poseen 15 capas, correspondiendo la primera y la última siempre al policación.

películas de (PAH/PSS)₇PAH el área normalizada fue de 0.8, un poco inferior al del vidrio, mientras que las áreas de las células sembradas sobre (PLL/PSS)₇PLL y (Chi/PSS)₇Chi fue similar a las de las células sembradas sobre vidrio. Además, el área celular normalizada sobre (PEI/PSS)₇PEI fue de 1.2, resultando estadísticamente superior a la del vidrio. Finalmente, las MPEs ensambladas con PDADMAC como polication mostraron todas una pobre adhesión celular independientemente del polianión, con un área normalizada cercana a 0.4.

Los parámetros morfológicos de redondez y relación de aspecto se muestran en la figura 4.6. La redondez y relación de aspecto cercanas a 1 indican que las células tienen formas redondeadas, no presentan filopodios largos y en general tienen mala adhesión. Los valores relativamente altos de estos parámetros (2 – 3), indican células con morfología ahusada o, en el caso de la redondez, puede tratarse de células redondeadas que presentan contornos rugosos o muchos filopodios pequeños, lo que sugiere que las células están estresadas debido a una pobre interacción con el substrato. Sin embargo, en la mayoría de los casos el comportamiento de la relación de aspecto y de la redondez coincide.

La relación de aspecto y redondez promedio de las células dependió de la composición de las multicapas y se comparó con los valores obtenidos para el vidrio utilizando el análisis de varianza de Fisher con $p = 0.05$. Sobre las multicapas fabricadas con PLL/Alg, PLL/Dex, PAH/PAA y las ensambladas con PDADMAC como polication y todos los polianiones excepto PSS, las células tuvieron valores promedio de redondez y de relación de aspecto menores que los encontrados para vidrio, para el que se observaron valores de 1.5 y 1.6 respectivamente. Los valores más bajos de aspecto y redondez se encontraron para las multicapas ensambladas utilizando PDADMAC, y estuvieron en el rango 1.1 – 1.4. Estos parámetros morfológicos son coherentes con los valores pequeños del área de expansión celular observada para estas combinaciones de polielectrolitos. Las células sembradas sobre las películas fabricadas con PLL/HA, PEI/HA, Chi con todos los polianiones y PSS con todos los policationes probados excepto PAH presentaron valores de relación de aspecto promedio similares al encontrado para las células sembradas sobre vidrio. Sin embargo, en varias de estas MPEs la redondez no tiene exactamente el mismo comportamiento que la relación de aspecto. En las combinaciones de Chi con todos los polianiones excepto Alg y las de PSS con PLL, Chi y PEI las células presentan valores de redondez promedio mayores que sobre vidrio y relaciones de aspecto similares a las obtenidas sobre vidrio, lo que indica que las células sembradas sobre estas películas presentan un citoplasma más rugoso o tienen varios filopodios. El hecho de que las células sembradas sobre los MPEs tengan valores de relación de aspecto promedio similares a los encontrados para el vidrio puede correlacionarse con una regular o buena adhesión. De hecho para las películas ensambladas con PAH, el área celular promedio mostró la misma tendencia que la relación de aspecto promedio. Las células sembradas sobre multicapas de PEI/Alg, PEI/Dex, PEI/PAA, PAH/Alg, PAH/Dex y PAH/PSS presentan valores de relación de aspecto y redondez promedio en el rango de 1.7 – 2.7, siendo mayores que los encontrados para el vidrio.

4.2.3. Proliferación celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT 24, 48 y 72 horas luego de la siembra sobre las diferentes MPEs estudiadas en este trabajo (Figura 4.7). La información mostró que la viabilidad celular de las células sembradas sobre todas las MPEs fue menor que para aquellas sembradas sobre vidrio. Para las MPEs, la viabilidad dependió de la composición particular de cada película. Además, el análisis de la viabilidad a distintos tiempos reveló 3 tipos de comportamiento:

- 1) El número de células aumenta aproximadamente en forma exponencial con el tiempo.

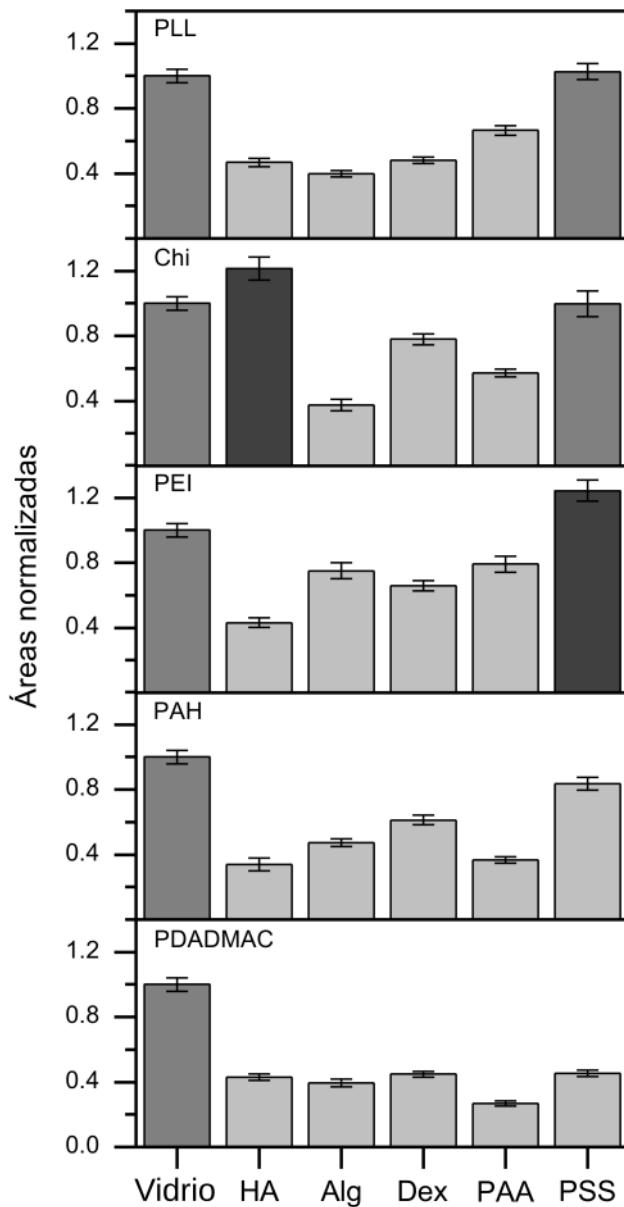


Figura 4.5: Áreas promedio normalizadas de células A549 adheridas sobre multicapas de polielectrolitos de distintas composiciones. Cada gráfico corresponde a un policación específico con diferentes polianiones, resultando una película de tipo (Policación/Polianión)₇Policación. Se analizaron al menos 100 células de diferentes posiciones del substrato para la evaluación del área de expansión celular promedio sobre cada película. Para cada MPE las áreas resultaron ser menores (gris claro), iguales (gris) o mayores (gris oscuro) respecto a las medidas en vidrio según un ANOVA con test de Fisher de 0.05 de confidencia.

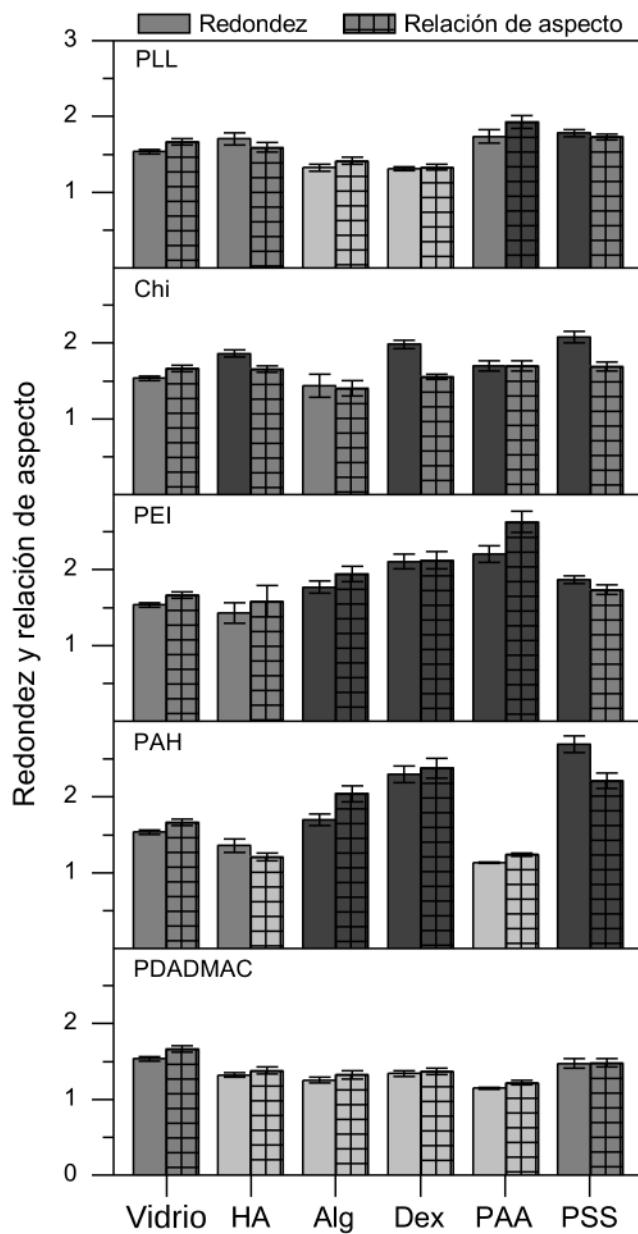


Figura 4.6: Características morfológicas de células A549 adheridas sobre multicapas de polielectrolitos de distintas composiciones. Cada gráfico corresponde a un polímero específico con diferentes polianiones, de estructura (Polímero/Polianión)₇Polímero. Se muestran la redondez y la relación de aspecto promedio. Se consideraron en el análisis al menos 100 células de diferentes posiciones del substrato para la evaluación de las características morfológicas de las células sobre cada película. Para cada MPE la redondez o relación de aspecto de las células fueron menores (gris claro), iguales (gris) o mayores (gris oscuro) respecto a las medidas en vidrio según un ANOVA y test de Fisher con $p = 0.05$.

Este fue el caso de las células sembradas sobre vidrio, PLL/PAA, Chi/HA, Chi/PAA, PEI/PAA y las MPEs ensambladas con Alg y Dex como polianiones y todos los policationes ensayados excepto las películas de PDADMAC/Alg, Chi/Alg y Chi/Dex.

- II) El número de células aumenta linealmente con el tiempo. Esto fue observado para las células sembradas sobre las MPEs ensambladas con PSS como polianión independientemente del polication, Chi/Alg, Chi/Dex, PAH/PAA y PDADMAC/Alg.
- III) La tasa de proliferación celular disminuye con el tiempo. Este comportamiento se observó para las células sembradas sobre PLL/HA, PAH/HA y las multicapas ensambladas con PDADMAC/HA y PDADMAC/PSS.

A parte de los comportamientos mencionados, la viabilidad de las células sobre películas de PEI/HA y PDADMAC/PAA fue escasa o nula.

4.2.4. Multicapas de Chi/HA

Dentro de las combinaciones de polielectrolitos utilizadas para obtener las MPEs ensayadas hay 4 que presentaron áreas celulares promedio similares (PLL/PSS, Chi/PSS) o mayores (Chi/HA, PEI/PSS) a las encontradas sobre vidrio. La multicapa de Chi/HA merece especial atención porque es la única ensamblada sólo con polielectrolitos naturales que presentó una buena adhesión. Sin embargo, en literatura se puede encontrar que las MPEs fabricadas con Chi/HA presentan baja adhesión celular debido a sus pobres propiedades mecánicas [4.14] por lo que deben ser tratadas con agentes entrecruzantes para aumentar su rigidez [4.7] o deben ser funcionalizadas con RGD para mejorar sus propiedades adhesivas [4.15].

El estudio del ensamblado de la multicapa de Chi/HA (Figura 4.8a) mostró una deposición escasa o nula a medida que se alternaban los polielectrolitos, con ΔF alrededor de 10-15 veces menores que las observadas para el ensamblado de cualquiera de las combinaciones mostradas en las figuras 4.1 y 4.2. La imagen de AFM de la multicapa (Chi/HA)₇HA (Figura 4.8b) permite distinguir fibras de polímero dispersas y separadas, que dejan la superficie del vidrio expuesta, lo que es coherente con una escasa cantidad de material depositado. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la carga juega un papel importante en el ensamblado capa por capa, por lo que es necesario que ambos polielectrolitos estén cargados para que puedan interactuar. El quitosano está disuelto en buffer Acetato a pH = 5 y se deposita efectivamente sobre vidrio formando la primera capa con la mayor parte de sus grupos cargados positivamente (su pKa ~ 6) [4.16]. Luego de lavar y agregar la solución de HA en buffer HEPES a pH = 7.4, sólo una pequeña parte de los grupos permanecen cargados positivamente, por lo que la cantidad de HA que puede depositarse es baja. Además, este cambio de pH hace que el escaso material depositado sea inestable y propenso a desarmarse en cada lavado o cambio de solución de polielectrolito.

La adhesión celular sobre (Chi/HA)₇Chi fue buena no por las propiedades de la superficie generada sino porque en estas condiciones no se forma una película uniforme y las células son capaces de interactuar con el substrato de vidrio (Figuras 4.4 y 4.5). Un efecto similar se informó para condrocitos sembrados sobre multicapas de Chi/HA ensambladas a pH = 5, donde la adhesión disminuyó al aumentar el número de capas y lograr una cobertura uniforme [4.17]. Esto pone de manifiesto la importancia de estudiar el grado de cobertura cuando se trabaja con revestimientos de superficies.

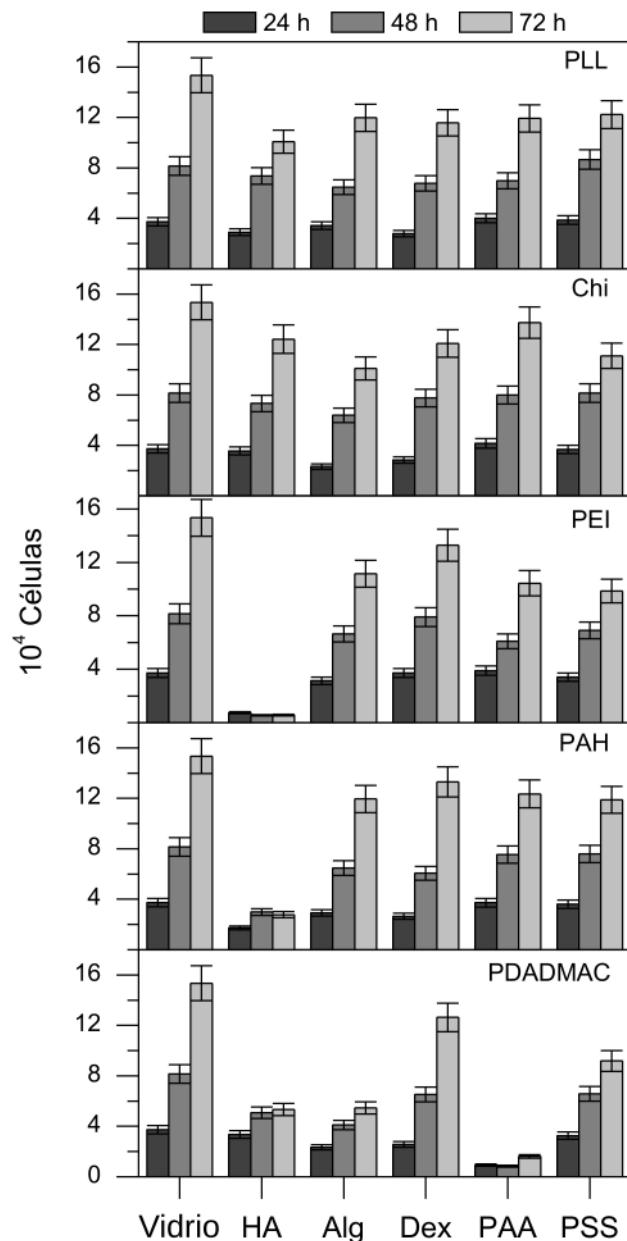


Figura 4.7: Proliferación celular de las células A549 sembradas sobre distintos MPes. El número de células fue medido a las 24, 48 y 72 horas luego de la siembra, utilizando el ensayo de MTT. El ensayo se hizo por triplicado. Se incluye el error estándar del promedio del número de células.

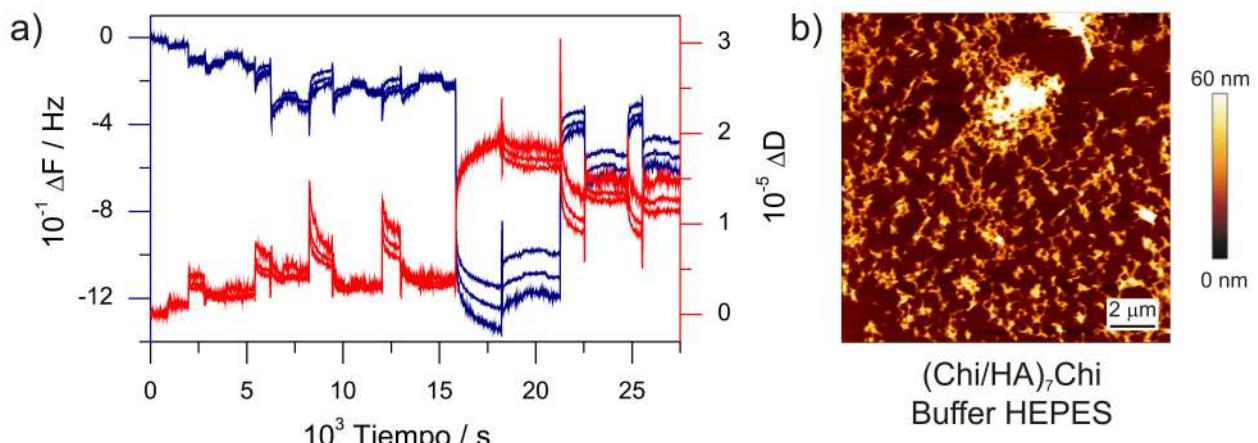


Figura 4.8: a) Cambio de frecuencia y de disipación en función del tiempo para el 3.^o, 5.^o y 7.^o armónicos durante el ensamblado de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$. b) Imagen de AFM de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ luego de dejar secar en aire.

4.2.5. “Dibloques” de multicapas de polielectrolitos: caracterización de las películas y adhesión celular

Todas las combinaciones de polielectrolitos biológicos resultaron en películas con áreas celulares menores que las observadas sobre películas ensambladas con polielectrolitos sintéticos, sobre todos las MPEs ensambladas con PSS. Con el objetivo de aumentar las propiedades adhesivas de las películas naturales y biocompatibles, se ensamblaron multicapas con dos bloques de combinaciones distintas de polielectrolitos (Figura 4.9). El primer bloque se ensambla con PSS y PLL, al contener PSS le confiere a la película en “dibloque” resultante una mayor rigidez y se espera que mejore la adhesión celular. El bloque superior contiene una combinación de polielectrolitos de origen natural y que presentan una adhesión moderada pero una tasa de proliferación celular aceptable, como PLL/Alg o PLL/Dex. En la figura 4.9 se muestra un esquema de la multicapa en “dibloque” constituida por un bloque inferior de PLL ensamblado con PSS seguido de un bloque superior de PLL ensamblado con Alg o Dex.

El ensamblado de los dos bloques se siguió por QCM-D, con el primer bloque formado por 6 bicapas de (PLL/PSS) seguido del ensamblado del segundo bloque con 4 bicapas de (PLL/Alg) (Figura 4.13 a,b) o 4 bicapas de (PLL/Dex) (Fig. 4.14 a,b). Los datos indican un crecimiento continuo para ambos tipos de multicapas en “dibloque”. Las curvas muestran un crecimiento supralineal para el bloque de (PLL/PSS) hasta las 12 capas, y luego un crecimiento lineal para las capas siguientes del bloque (PLL/Alg). Esto contrasta con la MPE de PLL/Alg ensamblada sin el bloque inicial (Figura 4.1) que muestra un crecimiento supralineal para todas las capas. De este modo, el bloque de PLL/PSS parece afectar el posterior crecimiento del bloque de PLL/Alg. Este hecho también puede inferirse de las imágenes de AFM. En la figura 4.10c puede apreciarse que la multicapa (PLL/PSS)₆ es bastante lisa, y esta característica se mantiene luego del ensamblado del bloque de PLL/Alg (figura 4.10d). La topografía del PLL/Alg en el “dibloque” es bastante diferente de la observada en la película de (PLL/Alg)₇PLL (Figura 4.3 a). Mientras que la superficie del “dibloque” es relativamente homogénea con pequeñas fibras de 0.2-0.5 μm de largo y 30 nm de altura, la superficie de la película de (PLL/Alg)₇PLL es heterogénea y está cubierta por estructuras fibrilares de distintos tamaños, de 0.5 a 6 μm de largo y de 60 a 120 nm de altura. Esto revela la influencia del bloque inferior de PLL/PSS en la morfología del bloque superior de

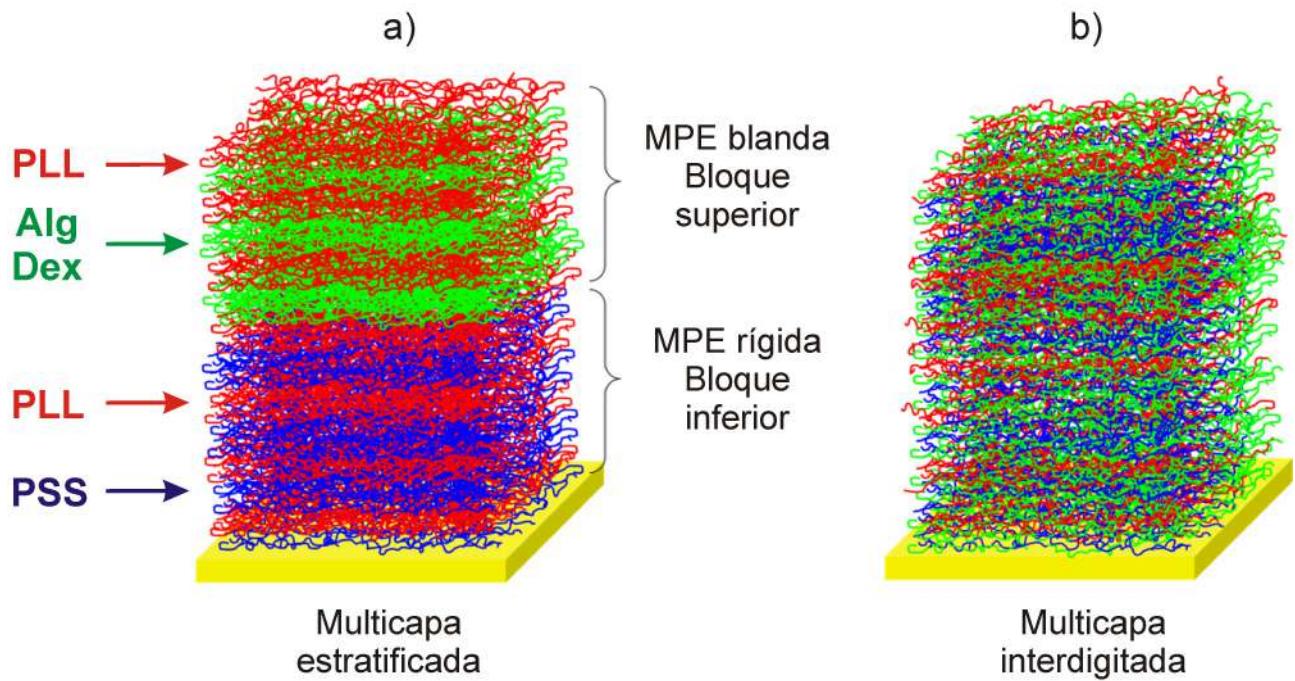


Figura 4.9: Esquema de la multicapa de polielectrolitos en “dibloque”. Está formado por un bloque inferior de $(PLL/PSS)_n$ y un bloque superior de $(PLL/Alg)_n$ o $(PLL/Dex)_n$ (a). Esquema que muestra la posible interdigitación de los distintos polielectrolitos que forman la película en “dibloque” (b).

PLL/Alg.

El “dibloque” que contiene PLL/Dex como bloque superior puede analizarse de un modo similar. En este caso el crecimiento del PLL/Dex puro no es tan fácil de clasificar como el del PLL/Alg, ya que oscila entre lineal y supralineal (Figura 4.1). Sin embargo, al depositarse luego de un primer bloque de PLL/PSS se observa un crecimiento lineal (Figura 4.11 a,b). Para el caso de las imágenes de AFM (Figura 4.11 c,d) se obtienen superficies bastante más rugosas luego de depositar el PLL/Dex sobre el bloque inferior de PLL/PSS que lo que se observaba para el caso del PLL/Alg.

Adhesión celular sobre las MPEs en “dibloque”

La adhesión de células A549 sobre multicapas de $(PLL/Alg)_n$ y $(PLL/Dex)_n$ mejoró considerablemente cuando los polielectrolitos se ensamblaron sobre un primer bloque de $(PLL/PSS)_n$, formando una estructura en “dibloque” (Figura 4.12). Las imágenes de microscopía de contraste de fase muestran que la adhesión mejora cuando se ensamblan 1, 2 o 4 bicapas del segundo bloque, aunque las células presentan un área promedio mayor cuando $n = 2$.

Las tinciones de fluorescencia de la F-actina muestran que las células sembradas sobre las MPEs en “dibloque” presentan un citoesqueleto celular organizado con fibras de actina largas que atraviesan todo el citoplasma celular al igual que las células sembradas sobre vidrio, y en contraste con las células sembradas sobre MPEs de $(PLL/Alg)_7$ o $(PLL/Dex)_7$, que presentan una extensión menor del citoesqueleto y adhesiones focales difusas (Figuras 4.13 y 4.14).

El área promedio de las células A549 sembradas sobre $(PLL/Alg)_7$ o $(PLL/Dex)_7$

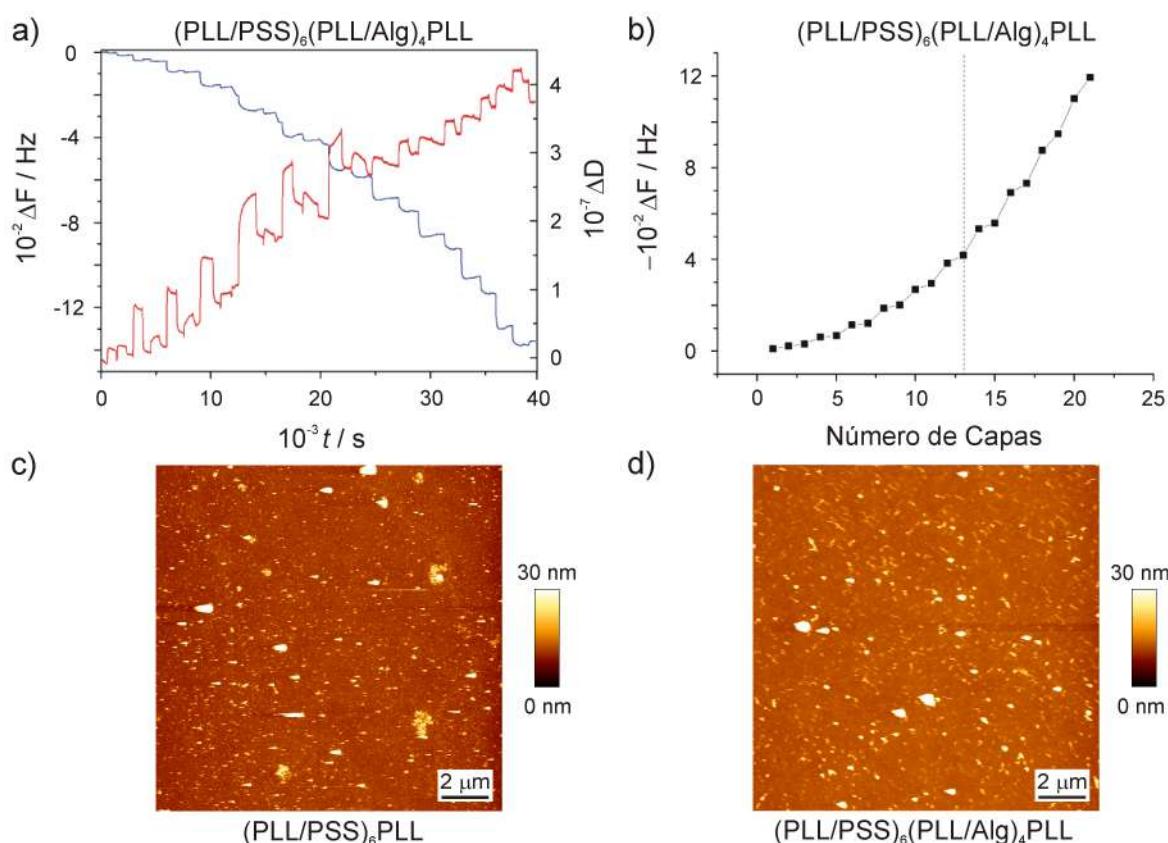


Figura 4.10: a) Cambio de frecuencia (curva azul) y de disipación (curva roja) del 3.^o armónico en función del tiempo para el ensamblado de multicapas de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6(\text{PLL}/\text{Alg})_4\text{PLL}$. b) Valores absolutos de ΔF en función del número de capas calculados a partir de la curva azul mostrada en a). c) Imágenes de AFM en seco de multicapas de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6\text{PLL}$ (c) y $(\text{PLL}/\text{PSS})_6(\text{PLL}/\text{Alg})_4\text{PLL}$ (d).

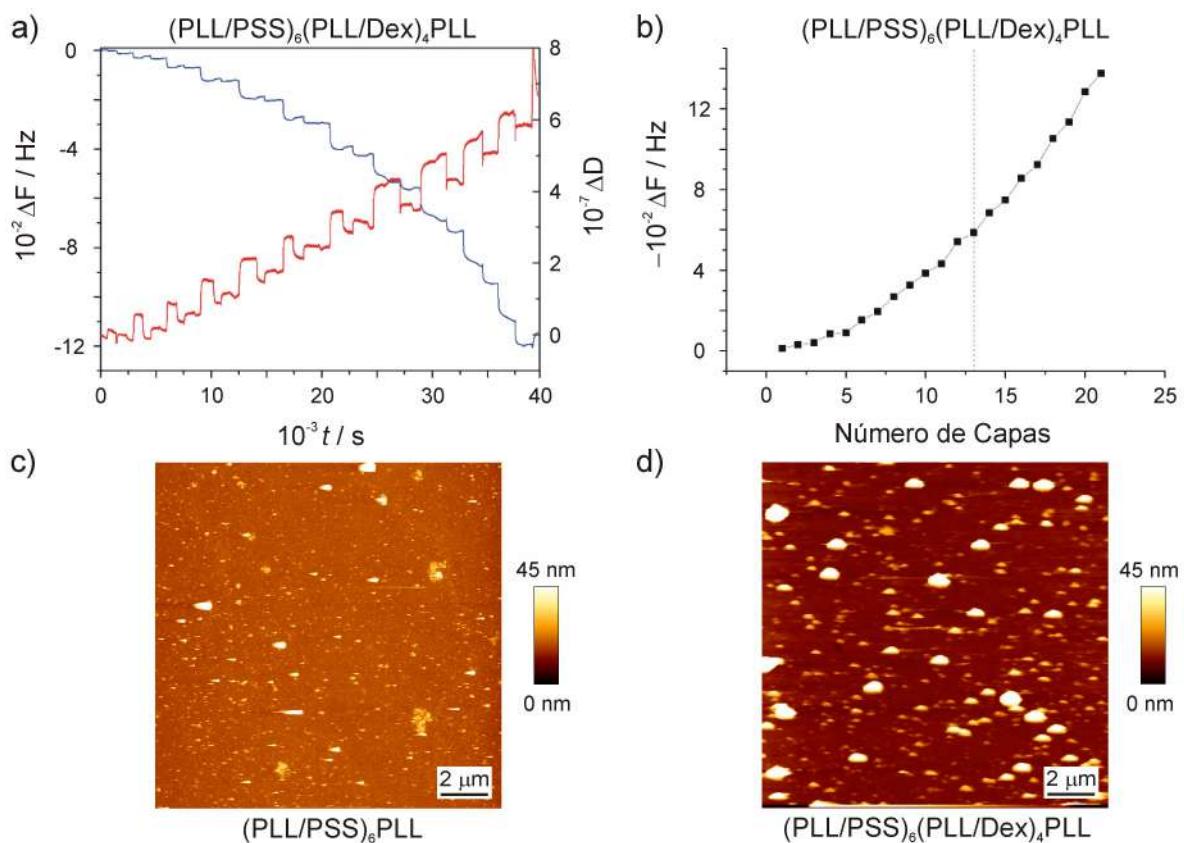


Figura 4.11: a) Cambio de frecuencia (curva azul) y de disipación (curva roja) del 3.^o armónico en función del tiempo para el ensamblado de multicapas de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6(\text{PLL}/\text{Dex})_4\text{PLL}$. b) Valores absolutos de ΔF en función del número de capas calculados a partir de la curva azul mostrada en a). c) Imágenes de AFM en seco de multicapas de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6\text{PLL}$ (c) y $(\text{PLL}/\text{PSS})_6(\text{PLL}/\text{Dex})_4\text{PLL}$ (d).

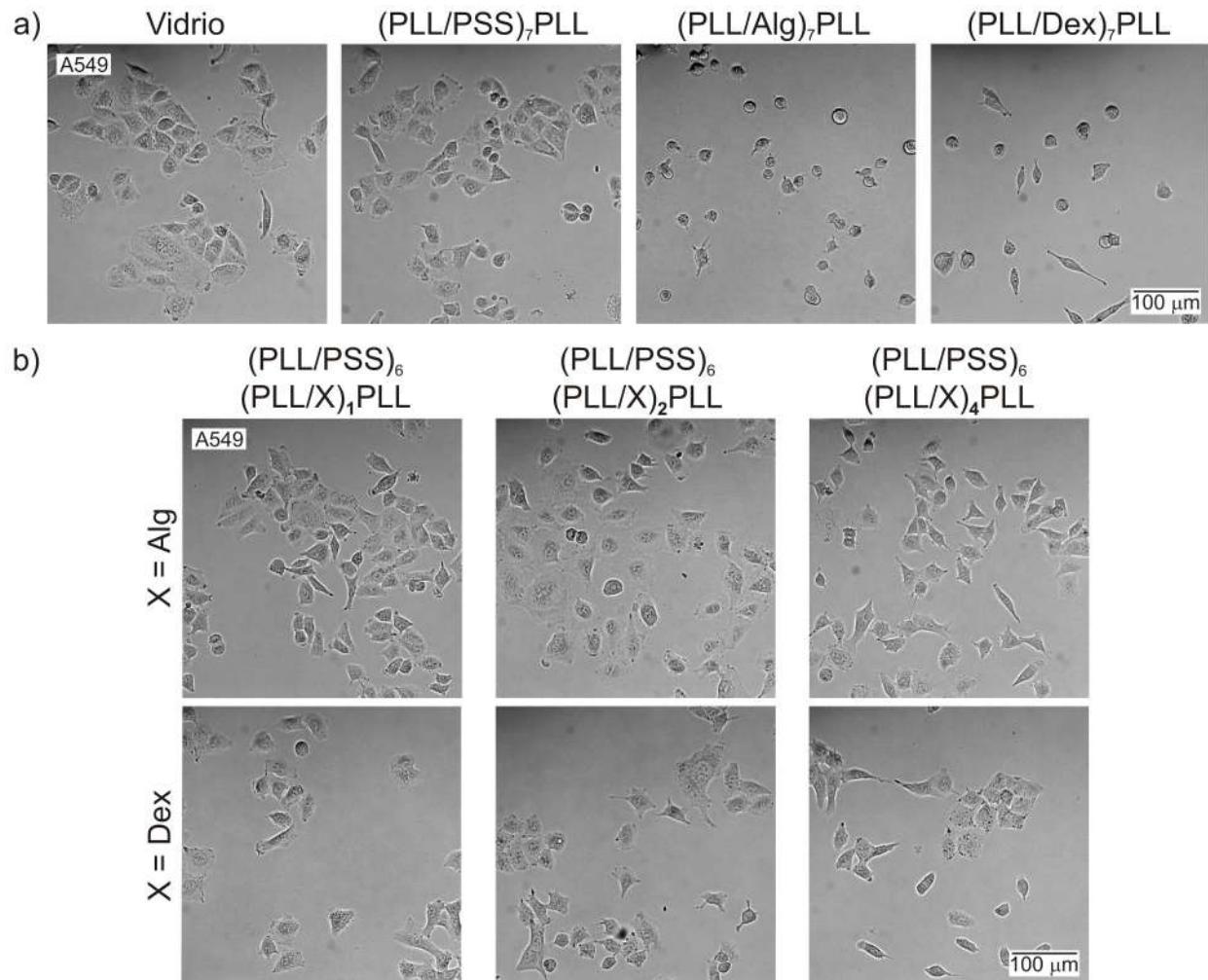


Figura 4.12: Imágenes de células A549 adheridas sobre vidrio, MPEs mono-bloque de $(PLL/PSS)_7PLL$, $(PLL/Alg)_7PLL$ y $(PLL/Dex)_7PLL$, (a) y sobre MPEs di-bloque $(PLL/PSS)_6(PLL/X)_nPLL$ ($X = Alg$, Dex; $n = 1$, 2 o 4). (b) Las imágenes fueron tomadas 48 horas luego de la siembra.

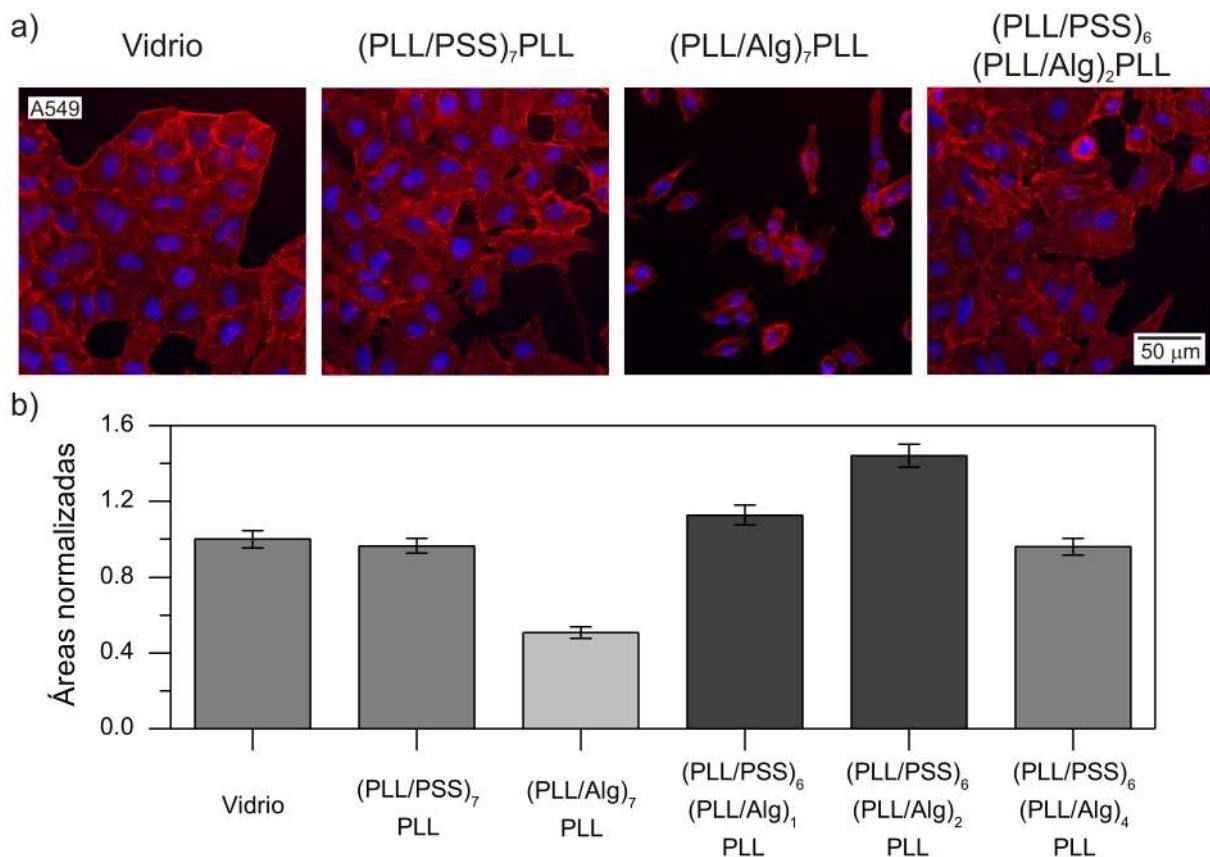


Figura 4.13: Imágenes de fluorescencia de actina (rojo) y ADN (azul) de células A549. La tinción se realizó 72 horas luego de la siembra sobre los substratos indicados en la figura (a). Áreas normalizadas promedio de las células, 48 horas después de la siembra. Para cada substrato las áreas de las células fueron menores (gris claro), iguales (gris) o mayores (gris oscuro) respecto a las medidas en vidrio según un ANOVA con test de Fisher de 0.05 de confiabilidad.

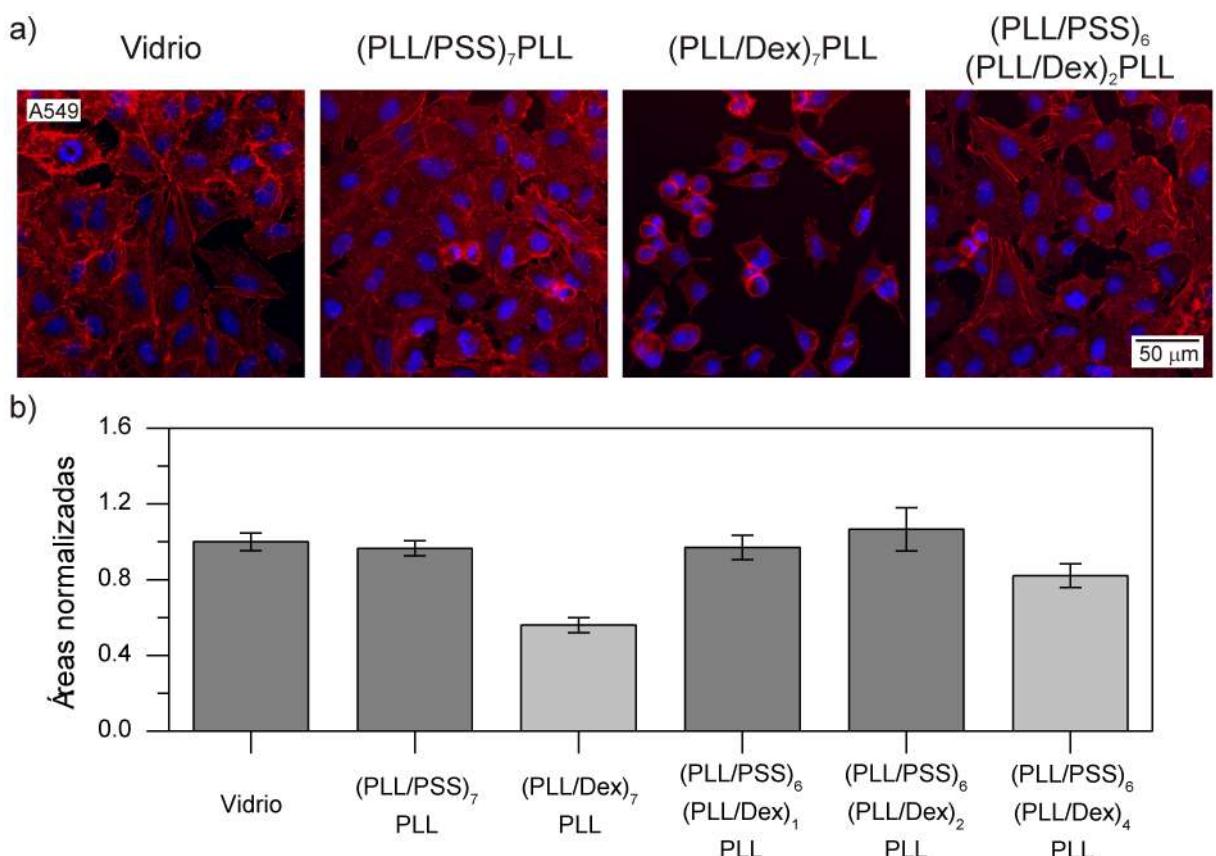


Figura 4.14: Imágenes de fluorescencia de actina (rojo) y ADN (azul) de células A549. La tinción se realizó 72 horas luego de la siembra sobre los substratos indicados en la figura (a). Áreas normalizadas promedio de las células, 48 horas después de la siembra. Para cada substrato las áreas de las células fueron menores (gris claro) o iguales (gris) respecto a las medidas en vidrio según un ANOVA con test de Fisher de 0.05 de confidencia.

fue alrededor de 0.4 veces la obtenida para células sembradas sobre vidrio, en tanto que las células sembradas sobre un MPE en “dibloque” con $n = 1, 2$ alcanzaron un área promedio mayor para el bloque superior de (PLL/Alg) o similar para el bloque superior (PLL/Dex), que la obtenida sobre vidrio o (PLL/PSS)₇PLL (Figuras 4.12, 4.13, 4.14). Con $n = 4$ el área celular promedio disminuyó a un valor similar al obtenido sobre vidrio para las multicapas cuyo bloque superior estaba compuesto por (PLL/Alg) y a valores un poco inferiores respecto al obtenido sobre vidrio para aquellas compuestas por (PLL/Dex).

Las diferencias en la adhesión celular que producen los distintos números de bicapas en el bloque superior también pueden observarse en las imágenes de fluorescencia del citoesqueleto de actina y de la vinculina que forma parte de las adhesiones focales (Figura 4.15). Las células sembradas sobre multicapas de (PSS/PLL)₆(PLL/Alg)_nPLL (con $n = 1, 2$ o 4) presentan adhesiones focales maduras (puntos verdes) al igual que lo hacen sobre vidrio y películas de (PSS/PLL)₇PLL, en contraste con las células sembradas sobre (PLL/Alg)₇PLL, las que apenas exhiben adhesiones focales de una manera difusa. Cabe destacar que las células adheridas sobre (PSS/PLL)₆(PLL/Alg)₂PLL muestran fibras de actina más largas distribuidas a lo largo del citoplasma, áreas celulares mayores y adhesiones focales más grandes que las células adheridas sobre (PSS/PLL)₆(PLL/Alg)₄PLL.

Para analizar el efecto del espesor de la película sobre la adhesión celular y poder compararlo con lo observado en las multicapas en “dibloque”, se analizó el área celular promedio sobre multicapas de (PLL/Alg)_nPLL con n entre 0 y 7 (Figura 4.16). La deposición de sólo una capa de PLL ($n = 0$) presenta áreas promedio de adhesión celular 1.4 veces más grandes que en vidrio, lo que pone de manifiesto la habilidad del PLL para promover la adhesión celular sobre plástico y vidrio [4.17]. Una multicapa con $n = 1$ disminuye el área promedio de adhesión celular a un 50 % de la encontrada sobre vidrio, mientras que con 3 - 4 bicapas de PLL/Alg depositadas sobre vidrio se alcanza un valor del área normalizada constante alrededor de 0.4. Cabe destacar que el ensamblado de 3 bicapas de (PLL/Alg) seguido con la QCM-D produce un $-\Delta F \sim 120$ Hz (Figura 4.1), aproximadamente el mismo cambio de frecuencia que produce el ensamblado de una sola capa de (PLL/Alg) sobre un bloque de (PSS/PLL)₆ (Figura 4.10). Teniendo presente este comportamiento, se puede indicar que a igualdad de masa depositada la diferencia observada sobre la adhesión celular observada para las células sobre MPEs en “dibloque” comparadas con las obtenidas sobre MPEs en “monobloque” es significativa. El depósito de 1-2 bicapas de (PLL/Alg) produce una disminución abrupta o una mejora en la adhesión celular cuando son depositadas sobre un substrato de vidrio o sobre un bloque de (PSS/PLL)₆ (Figuras 4.16 y 4.13), respectivamente.

Un comportamiento similar al descripto para las células A549 se encontró para la línea celular C2C12 (Figura 4.17). Una mejora en la adhesión celular se observó cuando las células fueron sembradas sobre un “dibloque” de (PSS/PLL)₆(PLL/Alg)₁PLL en comparación con las áreas encontradas sobre las películas de (PSS/PLL)₇PLL o (PLL/Alg)₇PLL por separado (multicapas “monobloque”).

4.3. Discusión

4.3.1. Multicapas “monobloque” (Policatión/Polianión)₇Policatión

Los resultados de este capítulo mostraron que la adhesión y proliferación de células A549 puede ser modulada por la composición de las MPEs (Figuras 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7). La morfología y el área celular se utilizó para evaluar las características de adhesión sobre las multicapas. El área de adhesión, área de extensión del citoplasma promedio, $870 \mu\text{m}^2$, y los

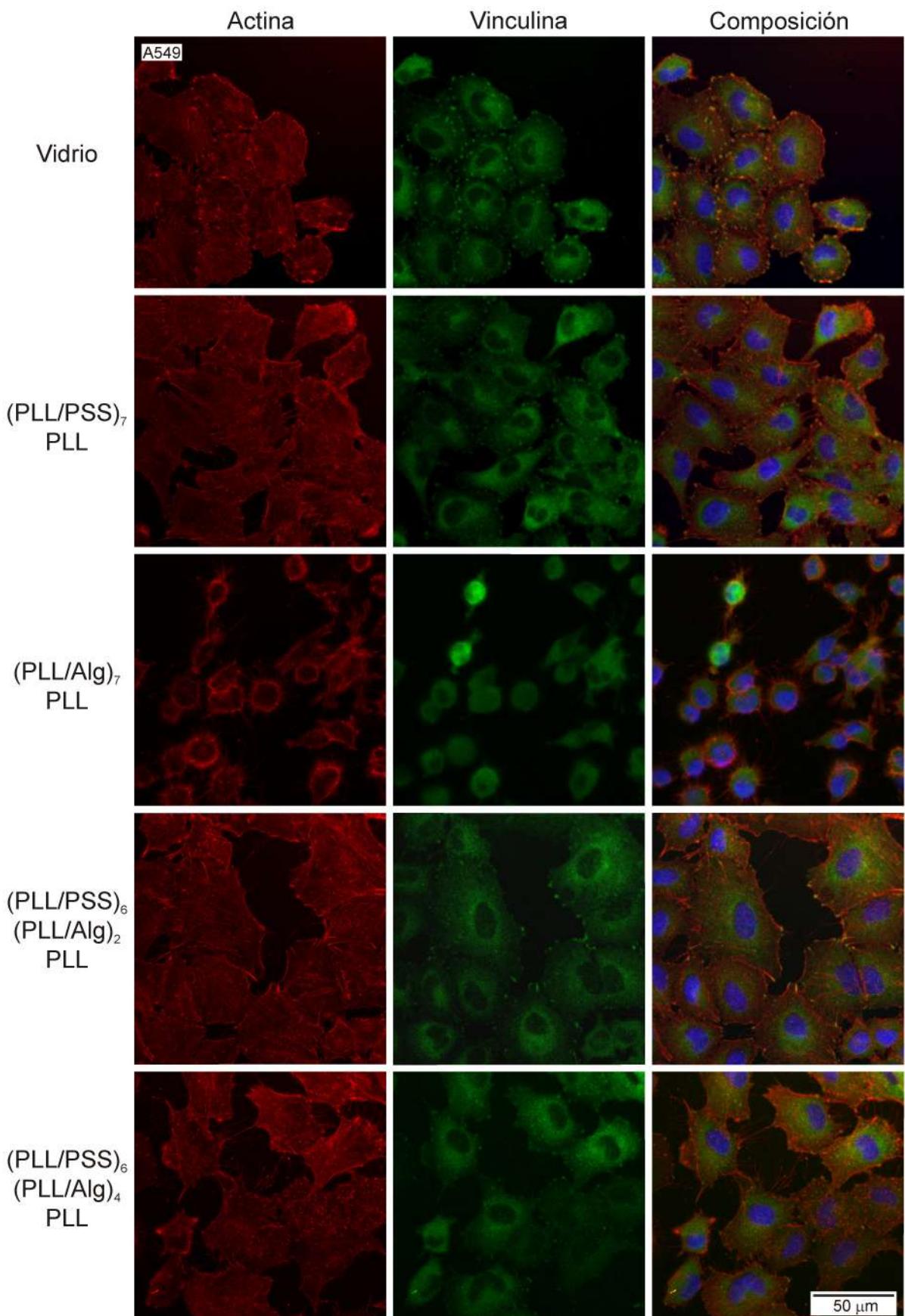


Figura 4.15: Imágenes de fluorescencia de células A549 con tinción de actina (rojo) y vinculina (verde). El núcleo también se tiñó con DAPI (azul). La tinción se realizó 72 horas después de la siembra en los substratos que se indican en la figura.

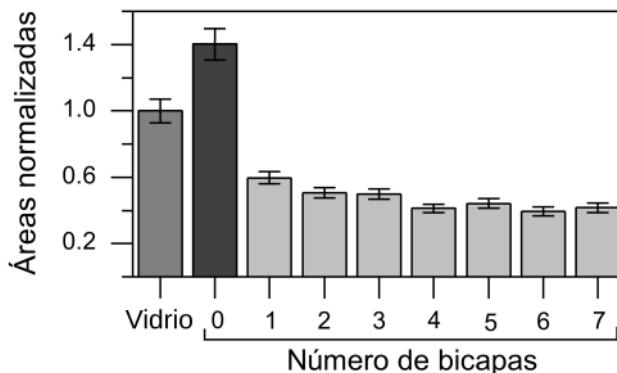


Figura 4.16: Áreas normalizadas de células A549 sembradas sobre vidrio y películas de distinto número de bicapas de $(PLL/\text{Alg})_n PLL$. Cuando $n = 0$, sólo se deposita una capa de PLL.

parámetros morfológicos (redondez y relación de aspecto) en el rango 1.5-1.6 encontrados sobre vidrio, se utilizaron como referencia para analizar los valores obtenidos para las células sembradas sobre las distintas MPEs. Entonces, valores grandes de áreas celulares promedio y parámetros morfológicos cercanos a 1.5 indican buenas propiedades de adhesión. Se demostró que estos parámetros dependen de la química de las MPEs definida por la combinación de los distintos policationes y polianiones, siendo siempre la última capa el policación (Figuras 4.5 y 4.6). Por ejemplo, las multicapas que tenían PLL como policación resultaron en superficies con poca adhesión cuando se ensamblaron con los polianiones naturales HA, Alg, Dex; el área de adhesión promedio resultó menor a la mitad del encontrado para células sembradas sobre vidrio. Estas MPEs tuvieron un crecimiento supralineal (Figura 4.1) y se espera que tengan baja rigidez [4.18–4.20]. Por ejemplo, las multicapas de PLL/HA son relativamente blandas [4.21] con un módulo de Young (E) en el rango de 3-85 kPa [4.8, 4.22, 4.23] dependiendo de las condiciones del ensamblado. En general, la adhesión sobre MPEs ensambladas con polielectrolitos naturales [4.24], tienden a inhibir la adhesión celular. Se encuentra en la literatura que las películas de $(\text{Chi}/\text{HA})_{24}$ ensambladas a $\text{pH} = 4.5$ y 150 mM de NaCl tienen un módulo de Young $E = 15$ kPa [4.14].

Las MPEs ensambladas con polianiones de origen natural y policationes sintéticos como PEI/Alg, PEI/dex y PAH/Dex presentaron una mejor adhesión celular que la descripta en el párrafo anterior. Las áreas celulares normalizadas dieron valores en el rango 0.6 - 0.8. Para el caso del PAA, su gran hidrofilicidad [4.25] podría explicar porqué las áreas de adhesión de células sembradas sobre películas ensambladas con PAA como policación fueron mayores que las observadas cuando se utilizó Alg o HA, pero permanecieron significativamente menores que sobre vidrio.

Por otro lado, las MPEs ensambladas utilizando el polianión sintético PSS mostraron buena adhesión celular, al menos en el rango de tiempo de los ensayos de este trabajo. La mayor área relativa promedio fue encontrada para las células sembradas sobre multicapas de PEI/PSS, con un valor 1.2 veces más grande que el encontrado sobre el vidrio. Los valores típicos de E para MPEs sintéticas como (PAH/PSS) están en el orden de los Gpa [4.25], y mostraron un crecimiento lineal en la masa depositada en función del tiempo o número de capas (Figura 4.2).

Es importante notar que el comportamiento descripto depende de la línea celular, y es entonces válido sólo para la línea celular A549, utilizada en los experimentos, o líneas celulares de características similares. Por ejemplo, mientras que la adhesión de ciertas líneas celulares es sensible a la rigidez del substrato, la adhesión de otras líneas parece no depender

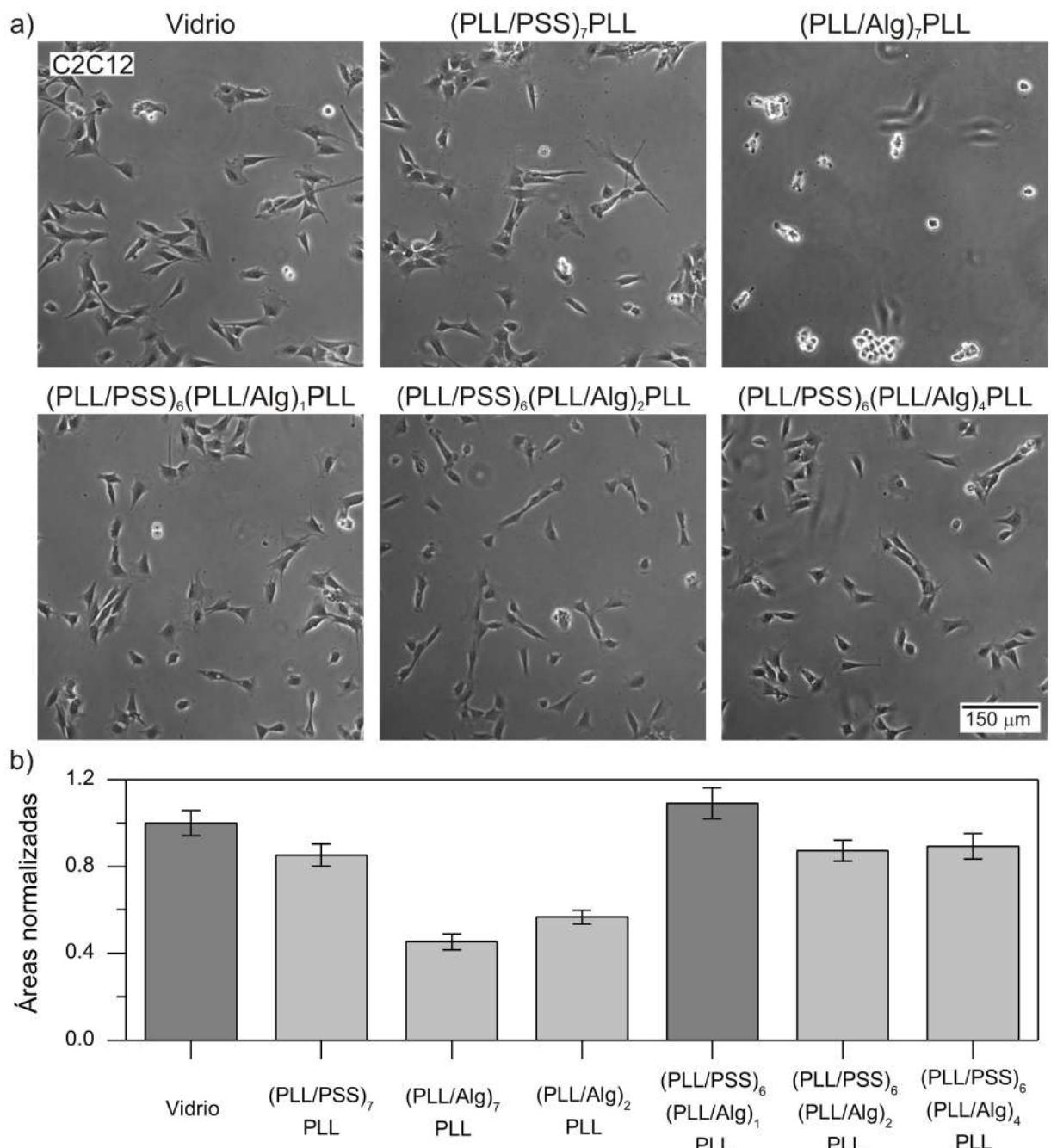


Figura 4.17: a) Imágenes de células C2C12 adheridas sobre vidrio, MPEs “monobloque” de $(PLL/PSS)_7PLL$ y $(PLL/Alg)_7PLL$ y sobre MPEs en “dibloque” $(PLL/PSS)_6(PLL/Alg)_nPLL$ ($n = 1, 2$ o 4). Las imágenes fueron tomadas 48 horas luego de la siembra. b) Áreas normalizadas promedio de las células, 48 horas después de la siembra. Para cada substrato las áreas de las células fueron menores (gris claro) o iguales (gris) respecto a las medidas en vidrio según un ANOVA con test de Fisher de 0.05 de confidencia.

de esta [4.26].

También es importante tener en mente que los experimentos de adhesión se llevaron a cabo en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB), cuyas proteínas se adsorben sobre la superficie de las MPEs y median la interacción entre las células y el substrato, y pueden bloquear parcialmente algunos grupos funcionales de los polielectrolitos capaces de interactuar con las células. A pesar de esto, se encontraron diferencias en el comportamiento de las células sembradas sobre las multicapas con diferentes policationes terminales. Entonces, es posible que la capa de proteínas tenga distintas características dependiendo de la composición de las MPEs. Al respecto, se publicó que las multicapas de (PDADMAC/PSS) terminadas en PDADMAC, aún en presencia de SFB que bloquea segmentos positivos libres del polication, presentan baja adhesión y viabilidad celular, mientras que las terminadas en PSS presentan una buena adhesión [4.27]. Los resultados obtenidos indicaron una baja adhesión y proliferación de las células A549 sobre MPEs ensambladas con PDADMAC, como era de esperarse debido a la fuerte interacción entre los segmentos libres positivos del PDADMAC y las proteínas y fosfolípidos negativos de la membrana celular, causando citotoxicidad [4.28, 4.29]. A pesar de estas características del PDADMAC, este polielectrolito se utiliza para estudiar el efecto de gradientes de hinchamiento por efecto de la absorción de agua en la multicapa polimérica [4.29].

La proliferación celular sobre las MPEs, evaluada mediante el ensayo de MTT realizado a las 24, 48 y 72 horas luego de la siembra (Figura 4.7), permite inferir acerca de la posible toxicidad de las multicapas. El número de células es proporcional a la absorbancia del MTT metabolizado. Debido al montaje experimental utilizado en estos ensayos, la proliferación celular está influenciada por la adhesión de las células ya que la falta de señales de anclaje resulta en el bloqueo de uno de los puntos de control tempranos del ciclo celular [4.30].

Se encontró que para varios tipos de células y diversos substratos la proliferación es óptima para fuerzas de adhesión intermedias, en tanto que las células permanecen en un estado quiescente cuando la capacidad de adhesión es muy alta [4.31]. El número de células sembradas sobre las MPEs ensambladas con policationes y polianiones naturales, excepto PLL/HA, exhibió un crecimiento exponencial, aunque las áreas de adhesión, fueron menores que sobre las MPEs ensambladas con algunos polianiones sintéticos. Por otro lado, la tasa de proliferación fue constante cuando las células se sembraron sobre MPEs ensambladas con PSS y todos los policationes estudiados. La adhesión sobre estas multicapas fabricadas con PSS fue buena excepto cuando el polication fue PDADMAC. Con PDADMAC se obtuvieron películas con mala adhesión y crecimiento sublineal del número de células en función del tiempo. Las cadenas positivas de PDADMAC, aún luego de la adsorción de proteínas del suero, parecen inhibir la proliferación celular, especialmente en las multicapas ensambladas con HA, Alg y PAA [4.28]. En resumen, un cambio en la composición de las multicapas afectó la adhesión y la proliferación celular de modo diferente.

Los datos discutidos indican la dependencia de las funciones celulares, adhesión y proliferación con la composición de la película. Esta última determina el tipo de crecimiento y las propiedades físicas del substrato, como la rigidez y el carácter hidrofílico que las células pueden sentir. Las MPEs más biocompatibles, obtenidas mediante la combinación de policationes naturales PLL o Chi con cualquiera de los polianiones naturales HA, Alg, Dex, resultaron superficies en donde las células se expandieron menos que sobre vidrio. Las MPEs obtenidas mediante el ensamblado de PLL o PEI con PSS resultaron en superficies más adherentes para las células A549, acercándose al comportamiento observado sobre vidrio. Sin embargo, el número de células aumentó a una tasa constante más que con un régimen exponencial. Estos resultados indican que la composición de las MPEs es importante para ajustar las funciones celulares adecuadamente, y que podrían ser utilizadas para diseñar materiales

con aplicaciones particulares.

4.3.2. “Dibloques” de multicapas de polielectrolitos

Resulta de interés controlar la composición de las MPEs para generar materiales biocompatibles con propiedades adhesivas bien controladas. Estos biomateriales pueden tener posibles aplicaciones para el diseño de transportadores de drogas con objetivos específicos, para la ingeniería de tejidos o para asistir en el proceso de sanación de heridas. Los resultados obtenidos para MPEs formados por combinación de un policatión y un polianión, mostraron que las multicapas a base de PSS tienen muy buenas propiedades adhesivas. Por este motivo, para mejorar las propiedades adhesivas de las multicapas biocompatibles a base de (PLL/Alg) o (PLL/Dex), se decidió cambiar la composición interna de estas MPEs incluyendo al PSS en las primeras capas de la película sin alterar la composición química de las capas externas, formada por polielectrolitos naturales biocompatibles.

Se prepararon MPEs con un bloque inicial de multicapas ensambladas con PSS como polianión y PLL como policatión. Sobre este bloque, se ensambló un número variable de capas de (PLL/Alg) o (PLL/Dex) como bloque superior. De esta manera se asegura que la superficie de la película permanezca biocompatible. La combinación de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6$ con $(\text{PLL}/\text{Alg})_n$ o $(\text{PLL}/\text{Dex})_n$ formando un sistema en “dibloque” permitió aumentar la adhesión celular en comparación con los substratos cubiertos con el mismo número de capas de (PLL/Alg) o (PLL/Dex) que los sistemas en “dibloque”. Además, las MPEs en “dibloque” mostraron áreas de adhesión mayores cuando $n = 2$, que para $n = 1$ o $n = 4$ (Figuras 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 y 4.17).

Las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 4.15) de las células sembradas sobre películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ muestran un citoesqueleto de actina difuso y ausencia de vinculina formando adhesiones focales. Por otro lado, las células sembradas sobre vidrio o “dibloques” de MPEs poseen fibras de actina más extensas que atraviesan el citoplasma y algunas se conectan con las adhesiones focales. En las películas de $(\text{PLL}/\text{PSS})_6(\text{PLL}/\text{Alg})_2\text{PLL}$ este hecho se vé más marcado, en acuerdo con la tendencia vista para las áreas de adhesión promedio.

En resumen, los “dibloques” de MPEs presentan propiedades diferentes de adhesión celular respecto a las observadas para las MPEs formadas por la combinación de un único par de polielectrolitos. Este hecho se puede interpretar por la interdigitación de los polielectrolitos durante el ensamblado o luego del mismo, que le confieren a la multicapa propiedades fisicoquímicas distintas a las encontradas para cada bloque que compone el sistema. En otras palabras, moléculas de PSS del bloque inferior se encuentran probablemente en el bloque superior, al igual que moléculas de Alg del bloque superior se encuentran en el bloque inferior (Figura 4.9). La información provista por la QCM-D y la AFM indica que el crecimiento y la morfología de las multicapas de (PLL/Alg) o (PLL/Dex) es diferente dependiendo de si fueron depositadas sobre vidrio o sobre un primer bloque de (PLL/PSS) (Figuras 4.1, 4.10 y 4.11).

La interdigitación hace que las propiedades del bloque superior en una MPEs formada por un sistema en “dibloque” sean diferentes de las propiedades del mismo bloque ensamblado sobre vidrio. Cuando el número de capas del bloque superior es de 4 a 6 bicapas, los efectos del bloque inferior disminuyen y la adhesión celular comienza a disminuir. Agregar más capas de polielectrolitos al bloque superior promueve una mayor disminución de la adhesión celular, sugiriendo que luego de depositar 4-6 bicapas, la interdigitación ya no está jugando un rol significativo.

La interdigitación es un fenómeno conocido en las MPEs y existen muchas publicaciones

al respecto [4.32–4.34]. Cuando una capa de polielectrolito se ensambla en una multicapa, puede afectar la película hasta 4 capas por debajo de ésta. La interdigitación ocurre en MPEs cuyo espesor crece tanto lineal como supralinealmente [4.35]. Incluso en MPEs compactas, que crecen linealmente, las nuevas capas adsorbidas se interdigan dentro de las capas más externas [4.36]. Al respecto, en trabajos de otros autores se informó que la rugosidad de las interfaces entre capas de polielectrolito es menor cerca de la interface película/aire que en las bicapas interiores [4.37], un hecho que se explica por la interdifusión de la capas inferiores promovida por cada capa de polielectrolito depositada.

Los experimentos de interdigitación proveen un modo simple de ajustar las propiedades adhesivas de las multicapas preparándolas como bloques de manera de mantener la química superficial del bloque superior prácticamente sin modificación. En este caso, se fabricaron superficies biocompatibles con adhesión celular mejorada utilizando un bloque inferior con PSS, que por su estructura vítreo incrementa el módulo elástico de las películas [4.38]. Para la misma química superficial, si las propiedades mecánicas de la película cambian, la adhesión celular también puede cambiar.

4.4. Conclusiones

Se estudió el efecto de la química de las MPEs sobre la proliferación y adhesión de células A549 comparando el crecimiento, el área y la morfología celular sobre vidrio y sobre MPEs con composiciones variadas, formadas por distintas combinaciones de polielectrolitos.

En general, las MPEs de origen natural, “blandas” y con un crecimiento supralineal, resultaron en substratos con poca adhesión celular. Las MPEs ensambladas con PSS como polianión y cada polication excepto PDADMAC resultaron en superficies mucho más adherentes.

Por otro lado, se observó que el cambio en la composición de las MPEs afecta la adhesión celular y la proliferación de manera diferente. Particularmente, las MPEs con PSS, a pesar de tener buenas propiedades adhesivas, promueven un crecimiento lineal del número de células en lugar de uno exponencial, como ocurre con muchas MPEs formadas por polielectrolitos naturales.

Para cada MPE con un determinado polication en la última capa, a pesar de la presencia de proteínas adsorbidas desde el medio de cultivo, las células son capaces de sensar las propiedades físicas y químicas de la película impuestas por el cambio del polianión de las capas interiores. Las diferentes combinaciones de polielectrolitos utilizadas en el proceso de ensamblado generan MPEs con un número constante de capas pero con distintas propiedades fisicoquímicas que pueden ser sensadas por las células. De esta manera, las diferencias en la adhesión y proliferación celular son el reflejo del cambio en los grupos funcionales de cada polielectrolito, del espesor de la película, la rigidez, el tipo y conformación de las proteínas adsorbidas desde el medio de cultivo.

Para el caso de las MPEs en “dibloque”, la interdigitación entre los polielectrolitos del bloque inferior y del bloque superior genera una película con propiedades diferentes a las de cada uno de los bloques depositados sobre vidrio. El efecto de la interdigitación sobre las propiedades de la multicapa se manifiesta hasta 4 - 6 bicapas desde la capa superior. La fabricación MPEs en “dibloque”, es un procedimiento simple y fácil para generar superficies que modulen la adhesión celular mediante la combinación precisa de bloques de multicapas formadas por un solo par polication/polianión, dando sistemas biocompatibles más complejos y versátiles.

Bibliografía

- [4.1] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml & V. Svorcik. “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants”. *Biotechnology Advances*, 2011. **29**(6), 739–767. (Citado en páginas 32, 181 y 256.)
- [4.2] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin & D. Discher. “Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses”. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(1), 617–628. (Citado en página 181.)
- [4.3] P. M. Kharkar, K. L. Kiick, A. M. Kloxin, K. S. Anseth, S. Kobel, M. P. Lutolf, K. S. Anseth, F. E. Weber, M. P. Lutolf, V. Vogel, J. P. Spatz, F. M. Watt & W. T. S. Huck. “Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments”. *Chemical Society Reviews*, 2013. **42**(17), 7335–7372. (Citado en página 181.)
- [4.4] R. R. Costa, J. F. Mano, M. Bessodes, D. Scherman, O.-W. Merten, C. A. V. Blitterswijk, M. Karperien, J. F. Mano, W. Li, R. Gaebel, R.-k. Li, B. Vollmar, G. Steinhoff & N. Ma. “Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies.” *Chemical Society Reviews*, 2014. **43**(10), 3453–79. (Citado en página 181.)
- [4.5] V. Gribova, R. Auzely-Velty & C. Picart. “Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering”. *Chemistry of Materials*, 2012. **24**(5), 854–869. (Citado en páginas 181 y 232.)
- [4.6] T. Crouzier, T. Boudou & C. Picart. “Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010. **15**(6), 417–426. (Citado en páginas 181 y 256.)
- [4.7] A. L. Hillberg, C. A. Holmes & M. Tabrizian. “Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films.” *Biomaterials*, 2009. **30**(27), 4463–70. (Citado en páginas 72, 181, 190, 232 y 256.)
- [4.8] S. Schmidt, N. Madabousi, K. Uhlig, D. Köhler, A. Skirtach, C. Duschl, H. Möhwald & D. V. Volodkin. “Control of cell adhesion by mechanical reinforcement of soft polyelectrolyte films with nanoparticles.” *Langmuir*, 2012. **28**(18), 7249–57. (Citado en páginas 181 y 201.)
- [4.9] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin & C. Picart. “Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications.” *Advanced Materials*, 2010. **22**(4), 441–67. (Citado en página 181.)
- [4.10] A. G. Skirtach, D. V. Volodkin & H. Möhwald. “Bio-interfaces-Interaction of PLL/HA Thick Films with Nanoparticles and Microcapsules”. *ChemPhysChem*, 2010. **11**(4), 822–829. (Citado en página 182.)

- [4.11] L. Kocgozlu, P. Lavalle, G. Koenig, B. Senger, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, H. Tenenbaum & D. Vautier. “Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells.” *Journal of Cell Science*, 2010. **123**, 29–39. (Citado en página 182.)
- [4.12] G. Francius, J. Hemmerle, V. Ball, P. Lavalle, C. Picart, J. C. Voegel, P. Schaaf & B. Senger. “Stiffening of Soft Polyelectrolyte Architectures by Multilayer Capping Evidenced by Viscoelastic Analysis of AFM Indentation Measurements”. *Journal Physical Chemistry C*, 2007. **111**(23), 8299–8306. (Citado en página 182.)
- [4.13] M. Salomäki & J. Kankare. “Influence of synthetic polyelectrolytes on the growth and properties of hyaluronan-chitosan multilayers.” *Biomacromolecules*, 2009. **10**(2), 294–301. (Citado en página 182.)
- [4.14] A. Schneider, L. Richert, G. Francius, J. C. Voegel & C. Picart. “Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films.” *Biomedical Materials*, 2007. **2**(1), S45–51. (Citado en páginas 190, 201 y 256.)
- [4.15] P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang & W. Wang. “Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion.” *Biomaterials*, 2008. **29**(10), 1412–21. (Citado en página 190.)
- [4.16] L. Richert, P. Lavalle, E. Payan, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel & C. Picart. “Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects.” *Langmuir*, 2004. **20**(2), 448–458. (Citado en páginas 190, 243 y 256.)
- [4.17] D. Mazia, G. Schatten & W. Sale. “Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy.” *The Journal of Cell Biology*, 1975. **66**(1), 198–200. (Citado en páginas 190 y 199.)
- [4.18] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J. C. Voegel & P. Lavalle. “Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(20), 12531–5. (Citado en página 201.)
- [4.19] D. L. Elbert, C. B. Herbert & J. A. Hubbell. “Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces”. *Langmuir*, 1999. **15**(16), 5355–5362. (Citado en página 201.)
- [4.20] P. Lavalle, C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J. C. Voegel, B. Senger & P. Schaaf. “Modeling the Buildup of Polyelectrolyte Multilayer Films Having Exponential Growth”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **108**, 635–648. (Citado en página 201.)
- [4.21] C. Picart, B. Senger, K. Sengupta, F. Dubreuil & A. Fery. “Measuring mechanical properties of polyelectrolyte multilayer thin films: Novel methods based on AFM and optical techniques”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007. **303**(1-2), 30–36. (Citado en página 201.)

- [4.22] A. Schneider, G. Francius, R. Obeid, P. Schwinté, J. Hemmerlé, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Senger & C. Picart. "Polyelectrolyte multilayers with a tunable young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion". *Langmuir*, 2006. **22**(3), 1193–1200. (Citado en página 201.)
- [4.23] A. J. Engler, L. Richert, J. Y. Wong, C. Picart & D. E. Discher. "Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion". *Surface Science*, 2004. **570**(1-2), 142–154. (Citado en página 201.)
- [4.24] L. Richert, A. J. Engler, D. E. Discher & C. Picart. "Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films." *Biomacromolecules*, 2004. **5**(5), 1908–16. (Citado en página 201.)
- [4.25] D. S. Salloum, S. G. Olenych, T. C. S. Keller & J. B. Schlenoff. "Vascular smooth muscle cells on polyelectrolyte multilayers: hydrophobicity-directed adhesion and growth." *Biomacromolecules*, 2005. **6**(1), 161–7. (Citado en página 201.)
- [4.26] A. J. Nolte, N. D. Treat, R. E. Cohen & M. F. Rubner. "Effect of Relative Humidity on the Young's Modulus of Polyelectrolyte Multilayer Films and Related Nonionic Polymers". *Macromolecules*, 2008. **41**(15), 5793–5798. (Citado en página 203.)
- [4.27] R. W. Tilghman, C. R. Cowan, J. D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J. K. Slack-Davis, B. R. Blackman, D. J. Tschumperlin & J. T. Parsons. "Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype." *PloS one*, 2010. **5**(9), e12905. (Citado en página 203.)
- [4.28] L. Han, Z. Mao, J. Wu, Y. Zhang & C. Gao. "Influences of surface chemistry and swelling of salt-treated polyelectrolyte multilayers on migration of smooth muscle cells." *Journal of the Royal Society Interface*, 2012. **9**(77), 3455–68. (Citado en página 203.)
- [4.29] H. Murata, R. R. Koepsel, K. Matyjaszewski & A. J. Russell. "Permanent, non-leaching antibacterial surfaces—2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells". *Biomaterials*, 2007. **28**(32), 4870–4879. (Citado en página 203.)
- [4.30] L. Han, Z. Mao, J. Wu, Y. Guo, T. Ren & C. Gao. "Directional cell migration through cell-cell interaction on polyelectrolyte multilayers with swelling gradients". *Biomaterials*, 2013. **34**(4), 975–984. (Citado en páginas 72, 203 y 211.)
- [4.31] R. K. Assoian & E. A. Klein. "Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness". *Trends in Cell Biology*, 2008. **18**(7), 347–352. (Citado en página 203.)
- [4.32] G. Decher. "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites". *Science*, 1997. **277**(5330), 1232–1237. (Citado en página 205.)
- [4.33] M. C. Hsieh, R. J. Farris & T. J. McCarthy. "Surface Priming for Layer-by-Layer Deposition: Polyelectrolyte Multilayer Formation on Allylamine Plasma-Modified Poly(tetrafluoroethylene)". *Macromolecules*, 1997. **30**(26), 8453–8458. (Citado en página 205.)
- [4.34] E. Donath, D. Walther, V. N. Shilov, E. Knippel, A. Budde, K. Lowack, C. A. Helm & H. Möhwald. "Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles". *Langmuir*, 1997. **13**(13), 5294–5305. (Citado en páginas 205 y 229.)

- [4.35] F. Caruso, H. Lichtenfeld, E. Donath & H. Möhwald. “Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids”. *Macromolecules*, 1999. **32**(7), 2317–2328. (Citado en página 205.)
- [4.36] O. Soltwedel, O. Ivanova, P. Nestler, M. Muller, R. Kohler, C. A. Helm, M. Madlen, K. Ralf & C. A. Helm. “Interdiffusion in Polyelectrolyte Multilayers”. *Macromolecules*, 2010. **43**(17), 7288–7293. (Citado en página 205.)
- [4.37] G. Ladam, P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher & F. Cuisinier. “In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers”. *Langmuir*, 2000. **16**(3), 1249–1255. (Citado en página 205.)
- [4.38] A. M. Lehaf, H. H. Hariri & J. B. Schlenoff. “Homogeneity, modulus, and viscoelasticity of polyelectrolyte multilayers by nanoindentation: Refining the buildup mechanism”. *Langmuir*, 2012. **28**(15), 6348–6355. (Citado en página 205.)

Capítulo 5

Efecto del recocido de las películas de polielectrolitos en las propiedades fisicoquímicas de las películas y en la adhesión celular: sistema PLL/Alg y PLL/Dex

5.1. Introducción

Los materiales de origen natural resultan de interés para aplicaciones biomédicas y en el estudio de la adhesión, migración y otros procesos celulares [5.1]. Por otro lado, las superficies que presentan gradientes en sus propiedades fisicoquímicas permiten simular más fehacientemente las características de la matriz extracelular al inducir una dependencia espacial de las funciones celulares [5.2]. Numerosos grupos de investigación desarrollaron gradientes en el pH de ensamblado de las MPEs modificando el grado de hinchamiento [5.3], gradientes en la rigidez de la MPE [5.2, 5.4], en la concentración de péptidos adhesivos o de factores de crecimiento [5.2, 5.5] mediante dispositivos de microfluídica, proporcionando un control espacial de señales físicas y biológicas que impacten en el destino celular. También se reportó el efecto del control espacial del grado de hinchamiento de MPEs sumergidas en un gradiente de sales, sobre la migración celular guiada por durotaxis y su dependencia con la densidad celular y las interacciones célula-célula [5.6]. Además, se pueden generar gradientes estables de rigidez en MPEs ensambladas sobre substratos de sílice o en MPEs libres controlando el tiempo de inmersión en una solución de agentes entrecruzantes naturales. [5.7].

En este capítulo se describe una nueva estrategia para mejorar la adhesión celular sobre MPEs fabricadas con biopolielectrolitos basada en el recocido térmico. Se mostrará que el recocido térmico, el calentamiento de las MPEs a temperatura constante, tiene un fuerte impacto en las películas a base de PLL/Alg y PLL/Dex, resultando en una gran mejora de la adhesión celular. Las células A549 y C2C12 sembradas sobre películas de PLL/Alg y PLL/Dex recocidas presentan características de adhesión similares a las sembradas sobre vidrio, mientras que las células se adhieren pobremente sobre películas de igual composición sin tratamiento. No se observan diferencias en la adhesión de células BHK sembradas sobre las películas recocidas o sin recocer, lo que pone de manifiesto que las interacciones célula-substrato dependen de la línea celular. El ensamblado de las MPEs se monitoreó mediante QCM-D y las películas se caracterizaron mediante AFM y experimentos de nanoindentación,

medidas de ángulo de contacto, potencial zeta y XPS. También se evaluó mediante QCM-D la adsorción de SAB y FN sobre las películas no recocidas y recocidas. Los cambios en la adhesión celular luego del recocido se correlacionaron con los cambios en las propiedades de las MPEs: topografía, rigidez, mojabilidad y deposición de proteínas.

Finalmente, se muestran los resultados de aplicar un gradiente de temperatura entre 10 °C y 50 °C sobre MPEs de PLL/Alg para producir cambios continuos en las propiedades fisiocoquímicas de la película que afecten la adhesión celular. El ángulo de contacto, la adsorción de proteínas y el área celular promedio varían en forma monótona desde la zona expuesta a una menor temperatura hacia la zona expuesta a una temperatura mayor.

5.2. Resultados

5.2.1. Fabricación de MPEs y recocido

Las multicapas de polielectrolitos se fabricaron mediante inmersión manual de un substrato de vidrio en las soluciones de los respectivos polielectrolitos, se secaron al aire y posteriormente se trataron térmicamente. Las MPEs son sistemas fuera del equilibrio y se espera que sean perturbados por la temperatura.

En la figura 5.1 se muestra el seguimiento del ensamblado de 15 capas de PLL/Alg sobre un cristal de SiO₂ mediante QCM-D. La frecuencia disminuye durante el pasaje de cada solución de polielectrolito por la celda de la microbalanza, lo que indica un aumento en la masa depositada. El cambio total de frecuencia, que crece exponencialmente con el número de capas, fue de -407 Hz. Las propiedades mecánicas de la película pueden ser cualitativamente descriptas a través de la separación de las curvas de frecuencia que corresponden a los distintos armónicos y los cambios en la disipación durante el ensamblado de PLL y Alg. Para cada capa de Alg depositada, hay un incremento pronunciado en la disipación, por ejemplo al depositar la 6.^o capa (3.^o capa de polianión, delimitada con línea de puntos en la figura 5.1) se observó un cambio de $\Delta D = 3.37 \times 10^{-6}$ a $\Delta D = 12.45 \times 10^{-6}$. También puede observarse una separación entre los tres armónicos. Este comportamiento está relacionado a la baja rigidez del Alg, que aumenta las características viscoelásticas de la película. Por otro lado, cuando se deposita PLL en la 7.^o capa, la disipación disminuye a la mitad ($\Delta D = 6.15 \times 10^{-6}$) al mismo tiempo que disminuye la distancia entre los armónicos, lo que indica que el depósito de PLL tiende a otorgarle rigidez o características sólidas a la multicapa.

Una vez ensamblada la película de (PLL/Alg)₇PLL se realizó el recocido en estufa. Se probaron temperaturas entre 24 y 80 °C durante distintos tiempos de recocido con las películas secas o sumergidas en agua. Las películas recocidas durante 3 días en seco a temperaturas de 37 °C o mayores presentaron mejoras en la adhesión celular, alcanzando valores de área promedio similares a los encontrados sobre vidrio.

Las películas que habían sido sumergidas en agua y calentadas, no presentaron diferencias en la adhesión celular respecto a las no recocidas (Figura 5.2a). Tampoco se observaron diferencias en la adhesión celular sobre películas dejadas a 24 °C durante 3 días. Arbitrariamente se decidió trabajar a 37 °C, la temperatura a la que se encuentra la estufa de cultivo celular, lo que permite realizar el tratamiento térmico en condiciones ascépticas.

El número de capas de la película también es un factor a tener en cuenta a la hora de mejorar la adhesión celular mediante tratamiento térmico. Las multicapas de PLL/Alg con 15 capas, es decir (PLL/Alg)₇PLL, presentan mejoras en la adhesión celular cuando son tratadas a 37 °C (o más) durante 3 días. Películas con mayor número de capas, como (PLL/Alg)₁₄PLL, no presentan buena adhesión luego de aplicar el mismo tratamiento térmico (Figura 5.2b).

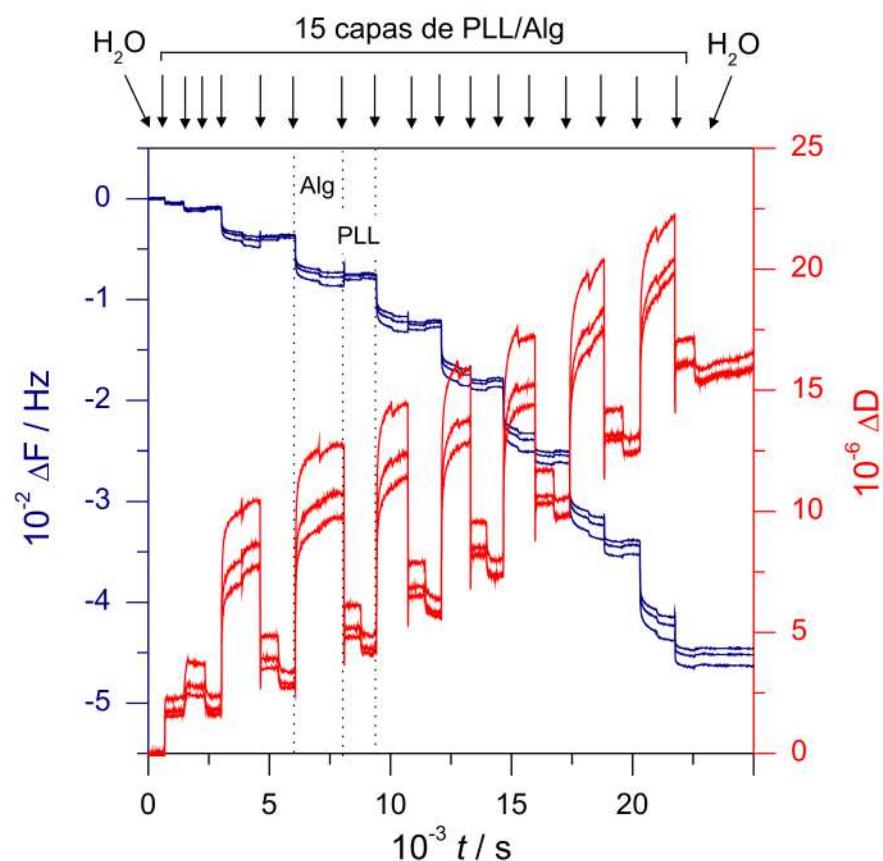


Figura 5.1: Ensamblado de 15 capas de PLL/Alg seguido por QCM-D. Las diferentes curvas corresponden al 3.^o, 5.^o y 7.^o armónico. Las líneas de puntos delimitan los intervalos de tiempo en que se depositó la 3.^o capa de polianión y la 4.^o capa de polication, según se indica en la figura.

Sin embargo es posible conseguir una buena adhesión celular modificando el esquema de ensamblado y calentamiento.

Se ensamblan primero 15 capas obteniendo las películas $(\text{PLL/Alg})_7\text{PLL}$, luego de secar se realiza un tratamiento térmico a 37 °C durante 3 días, se ensamblan las 14 capas restantes y finalmente se repite el tratamiento térmico. De esta manera es posible conseguir películas de mayor espesor con buena adhesión celular. Por cuestiones de practicidad, se decidió trabajar con películas de 15 capas, $(\text{PLL/Alg})_7\text{PLL}$ y $(\text{PLL/Dex})_7\text{PLL}$, con PLL como última capa.

5.2.2. Caracterización de las MPEs

Las imágenes de AFM de las películas de $(\text{PLL/Alg})_7\text{PLL}$ presentaron cambios en la morfología de la superficie luego del recocido (Figura 5.3a). La multicapa de $(\text{PLL/Alg})_7\text{PLL}$ presentó estructuras globulares de 100-300 nm de largo y entre 5 y 10 nm de altura, con picos que pueden alcanzar los 30 nm de altura. Luego del tratamiento térmico la superficie se volvió más plana, presentando estructuras más anchas y de menor altura (Figura 5.3b). La rugosidad de la superficie, expresada en términos de la desviación cuadrática media de las alturas (Rms), muestra una disminución de 4 a 2 nm luego del recocido térmico (Figura 5.3c).

La rigidez de las MPEs de PLL/Alg antes y después del recocido se estudió a través de medidas de nanoindentación. Aplicando el modelo de Hertz para ajustar las curvas de f-d se obtuvo el módulo de Young E de las multicapas. Se observó un aumento en la rigidez de las películas de 50 MPa a 450 MPa luego del recocido (Figura 5.3d). La evaluación del módulo elástico es una aproximación debido a que para su obtención se realizan numerosas suposiciones. Los valores obtenidos fueron muy altos comparado a los que se esperaban obtener para MPEs libres de PLL/Alg, debido principalmente a la influencia del substrato de vidrio. Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales y aplicando los mismos modelos para ajustar las curvas obtenidas para películas recocidas y no recocidas, los valores pueden compararse para estimar propiedades elásticas relativas. Se observa un incremento en la rigidez de aproximadamente un orden de magnitud luego del recocido.

De lo expuesto surge que las MPEs de PLL/Alg recocidas son más lisas y rígidas que las no recocidas, lo que indicaría un reordenamiento de las cadenas de polielectrolitos para formar una estructura más compacta.

5.2.3. Mojabilidad y carga superficial

La determinación del ángulo de contacto permite evaluar la mojabilidad de las películas antes y después del recocido (Figura 5.4a). El ángulo de contacto promedio fue de $36 \pm 2.8^\circ$ para las multicapas de $(\text{PLL/Alg})_7\text{PLL}$ antes del recocido. Este valor sugiere una hidrofilicidad relativamente alta, en acuerdo con las características hidrofílicas del Alg y el PLL. Luego del recocido, las propiedades de mojado de la película cambian drásticamente. El ángulo de contacto de las películas recocidas a 37 °C fue de $93 \pm 4.6^\circ$ y el de las recocidas a 80 °C fue de $95 \pm 1.8^\circ$. Esto indica que el recocido de las multicapas aumenta su hidrofobicidad.

Además, el potencial zeta de las multicapas ensambladas sobre partículas coloidales varía de -1.3 mV a -14.1 mV y -27 mV luego del recocido a 37 y 80 °C, respectivamente (Figura 5.4b). El uso de coloides en lugar de superficies planas puede producir diferencias en las características de las multicapas debido principalmente a los distintos pasos utilizados durante el ensamblado de las películas sobre las partículas coloidales, sin embargo comparar los resultados de potencial zeta obtenidos para sistemas coloidales con sistemas planos es una aproximación válida y utilizada por diferentes grupos. El valor pequeño y cercano a

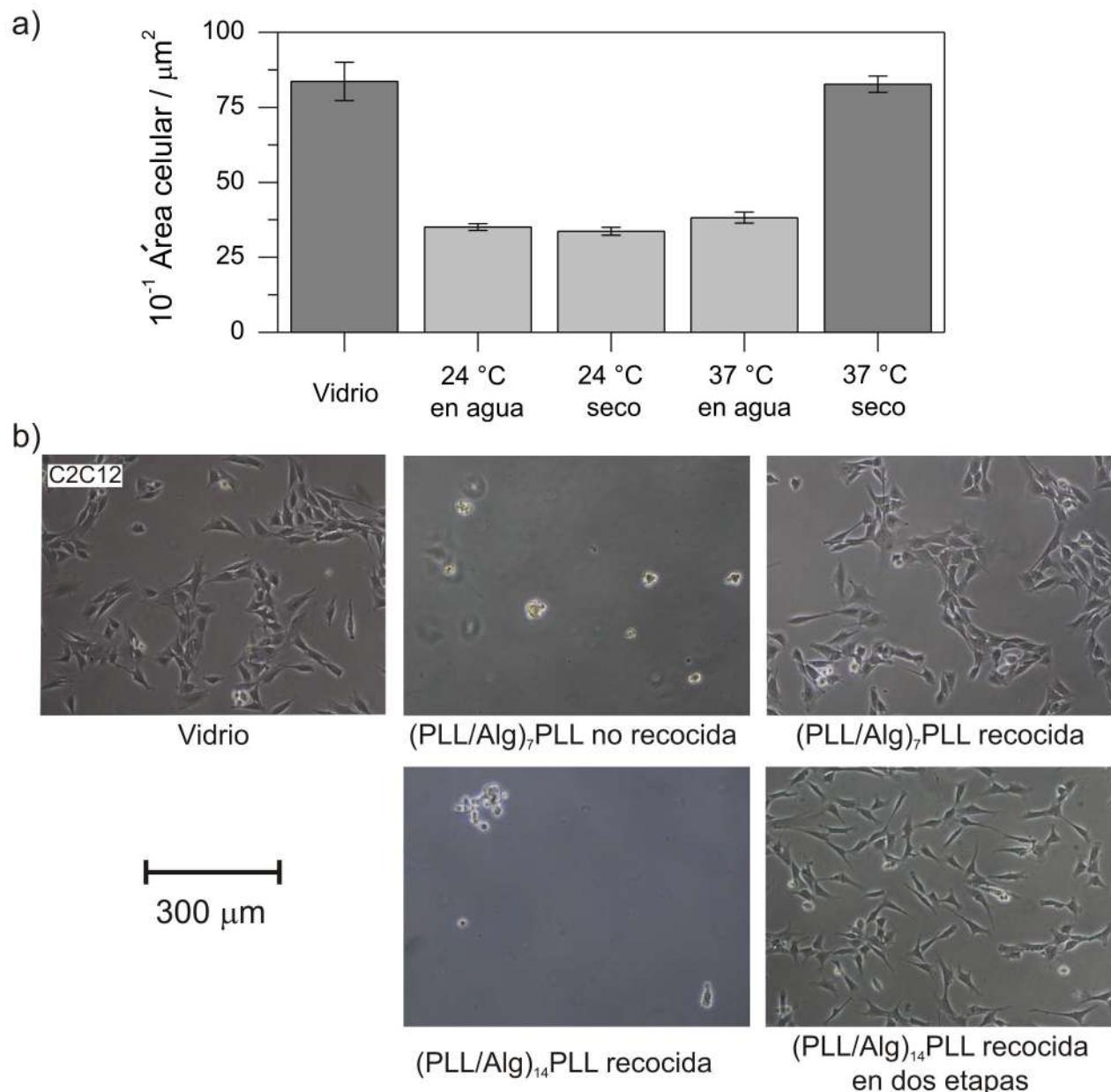


Figura 5.2: a) Áreas celulares promedio de células A549 sembradas sobre vidrio y películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ tratadas 3 días a 24 o 37 °C secadas o sumergidas en agua. b) Imágenes de células C2C12 sembradas sobre vidrio, multicapas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$, $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ y $(\text{PLL}/\text{Alg})_{14}\text{PLL}$ recocidas a 37 °C durante 3 días y $(\text{PLL}/\text{Alg})_{14}\text{PLL}$ ensamblado y recocido en dos etapas como se describe en el texto.

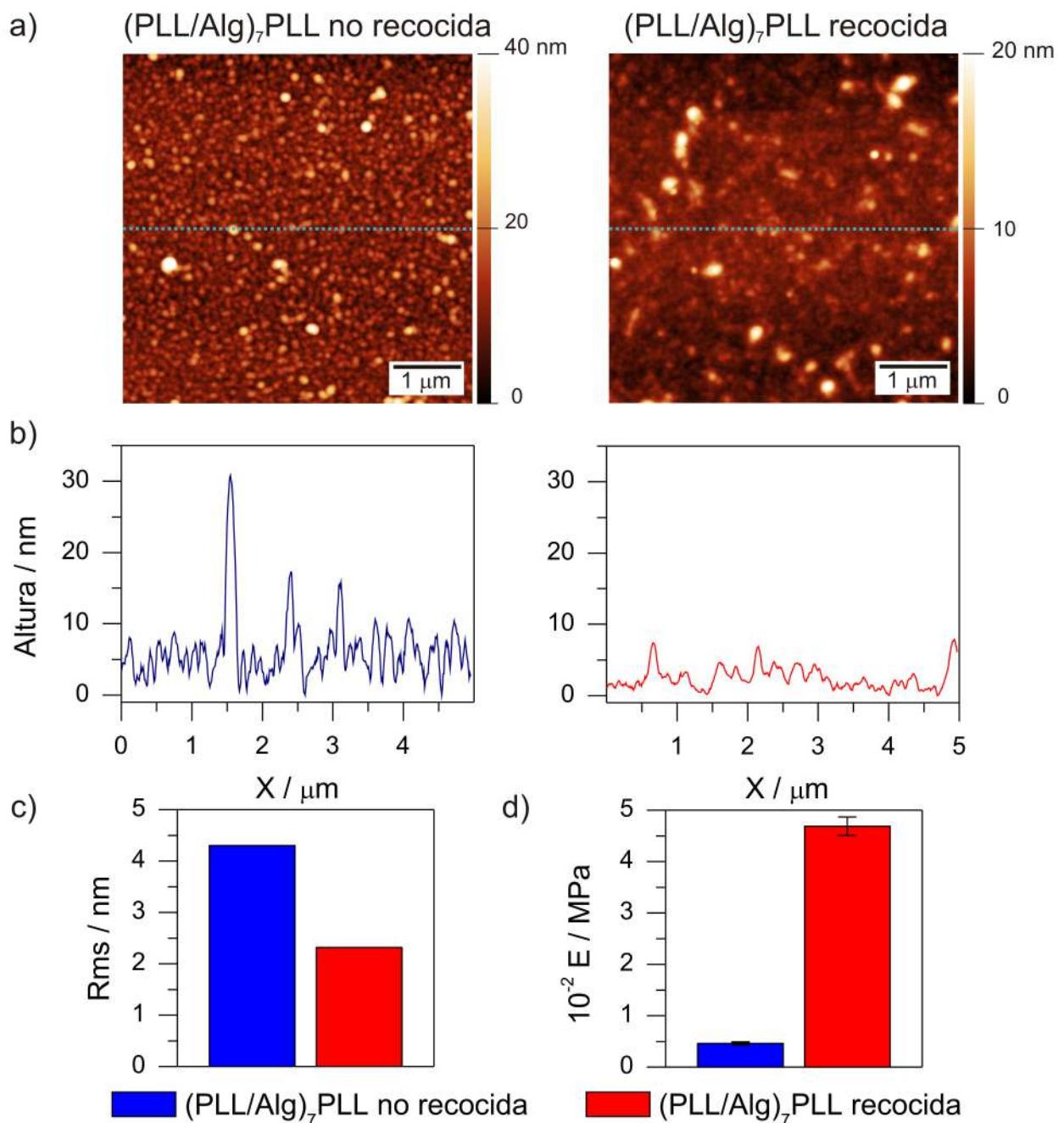


Figura 5.3: a) Imágenes de AFM de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocida y $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocida luego de secadas. b) Perfiles de altura correspondientes a la línea trazada en a). c) Rugosidad de las películas no recocida y recocida. d) Módulo de Young de las MPEs no recocidas y recocidas.

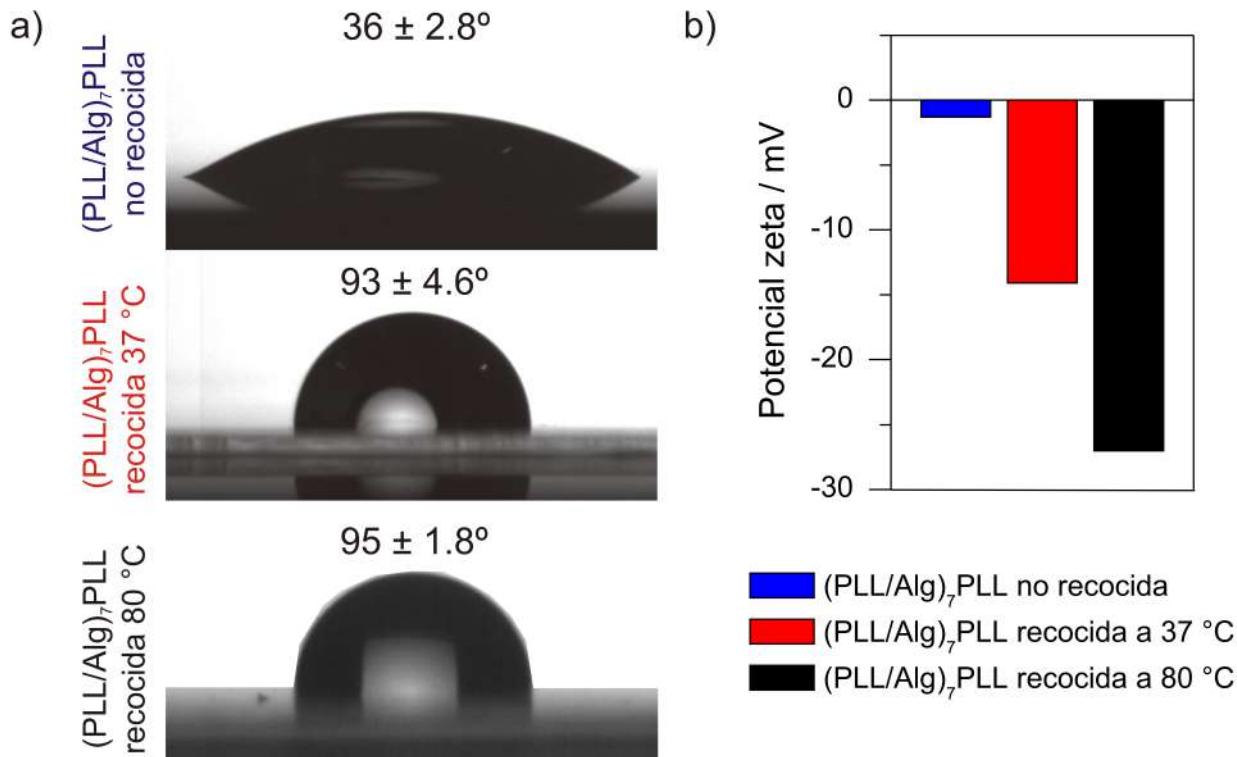


Figura 5.4: a) Medidas de ángulo de contacto sobre las multicapas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocidas y $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocidas a 37 y 80 °C durante 3 días. b) Potencial zeta de películas no recocidas y recocidas.

0 del potencial zeta previo al recocido, es indicativo de la interdigitación de las capas. El incremento en el valor negativo de la carga superficial luego del recocido indica que la carga negativa del Alg está presentada más efectivamente en la superficie de la película e implica un reordenamiento molecular de la multicapa.

5.2.4. Análisis químico

El análisis químico de las películas mediante XPS permitió estudiar la posibilidad de que el recocido promueva cambios en la química de las multicapas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$. El recocido podría estar induciendo la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilato del Alg y las aminas primarias del PLL.

En la figura 5.5 se muestran los espectros de alta resolución en la región del N 1s. Los dos picos a ~ 400 eV y ~ 401.5 eV se asignaron a los enlaces N-CO/C-NH₂ y C-NH₃⁺, respectivamente [5.8]. No se observan cambios en las energías de ligadura de estas especies en los espectros de XPS de las películas recocidas a 37 y 80 °C con respecto al de las no recocidas. Por otro lado, si hubiera entrecruzamiento entre las aminas del PLL y los grupos carboxilato del Alg deberían formarse enlaces amida. Estos enlaces ya están presentes en el PLL, por lo que no deberían aparecer nuevas señales.

Por otro lado, la relación de intensidad de las bandas N-CO/C-NH₂ y C-NH₃⁺ cambia con el recocido. La banda de N-CO/C-NH₂ aumenta en relación con la de C-NH₃⁺. Esto podría indicar dos cosas: que luego del recocido se forma más N-CO debido a la formación de nuevos enlaces amida o que los grupos NH₃⁺ se deprotonan durante el recocido aumentando la cantidad relativa de NH₂. Esto último podría ser consecuencia de la deshidratación de los grupos pendientes del PLL. Al comparar la composición química de las muestras (tabla

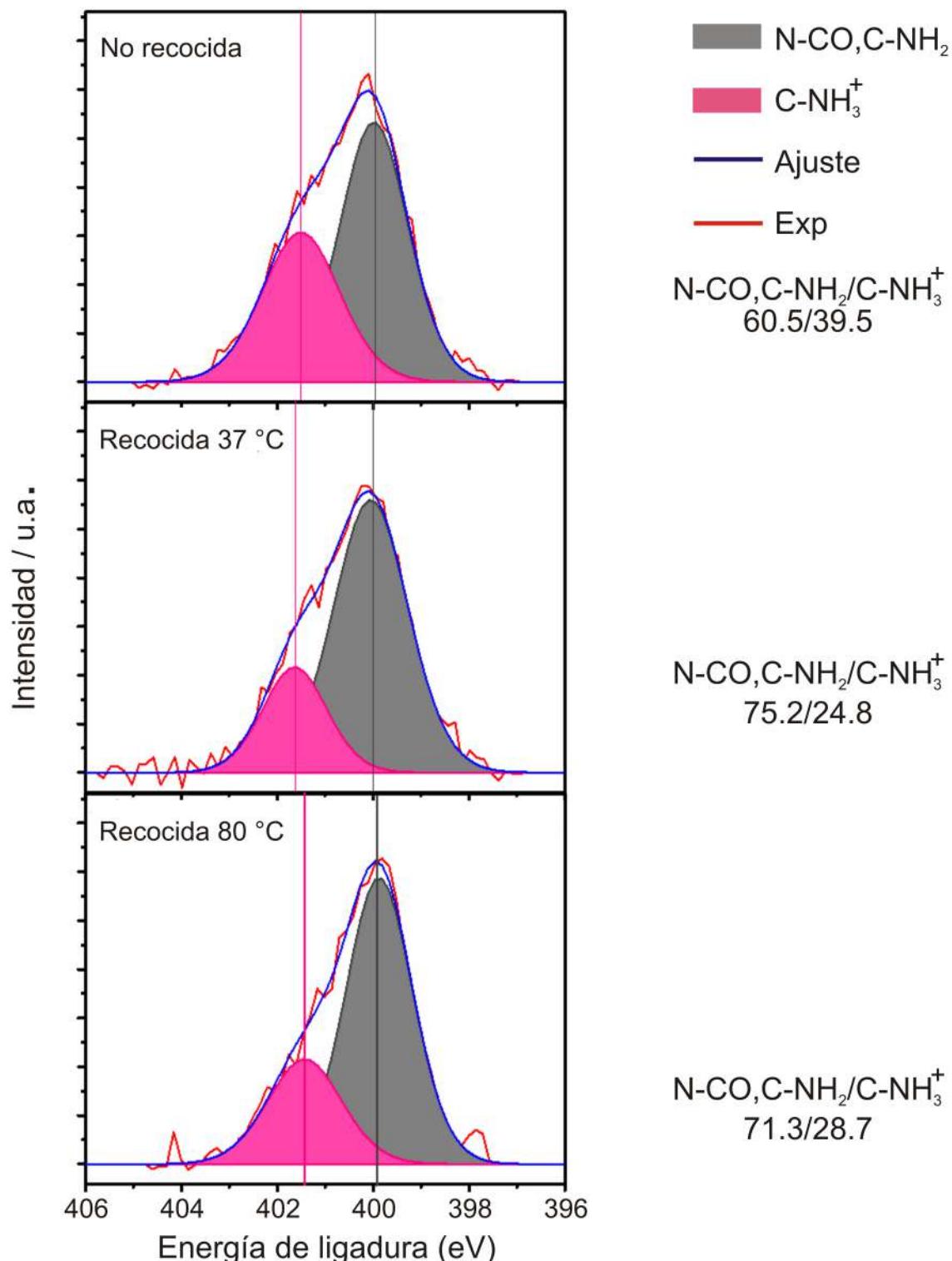


Figura 5.5: Análisis de XPS de las películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no recocidas y recocidas a 37 y 80 °C.

5.1), los porcentajes molares de C, O y N no cambian significativamente entre las películas no recocidas y las recocidas. Durante la formación de un enlace amida un grupo OH del carboxilato se pierde en forma de agua, por lo que el entrecruzamiento de los polielectrolitos debería resultar en una disminución del contenido de O. La ausencia de cambios en los porcentajes molares de C, N y O luego del recocido indicarían que el tratamiento térmico a estas temperaturas no induce la formación de enlaces amida y el entrecruzamiento de la multicapa.

	C / at. %	O / at. %	N / at. %
No recocida	58.52	31.72	9.76
Recocida a 37 °C	60.37	30.11	9.52
Recocida a 80 °C	59.53	31.40	9.07

Tabla 5.1: Composición química superficial de películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no recocidas y recocidas determinada por XPS y expresada como porcentaje atómico relativo (at. %).

5.2.5. Adsorción de proteínas

La sero albúmina bovina (SAB) y la fibronectina (FN) se usaron como proteínas modelo para obtener información del impacto del recocido sobre la adsorción proteica. La SAB es la proteína más abundante del suero del medio de cultivo, mientras que la FN es una proteína típica que promueve la adhesión celular. La superficie de las MPEs presentan grupos cargados y las proteínas pueden depositarse a través de interacciones electrostáticas y otras interacciones como puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, etc.

La adsorción de SAB sobre la multicapa de $(PLL/Alg)_7PLL$ produjo una disminución de frecuencia de $\Delta F = -186.5$ Hz y un aumento en la disipación de 8.0×10^{-6} u.a. (Figura 5.6a). Luego del lavado, la cantidad de proteína depositada resultó en un $\Delta F = -100$ Hz para el 3.^o armónico y la disipación disminuyó a $\Delta D = 3.0 \times 10^{-6}$ u.a. Por otro lado, las diferencias en la frecuencia y la disipación luego de la deposición de la SAB sobre las multicapas recocidas fue de $\Delta F = -45$ Hz y $\Delta D = 1.5 \times 10^{-6}$ u.a., respectivamente (Figura 5.6b). Luego del lavado, la frecuencia disminuyó a valores cercanos a -35 Hz. Entonces luego del recocido a 37 °C la masa de SAB que se deposita sobre la película es aproximadamente 3 veces menor a la que se deposita sobre la película sin tratar. Además, un valor menor de disipación se relaciona a un material más rígido, por lo que sobre la película recocida se deposita una menor cantidad de proteína pero formando una capa más compacta. Sobre las películas recocidas a 80 °C la deposición de SAB fue aún menor, obteniendo un $\Delta F \sim -5$ Hz.

Por otro lado, la adsorción de FN presenta un comportamiento inverso. Las multicapas de $(PLL/Alg)_7PLL$ recocidas adsorben una cantidad de FN que se corresponde con un $\Delta F = -65$ Hz, un valor casi dos veces mayor que los $\Delta F = -35$ Hz que se depositan sobre las multicapas sin recocer (Figura 5.7). La disipación presentó, para ambas películas, valores similares alrededor de $\Delta D = 3.5 \times 10^{-6}$ u.a.

5.2.6. Adhesión celular

Áreas celulares y parámetros morfológicos

El impacto del recocido de las películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ sobre la adhesión celular se ensayó con las células A549, C2C12 y BHK, midiendo cambios del área proyectada promedio, la relación de aspecto y la redondez de las células adheridas.

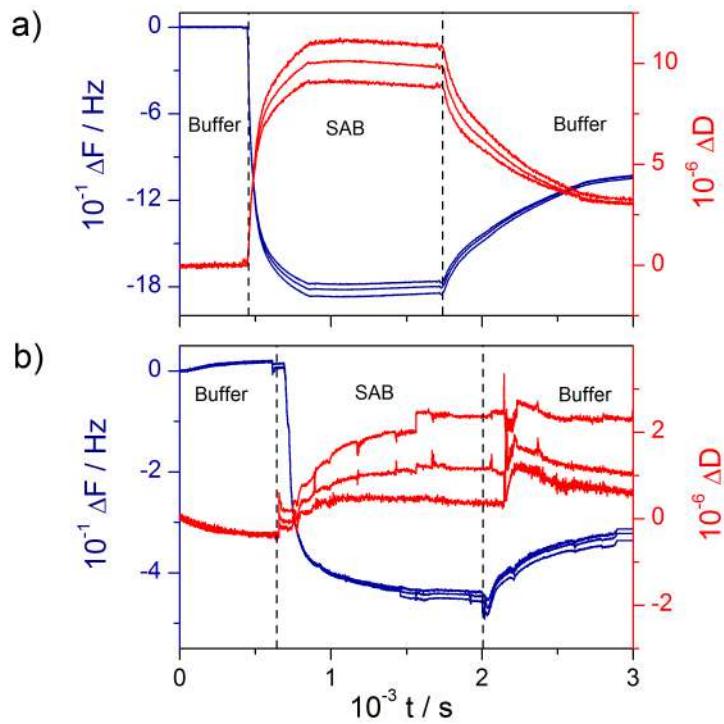


Figura 5.6: Representaciones del 3.^o, 5.^o y 7.^o armónico de la frecuencia y la disipación para la adsorción de BSA sobre multicapas de (PLL/Alg)₇PLL no recocidas (a) y recocidas (b)

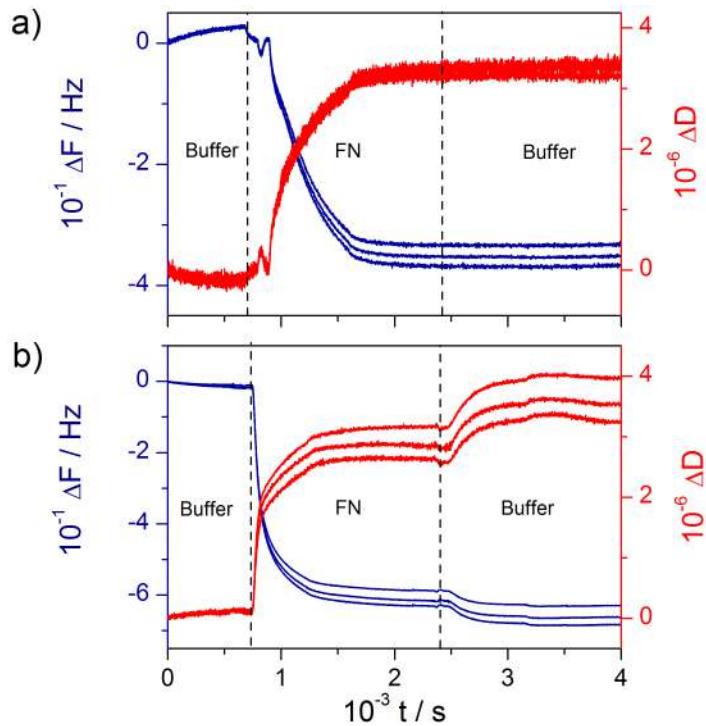


Figura 5.7: Representaciones del 3.^o, 5.^o y 7.^o armónico de la frecuencia y la disipación obtenidas para la adsorción de FN sobre multicapas de (PLL/Alg)₇PLL no recocidas (a) y recocidas (b).

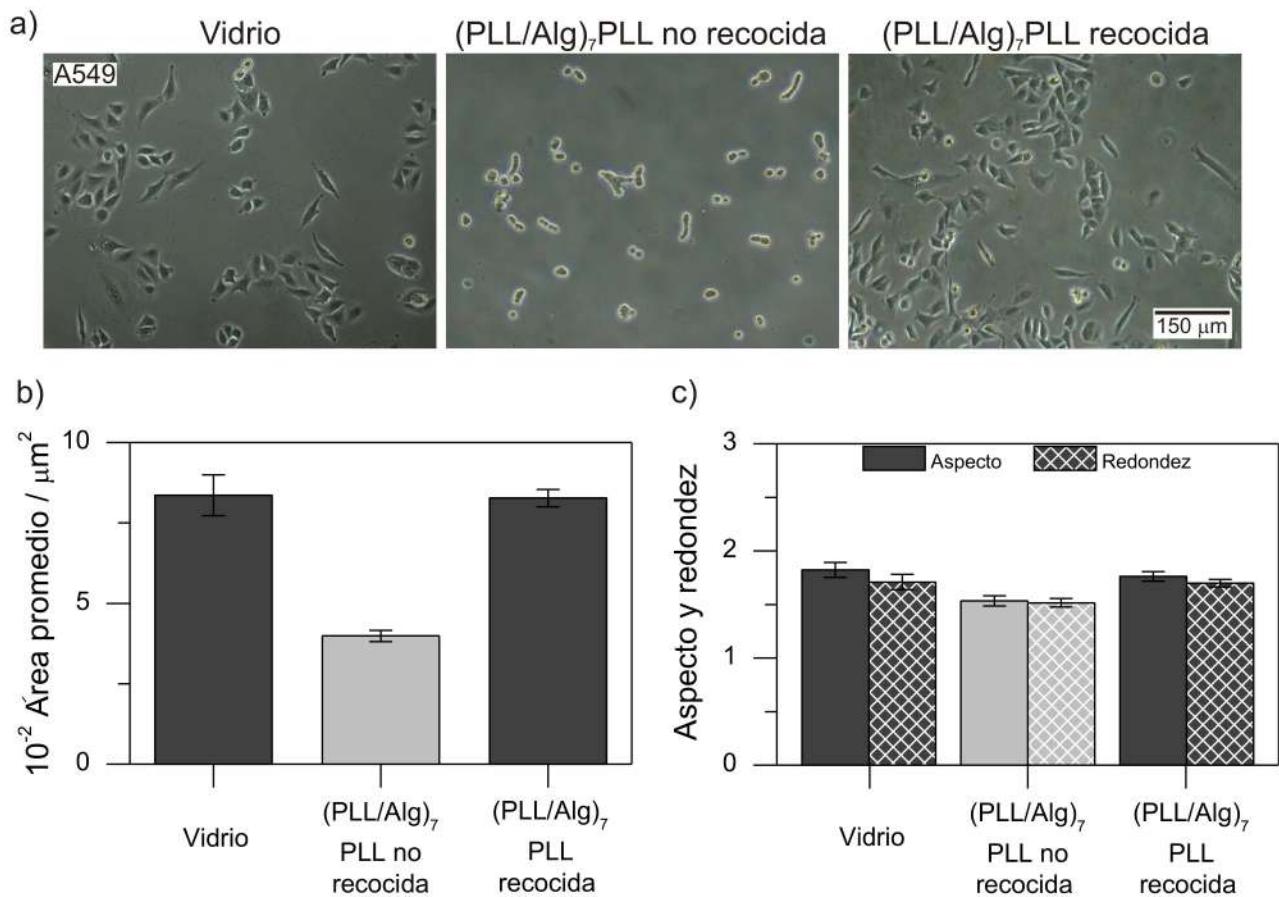


Figura 5.8: Características de la adhesión de células A549 medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocida y $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocida. a) Microimágenes de contraste de fase de células A549 sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. Se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas entre los promedios están indicados en escala de grises ($p = 0.05$).

Las células A549 y C2C12 presentaron una baja adhesión sobre películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ (Figuras 5.8 y 5.9), con áreas celulares promedio cercanas a $400 \mu\text{m}^2$. Este valor fue significativamente menor que el obtenido para células sembradas sobre vidrio, $870 \mu\text{m}^2$ para las células A549 y $920 \mu\text{m}^2$ para las células C2C12. Los valores de relación de aspecto y rugosidad de las células sembradas sobre películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ son cercanos a 1 y significativamente menores que los encontrados sobre vidrio, lo que indica que las células están redondeadas y mal adheridas. Las células sembradas sobre las películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ tratadas térmicamente a 37°C , presentaron áreas de adhesión celular y parámetros morfológicos similares a los obtenidos para células sembradas sobre vidrio, excepto la redondez promedio de las células C2C12 que fue significativamente mayor (2.70 ± 0.09 sobre $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocida y 2.43 ± 0.09 sobre vidrio).

Los fibroblastos BHK tienen un comportamiento distinto que el observado para las células A549 y C2C12. El tratamiento térmico de las multicapas parece no modificar la interacción de las películas con las células BHK (Figura 5.10). Los fibroblastos sembrados sobre multicapas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocidas y recocidas presentaron áreas promedio y parámetros morfológicos similares o ligeramente inferiores a los observados sobre vidrio. El área promedio de las células BHK sembradas sobre vidrio fue de $600 \mu\text{m}^2$, mientras que el obtenido para

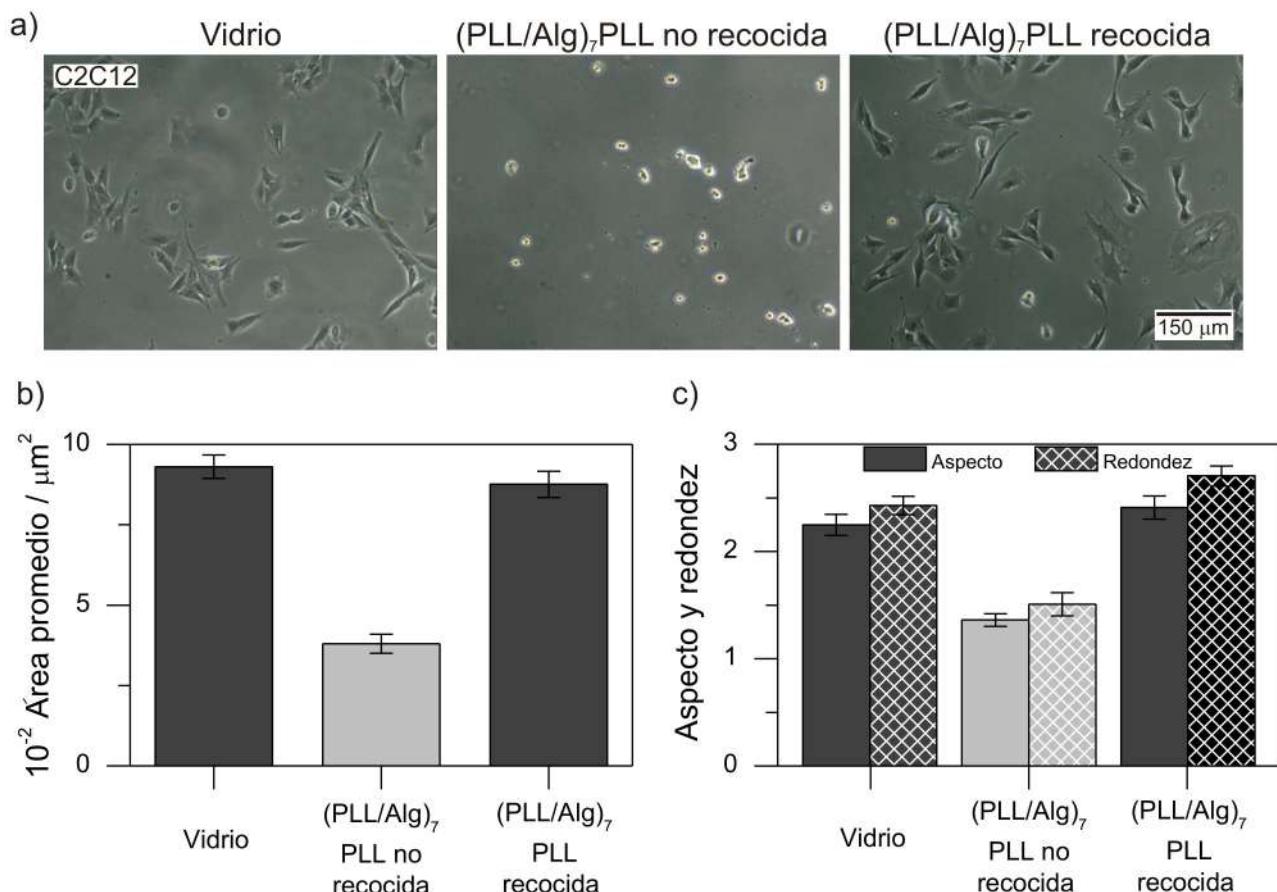


Figura 5.9: Características de la adhesión de células C2C12 medidas 1 día después de la siembra sobre vidrio, $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocida y $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocida. a) Microimágenes de contraste de fase de células C2C12 sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. Se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas entre los promedios están indicados en escala de grises ($p=0.05$).

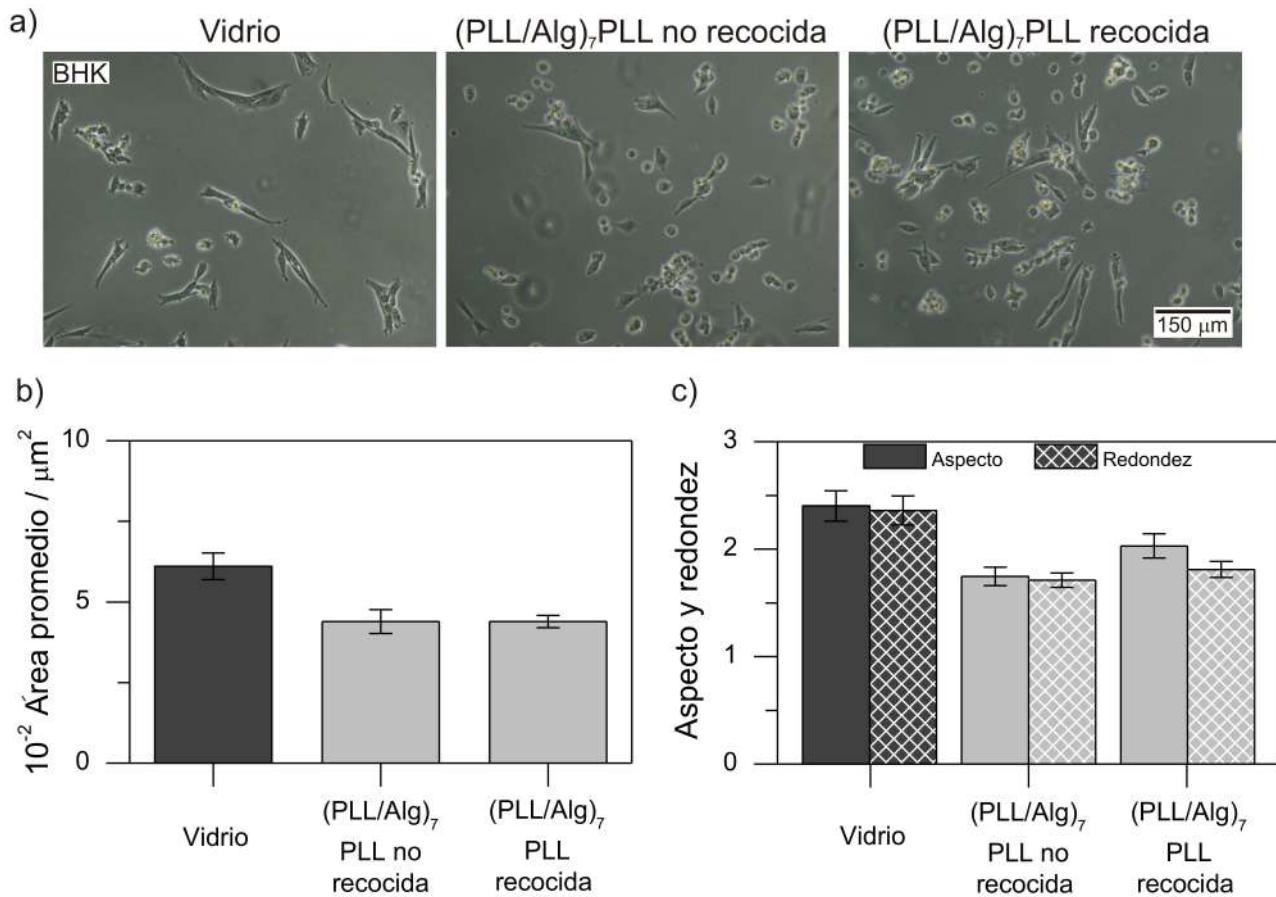


Figura 5.10: Características de la adhesión de células BHK medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ no recocida y $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ recocida. a) Microimágenes de contraste de fase de células BHK sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. Se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas entre los promedios están indicados en escala de grises ($p=0.05$).

las células sembradas sobre las películas de polielectrolitos fue de alrededor de $400 \mu\text{m}^2$, un 33 % menor. Cabe destacar que las características de adhesión de las células BHK sobre cada superficie es bastante heterogénea, con células redondeadas y con diferentes grados de extensión.

Las diferencias observadas en la adhesión muestran que la interacción de las células con las superficies es dependiente del tipo de célula. Las líneas celulares utilizadas en los experimentos son de naturalezas muy distintas: una línea tumoral epitelial de pulmón humano, mioblastos de ratón y fibroblastos de riñón de hamster. Las dos últimas tienen formas ahusadas, mientras que las primeras tienden a ser poliedros regulares. Los parámetros morfológicos obtenidos dan cuenta de estas características y para las células A549 y C2C12 se observó la misma tendencia en la adhesión, mientras que el recocido de las MPEs parece no influir demasiado en la capacidad de adhesión de las células BHK.

Tinciones fluorescentes

Las células A549 y C2C12 sembradas sobre las películas de $(\text{PLL}/\text{Alg})_7\text{PLL}$ sin recocer mostraron un citoesqueleto de actina difuso localizado sobre todo en la periferia celular. Por otro lado, las células adheridas sobre películas recocidas mostraron fibras de estrés

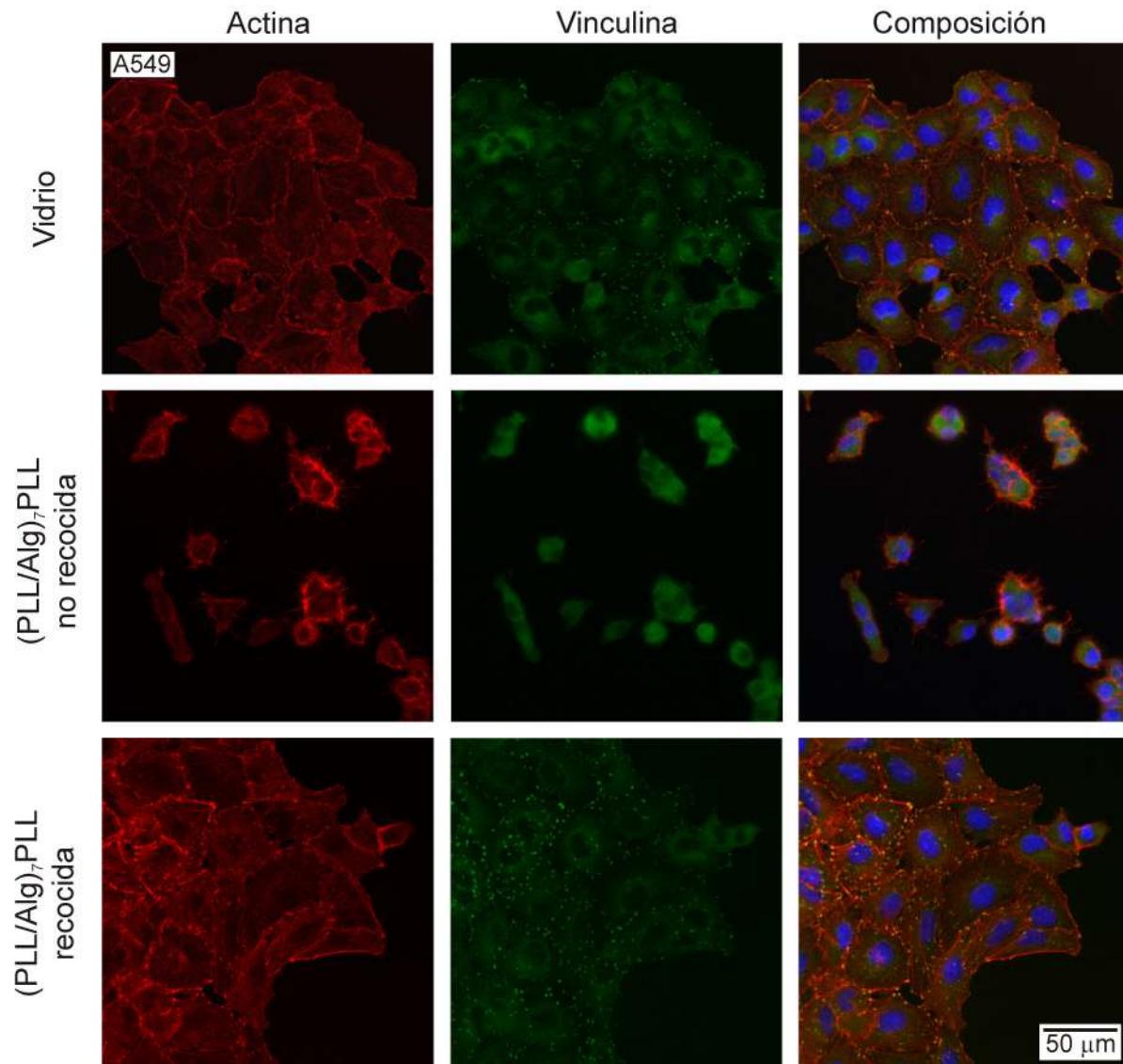


Figura 5.11: Imágenes de microscopía laser confocal de barrido de células A549 2 días después de la siembra sobre vidrio, películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no recocidas, y películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ recocidas.

bien ordenadas y extendidas a lo largo del citoplasma (Figuras 5.11 y 5.12). Las células adheridas interactúan y se extienden sobre los substratos a través de proteínas depositadas provenientes del medio de cultivo y forman adhesiones focales [5.9]. La vinculina es una proteína intracelular que conecta las fibras de estrés con la membrana en los sitios de anclaje celular.

La adhesión celular fue evaluada midiendo el área total asociada a la tinción de vinculina por célula (Tabla 5.2). Para las células A549 adheridas sobre películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ recocidas el área de adhesión fue de $23.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$, un valor similar a los $27.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ obtenidos para las células sembradas sobre vidrio, y 4-5 veces mayor que los $5.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ obtenidos para las células sembradas sobre MPEs no recocidas.

Por otro lado, para las células C2C12 el área de vinculina por célula fue de $39.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ para aquellas sembradas sobre vidrio, $12.1 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ para las sembradas sobre las multicapas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no recocidas y $37.9 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ para las sembradas sobre las multicapas recocidas. Para ambas células se observó una mejor adhesión sobre las películas

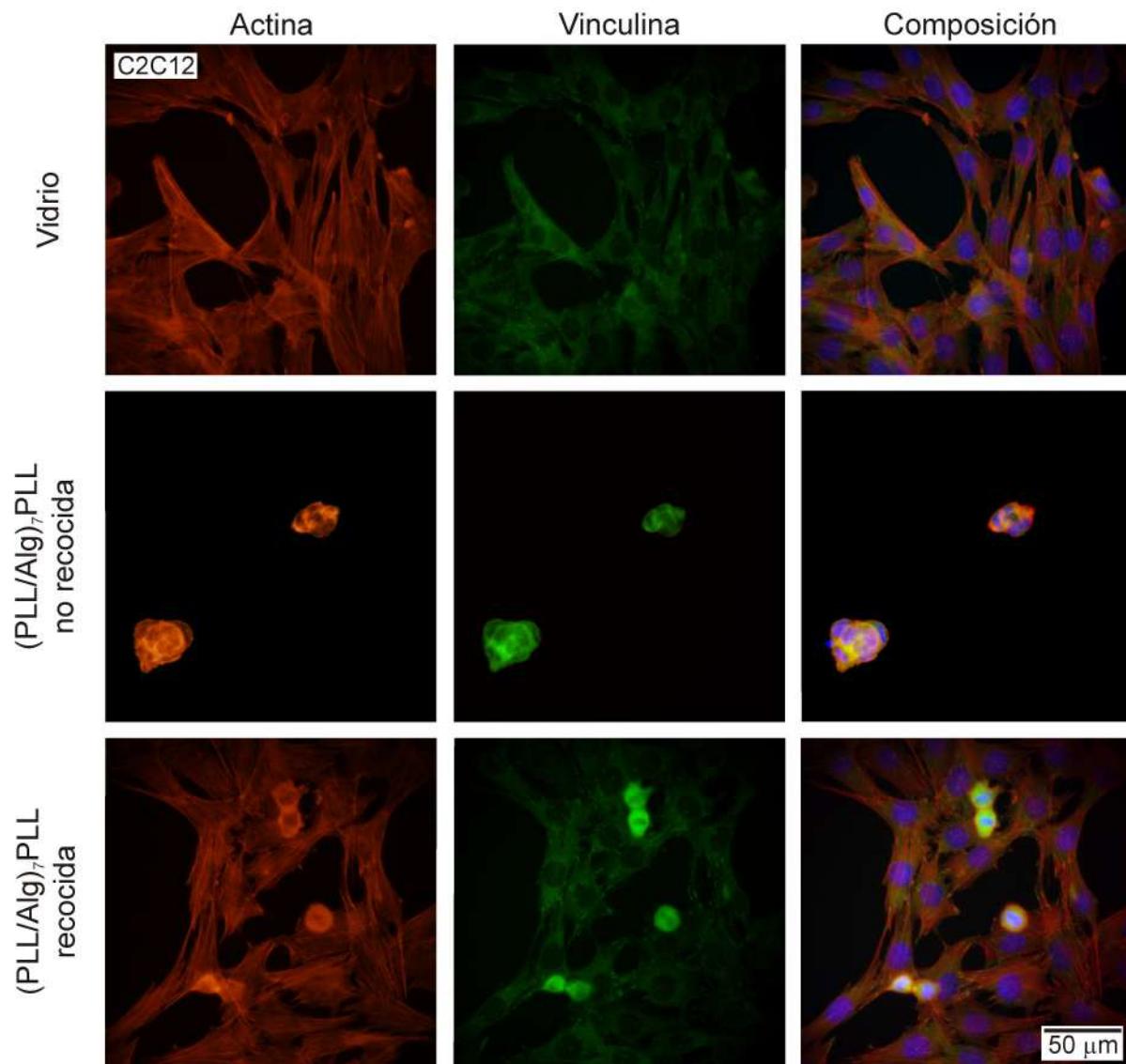


Figura 5.12: Imágenes de microscopía laser confocal de barrido de células C2C12 1 día después de la siembra sobre vidrio, películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no recocidas, y películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ recocidas.

recocidas, como se mostró en las figuras 5.11 y 5.12.

5.2.7. Gradiante térmico como estrategia para modular localmente las propiedades de la MPE

Empleando el sistema de gradiente térmico descripto en Materiales y métodos se sometió a las películas de $(PLL/Alg)_7PLL$ a una variación de temperatura aproximadamente lineal entre 10 y 50 °C a lo largo de 2 cm. El gradiente de temperatura resultante fue cercano a $0.002\text{ }^{\circ}\text{C }\mu\text{m}^{-1}$. Teniendo presente los resultados de la figura 5.2, un recocido a 24 °C durante 3 días de las multicapas de $(PLL/Alg)_7PLL$ no produce mejoras en la adhesión celular, por lo que es de esperar que el efecto del tratamiento sea bajo o nulo a bajas temperaturas y conforme se incremente la temperatura sea más apreciable.

El gradiente térmico produjo un cambio gradual en las propiedades fisicoquímicas a lo largo de la película de $(PLL/Alg)_7PLL$ de 2 cm de longitud (Figura 5.13). El ángulo de

Línea celular	Vidrio	(PLL/Alg) ₇ PLL no recocida	(PLL/Alg) ₇ PLL recocida
A549	$27.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$	$5.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$	$23.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$
C2C12	$39.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$	$12.1 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$	$37.9 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$

Tabla 5.2: Área total de vinculina por célula sobre vidrio y (PLL/Alg)₇PLL no recocidas y recocidas.

contacto medido sobre la película cada aproximadamente 5 mm mostró valores de 27° en el extremo de menor temperatura (16-20 °C), 54° en la región de temperatura intermedia (30-34 °C) y 70° en la región de mayor temperatura (42-46 °C, Figura 5.13a). El valor encontrado en la región de menor temperatura se asemeja al hallado sobre una película de (PLL/Alg)₇PLL sin tratar ($36 \pm 2.8^\circ$) y va aumentando conforme aumenta la temperatura del tratamiento, acercándose al valor de ángulo de contacto obtenido en las películas recocidas a 37 °C ($93 \pm 4.6^\circ$).

En cuanto a la adhesión celular, sobre la región tratada a mayor temperatura la adhesión de células C2C12 fue similar a la observada sobre vidrio, mientras que sobre la región tratada a baja temperatura la adhesión fue muy baja, similar a la que se encontró sobre películas de (PLL/Alg)₇PLL sin recocido (Figura 5.13b). Las variaciones más significativas en las áreas de adhesión se observaron en la región de 4 mm de longitud tratada a temperaturas entre 22 y 30 °C, teniendo las células sembradas sobre la región de 22-25 °C un área promedio de $260 \pm 15 \mu\text{m}^2$ y aquellas sembradas sobre la región tratada a 27-30 °C un área promedio de $715 \pm 20 \mu\text{m}^2$.

La cantidad de SAB conjugada con FITC adsorbida disminuyó yendo desde la región tratada a baja temperatura hacia la región tratada a alta temperatura, como se puede inferir de la intensidad de fluorescencia de las imágenes (Figura 5.13c). Este comportamiento se corresponde con lo observado mediante la QCM-D (Figura 5.6), donde se adsorbe 3 veces menos SAB en las multicapas recocidas que sobre las no recocidas.

5.2.8. Tratamiento térmico de multicapas (PLL/Dex)₇PLL

Las MPE de PLL/Dex presentan un comportamiento similar al encontrado para las multicapas de PLL/Alg (Figura 5.14). Las células A549 se adhirieron en forma escasa sobre las películas de (PLL/Dex)₇PLL sin recocer, presentaron citoesqueletos de actina desorganizados y difusos y áreas celulares en promedio 2 veces más pequeñas que las observadas en células sembradas sobre vidrio ($450 \mu\text{m}^2$ en la MPEs contra $870 \mu\text{m}^2$ sobre vidrio). Las células A549 sembradas sobre películas de PLL/Dex recocidas a 37 °C durante 3 días mostraron una buena adhesión, con fibras de actina que atravesaban todo el citoplasma y áreas celulares promedio similares a las del vidrio. Este ejemplo muestra que el recocido térmico podría utilizarse para mejorar la adhesión celular sobre sistemas similares, aunque también puede disminuir la adhesión celular como se muestra en el siguiente capítulo con las multicapas de Chi/HA.

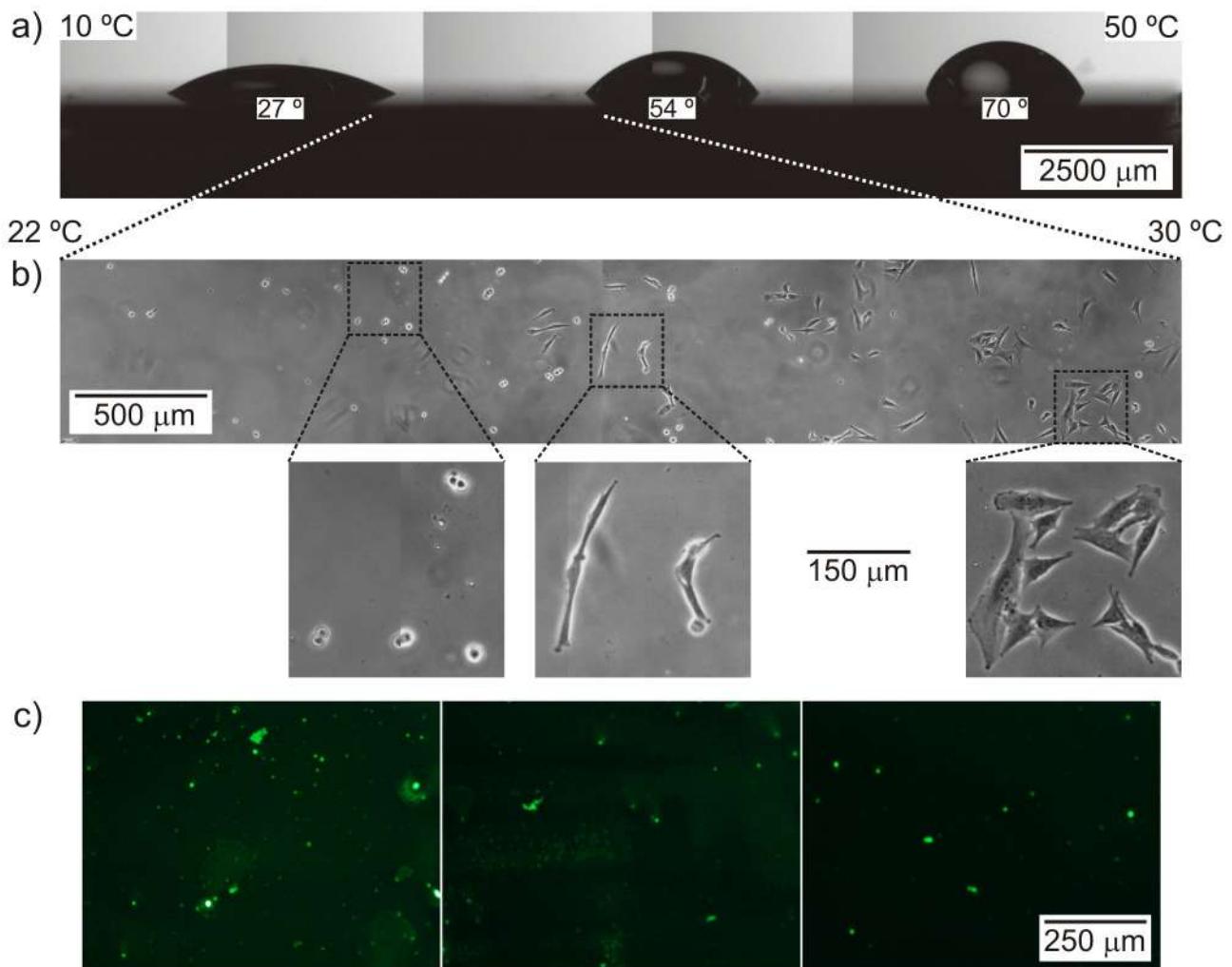


Figura 5.13: Efecto de la variación de temperatura de 10 °C a 50 °C a lo largo de 2 cm de una película de $(PLL/Alg)_7PLL$ sobre la mojabilidad de la superficie, la adhesión celular y la adsorción de SAB conjugada con FITC. a) Medidas de ángulo de contacto en distintos sitios de la MPE recocidos a distintas temperaturas. b) Imágenes de contraste de fase de células C2C12 adheridas sobre regiones de la película tratadas con temperaturas que van desde 22 °C a 30 °C. Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la MPE a lo largo del gradiente de temperatura entre 22-30 °C indicados por la línea de puntos que va de a) a b) producen cambios significativos en la adhesión celular. Las regiones dentro de los recuadros de líneas de punto se muestran ampliadas para apreciar mejor los cambios en la adhesión celular a lo largo del gradiente. c) SAB conjugada con FITC adsorbida en 3 regiones diferentes de la película recocida. La intensidad de la fluorescencia es mayor en las regiones tratadas a menores temperaturas.

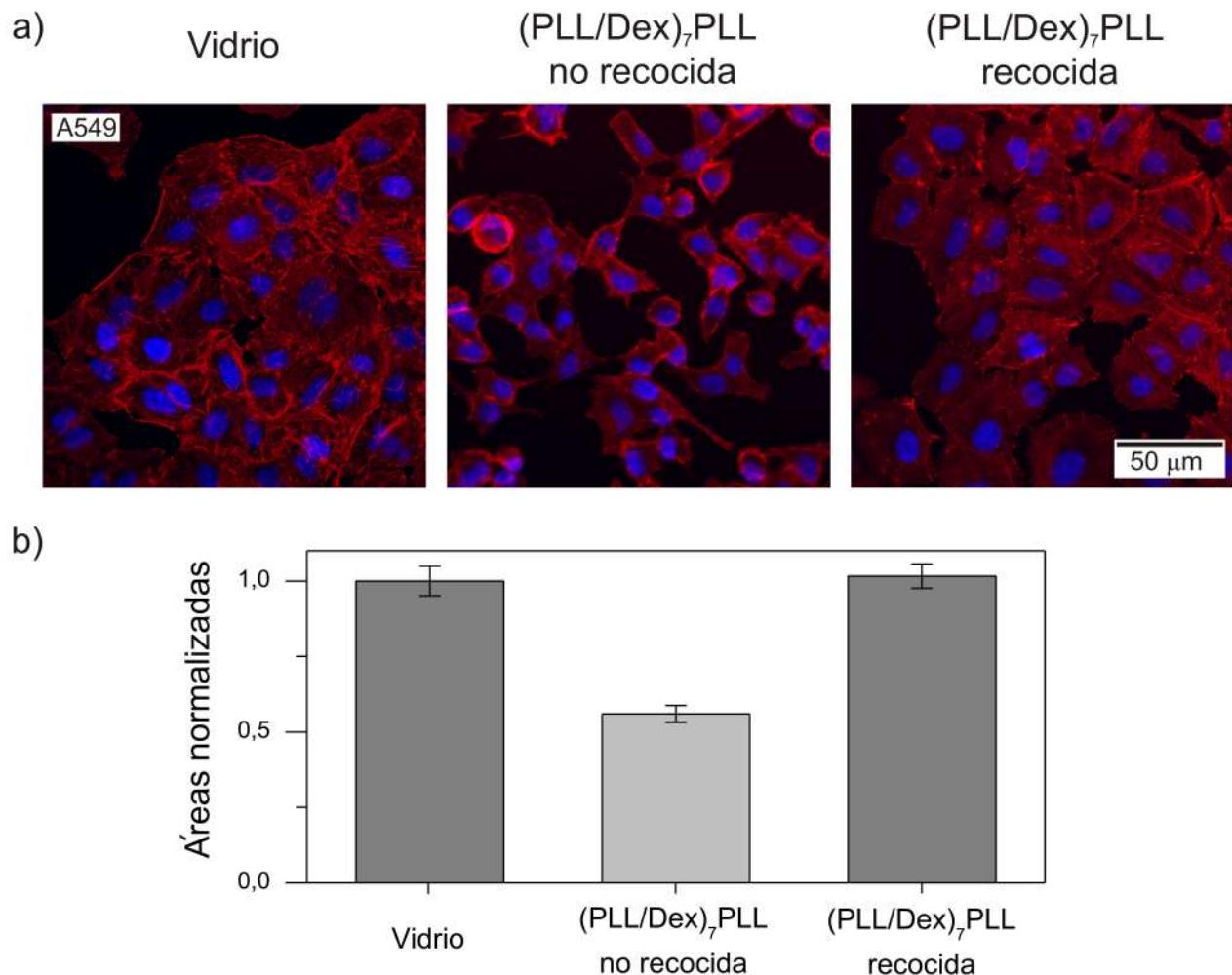


Figura 5.14: a) Imágenes de fluorescencia del citoesqueleto de actina (rojo) y núcleo celular (azul) de células A549 sembradas sobre vidrio, $(\text{PLL/Dex})_7\text{PLL}$ no recocida y $(\text{PLL/Dex})_7\text{PLL}$ recocida. b) Áreas celulares normalizadas de las células que se muestran en a).

5.3. Discusión

5.3.1. Reestructuración de la MPE durante el tratamiento térmico

En la literatura se reportó que las multicapas de PDADMAC y PSS en forma de cápsulas se reordenan y se contraen al tratarlas térmicamente, como consecuencia del movimiento de los polielectrolitos dentro de la película que tienden a maximizar la interacción entre especies de cargas opuestas [5.10, 5.11]. En este caso, las capas de polielectrolitos recién ensambladas tienen una estructura más o menos estratificada. La energía térmica facilita el movimiento de estas capas maximizando las interacciones electrostáticas, lo que probablemente resulta en la formación de complejos donde las interacciones entre policationes y polianiones son más fuertes. Los resultados mostrados en este capítulo evidencian un reordenamiento de las MPEs recocidas. La disminución de la rugosidad de la superficie y el aumento de rigidez invitan a pensar en un reordenamiento de los polielectrolitos que forman la multicapa.

El cambio en el ángulo de contacto indica que la superficie pasa de ser relativamente hidrofílica a hidrofóbica luego del calentamiento y refleja los cambios estructurales que ocurren en la MPE. Los datos de ensayos de adhesión realizados con películas de PLL/Alg tratadas a 37 °C durante 3 días pero inmersas en agua (Figura 5.2) mostraron que la adhesión celular no mejora como lo hace cuando el recocido se hace sobre la película en seco. Por lo tanto, el contenido de agua jugaría un rol fundamental en la reestructuración de la multicapa de polielectrolitos. De hecho, se ha demostrado recientemente que la deshidratación de los polielectrolitos y la ruptura de los puentes de hidrógeno entre el agua y los polielectrolitos aumenta la movilidad de los polímeros y conduce la transición vítreo observada al calentar MPEs y complejos de polielectrolitos [5.12]. El aumento en el valor del ángulo de contacto junto con la necesidad de que el tratamiento térmico deba realizarse en seco para ser efectivo indica que la película pierde agua durante el recocido. La disminución de la rugosidad de las multicapas recocidas junto con una menor cantidad de agua generaría una estructura más compacta y por lo tanto rígida, como se determinó en los experimentos de nanoindentación, y produce el mismo resultado que el entrecruzamiento químico en las MPEs [5.13, 5.14].

El potencial zeta levemente negativo de la película sin recocer (-1.3 mV) a pesar de que la última capa ensamblada es el policación PLL es indicativo de la interdigitación del PLL en las capas de Alg y de que algunos segmentos del polianión pueden protruir hacia la superficie de la película. Luego del recocido a 37 y 80 °C el potencial zeta se vuelve más negativo, alcanzando valores de -14.1 mV y -27 mV, respectivamente. Este cambio es coherente con una reestructuración de la multicapa. Si bien la fuerza impulsora de la reestructuración es la maximización de la interacción entre policación y polianión que generará un sistema menos cargado, la diferencia en el tamaño de cada polielectrolito explican el incremento en el valor negativo de la carga en la superficie de la MPE. Entonces, a pesar de que en el seno de la película las cargas de los polielectrolitos pueden estar más compensadas, una carga superficial neta permanece debido a la diferencia de pesos moleculares de los polímeros. La reestructuración implica que las cadenas de Alg, de un peso molecular máximo de 600 kD, queden más expuestas en la superficie y rodeen a las moléculas más pequeñas de PLL, de un peso molecular de 300 kD (Figura 5.15) [5.15]. Además se espera que el PLL, de menor peso molecular, tenga mayor capacidad de difundir hacia el interior de la MPE aumentando la interdigitación entre los polielectrolitos [5.16]. Esto podría explicar el exceso de carga superficial negativa.

El hecho de que luego del tratamiento térmico los grupos cargados del Alg están más presentes en la superficie no quiere decir que la densidad de grupos hidrofílicos expuestos

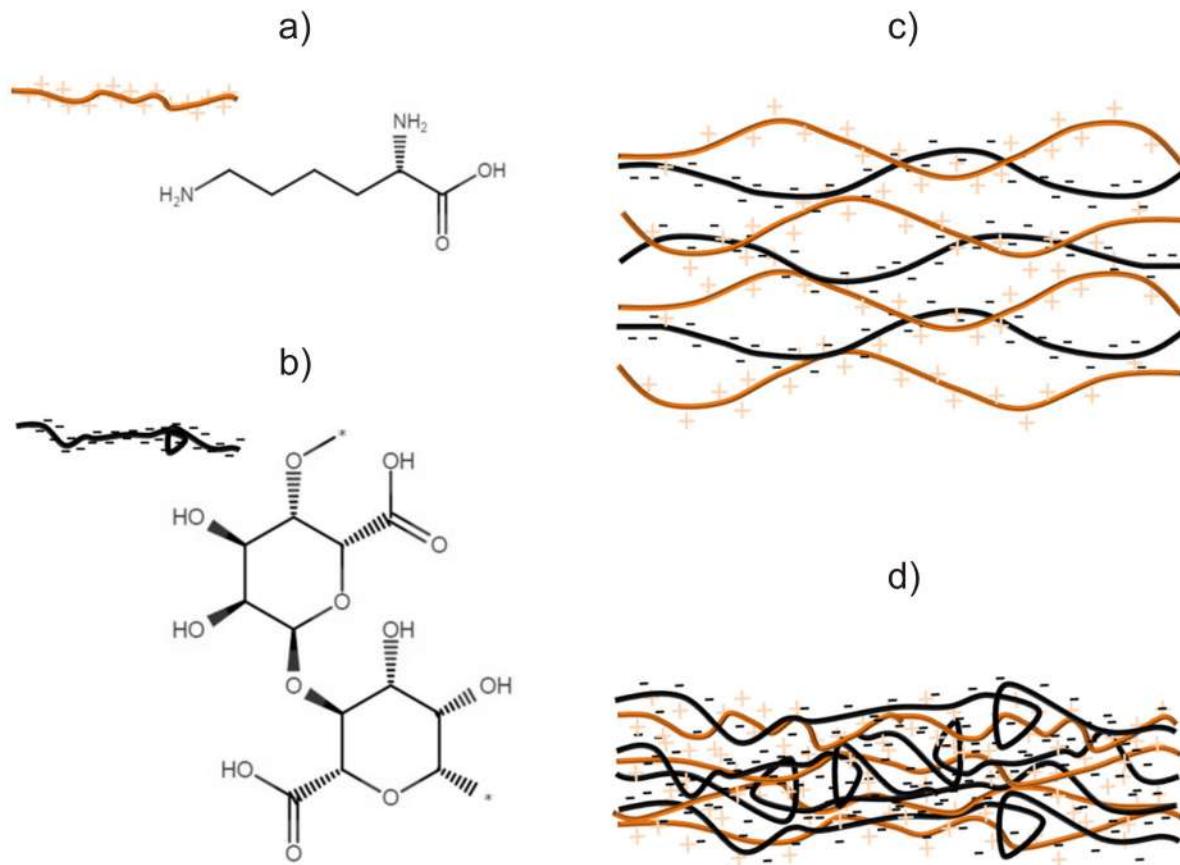


Figura 5.15: Representación de las estructuras químicas del PLL (a) y del Alg (b). Esquema de la estructura de la multicapa de PLL/Alg antes (c) y después (d) del recocido.

sea también mayor. De hecho, el aumento del ángulo de contacto indica que hay una menor densidad de grupos hidrofílicos en la superficie. Es importante señalar que la película está en contacto con el aire durante el proceso de recocido, por lo que una fuerza impulsora para el reordenamiento de los polímeros podría ser la disminución de la energía interfacial entre la superficie de la MPE y el aire, lo que llevaría a aumentar el número de grupos hidrofóbicos en la superficie [5.17].

Por otro lado, el recocido podría también inducir cambios en la química de las multicapas de PLL/Alg. Las medidas de XPS (Figura 5.5 y tabla 5.1), si bien no permiten descartar completamente un entrecruzamiento de las cadenas de polielectrolitos con el calentamiento, indican que la formación de enlaces amida promovida por calentamiento de las películas a temperaturas entre 37 y 80 °C es poco probable.

En resumen, las medidas de AFM, ángulo de contacto y potencial zeta indican un reordenamiento de la multicapa de polielectrolitos inducido por la temperatura, en el que los polímeros se mueven maximizando las interacciones electrostáticas y reduciendo la energía interfacial aire/MPE.

5.3.2. Adsorción de proteínas

Los estudios de adsorción de proteínas mediante QCM-D mostraron que las MPE recocidas a 37 °C adsorben aproximadamente 3 veces menos SAB que las películas no recocidas ($-\Delta F = -35$ Hz de las películas recocidas contra $-\Delta F = -100$ Hz de las no recocidas), mientras que adsorben un 80 % más de FN ($-\Delta F = -65$ Hz contra $-\Delta F = -35$ Hz). Las MPEs recocidas

a 80 °C adsorben aún menos SAB ($-\Delta F \sim -5$ Hz).

La SAB es una proteína de tamaño intermedio con respecto a las otras del plasma, tiene un peso 65 kDa, dimensiones de $7 \times 4 \times 4$ nm³, un punto isoeléctrico en el rango 4.8-5.1 [5.18, 5.19] y tiene cierta capacidad de reorientar su conformación al interactuar con ciertas superficies [5.20]. La fibronectina es una proteína relativamente más grande, de 440 kDa, con 20 nm de diámetro, un punto isoeléctrico entre 5.8-6.3 [5.18] y posee una gran flexibilidad y capacidad de cambiar de conformación [5.20]. Como los experimentos de adsorción de proteínas se hicieron en buffer HEPES pH 7.4, ambas proteínas estaban cargadas negativamente durante los ensayos de adsorción.

El recocido de la película de PLL/Alg aumenta el potencial zeta y la exposición de cadenas de Alg en la superficie, cambios que en principio, deberían volver a la superficie más resistente a la adsorción de proteínas. Se conoce que el alginato es resistente a la adsorción proteica [5.21, 5.22]. Además, la presencia de cargas negativas en la superficie podría disminuir la adsorción de proteínas cargadas negativamente como la SAB, que se adsorbe preferencialmente sobre superficies cargadas positivamente [5.23]. De todas maneras las proteínas no solo interactúan electrostáticamente con las superficies.

Por otro lado se sabe que la rugosidad de la superficie afecta la adsorción de proteínas, aunque depende de factores como el valor de rugosidad y características topográficas particulares. Por ejemplo se informó que la adhesión de SAB y FN en titanio nanoporoso con una rugosidad de 2.5 ± 0.4 nm es significativamente menor que en titanio más liso con rugosidad de 1.7 ± 0.2 nm [5.18]. Estos valores, si bien en el orden de los 4 nm para la MPE de (PLL/Alg)₇PLL sin recocer y a los 2 nm de la MPE recocida son difíciles de comparar ya que la topografía porosa de la titania difiere de la globular observada para las MPEs.

En otras publicaciones se reportó que la microrugosidad puede aumentar la cantidad de proteínas adsorbida [5.24]. En cuanto al efecto del ángulo de contacto, algunos trabajos indican que la adsorción de proteínas como la SAB es mayor en superficies más hidrofóbicas como es el caso de la película de PLL/Alg recocida [5.19]. A pesar de estos hechos, es de notar que se requiere un análisis más específico (para cada proteína) ya que se encontró que la correlación entre la adsorción proteica y la energía libre superficial es mejor que con el ángulo de contacto [5.24].

La disminución de la adsorción de SAB luego del recocido de la multicapa parecería estar relacionada principalmente a la presencia de Alg en la superficie de la película, que con su resistencia intrínseca a la adsorción proteica y sus grupos cargados negativamente, limitan la adsorción de esta proteína. Lo que sucede con el FN es algo más complicado. Por un lado a pesar de que en buffer PBS pH = 7.4 la FN tiene un potencial zeta de -5.7 mV, se conoce que se adsorbe cada vez en mayor cantidad en superficies con potencial superficial yendo de -28 a -121 mV [5.25]. Este comportamiento, contrario al esperado, se interpretó con una posible polarización de la proteína por parte de la superficie y es un ejemplo de lo complejas que pueden ser las interacciones de superficies con estas macromoléculas. Es importante notar que la FN es una proteína grande con dominios positivos y negativos bien marcados, y es capaz de cambiar de conformación y reorientarse al interactuar con la superficie y con moléculas vecinas, dependiendo de la densidad de moléculas de FN en la superficie [5.20]. A densidades de cubrimiento bajas, los dominios positivos de la FN estarán expuestos a la superficie cargada negativamente, y al aumentar la densidad las proteínas pueden reorientarse de tal manera de reducir las interacciones con la superficie y disminuir las fuerzas repulsivas con proteínas vecinas. Se necesitan más experimentos para estudiar cómo las interacciones proteína-superficie controlan no sólo la cantidad de proteína depositada sino su conformación.

5.3.3. Adhesión celular

La adhesión celular sobre un substrato depende de muchos factores, como la rugosidad o carga superficial, la hidrofilitad o la rigidez, entre otros. Las células adherentes son particularmente sensibles a la microrugosidad del substrato [5.26]. Las superficies con rugosidades en la escala submicrométrica y nanométrica en general promueven la adhesión y extensión celular [5.27–5.29]. Sin embargo, las células se adhieren mejor sobre las multicapas de PLL/Alg recocidas que son relativamente más lisas que las no recocidas, lo que sugiere que la rugosidad no es el factor más relevante en este sistema.

La mejora en las propiedades mecánicas es uno de los factores que podrían explicar la mejora de la adhesión celular. Las multicapas de PLL/Alg se reestructuran durante el tratamiento térmico, formando una estructura más densa y compacta con pérdida de agua, lo que da como resultado una película con un módulo de Young aparente un orden de magnitud mayor que las películas sin recocer. Se sabe que la rigidez del substrato es uno de los parámetros que determinan la adhesión celular en estos sistemas de polielectrolitos [5.30, 5.31] y una mejora en las propiedades mecánicas con el recocido daría cuenta del comportamiento observado de las células. Sin embargo, otros factores pueden afectar el modo en que las células sensan el substrato.

Además de los cambios en la carga superficial, el ángulo de contacto y la rigidez del substrato, la adsorción proteica también es un factor importante a tener cuenta para explicar los cambios en la adhesión celular. Cuando las células se adhieren sobre una superficie, no interactúan directamente con esta sino a través de las proteínas provenientes del medio de cultivo que se depositan en ella. No sólo la cantidad y conformación de las proteínas depositadas es importante para la adhesión celular, sino también la capacidad de las proteínas de ser reordenadas adecuadamente por las células [5.32]. Se observó que las proteínas adsorbidas sobre las superficies no polares hidrofóbicas, creadas mediante funcionalización de monocapas autoensambladas con grupos no polares como CH_3 y CF_3 en concentraciones altas, presentan interacciones proteína-proteína y proteína-substrato suficientemente fuertes e impiden la conformación adecuada de las proteínas para interactuar con las células [5.33]. Por otro lado, sobre substratos muy hidrofílicos las células no se adhieren debido a la interacción lábil de las proteínas con el substrato. Las células parecen adherirse mejor sobre superficies de hidrofobicidad/hidrofilitad intermedia. En el caso de las multicapas de PLL/Alg, las características estructurales de las proteínas depositadas sobre las superficies recocidas podrían tener un impacto positivo en las interacciones proteína-célula, mejorando la adhesión celular. Además, en el mismo sentido, otros trabajos informaron que superficies con ángulos de contacto cercanos a 90° , como el de las películas de PLL/Alg recocidas, exhiben buenas propiedades adhesivas como es el caso de osteoblastos humanos MG 63 sembrados sobre superficies modificadas de diamante [5.34].

De acuerdo a nuestros resultados, la mejora en la adhesión celular observada sobre las multicapas de PLL/Alg recocidas podría explicarse por un aumento en la rigidez de la película y una mejora en la adsorción de FN, una proteína de adhesión celular, en detrimento de una proteína no adhesiva como la SAB. La hidrofobicidad/hidrofilitad intermedia de las películas recocidas permitiría que estas proteínas estén en conformaciones adecuadas para favorecer la interacción con las células.

A pesar de estas posibles explicaciones, hay que tener en cuenta que la adhesión celular es un proceso muy complejo y se suele correr el riesgo de caer en razonamientos simplistas. Recientemente, por ejemplo, se comunicó que el ángulo de contacto no es un buen predictor de la respuesta biológica hacia la superficie de un material [5.35]. En cuanto a las propiedades mecánicas del substrato, las células no pueden sentir una superficie a lo que no se pueden

agarrar, por lo que un análisis de las fuerzas de adsorción y cantidad adsorbida de proteínas es necesario para interpretar la importancia de la rigidez del material [5.36]. Si la interacción de las proteínas con la superficie es lábil, las células no podrán adherirse independientemente de la rigidez del substrato. El caso de las proteínas es muy complejo, proteínas no adhesivas como la SAB pueden favorecer una conformación activa de las proteínas adhesivas cuando estas últimas se encuentra en baja cantidad [5.37]. La FN puede adsorberse formando estructuras globulares, incapaces de promover una buena adhesión y diferenciación celular, o redes fibrilares, que por su parecido con la MEC sí permiten la adhesión y la diferenciación de células C2C12 [5.38].

5.4. Conclusiones

El tratamiento térmico de multicapas de (PLL/Alg)₇PLL a 37 °C resulta en cambios significativos en las propiedades físicas y químicas de la MPEs. El recocido induce una topografía más lisa con un incremento significativo en la hidrofobicidad, lo que se ve en el cambio del ángulo de contacto de 36° a 93°. Además, el potencial zeta cambia de valores cercanos a 0 a -14.1 mV, y la MPE se vuelve más rígida aumentando el módulo de Young en un orden de magnitud. Todos estos cambios dan cuenta de una reestructuración de la multicapa durante el calentamiento, los polielectrolitos de cargas opuestas se mueven tendiendo a formar complejos que maximizan la compensación de carga a la vez que reducen la energía interfacial entre la superficie de la película y el aire.

Luego del tratamiento térmico la película se vuelve más resistente a la adsorción de SAB mientras promueve la adsorción de FN. También exhibe una mejora en la adhesión de células C2C12 y A549, mientras que las características de la adhesión de células BHK permanece inalterada. Las células C2C12 y A549 sembradas sobre MPEs recocidas presentan buenas áreas de adhesión y fibras de actina bien definidas, en contraste con las películas no recocidas. Consecuentemente, se espera que otros procesos celulares, como la migración y la proliferación se vean mejoradas en las MPEs recocidas. La mejora en la adhesión celular parece estar relacionada al aumento de rigidez de las películas, a la mayor adsorción de proteínas adhesivas en relación a proteínas no adhesivas y a una hidrofobicidad/hidrofilicidad óptima para una conformación adecuada de las proteínas.

Los resultados demuestran que el recocido de MPEs fabricados con polímeros biocompatibles como PLL/Alg y PLL/Dex puede ser aplicado para modular la adhesión celular de una manera simple y amigable, sin cambiar la composición química de la película ni utilizar procesos que involucran reactivos con distinto grado de toxicidad. Esta estrategia tiene potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Finalmente, la aplicación de un gradiente térmico con temperaturas en el rango 10-50 °C en películas de PLL/Alg permitió producir un cambio continuo en las propiedades de la película que afectan la adhesión celular. Las superficies con propiedades fisicoquímicas controladas espacialmente resultan importantes para producir materiales que imiten mejor la matriz extracelular que interactúa con las células. Estas superficies también son de particular interés para estudios básicos de la interacción de células y proteínas con superficies, ya que permiten evaluar el impacto del cambio gradual de determinada propiedad en un único experimento. La aplicación de gradientes térmicos para modificar localmente las propiedades fisicoquímicas de películas así como las características adhesivas de distintas líneas celulares puede ser extendida a otros sistemas poliméricos para aumentar la versatilidad de nuevos materiales destinados a evaluar más eficientemente las funcionalidades celulares.

Bibliografía

- [5.1] M. S. Kim, G. Khang & H. B. Lee. “Gradient polymer surfaces for biomedical applications”. *Progress in Polymer Science*, 2008. **33**(1), 138–164. (Citado en página 211.)
- [5.2] J. Almodóvar, T. Crouzier, Š. Selimović, T. Boudou, A. Khademhosseini, C. Picart, M. Lopez-Garcia, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger & J. P. Spatz. “Gradients of physical and biochemical cues on polyelectrolyte multilayer films generated via microfluidics”. *Lab on a Chip*, 2013. **13**(8), 1562. (Citado en página 211.)
- [5.3] K. Kirchhof, A. Andar, H. B. Yin, N. Gadegaard, M. O. Riehle, T. Groth, J. C. Voegel, C. Picart & C. Picart. “Polyelectrolyte multilayers generated in a microfluidic device with pH gradients direct adhesion and movement of cells”. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(19), 3326. (Citado en página 211.)
- [5.4] J. S. Martinez, A. M. Lehaf, J. B. Schlenoff & T. C. S. Keller. “Cell durotaxis on polyelectrolyte multilayers with photogenerated gradients of modulus”. *Biomacromolecules*, 2013. **14**(5), 1311–1320. (Citado en página 211.)
- [5.5] J. Almodóvar, R. Guillot, C. Monge, J. Vollaire, Š. Selimović, J. L. Coll, A. Khademhosseini & C. Picart. “Spatial patterning of BMP-2 and BMP-7 on biopolymeric films and the guidance of muscle cell fate”. *Biomaterials*, 2014. **35**(13), 3975–3985. (Citado en página 211.)
- [5.6] L. Han, Z. Mao, J. Wu, Y. Guo, T. Ren & C. Gao. “Directional cell migration through cell-cell interaction on polyelectrolyte multilayers with swelling gradients”. *Biomaterials*, 2013. **34**(4), 975–984. (Citado en páginas 72, 203 y 211.)
- [5.7] J. M. Silva, S. G. Caridade, N. M. Oliveira, R. L. Reis, J. F. Mano, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Frisch, C. Picart, M. D. Nagel & G. Dou. “Chitosan-alginate multilayered films with gradients of physicochemical cues”. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. **3**(22), 4555–4568. (Citado en página 211.)
- [5.8] G. Beamson & D. Briggs. “High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scienta ESCA300 Database”. *Journal of Chemical Education*, 1993. **70**(1), A25. (Citado en página 217.)
- [5.9] Q. Wang, editor. *Smart Materials for Tissue Engineering*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016. (Citado en páginas 29, 30, 31, 32, 33, 45, 46, 47, 48 y 224.)
- [5.10] K. Köhler, D. G. Shchukin, H. Möhwald & G. B. Sukhorukov. “Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number”. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005. **109**(39), 18250–18259. (Citado en página 229.)

- [5.11] K. Köhler, H. Möhwald & G. B. Sukhorukov. “Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules: 2. Insight into molecular mechanisms for the PDADMAC/PSS system”. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006. **110**(47), 24002–24010. (Citado en página 229.)
- [5.12] E. Yildirim, Y. Zhang, J. L. Lutkenhaus & M. Sammalkorpi. “Thermal Transitions in Polyelectrolyte Assemblies Occur via a Dehydration Mechanism”. *ACS Macro Letters*, 2015. **4**(9), 1017–1021. (Citado en página 229.)
- [5.13] K. Ren, T. Crouzier, C. Roy & C. Picart. “Polyelectrolyte Multilayer Films of Controlled Stiffness Modulate Myoblast Cell Differentiation”. *Advanced Functional Materials*, 2008. **18**(9), 1378–1389. (Citado en página 229.)
- [5.14] C. Pozos Vazquez, T. Boudou, V. Dulong, C. Nicolas, C. Picart & K. Glinel. “Variation of Polyelectrolyte Film Stiffness by Photo-Cross-Linking: A New Way To Control Cell Adhesion”. *Langmuir*, 2009. **25**(6), 3556–3563. (Citado en página 229.)
- [5.15] R. v. Klitzing, B. Kolarić, W. Jaeger, A. Brandt, R. A. Mackay, D. Langevin, G. Janink, C. Picot, M. Moan, C. Wolff, M. Rinaudo & P. G. de Gennes. “Structuring of poly(DADMAC) chains in aqueous media: a comparison between bulk and free-standing film measurements”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2002. **4**(10), 1907–1914. (Citado en página 229.)
- [5.16] E. Donath, D. Walther, V. N. Shilov, E. Knippel, A. Budde, K. Lowack, C. A. Helm & H. Möhwald. “Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles”. *Langmuir*, 1997. **13**(13), 5294–5305. (Citado en páginas 205 y 229.)
- [5.17] K. Köhler, D. G. Shchukin, H. Möhwald & G. B. Sukhorukov. “Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number”. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005. **109**(39), 18250–18259. (Citado en páginas 230 y 256.)
- [5.18] L. Richert, F. Variola, F. Rosei, J. D. Wuest & A. Nanci. “Adsorption of proteins on nanoporous Ti surfaces”. *Surface Science*, 2010. **604**(17-18), 1445–1451. (Citado en página 231.)
- [5.19] J. K. And & G. A. Somorjai. “Molecular Packing of Lysozyme, Fibrinogen, and Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Studied by Infrared-Visible Sum Frequency Generation and Fluorescence Microscopy”. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(10), 3150–3158. (Citado en página 231.)
- [5.20] M. Rabe, D. Verdes & S. Seeger. “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces”. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011. **162**(1-2), 87–106. (Citado en página 231.)
- [5.21] J. Zhou, G. Romero, E. Rojas, L. Ma, S. Moya & C. Gao. “Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting.” *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **345**(2), 241–7. (Citado en páginas 231 y 239.)

- [5.22] K. Zhao, X. Zhang, J. Wei, J. Li, X. Zhou, D. Liu, Z. Liu & J. Li. “Calcium alginate hydrogel filtration membrane with excellent anti-fouling property and controlled separation performance”. *Journal of Membrane Science*, 2015. **492**, 536–546. (Citado en página 231.)
- [5.23] S. Guo, X. Zhu, M. Li, L. Shi, J. L. T. Ong, D. Janczewski & K. G. Neoh. “Parallel Control over Surface Charge and Wettability Using Polyelectrolyte Architecture: Effect on Protein Adsorption and Cell Adhesion”. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2016. **8**(44), 30552–30563. (Citado en página 231.)
- [5.24] M. Pegueroles, C. Aparicio, M. Bosio, E. Engel, F. Gil, J. Planell & G. Altankov. “Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy”. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(1), 291–301. (Citado en página 231.)
- [5.25] J. H. Lin, H. Y. Chang, W. L. Kao, K. Y. Lin, H. Y. Liao, Y. W. You, Y. T. Kuo, D. Y. Kuo, K. J. Chu, Y. H. Chu & J. J. Shyue. “Effect of Surface Potential on Extracellular Matrix Protein Adsorption”. *Langmuir*, 2014. **30**(34), 10328–10335. (Citado en página 231.)
- [5.26] R. L. Sammons, N. Lumbikanonda, M. Gross & P. Cantzler. “Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration”. *Clinical Oral Implants Research*, 2005. **16**(6), 657–666. (Citado en página 232.)
- [5.27] E. Martínez, E. Engel, J. Planell & J. Samitier. “Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour”. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 2009. **191**(1), 126–135. (Citado en página 232.)
- [5.28] D. H. Kim, P. P. Provenzano, C. L. Smith & A. Levchenko. “Matrix nanotopography as a regulator of cell function”. *The Journal of Cell Biology*, 2012. **197**(3), 351–360. (Citado en páginas 232 y 268.)
- [5.29] W. Chen, L. G. Villa-Diaz, Y. Sun, S. Weng, J. K. Kim, R. H. W. Lam, L. Han, R. Fan, P. H. Krebsbach & J. Fu. “Nanotopography Influences Adhesion, Spreading, and Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells”. *ACS Nano*, 2012. **6**(5), 4094–4103. (Citado en página 232.)
- [5.30] V. Gribova, R. Auzely-Velty & C. Picart. “Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering”. *Chemistry of Materials*, 2012. **24**(5), 854–869. (Citado en páginas 181 y 232.)
- [5.31] A. L. Hillberg, C. A. Holmes & M. Tabrizian. “Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films.” *Biomaterials*, 2009. **30**(27), 4463–70. (Citado en páginas 72, 181, 190, 232 y 256.)
- [5.32] J. D. Mih, A. Marinkovic, F. Liu, A. S. Sharif & D. J. Tschumperlin. “Matrix stiffness reverses the effect of actomyosin tension on cell proliferation”. *Journal of Cell Science*, 2013. **125**(24). (Citado en página 232.)
- [5.33] G. Anand, S. Sharma, A. K. Dutta, S. K. Kumar & G. Belfort. “Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity”. *Langmuir*, 2010. **26**(13), 10803–10811. (Citado en página 232.)

- [5.34] M. Kopecek, L. Bacakova, J. Vacik, F. Fendrych, V. Vorlicek, I. Kratochvilova, V. Lisa, E. Van Hove, C. Mer, P. Bergonzo & M. Nesladek. “Improved adhesion, growth and maturation of human bone-derived cells on nanocrystalline diamond films”. *physica status solidi (a)*, 2008. **205**(9), 2146–2153. (Citado en página 232.)
- [5.35] M. R. Alexander & P. Williams. “Water contact angle is not a good predictor of biological responses to materials”. *Biointerphases*, 2017. **12**(2), 02C201. (Citado en páginas 32 y 232.)
- [5.36] C. J. Arias, R. L. Surmaitis & J. B. Schlenoff. “Cell Adhesion and Proliferation on the “Living” Surface of a Polyelectrolyte Multilayer”. *Langmuir*, 2016. **32**(21), 5412–5421. (Citado en páginas 31, 33, 233 y 256.)
- [5.37] J. E. Koblinski, M. Wu, B. Demeler, K. Jacob & H. K. Kleinman. “Matrix cell adhesion activation by non-adhesion proteins”. *Journal of Cell Science*, 2005. **118**(13), 2965–74. (Citado en página 233.)
- [5.38] M. Salmerón-Sánchez, P. Rico, D. Moratal, T. T. Lee, J. E. Schwarzbauer & A. J. García. “Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation”. *Biomaterials*, 2011. **32**(8), 2099–2105. (Citado en página 233.)

Capítulo 6

Efecto del recocido de las películas de polielectrolitos en las propiedades fisicoquímicas de las películas y en la adhesión celular: sistema Chi/HA

6.1. Introducción

La deposición de proteínas u otras biomoléculas y la formación de biopelículas suele ser un problema en el diseño de las interfasas de dispositivos biomédicos que están en contacto con fluídos biológicos. Esto puede llegar a comprometer severamente el uso de estos artefactos ya que la presencia de proteínas o bacterias puede generar respuestas biológicas no deseadas o infecciones [6.1, 6.2]. También suele ser necesario restringir la adhesión celular sobre la superficie de dispositivos médicos, por ejemplo, en instrumentos quirúrgicos tanto durante como luego de la intervención [6.3, 6.4]. A lo largo de los años, la funcionalización de las superficies para hacerlas resistentes a la adsorción proteica y a la adhesión de células siguió diversas estrategias, como pegilación, uso de surfactantes anfifílicos, recubrimiento con biopolímeros, deposición atómica de capas, etc. [6.5–6.8]. La efectividad de cada estrategia depende principalmente del grado de cobertura de las superficies y de la estabilidad de los recubrimientos en el tiempo.

La técnica de capa por capa se utilizó para producir recubrimientos con propiedades antibacterianas, capaces de matar a las bacterias por contacto, inhibir su adhesión o liberar agentes antibacterianos [6.9, 6.10]. El control de la adhesión de células mamíferas y bacterianas constituye todo un desafío en el desarrollo e implementación de nuevos materiales que estén en contacto con ambientes biológicos [6.11]. Dentro de los nuevos materiales, los recubrimientos a base de polisacáridos resultan interesantes por su biocompatibilidad, disponibilidad, resistencia a la adsorción proteica y propiedades antibacterianas [6.12, 6.13]. Las superficies recubiertas de quitosano, por ejemplo, presentan una limitada deposición de proteínas y tienen propiedades bactericidas [6.14, 6.15]. Los recubrimientos de ácido hialurónico se utilizan para prevenir las adhesiones de implantes con otros tejidos y órganos durante o luego de la intervención quirúrgica, y además resisten la adhesión bacteriana [6.13]. La técnica CpC ofrece una manera sencilla de ensamblar quitosano, un polímero, con otros biopolímeros que posean cargas negativas, como el alginato y el ácido hialurónico, resultando en superficies estables y resistentes a la deposición de proteínas y la adhesión de células [6.16–6.18].

Como se describió en el capítulo anterior, el recocido térmico de MPEs de PLL/Alg y PLL/Dex mejora la adhesión celular. Además, para el caso de las películas de PLL/Alg, se observó una disminución en la adsorción de BSA y un aumento en la adsorción de FN, un aumento en la rigidez e hidrofobicidad de la superficie y una carga superficial más negativa. Estos cambios en las propiedades de las MPEs con el recocido térmico son particulares del sistema PLL/Alg. Y si bien es de esperar que el recocido afecte las propiedades de cualquier sistema polimérico, debe ser estudiado para cada sistema particular.

En este capítulo se describe el efecto del recocido de MPEs de quitosano y ácido hialurónico en relación a la adsorción proteica y a la adhesión de células eucariotas y procariotas. Se mostrará que las multicapas de Chi/HA presentan una limitada adsorción proteica y adhesión celular, y que el recocido aumenta aún más esta resistencia. Para estos estudios se evaluó la adsorción de dos proteínas y la adhesión de 4 líneas celulares eucariotas y 2 tipos de bacteria distintos. Como en los capítulos anteriores la microbalanza de cristal de cuarzo se utilizó para estudiar el crecimiento y estabilidad de las multicapas, que se caracterizaron por microscopía de fuerza atómica, ángulo de contacto, potencial zeta y dicroísmo circular. Tanto las películas no recocidas como las recocidas presentaron superficies negativas e hidrofílicas, con muy baja deposición de proteínas y resistentes a la adhesión de células eucariotas y bacterianas. El recocido produjo cambios en la topografía de las superficies, que la hacen aún más resistentes a la adhesión celular y al coco Gram-positivo *S. aureus*. El recocido de multicapas de Chi/HA modifica las interacciones célula-película y podría usarse como un método alternativo y amigable para la modificación de superficies con aplicaciones biológicas.

6.2. Resultados

6.2.1. Ensamblado, recocido y caracterización de las películas de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$

Ensamblado y estabilidad estudiados por QCM-D

El ensamblado de las multicapas de Chi/HA debe realizarse a pH levemente ácido para garantizar que los polielectrolitos estén cargados y así, mediante interacciones electrostáticas puedan ensamblarse. Los resultados de la QCM-D obtenidos del ensamblado de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ en buffer Acetato 10 mM y NaCl 150 mM (pH = 5) se muestran en la figura 6.1. La frecuencia (ΔF) disminuyó luego del ensamblado de cada polielectrolito siguiendo un comportamiento quasi-exponencial con el número de capas (Figuras 6.1 y 6.2a). Luego del ensamblado de la última capa de polielectrolito (policatión) se lavó la película con buffer Acetato y una vez estabilizada la señal se hizo fluir buffer HEPES (pH = 7.4) por la celda de la QCM-D para evaluar la estabilidad de la película en pH fisiológico. La frecuencia aumentó alrededor de 60 Hz, aproximadamente un 20 % del cambio de frecuencia total medida inmediatamente luego del ensamblado de la multicapa, y permaneció estable con un $\Delta F = -250$ Hz durante 2000 min. Esto indica que parte de la película se removió en el medio fisiológico del cultivo celular, pero el substrato permaneció cubierto por el remanente de la película ensamblada. De hecho, al retirar el cristal de SiO_2 de la microbalanza luego del ensamblado y lavado con los dos buffers se observó un depósito blanco. Es importante destacar que tanto en el buffer HEPES como en el buffer Acetato, la mayor parte de las especies iónicas corresponden al NaCl, por lo que el cambio de pH de uno a otro debe ser el factor más importante que lleva al desensamblado de una parte de la película. Un segundo ciclo de lavado con buffer Acetato/buffer HEPES produce un cambio de frecuencia menor y

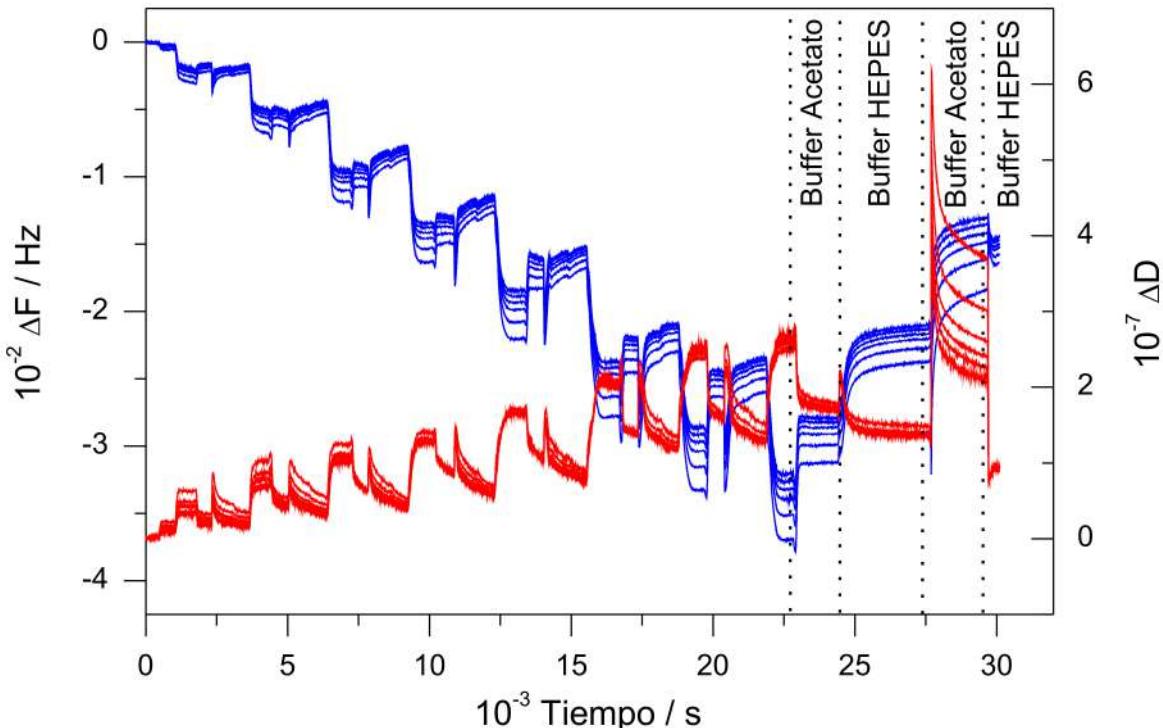


Figura 6.1: Ensamblado de una multicapa de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ seguida por QCM-D. Los cambios de frecuencia (azul) y los de disipación (rojo) corresponden al 3.^o, 5.^o, 7.^o, 9.^o, 11.^o y 13.^o armónicos. Las líneas de puntos indican el flujo de buffer Acetato y buffer HEPES luego del ensamblado. Puede apreciarse un aumento de ΔF con los sucesivos lavados.

por lo tanto la masa desprendida de la multicapa es también menor.

Dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (DC) es muy útil en la caracterización de péptidos [6.19], y en algunas publicaciones se la usó para seguir el ensamblado de las MPEs [6.20, 6.21], en las que se demostró que la señal de dicroísmo circular aumenta con el número de capas depositadas. Las medidas de DC fueron realizadas sobre multicapas recién ensambladas y luego de 1 y 2 días de recocido a 37 °C (Figura 6.2b). Puede observarse que a bajas longitudes de onda, los ángulos de DC se vuelven cada vez más negativos a medida que aumenta el tiempo de recocido. Los resultados representados en la figura 6.2 muestran un incremento en la señal de DC ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) con el tiempo de recocido. En este caso, sin aumento en el número de capas de polielectrolito, la disminución en la señal podría interpretarse como una densificación de la MPE. Al igual que en el sistema de PLL/Alg descrito en el capítulo anterior, el proceso de recocido genera una película más compacta.

Medidas de ángulo de contacto y potencial zeta

Las películas de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ son hidrofílicas, tanto antes y después del recocido, con valores de ángulo de contacto de $30.2 \pm 0.3^\circ$ y $20.6 \pm 1.8^\circ$ respectivamente (Tabla 6.1). El recocido aumenta levemente, el carácter hidrofílico de estas películas a diferencia de lo que ocurre con las MPEs de PLL/Alg, donde aumenta el carácter hidrofóbico.

Las medidas de potencial zeta (Tabla 6.1) muestran que el signo y valor de la carga de las multicapas de Chi/HA son dependientes del medio en el que se realizaron las determinaciones.

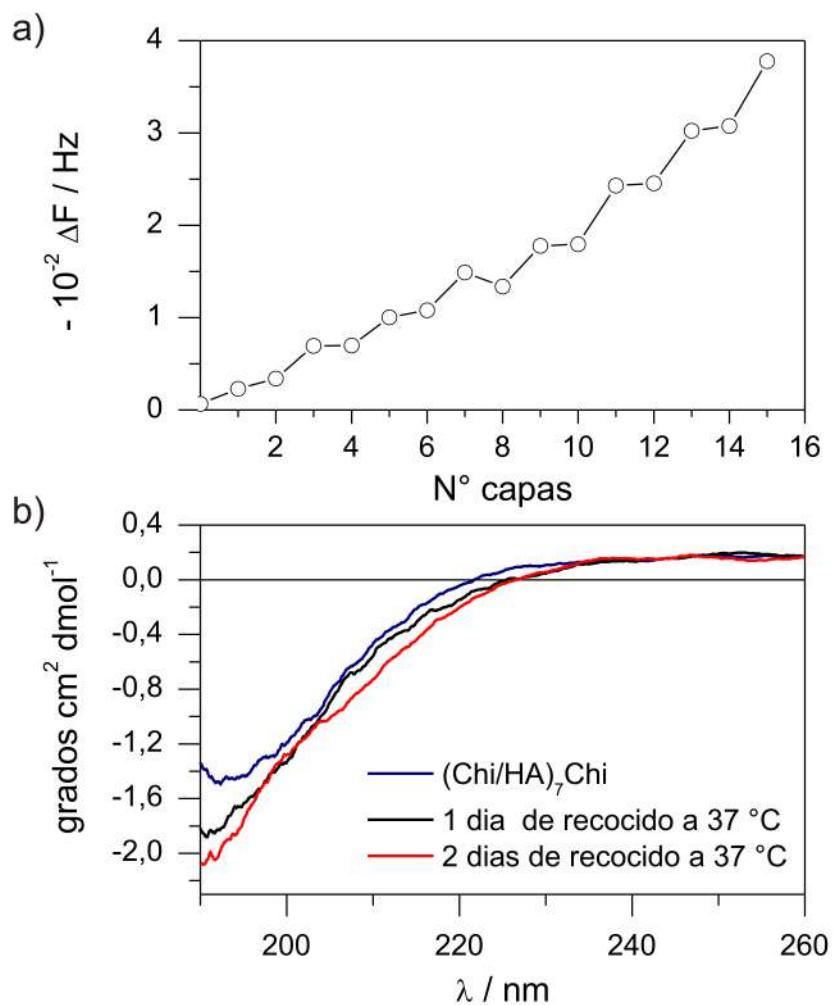


Figura 6.2: a) $-\Delta F$ en función del número de capas para el ensamblado de la película de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$. Puede observarse el crecimiento exponencial. b) Espectro de DC de MPE $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recién ensamblada y luego de 1 y 2 días de recocido a 37 °C, como se indica en la figura.

(Chi/HA) ₇ Chi	Potencial zeta		Ángulo de contacto
	Buffer HEPES	Buffer Acetato	
No recocida	-24 mV	25 mV	30.2 ± 0.3°
Recocida	-31 mV	18 mV	20.6 ± 1.8°

Tabla 6.1: *Medidas de ángulo de contacto de películas de (Chi/HA)₇Chi y de potencial zeta en buffer HEPES y Acetato de partículas recubiertas con MPE (Chi/HA)₇Chi.*

Cada buffer está compuesto por distintos iones y tienen distintos pH bien definidos, e inducen cambios en la película y en los grados de ionización de los polielectrolitos en pH ácido o fisiológico. Mientras que en buffer Acetato el potencial es positivo, en buffer HEPES este es negativo. Tanto el Chi como el HA son polielectrolitos débiles con valores de pKa ~ 6 [6.22] y pKa ~ 3-4 [6.23] respectivamente, por lo que un cambio de pH de 5 a 7.4 producirá sobre todo una gran disminución de la densidad de carga positiva del Chi, confiriendo a la película un potencial zeta negativo debido a la abundancia de cargas negativas del HA [6.24, 6.25].

El desensamblado de algunas capas de la película en buffer HEPES, así como el intercambio entre las especies iónicas presentes en cada buffer podría contribuir también al cambio en el potencial zeta. El recocido no afecta el signo del potencial zeta pero sí afecta su valor, volviéndolo aún más negativo en buffer HEPES (de -24 a -31 después del recocido) y más pequeño en buffer Acetato (de 25 a 18 después del recocido). Como se describió en el caso del recocido del PLL/Alg el hecho de que el polianión tenga un mayor PM que el poliacidón, 1500-2200 kDa del HA contra 100-300 kDa del Chi, podría explicar por qué el recocido las películas de Chi/HA afecta su potencial zeta. El aumento de temperatura facilitaría la movilidad de las cadenas de polielectrolitos, permitiendo que los residuos cargados del HA queden expuestos en la superficie.

Características topográficas y medidas de rigidez

Las imágenes de AFM de MPEs de (Chi/HA)₇Chi no recocidas y recocidas se adquirieron luego de sumergir las películas en buffer HEPES durante 40 minutos, lavarlas con agua destilada y dejarlas secar en aire. La inmersión en buffer HEPES se realizó para obtener condiciones de las películas en condiciones más cercanas a las que tiene la película en el medio de cultivo celular. En la figura 6.3a-f se muestran ambas superficies en tres escalas diferentes, correspondiendo a imágenes de 50x50 μm^2 , 5x5 μm^2 y 1x1 μm^2 . Se puede observar que luego del recocido las superficies se vuelven menos rugosas en la submicro y nanoescala. En la escala más grande la película sin tratar presenta numerosos picos con alturas de entre 10-20 nm, y protrusiones más grandes que alcanzan los 45-90 nm de altura, separadas una distancia entre 10 a 15 μm (Figura 6.3g). En cambio la película tratada térmicamente exhibe una superficie lisa interrumpida por grandes protrusiones de 60-150 nm de altura con una separación cercana a los 20 μm . En las imágenes a escalas más pequeñas, se observa que las películas recocidas presentan una topografía formando una red fibrilar que recuerda a un fractal. La altura promedio de esta red es de 7.2 ± 1.2 nm, bastante más planas que las películas no recocidas que a esa escala tienen una altura promedio de 15.9 nm (Figura 6.3h). Las estructuras en forma de red de la película no recocida tienen un largo de 0.2-0.7 μm , una separación media o valles de 1 μm y alturas que van desde los 10 a los 20 nm, mientras que las estructuras fibrilares que presenta la MPE recocida son significativamente más pequeñas, con 0.1-0.3 μm de largo, 0.1 μm de separación y 5-12 nm de altura.

La rugosidad (Rms) calculada a partir de las imágenes de 5x5 μm^2 tiene un valor de 9.4 ± 0.6 nm para las películas sin recocer y de 3.3 ± 0.1 nm para las recocidas (Figura

6.3i). Entonces, como consecuencia del recocido la superficie de las multicapas se vuelve menos rugosa y más bidimensional, a la vez que se cubre más homogéneamente por la red de polímeros. Las distribución de alturas (Figura 6.3j) concide con estas observaciones. Para el caso de las MPEs recocidas se observa un sólo máximo cercano a 5 nm por lo que son bastante homogéneas, mientras que las no recocidas tienen un pico agudo a 5-6 nm y una meseta que va desde 8 a 20 nm, lo que indica una superficie más rugosa y heterogénea.

La rigidez de las MPEs de Chi/HA antes y después del recocido se estudió a través de medidas de nanoindentación. Aplicando el modelo de Hertz para ajustar las curvas de f-d se hizo una estimación del módulo de Young. A diferencia de lo observado en el sistema PLL/Alg, no se encontró una diferencia significativa entre la rigidez de las películas de Chi/HA recocidas y no recocidas.

6.2.2. Propiedades antiadhesivas

Adsorción proteíca

Como en el capítulo anterior, se utilizaron SAB y FN como proteínas modelo para estudiar el efecto del recocido de las películas sobre la adsorción proteica. Las soluciones de SAB y FN se prepararon en buffer HEPES a una concentración final de 1 mg mL^{-1} y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Sobre las muestras de Chi/HA colocadas en las celdas de la microbalanza se hizo pasar primero buffer Acetato, luego buffer HEPES y luego la solución de proteína. Mediante la técnica de QCM-D no pudo detectarse adsorción de SAB (Figura 6.4) ni de FN (Figura 6.5) sobre las películas de Chi/HA, independientemente del recocido o no de las MPEs.

Por otro lado, los datos de DC muestran una pequeña adsorción de FN tanto sobre las películas recocidas como sobre las no recocidas (Figura 6.6). Es importante notar que para realizar las medidas de DC, la multicapa se ensambla sobre cubreobjetos de cuarzo para microscopía, se sumerge durante 40 min en la solución de proteína en buffer HEPES, luego se enjuaga con agua y finalmente se seca con pasaje de nitrógeno antes de medir. Este procedimiento difiere del empleado en las medidas de QCM-D en las que siempre hay líquido en la celda. La presencia de FN en las MPEs se pone de manifiesto por DC debido a la aparición de pequeños picos en el espectro en los rangos de 230-210 nm y 190-180 nm, los que se ven más claramente en la MPE no recocida (Figura 6.6). Los dos hombros que aparecen en el rango de 230-210 nm son característicos de una conformación α -hélice de las proteínas. Este hecho podría indicar que la FN se adsorbe en conformaciones diferentes sobre la MPE tratada y sobre la no tratada.

Adhesión de células de mamíferos

Las células utilizadas en estos experimentos son de naturalezas muy distintas: células tumorales de pulmón humano (A549), fibroblastos de riñón de hamster (BHK), osteoblastos (MC3T3-E1) y mioblastos de ratón (C2C12). Las tres últimas tienen morfologías más ahuesadas, mientras que la primera tiende a parecerse más a poliedros regulares. Los parámetros morfológicos obtenidos sobre una superficie control de vidrio dan cuenta de estas características (Figuras 6.7, 6.8, 6.11 y 6.10).

Las MPEs de Chi/HA producen un efecto significativo sobre la adhesión celular (Figuras 6.7, 6.8, 6.11 y 6.10). Las células A549 presentan poca adhesión sobre estas MPEs, ya sean recocidas o no recocidas (Figura 6.7a), con un área promedio cercana a $310 \mu\text{m}^2$, lejos de los $800 \mu\text{m}^2$ encontrados para las A549 sembradas sobre vidrio (Figura 6.7b). Sobre vidrio las células tuvieron valores de relaciones de aspecto y redondez de 1.6-1.7, y estos disminuyeron

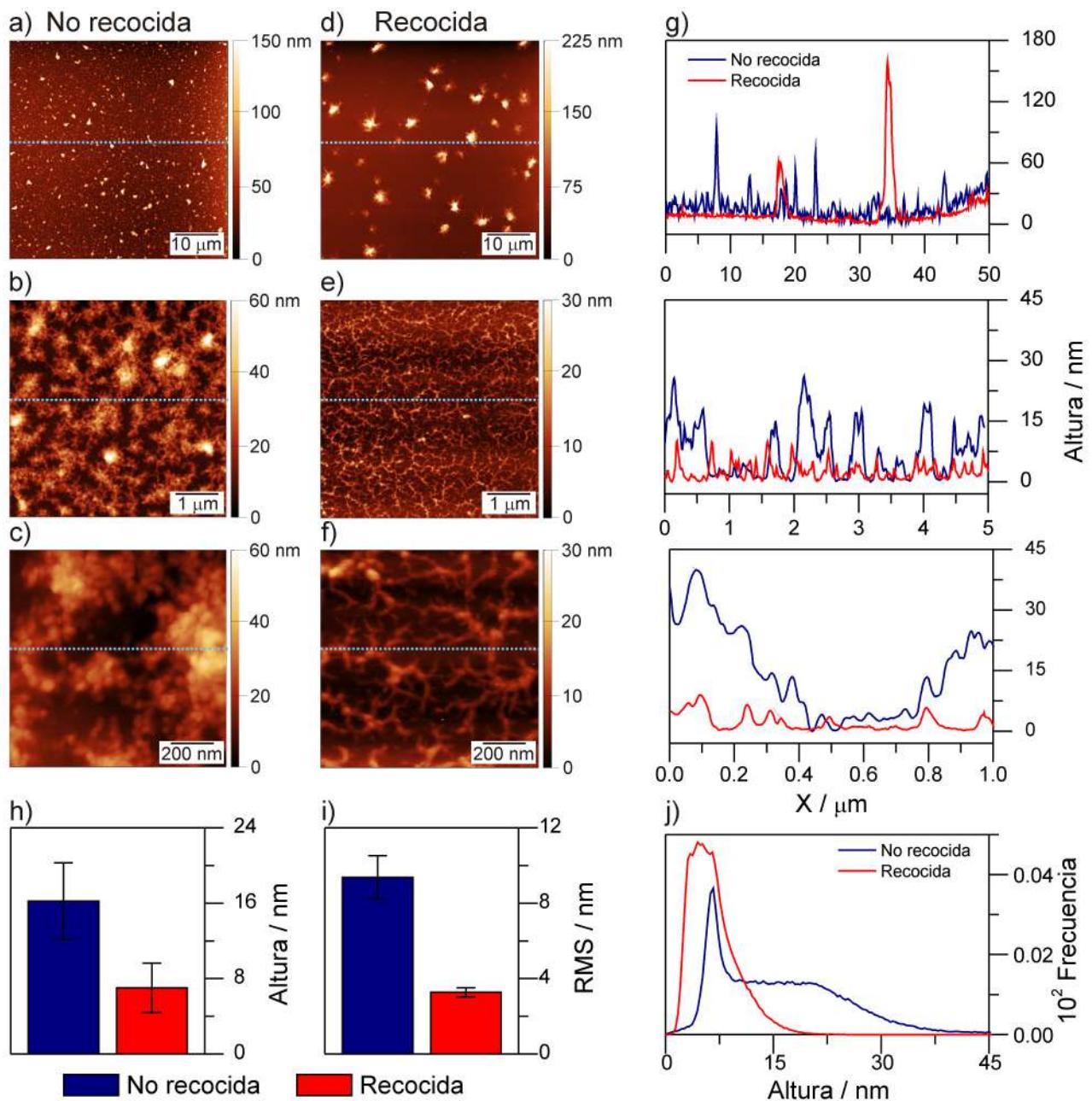


Figura 6.3: Imágenes de AFM de multicapas de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ tomadas con diferentes aumentos: MPE no recocidas (a-c) y MPE recocidas (d-f). Perfiles de altura indicados por la línea de puntos celeste se muestran en (h) para películas sin recocer (azul) y recocidas (rojo). Altura (i) y rugosidad (j) promedio. Distribuciones de altura para multicapas no recocidas y recocidas (k).

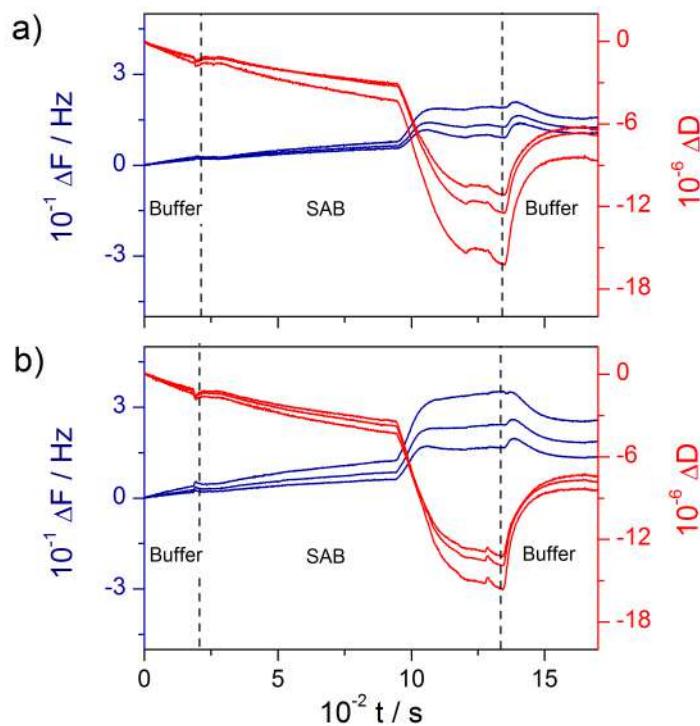


Figura 6.4: Datos de QCM-D para el 3.^o, 5.^o y 7.^o armónico para la adsorción de SAB sobre multicapas de (Chi/HA)₇Chi no recocidas (a) y recocidas (b).

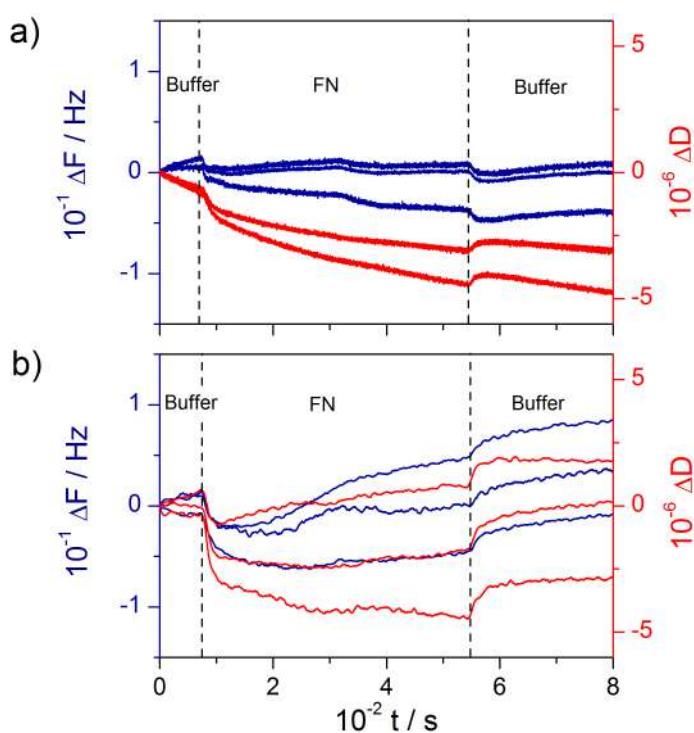


Figura 6.5: Curvas de QCM-D para el 3.^o, 5.^o y 7.^o armónico para la adsorción de FN sobre multicapas de (Chi/HA)₇Chi no recocidas (a) y recocidas (b).

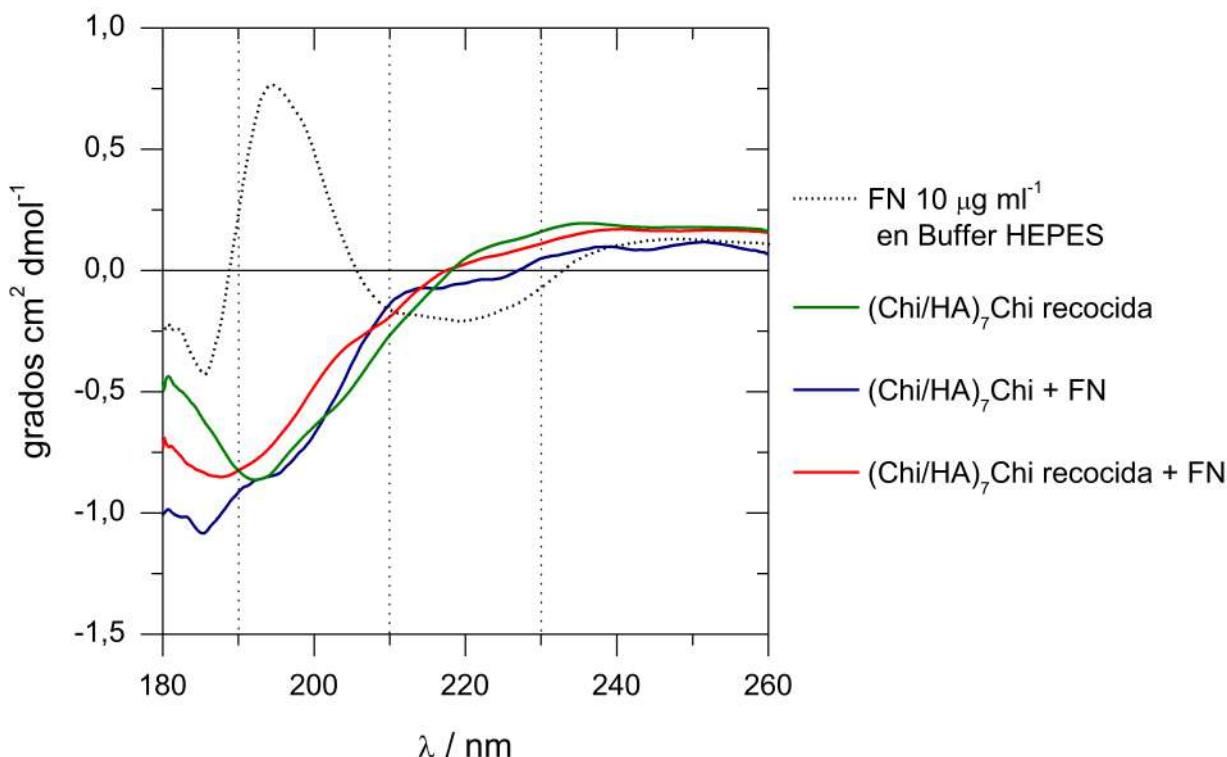


Figura 6.6: Espectro de DC de FN en buffer HEPES, multicapa $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recocida, $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi} + \text{FN}$ y $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recocida + FN. Las líneas de puntos en los rangos de 230-210 nm y 190-180 nm indican las regiones características de los picos de FN.

al considerar las MPEs de Chi/HA no recocidas y luego las recocidas, teniendo valores cercanos a 1 sobre estas últimas (Figura 6.7c). Estos parámetros morfológicos indican la misma tendencia que las áreas pequeñas observadas, y confirman la escasa adhesión de las células A549 sobre estas películas.

Las células BHK presentan un comportamiento similar al de las A549 (Figura 6.8a). No pudo detectarse una diferencia significativa entre las áreas promedio de las células sembradas sobre multicapas de Chi/HA recocidas o no recocidas, en ambos casos los valores fueron cercanos a $280 \mu\text{m}^2$, significativamente menores que los $600 \mu\text{m}^2$ encontrados para las células sembradas sobre vidrio (Figura 6.8b). Sin embargo las imágenes de microscopía muestran que la adhesión de las células BHK es heterogénea incluso sobre vidrio, donde se observan células bien adheridas y ahusadas, y células redondeadas muy pequeñas. Sobre las multicapas de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ hay cierto número de células adheridas regularmente con áreas de expansión del citoesqueleto pequeñas, y una mayoría de células redondeadas. En cambio luego del recocido sólo pueden observarse células redondeadas mal adheridas. Al promediar las áreas celulares, la presencia de células regularmente adheridas sobre las multicapas no recocidas queda oculta por el elevado número de células redondeadas. Los parámetros morfológicos brindaron algo más de información al respecto (Figura 6.8c). Sobre vidrio las células tienen una relación de aspecto y redondez promedio cercanas a 2.4, lo que coincide con su morfología fibroblástica, disminuyen a 1.8 para las células sembradas sobre películas no recocidas y son prácticamente 1 para las células sobre películas de Chi/HA recocidas, en las que todas las células están redondeadas.

El recocido de las películas de Chi/HA produjo un efecto más marcado sobre la adhesión de las células C2C12 y MC3T3-E1 (Figuras 6.9 y 6.10). Para los mioblastos C2C12 los parámetros de adhesión se determinaron 24 horas luego de la siembra, en lugar de 48 horas

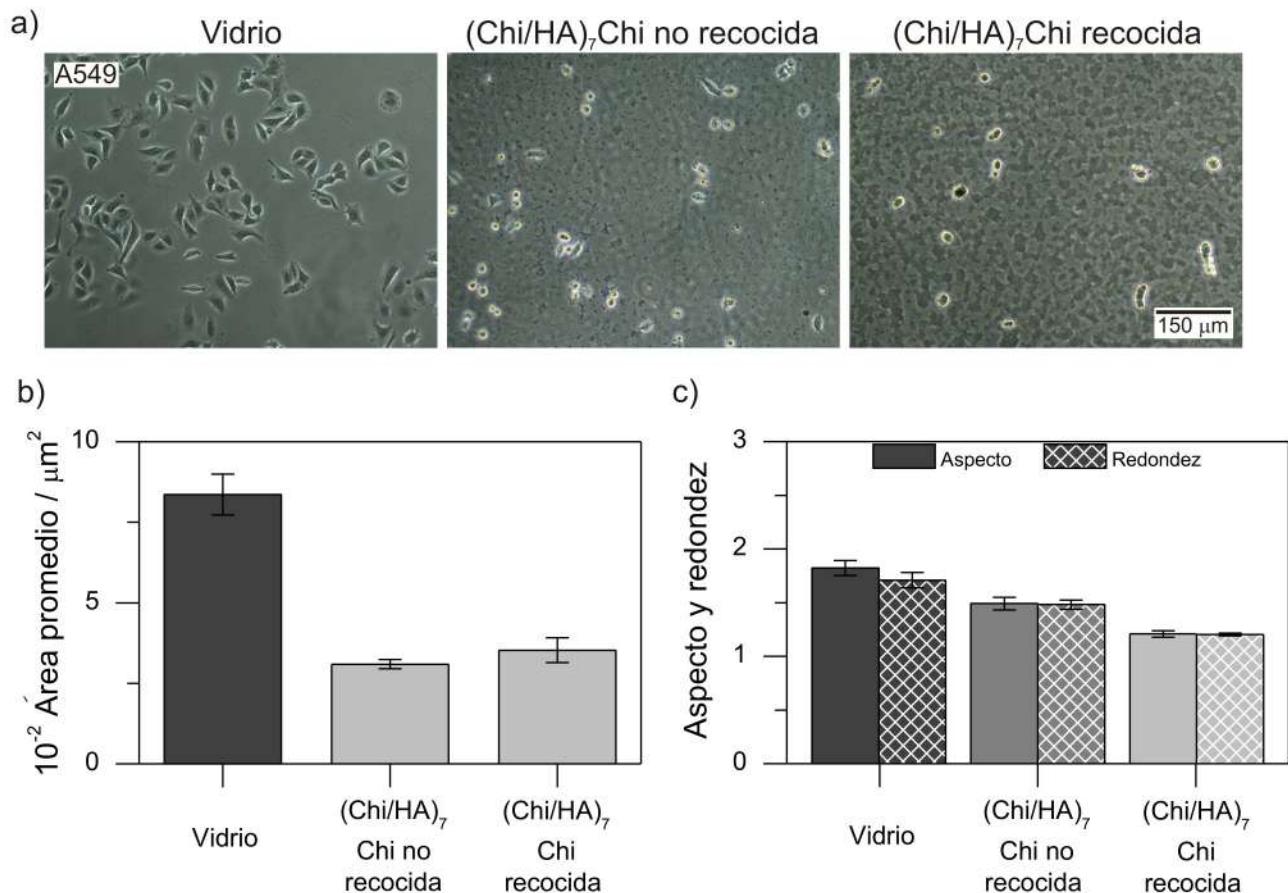


Figura 6.7: Características de la adhesión de células A549 medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ no recocida y $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recocida. a) Microimágenes de contraste de fase de células A549 sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. En la figura se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los promedios están indicados en escala de grises.

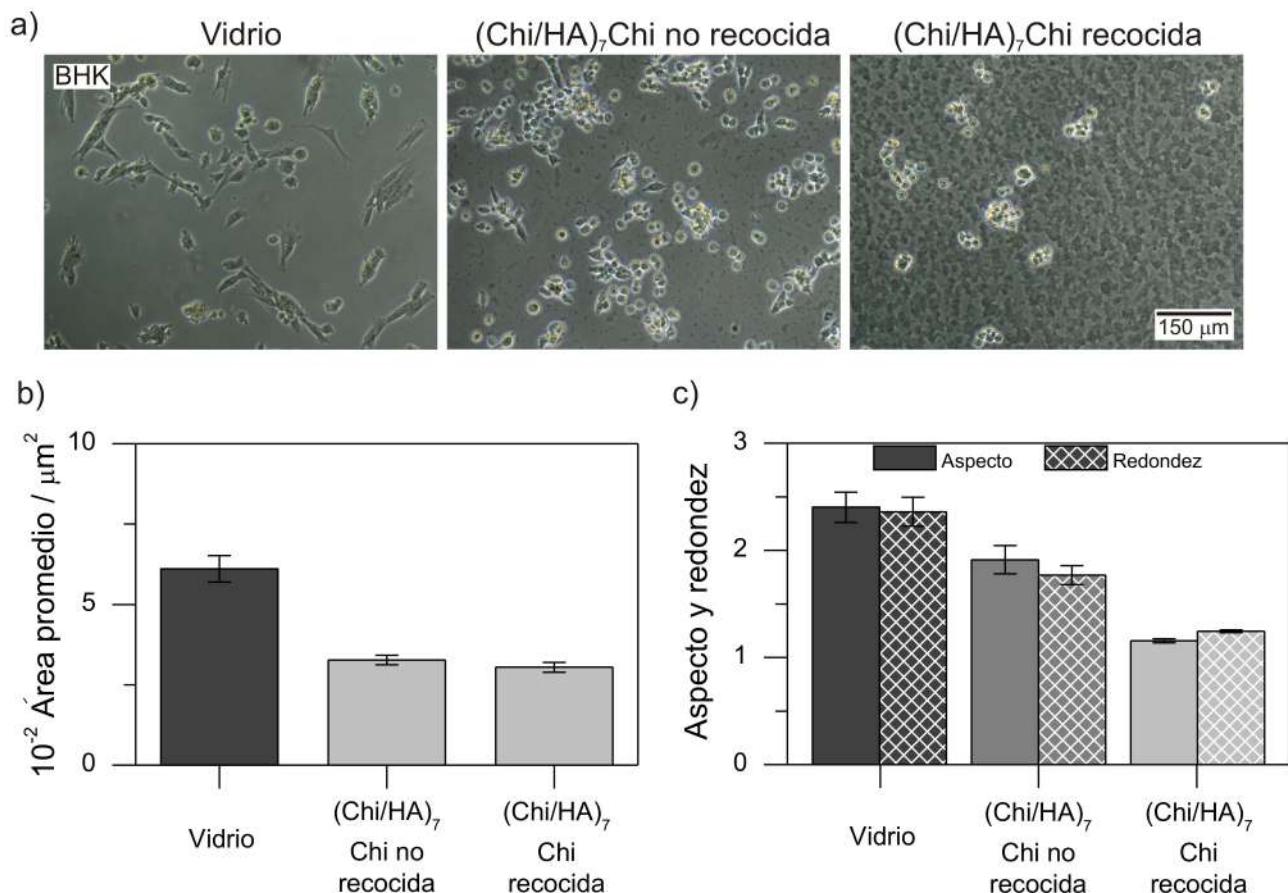


Figura 6.8: Características de la adhesión de células BHK medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ no recocido y $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recocido. a) Microimágenes de contraste de fase de células BHK sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. En la figura se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los promedios están indicados en escala de grises.

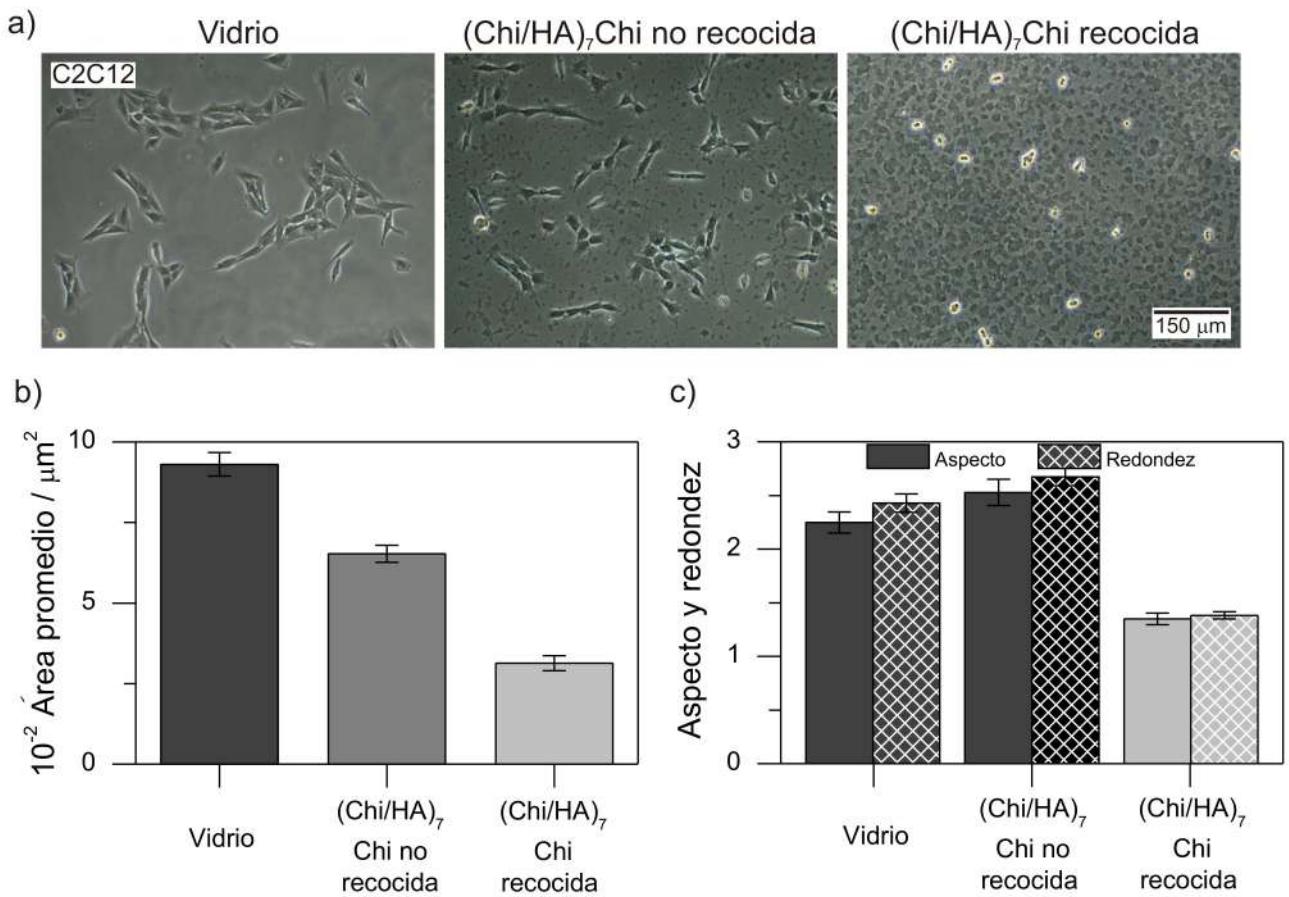


Figura 6.9: Características de la adhesión de células C2C12 medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ no recocidas y $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ recocidas. a) Microimágenes de contraste de fase de células C2C12 sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. En la figura se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los promedios están indicados en escala de grises.

después de la siembra como se hizo para las A549, BHK y MC3T3-E1. Esto se debe a la mayor tasa de duplicación de las células C2C12 que la de las otras líneas celulares utilizadas. Los mioblastos se adhieren sobre las películas no recocidas, aunque exhiben un patrón de agregación distinto a las agregadas sobre vidrio. Luego de 48 horas de sembradas sobre las películas no recocidas, las células tienden a formar pequeñas colonias con una capa exterior de células altamente ordenadas y polarizadas en la dirección radial, a diferencia de las células sembradas sobre vidrio que forman colonias más grandes y desordenadas (Figura 6.11). Sobre las MPEs recocidas la adhesión es muy baja y no se observa formación de colonia alguna.

Las áreas promedio de las células C2C12 sembradas sobre vidrio, las películas no recocidas y películas recocidas fueron de 930, 650 y $310 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Figura 6.9b). Los parámetros morfológicos de las células sembradas sobre las multicapas de Chi/HA no recocidas estuvieron en el intervalo de 1.3-1.5 (Figura 6.9c), significativamente menores que los encontrados para las células sobre vidrio (2.2-2.5). La redondez de las células sembradas sobre películas recocidas es mayor a la de las células sobre vidrio, a pesar de tener una relación de aspecto muy similar. Esto indica que las células tienen morfologías más rugosas, por deformaciones de la membrana o la presencia de filopodios.

Las células MC3T3-E1 se adhirieron sobre las películas de Chi/HA no recocidas con

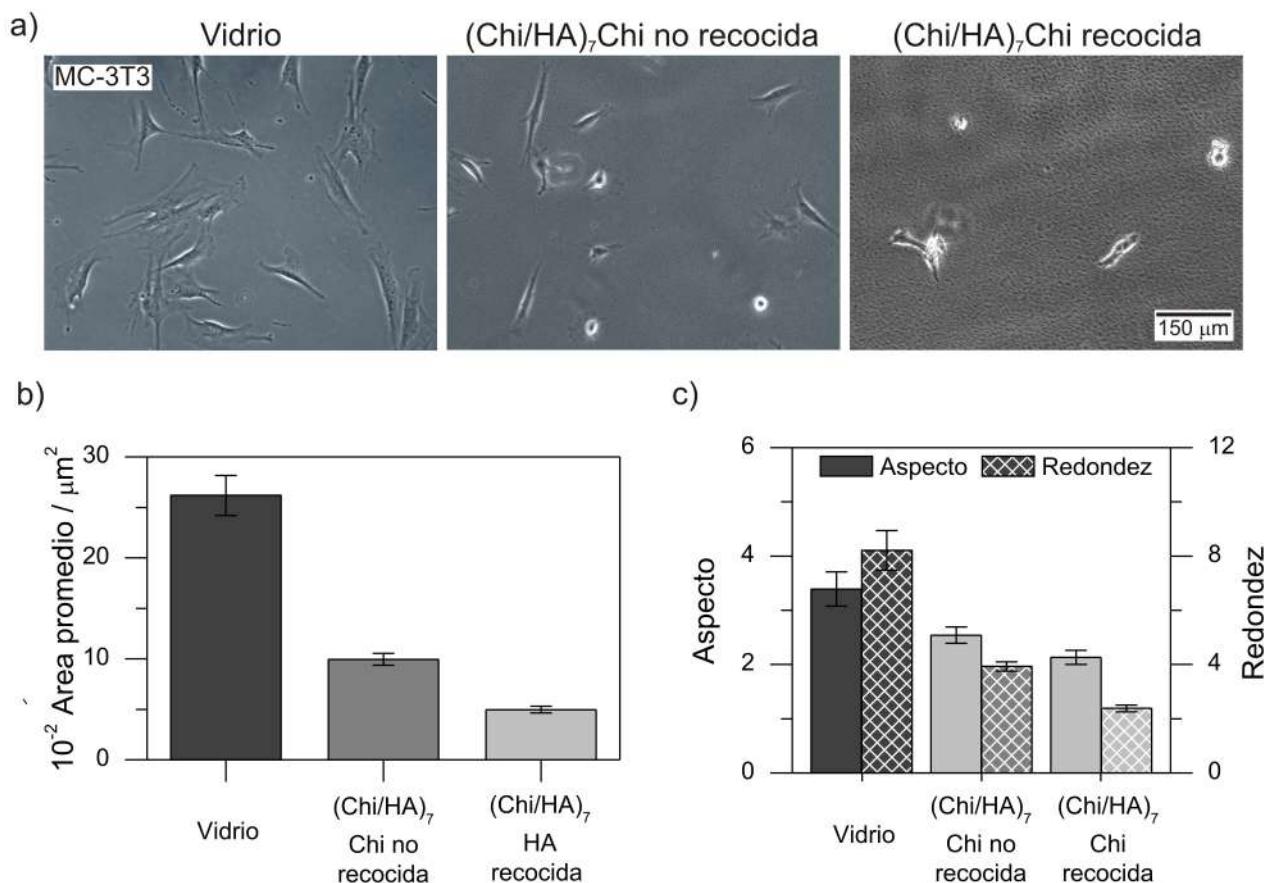


Figura 6.10: Características de la adhesión de células MC3T3-E1 medidas 2 días después de la siembra sobre vidrio, $(Chi/HA)_7$ Chi no recocidas y $(Chi/HA)_7$ Chi recocidas. a) Microimágenes de contraste de fase de células MC3T3-E1 sembradas sobre las distintas superficies. b) Áreas celulares promedio. c) Relación de aspecto y redondez promedio. En la figura se incluyen los errores estándar. Las diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los promedios están indicados en escala de grises.

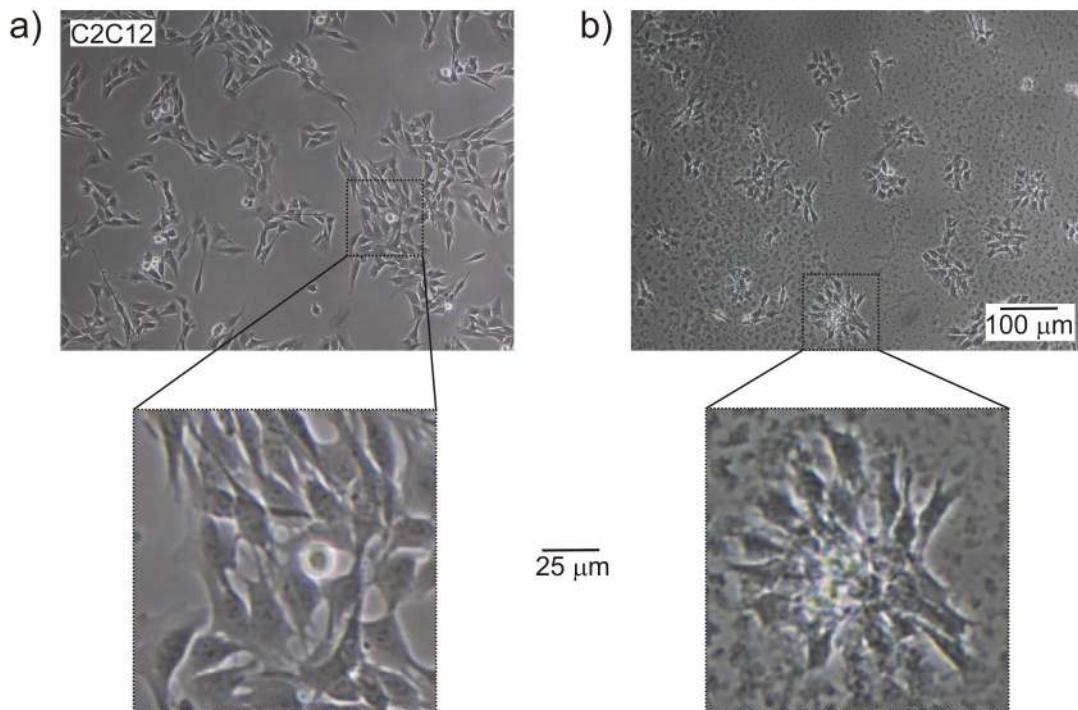


Figura 6.11: Células C2C12 48 horas pos siembra sobre vidrio (a) y una película de (Chi/HA)₇Chi (b). Se muestran regiones aumentadas 4 veces que permiten observar las agrupaciones desordenadas de células sobre vidrio y las pequeñas colonias con células orientadas en la dirección radial sobre las MPEs.

áreas significativamente menores que sobre vidrio, $900 \pm 60 \mu\text{m}^2$ contra $2600 \pm 100 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Figura 6.10b). La adhesión sobre las multicapas recocidas fue aún más pobre, con valores de $400 \pm 30 \mu\text{m}^2$. Los parámetros morfológicos tendieron a disminuir yendo desde las películas no recocidas hacia las recocidas (Figura 6.10c).

Para resumir, la adhesión celular es baja sobre las películas antes del recocido y depende de la línea celular. Las células A549 prácticamente no se adhieren sobre las películas, y por ello el recocido prácticamente no produce cambios. Las células BHK, las MC3T3-E1 y las C2C12 mostraron una menor adhesión sobre las MPEs que sobre vidrio, y el recocido de las películas hace que la adhesión sea aún peor.

Adhesión bacteriana sobre MPEs

Para evaluar la adhesión bacteriana sobre las películas de Chi/HA se sembraron suspensiones de *E. coli* y *S. aureus* en PBS sobre vidrio, las MPEs no recocidas y las MPEs recocidas. Luego de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con abundante solución de PBS, se fijaron con una solución al 4 % de formaldehído, se tiñeron con una solución de DAPI diluida 1:1000 en PBS y finalmente se observaron por microscópica de fluorescencia (Figura 6.12a). Las microimágenes de las bacterias sembradas sobre vidrio muestran una gran cobertura de la superficie, con un área de fluorescencia de $2.3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para *S. aureus* y $6.9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para *E. coli* (Figura 6.12b). El área cubierta por ambas bacterias disminuye abruptamente sobre las películas recocidas y sin recocer. El recocido aumenta significativamente las propiedades antiadherentes de las películas de (Chi/HA)₇Chi para a la bacteria Gram-positiva, con un área de cobertura un 18 % menor al de las películas no recocidas como puede observarse en las imágenes e histogramas correspondientes.

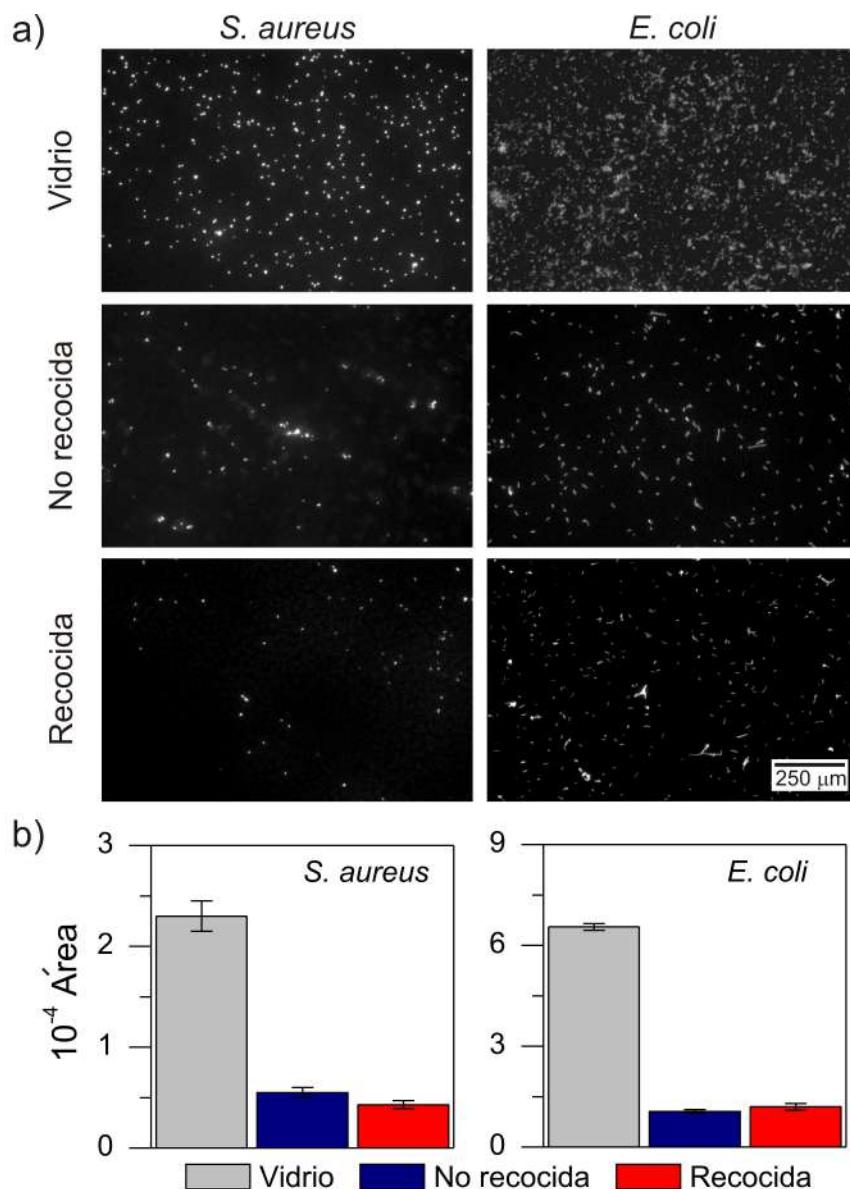


Figura 6.12: a) Microimágenes de fluorescencia de *S. aureus* y *E. coli* sobre MPEs de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ sin recocer y recocidas. b) Área cubierta por las bacterias en las imágenes mostradas en (a). Se incluyen los errores estandar.

Además, las diferencias morfológicas entre ambas bacterias se aprecia en las imágenes. Las bacterias *S. aureus* aparecen como microorganismos redondeados y las *E. coli* como bacilos cortos.

Es importante aclarar que el tratamiento de las imágenes puede afectar considerablemente la determinación de las áreas de cobertura, por lo que los mismos filtros fueron utilizados para hacer comparaciones confiables.

Para confirmar los resultados de adhesión bacteriana, se realizaron una serie de experimentos extrayendo todas las bacterias de las muestras y contando el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Para esto, se sembraron suspensiones de *E. coli* y *S. aureus* en PBS sobre películas recocidas o no recocidas, y luego de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con abundante solución de PBS, y las bacterias adheridas se desprendieron mediante sonicación en solución nueva de PBS. Luego, se sembraron 100 μL de cada muestra en distintas soluciones en placas con agar LB y finalmente después de 24 horas se contó el número de UFC utilizando la dilución adecuada. Sobre vidrio se obtuvieron valores similares de UFCs, $(5.6 \pm 0.3) \times 10^6$ UFC para *S. aureus* y $(6.0 \pm 0.5) \times 10^6$ UFC para *E. coli* (Figura 6.13a). Sobre las películas de Chi/HA se obtuvieron valores 5 veces más pequeños para ambas especies bacterianas. Además, se observó un 20 % menos de *S. aureus* adheridas sobre las MPEs recocidas en comparación con las MPEs no recocidas.

En otro grupo de experimentos, se cuantificó la adhesión bacteriana sobre las MPEs recocidas y no recocidas despegándolas por sonicación de las muestras, colocándolas en caldo LB y midiendo la densidad óptica a cada hora durante 5 horas. El aumento de la densidad óptica, producto del incremento en el número de células, creció exponencialmente con el tiempo. Los datos de *S. aureus* mostraron una densidad óptica menor para las bacterias despegadas de las películas recocidas, lo que se observa más claramente a tiempos largos (Figura 6.13b). Para *E. coli* las diferencias en la densidad óptica entre las bacterias despegadas de películas recocidas y no recocidas fueron mucho menores, con valores ligeramente inferiores sobre las películas recocidas.

En resumen, las películas de Chi/HA tienen una elevada resistencia a la adhesión bacteriana, resistencia que el recocido de las multicapas incrementa para el coco Gram-positivo *S. aureus*.

6.3. Discusión

6.3.1. Reestructuración de las multicapas de Chi/HA recocidas

Las medidas de AFM de MPEs de Chi/HA no recocidas y recocidas luego de la inmersión en buffer HEPES y secadas al aire muestran que la superficie se vuelve menos rugosa con el recocido, como en el caso de las MPEs de PLL/Alg. Sin embargo, mientras que en estas últimas se forma una estructura granular homogénea, las MPEs de Chi/HA mantienen una estructura de red fibrilar. Las propiedades mecánicas de las películas de Chi/HA no se ven afectadas luego del recocido, a diferencia de las multicapas de PLL/Alg que se vuelven más rígidas luego del recocido.

Al igual que en el sistema PLL/Alg, durante la reestructuración de la multicapa de Chi/HA inducida por temperatura, las cadenas de polielectrolitos se ordenan formando complejos donde se maximice la interacción entre cargas opuestas. El potencial zeta de ambos sistemas disminuye luego del recocido, lo que podría deberse a una mayor presencia de los grupos cargados del polianión en la superficie, que al ser más grande rodea al polícatón mientras este último tiende a difundir hacia las capas interiores de la película. A diferencia

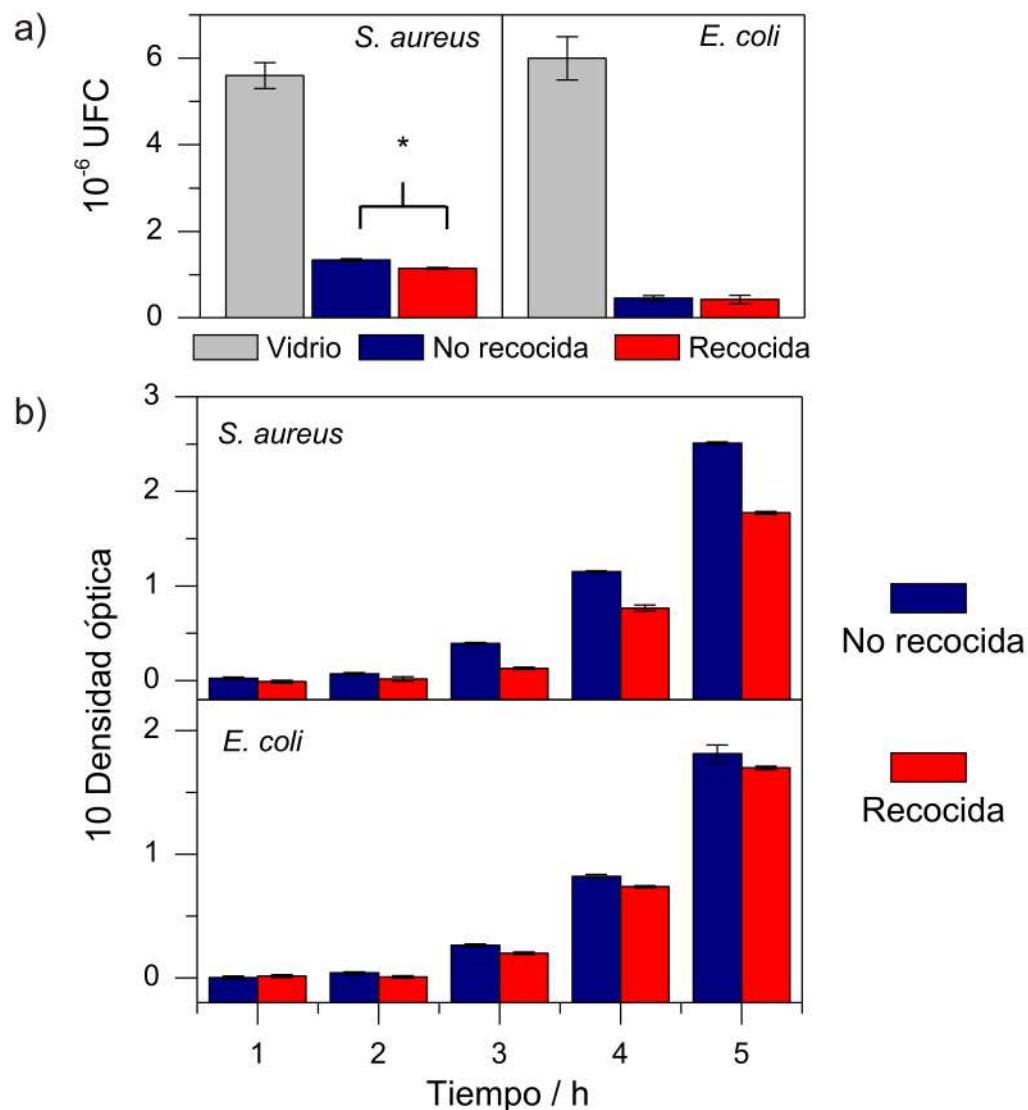


Figura 6.13: a) Unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* y *E. coli* despegadas del vidrio y películas de (Chi/HA)7Chi no recocidas y recocidas. El * indica diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los promedios. b) Cuantificación de la adhesión bacteriana mediante la medida de dispersión de luz a 600 nm a diferentes tiempos.

del sistema PLL/Alg que se volvía más hidrofóbico luego del recocido, el recocido de películas de Chi/HA genera superficies levemente más hidrofílicas. Este resultado puede parecer contradictorio con la idea de que los polielectrolitos se reordenan presentando en la superficie sus grupos hidrofóbicos de tal manera de reducir la tensión interfacial aire/multicapa [6.26]. Sin embargo, el HA y el Chi son ambos polímeros naturales muy hidrofílicos [6.27] y resulta difícil que luego de la reestructuración queden expuestos grupos funcionales más hidrofóbicos, ya que prácticamente todos los carbonos de ambas moléculas tienen grupos hidroxilo o amino capaces de interactuar con el agua a través de puentes de hidrógeno.

6.3.2. Propiedades antiadhesivas

Resistencia a la adsorción proteíca

En comparación con las películas de PLL/Alg, las de Chi/HA presentan una fuerte resistencia a la adsorción proteica, que no puede ser detectada por la QCM-D al menos en nuestras condiciones experimentales. Cabe destacar que se conoce que cantidades tan bajas de FN, de alrededor de 20 ng cm^{-2} , alcanzan para promover la adhesión celular sobre monocapas autoensambladas de alcanoíoles sobre oro [6.28], una cantidad que se corresponde con un $\Delta F \sim 5 \text{ Hz}$ y que debido a la inestabilidad de la MPE se encuentra dentro del error de nuestras medidas de QCM-D.

Resistencia a la adhesión de células de mamíferos

Se conoce la baja adhesión celular sobre películas de Chi/HA, lo que probablemente se deba al elevado grado de hidratación y la rigidez baja de las películas de polímeros naturales [6.24, 6.29, 6.30]. De hecho, se utiliza para mejorar la adhesión celular sobre multicapas de Chi/HA la técnica de entrecruzamiento químico que aumenta la rigidez de las películas [6.31]. La adhesión celular sobre películas de $(\text{Chi}/\text{HA})_7\text{Chi}$ empeora aún más luego del recocido. Las MPEs no recocidas o recocidos presentan en ambos casos una carga superficial negativa, son hidrofílicas, resistentes a la adsorción de proteínas y presentan propiedades mecánicas similares. Consecuentemente, los cambios topográficos producidos durante el recocido son los principales candidatos a ser responsables de los cambios observados en la adhesión celular. Se sabe que las características topográficas del substrato en diferentes escalas tienen una gran influencia en la funcionalidad celular [6.32, 6.33]. En general, las células tienden a adherirse mejor sobre las superficies más rugosas que presentan motivos en la micro y nanoescala. Las películas de Chi/HA recocidas son más planas y presentan una rugosidad menor, lo que es coherente con una menor adhesión celular.

Los cambios morfológicos pueden afectar el comportamiento celular en forma indirecta, afectando a las proteínas adsorbidas sobre la superficie con las que interaccionan las células. La adsorción de proteínas juega un rol fundamental en la adhesión celular. No sólo la cantidad depositada, sino la conformación que adquieren luego de adsorberse puede influenciar el proceso de adhesión celular. Las proteínas adsorbidas sobre una superficie requieren cambios conformacionales para promover la adhesión celular ya que ciertas estructuras proteicas específicas son fundamentales para que las células de mamíferos puedan formar las adhesiones focales [6.34–6.36]. Las superficies de igual composición, pero que tengan diferentes rugosidades pueden producir distintos cambios conformacionales en la FN [6.37–6.39]. La conformación de la FN sobre las MPEs puede verse afectada por el recocido, como puede apreciarse en las medidas de DC de FN adsorbida sobre las MPEs (Figura 6.6). Los resultados de DC mostraron adsorción de FN sobre la película recocida y la no recocida, pero sugiere

que la conformación es distinta cuando se adsorbe sobre las MPEs recocidas en comparación con las no recocidas.

Resistencia a la adhesión bacteriana

Algunos polisacáridos pueden ser utilizados para generar superficies que prevengan la formación de biopelículas bacterianas, ya sea a través de sus propiedades antiadhesivas, como es el caso del ácido hialurónico, o de sus propiedades bactericidas, como es el caso del quitosano [6.13]. Los resultados mostrados (Figuras 6.12 y 6.13), son coherentes con las interesantes propiedades antibacterianas que poseen estos polisacáridos. El recocido de las películas disminuye aún más la adhesión del coco Gram-positivo *S. aureus*, lo que puede estar relacionado con los cambios fisicoquímicos y topográficos que sufre la multicapa durante el recocido y las características particulares de esta bacteria.

Para analizar las diferentes características de la adhesión bacteriana sobre las superficies de las MPEs recocidas y no recocidas es útil considerar algunas características generales de la pared celular de las bacterias utilizadas en este trabajo. La bacteria *S. aureus* es un coco Gram-positivo y *E. coli* es un bacilo Gram-negativo [6.40]. La pared celular que rodea la membrana interna de las bacterias Gram-positivas está compuesta de una capa de 20 – 80 nm de espesor de peptidoglicano que contiene cierta cantidad de ácido teicoico, que son polímeros de glicerol o ribitol unidos por enlaces fosfodiéster y decorados con aminoácidos y monosacáridos [6.41]. Además, posee ácidos lipoteicoicos, obtenidos por la unión de ácidos teicoicos con fosfolípidos, unen la pared celular con la membrana plasmática de la célula [6.42]. Debido a sus cargas negativas, los ácidos teicoicos son en parte responsables de la carga negativa de la superficie de las bacterias Gram-positivas. Se informaron valores de potencial zeta de diferentes cepas de *S. aureus* entre -5 mV y -50 mV, que dependieron de las condiciones y técnicas de medida [6.43–6.45]. Por otro lado, las envolturas celulares de las bacterias Gram-negativas son mucho más complejas, con una pared celular de peptidoglicano de 2 nm de espesor localizada entre la membrana interna y la membrana externa. Esta última está compuesta de lipopolisacáridos y lipoproteínas [6.46, 6.47]. La bacteria *E. coli* pertenece a la familia Enterobactericeae y posee flagelos con los cuales puede moverse. Su carga superficial es negativa, con valores entre -20 mV y -60 mV [6.44, 6.45, 6.48].

En las condiciones de los ensayos mostrados en este capítulo las bacterias se encuentra en los primeros estadio de adhesión, donde es de esperar que no existan interacciones específicas entre las células y las superficies [6.49, 6.50]. La carga superficial de las MPEs recocidas o no recocidas medidas en buffer HEPES es en ambos casos negativa, con un valor algo más negativo para las recocidas (-31 ± 3 mV) respecto a las no recocidas (-24 ± 3 mV). El potencial zeta negativo de la superficie de la multicapa de Chi/HA y que se vuelve aún más negativo luego del recocido podría explicar en parte el incremento de la resistencia a la adhesión de bacterias cargadas negativamente.

Otro factor importante en la adhesión de microorganismos sobre una superficie es la hidrofilicidad/hidrofobicidad de la misma. El bajo ángulo de contacto de las películas de Chi/HA ($30.2 \pm 0.3^\circ$) que disminuye aun más luego del recocido ($20.6 \pm 1.8^\circ$) refleja la gran afinidad de estas superficies por moléculas de agua, lo que les confiere resistencia a la adhesión bacteriana como se encuentra publicado en la bibliografía [6.13].

Tanto el aumento en la hidrofilicidad como en la carga negativa superficial contribuyen a la mayor resistencia de las MPEs recocidas a la adhesión de *S. aureus* [6.13]. Pero las características topográficas de las superficies también parecen afectar el proceso de adhesión bacteriana como lo informaron varios trabajos [6.51–6.53]. Se encontraron casos donde una mayor rugosidad favoreció la adhesión bacteriana [6.54, 6.55], y otros donde se observó el

efecto inverso [6.56, 6.57]. En estos estudios la rugosidad es estimada como la desviación cuadrática media de las alturas (Rms), estimación que puede ser apropiada para algunas superficies. También se han empleado otros parámetros morfológicos para caracterizar las superficies, aunque no siempre se encontró una clara correlación con la adhesión y merece una mayor atención e investigación s [6.58].

A partir de los perfiles de alturas medidos en las imágenes de AFM de 5×5 y $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ de películas no recocidas y recocidas, la distribución de picos (Figura 6.3j) muestra distintas características para MPEs recocidas y no recocidas. Las películas recocidas muestran un único máximo, mientras que en las no recocidas se observa la contribución de dos poblaciones: una con alturas similares a aquellas obtenidas para las multicapas recocidas y otra con valores más grandes. Estos picos más altos exhiben una separación promedio de 1-2 μm , un tamaño que coincide con las dimensiones de las bacterias. Estas características topográficas podrían afectar la adhesión bacteriana mediante dos mecanismos: aumentando el área de interacción entre las bacterias y la superficie de las películas, y generando pequeños agujeros que contengan las bacterias durante la deposición. Los cambios topográficos generados por el recocido podrían afectar el proceso de adhesión de *S. aureus* ya que no son móviles ni poseen apéndices adaptables, en contraste con *E. coli* que se adapta mejor a los cambios topográficos ya que es capaz de regular la expresión de fimbrias en función de la rugosidad de la superficie [6.59, 6.60]. Sobre superficies rugosas las bacterias *E. coli* tienen una morfología lisa, mientras que sobre superficies lisas se ven rugosas debido a la expresión de fimbrias y otras estructuras adhesivas. Por este motivo la disminución de la rugosidad de las películas producida por el recocido podría tener un menor efecto en *E. coli*, capaz de adaptarse para adherirse sobre superficies lisas y un efecto significativo en *S. aureus*.

6.4. Conclusiones

Las multicapas de Chi/HA mostraron una limitada adhesión para 4 líneas celulares de diferentes orígenes, del coco Gram-positivo *S. aureus* y del bacilo Gram-negativo *E. coli*. El recocido de las multicapas durante 72 horas a 37 °C resultó en una adhesión aún más restringida de las células eucariotas y en una disminución del 20 % de la adhesión de *S. aureus* respecto a las MPEs no recocidas.

El aumento de las propiedades antiadhesivas de las MPEs de Chi/HA está fuertemente relacionado con los cambios topográficos que se producen durante el recocido. Este proceso mantiene la hidrofilicidad de las multicapas, su carga negativa y su resistencia a la adsorción de proteínas, con pequeños cambios en sus magnitudes que no pueden explicar la disminución de la adhesión celular. Por otro lado, la topografía de las MPEs cambia significativamente durante el recocido. La estructura fibrilar se mantiene, pero se genera una superficie más lisa y homogénea. Estos cambios topográficos podrían también modificar la conformación de las pocas proteínas que se depositan sobre la película, modificando así la adhesión de las células de mamíferos.

En cuanto a la adhesión bacteriana sobre las películas recocidas, el coco Gram-positivo *S. aureus* se comporta diferente del bacilo Gram-negativo *E. coli*. Esta última es capaz de adaptarse para interactuar con superficies de características topográficas distintas regulando la expresión de estructuras adhesivas como las fimbrias, mientras que *S. aureus* podría verse más afectado por la topografía del substrato. La distancia promedio entre los picos más altos en la superficie de las MPEs no recocidas coincide con el tamaño de *S. aureus* y la mayor rugosidad de estas MPEs proporcionaría una mayor superficie de interacción, que sumada al efecto “captura” de las bacterias podría explicar la mayor adhesión sobre las películas no

recocidas.

En este capítulo se presentó un procedimiento sencillo para mejorar la performance de superficies resistentes a la adsorción proteica y resistentes a la adhesión de células eucariotas y bacterianas, mediante el ensamblado capa por capa de biopolímeros como el quitosano y el ácido hialurónico y el posterior recocido térmico. Este procedimiento tiene como ventaja que no requiere enlaces covalentes para modificar una superficie y puede aplicarse a cualquier superficie cargada.

Bibliografía

- [6.1] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam & P. K. Yarlagadda. “Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review”. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2014. **228**(10), 1083–1099. (Citado en página 239.)
- [6.2] S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber & J. C. Simon. “Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials”. *Biomaterials*, 2011. **32**(28), 6692–6709. (Citado en página 239.)
- [6.3] G. Pados, A. Makedos & B. Tarlitzis. *Endoscopy*. InTech, 2013. (Citado en páginas 44 y 239.)
- [6.4] M. Posaric-Bauden, K. Isaksson, D. Åkerberg, R. Andersson & B. Tingstedt. “Novel anti-adhesive barrier Biobarrier reduces growth of colon cancer cells”. *Journal of Surgical Research*, 2014. **191**(1), 196–202. (Citado en página 239.)
- [6.5] K. Haraguchi, K. Kubota, T. Takada & S. Mahara. “Highly Protein-Resistant Coatings and Suspension Cell Culture Thereon from Amphiphilic Block Copolymers Prepared by RAFT Polymerization”. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(6), 1992–2003. (Citado en página 239.)
- [6.6] X. Zhao, Y. Su, Y. Li, R. Zhang, J. Zhao & Z. Jiang. “Engineering amphiphilic membrane surfaces based on PEO and PDMS segments for improved antifouling performances”. *Journal of Membrane Science*, 2014. **450**, 111–123. (Citado en página 239.)
- [6.7] V. B. Damodaran & N. S. Murthy. “Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials.” *Biomaterials research*, 2016. **20**, 18. (Citado en página 239.)
- [6.8] I. Banerjee, R. C. Pangule & R. S. Kane. “Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms”. *Advanced Materials*, 2011. **23**(6), 690–718. (Citado en página 239.)
- [6.9] X. Zhu, X. Jun Loh, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, S. L.-M. Teo, D. Rittschof, C. Zhao, X. Li, C. Egles, C. Detrembleur, Y. Frère, L. Jierry, P. SchAAF, H. Kerdjoudj, M. H. Metz-Boutigue & F. Boulmedais. “Layer-by-layer assemblies for antibacterial applications”. *Biomaterials Science*, 2015. **3**(12), 1505–1518. (Citado en página 239.)
- [6.10] X. J. Loh. “Latest Advances in Antibacterial Materials”. *Journal of Molecular and Engineering Materials*, 2017. **05**(01), 1740001. (Citado en página 239.)
- [6.11] S. Guo & X. Zhu. “Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications”. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **70**, 1163–1175. (Citado en página 239.)

- [6.12] K.-O. Doh & Y. Yeo. “Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines.” *Therapeutic delivery*, 2012. **3**(12), 1447–56. (Citado en página 239.)
- [6.13] G.-A. Junter, P. Thébault & L. Lebrun. “Polysaccharide-based antibiofilm surfaces”. *Acta Biomaterialia*, 2016. **30**, 13–25. (Citado en páginas 239 y 257.)
- [6.14] M. Bulwan, K. Wójcik, S. Zapotoczny & M. Nowakowska. “Chitosan-Based Ultrathin Films as Antifouling, Anticoagulant and Antibacterial Protective Coatings”. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2012. **23**(15), 1963–1980. (Citado en página 239.)
- [6.15] D. Rana & T. Matsuura. “Surface Modifications for Antifouling Membranes”. *Chemical Reviews*, 2010. **110**(4), 2448–2471. (Citado en página 239.)
- [6.16] A. Schneider, C. Vodouhê, L. Richert, G. Francius, E. Le Guen, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Frisch & C. Picart. “Multifunctional polyelectrolyte multilayer films: combining mechanical resistance, biodegradability, and bioactivity.” *Biomacromolecules*, 2007. **8**(1), 139–45. (Citado en página 239.)
- [6.17] S. G. Caridade, C. Monge, F. Gilde, T. Boudou, J. F. Mano & C. Picart. “Free-standing polyelectrolyte membranes made of chitosan and alginate.” *Biomacromolecules*, 2013. **14**(5), 1653–60. (Citado en página 239.)
- [6.18] J. Zhou, G. Romero, E. Rojas, L. Ma, S. Moya & C. Gao. “Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting.” *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **345**(2), 241–7. (Citado en páginas 231 y 239.)
- [6.19] R. Lakshminarayanan, E. O. Chi Jin, X. J. Loh, R. M. Kini & S. Valiyaveettill. “Purification and Characterization of a Vaterite-Inducing Peptide, Pelovaterin, from the Eggshells of Pelodiscus sinensis (Chinese Soft-Shelled Turtle)”. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(3), 1429–1437. (Citado en página 241.)
- [6.20] N. Higashi, K. Yasufuku, Y. Matsuo, T. Matsumoto & T. Koga. “Thermo-responsive multilayer films from ionic polymers with elastin-like peptide as graft chains”. *Colloids and Interface Science Communications*, 2014. **1**, 50–53. (Citado en página 241.)
- [6.21] S. Grohmann, H. Rothe & K. Liefeth. “Investigations on the Secondary Structure of Polypeptide Chains in Polyelectrolyte Multilayers and their Effect on the Adhesion and Spreading of Osteoblasts”. *Biointerphases*, 2012. **7**(1), 62. (Citado en página 241.)
- [6.22] D. Filion, M. Lavertuand & M. D. Buschmann. “Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems”. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(10), 3224–3234. (Citado en página 243.)
- [6.23] A. Mero & M. Campisi. “Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules”. *Polymers*, 2014. **6**(2), 346–369. (Citado en página 243.)
- [6.24] L. Richert, P. Lavalle, E. Payan, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel & C. Picart. “Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects.” *Langmuir*, 2004. **20**(2), 448–458. (Citado en páginas 190, 243 y 256.)

- [6.25] A. Denuziere, D. Ferrier & A. Domard. “Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects”. *Carbohydrate Polymers*, 1996. **29**(4), 317–323. (Citado en página 243.)
- [6.26] K. Köhler, D. G. Shchukin, H. Möhwald & G. B. Sukhorukov. “Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number”. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005. **109**(39), 18250–18259. (Citado en páginas 230 y 256.)
- [6.27] K. Halake, H. J. Kim, M. Birajdar, B. S. Kim, H. Bae, C. Lee, Y. J. Kim, S. Kim, S. Ahn, S. Y. An, S. H. Jung & J. Lee. “Recently developed applications for natural hydrophilic polymers”. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016. **40**, 16–22. (Citado en página 256.)
- [6.28] B. G. Keselowsky, D. M. Collard & A. J. García. “Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003. **66A**(2), 247–259. (Citado en página 256.)
- [6.29] A. Schneider, L. Richert, G. Francius, J. C. Voegel & C. Picart. “Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films.” *Biomedical Materials*, 2007. **2**(1), S45–51. (Citado en páginas 190, 201 y 256.)
- [6.30] T. Crouzier, T. Boudou & C. Picart. “Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010. **15**(6), 417–426. (Citado en páginas 181 y 256.)
- [6.31] A. L. Hillberg, C. A. Holmes & M. Tabrizian. “Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films.” *Biopolymers*, 2009. **30**(27), 4463–70. (Citado en páginas 72, 181, 190, 232 y 256.)
- [6.32] F. Gentile, L. Tirinato, E. Battista, F. Causa, C. Liberale, E. M. di Fabrizio & P. Deuzzi. “Cells preferentially grow on rough substrates”. *Biomaterials*, 2010. **31**(28), 7205–7212. (Citado en página 256.)
- [6.33] A. T. Nguyen, S. R. Sathe & E. K. F. Yim. “From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance”. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2016. **28**(18), 183001. (Citado en página 256.)
- [6.34] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Rumí & V. Svorcík. “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants”. *Biotechnology Advances*, 2011. **29**(6), 739–767. (Citado en páginas 32, 181 y 256.)
- [6.35] C. J. Arias, R. L. Surmaitis & J. B. Schlenoff. “Cell Adhesion and Proliferation on the “Living” Surface of a Polyelectrolyte Multilayer”. *Langmuir*, 2016. **32**(21), 5412–5421. (Citado en páginas 31, 33, 233 y 256.)
- [6.36] D. Yang, X. Lü, Y. Hong, T. Xi & D. Zhang. “The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials”. *Biomaterials*, 2013. **34**(23), 5747–5758. (Citado en página 256.)
- [6.37] M. S. Lord, M. Foss & F. Besenbacher. “Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response”. *Nano Today*, 2010. **5**(1), 66–78. (Citado en página 256.)

- [6.38] M. B. Hovgaard, K. Rechendorff, J. Chevallier, M. Foss & F. Besenbacher. “Fibronectin Adsorption on Tantalum: The Influence of Nanoroughness”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008. **112**(28), 8241–8249. (Citado en página 256.)
- [6.39] M. Lord, B. Cousins, P. Doherty, J. Whitelock, A. Simmons, R. Williams & B. Miltorph. “The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response”. *Biomaterials*, 2006. **27**(28), 4856–4862. (Citado en página 256.)
- [6.40] J. M. Willey, L. Sherwood & C. J. Woolverton. *Prescott's microbiology*. Mc Graw Hill, 2017. (Citado en página 257.)
- [6.41] S. Brown, J. P. Santa Maria & S. Walker. “Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria”. *Annual Review of Microbiology*, 2013. **67**(1), 313–336. (Citado en página 257.)
- [6.42] M. G. Percy & A. Gründling. “Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria”. *Annual Review of Microbiology*, 2014. **68**(1), 81–100. (Citado en página 257.)
- [6.43] E. Kłodzinska, M. Szumski, K. Hrynkiewicz, E. Dziubakiewicz, M. Jackowski & B. Buszewski. “Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism”. *Electrophoresis*, 2009. **30**(17), 3086–3091. (Citado en página 257.)
- [6.44] E. Kłodzińska, M. Szumski, E. Dziubakiewicz, K. Hrynkiewicz, E. Skwarek, W. Janusz & B. Buszewski. “Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation”. *Electrophoresis*, 2010. **31**(9), 1590–1596. (Citado en página 257.)
- [6.45] N. Mitik-Dineva, J. Wang, V. K. Truong, P. Stoddart, F. Malherbe, R. J. Crawford & E. P. Ivanova. “Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness”. *Current Microbiology*, 2009. **58**(3), 268–273. (Citado en página 257.)
- [6.46] C. Whitfield & M. S. Trent. “Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides”. *Annual Review of Biochemistry*, 2014. **83**(1), 99–128. (Citado en página 257.)
- [6.47] S. Okuda & H. Tokuda. “Lipoprotein Sorting in Bacteria”. *Annual Review of Microbiology*, 2011. **65**(1), 239–259. (Citado en página 257.)
- [6.48] H. Schwegmann, A. J. Feitz & F. H. Frimmel. “Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **347**(1), 43–48. (Citado en página 257.)
- [6.49] Y. H. An & R. J. Friedman. *Handbook of bacterial adhesion : principles, methods, and applications*. Humana Press, 2000. (Citado en página 257.)
- [6.50] D. Campoccia, L. Montanaro & C. R. Arciola. “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces”. *Biomaterials*, 2013. **34**(34), 8533–8554. (Citado en página 257.)
- [6.51] F. Song, H. Koo & D. Ren. “Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation”. *Journal of Dental Research*, 2015. **94**(8), 1027–1034. (Citado en página 257.)

- [6.52] H. H. Tuson & D. B. Weibel. “Bacteria-surface interactions.” *Soft matter*, 2013. **9**(18), 4368–4380. (Citado en página 257.)
- [6.53] L. C. Hsu, J. Fang, D. A. Borca-Tasciuc, R. W. Worobo & C. I. Moraru. “Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces.” *Applied and environmental microbiology*, 2013. **79**(8), 2703–12. (Citado en página 257.)
- [6.54] L. Liu, B. Ercan, L. Sun, K. S. Ziemer & T. J. Webster. “Understanding the Role of Polymer Surface Nanoscale Topography on Inhibiting Bacteria Adhesion and Growth”. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016. **2**(1), 122–130. (Citado en página 257.)
- [6.55] C. Lüdecke, M. Roth, W. Yu, U. Horn, J. Bossert & K. D. Jandt. “Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via nano adhesion points”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. **145**, 617–625. (Citado en página 257.)
- [6.56] T. J. Webster, M. K. Banks, B. Applegate & T. J. Webster. “Influence of nanophasse titania topography on bacterial attachment and metabolism”. *International Journal of Nanomedicine*, 2008. **3**(4), 497. (Citado en página 258.)
- [6.57] N. Mitik-Dineva, J. Wang, V. K. Truong, P. R. Stoddart, F. Malherbe, R. J. Crawford & E. P. Ivanova. “Differences in colonisation of five marine bacteria on two types of glass surfaces”. *Biofouling*, 2009. **25**(7), 621–631. (Citado en página 258.)
- [6.58] M. Lorenzetti, I. Dogša, T. Stošicki, D. Stopar, M. Kalin, S. Kobe & S. Novak. “The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates”. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. **7**(3), 1644–1651. (Citado en página 258.)
- [6.59] L. Rizzello, A. Galeone, G. Vecchio, V. Brunetti, S. Sabella & P. P. Pompa. “Molecular response of *Escherichia coli* adhering onto nanoscale topography”. *Genome Biology*, 2003. **4**(6), 219. (Citado en página 258.)
- [6.60] L. Rizzello, B. Sorce, S. Sabella, G. Vecchio, A. Galeone, V. Brunetti, R. Cingolani & P. P. Pompa. “Impact of Nanoscale Topography on Genomics and Proteomics of Adherent Bacteria”. *ACS Nano*, 2011. **5**(3), 1865–1876. (Citado en página 258.)

Capítulo 7

Propagación de colonias sobre substratos microestructurados

7.1. Introducción

Los sistemas biológicos son sistemas complejos donde el comportamiento del sistema no puede ser inferido simplemente a partir de las propiedades de sus partes constituyentes y se requiere una gran cantidad de información para describirlos [7.1, 7.2]. En el caso de las colonias celulares existen numerosas variables que influyen en su desarrollo, tales como la línea celular, las condiciones de cultivo o el pasaje de las células [7.3, 7.4], el lote del suero utilizado para suplementar el medio de cultivo [7.5] o la variabilidad intrínseca de las células [7.6]. Esto hace que a veces resulte necesario realizar numerosas repeticiones de los experimentos para garantizar que los resultados sean estadísticamente significativos [7.7]. Por este motivo resulta de gran interés encontrar leyes o procesos universales que permitan describir estos sistemas.

Como hemos visto en los capítulos 1, 2 y 3, la propagación de las interfases de colonias de geometría lineal o circular de células tumorales o transformadas son coincidentes con los esperados para la universalidad de KPZ, al igual que la interfase generada con un modelo de Eden [7.8] o con la electroconvección de cristales líquidos en fase nemática [7.9]. La principal diferencia de estos últimos con respecto al estudio de colonias de células es el tiempo que lleva realizar los experimentos o simulaciones y analizar los resultados. Una simulación en que se agregan más de 10^7 partículas se demora apenas un par de minutos, un tiempo similar al que demoran los experimentos de electroconvección [7.9, 7.10]. Esto hace posible realizar miles de simulaciones o cientos de experimentos en una semana. Por otro lado, las colonias deben seguirse durante más de 10^3 minutos y el análisis posterior de las imágenes obtenidas requiere mucho trabajo. Esto limita significativamente el número de experimentos que pueden realizarse, por lo que los exponentes calculados tienen un menor peso estadístico.

Hay situaciones en que no es posible vincular los exponentes obtenidos mediante el análisis de escalado dinámico con una clase en particular [7.11], que los exponentes obtenidos experimentalmente difieren de aquellos obtenidos a partir de modelos [7.12] o que simplemente no se obedecen las reglas de escalado dinámico [7.13]. En estos casos es necesario buscar alternativas a los exponentes de escalado para relacionar con cierta seguridad la dinámica de crecimiento con una “clase universal” [7.14]. Una estrategia es intentar identificar las características distintivas de cada clase en el comportamiento de los constituyentes del sistema y la evolución de la interfase. En el caso de la clase de KPZ, una característica distintiva es el término no lineal $\lambda/2(\nabla h)^2$ que da cuenta del crecimiento lateral de la interfase. Esto podría hacerse determinando la velocidad de crecimiento de la interfase ($\langle V_F \rangle$) en superficies in-

clinadas con un ángulo s [7.14]. Una interfase con crecimiento lateral tiene una dependencia cuadrática de la $\langle V_F \rangle$ con el ángulo de inclinación:

$$\langle V_F \rangle(s) = \langle V_F \rangle(0) + \frac{\lambda}{2} s^2 \quad (7.1)$$

Aplicar esta técnica en simulaciones numéricas es sencillo, ya sea en simulaciones de deposición balística de partículas(Figura 7.1a) [7.8], de fluídos avanzando en medios porosos [7.15] o incluso del crecimiento de colonias celulares (Figura 7.1b) [7.16]. Sin embargo, resulta difícil conseguir un sistema experimental con una inclinación constante de la interfase que cumpla con las condiciones impuestas para el cumplimiento de las ecuaciones [7.14]. Algunos sistemas experimentales en los que es posible conseguir una inclinación constante de la interfase son la erosión de paisajes inclinados (Figura 7.1c) [7.17] o la deposición de películas delgadas con ángulo oblícuo (por “sputtering” o láser pulsado, figura 7.1d) [7.18].

El conocimiento de la dinámica de propagación de las colonias celulares permite una mejor descripción de diversos procesos fisiológicos y patológicos, ayuda a proponer modelos matemáticos más realistas y proporciona información valiosa para el desarrollo de nuevos materiales y alternativas terapeúticas contra diversas patologías [7.19–7.22]. Por este motivo, resulta de interés estudiar desde distintos enfoques el cumplimiento de modelos universales. En este sentido se propone un arreglo experimental que intenta poner de manifiesto la contribución no lineal en la propagación de las colonias celulares, que de acuerdo a trabajos publicados y a lo visto en los capítulos 1, 2 y 3, sigue en determinado rango de L y t el modelo estándar de KPZ.

El arreglo experimental se basa en la influencia que tiene la topografía del substrato sobre las distintas funciones celulares [7.23, 7.24]. En la literatura se reportaron diversas técnicas de micro y nano fabricación que permiten obtener substratos con variadas características topográficas: microranuras, nanopilares, nanohuecos y hasta gradientes topográficos. Los substratos con microranuras permiten controlar la morfología, la orientación, la migración, la proliferación y hasta la expresión de ciertos genes [7.25, 7.26]. Además, pueden utilizarse para favorecer la transfección [7.27] o incluso para distinguir células cancerígenas con distinta actividad metastásica [7.28]. Los materiales con características topográficas controladas resultan de interés en el área de la ingeniería de tejidos y regeneración celular, ya que pueden utilizarse para dirigir la movilidad celular y favorecer el cerrado de heridas [7.29, 7.30].

En este capítulo se utilizarán substratos microestructurados con ranuras con distintos períodos para obtener frentes de CQLs de células A549 con ángulo de inclinación constante respecto a las ranuras. La velocidad de propagación de las colonias con distintos ángulos de inclinación permitirá probar la existencia del término no lineal en el modelo que describe la evolución de la rugosidad.

7.2. Resultados y discusión

La influencia de las microranuras en la orientación y movilidad de las células A549 dependió de la separación entre las crestas. Los períodos g1 y g2 (de 11.2 y 10 micras) prácticamente no afectaron la orientación y movilidad celular. Los períodos g3, g4 y g5 (de 6.6, 5.2 y 3.3 micras, respectivamente) influyeron considerablemente en la movilidad de las células. El mayor efecto se observó para el período g5, por lo que se lo utilizó para orientar el movimiento celular a distintos ángulos con respecto al frente de la colonia (Figura 7.2).

En la figura 7.2 se muestra una CQL con un ángulo de inclinación de 45 ° con respecto a las microranuras. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran la distancia de separación entre las crestas y valles, cuya profundidad es de 540 nm. Las imágenes

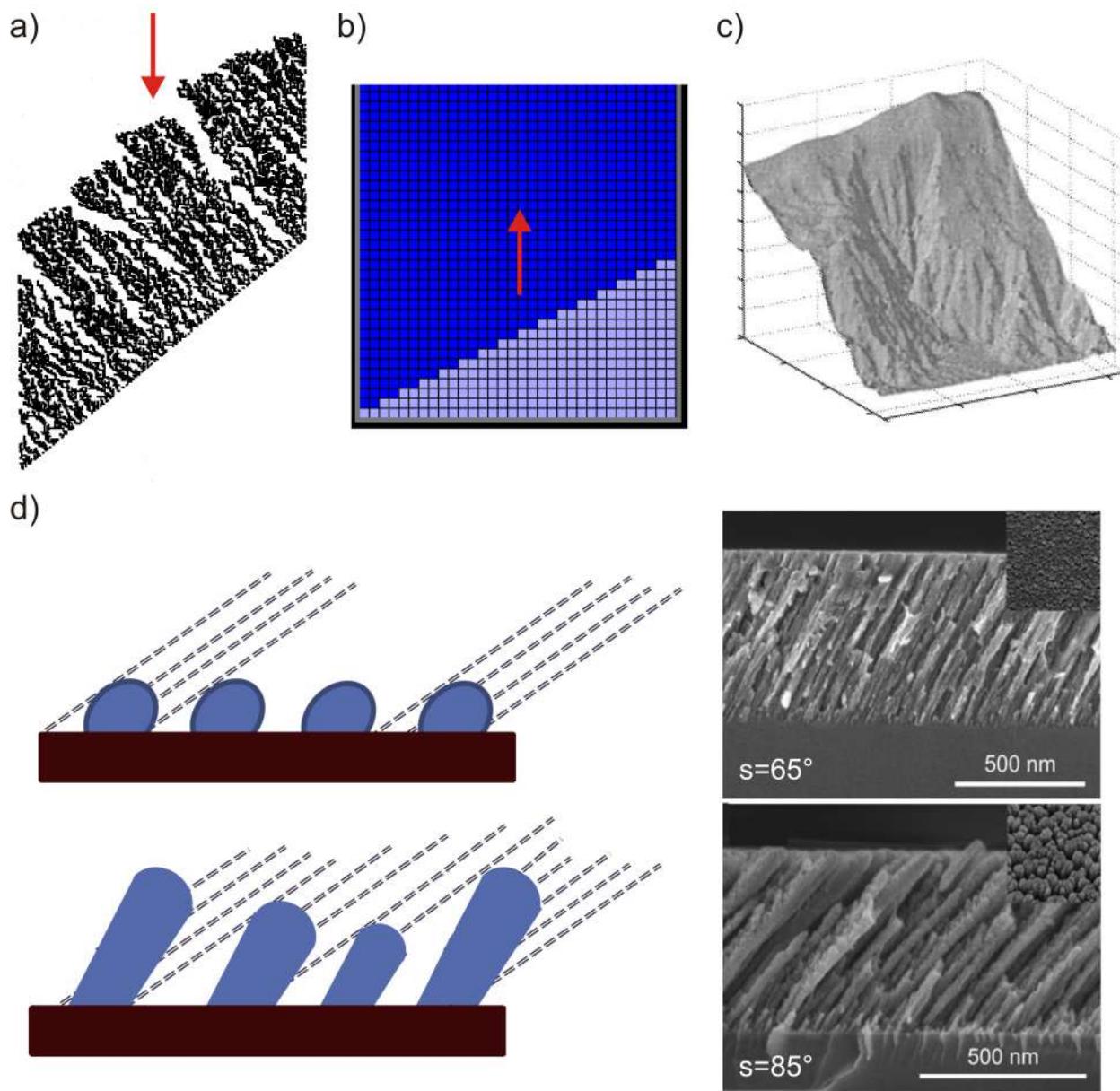


Figura 7.1: Interfases creciendo con ángulo de inclinación constante. Simulación de la deposición balística de partículas (a) y del crecimiento de una colonia de células (b). Las flechas rojas indican la dirección en que se depositan las partículas o en la que avanza la colonia. Mapa digital de un cañón submarino de la costa de Oregón (c) y deposición con ángulo oblícuo de una película de TiO_2 (d). Puede observarse que a medida que aumenta el ángulo de deposición, las protrusiones son más anchas. Adaptado de [7.8, 7.16–7.18].

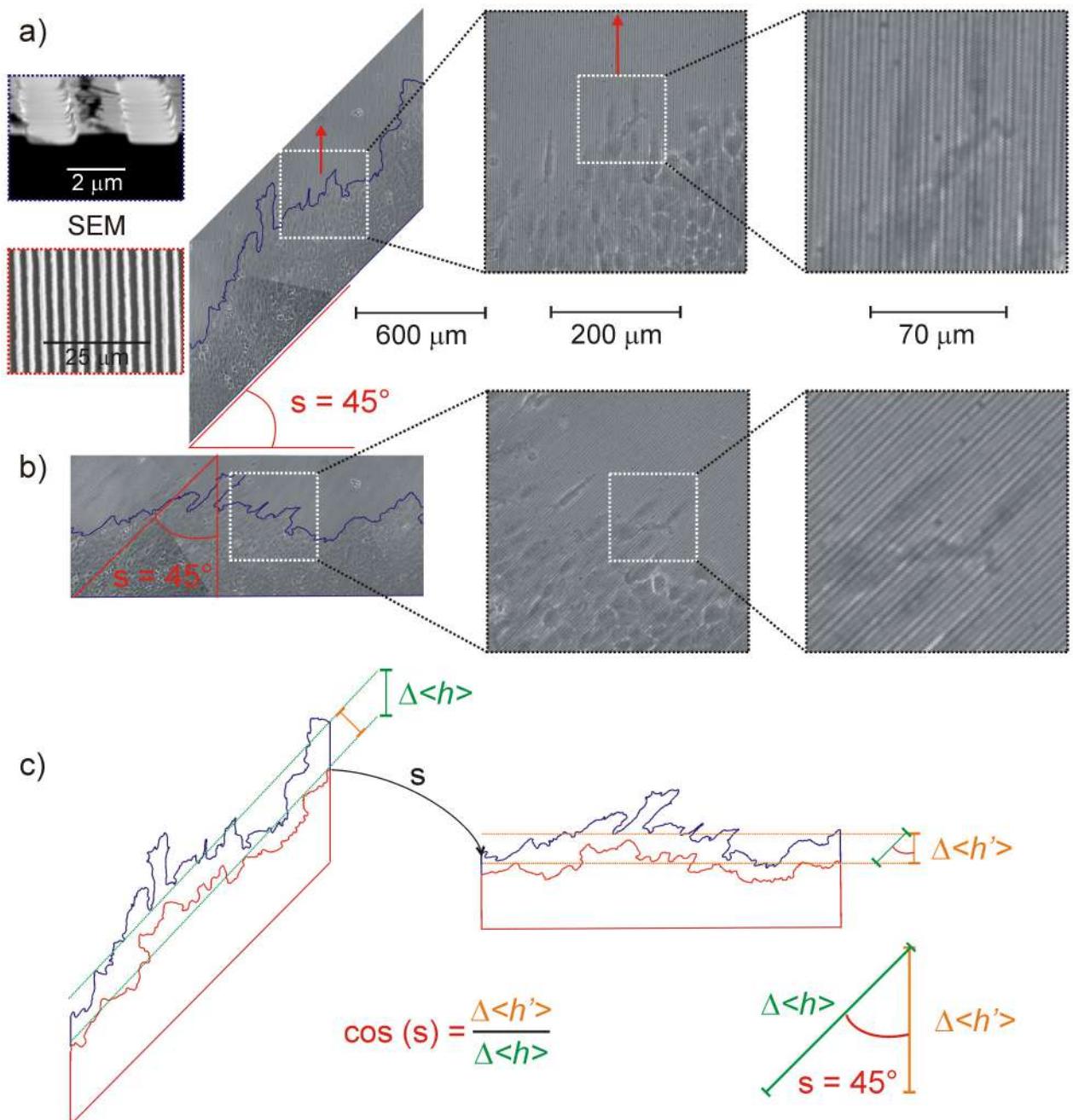


Figura 7.2: a) CQL de células A549 propagándose con un ángulo de inclinación constante sobre un substrato con microranuras, con $s = 45^\circ$. La flecha roja indica la dirección de avance del frente. Se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de las microranuras con período g5. b) La interfase puede rotarse para facilitar el análisis del contorno. Las imágenes aumentadas permiten observar las microranuras y el efecto que producen en la orientación de las células. c) Al analizar la diferencia de alturas promedio de las interfasas rotadas ($\langle \Delta h' \rangle$), estas deben corregirse con s para obtener el valor $\langle \Delta h \rangle$ deseado.

aumentadas permiten observar que la orientación de las células y de las protrusiones se ve influenciada por la presencia de las microranuras (Figura 7.2). La imagen de la colonia puede rotarse en el ángulo s para analizar el frente del mismo modo que se hacía con los frentes de las CQLs de los capítulos 1, 2 y 3 (Figura 7.2b). Es importante notar que las diferencias de alturas entre las imágenes rotadas ($\langle \Delta h' \rangle$) deben corregirse con el $\cos(s)$ para obtener las diferencias de alturas ($\langle \Delta h \rangle$, Figura 7.2c) que se utilizan para calcular $\langle V_F \rangle$.

7.2.1. Características morfológicas

En la figura 7.3 se muestra el contorno de CQLs propagándose con distintos ángulos de inclinación a $t = 1865$ min. El L de las distintas interfases consideradas varía porque se seleccionaron aquellas colonias o segmentos de colonia que a $t = 0$ min tuvieran una rugosidad ~ 0 (es decir, sean planas) y permitan un análisis más fehaciente de la velocidad de propagación del frente. Además, el substrato microestructurado tiene un área de $20 \times 4 \text{ mm}^2$ y a medida que se aumenta el ángulo de inclinación la región que puede cubrir la colonia disminuye.

Puede observarse que a medida que aumenta s , aumenta la inclinación de las protrusiones con respecto a una recta normal a la interfase inicial (Figura 7.3). Los frentes con $s = 0^\circ$ presentan numerosas protrusiones angostas, que se van ensanchando a medida que aumenta la inclinación de la interfase. El ancho de las protrusiones medido a $100 \mu\text{m}$ del borde de la colonia aumenta de $64 \pm 5 \mu\text{m}$ a $(34 \pm 9) \times 10^1 \mu\text{m}$ yendo de $s = 0^\circ$ a $s = 60^\circ$ (Tabla 7.1). Este ensanchamiento de las protrusiones al aumentar s se reportó también para otros sistemas experimentales [7.18]. La rugosidad de la interfase disminuye considerablemente al aumentar la inclinación. Los frentes con $s = 0^\circ$ tienen una rugosidad de $74.0 \mu\text{m}$ y para aquellos con $s = 60^\circ$ es de $46.3 \mu\text{m}$ (Tabla 7.1).

	0°	12°	25°	45°	60°
Ancho protrusiones / $10^{-1} \mu\text{m}$	6.4 ± 0.5	11 ± 3	19 ± 5	27 ± 6	34 ± 9
Rugosidad / μm	74.0	71.7	69.4	60.8	46.3
Relación de aspecto	3.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1

Tabla 7.1: Aspectos morfológicos de las colonias y las células de CQLs propagándose con distintos ángulos de inclinación. Ancho de las protrusiones medido a $100 \mu\text{m}$ del borde, rugosidad de la interfase y relación de aspecto de las células del borde.

En las figuras 7.4 y 7.5 se muestran colonias propagándose con ángulos de inclinación extremos, de 0° y 70° , respectivamente. La colonia propagándose con $s = 0^\circ$ tiene una interfase con numerosos picos agudos y células de morfología rugosa claramente influenciadas por la presencia de las microranuras. Por otro lado, con $s = 70^\circ$ la interfase presenta protrusiones más suaves y las células, si bien en muchos casos orientadas con las microranuras, no tienen tantas prolongaciones citoplasmáticas ni un contorno tan rugoso como con $s = 0^\circ$.

La morfología de las células en la región del borde de la colonia se ve afectada por el ángulo de inclinación de las microranuras respecto a la interfase de la colonia, siendo más ahusadas cuanto menor es s . La relación de aspecto de las células en el borde de las colonias con $s = 0^\circ$ es de 3.9 ± 0.2 , disminuyendo a valores menores de la mitad (1.8 ± 0.1) cuando $s = 60^\circ$. Además, la interacción con células vecinas tiende a disminuir a la vez que tienden a bifurcar sus prolongaciones sobre las crestas del substrato microestructurado cuando s es pequeño (imágenes aumentadas de la Figura 7.4).

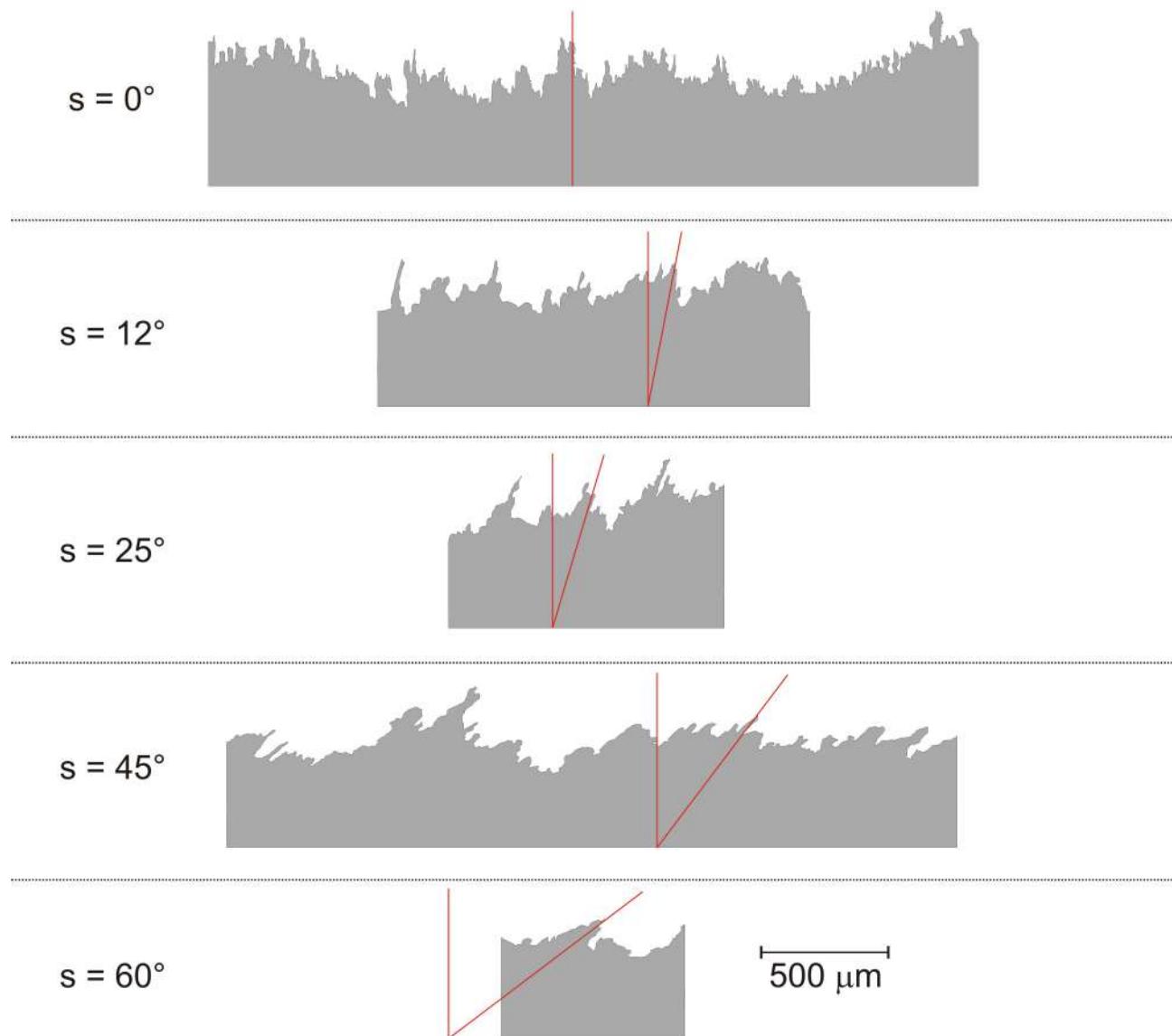


Figura 7.3: Contornos de colonias propagándose con distintos ángulos de inclinación. $t = 1865$ min. Las líneas rojas hacen notar la inclinación de las protrusiones a medida que s aumenta.

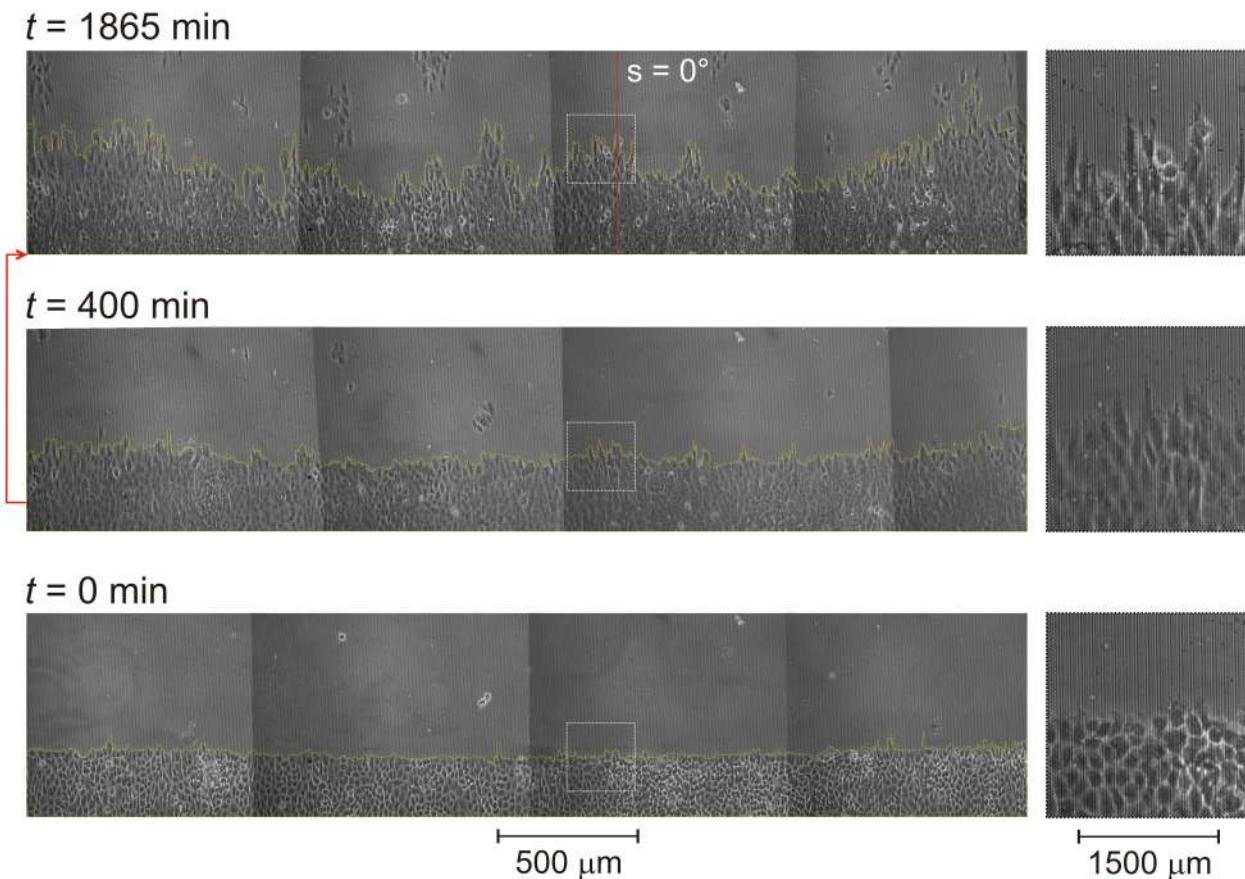


Figura 7.4: Secuencia de imágenes de una CQL propagándose con una inclinación $s = 0^\circ$. La región dentro del cuadrado se muestra aumentada 3 veces.

Los datos morfológicos de las interfases, protrusiones y células indican que un mayor s parece favorecer una cobertura del espacio libre de una manera más densa y homogénea.

7.2.2. Velocidad promedio del frente en función del ángulo de inclinación de la interfase (s)

El ángulo de inclinación de la interfase tiene una gran influencia en la velocidad de avance del frente. En la figura 7.6 se observa una relación cuadrática entre la $\langle V_F \rangle$ y s , tal como se esperaba según la ecuación (7.1) para una interfase que tiene un componente de crecimiento lateral. De la ecuación cuadrática de ajuste puede calcularse el valor de λ , que resulta ser para estas condiciones $5.2 \times 10^{-5} \mu\text{m min}^{-1} \text{ grado}^{-2}$. Esto prueba por primera vez experimentalmente la existencia de un término no lineal en la propagación de la interfase de colonias de células tumorales y valida la aplicación del modelo estándar de KPZ, cuya ecuación es:

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \frac{\lambda}{2} \nabla h^2 + \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad (7.2)$$

El término no lineal de la ecuación (7.2) implica la presencia de crecimiento lateral o en dirección normal “local” a la interfase. A diferencia del término lineal, que reorganiza la materia de la interfase manteniendo la $\langle h \rangle$ constante, el término no lineal aumenta la $\langle h \rangle$ agregando materia a la interfase si $\lambda > 0$, como en el caso de la propagación de CQLs de células A549. Es necesario realizar más experimentos para poder relacionar los cambios en

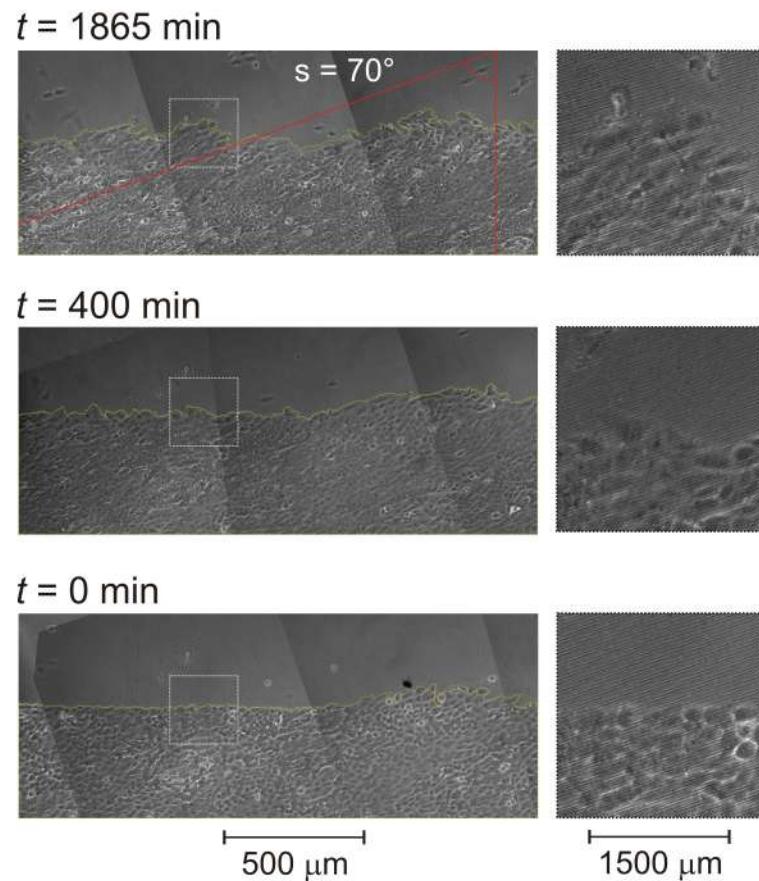


Figura 7.5: Secuencia de imágenes de una CQL propagándose con una inclinación $s = 70^\circ$. La región dentro del cuadrado se muestra aumentada 3 veces.

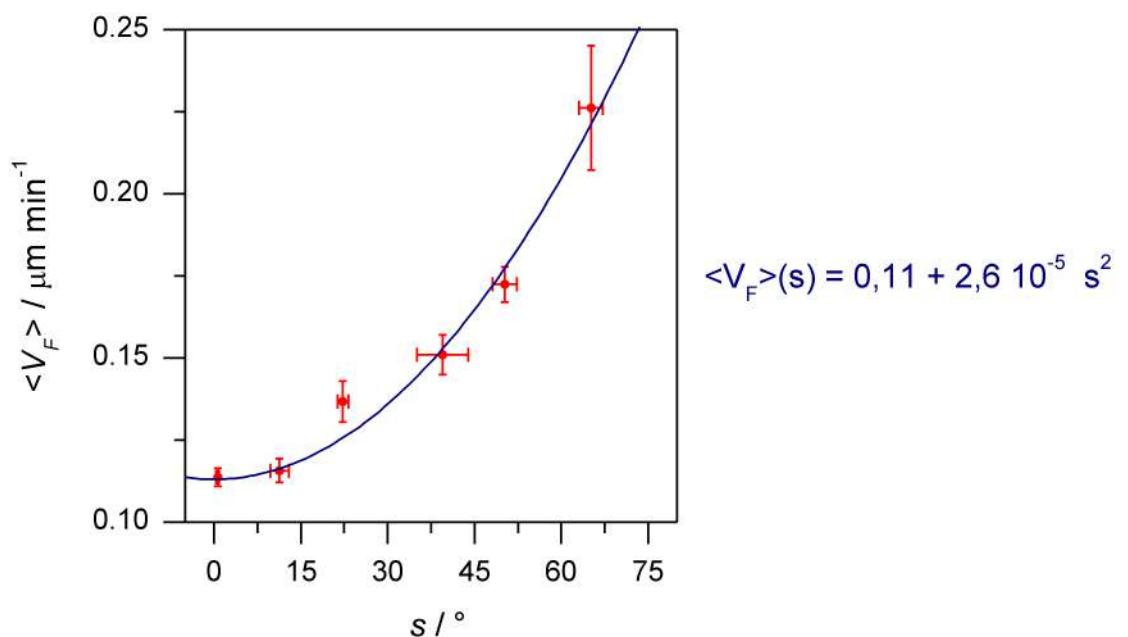


Figura 7.6: $\langle V_F \rangle$ en función del ángulo de inclinación de la interfase. Se muestra la ecuación de segundo grado que ajusta los datos experimentales.

las morfologías, densidades y trayectorias celulares con el aumento en la $\langle V_F \rangle$ a medida que aumenta la inclinación de la interfase y probar si el diseño experimental satisface las condiciones del modelo más allá de posibles coincidencias fortuitas.

7.3. Conclusiones

La utilización de substratos microestructurados permite, al menos en cierto intervalo de tiempo, obtener colonias quasi lineales que se propagan con ángulo de inclinación constante. Las microranuras afectan tanto la morfología de las células como la morfología de la interfase. Las células se orientan y desplazan influenciadas por el ángulo de inclinación de las microranuras, del mismo modo que las protrusiones del contorno de la colonia.

Al aumentar el ángulo de inclinación los frentes cubren el espacio libre de una manera más densa y homogénea. Además, también aumenta la velocidad de propagación de la interfase. Estos hechos resultan muy interesantes para el desarrollo de nuevos materiales de utilidad en la regeneración celular y el sanado de heridas, donde no sólo es necesario favorecer el rápido cerrado de heridas sino también controlar la integridad del tejido formado.

La relación cuadrática entre la $\langle V_F \rangle$ y s prueba la existencia de una contribución lateral en la propagación de la interfase de colonias de células A549 y permite calcular el valor de λ en estas condiciones. Este sistema experimental podría aplicarse a otras líneas celulares de características epiteliales similares a las A549. Los resultados obtenidos junto con los exponentes calculados para otras líneas celulares mediante el análisis de escalado dinámico corroboran que, al menos en ciertos intervalos de L y t , la propagación del frente de colonias celulares puede interpretarse con la ecuación estándar de KPZ. Esta información puede ayudar a comprender los procesos generales que tienen lugar en la propagación de las colonias y aportar al desarrollo de nuevos modelos, simulaciones, biomateriales o estrategias terapeúticas.

Bibliografía

- [7.1] G. Van de Vijver, L. Van Speybroeck & W. Vandevyvere. “Reflecting on complexity of biological systems: Kant and beyond?” *Acta Biotheoretica*, 2003. **51**(2), 101–140. (Citado en página 267.)
- [7.2] Y. Bar-Yam. “The dynamics of complex systems”. *The Advanced Book Studies in Nonlinearity series*, 1997. página 849. (Citado en página 267.)
- [7.3] L. P. Freedman, M. C. Gibson, S. P. Ethier, H. R. Soule, R. M. Neve & Y. A. Reid. “Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication”. *Nature Methods*, 2015. **12**(6), 493–497. (Citado en página 267.)
- [7.4] M. J. Briske-Anderson, J. W. Finley & S. M. Newman. “The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1997. **214**(3), 248–57. (Citado en página 267.)
- [7.5] X. Zheng, H. Baker, W. S. Hancock, F. Fawaz, M. McCaman & E. Pungor. “Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs”. *Biotechnology Progress*, 2008. **22**(5), 1294–1300. (Citado en página 267.)
- [7.6] L. Pelkmans. “Using Cell-to-Cell Variability—A New Era in Molecular Biology”. *Science*, 2012. **336**(6080), 425–426. (Citado en página 267.)
- [7.7] D. L. Vaux. “Know when your numbers are significant”. *Nature*, 2012. **492**, 180–181. (Citado en página 267.)
- [7.8] A. L. Barabasi & H. E. Stanley. *Fractal concepts in surface growth*. Cambridge University Press, 1995. (Citado en páginas 37, 41, 42, 43, 113, 122, 146, 173, 174, 267, 268 y 269.)
- [7.9] K. A. Takeuchi & M. Sano. “Universal Fluctuations of Growing Interfaces: Evidence in Turbulent Liquid Crystals”. *Physical Review Letters*, 2010. **104**(23), 230601. (Citado en páginas 43, 114 y 267.)
- [7.10] S. G. Alves, S. C. Ferreira & M. L. Martins. “Strategies for Optimize Off-Lattice Aggregate Simulations”. *Brazilian Journal of Physics*, 2008. **38**(1), 6. (Citado en página 267.)
- [7.11] M. A. Rubio, C. A. Edwards, A. Dougherty & J. P. Gollub. “Self-affine fractal interfaces from immiscible displacement in porous media”. *Physical Review Letters*, 1989. **63**(16), 1685–1688. (Citado en página 267.)

- [7.12] V. K. Horváth, F. Feredey & T. Vicsek. “Dynamic scaling of the interface in two-phase viscous flows in porous media”. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 1991. **24**(1), L25. (Citado en página 267.)
- [7.13] S. He, G. L. M. K. S. Kahanda & P. Z. Wong. “Roughness of wetting fluid invasion fronts in porous media”. *Physical Review Letters*, 1992. **69**(26), 3731–3734. (Citado en página 267.)
- [7.14] R. Albert, A.-L. Barabási, N. Carle & A. Dougherty. “Driven interfaces in disordered media: determination of universality classes from experimental data”. *Physical Review Letters*, 1998. **81**(14), 2926–2929. (Citado en páginas 267 y 268.)
- [7.15] L. A. N. Amaral, A. L. Barabási & H. E. Stanley. “Universality classes for interface growth with quenched disorder”. *Physical Review Letters*, 1994. **73**(1), 62–65. (Citado en página 268.)
- [7.16] B. Moglia. *Estudio computacional de la dinámica del crecimiento celular: buscando el comportamiento universal*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, 2015. (Citado en páginas 268 y 269.)
- [7.17] R. Pastor-Satorras & D. H. Rothman. “Scaling of a Slope: The Erosion of Tilted Landscapes”. *Journal of Statistical Physics*, 1998. **93**(3/4), 477–500. (Citado en páginas 268 y 269.)
- [7.18] A. Barranco, A. Borras, A. R. Gonzalez-Elipe & A. Palmero. “Perspectives on oblique angle deposition of thin films: From fundamentals to devices”. *Progress in Materials Science*, 2016. **76**, 59–153. (Citado en páginas 268, 269 y 271.)
- [7.19] M. B. M. Spera, T. B. Taketa & M. M. Beppu. “Roughness dynamic in surface growth: Layer-by-layer thin films of carboxymethyl cellulose/chitosan for biomedical applications”. *Biointerphases*, 2017. **12**(4), 04E401. (Citado en página 268.)
- [7.20] M. Eisen. *Mathematical Models in Cell Biology and Cancer Chemotherapy*. Springer, Berlin, 1979. (Citado en página 268.)
- [7.21] H. Herzl & N. Blüthgen. “Mathematical models in mammalian cell biology.” *Genome biology*, 2008. **9**(7), 316. (Citado en página 268.)
- [7.22] H. P. Fischer. “Mathematical modeling of complex biological systems: from parts lists to understanding systems behavior.” *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 2008. **31**(1), 49–59. (Citado en página 268.)
- [7.23] C. Bettinger, R. Langer & J. Borenstein. “Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function”. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(30), 5406–5415. (Citado en página 268.)
- [7.24] D. H. Kim, P. P. Provenzano, C. L. Smith & A. Levchenko. “Matrix nanotopography as a regulator of cell function”. *The Journal of Cell Biology*, 2012. **197**(3), 351–360. (Citado en páginas 232 y 268.)

- [7.25] W. T. Su, Y. F. Liao, T. W. Wu, B. J. Wang & Y. Y. Shih. “Microgrooved patterns enhanced PC12 cell growth, orientation, neurite elongation, and neuritogenesis”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013. **101A**(1), 185–194. (Citado en página 268.)
- [7.26] H. Gao, X. Cao, H. Dong, X. Fu & Y. Wang. “Influence of 3D Microgrooves on C2C12 Cell Proliferation, Migration, Alignment, F-actin Protein Expression and Gene Expression”. *Journal of Materials Science and Technology*, 2016. **32**(9), 901–908. (Citado en página 268.)
- [7.27] P.-Y. Wang, Y.-S. Lian, R. Chang, W.-H. Liao, W.-S. Chen & W.-B. Tsai. “Modulation of PEI-Mediated Gene Transfection through Controlling Cytoskeleton Organization and Nuclear Morphology via Nanogrooved Topographies”. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017. (Citado en página 268.)
- [7.28] S. F. Zhou, S. Gopalakrishnan, Y. H. Xu, S. K. Y. To, A. S. T. Wong, S. W. Pang & Y. W. Lam. “Substrates with patterned topography reveal metastasis of human cancer cells”. *Biomedical Materials*, 2017. **12**(5), 055001. (Citado en página 268.)
- [7.29] P. Sharma, C. Ng, A. Jana, A. Padhi, P. Szymanski, J. S. H. Lee, B. Behkam & A. S. Nain. “Aligned fibers direct collective cell migration to engineer closing and nonclosing wound gaps”. *Molecular Biology of the Cell*, 2017. **28**(19), 2579–2588. (Citado en página 268.)
- [7.30] Q. Zhang, H. Dong, Y. Li, Y. Zhu, L. Zeng, H. Gao, B. Yuan, X. Chen & C. Mao. “Microgrooved polymer substrates promote collective cell migration to accelerate fracture healing in an in vitro model”. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. **7**(41), 23336–23345. (Citado en página 268.)

Conclusiones generales

A lo largo de esta tesis se utilizaron técnicas de cultivo celular para estudiar diversos aspectos del crecimiento y expansión de sistemas celulares y distintas propiedades de materiales biocompatibles. Teniendo en cuenta que las células no son entes estáticos, sino que sensan los cambios en su entorno y responden a ellos cambiando su fenotipo y el ambiente que las rodea, se intentó modificar la forma en que las células interactúan entre ellas y con el entorno. Por este motivo se trabajó con células individuales o con sistemas formados por agregados quasi circulares o quasi lineales de distintas densidades y poblaciones celulares. Además, el entorno de las células se modificó de diversas maneras para estudiar cómo los cambios realizados afectaban el fenotipo de las células y las características de las colonias. El medio de cultivo se modificó por adición de espesantes o agentes solubles con bioactividad. El substrato sobre el que se sembraron las células se modificó mediante multicapas de polielectrolitos o mediante el control de su topografía. Los distintos sistemas de estudio se analizaron en diferentes escalas de espacio y tiempo, yendo desde eventos celulares como la adhesión, la migración o la proliferación, a fenómenos globales como el avance de la interfase de las colonias y su dinámica de rugosado.

Los resultados obtenidos muestran que la formación y la propagación de los sistemas celulares dependen de las interacciones de las células entre sí y con el entorno. La capacidad de las células de formar colonias confluentes depende de la adhesión de las células al substrato, que condiciona la morfología del citoplasma y el conjunto de señales que se originan en la interacción. Este comportamiento depende del tipo de célula. Una vez formadas, la propagación de las colonias va acompañado de la aparición de diversas heterogeneidades espacio-temporales que determinan tanto la dinámica de crecimiento global de la colonia como las características locales y el fenotipo de las células. La modificación de las condiciones de crecimiento, por ejemplo por agregado de factor de crecimiento epidérmico o de metil celulosa, afectó características de las células como la morfología, la tasa de duplicación y la movilidad. Estos cambios se tradujeron en cambios en la cinética de crecimiento de las colonias y en la dinámica de rugosado.

En varios capítulos de esta tesis se compararon resultados experimentales con los obtenidos empleando distintos modelos matemáticos, como el modelo de Potts o sus variantes, modelos multiescala y modelos continuos que permitieron una mejor descripción de los fenómenos intervenientes. La vinculación entre el trabajo experimental y el teórico resulta muy enriquecedora para ambos. Mientras los resultados experimentales permiten poner a prueba las predicciones de los modelos teóricos y mejorarlos, la teoría puede ayudar a generar nuevas hipótesis, a describir aspectos mecanísticos y a realizar pruebas que experimentalmente resultan difíciles. En esta tesis, la conjunción de modelos y experimentos permitió profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos mecanísticos a nivel celular y en la escala de las colonias celulares, que resultan de interés para describir procesos fisiológicos y patológicos.

La modificación inteligente de la superficie en contacto con las células permite controlar

diversos aspectos de la vida celular, como la adhesión, la proliferación, la migración o la diferenciación. La técnica de capa por capa utilizada en esta tesis resultó una manera sencilla, robusta y reproducible de generar películas biocompatibles sobre las que se sembraron las células. La utilización de distintos polielectrolitos sintéticos y naturales permitió describir cómo la composición de las películas afecta la adhesión y la proliferación celular. La fabricación de películas heterogéneas, combinando polielectrolitos sintéticos y naturales formando bloques, permitió disponer de una alta biocompatibilidad resultante de mejorar la adhesión celular modulando las propiedades mecánicas mediante un polielectrolito sintético en capas internas y manteniendo una alta proliferación mediante un conjunto de capas formadas por polielectrolitos naturales. Otra manera de modificar las propiedades de las películas es mediante tratamientos pos ensamblado. Se encontró que el tratamiento térmico (recocido) de las películas poliméricas luego del secado permite cambiar sus propiedades fisicoquímicas, tales como mojabilidad, rigidez, potencial zeta, adsorción proteica y modular así la adhesión celular. Las multicapas de polielectrolitos son sistemas fuera del equilibrio y el aumento de temperatura favorece la movilidad de las cadenas para alcanzar un estado de menor energía. Este proceso es similar al que ocurre durante el tratamiento térmico de los metales y aleaciones que alcanzan estructuras más estables. En el caso de las películas de polielectrolitos se encontró que el contenido de agua juega un papel importante en el efecto que produce el tratamiento térmico. Estos resultados deben tenerse en cuenta para cualquier sistema supramolecular en general. Además de los potenciales usos y aplicaciones en la ciencia de los materiales despierta numerosas interrogantes: ¿Las propiedades de las muestras fabricadas cambian con el tiempo? ¿Cuándo es mejor medirlas? ¿En caso de no poder medirlas en el momento, cuál es la mejor manera de conservarlas?

El control de las propiedades fisicoquímicas del substrato permite “dirigir” el destino celular, por lo que resulta de interés tanto en el desarrollo de protocolos mejorados para la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, como también en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o como plataforma de análisis de las propiedades celulares. Las características fisicoquímicas y bioquímicas del entorno celular afectan en forma compleja el fenotipo celular. El control adecuado de las propiedades de los materiales permite, por un lado, generar sistemas inteligentes para inducir determinado fenotipo celular, y por el otro, separar para su estudio determinados procesos que contribuyen al mecanismo global que describe la evolución del sistema. Por ejemplo, la utilización de substratos microestructurados permitió por primera vez analizar empíricamente la validez del modelo de crecimiento utilizado para describir la propagación de la interfase de sistemas multicelulares. La orientación de las microranuras respecto al contorno de la interfase afecta la velocidad de propagación de las colonias. La dependencia de esta última con el ángulo de inclinación de las microranuras está de acuerdo con el modelo de crecimiento propuesto. Esto es una muestra de que para abordar ciertos tipos de problemas resulta necesario un enfoque interdisciplinario que reúna herramientas de la biología, la química y la física.

Los resultados presentados en esta tesis abren numerosas perspectivas. Los sistemas utilizados podrían combinarse para modificar el entorno celular de maneras más complejas. Podría modificarse la reología del medio de cultivo junto con el substrato, ya sea mediante microranuras o mediante multicapas de polielectrolitos. O estas últimas podrían ensamblarse intercalando en algunas capas factor de crecimiento epidérmico para tener una liberación local y controlada de la droga. El gradiente de temperatura podría utilizarse para intentar controlar la orientación y migración de las células sembradas sobre una multicapa de polielectrolitos. El efecto de la temperatura parece ser general y se espera poder aplicarlo a otros sistemas poliméricos más allá de los obtenidos por la técnica de capa por capa. También podría ensamblarse una multicapa de polielectrolitos sobre un substrato microestructurado

y ver como influyen en forma combinada la topografía y el recocido. Además de la adhesión, migración y proliferación celular, podrían estudiarse otros procesos celulares como la diferenciación. En las condiciones adecuadas, las células C2C12 y MC-3T3 pueden diferenciarse a miotubos y osteoblastos, respectivamente. Las características del substrato (como la topografía o la rigidez) y del medio (como la presencia de ciertos iones o biomoléculas) pueden modular el proceso de diferenciación.

En resumen, esta tesis aporta al conocimiento de los procesos involucrados en la propagación y expansión de sistemas celulares constituidos por células aisladas o colonias confluentes. Se utilizaron entornos celulares convencionales o modificados adecuadamente por el agregado de sustancias con distinta actividad biológica o utilizando substratos poliméricos con propiedades fisicoquímicas controladas que permitieron modular distintas características de la adhesión celular. Se utilizaron y discutieron los sistemas considerando aproximaciones provenientes de distintas disciplinas: técnicas de cultivo celular, de la ciencia de materiales y de la física estadística.

Lista de trabajos publicados o en preparación

Publicados

- “Tailored polyelectrolyte thin film multilayers to modulate cell adhesion”.
Biointerphases, **12**(4):04E403, 2017.
- “Enhanced antiadhesive properties of chitosan/hyaluronic acid polyelectrolyte multilayers driven by thermal annealing: low adherence for mammalian cells and selective decrease in adhesion for Gram-positive bacteria”.
Materials Science and Engineering: C, **80**:677–687, 2017.
- “Thermal Annealing of Polyelectrolyte Multilayers: An Effective Approach for the Enhancement of Cell Adhesion”.
Advanced Materials Interfaces, **4**(1):1600126, 2017.
- “Impact of thermal annealing on wettability and antifouling characteristics of alginate poly-L-lysine polyelectrolyte multilayer films”.
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **145**:328–337, 2016.
- “Spatio-temporal morphology changes in and quenching effects on the 2D spreading dynamics of cell colonies in both plain and methylcellulose-containing culture media”.
Journal of Biological Physics, **42**(3):477-502, 2016.
- “Polyelectrolytes Multilayers to Modulate Cell Adhesion: A Study of the Influence of Film Composition and Polyelectrolyte Interdigitation on the Adhesion of the A549 Cell Line”.
Macromolecular Bioscience, **16**(4):482–495, 2016
- “Dynamic scaling analysis of two-dimensional cell colony fronts in a gel medium: A biological system approaching a quenched Kardar-Parisi-Zhang universality”.
Physical Review E, **90**(2):022706, 2014.
- “Influence of individual cell motility on the 2D front roughness dynamics of tumour cell colonies”.
Journal of biological physics, **40**(3):285–308, 2014.

En preparación

- “Morphology and dynamic aspects of tumour cell colonies propagating in epidermal growth factor supplemented medium”
- “Experimental evidence of the non linear term in the interface propagation of tumour cells colonies on microgrooved substrates”